



Vývoj nanovláknenných nosičů pro biomedicínské aplikace

Disertační práce

Studijní program:

P3106 Textilní inženýrství

Studijní obor:

Textilní technika a materiálové inženýrství

Autor práce:

Ing. Iveta Danilová

Školitel práce:

doc. Mgr. Irena Lovětinská-Šlamborová, Ph.D.
Katedra chemie



Prohlášení

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

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

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci nezasahuje do mých autorských práv užitím mé disertační práce pro vnitřní potřebu Technické univerzity v Liberci.

Užiji-li disertační práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti Technickou univerzitu v Liberci; v tomto případě má Technická univerzita v Liberci právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

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

Beru na vědomí, že má disertační práce bude zveřejněna Technickou univerzitou v Liberci v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů.

Jsem si vědoma následků, které podle zákona o vysokých školách mohou vyplývat z porušení tohoto prohlášení.

11. května 2020

Ing. Iveta Danilová

Abstrakt

Disertační práce je věnována vývoji a testování materiálu pro enzymatický debridement. Konkrétně se jedná o optimalizaci postupu imobilizace proteolytických enzymů na křemičitá nanovlákná. Tímto způsobem upravená nanovlákná mají sloužit k bezbolestnému odstranění nekrotické tkáně díky proteolytické aktivitě enzymů, která katalyzuje odštěpení nekrózy od zdravé spodiny rány.

Hlavním úkolem je na základě rozsáhlé rešerše, dostupných technik a analyzačních přístrojů vytvořit vhodný postup kovalentní imobilizace enzymů na nanovlákná a vybrat nejlepší proteolytický enzym. Zvolený postup byl vždy porovnáván s již známým, ale pro medicínu nevyhovujícím postupem, který využívá (3-Aminopropyl)triethoxysilan a glutaraldehyd. Z hlediska techniky imobilizace byl nejpodrobněji testován postup s využitím (3-Aminopropyl)triethoxysilanu, sukcinanhydridu a následně esteru vytvořeného z N-hydroxysukcinimidu a 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu. Protože výsledky testů cytotoxicity prováděných na myších 3T3 fibroblastech nebyly v případě výše uvedeného postupu uspokojivé, byl vyvinut ještě další postup imobilizace, ve kterém byl 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid nahrazen N,N'-Disuccinimidyl karbonátem.

V druhé části výzkumu jsem imobilizovala na nanovlákná postupně 7 proteolytických enzymů. Jejich proteolytická aktivita byla měřena pomocí spektrofotometrických metod a byla testována za různých podmínek – změny hodnoty pH, teploty, vlivu teploty na stabilitu enzymů apod. Jako nejvhodnější enzym byl označen trypsin z hovězího pankreatu, výborných výsledků bylo dosaženo také s proteázou z *Aspergillus oryzae*.

Účinnost vytvořených nanovláken s imobilizovaným enzymem byla ověřena pomocí in vitro testů na prasečí kůži. Úspěšná imobilizace byla potvrzena v rámci testů stability vzorků – při dodržení navrhovaných podmínek skladování, trypsin i po 180 dnech vykazoval více jak 90% proteolytickou aktivitu.

Klíčová slova

Debridement; Imobilizace enzymů; Proteolytický enzym; Křemičitá nanovlákná; Odstranění nekrózy

Abstract

The dissertation is devoted to the development and testing of the material for an enzymatic debridement. Specifically, it is about optimizing the process of proteolytic enzymes immobilization onto silica nanofibers. The nanofibers treated in this way are intended to painlessly removal of the necrotic tissue due to the proteolytic activity of the enzymes, which catalyze the cleavage of necrosis from the healthy base of the wound.

The main aim is to optimize a suitable procedure for the covalent immobilization of enzymes onto nanofibers and to choose the best proteolytic enzyme on the basis of an extensive testing, available techniques and analysis devices. The chosen procedure was always compared with the already known but unsuitable procedure for medicine, which uses (3-Aminopropyl) triethoxysilane and glutaraldehyde. In terms of the immobilization process, the procedure using (3-Aminopropyl) triethoxysilane, succinic anhydride and subsequently an ester formed from N-hydroxysuccinimide and 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide was tested in the most detail. Because the results of the cytotoxicity assays performed on mouse 3T3 fibroblasts were not satisfactory, another immobilization procedure was developed in which 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide was replaced by N,N'-Disuccinimidyl carbonate.

In the second part of the research, I immobilized 7 proteolytic enzymes onto nanofibers surface. By spectrophotometric methods was measured their proteolytic activity and was tested it under various conditions - changes of pH value and temperature, the effect of temperature on the enzymes stability, etc. Trypsin from bovine pancreas was identified as the most suitable enzyme, excellent results were also obtained with the protease from *Aspergillus oryzae*.

The efficacy of the created nanofibers with immobilized enzyme was verified by in vitro tests on pig skin. Successful immobilization process was confirmed in sample stability tests - under the proposed storage conditions, trypsin showed more than 90% proteolytic activity even after 180 days from immobilization.

Keywords

Debridement; Immobilization of enzymes; Proteolytic enzyme; Silica nanofibers, Removing of necrosis

Poděkování

Děkuji paní doc. Ireně Lovětinské-Šlamborové, Ph.D. za vedení mé disertační práce a panu doc. Ing. Petru Exnarovi, CSc. za přínosné konzultace. Ráda bych také poděkovala zaměstnancům Katedry netkaných textilií TUL, kteří mi pomáhali s některými testy cytotoxicity (jmenovitě Ing. Šárce Hauzerové a Ing. Terezce Švarcové). Mé velké díky patří také pánům z Katedry materiálů TUL – Ing. Pavlovi Kejzlarovi, Ph.D. a Ing. Lukášovi Voleskému, Ph.D., kteří mi byli nápomocni při zobrazování a analýze povrchu nanovláken. Dále bych ráda poděkovala Soně Rothové za přípravu a výrobu křemičitých nanovláken, Marcele Krejčíkové za provedení antibakteriálních testů (obě z Katedry chemie) a Mgr. Václavovi Bittnerovi z Katedry matematiky a didaktiky matematiky za pomoc se statistickým zpracováním výsledků. Z Fakulty zdravotnických studií děkuji nejen celému vedení, ale také kolegyni Mgr. Šárce Michetschlägerové za pomoc v tkáňové laboratoři při testech cytotoxicity.

V neposlední řadě děkuji mé rodině za podmínky, které mi vytvářela a vytváří proto, abych se mohla věnovat vždy tomu, čemu chci – i výzkumu inovativních materiálů určených pro dermální aplikace. Velice si toho vážím. Děkuji mému partnerovi za neuvěřitelnou podporu, dodaný optimismus a za to, že ve mě věří, ať přijdu s čímkoliv.

Obsah

SEZNAM ZKRATEK	8
1 ÚVOD	9
2 TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1 Léčba ran kůže	11
2.1.1 Vlastnosti a složení zdravé kůže	11
2.1.2 Rány obsahující nekrotickou tkáň	13
2.1.3 Fáze rány a aspekty, které hojení ovlivňují	13
2.2 Druhy debridementu	14
2.3 Enzymy využitelné k odstranění nekrotické tkáně	20
2.3.1 Základy enzymologie	20
2.3.2 Mechanismus účinku enzymů	21
2.3.3 Proteolytické enzymy	23
2.4 Imobilizace enzymů na substrát	27
2.4.1 Používané substráty pro imobilizaci enzymů	27
2.4.2 Způsoby imobilizace na substrát	28
2.4.3 Imobilizace pomocí glutaraldehydu	29
2.5 Využití nanovláken jako substrátu pro imobilizaci enzymů	32
2.5.1 Výroba křemičitých nanovláken	32
2.5.2 Stabilizace nanovláken pomocí teploty	34
3 PRAKTICKÁ ČÁST	35
3.1 Křemičitá nanovlákná a vliv teploty stabilizace na jejich vlastnosti	35
3.1.1 Vizualizace nanovláken.....	36
3.1.2 Charakterizace vlivu teploty stabilizace.....	41
3.2 Úprava povrchu nanovláken	43
3.2.1 Silanizace povrchu nanovláken	45
3.2.2 Funkcionalizace povrchu silanizovaných křemičitých nanovláken.....	48
3.2.3 Metoda úpravy nanovláken A-EDC	54
3.2.4 Metoda úpravy nanovláken B-DSC.....	55
3.2.5 Metoda úpravy nanovláken C-GLU	56
3.3 Imobilizace proteolytických enzymů	57
3.4 Testování proteolytické aktivity enzymů	58
3.4.1 Jednotky proteolytické aktivity	62
3.4.2 Testování proteolytické aktivity enzymů v závislosti na hodnotě pH	63
3.4.3 Testování proteolytické aktivity v závislosti na teplotě	65
3.5 Sterilizace vyrobených vzorků	66
3.5.1 Sterilizace UV zářením	66

3.5.2	Sterilizace ethylenoxidem	69
3.5.3	Sterilizace ethanolem	71
3.5.4	Sterilizace polyvalentními alkoholy	71
3.5.5	Sterilizace pomocí filtrace kapalin	72
3.6	Testování cytotoxicity vyrobených materiálů in vitro.....	73
3.6.1	Test viability buněk – metoda MTT	73
3.6.2	Test viability buněk – metoda cck-8	74
3.6.3	Test viability buněk – metoda AlamarBlue	74
3.7	Testování stability nanovláken s imobilizovanými enzymy	75
3.8	Testování rozpustnosti nanovláken s enzymy	76
3.9	Testování změny pH roztoku po louhování nanovláken s enzymy	77
3.10	In vitro testy na prasečí kůži	78
4	<i>VÝSLEDKY</i>.....	83
4.1	Vliv metody funkcionalizace, hodnoty pH a teploty na aktivitu enzymů.....	83
4.1.1	Vliv metody funkcionalizace nanovláken	83
4.1.2	Vliv hodnoty pH na proteolytickou aktivitu enzymů	89
4.1.3	Vliv teploty na proteolytickou aktivitu enzymů	90
4.2	Vliv metody imobilizace enzymů na cytotoxicitu.....	91
4.3	Vliv podmínek skladování na stabilitu imobilizovaných enzymů	96
5	<i>DOPORUČENÍ NA POKRAČOVÁNÍ VE VÝZKUMU</i>.....	98
6	<i>DISKUZE A ZÁVĚR</i>	99
	<i>SEZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH CITACÍ</i>.....	102

Seznam zkratek

AFM	Mikroskop atomárních sil
APTES	(3-Aminopropyl)triethoxysilan
ATB	Antibiotika
BR	Bromelain ze stonku ananasu
CMC	N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)karbodiimid
DCC	N,N'-Dicyklohexylkarbodiimid
DMEM	Dulbekovo modifikované Eaglovo médium
DSC	N,N'-Disuccinimidyl karbonát
DTT	Dithiotreitol
E.C.	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
EtOH	Ethanol
EWMA	Evropská asociace pro management ran
FBS	Fetální bovinní sérum
FTIS	Fluorescein-isothiokyanát
GLU	Glutaraldehyd
GLYMO	(3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilan
IPA	Izopropylalkohol
MES pufr	Pufr kyseliny 2-(N-morfolino)-ethansulfonové
MTT	(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid)
NHS	N-hydroxysukcinimid
PBS	fosfátový pufr
PR	Proteáza z <i>Aspergillus oryzae</i>
S.A.	<i>Staphylococcus aureus</i>
SEM	Skenovací elektronový mikroskop
SU	Sukcinanhydrid, anhydrid kyseliny jantarové
Sulfo-NHS	N-hydroxysulfosuccinimid
TR	Trypsin z hovězího pankreatu
WST	ve vodě rozpustná tetrazoliová sůl
XTT	(2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid)

1 Úvod

Ačkoliv se v moderní medicíně dnes a denně objevují nové metody pro zkvalitnění života lidí po celém světě, zatím nebyl zcela optimalizován účinný a bezbolestný postup odstranění nekrotické tkáně. Přitom odstranění nekrotické tkáně objevující se u vyšších stupňů popálenin kůže, diabetických vředů nebo dekubitů (proleženin), je stěžejním krokem v první fázi léčby. Zahájit léčbu rány odstraněním nekrózy je nutné nejen proto, že tato tkáň nemá šanci na zhojení, ale především velmi zvyšuje riziko vzniku infekce.

Odborně se tento proces nazývá debridement a je možno ho provést několika způsoby. Existuje debridement enzymatický, autolytický, chemický či biologický. Každý má však nějaké nevýhody, a tak se, bohužel, i v moderní medicíně stále nejvíce využívá debridement chirurgický, který spočívá ve vyškrabování nekrotické tkáně pomocí chirurgických nástrojů. O bolestivosti této metody přitom není pochyb. Další nevýhodou spojenou s touto metodou je poškození i okolní zdravé tkáně. Pokud vezmeme ještě v úvahu, že popáleninami jsou velmi často postiženy děti v raném věku, jistě každý uzná, že je nejvyšší čas se věnovat vývoji metody, která by chirurgický debridement nahradila.

Jednou z bezbolestných metod je enzymatický debridement využívající proteolytických enzymů, které katalyzují štěpení peptidových vazeb mezi nekrotickou a zdravou tkání. Důvodem, proč tento způsob odstranění nekrotické tkáně již nenahradil chirurgickou metodu, je vysoká nestabilita enzymů a jejich pH a teplotní závislost. Enzymy jsou obecně velmi složité bílkovinné makromolekuly, které jsou aktivní jen za přesně daných podmínek. Jejich aktivitu a stabilitu výrazně zvyšuje navázání (imobilizace) na vhodný materiál. V této disertační práci byla jako podpůrný materiál pro imobilizaci enzymů použita křemičitá nanovlákna, která se vyznačují velmi reaktivním povrchem a strukturou podobající se mezibuněčné matrix, čehož je možné využívat zejména ve fázi nově se tvořící tkáně. Na základě dřívějšího testování bylo také ověřeno, že křemičitá nanovlákna jsou biokompatibilní a biodegradabilní. Vlákna by se tedy měla postupně rozložit na složky pro tělo bezpečné. Protože se ovšem jedná o inovativní odvětví moderní medicíny, je nezbytné vytvořené vzorky podrobit velkému množství testů, provést rozsáhlou rešerši dané problematiky a zkoumat vliv mnoha faktorů ovlivňujících chování enzymů.

Cílem disertační práce je vyvinout metodu imobilizace proteolytických enzymů na křemičitá nanovlákna. V současné době se nejčastěji enzymy imobilizují pomocí glutaraldehydových můstků (tedy glutaraldehydu), který je pro využití, zejména ve zdravotnictví, nevhodný. Proto je nutné zaměřit se na nalezení vhodného a ekonomicky výhodného mechanismu imobilizace enzymů. Celý proces vývoje je zaměřen na co nejefektivnější postup výroby materiálů, který by se aplikoval na poraněnou pokožku.

Práce se zabývá všemi postupnými kroky po elektrostatickém zvláknění křemičitých nanovláken. Konkrétně tedy vlivem teploty stabilizace nanovláken na vlastnosti nanovláken, několika způsoby modifikace a funkcionalizace povrchu nanovláken a imobilizací vybraných proteolytických enzymů. Protože je aktivita enzymů velmi závislá na hodnotě pH, teplotě a přítomnosti některých inhibitorů, vyrobená nanovlákna jsou testována za různých podmínek. Dále se práce zaměřuje na testování cytotoxicity, antibakteriálních vlastností, in vitro testování proteolytické aktivity enzymů na prasečí kůži a věnuje se také způsobu skladování materiálu pro co nejdelší zachování stability enzymů i samotného nanovláknenného materiálu.

2 Teoretická část

Zatím ani v moderní medicíně nebyl objeven způsob, jakým by bylo možné bezbolestně a efektivně odstranit nekrotickou tkáň, objevující se u těžkých popálenin, chronických ran, těžce se hojících ran, diabetických vředů, gangrén nebo dekubitů (proleženin) a rozhodně je to jedno z odvětví medicíny, kterému se velké množství výzkumných pracovníků a farmaceutických společností věnuje. Každá rána je jiná, proces hojení rány má několik fází a závisí na mnoha dalších faktorech – věk, přidružená onemocnění, stav imunitního systému, pohyblivost pacienta, zda je rána suchá, nebo mokvající, kvalita života a v neposlední řadě také na dostupnosti zdravotní péče, guidelines v dané zemi, kvalitě léčebných produktů a schopnostech ošetřujících lékařů (Strohal et al. 2013). Všichni odborníci se ale shodují na nezbytném první kroku – odstranění devitalizované části tkáně, která má porušené krevní zásobení, nemá šanci na zhojení, prodlužuje dobu hojení, a zejména zvyšuje riziko vzniku infekce.

Na fakt, jak je to složitý proces, poukazuje i Evropská asociace pro management ran (EWMA), která vydala v roce 2013 ucelený přehled o klasifikaci ran, možnostech odstranění odumřelé tkáně a zahrnula do této publikace i ekonomické aspekty (Strohal et al. 2013). Úspěšný vývoj materiálů pro odstranění nekrózy z ran bylo tedy nezbytné zahájit rozsáhlou rešerší aktuálních možností této problematiky, připomenout si základní fakta o kůži zdravé i poraněné, pochopit složitost procesu katalýzy, která probíhá právě za přítomnosti proteolytických enzymů a propojit tato fakta v praktické části.

2.1 Léčba ran kůže

Pro pochopení problematiky složitého systému léčby ran kůže je důležité nejprve nastínit několik základních dogmat o kůži samotné, vzniku nekrotické tkáně, fázích hojení a podmínkách, které hojení ran výrazně ovlivňují.

2.1.1 Vlastnosti a složení zdravé kůže

Kůže je největším orgánem těla a tvoří zevní povrch organismu. Vytváří tedy bariéru organismu vůči okolí a chrání ho před vnějšími chemickými, fyzikálními a mikrobiologickými vlivy. Zdravá kůže má díky ovlivňování činnosti potních žláz a změn průtoku krve ve svém krevním

řečišti zároveň funkci termoregulační. Sama o sobě je špatný vodič tepla. Dále hraje velmi důležitou roli v procesu látkové výměny organismu, protože se podílí na procesu dýchání i exkrece látek z organismu. Nemalou roli má také při zajištění správné funkce imunitního systému a za určitých podmínek dochází v kůži i k tvorbě vitamínu D.

Plocha kůže dospělého člověka dosahuje 1,6 až 1,8 m², tloušťka kůže se liší v jednotlivých oblastech těla a pohybuje se v rozmezí 0,5 až 4 mm. Hmotnost samotné kůže je okolo 3 kilogramů. Kůže má takovou stavbu, aby byla schopna se přizpůsobit pohybům a tvarovým změnám těla. Skládá se ze tří hlavních částí – epidermis (pokožka), dermis (škára) a hypodermis (podkožní vazivo neboli subcutaneous). Vrstva nejbližší k povrchu těla – epidermis – je složena z keratinocytů, melanocytů, Langerhansových a Merkelových buněk, podle oblastí obsahuje také chlupy, nehty a potní žlázy. Jedná se o vrstevnatý dlaždicový epitel, který v povrchových vrstvách rohovatí. Buňky epidermis se tvoří v bazální vrstvě, což je jediná vrstva vyšších buněk směrem k dermis. Pouze v této vrstvě dochází k mitóze kožních buněk, poté se buňky směrem k povrchu oplošťují, ztrácí jádro, postupně odumírají a rohovatí. Průměrná doba mezi vznikem keratinocytu mitózou v bazální rovině a odloučením na povrchu kůže je 1 měsíc (Čihák et al. 2001).

Z hlediska složení kůže je zde hojně zastoupena vláknitá bílkovina keratin jako specifický produkt keratinocytů, přičemž mezibuněčný prostor je tvořen zejména proteoglykany. Propustnost kůže pro molekuly se liší v jednotlivých vrstvách a závisí i na okolních podmínkách. V normálním stavu je pouze bazální část epidermis propustná i pro velké makromolekuly, proti tomu vrchní rohová část již tvoří bariéru pro fyzikální a chemické škodliviny, ve větší míře i proti kyselinám a v menší proti louhům. Díky vysokému obsahu bílkovinných složek v rohovité části epidermis je ale povrch kůže hygroskopický – při delším působení vody kůže bobtná a velmi se snižuje nepropustnost kůže pro větší molekuly. Obecně platí, že i za normálních podmínek vždy dochází k určitému průchodu jakékoliv látky s malou molekulou kůží. Více prochází látky rozpustné v tucích, než ve vodě (Čihák et al. 2001).

Prostřední vrstva se nazývá škára a je tvořena fibroelastickým kolagenním vazivem. Její povrchová část je tvořena, kromě sítí kolagenních a elastických vláken, také sítí kapilární, nervovou a vazivovými buňkami. V hlubší vrstvě jsou nejvíce zastoupeny snopce kolagenních fibril, které zajišťují kůži její tažnost. V menší míře jsou zde zastoupena elastická vlákna a hladká svalovina (Čihák et al. 2001).

Třetí částí, která spojuje kůži s povrchovou fascií, nebo s periostem, je podkožní vazivo tvořené hustšími vazivovými pruhy. Protože se tyto pruhy v některých místech upevňují na fascii a periost, není v těchto místech kůže pohyblivá a není možné, aby se zde vytvořil tukový polštář. Tato místa jsou velmi náchylná na vznik proleženin u osob dlouhodobě imobilních. Ze všech výše zmíněných důvodů vyplývá, že ztráta kůže, rozsáhlé poranění, nebo ztráta její funkčnosti je život ohrožujícím stavem (Čihák et al. 2001).

2.1.2 Rány obsahující nekrotickou tkáň

Nekrotická tkáň nevzniká pouze u vyšších stupňů popálenin, ale i u chronických ran, diabetických vředů, dekubitů, gangrén, ran napadených infekcí a dalších těžce se hojících ran. Může se jednat o ránu suchou (například adheovaná nekrotická tkáň u vyšších stupňů popálenin), o ránu suchou s fibrinovým okrajem, který zabraňuje hojení, nebo o ránu infikovanou bakteriemi tvořícími biofilm atd. Na ráně odlišujeme spodinu rány, její okraje a okolí rány. Celá nekrotická tkáň nemá nikdy šanci na zhojení a musí být vždy odstraněna (Guo a DiPietro 2010). Nekróza je signalizována nevratnými změnami v jádru buňky, dochází ke karyolýze (rozpad chromatinu kvůli enzymatické degradaci endonukleáz), pyknóze (zahuštění chromatinu v buněčném jádru) a následně karyorhýze (rozdělení buněčného jádra spojené s uvolněním chromatinu do cytoplazmy). V cytoplazmě dochází ke kondenzaci a intenzivní eosinofilii, ztrátě struktury a fragmentaci. Ať už byl mechanismus buněčné smrti jakýkoli (ischemie, teplota, toxiny, mechanické trauma, nebo apoptóza), ve chvíli, kdy je nekróza na tkáni již viditelná alespoň základními zobrazovacími metodami, předcházela jí smrt velkého počtu buněk (Majno a Joris 1995).

2.1.3 Fáze rány a aspekty, které hojení ovlivňují

Pro efektivní vývoj materiálů, které by měly odstranit nekrotickou tkáň, je velmi důležité stanovit, kdy je ten nejideálnější čas na jejich aplikaci. Část odborné literatury rozlišuje 3 fáze rány (Simon 2019) a další literatura 4 fáze rány (Guo a DiPietro 2010). Pokud jsou fáze rozděleny do tří procesů, první je většinou označována jako fáze čistící (exsudativní), nebo zánětlivá. Druhá fáze je označována jako granulační a třetí jako epitelizační. Pokud je proces hojení rozdělen na 4 části, jedná se většinou o fázi hemostatickou, dále zánětlivou, proliferační a remodelační (Thiruvoth et al. 2015). Nutnost odstranění nekrózy přichází již ve fázi zánětlivé (tedy v první, popřípadě druhé fázi), protože nekróza je jak funkční, tak mechanickou překážkou pro uzavírání a postupné hojení rány. Z časového hlediska u většiny druhů poranění

kůže (termického, traumatického i chemického) dochází již během následujících 24 hodin k synchronizované vlně mitóz buněk bazální vrstvy epidermis. Kůže se snaží zvýšením proliferace znovuobnovit tkáň a nahradit defekt. Výsledkem je většinou vznik kožní šupiny na povrchu poranění. U rozsáhlejších ran se ale může 4. fáze objevit až po týdnech či měsících (Thiruvoth et al. 2015).

Faktorů, které ovlivní hojení ran je celá řada. Z těch lokálních je nutné zmínit v první řadě infekci a oxygenaci, protože kyslík je důležitý pro metabolismus buněk. Výraznou komplikací při hojení je přítomnost cizích těles v ráně, poranění cévního systému a rozmáčení okrajů rány (macerace). Poslední aspekt velmi ovlivňuje vhodný výběr krytí rány a jeho schopnost absorpce exsudátu. Podle potřeby může být aplikováno vlhké krytí, či kombinované (Guo a DiPietro 2010). V tomto smyslu mají nanovlákná hned několik výhod, protože díky své vysoké porozitě se k ráně dostane kyslík, vlákna jsou neadherentní a exsudát tedy může vytékat z rány (Lovětinská-Šlamborová et al. 2014).

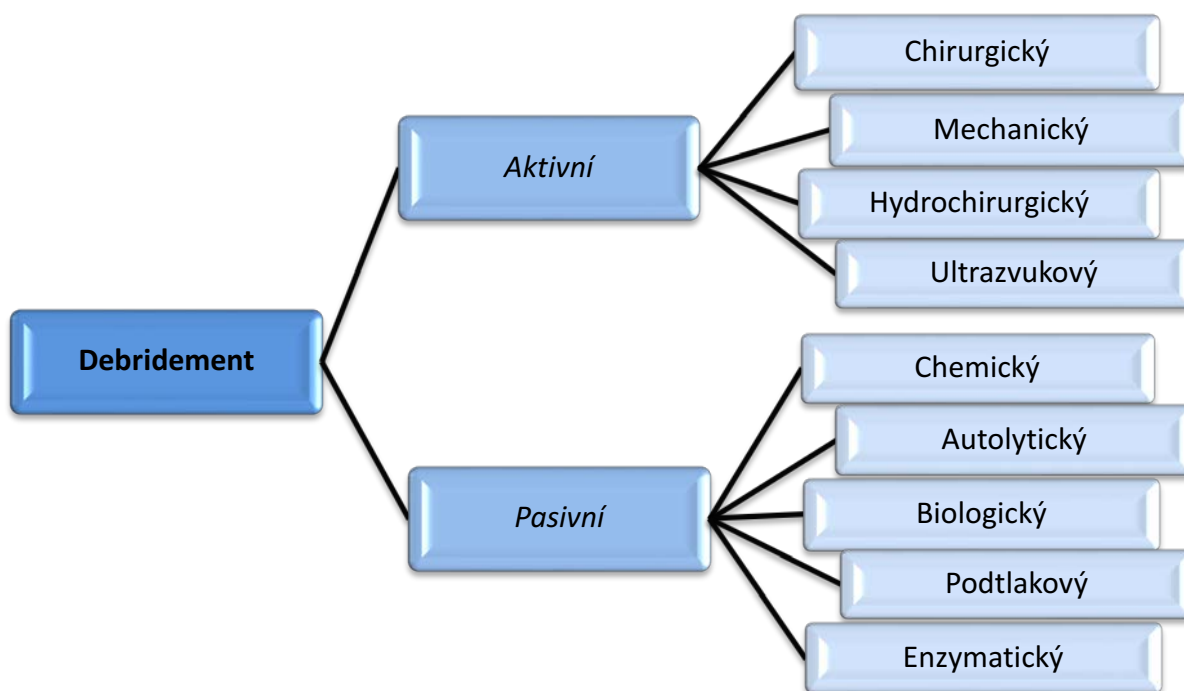
Bohužel velkou roli v léčbě ran hrají i celkové faktory – věk, pohlaví, obezita, kouření, alkohol, strava, léky, stres, pohlavní hormony, chemoterapie a přidružená onemocnění (zejména ischemická choroba, diabetes mellitus, krevní poruchy, hypertenze, ateroskleróza, autoimunitní poruchy, žloutenka, uremie a mnoho dalších) (Guo a DiPietro 2010).

2.2 Druhy debridementu

Jako debridement je označováno vyčištění rány, součást toalety rány. Spočívá v celkovém odstranění adhezaní, nekrotické nebo kontaminované tkáně. Nejedná se tedy o klasické vyčištění rány od cizích těles, metabolických produktů, nebo o resekci funkční tkáně ani amputaci. EWMA definuje debridement jako proces odstranění nekrotické tkáně, escharu, devitalizované tkáně, infikované tkáně, hyperkeratózy, strupu, hnisu, hematomu, cizích těles, nečistot a kostních fragmentů za účelem podpory hojení rány (Strohal et al. 2013). Tento proces je důležitou součástí managementu rány, protože čisté lůžko rány je předpokladem pro optimální hojení. Debridement je nutné provést v první fázi hojení rány, protože delší přítomnost nekrotické tkáně vede k neustálé aktivitě zánětlivých cytokinů, fibronektinu a metaloproteáz. Odstraněním těchto složek dojde opět ke stimulaci syntézy DNA, produkci keratinocytů a ke snížení rizika vzniku infekce a tvorby biofilmu (Ramundo a Gray 2008).

Slovo debridement pochází z francouzštiny a poprvé ho použil Henri La Dran již v 17. století k označení incize, která měla podpořit odtok exsudátu z rány (O'Brien 2002). Výběr optimální techniky pro odstraňování nežádoucí tkáně je ovlivněn mnoha faktory včetně typu a objemu nekrotické tkáně, přítomnosti infekce, velikosti rány, bolesti spojené s touto technikou, přítomnosti komorbidních stavů včetně sepse, vaskularity rány a sousedních tkání, preferencí pacienta a finanční náročnosti jednotlivých metod. Zejména v oblasti domácí péče a dlouhodobé péče je také ovlivněna dostupností jednotlivých technik a zkušenostmi ošetřujícího personálu (Ramundo a Gray 2008).

Druhů debridementu existuje celá řada. Nejčastěji se rozdělují na aktivní a pasivní metody. Mezi aktivní metody patří debridement chirurgický, mechanický, hydrochirurgický a ultrazvukový, k pasivním metodám řadíme debridement chemický, autolytický, biologický, podtlakový a enzymatický (Obrázek 1). Jednotlivé druhy debridementu se mezi sebou velmi často kombinují.



Obrázek 1: Druhy debridementu.

Chirurgický debridement

Jedná se o nejrazantnější, nejrychlejší, ale též nejradikálnější formu debridementu. Provádí se pomocí skalpelu, nůžek, exkochleačních lžiček, pinzet apod. Je používán na rány, které musí být neodkladně vyčištěny, na infikované nekrotické rány, velmi rozsáhlé hluboké rány a na diabetické vředy s nekrózami. Chirurgický debridement může být proveden najednou,

až do krvácející tkáně, nebo může být nekrotická tkáň odebírána postupně. Často je chirurgický debridement kombinován s méně invazivními metodami, zejména s autolytickým debridementem (Brigido 2006).

Mechanický debridement

Mechanický debridement je jednou z nejdéle a nejčastěji používaných metod – zejména v USA (Rodeheaver 1999). Do této skupiny řadíme například metodu nazývanou wet-to-dry, kde je principem strhávání zaschlé gázy z povrchu rány, která s sebou odstraní také nekrotickou tkáň. Bolestivost této (jedné z nejstarších) metody je velmi výrazná. Dále sem řadíme použití vlhké gázy, která se ještě před vyschnutím opět nahradí novou vlhkou gázou. Samotné krytí gázou je často používaná srovnávací metoda pro nově vyvíjené druhy debridementu (Dryburgh et al. 2008). Patří sem také otírání rány navlhčenými monofilamentními vlákennými materiály, které se používají na již vysušené strupy. Strupy se tímto postupem rozmáčejí a vytírají z rány.

Hydrochirurgický debridement

Tento typ debridementu je jistě jedním z nejmodernějších. Je nejmladší součástí hydroterapie a využívá vodu proudící pod silným tlakem z trysky. Její proud s sebou strhává nekrotickou tkáň a buněčný detritus a vyplachuje exsudát z rány. Hydroterapie je vhodná na rány se zhmožděním měkkých tkání, rány s nekrotickým okolím a s nekrózou na spodině, na těžší popáleniny i ulcerace různé etiologie (Brown et al. 1978).

Ultrazvukový debridement

Ultrazvuk je v tomto odvětví využíván zejména díky své schopnosti koagulovat tkáň. Podle zvolené frekvence a intenzity může ultrazvuk interferovat s různými látkami a tkáněmi (od inertních proteinů až po celé buněčné orgány a může docházet jak k destrukci tkáně, tak k fyziologické modifikaci. Jeho vlivu je možné využít nejen při debridementu, ale zároveň při stimulaci tkáně v hojící fázi (Strohal et al. 2013; Szokoly a Aradi 2013).

Chemický debridement

Další možností, jak odstranit nekrotickou tkáň, je aplikace chemických látek – chemický debridement. Jedná se konkrétně o látky: kyselinu salicylovou, kyselinu benzoovou, močovinu, nebo chlornany. Látky působí na nekrózu, ale bohužel působí také na okolí rány, které dráždí a poškozují. Chemický debridement se tedy používá pouze u případů infikovaných ran s malým rozsahem. U rozsáhlejších poranění je příliš vysoké riziko resorpce použitých chemikálií a toxické poškození organismu (Stryja 2006).

Autolytický debridement

Jedná se o postupné rozpouštění nekrotické tkáně pomocí tělu vlastních enzymů – tzv. metaloproteáz, které se v zánětlivé fázi hojení uvolňují ve spodině rány, a žírných buněk v optimálně vlhkém prostředí rány. Jejich činností dochází k rozpuštění nekrotické tkáně. Výhodou metody je využití tělu vlastních látek, nevýhodou je ovšem nejen časová náročnost, ale zejména nutnost vlhkého prostředí rány, které výrazně zvyšuje riziko vzniku infekce. Z toho důvodu není například u pacientů trpících diabetes mellitus tento způsob vůbec doporučován (Stryja 2006). Udržování neustále vlhkého prostředí v ráně je možné například pomocí hydrogelů, s obsahem vody 30 až 90 % vyrobených z karboxymethylcelulózy (Dissemond 2006). Dále pomocí hydrokoloidního krytí, které je vytvořeno z karbomethylcelulózy, pektinu, nebo želatiny a po nasáknutí exsudátu se krytí mění v gel (Bouza et al. 2005). Na trhu se objevuje také vysokoabsorpční krytí nové generace s inteligentní technologií zajišťující neustálou vlhkost. Nejčastěji je tvořeno z více funkčních polymerů a mělo by zajistit ideální fyziologické podmínky pro vlastní autolytický debridement (König et al. 2005). Existuje samozřejmě mnoho druhů moderních krytí ran, které podporují autolytický debridement a zároveň obsahují například částice stříbra a další antibakteriální složky (Caruso et al. 2006).

Biologický debridement

Nejčastěji využívaným příkladem biologického způsobu odstranění mrtvé tkáně je larvoterapie. Jak již vyplývá ze samotného názvu, využívány jsou larvy – konkrétně larvy *Luciliasericata* (bzučivky zelené). Sekreční šťávy bzučivek obsahují velké množství proteolytických enzymů, které selektivně rozrušují nekrotický materiál. Tímto materiálem se bzučivky následně živí. Zdravá tkáň, granulační tkáň i spodina rány však zůstávají nepoškozeny. Spodina rány je larvami dokonce stimulována, dochází k jejímu lepšímu prokrvení a stimulaci tvorby granulační tkáně, růstu fibroblastů a chondrocytů (Horobin et al. 2005). Sekret, který larvy produkují, je alkalické povahy a obsahuje látky s baktericidními účinky. Ty jsou účinné i u kmenů, které jsou rezistentní vůči léčbě antibiotiky (např. u kmenu methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) (Sherman a Shimoda 2004).

Protože aplikace larev do rány není dobře snášena často ani pacienty ani zdravotnickým personálem, nově se aplikují larvy v takzvaném bioobalu, který obsahuje živé sterilní larvy a pěnové kuličky v síťovém vaku. Okolí rány je ošetřeno zinkovou masťou, nebo hydrokoloidním krytím proto, aby nedocházelo k jeho podráždění (Evans 2002).

Podtlakový debridement

Podtlak, nebo-li vakuovou terapii, řadíme mezi metody nepřímé. Tato metoda kombinuje vlhké krytí rány a podtlak působící příznivě na spodinu rány. Rána je poté dobře prokrvena a je podpořena fáze granulace nové tkáně. Metoda spíše ale jen podporuje autolytický debridement a sama o sobě nepodporuje odstranění nekrotické tkáně (Hartmann 2016).

Enzymatický debridement

Další možností je enzymatický debridement. Již výše bylo zmíněno, že se pro tyto účely používají proteolytické enzymy z třídy hydroláz, které katalyzují štěpení peptidových vazeb (štěpení nekrotické tkáně od spodiny rány). Výhodou je pouze lokální působení enzymu, které nepoškozuje okolní zdravou tkáň. Metoda je mnohem rychlejší než autolytický debridement. Nevýhodou je finanční náročnost a zejména nestabilita enzymů. Aktivita enzymů je velmi závislá na okolních podmínkách, jako je hodnota pH, teplota, přítomnost antiseptik atd. Enzymy jsou většinou přidávány do mastí nebo gelů a měly by pracovat synergicky s endogenními enzymy pacienta. Enzymatický debridement se v této formě obvykle doporučuje použít na rány, které jsou klasifikovány jako stadium III nebo IV. Tyto typy ran zahrnují více vrstev tkáně, včetně všech vrstev kůže a podkožních tkání (Strohal et al. 2013). Protože je tato disertační práce zaměřena na vývoj materiálů využívajících právě tento druh debridementu, podrobněji se enzymům věnuje následující kapitola. Pro přehlednost jsou ještě jednou v Tabulce 1 uvedeny konkrétní typy jednotlivých druhů debridementu společně s jejich výhodami a nevýhodami.

Tabulka 1: Výhody a nevýhody konkrétních typů debridementu.

Typ debridementu		Výhody	Nevýhody
1	Chirurgický	Účinný u tlustších vrstev nekrotické tkáně, rychlý (Al-Arabi et al. 2007)	Dochází k poranění krevního zásobení, nervové tkáně, spodiny rány atd. Velmi bolestivý (Cardinal et al. 2009)
2	Mechanický		
2A	<i>Wet-to-dry</i>	Rychlý a účinný u infikovaných nekrotických ran (Eneroth a van Houtum 2008)	Vysoká bolestivost a poškození i zdravé tkáně (Eneroth a van Houtum 2008)
2B	<i>Použití gázy</i>	Cenově dostupný (Ragnarson-Tennvall a Apelqvist 1997)	Nutnost velmi často ránu převazovat (Ragnarson-Tennvall a Apelqvist 1997)
2C	<i>Monofilamentní obvazy</i>	Rychlý a účinný (Bahr et al. 2011)	Vysoká bolestivost zejména u rozsáhlejších ran (Bahr et al. 2011)
3	Hydrochirurgický	Možnost použít proud vody obsahující antiseptické roztoky (Strohal et al. 2013)	Bolestivý Riziko přenosu bakterií ve formě aerosolu na další části těla pacienta, nebo personálu Vyžaduje dobré znalosti a praxi ošetřujícího personálu (Daeschlein et al. 2010)
4	Ultrazvukový	Při aplikaci zároveň stimuluje pozitivně tkáň a urychluje fázi hojení (Strohal et al. 2013)	Hrozí fyziologické změny i na okolní zdravé tkáni (Strohal et al. 2013)
5	Chemický	Účinný (Hartmann 2016)	U rozsáhlejších ran velmi toxický (Hartmann 2016)
6	Autolytický		
6A	<i>Hydrogely</i>	Jsou průhledné a mohou mít chladicí efekt – využívá se u popálenin (Dissemond 2006)	Není možné použít u krvácejících ran Vysoké riziko vzniku anaerobní infekce (Gray et al. 2011)
6B	<i>Vysokoabsorpční krytí</i>	Použitelné u ran s velkým množstvím exsudátu (Bowler et al. 1999)	Velmi náchylné k infekci <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Není možné použít v okolí očí a sliznic z důvodu nebezpečí adheze a vysušení (Strohal et al. 2013)
7	Biologický	Nepoškozuje zdravou tkáň Účinné u chronických ran (Pospíšilová 2009)	Neestetické Finančně náročné Nemožné použít v okolí očí, v blízkosti gastrointestinálního a dýchacího systému atd. (Pospíšilová 2009)
8	Podtlakový	Podtlak stimuluje angiogenezi, aktivitu makrofágů a leukocytů (Saxena et al. 2004)	Není možné použít u infikovaných, nekrotických, krvácejících, nebo rozsáhlejších ran Málo účinný (Stannard et al. 2009)
9	Enzymatický	Bezbolestný Pouze lokální působení	Velmi náročné zajistit dlouhodobou aktivitu enzymů

2.3 Enzymy využitelné k odstranění nekrotické tkáně

Enzymy jsou globulární bílkovinné makromolekuly s katalytickými funkcemi, které urychlují chemické přeměny. Jsou velmi důležitými biokatalyzátory, které se podílí na řízení a koordinaci chemických reakcí v organismu a s ním spojených energetických změn. Předpokládaný počet enzymů i v těch nejjednodušších systémech je přes 3000 a řídí rychlosti prakticky všech reakcí, které v nich probíhají. Celkový počet enzymů se odhaduje z důvodu jejich druhové specifity na miliardy. Většinou katalytickou reakci vykonává složená bílkovina (60–70 %), kde nebílkovinná část se nazývá kofaktor. Katalýzu může ovšem provádět i jednoduchá bílkovina (Vodrážka 1992).

Složením enzymů, jejich nejdůležitějším částem a funkcím bude věnována větší pozornost v dalších kapitolách. Pro správné pochopení a možnost vývoje nových metod imobilizace enzymů je také nesmírně důležité pochopit mechanismus jejich účinku, možnosti aktivace a inhibice enzymů, podmínky imobilizace a možné způsoby stabilizace enzymů.

2.3.1 Základy enzymologie

Hlavní funkcí enzymů je urychlení reakcí bez ovlivnění složení rovnovážné směsi, neboť zvyšují rychlost reakce oběma směry. Směr průběhu reakce není ovlivněn katalyzátorem, ale je dán energetickými a koncentračními poměry v reagujících systémech. Důležitou funkcí enzymů je zajištění specifického průběhu reakcí bez vzniku vedlejších produktů a jejich přesné návaznosti a koordinace. S tím souvisí i nutnost pružné regulace aktivity enzymů podle měnících se potřeb organismů (Vodrážka 1992).

Díky složitosti enzymů je velmi obtížné je chemicky vytvořit. Chemicky vytvořené enzymy jsou samozřejmě v dnešní době hojně využívány, přírodní enzymy jsou však mnohem dokonalejší. Např. rychlost reakce přírodních enzymů, je až o několik řádů vyšší než u umělých enzymů. Vodrážka v knize Biochemie (1992) uvádí, že jedna molekula přírodního enzymu je schopna za 1 sekundu přeměnit až 5×10^4 molekul substrátu. Nespornou výhodou je jednoduchá regulovatelnost jejich účinku, netoxičnost a práce za mírných podmínek (teplota 20 až 40 °C, tlak 0,1 MPa a pH většinou kolem 7,0). Nevýhodou je jejich rychlá opotřebovanost a vysoká citlivost k řadě vlivů. Proto – a také podle potřeb regulace – jsou (stejně jako ostatní bílkoviny) stále odbourávány a znova syntetizovány.

Nejjednodušeji lze enzymy rozdělit podle místa působení na intracelulární a extracelulární. Většina enzymů je intracelulárních. Vznikají tedy v buňce, zde i zůstávají a vykonávají své specifické funkce. Proti tomu extracelulární enzymy jsou buňkou, kde vznikly, vyloučeny a uplatňují se v tkáňových kapalinách. U živočichů zejména v trávicích šťávách, krvi nebo mozkomíšním moku. Velmi často také dochází k vytváření tzv. prekursorů aktivních enzymů. Buňky vytvoří pouze inaktivní formu, která je tkáňovými kapalinami transportována na místa účinku. Zde dochází k limitované proteolýze, jedná se tedy o odštěpení určité části inaktivní molekuly, která maskuje aktivní centrum. Někdy dochází i k přerušení jedné či více vazeb, přeargování prostorové struktury a k aktivaci centra. Inaktivní prekursory se nazývají proenzymy nebo zymogeny. V této formě se většinou vytváří trávicí proteázy či enzymy procesu srážení krve (Vodrážka 1992).

2.3.2 Mechanismus účinku enzymů

Samotná enzymová reakce probíhá vždy v aktivním místě enzymu. Jedná se o relativně malou oblast enzymu s přesně rozmístěnými určitými funkčními skupinami. Funkční skupiny jsou součástí postranních řetězců aminokyselinových zbytků, které bývají v polypeptidovém řetězci vestavěny na různých, někdy dosti vzdálených místech. Prostorová struktura enzymů je však taková, že ve většině případů dochází ke srolování dlouhých řetězců, čímž se dostávají postranní řetězce s funkčními skupinami do bezprostřední blízkosti. Na tvorbě a správné funkci aktivního centra se podílí velké množství skupin. Nejdůležitější je katalytické centrum, vazebné centrum a další skupiny, jejichž hlavním úkolem je vytvářet vhodné chemické prostředí v aktivním centru (Vodrážka 1992).

Katalýza probíhající v organismu díky enzymům je mnohem účinnější. Rychlost enzymové reakce je asi 10^8 až 10^{14} násobně vyšší než rychlost reakce nekatalyzované. Rychlost této reakce závisí na velkém množství faktorů, z nichž většina vychází z osobité struktury enzymů. Velmi důležitým faktorem je reakční specifita enzymů. Rozumíme tím specifitu k typu katalyzované reakce, díky které může dojít ke vzniku různých produktů z toho samého substrátu. Některé enzymy katalyzují přeměnu jen jediného substrátu a mají tedy absolutní strukturní specifitu, jiné mohou katalyzovat určitou reakci u celé skupiny substrátů (skupinová specifita). Třetí skupinou jsou enzymy s relativní skupinovou specifitou, u kterých je obvyklé, že katalyzují přednostně reakci jedné skupiny substrátů, ale jsou schopny působit i na jiné skupiny substrátů. Působení druhotné se již ale projevuje ve znatelně menší míře (Vodrážka et al. 1991).

Mechanismus účinku enzymů probíhá v několika krocích. Nejprve musí dojít k tomu, že enzym rozpozná obecné strukturní rysy na substrátu. Tak, aby mohlo dojít ke spojení aktivního centra se substrátem a katalýze reakce, dochází většinou po rozpoznání také ke konformačním změnám. Někdy se jedná pouze o přeuspořádání postranních řetězců, jindy je možná velká reorganizace molekuly a odhalení původně nedostupných skupin. Po přeorganizování molekuly dochází k blízkému kontaktu aktivního místa se substrátem. Bylo zjištěno, že aktivní zachytávání substrátu z okolního roztoku vede k velmi nízkým hodnotám aktivační energie enzymových reakcí (jinak řečeno – účinnou katalýzu není možné pozorovat u molekul volně se pohybujících v roztoku, je velmi důležitý jejich vzájemný kontakt). Vzdálenost mezi interagujícími atomy substrátu a molekulami aktivních center se pohybuje pouze okolo 0,3 nm a vznikající vazby jsou většinou nekovalentní. Takto malá vzdálenost interagujících skupin je výhodná zejména proto, že se zde i ve vodném prostředí nedostanou molekuly vody a místo vzniku vazby má většinou jiné fyzikální podmínky než okolní vodné prostředí. V aktivním centru dochází nejen k přiblížení atomů substrátu a skupin aktivního centra, dochází také ke zvýšení koncentrace substrátu. Při vzniku vazby aktivní místo–substrát dochází vždy také k optimálnímu nasměrování katalytických skupin tak, aby se překryly jejich orbitály a reakce se usnadnila přímou interakcí obou skupin (Vodrážka et al. 1991).

Jak již bylo zmíněno výše, i v případě enzymové katalýzy je nutné určité množství dodané energie. Velikost této energie je sice nižší než u reakcí probíhajících bez působení enzymů, nutná je však také. Zdrojem této aktivační energie pro aktivaci enzymových reakcí je energie, která se uvolní při vazbě substrátu na enzym.

Pokud shrneme uvedené informace, potřebujeme enzymy přivést do přímého kontaktu s nekrotickou tkání a zajistit podmínky reakce takové, aby mohlo docházet ke konformačním změnám enzymu a k zpřístupnění aktivního centra. V makroměřítku nejsme schopni jednoduchými technikami tyto konformační změny nijak analyzovat, ale víme, že výše popsany mechanismus účinku enzymů ovlivní právě hodnota pH, teplota a přítomnost určitých chemických sloučenin. V této kapitole byl také vysvětlen důvod, proč je smyslem disertační práce navázat enzymy na nanovlákná – ta totiž dokáží přesně kopírovat povrch rány, a tedy zajistit přímý kontakt enzymu s nekrózou. Pokud by byly použity například příliš nepoddajné obvazy, nezajistíme úplný kontakt s povrchem rány. V případě zamíchání enzymů do mastí sice zajistíme přímý kontakt s povrchem rány, ale zabraňujeme bohužel přístupu kyslíku k ráně a velmi snižujeme možnost konformačních změn uvnitř enzymů.

Mechanismus účinku je pro všechny druhy enzymů stejný, podle druhu katalyzované reakce se ale enzymy rozdělují do šesti hlavních tříd – oxidoreduktázy, transferázy, hydrolázy, lyázy, isomerázy a ligázy. Blíže se budu věnovat pouze jedné podskupině hydroláz, kterou jsou právě proteolytické enzymy.

2.3.3 Proteolytické enzymy

Proteolytické enzymy se pro svou hlavní funkci, štěpení peptidových vazeb, často nazývají peptidázy. Proteázy se dělí na exopeptidázy, štěpící z N-konce (aminopeptidázy) nebo C-konce peptidu (karboxypeptidázy), a na endopeptidázy, zaměřující se na vnitřní peptidové vazby polypeptidů. Podle katalytického mechanismu se proteolytické enzymy rozdělují do čtyř základních skupin. Serinové proteázy obsahují v aktivním centru serin, vyskytují se převážně extracelulárně a preferují slabě alkalické prostředí. K této skupině se přiřazují i proteázy s aktivním centrem tvořeným threoninem. Dále se jedná o cysteinové a aspartylové proteázy, obě tyto skupiny se zpravidla nachází v intracelulárním prostředí (aspartylové proteázy také v trávicím traktu) a vyžadují kyselé prostředí. Poslední – metaloproteázy – obsahují v aktivním centru kov, nejčastěji Zn^{2+} , typicky se vyskytují v extracelulární matrix nebo na povrchu buněk a jsou aktivní v neutrálním prostředí (Bugg 2004).

Inhibitory enzymů

Stejně, jako jiné enzymy i enzymy proteolytické mají své inhibitory. Inhibitory skupinově nespecifické jsou schopny inhibovat členy všech 4 mechanistických tříd proteáz. Nejvýznamnějším příkladem pro člověka je alfa-2-makroglobulin. Daleko rozsáhlejší je kategorie skupinově specifických inhibitorů. Tyto inhibitory byly izolovány z různých tkání rozličných druhů a dále ze semen, vajec a tělních tekutin (Chandrasekaran 2015). Protože je také velká řada chemických sloučenin, které inhibují aktivitu proteáz, je nutné této skutečnosti věnovat pozornost při výběru chemikálií napomáhajících následné imobilizaci enzymů. Například kyselina ethylendiamintetraoctová je sice vhodná z hlediska své struktury k použití jako ligand mezi podpurným materiálem a enzymem, bohužel ale výrazně inhibuje aktivitu proteolytických enzymů (Hermanson 2008). Je nutné také uvést, že některá antiseptika rovněž inhibují aktivitu enzymů, a tak je není možné současně použít.

Nejen inhibitory ale ovlivňují aktivitu enzymů. Další faktor je například hodnota pH, která se liší pro každý enzym. Příkladem enzymu, který je aktivní při velmi nízkém pH je pepsin, pro který je optimální $pH = 2,0$. Mnoho enzymů poté nejefektivněji pracuje při pH kolem

6–8 (např. papain, trypsin, chymotrypsin), ve velmi zásaditém prostředí je aktivní například enzymový preparát Esperasa, který pracuje při pH = 9–12, je také velmi tepelně stabilní, chemicky stabilní a hydrolyzuje velmi dobře bílkoviny. Vlastnosti, které byly popsány u Esperasy, jsou právě vyžadovány u všech enzymů, které se mají potencionálně využívat v průmyslu. Dalšími předpoklady vhodného enzymu je nenáročná aktivace (popř. převod ze zymogenu na aktivní enzym), vysoká efektivnost enzymové katalytické reakce a možnost jednoduché imobilizace enzymu na substrát (Vodrážka et al. 1991).

Nejčastěji se proteolytické enzymy využívají při léčbě trávících a zažívacích problémů. Některé studie zjistily, že proteolytické enzymy by mohly být prospěšné také pro léčbu bolesti v krku, osteoartrózu a post-herpetickou neuralgii (Kleine et al. 1995; Singer a Oberleitner 1996). Další teorie, populární v některých kruzích alternativní medicíny, ukazuje, že proteolytické enzymy mohou pomoci při léčbě revmatoidní artritidy, roztroušené sklerózy a dalších autoimunitních onemocnění (Al-Khateeb a Nusair 2008). Výsledky v tomto odvětví jsou však většinou zastaralé, nebo byly testy prováděny v malém rozsahu. Majorita vědců se však shoduje, že proteolytické enzymy mají účinnost při snižování bolesti, při léčbě poranění, popálenin a při léčbě zažívacích problémů (Parlak et al. 2013).

Enzymy, které jsou nejčastěji vybírány pro léčbu ran, jsou uvedeny v Tabulce 2. Jedná se o enzymy živočišné, rostlinné i bakteriální. Velkou výhodou například papainu je, že rozpouští fibrinové části nekrotické tkáně v širokém rozmezí hodnot pH – od pH = 3,0 až po pH = 12,0 (Falabella 2006). Protože ale papain potřebuje ke své aktivitě sulfhydrylové skupiny, které obsahuje například cystein, je často kombinován s ureou (močovinou). Ta zároveň denaturuje proteiny, což velmi napomáhá papainu ve štěpení nekrotické tkáně (Shapira et al. 1973). Je ale nutné podotknout, že papain není komerčně dostupný ve všech zemích.

Z bakteriálních enzymů se velmi často využívá kolagenáza. Získává se z *Clostridium histolyticum* a využívá se proto, že je to jediný enzym, který je schopen štěpit trojšroubovici kolagenu, ale neštěpí keratin, fibrin, hemoglobin nebo tuk. Zdravá kůže je složena ze 70 až 80 % z kolagenu a nekrotická tkáň je složena z kolagenu typu IV, glykoproteinů a proteoglykanů. Bakteriální kolagenáza tedy urychluje štěpení kolagenu na menší úseky a podporuje hojení rány také díky štěpení přírodního kolagenu spojujícího zdravou a poškozenou tkáň. Rozklad nekrotické tkáně je ale závislý nejen na aktivitě kolagenázy,

ale také na aktivitě makrofágů a dalších proteáz (Falabella 2006; Püllen et al. 2002; Ramundo a Gray 2009).

Důležitým proteolytickým enzymem je také streptokináza, která štěpí fibrin mezi argininem a valinem a katalyzuje přeměnu plazminogenu na plazmin. Plazmin je proteolytický enzym, který následně rozpouští fibrinová vlákna (fibrinolýza) a celou řadu plazmatických proteinů na polypeptidy a aminokyseliny. Často se používá v kombinaci se streptodornázou, která rozpouští viskózní nukleoproteiny nekrotických buněk a hnisu, aniž by ovlivňovala zdravé buňky (Strohal et al. 2013). Díky štěpení fibrinu, ale není možné použít streptokinázu k léčbě akutních ran, protože by mohla výrazně zvýšit krvácivost v ráně. Streptodornáza zase může způsobit horečku, zimnici, nebo leukocytózu (zvýšený počet bílých krvinek v krvi) kvůli absorpci částí purinů a pyrimidinů. Streptokináza a streptodornáza se mohou také projevit jako antigen a způsobit aktivaci protilátek. Použití těchto enzymů často vedlo i k podráždění zdravého okolí rány, objevovalo se svědění a zarudnutí (Smith 2008), proto nebyla streptokináza a streptodornáza v praktické části vůbec použita.

Tabulka 2: Druhy enzymů používaných v léčbě ran, přeloženo z (Dissemond 2006).

Druh	Enzym	Zdroj
Živočišný	Fibrinolysin	Bovinní (hovězí) plazma
	Deoxyribonukleáza	Bovinní pankreas
	Multienzymový komplex korýšů	Krunýřovka krillová
	Kolagenáza	Krab kamčatský
	Kataláza	Koňská játra
Rostlinný	Papain	Papája obecná
	Bromelain	Ananas
Bakteriální	Kolagenáza	<i>Clostridium histolyticum</i>
	Streptokináza	<i>Streptococcus haemolyticus</i>
	Streptodornáza	<i>Streptococcus haemolyticus</i>
	Sutlaim	Bacil senný

Výše uvedené enzymy jsou nejčastěji přidávány do mastí a hydrogelů, nebo podávány jako čistá enzymatická externa. Masti je většinou nutné aplikovat jednou až dvakrát denně a jsou kombinovány i s jinou metodou debridementu (nejčastěji chirurgickou). Produkty s enzymy dostupné na českém a světovém trhu jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3: Produkty pro enzymatický debridement dostupné na českém a světovém trhu.

Název	Enzym	Prodává se v ČR	Zdroj
Revamil® hydrofilní gel	med, který aktivuje pomocí peroxidu vodíku proteázy a obsahuje glukózooxidázu bojující proti infekci	ano	(Wanszelbaum 2016)
IruXol Mono	mast obsahující kolagenázu z <i>Clostridium histolyticum</i> a směs dalších proteáz	ano	(SÚKL 2019)
NexoBrid	čistý inertní gel obsahující bromelain	ano	(MediWound Ltd. 2018)
Pana-Veyxal® Salbe	mast s kombinací chymotrypsinu, trypsinu, papainu a vitamínů A a E	ano veterinární	(Weiron Dynamics, s.r.o. 2018a)
SunLitan® PA Zink	sprej s enzymy (trypsin, chymotrypsin, papain), vitamíny A a E, allantoinem a glycerinem	ano veterinární	(Weiron Dynamics, s.r.o. 2018b)
Xenaderm Ointment	mast obsahující trypsin a ricinový olej	ne	(Healthpoint, Ltd. 2019)
Collagenase SANTYL® Ointment	mast obsahující kolagenázu z <i>Clostridium histolyticum</i>	ne	(Smith & Nephew, Inc. 2008)
Accuzyme® Papain-Urea Debriding Ointment	hydrofilní mast obsahující papain a ureu	ne	(Wright a Shi 2003)
Varidase topical	mast obsahující streptokinázu a streptodornázu	ne	(Rutter et al. 2000)
Fibrinolysin W/DNASE – topical oitment	mast obsahující fibrinolysin	ne	(DrugInfo 2007)

Nejčastějšími produkty, které se na trhu objevují, jsou masti s kolagenázou a masti s papain-ureou. Gely ze streptokinázy a streptodornázy jsou poměrně drahé a byla prokázána i alergie na tyto enzymové gely (Strohal et al. 2013). U mastí se často doporučuje zvlhčování suchých spodin ran například pomocí fyziologického roztoku, u infikovaných ran se doporučuje kombinace s antibiotiky (ale např. u masti IRUXOL MONO není možné použít současně antibiotika tyrothricin, gramicidin a tetracykliny). U této masti není možné díky kolagenáze použít zároveň ani antiseptika, těžké kovy a mýdla. Aplikace masti je doporučována dvakrát denně a převaz je nutný minimálně jedenkrát denně. Je nutné se vyvarovat aplikaci masti na okolní zdravou tkáň (SÚKL 2019).

Enzymy jsou do masť často jen přimíchány, při použití hydrogelů se někdy jedná již o pevnější chemické vazby. Při použití masť je důležité zdůraznit, že se jedná spíše o podpůrnou metodu, která je v naprosté většině případů kombinována ještě s mechanickým odstraněním nekrózy. Neřeší tedy zásadní problém tématu disertační práce.

Pro pochopení možností navázání (imobilizace) enzymů na substrát – v našem případě křemičitá nanovlákna, jsou v následující kapitole uvedeny základní možnosti a způsoby imobilizace. V tuto chvíli bych ještě ráda – pro správnou orientaci v textu – upozornila na fakt převzatý z odborné literatury. Pojem substrát se používá nejen pro látku, ze které vznikají při katalyzované reakci enzymů produkty, ale také pro materiály, na které se enzymy pouze navazují (imobilizují) a nijak je neovlivňují.

2.4 Imobilizace enzymů na substrát

Imobilizace enzymu je velmi důležitým krokem při práci s enzymy. Vazba enzym a nosič zvyšuje nejen enzymovou stabilitu, ale umožňuje také opakované použití katalyzátoru a snadnější odstranění z reakční směsi. Způsobů imobilizace je velká řada, ne všechny jsou však efektivní a v některých případech dochází k imobilizaci enzymu na substrát pouze na velmi omezenou dobu (Talbert a Goddard 2012).

2.4.1 Používané substráty pro imobilizaci enzymů

Pro imobilizaci enzymů je možné použít jak substráty porézní, tak neporézní. Pro větší kapacitu vazby enzymu a vyšší ochranu vazby před prostředím, jsou ve většině případů lepší substráty porézní. U všech porézních materiálů však nelze jednoznačně zajistit kontrolovanou velikost a distribuci pórů, které by pomohly zoptimalizovat možnou kapacitu naimobilizovaného enzymu nebo průtokové vlastnosti systému enzym–substrát. Porézní a neporézní substráty je možno vyrábět z organických, anorganických i anorganicko–organických materiálů, z přírodních i umělých. Výhodou anorganických substrátů je vyšší stabilita jak fyzikální, tak chemická i mikrobiální. Výhodou přírodních materiálů je lepší biokompatibilita. Nejlepší materiály by tedy měly být přírodní anorganické, kterými je například bentonit, nebo oxid křemičitý. Imobilizace enzymů na oxid křemičitý, jak ve formě nanovláken, nanočástic i fólií ukazuje velmi dobré výsledky při vývoji substrátu pro imobilizace biomolekul (enzymů, antibiotik, růstových faktorů, proteinů a jiných). Nejčastěji používaným syntetickým anorganickým materiálem v této oblasti je sklo, používá se neporézní a kontrolovaně porézní.

Dalšími materiály jsou kovy a oxidy kovů s kontrolovanou velikostí pórů (Purkrťová 2012). Podobné problematice jako je řešena v této disertační práci – způsobům přípravy nosičů na bázi skla s imobilizovanými protilátkami se věnuje například český patent přihlášený již v roce 1986 (Marek et al. 1989), opět je ale pro imobilizaci používán glutaraldehyd.

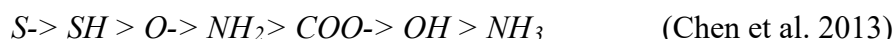
Jako organické nosiče pro imobilizaci molekul se zdají nejlepší přírodní polymery, např. polysacharidy (celulóza, dextran, agar, agaróza, chitin, alginát) a proteiny (z nich nejčastěji kolagen, albumin). Ze syntetických organických materiálů jsou těmi nejpoužívanějšími polystyreny a polypropyleny, dále polyakryláty, polymetylakryláty a polyakrylamidy (Purkrťová 2012).

2.4.2 Způsoby imobilizace na substrát

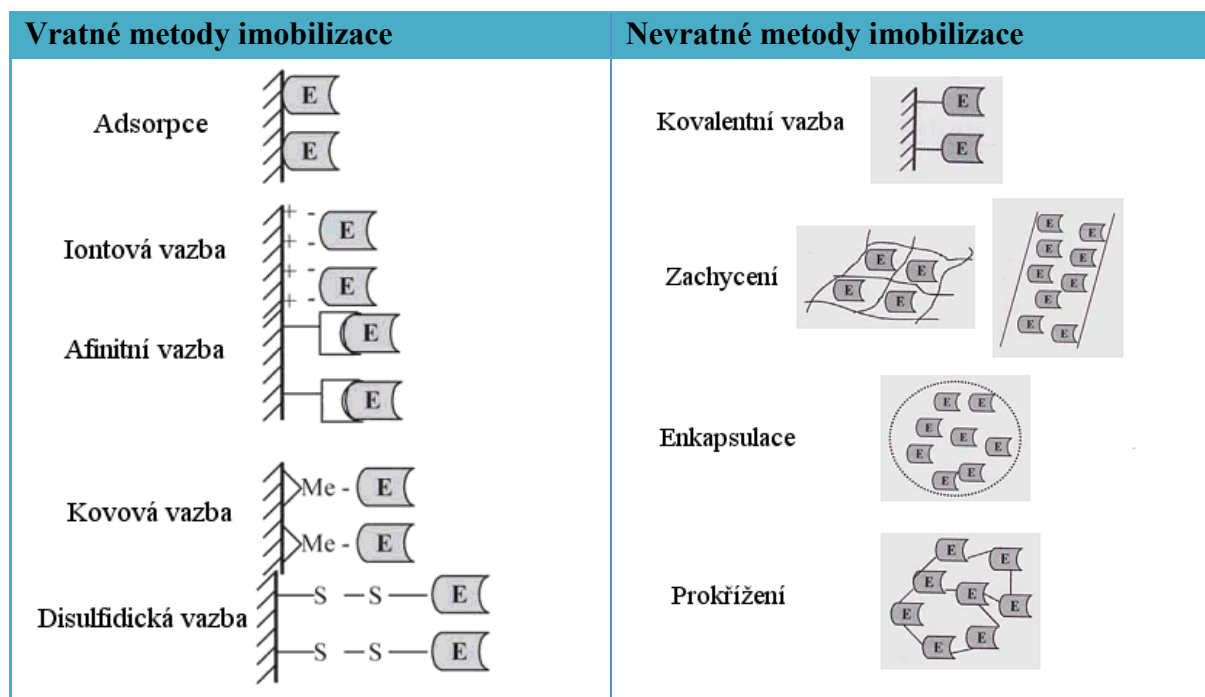
Imobilizaci lze rozdělit na vratnou a nevratnou. Mezi vratné metody imobilizace řadíme fyzikální adsorpci, iontovou, afinitní a kovovou vazbu, a také vazbu pomocí disulfidických můstků (Obrázek 2). Principem prvních třech metod je vždy adsorpce enzymu na povrch substrátu díky nekovalentním vazbám. V prvním případě dochází k vazbě enzym–substrát díky vodíkovým můstkům; van der Waalsovým silám nebo hydrofobní interakcí. Vratná je tato interakce proto, že lze rozdělit vazbu změnou podmínek (např. pH, iontová síla, teplota, polarita rozpouštědla). Řadíme sem i vazbu disulfidovým můstkem, která je sice kovalentní, ale může být rozdělena reakcí s vhodným činidlem (DTT či β -merkapt ethanol) za mírných podmínek. Podmínkou vzniku disulfidového můstku je obsah volné thiolové skupiny, která není nutná pro zachování struktury jak u enzymu, tak u nosiče (reaktivní disulfid či oxidy disulfidu – thiosulfínátové, thiosulfonátové skupiny). Reaktivitu thiolové skupiny je poté možno modelovat změnou pH (Purkrťová 2012). Nejvhodnější jsou samozřejmě pevné, dlouhotrvající (kovalentní) vazby, které není možné jednoduše přerušit vnějšími vlivy.

Asi nejrozšířenější imobilizační technikou je vazba enzym–nosič pomocí kovalentní vazby. Velká rozšířenost této metody je umožněna širokou škálou reakcí závislých na funkční skupině přístupné pro danou matici (nosič). Principem této metody je aktivace substrátu v důsledku modifikace její funkční skupiny, ta způsobí vznik aktivované skupiny přímo v řetězci polymeru. Aktivace většinou vede k vytvoření elektrofilní skupiny na polymeru, která následně reaguje se silným nukleofilem v imobilizovaném proteinu (Mateo et al. 2007). Pro následnou reakci aktivované skupiny matrice s enzymem se nejčastěji využívá těchto skupin v proteinech: lysin (ϵ -amino skupina); cystein (thiolová skupina); asparágová a glutamová kyselina

(karboxylová skupina) (Chen et al. 2013). Reaktivita skupiny v postranním řetězci proteinu je určena stavem protonizace ($\Rightarrow$ vliv pH) a sleduje následující zákonitost:



Nevýhodou této metody je nutná aktivace nosiče, výhodou je pevnost vazby. Protože se u většiny metod již doporučuje spíše vlhké prostředí v rání, hrozí také odtok aktivních látek (v našem případě enzymů). Při kovalentním navázání však tento problém odpadá (Lovětinská-Šlamborová et al. 2014). Speciálním druhem kovalentní vazby je tedy vazba disulfidickými můstky, která je vratná, ostatní kovalentní vazby jsou nevratné. Ve většině případů jsou nevratné také metody nazývané zachycení, enkapsulace a prokřížení (Obrázek 2). Příkladem kovalentní vazby často využívané pro imobilizaci enzymů je vazba pomocí glutaraldehydu a vazba epoxy skupinou (Purkrťová 2012).

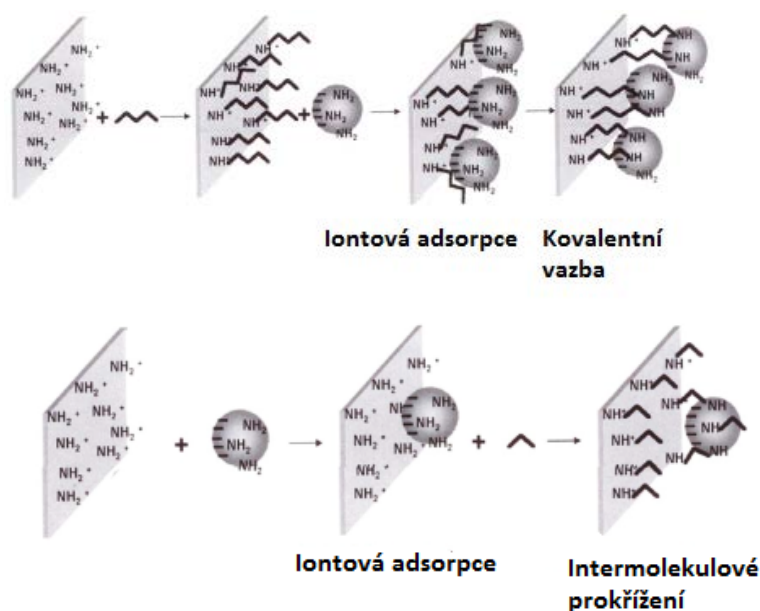


Obrázek 2: Vratné metody imobilizace enzymů na substrát - přeloženo z (Guisan 2006).

2.4.3 Imobilizace pomocí glutaraldehydu

Je to jedna z nejpoužívanějších metod. Je možné použít glutaraldehyd buď přímo pro aktivaci substrátu, nebo je často také využívána metoda, kdy dochází nejprve k aktivaci substrátu amino skupinami pomocí (3-Aminopropyl)triethoxysilanu, a poté k prokřížení enzymu a nosiče za pomoci glutaraldehydu (Obrázek 3). Principem je vznik Schiffovy báze, která vzniká po 0,5 až 2 hodinách u substrátů funkcionalizovaných aminovou skupinou

a glutaraldehydem v 1 až 5% vodném roztoku – často ve fosfátovém pufru s pH = 7,0 (Swarnalatha et al. 2013; Zhang et al. 2013), popř. v citrátovo-fosfátovém pufru s pH = 6 (Yewale et al. 2013). Přesný popis funkcionalizace pomocí glutaraldehydu přímo na křemičitých nanočásticích silanizovaných pomocí APTES je uveden v článku Dandavate a kol. (2009). Po této reakci je druhá volná aldehydová skupina glutaraldehydu k dispozici pro stejnou reakci s NH_2 skupinou enzymu. Zbývající volné aldehydové skupiny se inaktivují glycinem nebo ethanolaminem. Někdy se provádí redukce Schiffovýchází ještě borohydridem, přičemž vzniklá vazba je stabilnější. Imobilizace pomocí glutaraldehydu je sice účinná a efektivní, nevýhodou je však samotný glutaraldehyd, který není biokompatibilní (Chen et al. 2013). Pro buňky je toxický (Beauchamp et al. 1992) a využívá se spíše jako dezinfekce.



Obrázek 3: Dva způsoby využití glutaraldehydu pro imobilizaci enzymů – přeloženo z (Guisan 2006).

Dokladem tohoto tvrzení je i studie Bayata a kol. (2019) věnující se vývoji chitosanových nanovláken s bromelainem, který byl již rozpuštěn v roztoku pro elektrostatické zvlákňování, a byl tedy ve 2% nebo 4% koncentraci součástí přímo vytvořených nanovláken. V případě, kdy byla pro zvýšení stabilizace těchto vláken použita metoda prokřížení (blíže o metodě je uvedeno níže v této kapitole) pomocí glutaraldehydu, byl materiál pro lidské kožní fibroblasty cytotoxický (konkrétně při použití 4% roztoku bromelainu). Přitom jinak byla samotná chitosanová nanovlákná, chitosanová nanovlákná s 2 % i 4 % bromelianu a samotný bromelain pro uvedený druh buněčné linie netoxické. Z těchto důvodů nebyl glutaraldehyd k imobilizaci vybrán. Vzhledem tomu, že je to ale nejčastěji používaná metoda pro imobilizaci enzymů

v jiných odvětvích než medicínských, byla tato metoda použita jako srovnávací a hlavním úkolem disertační práce bylo nahradit právě tento ligand.

Dalším příkladem nevratné metody imobilizace je tedy zachycení enzymu (entrapment). Jedná se o přichycení enzymu do polymerní struktury, která dovolí substrátu a produktům volně procházet, ale enzym zůstane zachycen. Způsoby zachycení mohou být pomocí gelu, polymeru, vlákn a mikro-enkapsulace (Kim et al. 2006). Nevýhodu tato metoda skýtá v omezení přenosu hmoty skrze membránu nebo gely. Nejznámější technikou využívající zachycení enzymu je imobilizace v sol-gelu. Enzym je zachycen do matrice SiO_2 a nosič vzniká kyselou či bazickou hydrolyzou tetraalkoxysilanů (např.: $[\text{Si}(\text{OR})_4]$, $[\text{RSi}(\text{OCH}_3)_3]$, nebo $[\text{Si}(\text{OCH}_3)_4]$).

Nevratnou imobilizaci zajišťuje i takzvaná enkapsulace. Nejčastěji se k imobilizaci enkapsulací využívá monovrstva či dvojvrstva fosfolipidů. Velkou výhodou tohoto postupu je možnost směřování komplexu enzym–substrát, proto se využívá u cílené dopravy léčiv. Metoda se také používá u špatně rozpustných látek. Poslední ze zmiňovaných metod je prokřížení (jinak také nazýváno cross-link). Pro tuto techniku je sice nezbytné použití bifunkčního činidla (nejčastěji glutaraldehydu), na druhou stranu je to jedna z mála metod, díky kterým je možná imobilizace i multimerních enzymů (Chen et al. 2013). V Tabulce 4 jsou porovnány faktory ovlivňující výběr způsobu imobilizace u 4 nejčastěji používaných metod imobilizace – adsorpce, kovalentní vazby, zachycení a enkapsulace. Pro imobilizaci enzymů v této práci byla vybrána kovalentní vazba enzymu na nanovlákn, protože se jedná o vazbu silnou, která nezabraňuje difúzi. Současně se vznikem kovalentní vazby dochází díky velmi reaktivnímu povrchu nanovláken zároveň k adsorpci na jejich povrch. Tento fakt je samozřejmě pozitivní, protože dochází k vyšší úspěšnosti imobilizace enzymů.

Tabulka 4: Porovnání metod imobilizace enzymů (Purkrťová 2012).

	Adsorpce	Kovalentní vazba	Zachycení	Enkapsulace
Příprava	jednoduchá	složitá	složitá	jednoduchá
Náklady	nízké	vysoké	střední	vysoké
Vazebná síla	liší se	silná	slabá	silná
Uvolnění enzymu	ano	ne	ano	ne
Uplatnitelnost	široká	selektivní	široká	velmi široká
Vliv matrice	ano	ano	ano	ano
Zábrany pro difúzi	ne	ne	ano	ano

2.5 Využití nanovláken jako substrátu pro imobilizaci enzymů

Nanovlákná jsou vlákna s průměrem od 1 do 999 nm, přičemž jejich délka výrazně převyšuje průměr. Díky velmi malému průměru získávají nanovlákná odlišné vlastnosti než vlákna s průměrem v mikrometrech, nebo milimetrech. Čím menší je průměr, tím větší je zakřivení povrchu. Díky této skutečnosti je povrch nanovláken velice reaktivní a jejich měrný povrch velmi vysoký – jedná se o jednotky až desítky m^2/g . Pro využití nanovláken při léčbě ran je také důležité, že nanovlákná mají stejné mechanické vlastnosti jako vlákna s větším průměrem, jsou tvarovatelná a mohou se přizpůsobit reliéfu rány (Slamborova et al. 2014).

Byl prokázán také účinek nanovláken na nově se tvořící tkáň při léčbě ran. Protože jsou nanovlákná svou strukturou velmi podobná mezibuněčné hmotě, pozitivně ovlivňují uspořádání, tvar a funkci buněk v první fázi tvorby nové kůže (Chandrasekaran et al. 2011). Nanovlákná je možno vytvořit několika způsoby od vymývání částic, separace fází, metodou 3D tiskáren, odstředivým zvlákňováním a elektrospinningem (elektrostatickým zvlákňováním), tedy zvlákňováním při účinku elektrického pole (Tamayol et al. 2013). Právě poslední ze jmenovaných metod je asi tou nejznámější a nejčastěji používanou.

Pokud se zaměříme na využití elektrostaticky zvlákněných nanovláken k imobilizaci enzymů, Srbová a kolektiv (2016) ve své práci porovnávali stabilitu proteolytického enzymu trypsinu navázaného na chitosanová nanovlákná buď kovalentní vazbou, nebo adsorpcí. Výsledkem práce je opětovně fakt, že stabilita trypsinu se pomocí kovalentního navázání oproti naadsorbování na nanovlákná několikanásobně zvýšila. Je to ovšem jen jedna z velmi mála prací, která se touto problematikou zabývá, navíc vlastnosti chitosanových vláken se velmi často mění při každém zvlákňování. Nanovlákná vyrobená touto metodou mají průměr vláken většinou od 10 do 100 nanometrů, vykazují se velmi vysokou porozitou s propojenými póry, čímž se reálně přibližují struktuře mezibuněčné hmoty (Ingavle a Leach 2014). Porozita zároveň zajišťuje další důležitou vlastnost nanovláken – bezproblémový přístup kyslíku do rány a odtok exsudátu z rány, aniž by póry prošly bakterie, které jsou již větších rozměrů (Najafabadi et al. 2014).

2.5.1 Výroba křemičitých nanovláken

Při přípravě nanovláken pomocí elektrostatického zvlákňování dochází k tvorbě nanovláken z polymerního roztoku nebo taveniny v elektrostatickém poli. Za rozšíření této metody se velmi zasloužila také Technická univerzita v Liberci společně s firmou Elmarco skrze

světový patent na výrobu nanovláken v průmyslovém měřítku (A method of nanofibres production from a polymer solution using electrostatic spinning and a device for carrying out the method – WO2005024101A1) (Jirsak et al. 2005).

Bližší popis pouze princip elektrostatického zvlákňování z polymerního roztoku, protože tento způsob byl použit pro výrobu křemičitých vláken využívaných v předkládané práci. Při elektrostatickém zvlákňování dochází společně se zvyšováním intenzity elektrického pole ke vzniku Taylorových kuželů na povrchu polymerního roztoku. Při převážení repulsivních elektrostatických sil nad povrchovým napětím roztoku dochází k vylétnutí řetězce polymerního roztoku z anody ke katodě se současným velmi rychlým odpařováním rozpouštědla. Výsledkem jsou vytvořená nanovlákná sbíraná na kolektor. Výslednou morfologii vytvořených nanovláken ovlivňuje velikost zvoleného napětí (čím vyšší napětí, tím lepší homogenita a uniformita vláken) a vzdálenost mezi anodou a katodou.

Křemičitá nanovlákná byla vyrobena elektrostatickým zvlákňováním z prekurzoru tetraethoxysilanu, který se postupným zrání mění ze solu na gel (SLAMBOROVA et al. 2014). Aby bylo možné vytvořit roztok pro zvlákňování nanovláken metodou sol-gel, kde se bude roztok postupně měnit ze solu na gel pomocí kyselé katalýzy, je nutné udržet molární poměr vody a tetraethoxysilanu v rozmezí 1,6 až 3 ($k = [\text{H}_2\text{O}] / [\text{tetraethoxysilan}] = 1,6-3$) a molární poměr kyseliny a tetraethoxysilanu v rozmezí 0,001 až 1 ($m = [\text{kyselina}] / [\text{tetraalkoxysilan}] = 0,001-1$). Pro výrobu vhodného roztoku pro zvlákňování je nutné v dalším kroku oddestilovat rozpouštědlo v takovém množství, aby výsledná koncentrace SiO_2 byla v solu 28 až 44 hmotnostních procent.

K výrobě nanovláken pro jedno zvlákňování bylo tedy vždy použito 300 ml tetraethoxysilanu a 330 ml isopropylalkoholu. Po 15 minutách bylo k těmto chemikáliím přidáno dalších 200 ml isopropylalkoholu, 8 ml 2M kyseliny chlorovodíkové a 60 ml destilované vody. Směs byla kontinuálně míchána s frekvencí asi 200 otáček za minutu po dobu 50 minut. Poté byl počet otáček zvýšen na 300 za minutu a vystaven teplotě 200 °C po dobu 2 hodin v olejové lázni. V posledním kroku bylo oddestilováno asi 400 ml isopropylalkoholu. Vzniklý sol byl uchováván v polyethylentereftalátové lahvi a následně elektrostaticky zvlákňován.

K elektrostatickému zvlákňování dochází vždy jen za určité viskozity. Protože sol se postupně mění na gel a neustále zvyšuje svou viskozitu, musí být tato fyzikální veličina vždy pečlivě kontrolována. Optimální viskozita pro elektrostatické zvlákňování solu vyrobeného výše

uvedeným způsobem je v rozmezí mezi 55–70 dPas. Sol byl vždy zvlákněn z volné hladiny na bezjehlovém přístroji NanospiderTM od firmy Elmarco za přesně kontrolovaných podmínek (vzdálenost elektrod: 140 mm, rychlost posuvu podkladu na kolektoru: 0,2 mm/s, elektrické napětí: 57 kV, vlhkost vzduchu: 33 % a laboratorní teplota: 23 °C).

2.5.2 Stabilizace nanovláken pomocí teploty

Vlákna je nutné po zvláknování tepelně stabilizovat. Teplota stabilizace poté ovlivňuje zejména počet aktivních SI-OH skupin pro následnou vazbu s aminoalkoxysilany a rychlost rozpuštění vyrobených nanovláken s tím, že platí, čím vyšší teplota, tím pomalejší rozpouštění. Vlivu teploty stabilizace na těchto vláknech se již věnovala předchozí práce (Studničková et al. 2007), ve které byl zkoumán vliv teploty stabilizace vláken na jejich vlastnosti. Použita byla termogravimetrická analýza a infračervená spektroskopie. Vlákna byla vždy teplotně stabilizována do 800 °C, testovány byly 4 rychlosti zahřívání od 1 °C za minutu až po 10 °C za minutu. Testováním bylo zjištěno následující – při teplotě 100 °C se uvolňuje pouze fyzikálně vázaná voda, k další změně dochází okolo teploty 350 °C, při které dochází k uvolnění vody vázané v Si-OH skupinách a k uvolnění všech ostatních organických sloučenin. Po vystavení vláken teplotě 550 °C po dobu 2 hodin se již nevyskytuje ve vláknech nic jiného než amorfni oxid křemičitý. K přeměně na křemenné sklo dochází kolem teploty 850 °C (Studničková et al. 2007).

Na základě těchto a dalších výsledků testů paní docentky Ireny Lovětinské-Šlamborové a pana docenta Petra Exnara byly stanoveny 3 různé teploty stabilizace, u kterých byl dále zkoumán vliv teploty na vlastnosti nanovláken. Jednalo se o teploty 180 °C, 260 °C a 550 °C. Tyto teploty odpovídají optimálním rychlostem rozpouštění křemičitých nanovláken v tělních tekutinách podle požadovaného účelu. Čím je vyšší teplota, tím je pomalejší rozpouštění (Paprčková 2017).

Teoretická část byla věnována vysvětlení, proč je nutné v prvním fázi hojení ran kůže odstranit nekrotickou tkáň a proč tento úkon není jednoduchý. Enzymatický debridement není určitě jediný použitelný způsob, je zde ale velká možnost pro vývoj metody bezbolestného odstranění nekrózy s využitím všech výhod nanovláken.

3 PRAKTICKÁ ČÁST

Praktická část disertační práce se věnuje optimalizaci imobilizačního procesu proteolytických enzymů na křemičitá nanovlákná takovým způsobem, aby si enzymy zachovaly co nejdéle svou aktivitu a mohly být tímto způsobem použity při odstranění nekrotické tkáně povrchových ran. Postup výroby nanovláken nebyl v této disertační práci řešen, ani nijak upravován, práce je zaměřena zejména na kovalentní navázání proteolytických enzymů pomocí zdravotně nezávadných ligandů a výběr co nejvhodnějšího proteolytického enzymu. Testováno bylo tedy několik druhů ligandů, vliv teploty a hodnoty pH na proteolytickou aktivitu enzymů, byly provedeny opakované testy cytotoxicity, testy stability, antibakteriální testy, testy na modelu popálené prasečí kůže a další.

3.1 Křemičitá nanovlákná a vliv teploty stabilizace na jejich vlastnosti

Pro výrobu vzorků napomáhajících bezbolestnému odstranění nekrotické tkáně byla na základě dřívějších výsledků týmu paní docentky Ireny Lovětinské-Šlamborové vybrána křemičitá nanovlákná. Popis jejich výroby je uveden v patentu Nanofiber structure with immobilized organic agents and the method of its preparation – WO 2014026656 A1 (Slamborova et al. 2014), zkráceně také v kapitole 2.5.1.

Hodnota teploty pro stabilizaci zvlákněných nanovláken byla v prvních letech práce na mé disertaci ovlivněna kvalifikačními pracemi studentky Markéty Paprčkové. Ta se věnovala ve své bakalářské a následně diplomové práci vlivu teploty stabilizace křemičitých nanovláken na jejich rozpouštění ve vodném prostředí (Paprčková 2014) a poté ve vybraných tělních tekutinách (Paprčková 2017). Nejdůležitějším výsledkem bakalářské práce studentky Paprčkové pro mou vlastní disertační práci bylo zjištění, že nanovlákná stabilizovaná při teplotě menší než 400 °C lze považovat za zdravotně nezávadná (v případě rozpouštění ve fyziologickém roztoku), vlákna tepelně zpracovaná při 500 °C již dosahují hraničních hodnot a vlákna stabilizovaná na vyšší teplotu než 500 °C již nesplňují kritéria pro bezpečné rozpouštění.

V rámci diplomové práce studentky Markéty Paprčkové byl zkoumán vliv teploty stabilizace na rozpouštění nanovláken v tělních tekutinách. V práci je uvedeno, že rozpouštění většiny nanomateriálů probíhá podle kinetiky prvního řádu. Díky tomu je možné odhadnout poločas

rozpuštění nanovláken jako míru jejich biodurability (schopnosti odolávat chemickým a fyziologickým změnám). Vystavit nanovláknům působení simulovaných tělních tekutin a měřit poločas rozpouštění je jedna z mála možností, jak odhadnout interakci daného materiálu s biologickým prostředím (Maxim et al. 2006). Studentka Paprčková porovnávala své výsledky se závěry testování provedené firmou Johns Manville Corporation, která realizovala testy rozpustnosti několika typů vláken a uvedla, že vlákna mající poločas rozpouštění nižší než 40 dní, lze považovat za zdravotně nezávadná (Hesterberg a Hart 1999). Pro aplikace nanovláken s imobilizovanými enzymy na odstranění nekrotické tkáně objevující se u kožních ran byly nejdůležitější výsledky rozpustnosti křemičitých nanovláken v simulovaném potu. Byly testovány 2 druhy simulovaného potu (s hodnotou pH = 4,5 a pH = 5,4). V případě tepelné stabilizace při 180 °C byla podmínka zdravotní nezávadnosti splněna v obou simulovaných potech, opačně při tepelné stabilizaci při teplotě 550 °C nebyla tato podmínka zdravotní nezávadnosti splněna ani v jednom ze simulovaných potů. Ze všech testů i na jiných simulovaných tekutinách vyplynulo, že čím je vyšší hodnota pH, vyšší obsah organických látek a vyšší iontová síla, tím je rychlost rozpouštění vyšší.

Již v kapitole 2.5.2 a v citovaných kvalifikačních pracích bylo uvedeno, proč pro tepelnou stabilizaci křemičitých nanovláken byly vybrány tyto hodnoty – 180, 260 a 550 °C. Stabilizace probíhala vždy 2 hodiny. V první části předkládané disertace byla tedy používána křemičitá nanovláknová stabilizována na tyto teploty a byl zkoumán jejich vliv na strukturu nanovláken, proteolytickou aktivitu enzymů a cytotoxicitu.

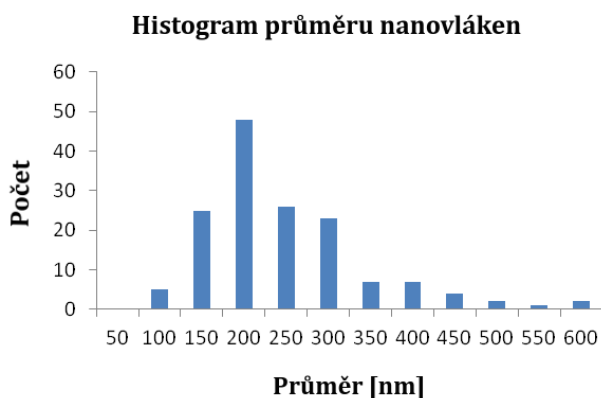
3.1.1 Vizualizace nanovláken

Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

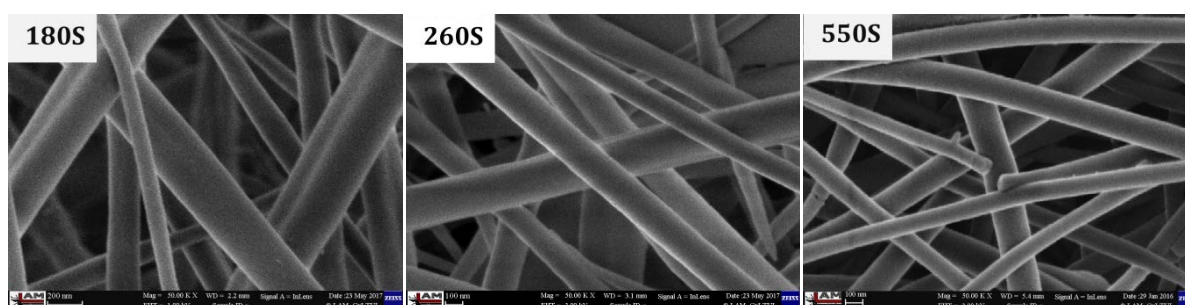
Křemičitá nanovláknová vyrobena výše popsaným způsobem byla vždy vizualizována pomocí SEM. Použit byl mikroskop Carl Zeiss ULTRA Plus a vlákna byla vždy pozlacena pro odvedení náboje. Byl použit režim sekundárních elektronů SE1. Měření průměrů nanovláken bylo provedeno pomocí obrazů SEM v programu SW NIS-Elements AR a statisticky zpracováno prostřednictvím programu QCExpert (TriloByte Statistical Software, Pardubice, Česká republika). Plošná hmotnost byla vypočítána z 9 sérií zvlákňování, vždy byly měřeny 3 vzorky z každého zvlákňování a hodnota se pohybovala v rozmezí 25–55 g/m².

Průměr nanovláken byl měřen opakovaně na náhodně vybraných vláknech a pohyboval se v intervalu 80–650 nm. Na Obrázku 4 je znázorněn histogram průměru nanovláken,

vypočítán ze 150 měření průměru vláken na 3 náhodných SEM snímcích křemičitých nanovláken tepelně stabilizovaných, při teplotě 260 °C. SEM snímky křemičitých nanovláken s teplotou stabilizace 180 °C (180S), 260 °C (260S) a 550 °C (550S) bez enzymu jsou znázorněny na Obrázku 5.

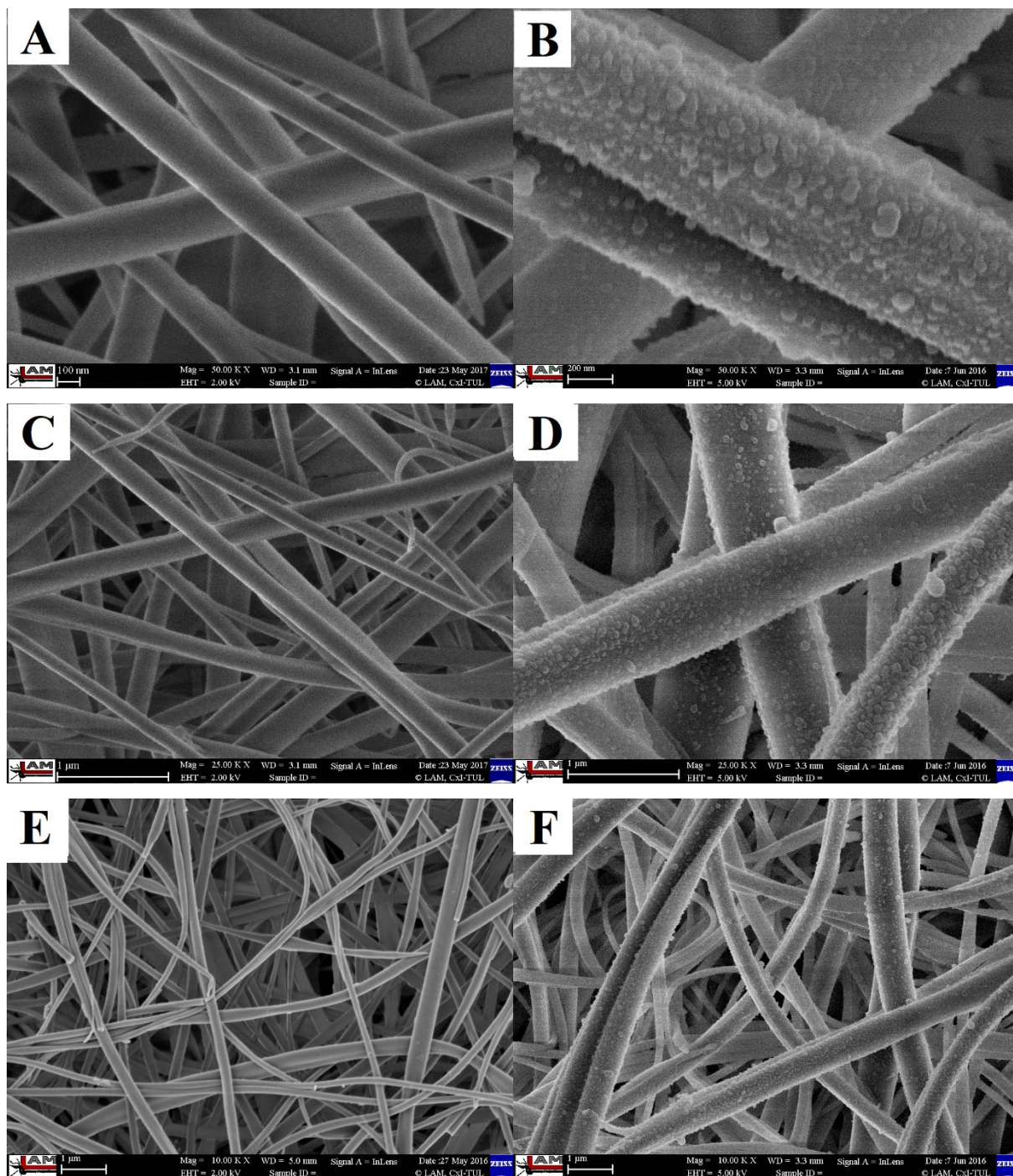


Obrázek 4: Histogram průměru křemičitých nanovláken stabilizovaných při teplotě 260 °C (počet měření = 150, náhodně měřeno na 3 SEM snímcích).



Obrázek 5: SEM snímky nanovláken s odlišnou teplotou stabilizace (180 °C = 180S, 260 °C = 260S a 550 °C = 550S). Zvětšení 50 000x.

Pořízeny byly také SEM snímky standardních křemičitých nanovláken a nanovláken s imobilizovanými enzymy. Jednalo se buď o metodu úpravy B-DSC (více o metodě v kap. 3.2.4) s imobilizovaným trypsinem z hovězího pankreatu EC 3.4.21.4 (Obrázek 6 B), nebo o metodu úpravy A-EDC (více o metodě v kap. 3.2.3.) s imobilizovaným trypsinem (Obrázek 6 D a 6 F). Snímky byly pořízeny s různým zvětšením. Na snímcích s imobilizovanými enzymy (B, D a F) jsou jasně viditelné „kuličky“ na povrchu nanovláken. Povrch nanovláken není hladký jako v případě standardů. Všechna vlákna byla tepelně stabilizována na teplotu 180 °C.



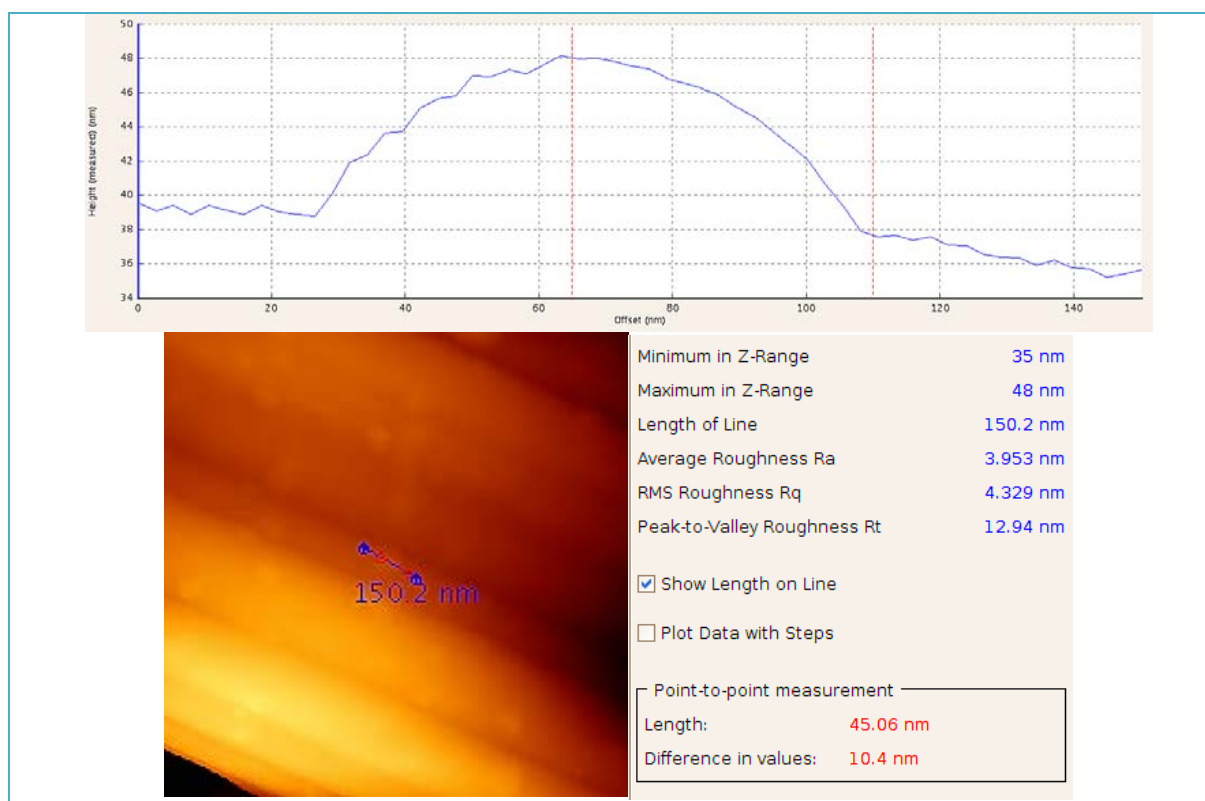
Obrázek 6: SEM snímky standardních nanovláken bez enzymu (A, C a E) a s imobilizovanými enzymy: metoda úpravy B-DSC s trypsinem (B), metoda úpravy A-EDC s trypsinem (D a F). Zvětšení: 50 000 x (A, B), 25 000 x (C, D), 10 000 x (E, F).

Mikroskopie atomárních sil (AFM)

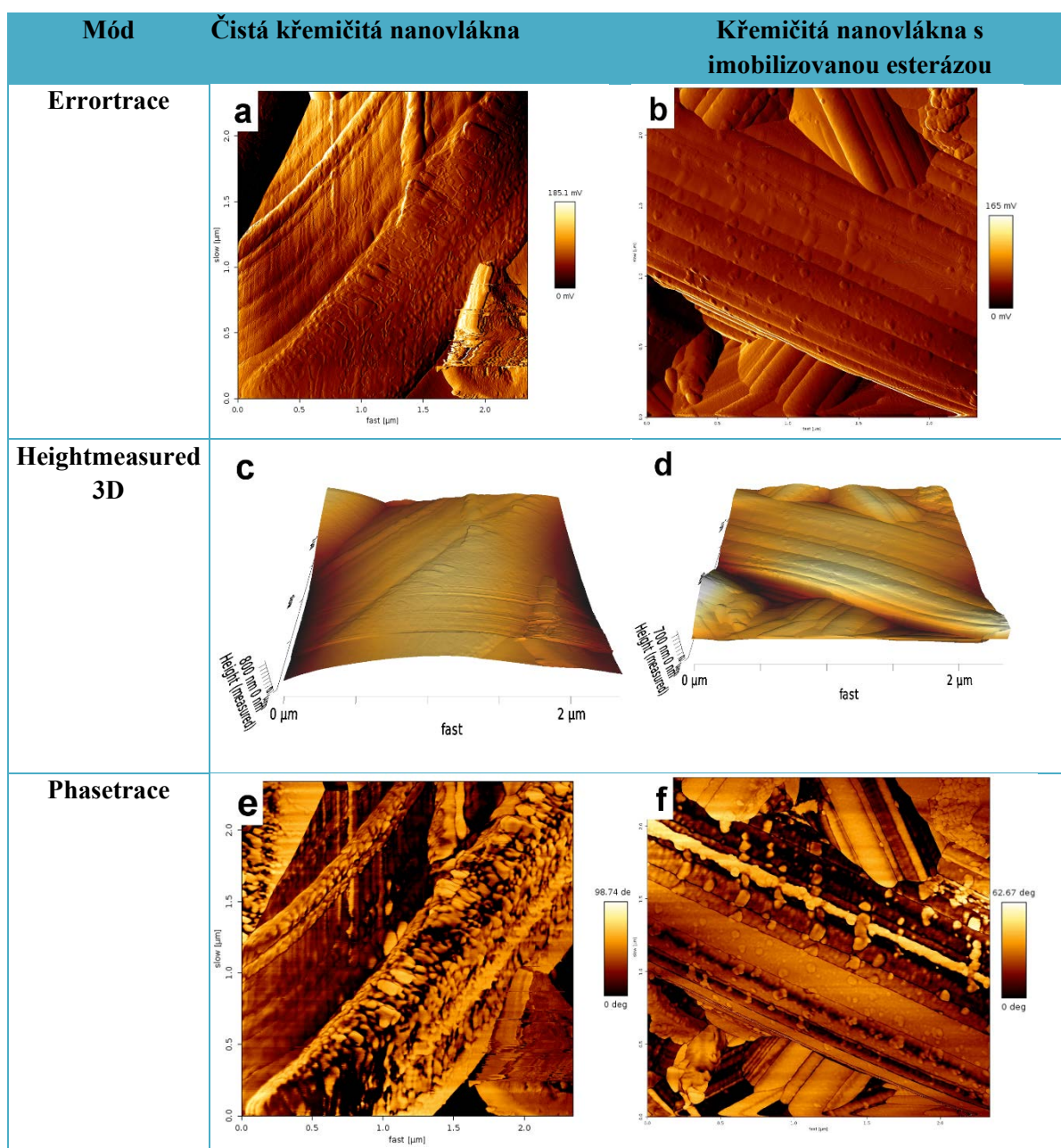
K vizualizaci povrchu nanovláken byl použit také mikroskop atomárních sil NanoWizardIII. Pomocí AFM byla vizualizována křemičitá nanovlákná s imobilizovaným modelovým enzymem – esterázou z prasečích jater (EC 3.1.1.1). Křemičitá nanovlákná byla stabilizována při teplotě 180 °C, povrch nanovláken byl následně upraven pomocí (3-Aminopropyl)-

triethoxysilanu (APTES) a glutaraldehydu – více o metodě v článku: (Danilova et al. 2014). Vzorek byl připraven za použití speciální reverzibilní pásky, skenovací plocha byla 2,3 x 2,3 μm a byl použit bezkontaktní mód. Vzorky byly zobrazeny v módu “errortrace”, “heightmeasuredtrace 3D” a “phasetrace”. Data byla zpracována v programu JPK DataProcessing a byla měřena velikost vázaného enzymu esterázy a vzdálenost mezi dvěma sousedními molekulami esterázy.

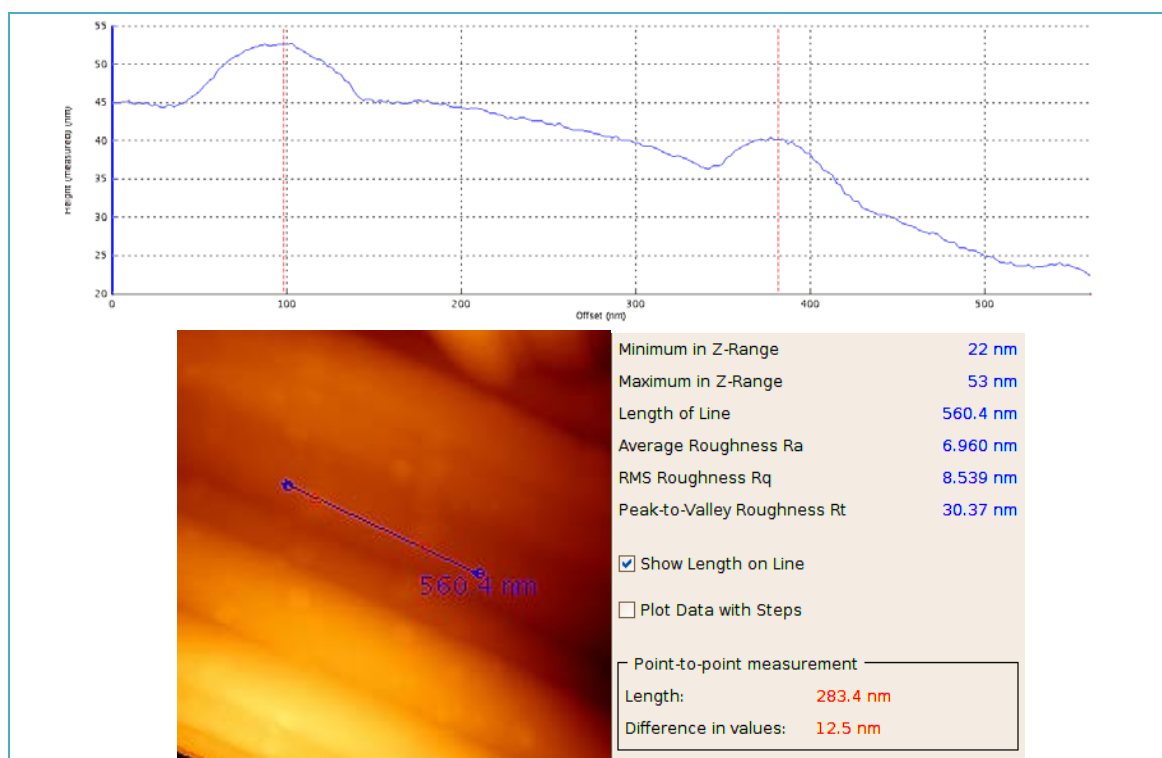
Obrázek 7 jasně potvrzuje, že velikost imobilizovaného enzymu je asi 10 nm. Velikost imobilizovaného enzymu samozřejmě vždy závisí na shluku molekul esterázy a pohybuje se od 10 nm do 40 nm. Porovnání všech zobrazovacích módů je na Obrázku 8. Z Obrázku 9 je patrné, že vzdálenost mezi dvěma sousedními molekulami vázané esterázy je asi 280–290 nm. Snímání vzorků pomocí AFM nebylo poté již dále používáno a k zobrazení povrchu byla používána metoda SEM.



Obrázek 7: Profil osy a naměřené hodnoty velikosti molekuly esterázy z AFM snímku v módu "heightmeasured 3D". Skenovaná plocha: 1,5 x 1,5 μm .



Obrázek 8: AFM snímky čistých křemičitých nanovláken (a, c, e) a nanovláken s imobilizovanou esterázou (b, d, f), kde jsou jasně patrné malé kuličky esterázy na povrchu vláken. Skenovaná plocha je vždy 2,3 x 2,3 μm .



Obrázek 9: Profil osy a naměřené hodnoty vzdálenosti mezi dvěma molekulami esterázy z AFM snímku v módu "heightmeasured 3D". Skenovaná plocha byla 1,5 x 1,5 μm .

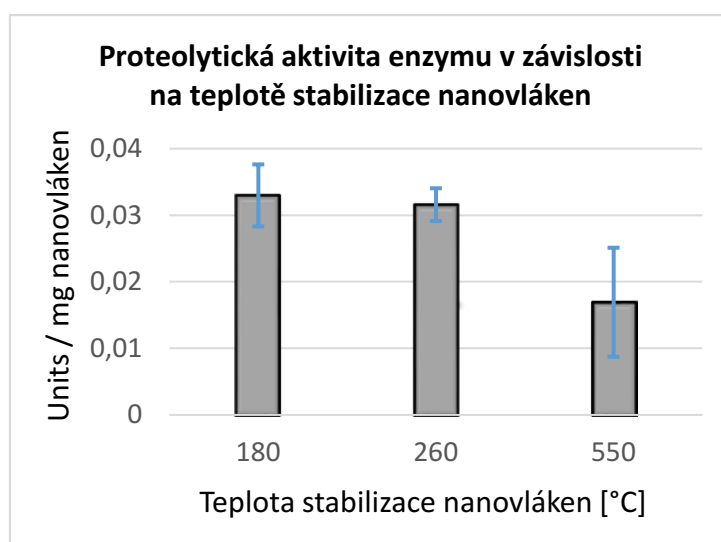
3.1.2 Charakterizace vlivu teploty stabilizace

Bylo provedeno také měření průměru nanovláken stabilizovaných na teplotu 180, 260 a 550 $^{\circ}\text{C}$ bez enzymu (standardu nanovláken) a s imobilizovaným enzymem (jednalo se o enzym bromelain ze stonku ananasu (EC 3.4.22.32), imobilizace byla provedena pomocí metody A-EDC, více o této metodě je uvedeno v kapitole 3.2.3). Základní charakteristiky jsou uvedeny v Tabulce 5. Zdá se, že se zvyšováním teploty stabilizace se zvyšuje průměr vláken, kvůli velké směrodatné odchylce nelze ale toto tvrzení brát jako statisticky významné. Dále měření průměru potvrdilo jeden fakt viditelný na Obrázku 7 v kap. 3.1.1 – průměr nanovláken s imobilizovanými enzymy je větší než u standardu nanovláken bez enzymu.

Tabulka 5: Základní charakteristiky křemičitých nanovláken s odlišnou teplotou stabilizace.

Teplota stabilizace	Enzym	Označení	Průměr vláken	Směrodatná odchylka	Minimální průměr	Maximální průměr
180 $^{\circ}\text{C}$	—	180S	160,92 nm	93,08 nm	95,68 nm	528,57 nm
	Bromelain	180B	165,9 nm	63,02 nm	70,43 nm	447,5 nm
260 $^{\circ}\text{C}$	—	260S	171,39 nm	87,98 nm	45,76 nm	538,07 nm
	Bromelain	260B	231,18 nm	88,9 nm	90,98 nm	448,29 nm
550 $^{\circ}\text{C}$	—	550S	213,25 nm	82,98 nm	95,25 nm	438,45 nm
	Bromelain	550B	241,19 nm	125,98 nm	92,97 nm	595,02 nm

Na Obrázku 10 jsou uvedeny výsledky testu proteolytické aktivity imobilizovaného enzymu PR (proteáza z *Aspergillus oryzae*, EC 232-642-4) v závislosti na teplotě stabilizace křemičitých nanovláken. Enzym byl imobilizován podle postupu uvedeném v kapitole 3.2.3, proteolytická aktivita byla měřena pomocí Lowryho metody uvedené v kap. 3.4. Pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) bylo zjištěno, že se proteolytická aktivita imobilizovaného enzymu liší na hladině významnosti 5 % v závislosti na teplotě stabilizace nanovláken. Pomocí dvouvýběrového t-testu bylo ověřeno, že nejnižší proteolytická aktivita imobilizovaného enzymu byla na vláknech s teplotou stabilizace 550 °C, vyšší aktivita enzymu byla v případě použití nanovláken stabilizovaných při 180 a 260 °C. Přitom rozdíl aktivity na těchto vláknech nebyl statisticky významný na hladině 5 %.

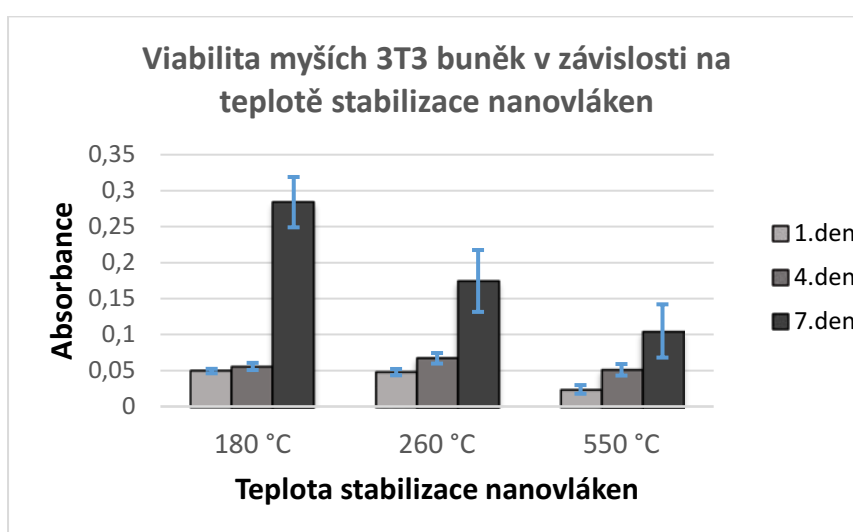


Obrázek 10: Proteolytická aktivita enzymu PR (proteáza z *Aspergillus oryzae*) při teplotě 37 °C a hodnotě pH = 7 v závislosti na teplotě stabilizace křemičitých nanovláken. Hodnoty byly průměrovány ze 4 vzorků.

Proveden byl také kolorimetrický test měřící metabolickou aktivitu buněk (test MTT, viz. kap. 3.6.1) v kontaktu s nanovláknem stabilizovanými na 3 uvedené teploty. Byly použity buňky 3T3-SA myší fibroblasty. Viabilita byla měřena 1., 4. a 7. den po nasazení buněk na nanovlákn. Složení média bylo následující: Dulbekovo modifikované Eaglovo médium s vysokým obsahem glukózy (DMEM High Glucose) a 10 % fetálního bovinního séra (FBS), 1 % antibiotik (ATB) a 1 % L-glutaminu. Výsledek testu velmi ovlivnil způsob sterilizace vzorků. Po imobilizaci enzymu byly vzorky sterilizovány pomocí studeného ethylenoxidu a poté odvětrávány 14 dní. V porovnání výsledků MTT testu prováděných stejnou laboratoří (laboratoř KNT, TUL) na shodných křemičitých nanovlákních za použití identické metody

i buněk, byla viabilita výrazně nižší v případě použití ethylenoxidu pro sterilizaci oproti sterilizaci v autoklávu. Na základě těchto výsledků, byla metoda sterilizace pomocí ethylenoxidu označena za nevhodnou (viz. kap. 3.5.2). Z grafu na Obrázku 11 je nicméně znatelné, že metabolická aktivita buněk se snižovala se zvyšující se teplotou stabilizace. Na základě těchto a výše uvedených výsledků, byla jako nejvýhodnější teplota stabilizace nanovláken zvolena hodnota 180 °C.

Pokud byla dále v disertační práci použita teplota 260 nebo 550 °C, bylo to z důvodu, že testy byly prováděny ještě před vyhodnocením vlivu teploty stabilizace, nebo byly prováděny souběžně s těmito testy.



Obrázek 11: Graf závislosti viability myších 3T3 fibroblastů na teplotě stabilizace křemičitých nanovláken. Měřeno 1., 4. a 7. den od nasazení buněk na nanovlákná. Sterilizace pomocí ethylenoxidu, test kontaktem.

3.2 Úprava povrchu nanovláken

Pokud není pro zamýšlenou aplikaci vhodné využít pouze fyzikální adsorpci biomolekul na povrch nanovláken, ale je vhodné využít kovalentní vazby, nebo disulfidických můstků – což je i náš případ – je nutné většinou povrch nanovláken aktivovat (upravit tak, aby bylo možné na povrch navázat biomolekuly). Modifikovat povrch nanovláken lze pomocí plazmy, mokrou chemickou metodou (wet chemical treatment), povrchovou polymerizací (surface graft polymerization), nebo ko-elektrospinning povrchu vláken pomocí povrchově aktivních látek. Pomocí působení plazmy je možné upravit chemické složení povrchu nanovláken napomáhající buď ke zvýšení biokompatibility, nebo možnosti kovalentního navázání biomolekul. Typické

je plazmování pomocí kyslíku, amoniaku, nebo vzduchu, které vede ke vzniku povrchových karboxylových, nebo amino skupin. Plazmování pomocí argonu se často využívá ke zvýšení adheze buněk na povrch. Principem mokré chemické metody je částečná povrchová hydrolýza, která má za následek buď změnu smáčivosti povrchu, nebo vznik nových funkčních skupin. Pro úpravu nanovláknenných materiálů je využívána častěji než plazmování, protože plazmové ošetření nemůže účinně modifikovat silnější vrstvy nanovláken uvnitř vrstvy (Yoo et al. 2009).

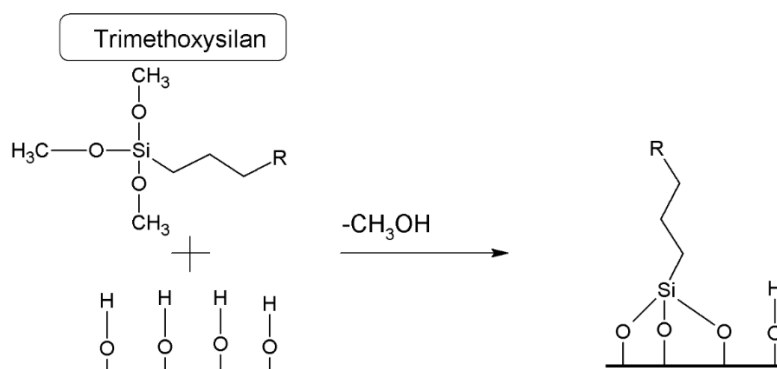
Před samotným začátkem úpravy povrchu nanovláken je nutné si uvědomit, jak enzymy reagují a tedy jaké funkční skupiny je výhodné na povrch nanovláken navázat. Enzymy jsou složeny z proteinů, ty jsou složeny z aminokyselin spojených peptidovou vazbou. Nejvýznamnější aminokyseliny pro účely modifikace a konjugace jsou ty, které obsahují ionizovatelné postranní řetězce: kyselinu asparagovou, kyselinu glutamovou, lysin, arginin, cystein, histidin a tyrosin. Postranní řetězce těchto aminokyselin mohou být silným nukleofilem, který se zapojí do adičních reakcí. Například lysin, arginin a histidin mají postranní řetězce obsahující ionizovatelný amin, který spolu s N-terminálním α -aminem přispívá k celkovému kladnému náboji proteinu. Protože se enzymy často vyskytují v prostředí s nižší hodnotou pH, než jsou hodnoty ionizačních bodů uvedených aminů (pKa primárních α -aminů v aminokyselinách je 7,6 až 8,0, aminů v postranním řetězci lysinu 9,3 až 9,5, v argininu okolo 12,0 a v histidinu 6,7-7,1), jsou tyto aminy protonovány a mají kladný náboj (Hermanson 2008).

Postranní řetězce obsahující amin v lysinu, argininu a histidinu jsou navíc na povrchu proteinů a mohou být snadno derivatizovány. Nejdůležitějšími reakcemi, které se mohou vyskytnout u těchto zbytků, jsou alkylace a acylace. Pokud tedy chceme kovalentně navázat enzymy na nanovláknena, musíme vybírat takové sloučeniny, které budou reagovat s těmito aminoskupinami. Například bromelain reaguje pomocí aminoskupin na aminokyselinách lysin, tyrosin, arginin a fenylalanin, trypsin pomocí aminoskupin na argininu a lysinu atd. (Hermanson 2008).

Úprava povrchu křemičitých nanovláken tedy spočívá v propojení SI-OH skupiny na povrchu nanovláken a aminoskupin na povrchu enzymu. Velmi často se v prvním kroku využívá procesu silanizace a následné jednostupňové, nebo dvoustupňové funkcionalizace. Za určitých reakčních podmínek je ale možné silanizaci vynechat a využít pouze jednostupňové funkcionalizace. O všech těchto možnostech pojednávají následující kapitoly.

3.2.1 Silanizace povrchu nanovláken

Díky výrobě nanovláken z tetraethoxysilanu obsahuje povrch nanovláken SI-OH skupiny, které se využívají k zavedení vhodných reaktivních skupin pro následnou kovalentní vazbu s enzymy. Nejčastěji se k úpravě povrchu křemičitých nanovláken využívá procesu silanizace – reakce hydroxylových skupin na povrchu křemičitých nanovláken s alkokoxysilany. Nejznámější alkokoxysilan pro tyto účely je (3-Aminopropyl)triethoxysilan (APTES). Dále je ale možné použít také (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilan, nebo (3-Glycidyloxypropyl)-trimethoxysilan (GLYMO) a další (Hermanson 2008), Obrázek 12.



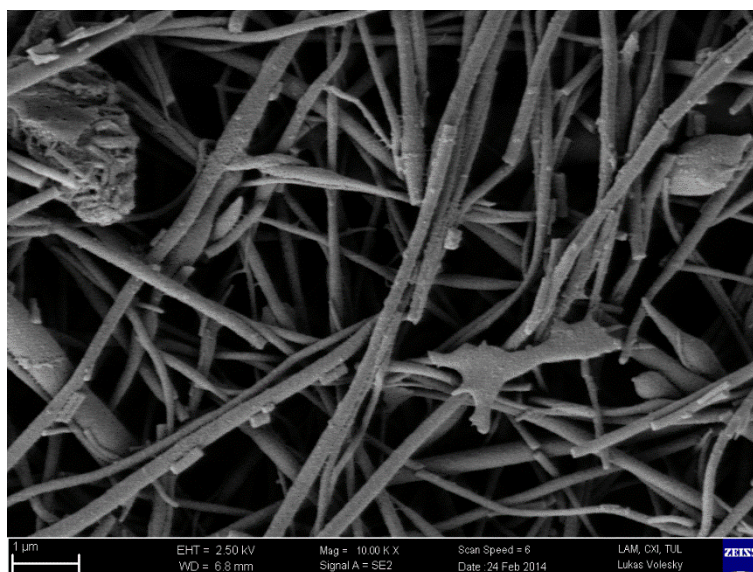
Obrázek 12: Princip silanizace povrchu křemičitých nanovláken pomocí trimethoxysilanu.

V této disertační práci byly použity dva alkokoxysilany: (3-Aminopropyl)triethoxysilan a (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilan. Pokud je využit APTES, tak ten reaguje s volnými hydroxylovými skupinami oxidovaného povrchu křemičitých nanovláken za uvolnění ethanolu a v druhém kroku dochází ke kondenzaci a horizontální polymeraci. Molekula APTES tvoří siloxan se sousedním povrchově vázaným APTES. Reaktivní skupinou pro navázání biomolekul, nebo pro další reakce je aminoskupina. V případě silanizace povrchu křemičitých nanovláken s (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilanem je výslednou reaktivní skupinou epoxy skupina, která podle hodnoty pH může reagovat zejména s thiolovou, aminovou nebo hydroxylovou skupinou biomolekuly. I při použití (3-Glycidyloxypropyl)-trimethoxysilanu dochází k tvorbě siloxanu (vazbě SI-O-SI) mezi sousedními molekulami GLYMO.

(3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilanu

Podle (Petkova et al. 2012) byl testován postup silanizace křemičitých nanovláken pomocí (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilanu. Nejprve byly testovány dvě koncentrace GLYMO rozpuštěné v absolutním toluenu. Práce probíhala v dusíkové atmosféře po dobu jedné hodiny

(koncentrace buď 4%, nebo 10% GLYMO v toluenu na 50 mg nanovláken). Dále byla vlákna vysušena v sušárně na 40 °C. Protože bylo pouhým okem vidět změnu struktury nanovláken, byl toluen zaměněn za 1,4-dioxan, nebo absolutní ethanol. I v těchto případech ale došlo k naprosté změně struktury vláken – k porušení vláken, polámání a vzniku „shluků a bublin“ (Obrázek 13). Makroskopicky se zdála nanovláknina podobná spíše folii než nanovláknům. Proto byl ke kroku silanizace zvolen pouze APTES, který již byl k tomuto kroku a na těchto nanovlákních využíván paní docentkou Irenou Lovětinskou-Šlamborovou k silanizaci před kovalentním navázáním antibiotika tetracyklin (Lovětinská-Šlamborová et al. 2014).



Obrázek 13: SEM snímek nanovláken po silanizaci 4% GLYMO v 1,4-dioxanu. Zvětšení 10 000 x.

(3-Aminopropyl)triethoxysilan

Dále byl tedy pro krok silanizace využívám pouze APTES a byly realizovány testy týkající se koncentrace APTES a načasování silanizace povrchu křemičitých nanovláken. Množství reaktivních aminoskupin (NH_2) navázaných díky silanizaci pomocí APTES na povrch křemičitých nanovláken bylo kvantifikováno pomocí činidla fluorescein-isothiokyanát (FITC). Jeho množství, které se naváže pouze na aktivní aminoskupiny z APTES je možné kvantifikovat spektrofotometricky při vlnové délce 490 nm. Díky kalibrační křivce a podle Lambert-Beerova zákona je možné z míry absorbance záření vzorku vypočítat množství aminoskupin, které jsou na křemičitých vláknech reaktivní a je možné je využít v následujícím kroku funkcionalizace.

Z Tabulky 6 vyplývá, že nejvyšší množství reaktivních aminoskupin při nejmenší koncentraci a nejkratší době silanizace je v případě reakce 2% APTES po dobu 2 hodin. Uvedené výsledky

je možné porovnat s výsledky z prvkové elementární analýzy, kde se stanovil obsah dusíku ve vzorku silanizovaných nanovláken pomocí 2% APTES (71 ± 8 μmol APTES na 1 g nanovláken) a s teoretickým výpočtem maximálního pokrytí povrchu nanovláken pro křemičitá vlákna s měrným povrchem $10 \text{ m}^2/\text{g}$ ($41 \mu\text{mol}$ APTES na 1 g nanovláken). Z výsledků tedy vyplývá, že APTES není na povrchu křemičitých nanovláken pouze v jedné vrstvě (protože množství APTES z elementární analýzy je vyšší než výpočet, kolik se vejde APTES v jedné vrstvě na povrch nanovláken). Zároveň je v Tabulce 6 dokázáno, že ne všechny aminoskupiny APTES jsou aktivní pro další reakce. Je to dané zejména tím, že APTES není v monovrstvě a díky stericitě nejsou dostupné všechny aminoskupiny APTES pro další reakce.

Tabulka 6: Množství reaktivních aminoskupin v závislosti na koncentraci (3-Aminopropyl)triethoxysilanu a době silanizace.

Koncentrace APTES	Množství reaktivních aminoskupin v μmol na 1 g nanovláken				
	Doba reakce				
	5 minut	30 minut	1 hodina	2 hodiny	4 hodiny
0,5 %.	$7,1 \pm 2,2$	$6,3 \pm 3,3$	$8,3 \pm 5,5$	$6,7 \pm 4,1$	$9,9 \pm 3,9$
1 %	$7,6 \pm 5,0$	$6,2 \pm 8,7$	$17,6 \pm 3,3$	$19,2 \pm 1,9$	$18,9 \pm 5,2$
2 %	$15,8 \pm 4,7$	$14,8 \pm 4,7$	$22,8 \pm 2,0$	$27,7 \pm 3,4$	$26,9 \pm 3,9$
5 %	$19,3 \pm 6,2$	$17,8 \pm 5,1$	$28 \pm 2,2$	$25,9 \pm 4,2$	$21,7 \pm 9,3$

Na základě informací z článku (Vashist et al. 2014), ve kterém se uvádí, že oplachování po silanizaci buď v toluenu, ethanolu, nebo ve vodě odstraňuje slabě vázané silanové molekuly a hydrolyzuje zbytky alkoholových vazeb, byla vždy vlákna po silanizaci 2 x opláchnuta v ethanolu. Na základě stejné studie, byla vlákna vždy po silanizaci a oplachu vystavena v sušárně teplotě 110°C po dobu 30 min. Při této teplotě dochází k přeměně amonných iontů na reaktivní neutrální aminy a vzniká tedy více siloxanových vazeb. Pokud by ovšem teplota překročila hodnotu 150°C , docházelo by k disociaci aminových skupin, což není žádoucí (Vashist et al. 2014). Ve stejné studii je také uvedeno, že nejvyšší hustoty APTES na povrchu křemičitých materiálů se docílí při koncentraci 2% APTES a při teplotě reakce 70°C . K silanizaci pomocí APTES by mělo docházet alespoň v částečně vodném prostředí, protože ethoxyskupiny nejsou dostatečně reaktivní, aby reagovaly s OH skupinami na povrchu křemičitých nanovláken bez předchozí hydrolyzy. Proto se většinou APTES rozpouští v 95% izopropylalkoholu, nebo ethanolu (Vashist et al. 2014). Všechna tato doporučení byla vyzkoušena a přejata do procesu výroby vzorků.

Pomocí metody využívající FTIC byl také testován způsob uchovávání vzorků po delší dobu. Křemičitá nanovlákná teplotně stabilizovaná na 260 °C byla silanizována ihned po zvlákňování, dále až 1 měsíc po zvlákňování a 2 měsíce po zvlákňování. Teplotní stabilizace následovala vždy neprodleně po zvlákňování. Z Tabulky 7 je výsledek tohoto testu jasný – čím déle po zvlákňování k silanizaci dochází, tím méně je na povrchu aktivních aminoskupin. Tato nevýhoda je přímým důsledkem jedné z hlavních výhod nanovláken – velmi reaktivního povrchu. Protože všechny naadsorbované molekuly by se ale měly při teplotě 150 °C resorbovat z povrchu nanovláken, bylo vyhřátí nanovláken na 150 °C po dobu dvou hodin zařazeno těsně před silanizací.

Tabulka 7: Množství reaktivních aminoskupin v závislosti na prodlení mezi zvlákňováním nanovláken a procesem silanizace.

Koncentrace APTES	Množství reaktivních aminoskupin v μmol na 1 g nanovláken		
	Silanizace ihned po zvlákňování	Silanizace 1 měsíc po zvlákňování	Silanizace 2 měsíce po zvlákňování
2 %	27,7 $\pm$ 2,0	13,9 $\pm$ 6,3	9,9 $\pm$ 4,4

Na základě rešerše a výše uvedených výsledků byl tedy stanoven postup silanizace následovně: teplotně stabilizovaná křemičitá nanovlákná byla vždy uchovávána v silném alobalu a uzavíratelném sáčku ve tmě v laboratorních podmínkách. Před silanizací byla nanovlákná vystavena teplotě 150 °C na 2 hodiny, následovala okamžitě silanizace pomocí 2% APTES v 95% izopropylalkoholu (dobu reakce 2 hod., teplota 70 °C). Poté následoval 2x oplach v ethanolu a vysušení vláken na 110 °C po dobu 30 min. Ihned po silanizaci následovala funkcionalizace povrchu nanovláken. Protože po silanizaci nanovláken pomocí APTES jsou na povrchu reaktivní aminoskupiny a reaktivní skupinou v enzymech pro kovalentní vazbu je také ve většině případů aminoskupina, je nutné v dalším kroku propojit tyto dvě aminoskupiny. Často se k tomu používají například bifunkční činidla. O bifunkčních činidlech a dalších reagentech, které nám umožní kovalentní vazbu mezi aminoskupinou APTES a proteolytickým enzymem pojednává následující kapitola a reakce je obecně nazývána jako funkcionalizace.

3.2.2 Funkcionalizace povrchu silanizovaných křemičitých nanovláken

Nejvíce času bylo věnováno kroku funkcionalizace nanovláken pomocí různých sloučenin a činidel. Často se používají halogenidy, bifunkční činidla, nebo sulfony. Jejich reaktivní

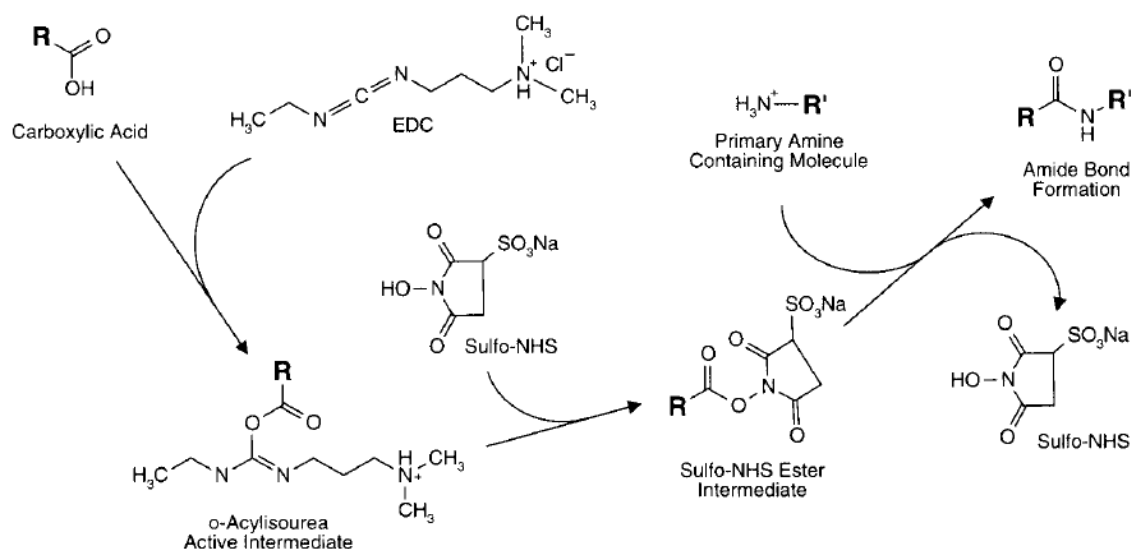
skupiny poté již reagují přímo s biomolekulami. V literatuře je popsáno opravdu nepřeberné množství možných postupů, většina sloučenin, nebo jejich rozpouštědel, ale mohou být pro organismus toxická. K funkcionalizaci je možné využít homobifunkční (se stejnými reaktivními skupinami na koncích), nebo heterobifunkční činidla (kde je každá reaktivní skupina na konci jiná).

NHS estery

Snad nejčastějším reagentem jsou NHS estery. Jedná se o ester N-hydroxysukcinimidu, který je vytvořen reakcí karboxylátu s N-hydroxysukcinimidem za přítomnosti karbodiimidu.

Pro vytvoření stabilního esteru je důležité, aby byl karbodiimid rozpustný ve vodě. Příkladem těchto karbodiimidů je N,N'-Dicyclohexylkarbodiimid (DCC), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid (EDC), nebo N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-karbodiimid (CMC).

V dalším kroku NHS estery reagují s primárními a sekundárními aminy na N-terminálních koncích enzymů a postranních řetězcích lysinu za vzniku stabilní amidové a imidové vazby. Jako meziprodukt vzniká O-acylisomočovina (popřípadě jiné močoviny, záleží na použitém karbodiimidu). Místo NHS je také možné využít pro tyto reakce N-hydroxysulfosuccinimid (sulfo-NHS). Na Obrázku 14 je schéma celého procesu – vzniku aktivního meziproduktu O-acylisomočoviny, dále vzniku aktivního sulfo-NHS esteru a konečného vzniku pevné amidové vazby s aminoskupinou a vedlejšího produktu: sulfo-NHS. Vznik NHS i sulfo-NHS esterů je ovlivněn procesem hydrolyzy. Vliv na rychlost hydrolyzy NHS esterů má i hodnota pH reakce (uváděná hodnota rozpadu NHS esteru při teplotě 0 °C a pH = 7,0 je 4 až 5 hodin (Lomant a Fairbanks 1976), naproti tomu při teplotě 4 °C a pH = 8,6 pouze 10 minut (Cuatrecasas a Parikh 1972). Pro maximální výtěžek reakce mezi aminoskupinou enzymů a NHS esterem, a zároveň minimalizaci vlivu hydrolyzy se tedy doporučuje poměr NHS esteru a enzymu 10:1, tvorba NHS esteru v organickém rozpouštědle a následná reakce s enzymy ve vodném prostředí (Hermanson 2008). Z výše popsaných karbodiimidů se nejčastěji používá EDC, protože jako meziprodukt vzniká ve vodě rozpustná o-acylisomočovina, která se díky této vlastnosti jednoduše odstraní ze směsi. Naproti tomu při použití DCC vzniká dicyklohexylmočovina, kterou je nutné odfiltrovat. DCC je navíc potenciálním alergenem.



Obrázek 14: Schéma vzniku amidové vazby mezi karboxylovou skupinou a aminoskupinou pomocí sulfo-NHS esteru s využitím 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu (EDC) a N-hydroxysulfosuccinimidu (Sulfo-NHS) a vznikem meziproduktů: O-acylisomočoviny (o-Acylisourea) a Sulfo-NHS (Hermanson 2008).

Anhydridy

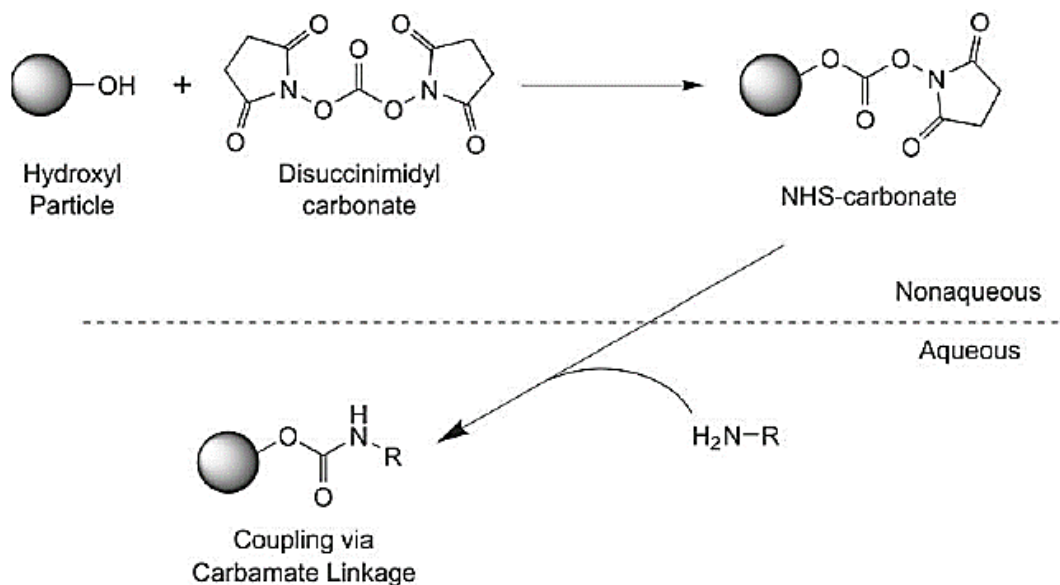
V našem případě je nutné před použitím těchto karbodiimidů vytvořit na povrchu křemičitých nanovláken karboxylové skupiny. Ke karboxylaci silanizovaných křemičitých nanovláken je možné využít například anhydridy: anhydrid kyseliny jantarové (sukcinanhydrid, SU), anhydrid kyseliny glutarové, anhydrid kyseliny maleinové, anhydrid kyseliny itakonové, anhydrid kyseliny pyromelitové a anhydrid kyseliny mellitové (Fischer a Peißker 1998; Mozhaev et al. 1988; Schmidt et al. 2003). Anhydridy jsou tvořeny dehydratací dvou karboxylových kyselin, jsou velmi reaktivní vůči nukleofilním sloučeninám a jsou schopny acylovat (nahrazovat reaktivní vodíkové atomy acylovou $RCO-$ skupinou) řadu funkčních skupin proteinů a makromolekul (Hermanson 2008).

Při reakci anhydridu dikarboxylových kyselin s nukleofilem se otevře kruhová struktura anhydridu, čímž vznikne acylovaný produkt s karboxylátovou skupinou. Tímto způsobem je možné převést původní aminoskupinu z APTES na povrch s reaktivní karboxylovou skupinou. Tuto karboxylovou skupinu je možné využít při další funkcionalizaci například pomocí EDC, nebo mohou tyto karboxylové skupiny reagovat rovnou s proteiny, ze kterých se skládají enzymy. Zmíněné karboxylové skupiny mohou reagovat s lysinovými postranními řetězci, thiolovými skupinami cysteinu, fenolátovými ionty tyrosinových zbytků a imidazolylovanými kruhy histidinů. Nicméně acylace cysteinových, tyrosinových a histidinových postranních řetězců tvoří nestabilní komplexy, které jsou snadno reverzibilní.

Pokud ale dojde k acylaci aminoskupiny proteinů, je tato vazba stabilní (Fraenkel-Conrat 1957).

Karbonáty

Další možností funkcionalizace je reakce aminoskupin enzymů s uhličitany (karbonáty). Nejčastěji používanou bifunkční karbonátovou sloučeninou je N,N'-Disuccinimidyl karbonát (DSC, disukcinimidylkarbonát), který se v podstatě skládá z karbonylové skupiny obsahující dva NHS estery. Uhličitany velmi dobře reagují s aminoskupinami enzymů za vzniku stabilní karbamátové vazby. V našem případě DSC může reagovat buď s hydroxylovou skupinou přímo na povrchu křemičitých nanovláken, nebo mohou být na povrch zavedeny karboxylové skupiny pomocí silanizace a následné karboxylace. Kvůli hydrolyze je opět nezbytné, a by první část reakce probíhala v bezvodném prostředí a dále ve vodném prostředí. Tímto postupem vzniká velmi stabilní vazba (Hermanson 2008) (Obrázek 15). V rámci disertační práce jsem testovala obě možnosti – jak navázání DSC přímo na hydroxylové skupiny křemičitých nanovláken, tak na karboxylové skupiny po silanizaci pomocí APTES a karboxylaci pomocí SU.



Obrázek 15: Schéma funkcionalizace hydroxylových skupin pomocí disukcinimidylkarbonátu (Disuccinimidylcarbonate) za vzniku NHS- karbonátu v nevodném prostředí a následné navázání aminoskupin ve vodném prostředí (Hermanson 2008)

Kyselina glutarová

Existují také studie, které doporučují zaměnit glutaraldehyd za kyselinu glutarovou (Mitra et al. 2014), protože u té je prokázáno, že se vyskytuje fyziologicky nejen v rostlinách a tkáních zvířat, ale také v krvi lidí, nebo moči a není toxická (Horn et al. 1957). Jedinou

nevýhodou této kyseliny je, že nikdy nevznikají kovalentní vazby, jako tomu je v případě zesítnění pomocí glutaraldehydu. Místo kovalentní vazby sice vznikají pouze vazby iontové a vodíkové, ale protože byla po rozsáhlém testování kyselina glutarová označena za vhodnou biokompatibilní náhradu glutaraldehydu (Mitra et al. 2014), byla v disertační práci zařazena do testování.

Divinylsulfon

Další možnost je využití sulfonů, kde se nejvíce využívá divinylsulfon. Toto bifunkční činidlo se využívá zejména díky jeho vysoké stabilitě ve vodě a stabilní vazbě s proteiny. Na rozdíl od výše zmíněných metod reaguje lépe s cysteinovými SH skupinami než s aminoskupinami. S aminoskupinami lysinu reaguje také, ale vazby nejsou tak stálé a vznikají pouze v alkalickém prostředí. Pro navázání divinylsulfonu na křemičitá nanovlákná je možné využít OH skupin, nebo je nutné modifikovat tyto skupiny a přivést na povrch reaktivní NH skupiny (Zucca a Sanjust 2014). Na základě několika studií o toxicitě divinylsulfonu, které upozorňují až na 6x vyšší toxicitu tohoto bifunkčního činidla v porovnání s jinými (West et al. 2011), popřípadě poukazují na velmi nízkou hladinu divinylsulfonu, aplikovaného na kůži králíků (0,022 mg/kg), která způsobila smrt 50 % testovaných králíků (Smyth et al. 1962), nebyl tento reagent do testování v disertaci vůbec přijat.

Benzochinon

Z podobného důvodu nebyl použit ani benzochinon, který sice může reagovat již s OH skupinami na povrchu nanovláken, nebo s aminoskupinami po silanizaci povrchu a z druhé strany s NH₂ a SH skupinami enzymů (Zucca a Sanjust 2014), ale pro využití v medicíně je příliš neurotoxický (Chambers a Rowan 1982).

Epichlorhydrin

Výše zmíněné platí také pro epichlorhydrin. Pro imobilizaci enzymů je možné ho použít, substrát musí obsahovat buď OH, nebo NH₂ skupiny, na které se epichlorhydrin naváže, a poté reaguje s aminoskupinami enzymů, dá se ale využít v jiném odvětví než je medicína – opět je velmi toxický pro organismus, zejména velmi karcinogenní (EPA 1985).

V Tabulce 8 jsou uvedeny reagenty, kterými je možné nahradit glutaraldehyd. U některých chemikálií bylo testováno více koncentrací, různé doby reakce a více rozpouštědel. V tabulce je také uvedeno, zda byla tato chemikálie testována a jaký byl výsledek. Používán byl

2% APTES rozředěný v 95% IPA. Ke karboxylaci byl používán anhydrid kyseliny jantarové (SU) rozpuštěný v 99,9% ethanolu.

Tabulka 8: Reagencie, kterými je možné nahradit glutaraldehyd při imobilizaci enzymů i s informacemi, zda byl tento postup testován. Použito: (3-aminopropyl)triethoxysilan (APTES), anhydrid kys. jantarové (SU), N,N'-Dicyklohexylkarbodiimid (DCC), N-hydroxysukcinimid (NHS), 1-Etyl-3-(3-dimetylamino)propylkarbodiimid (EDC), N-Cyklohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)karbodiimid (CMC), N,N'-Disuccinimidyl karbonát (DSC)

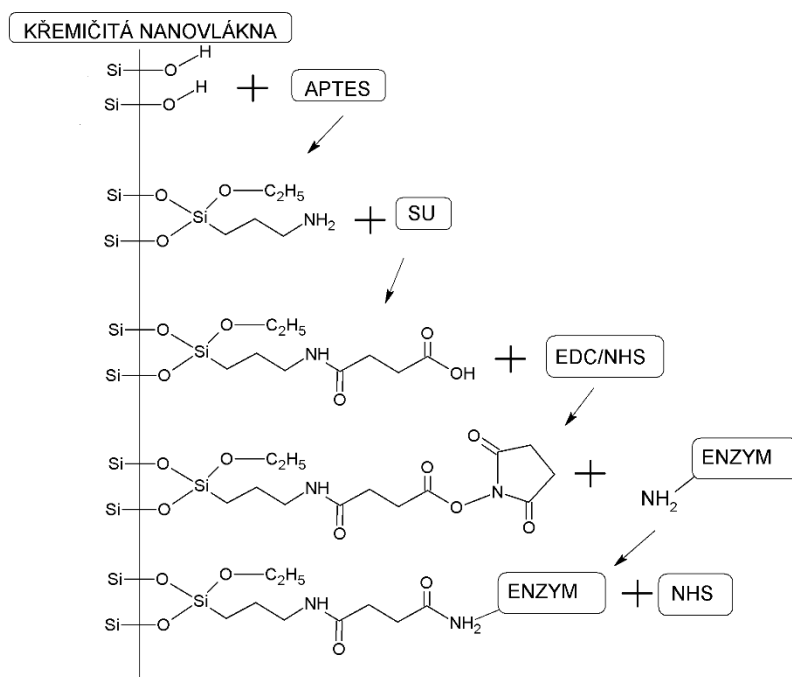
Silanizace	Funkcionalizace		Druh testu		
	Karboxylace	Testováno			Výsledek
APTES	Anhydrid	DCC /NHS	NE	-	Doporučuje se nahrazovat pomocí EDC, protože vzniká ve vodě nerozpustná dicyklohexylmočovina (Hermanson 2008)
APTES	SU	EDC /NHS	ANO	Test proteol. aktivity, testy cytotoxicity.	Obrázek 34, 39, 40, 42, 43
APTES	Anhydrid	CMC /NHS	NE	-	-
APTES	SU	DSC	ANO	Test proteol. aktivity, testy cytotoxicity	Obrázek 35, 43, 44
-	-	DSC	ANO	Testy cytotoxicity	Obrázek 39, 40
APTES	SU	EDC	NE		Výhodnější je použít s NHS anebo sulfo-NHS protože se tím zvýší rozpustnost esteru i stabilita meziprojektu, který reaguje s aminy enzymů (Hermanson 2008)
APTES		Kyselina glutarová	ANO	Testy stability	Tabulka 13
		Divinylsulfon	NE		
		Benzochinon	NE		
		Epichlorhydrin	NE		

Nejvíce byl testován postup s použitím APTES k silanizaci povrchu, kde následoval proces dvoustupňové funkcionalizace pomocí SU jako anhydridu ke karboxylaci povrchu a NHS esteru vytvořeného z NHS a EDC. Pro lepší orientaci jsem tento postup označila jako postup A-EDC a je rozepsán v následující kapitole.

3.2.3 Metoda úpravy nanovláken A-EDC

Na základě velmi rozsáhlé rešerše, výše uvedeným důvodům a výsledkům, byl optimalizován následující postup úpravy nanovláken. Tento způsob úpravy nanovláken byl podroben nejrozsáhlejšímu testování. Protože se při této metodě používá 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid, tedy EDC, byla tato metoda označena jako metoda A-EDC.

Křemičitá nanovlákná byla hned po elektrostatickém zvlákňování tepelně stabilizována na požadovanou teplotu (později již vždy na 180 °C), byla skladována v suchu, temnu, v obalu z hliníkové fólie. Těsně před použitím byla nanovlákná vyhřáta na 150 °C po dobu 2 hodin. Poté byla nanovlákná ponořena do 2% roztoku APTES v 95% roztoku IPA. Reakce probíhala při teplotě 70 °C a po reakci byla nanovlákná dvakrát promyta v EtOH. Následně byla nanovlákná opět vložena do sušárny, kde byla postupně pomalu zvyšována teplota až na 110 °C na dobu 0,5 hodiny. Dalším krokem byla karboxylace pomocí sukcinanhydridu. 2% SU byl rozpuštěn v EtOH a nanovlákná byla ponořena do tohoto roztoku o laboratorní teplotě na 2 hodiny. Poté byla nanovlákná opět promyta pomocí absolutního EtOH. Následně byl využit N-hydroxysukcinimidový ester vytvořený z EDC a NHS. EDC bylo rozpuštěno v 0,05 M MES pufru s pH = 6,0 a vedle bylo NHS rozpuštěno také ve stejném MES pufru. Oba roztoky byly smíchány tak, aby konečná koncentrace roztoku byla 2% EDC i 2% NHS. Reakce nanovláken v tomto roztoku probíhala po dobu 15 min při pokojové teplotě. Nanovlákná byla dále promyta třikrát v MES pufru. Nyní již bylo možné rozpustit požadovaný enzym v 0,1 M fosfátovém pufru s pH = 7,2 v konečné koncentraci 2 % enzymu. Reakce s enzymy probíhala po dobu 2 hodin při teplotě 37 °C. Poté následoval opět oplach pomocí fosfátového pufru. Nanovlákná s imobilizovanými enzymy byla poté vysušena při teplotě 34 °C a dále používána k testování. Schéma je naznačeno na Obrázku 16.



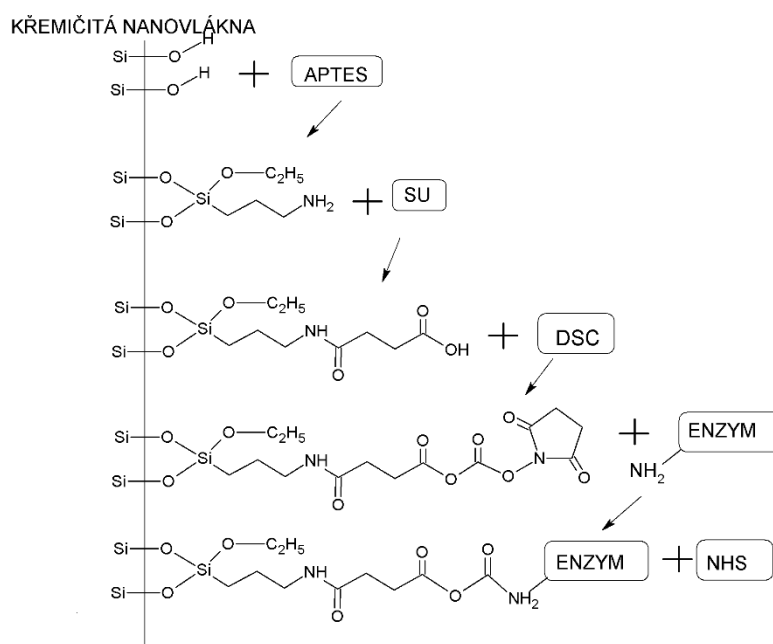
Obrázek 16: Schéma postupu imobilizace enzymu na křemičitá nanovlákná pomocí modifikace povrchu (3-Aminopropyl)triethoxysilanem a následné funkcionalizace sukcinanhydridem a N-hydroxysukcinimidovým (Danilova a Lovětinská-Šlamborová 2016).

Pomocí tohoto procesu funkcionalizace byla optimalizována metoda měření proteolytické aktivity enzymů a byly takto provedeny základní testy pH závislosti a teplotní závislosti enzymů. Až v rámci testů cytotoxicity bylo zjištěno, že tento postup funkcionalizace vykazuje poměrně vysokou cytotoxicitu (kap. 4.2. Obrázek 42 a 43) a začala být testována metoda s využitím disukcinimidylkarbonátu.

3.2.4 Metoda úpravy nanovláken B-DSC

Další metoda, která byla optimalizována a široce testována, je označena jako metoda B-DSC a využívá se při ní disukcinimidylkarbonát. Křemičitá nanovlákná, která byla ihned po elektrostatickém zvlákňování tepelně stabilizována na požadovanou teplotu (později již vždy na 180 °C), byla skladována v suchu, temnu, v obalu z hliníkové fólie. Těsně před použitím byla nanovlákná vyhřátá na 150 °C po dobu 2 hodin. Poté byla nanovlákná ponořena do 2% roztoku APTES v 95% roztoku IPA. Reakce probíhala při teplotě 70 °C a po reakci byla nanovlákná dvakrát promyta v EtOH. Následně byla nanovlákná opět vložena do sušárny, kde byla postupně pomalu zvyšována teplota až na 110 °C na dobu 0,5 hodiny. Dalším krokem byla karboxylace pomocí sukcinanhydridu. 2% SU byl rozpuštěn v EtOH a nanovlákná byla ponořena do tohoto roztoku při laboratorní teplotě na 2 hodiny. Poté byla

nanovlákná opět promyta pomocí absolutního EtOH. Následně byl připraven 2% roztok disukcinimidylkarbonátu v EtOH a nanovlákná byla ponořena na 1 hodinu při pokojové teplotě. Promytí probíhalo opět několikrát v EtOH. Nyní již bylo možné rozpustit požadovaný enzym v 0,1 M fosfátovém pufru s pH = 7,2 v konečné koncentraci 2 % enzymu. Reakce s enzymy probíhala po dobu 2 hodin při teplotě 37 °C. Poté následoval opět oplach pomocí fosfátového pufru. Nanovlákná s imobilizovanými enzymy byla poté vysušena při teplotě 34 °C a dále používána k testování. Schéma je naznačeno na Obrázku 17.

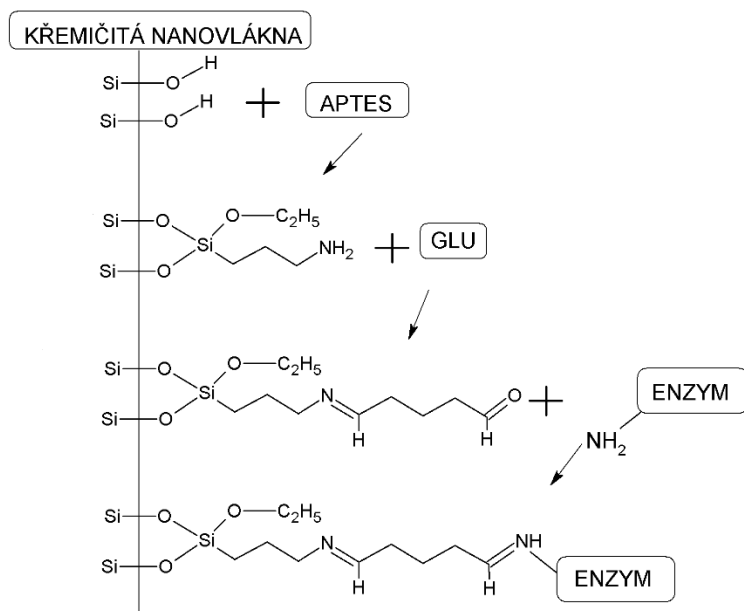


Obrázek 17: Schéma postupu imobilizace enzymu na křemičitá nanovlákná pomocí modifikace povrchu (3-Aminopropyl)triethoxysilanem a následné funkcionalizace sukcinanhydridem a disukcinimidyl karbonátem.

3.2.5 Metoda úpravy nanovláken C-GLU

Tato metoda byla optimalizována na základě rešerše uvedené v kapitole 2.4.3 a byla používána pouze jako srovnávací. Křemičitá nanovlákná, která byla hned po elektrostatickém zvlákňování tepelně stabilizována na požadovanou teplotu (později již vždy na 180 °C), byla skladována v suchu, temnu, v obalu z hliníkové fólie. Těsně před použitím byla nanovlákná vyhřátá na 150 °C po dobu 2 hodin. Poté byla nanovlákná ponořena do 2% roztoku APTES v 95% roztoku IPA. Reakce probíhala při teplotě 70 °C a po reakci byla nanovlákná dvakrát promyta v EtOH. Následně byla nanovlákná opět vložena do sušárny, kde byla postupně pomalu zvyšována teplota až na 110 °C na dobu 0,5 hodiny. Dále byl glutaraldehyd rozředěn v 0,1M fosfátovém pufru s hodnotou pH = 7,2 na konečnou koncentraci 2 %. Nanovlákná byla ponořena v roztoku po dobu 2 hodin při pokojové teplotě a následně byla dvakrát promyta

ve stejném pufru. Nyní již bylo možné rozpustit požadovaný enzym v 0,1 M fosfátovém pufru s pH = 7,2 v konečné koncentraci 2 % enzymu. Reakce s enzymy probíhala po dobu 2 hodin při teplotě 37 °C. Poté následoval opět oplach pomocí fosfátového pufru. Nanovlákná s imobilizovanými enzymy byla poté vysušena při teplotě 34 °C a dále používána k testování. Schéma je naznačeno na Obrázku 18.



Obrázek 18: Schéma postupu imobilizace enzymu na křemičitá nanovlákná pomocí modifikace povrchu APTES a následné funkcionalizace glutaraldehydem.

3.3 Imobilizace proteolytických enzymů

Imobilizováno bylo postupně 7 druhů enzymů, byly vybrány enzymy rostlinné, živočišné i bakteriální. Protože má každý enzym ve své velmi složité struktuře pouze jedno aktivní místo, kde může docházet ke katalýze reakcí, závisí na mnoha podmínkách, zda bude enzym opravdu aktivní a bude danou reakci katalyzovat. Důležitým parametrem u enzymů je tedy jejich pH a teplotní optimum. Údaje o teplotním i pH optimu se v literatuře velmi často liší. Důvodem jsou různé metody měření aktivity (různé substráty, odlišné jednotky, ve kterých se aktivita měří), dále přítomnost inhibitorů, zda jsou enzymy volné, nebo imobilizované atd. Seznam enzymů i se základními charakteristikami enzymů jsou uvedeny v Tabulce 9. Nejprve bylo vybráno 7 enzymů, byly provedeny základní testy aktivity enzymů při standardních podmínkách (teplota 37 °C, pH = 7, Obrázek 20), v dalším testování bylo následně pracováno již s menším počtem enzymů, byly ale provedeny rozsáhlejší testy závislosti proteolytické

aktivity enzymů na hodnotě pH, na teplotě, na podmínkách uskladnění, způsobu imobilizace a podobně. Základním krokem bylo optimalizovat metodu pro stanovení proteolytické aktivity enzymů.

Tabulka 9: Charakteristika imobilizovaných enzymů, H = izolováno z hub, B = bakteriální, R = rostlinný, Ž = živočišný, SER = serinová proteáza, MET = metaloproteáza, CYS = cysteinová proteáza.

Označení	Název	Izolován z	Druh		pH optimum	Teplotní optimum	Zdroj
PR1	Proteáza typ XXIV	<i>Bacillus licheniformis</i>	B	SER	6,5–8,5	65–70 °C	(Rawlings a Salvesen 2013)
PR2	Proteáza typ XXIII	<i>Aspergillus oryzae</i>	B	SER	4,5–5,5	55–60 °C	(de Castro a Sato 2014)
KO	Kolagenáza	<i>Clostridium histolyticum</i>	B	MET	6,3–8,8	50 °C	(Chang et al. 1991), (Allen Foegeding a Larick 1986)
BR	Bromelain	stonek ananasu	R	CYS	6,5–7,5	55 °C	(Silveira et al. 2009)
TR1	Trypsin typ I	hovězí pankreas	Ž	SER	7–9	40 °C	(Sipos a Merkel 1970)
TR2	Trypsin typ V-S	prasečí pankreas	Ž	SER	7–9	40–45 °C	(Buck et al. 1962)
CH	Chymotrypsin typ II	hovězí pankreas	Ž	SER	7–9	40 °C	(Walsh 2002)

3.4 Testování proteolytické aktivity enzymů

Existuje mnoho metod, jak je možné zjistit kvalitativně, nebo kvantitativně enzymatickou aktivitu, popř. přítomnost proteinu – pomocí elektroforézy s využitím western blotu, pomocí metody Bradfordové (Bradford 1976), použitím cirkulárního dichroismu, diferenční skenovací kalorimetrie, elektronové spinové rezonance nebo snímáním mikrobalance křemenného krystalu. Velmi často se zejména užívají různé druhy spektroskopie – energiově disperzní spektroskopie, fluorescenční spektroskopie, infračervená spektroskopie s využitím Fourierovy transformace a různé druhy absorpční a emisní spektroskopie (Petkova et al. 2012). Vzhledem k dostupnosti metody a přístrojovému vybavení v laboratořích jsem se nejvíce věnovala analýze aktivity enzymů pomocí absorpční spektroskopie.

Díky tomu, že enzymy jsou katalyzátory mnoha reakcí (např. hydrolytických reakcí), je možné analyzovat produkty, které za přítomnosti daného enzymu vzniknou. Pokud

je možné vzniklý produkt stanovit pomocí změny absorbance elektromagnetického záření, jinak řečeno, vzniklý produkt absorbuje záření o určité vlnové délce, a přitom původní sloučeniny (chemikálie) vstupující do reakce záření o této vlnové délce neabsorbují, jedná se o metody spektrofotometrické. Substrát, se kterým přichází enzym do reakce, se v tomto případě nazývá chromogenní. Nejčastěji se používá takových látek, u kterých je možné pozorovat změnu absorbance ve viditelné, nebo ultrafialové oblasti.

Každá z těchto dvou částí elektromagnetického spektra má své výhody i nevýhody. Nespornou výhodou u elektromagnetického záření ve viditelné oblasti je jistě viditelná změna barvy roztoku pouhým okem. Výhodou měření v UV oblasti je vyšší míra absorbance záření většiny látek, než je míra absorbance ve viditelné oblasti. Míra absorbance záření v UV oblasti je tedy u většiny látek vyšší, proto stačí i malá enzymatická aktivita, která vytvoří velmi malé množství produktu absorbujícího v UV oblasti, a již je tato hodnota detekovatelná. Naopak s tím ale také souvisí nevýhoda měření v UV oblasti, v této oblasti totiž absorbuje záření i mnoho látek obsažených v pufrch a hlavně samotné aminokyseliny, ze kterých jsou enzymy složeny. Např. tyrosin, tryptofan, cystein nebo DNA absorbují záření mezi 260 a 280 nm (Beaven et al. 1950). Tato vlastnost vnáší do spektrofotometrických měření velké nepřesnosti. Pokud jsou k měření absorbance určitých vlnových délek použity UV–VIS spektrofotometry s jamkovými destičkami, tak destičky, které je možné použít k měření v UV oblasti (např. 96-jamkové destičky z cyklického olefinového kopolymeru, COC destičky od firmy Greiner Bio-One GmbH), jsou výrazně finančně náročnější než destičky pro měření ve viditelné oblasti spektra. Tento postup byl tedy optimalizován, vyzkoušen, ale dále nepoužíván.

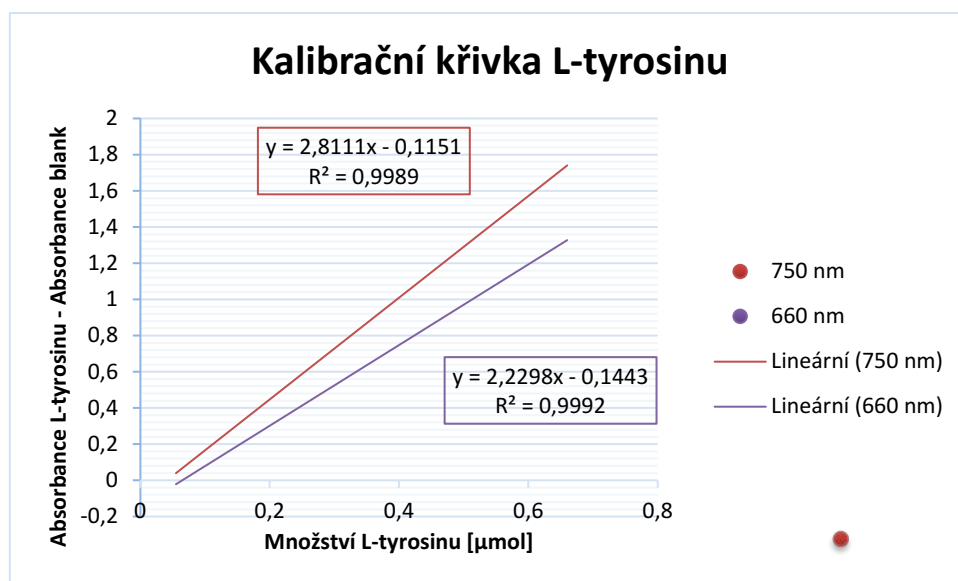
Jako substrát je možné využít látky přírodní, nebo syntetické. Z těch přírodních se často využívá kasein, hemoglobin a želatina, poté existuje nepřehledné množství substrátů syntetických (N-Benzoyl-L-tyrosine ethyl ester pro stanovení aktivity chymotrypsinu, N-benzoyl-L-Arg ethyl ester pro stanovení aktivity bromelainu, nebo Z-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro jako substrát pro kolagenázy atd.), které jsou ovšem často vytvořeny pro jeden enzym, nebo skupinu enzymů a jejich cena je mnohem vyšší než cena přírodních substrátů. V metodách popsanych níže byl využíván jako substrát kasein. Pro optimalizaci metod byla používána nanovlákná s imobilizovanými enzymy pomocí metody A-EDC.

Ze spektrofotometrických metod, u kterých je vytvořený produkt možné detekovat ve viditelné oblasti elektromagnetického spektra, byly optimalizovány dvě – metoda s využití Folin-Ciocalteuova činidla a Lowryho metoda (Lowry et al. 1951). Pokud je proteolytický

enzym aktivní, katalyzuje hydrolýzu (přesněji proteolýzu) kaseinu a uvolňuje se L-tyrosin, který absorbuje elektromagnetické záření v okolí vlnové délky 275 nm. Z výše uvedených důvodů se ale často nechává vzniklý L-tyrosin reagovat s barvivem, které absorbuje záření ve viditelné oblasti a je tak možné z míry absorbance opět určit množství enzymu.

Metoda s využití Folin-Ciocalteuova činidla

Vhodným barvivem je pro tyto účely například Folin-Ciocalteuovo činidlo obsahující kyseliny fosfomolybdenové a fosfowolframové, které se redukují tyrosinovými zbytky proteinů a barví se modře. Tato činidlo dobře absorbuje záření s vlnovou délkou 750 nm. Záření s vlnovou délkou 750 nm až 760 nm je absorpčním maximem tohoto barviva, často je ovšem uváděno, že se absorbance Folin-Ciocalteuova činidla odečítá při vlnové délce 660 nm. Vytvořením mnoha kalibračních křivek bylo dokázáno, že je to způsobeno tím, že závislost Folin-Ciocalteuova činidla na absorbanci je při vlnové délce 660 nm mírně lineárnější než při 750 nm. Protože ovšem množství enzymu navázaného na nanovláčkách je velmi malé, byla pro testování vybrána vlnová délka 750 nm, kde je znatelná absorbance Folin-Ciocalteuova činidla i při velmi malé koncentraci aktivního enzymu ve vzorku (Obrázek 19). Po přesně dané době je nutné proteolytickou reakci (odštěpování aminokyselin z kaseinu) zastavit. Způsobů zastavení reakce je více, jedná se o látky, které denaturují enzym (silné kyseliny, alkálie nebo detergenty), dále je možné použít teplo, nebo nevratné inhibitory, jako jsou ionty těžkých kovů. V některých případech může být enzym zastaven přidáním komplexotvorného činidla, jako je kyselina ethylendiamintetraoctová, která odstraňuje kovové ionty nezbytné pro aktivitu enzymů, dokonce i chlazení na ledu může být dostačující (Scopes 2002). Aktivitu enzymů by nebylo nutné zastavovat v případě, že chceme sledovat vznik produktu po nějakou dobu. Tento postup by byl výhodný, ale je možný pouze u volných enzymů a ne v případě imobilizovaných enzymů.



Obrázek 19: Kalibrační křivka závislosti absorbance roztoku při 660 a 750 nm na množství L-tyrosinu, podle které se přepočítává množství L-tyrosinu vytvořeného při proteolytické reakci imobilizovaných enzymů.

Optimalizovaná metoda byla stanovena následujícím způsobem. K rozpuštěnému kaseinu, který se nechal vytemperovat na zvolenou teplotu (37 °C), bylo přidáno známé množství nanovláken s imobilizovaným enzymem. Proteolytické štěpení probíhalo přesně 20 min, poté byla reakce zastavena kyselinou trichloroctovou. Srážecí reakce probíhala po dobu 30 min. Poté byl vzorek přefiltrován přes polyethersulfonový filtr s póry o velikosti 0,45 μm a byl k němu přidán optimalizovaný poměr uhličitanu sodného a Folin-Ciocalteuova činidla. Měření absorbance probíhalo na přístroji Synergy HT od firmy Biotech, hodnota absorbance byla odečítána při vlnové délce 750 nm. Jako blank byl nakonec zvolen stejný poměr uhličitanu sodného a Folin-Ciocalteuova činidla, který byl přidáván do testovaného vzorku, protože toto činidlo je žluté až žlutozelené a mírně tedy absorbuje ve zvolené oblasti elektromagnetického spektra. Testovány byly i jiné druhy filtrů, např. nylonové a polystyrénové, ale ukázalo se, že tyto materiály vnášejí chybu do měření. Výše popsaná metoda byla používána asi 2 roky, byl testován poměr uhličitanu sodného a Folin-Ciocalteuova činidla, bylo vyzkoušeno mnoho enzymů, ale výsledky občas nebyly reprodukovatelné, proto byla hledána metoda, která by přinášela spolehlivější výsledky.

Lowryho metoda

Nakonec byla zvolena Lowryho metoda. Jedná se o vylepšení výše popsané metody. Po reakci enzymu se substrátem se ještě před přidáním Folin-Ciocalteuova činidla přidává biuretové činidlo, které zajistí chelataci měďnatého iontu imidovými strukturami polypeptidového

řetězce, v dalším kroku se již přidává opět Folin-Ciocalteuovo činidlo (Lowry et al. 1951). Tento postup se osvědčil a byl poté používán vždy k měření aktivity proteolytických enzymů, výsledky získané předchozí metodou byly zopakovány.

Často používanou metodu Bradfordové s využitím barviva Coomassie Blue G250 se nepodařilo optimalizovat. Metoda na imobilizovaných vláknech nebyla reprodukovatelná, často docházelo k odlišným výsledkům při opakování testů se stejnými podmínkami, proto nebyla metoda používána.

3.4.1 Jednotky proteolytické aktivity

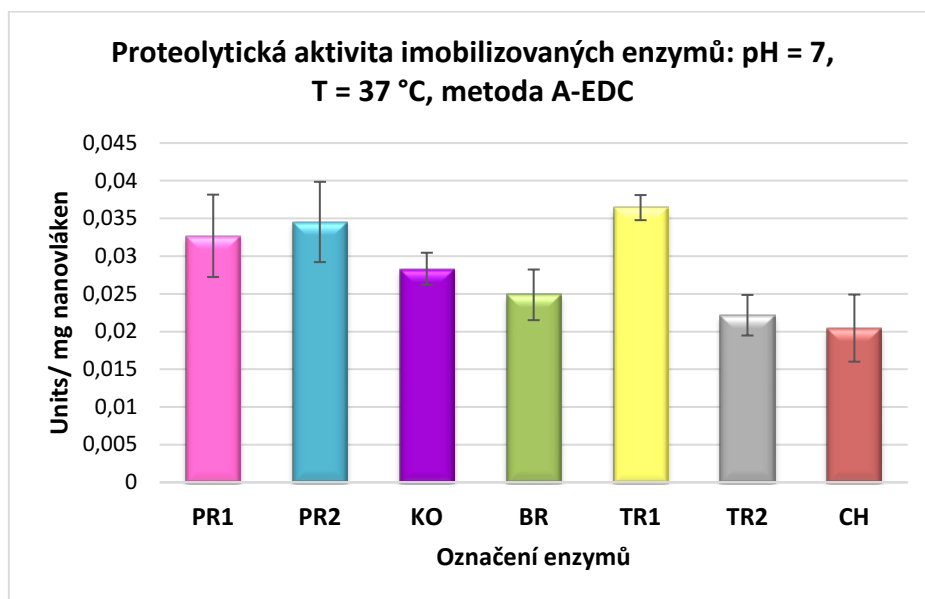
K vyjádření výsledku měření se používá několik jednotek. Nejčastěji se používá k vyjádření výsledku jednotka enzymové aktivity (Unit), která je rovna množství enzymu potřebného k vytvoření produktu z 1 μmol substrátu za minutu. Dále se někdy uvádí výsledky v mg/ml , v mol/l nebo v procentech relativní aktivity. Pro účely porovnávání proteolytické aktivity imobilizovaných enzymů na nanovlákná byla aktivita vždy vztažena na mg nanovláken. Tento způsob byl přejat z literatury, která se zabývá danou tematikou (Srbová et al. 2016). Výsledek je vždy uveden v jednotkách Units na mg nanovláken, přičemž 1 Unit je definována jako množství enzymu katalyzujícího produkci 1 μmol L-tyrosinu za minutu.

Výsledný vzorec pro výpočet aktivity enzymů byl tedy následující (Rovnice 1), kde nty_r je množství L-tyrosinu v mikromolech odštěpeného z kaseinu za dobu reakce, V_r je celkový objem chemikálií vstupujících do reakce v mililitrech, Mvl je hmotnost nanovláken vstupujících do reakce v miligramech, Tr je čas reakce v minutách a $Vcol$ je objem chemikálií vstupujících do kolorimetrické reakce před měřením absorbance L-tyrosinu pomocí spektrofotometru v mililitrech.

$$\frac{\text{Units}}{\text{mg vláken}} = \frac{nty_r[\mu\text{mol}] * V_r[\text{ml}]}{Mvl[\text{mg}] * Tr[\text{min}] * Vcol[\text{ml}]} \quad \text{Rovnice 1} \quad (\text{Srbová et al. 2016})$$

Výše popsanou metodou byly tedy provedeny základní testy měření proteolytické aktivity imobilizovaných enzymů funkcionalizovaných na křemičitá nanovlákná pomocí Metody A-EDC. Pro rozpuštění enzymů při jejich imobilizaci byl používán fosfátový pufr – nejčastěji se používá 50 mM fosfátový pufr s $\text{pH} = 7,2$ (Hermanson 2008). Jako základní podmínky jsou obecně přijaty hodnota $\text{pH} = 7$ a teplota 37°C (Obrázek 20). Podrobnější informace o uvedených enzymech byly uvedeny v Tabulce 9. Úspěšně bylo tedy imobilizováno

7 modelových proteolytických enzymů. Další testy pokračovaly pouze se 4 enzymy: byla vyřazena proteáza s nižší aktivitou (tedy PR1), trypsin s nižší aktivitou (tedy TR2) a kolagenáza (KO). Proteáza a trypsin byly vyřazeny z důvodu nižší aktivity u stejného druhu enzymu a kolagenáza byla bohužel vyřazena proto, že jsme v laboratoři neměli dostatečné množství tohoto enzymu k provedení všech uvedených testů v této disertační práci. Protože chemikálie a spotřební materiál potřebný v této práci je velice finančně náročný, nebylo možné zakoupit novou kolagenázu v prvních 4 letech výzkumu.



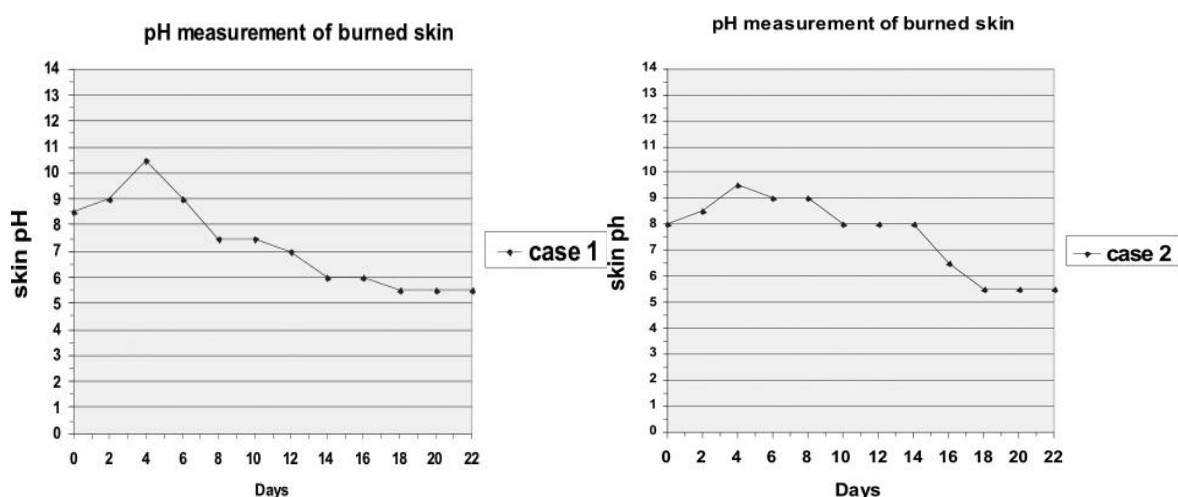
Obrázek 20: Proteolytická aktivita 7 různých imobilizovaných enzymů na křemičitá nanovláčka: proteáza z *Bacillus licheniformis* (PR1), proteáza z *Aspergillus oryzae* (PR2), kolagenáza z *Clostridium histolyticum* (KO), bromelain ze stonku ananasu (BR), trypsin z hovězího pankreatu (TR1), trypsin z prasečího pankreatu (TR2) a chymotrypsin z hovězího pankreatu (CH).

3.4.2 Testování proteolytické aktivity enzymů v závislosti na hodnotě pH

Testy byly nejprve prováděny s více druhy proteolytických enzymů. K podrobnějšímu testování byly vybrány 4 druhy proteolytických enzymů. Byly vybrány enzymy, které mají pH optimum podobné hodnotě pH, která se objevuje u nekrotické tkáně. Hodnota pH zdravé pokožky se pohybuje v rozmezí 4,8 až 6, nejčastěji se uvádí hodnota 5,5. Výhodou mírně acidického prostředí je zejména vyšší schopnost bakteriální bariéry, protože většina patogenních a saprofytických bakterií přežívá v rozmezí hodnot pH 7,2 až 7,6 (Osti 2008).

Ve chvíli, kdy dojde k popálení kůže, zvyšuje se hodnota pH na neutrální až mírně alkalickou. U prvních a druhých stupňů popálenin dojde k zpětné epitelizaci v průběhu 14 dnů, zatímco u hlubokých druhých a třetích stupňů popálenin dochází k zpětné epitelizaci během 30 dnů

a zároveň vzniku hypertrofických jizev a keloidů. Jak je vidět z grafů na Obrázku 21 převzatých ze studie Enzo Osti (2008), hodnota pH se časem mění a těsně po popálení (měřeno 30 min po popálení) byla u prvního pacienta 8,5 a u druhého 8, poté se do 4. dne zvyšovala až k hodnotám výrazně alkalickým, následně začala klesat. Na fyziologickou hodnotu (pH pokožky = 5,5) se úroveň pH vrátila po 18 dnech u obou pacientů. Hodnota pH v ráně velmi závisí také na způsobu léčby pacienta s hlubokou popáleninou. Ve výše uvedené studii byly popáleniny vždy nejprve 15 minut chlazeny fyziologickým roztokem o teplotě 23 °C, poté byl proveden chirurgický debridement okrajů popáleniny a následně byl aplikován polopropustný hydrogel. Po několika dnech byl první pacient léčen pomocí obvazu Hyalomatrix (syntetická kyselina hyaluronová), u druhý pacient pomocí přípravku Dermasilk (čisté hedvábí obsahující 70–78 % fibroinu a sericinu).

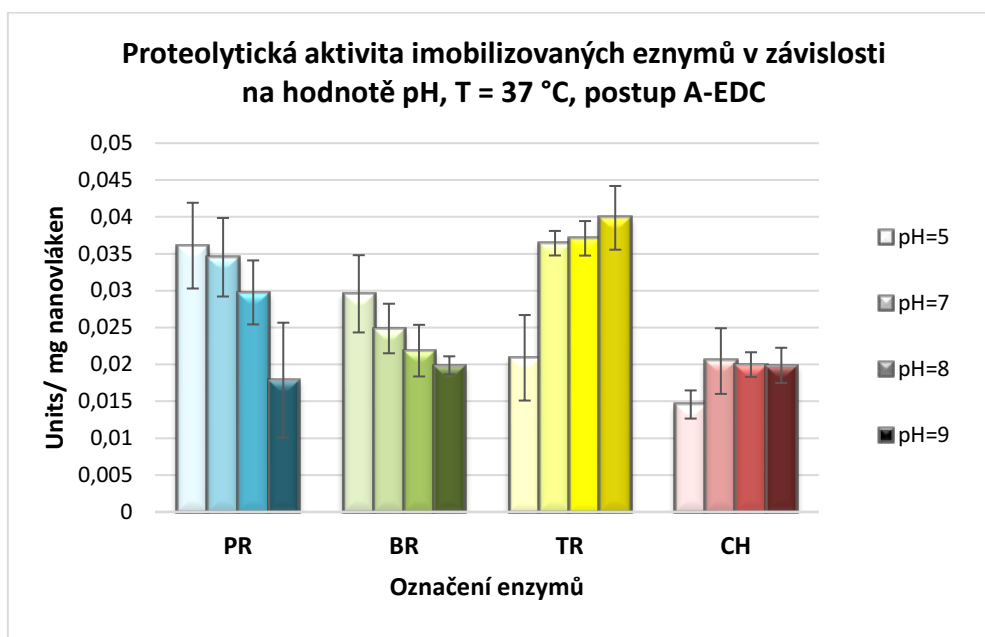


Obrázek 21: Změna hodnoty pH v popálenině den po dni u dvou pacientů – první pacient byl léčen pomocí obvazu Hyalomatrix a druhý pomocí přípravku Dermasilk (Osti 2008).

Pro naše účely je nejdůležitější, aby imobilizované enzymy na křemičitých nanovláčkách byly aktivní zejména v první fázi hojení rány, tedy ve chvíli, kdy má dojít k odstranění nekrotické tkáně. Z grafů na Obrázku 21 je možné odečíst, že hodnota pH ihned po popálení je v ráně 8,0 popř. 8,5, další studie uvádí, že pH v popálenině se pohybuje v první fázi spíše v neutrálním pH (Smith & Nephew, Inc. 2002). Z toho důvodu byly vybrány zástupci enzymů, u kterých se uvádí, že jejich pH optimum je v okolí 7,0. Protože se velmi liší informace o optimálním pH jednotlivých enzymů, bylo provedeno i rozsáhlé měření proteolytické aktivity závislé na hodnotě pH.

Pro prvotním testování závislosti pH byly zvoleny 4 hodnoty: pH = 5 dále 7,8 a 9. Na nanovláčka o dané hmotnosti byly uvedenou metodou imobilizovány enzymy. Tyto vzorky

byly ponořeny vždy přesně na 1 hodinu do uvedeného pufru, poté vytaženy a proteolytická aktivita byla ihned měřena pomocí Lowryho metody uvedené v kap. 3.4. Byly použity tyto pufrы: 0,1 M acetátový pufr s pH = 5,0 dále 0,1 M fosfátový pufr (pH = 7,0 a pH = 8,0) a 0,1 M Tris-HCl pufr s pH = 9,0. Tyto pufrы byly vybírány tak, aby jejich složení neovlivňovalo aktivitu enzymů. Například pufr Tris-EDTA nemohl být použit, protože EDTA inhibuje aktivitu velké řady proteolytických enzymů. Výsledky testu proteolytické aktivity imobilizovaných enzymů pomocí metody A-EDC v závislosti na hodnotě pH, jsou uvedeny v grafu na Obrázku 22. Test byl proveden 2x vždy po 4 vzorcích od každého enzymu a hodnoty pH. Průměrováno bylo tedy vždy 8 hodnot. Pro svou nízkou aktivitu při všech testovaných hodnotách pH byl dále z výzkumu vyřazen chymotrypsin z hovězího pankreatu EC 3.4.21.1 (CH). Více výsledků z testování proteolytické aktivity v závislosti na teplotě a hodnotě pH je uvedeno v kapitole 4.1, protože výsledky byly hodnoceny pomocí komplexní statistiky.



Obrázek 22: Graf závislosti proteolytické aktivity enzymů na hodnotě pH. Enzymy: proteáza z *Aspergillus oryzae* (PR), bromelain ze stonku ananasu (BR), trypsin z hovězího pankreatu (TR) a chymotrypsin z hovězího pankreatu (CH).

3.4.3 Testování proteolytické aktivity v závislosti na teplotě

Proteolytická aktivita imobilizovaných enzymů byla testována také v závislosti na teplotě. Byly vybrány 4 teploty: 4, 23, 37 a 45 °C, které korespondují s podobně zaměřenými výzkumy. Teplota 4 °C byla vybrána, jako teplota skladování vzorků v lednici. Teplota 23 °C byla vybrána jako přirozená teplota v laboratoři, teplota 37 °C jako teplota těla a teplota 45 °C jako optimální teplota pro enzymy, při které ještě nedochází k denaturaci proteinů. Při měření proteolytické

aktivity v závislosti na teplotě byl substrát kasein vždy vytemperován na danou teplotu (4, 23, 37, nebo 45 °C), poté bylo přidáno zvážené množství nanovláken s imobilizovaným enzymem a proteolytické štěpení probíhalo přesně 20 min opět za dané teploty. Reakce byla zastavena kyselinou trichloroctovou působící 30 min. Poté byly vzorky přefiltrovány přes polyethersulfonový filtr a dále byla všechna činidla (Lowryho a Folin-Ciocalteuovo) již s pokojovou teplotou, protože již byla proteolytická reakce zastavena. Po testování byly jako teplotně nezávislé enzymy označeny bromelain a chymotrypsin a jako teplotně závislé trypsin a proteáza (viz. výsledky na Obrázku 38 v kapitole 4.1.3).

3.5 Sterilizace vyrobených vzorků

Před samotnými testy cytotoxicity bylo nutné vyřešit problém, jak sterilizovat křemičitá nanovlákná s imobilizovanými enzymy. Nejčastější metody sterilizace biodegradabilních vzorků jsou uvedeny na konci kap. 3.5.5 v Tabulce 11. Mnoho z těchto metod ovšem nemohlo být použito. Například sterilizace vysokou teplotou nemohla být použita kvůli imobilizovaným enzymům, protože díky své proteinové povaze ztrácí enzymy aktivitu již při 55-60 °C, kdy dochází k denaturaci proteinů a ke konformačním změnám. Další dlouho zvažovanou možností byla sterilizace pomocí gama záření. Nejčastěji se pro sterilizaci vzorků využívá záření s absorbovanou dávkou 10 až 30 kGy/h (Dai et al. 2016). Podle (Plikk et al. 2006; Yunoki et al. 2006; Cottam et al. 2009) není gama záření ale vhodné na tento druh vzorků, protože po tomto procesu dochází ke změně chemických vlastností sterilizovaných vzorků, ke snížení mechanické odolnosti v tahu a molekulové hmotnosti a ke zvýšení rychlosti degradace materiálů.

3.5.1 Sterilizace UV zářením

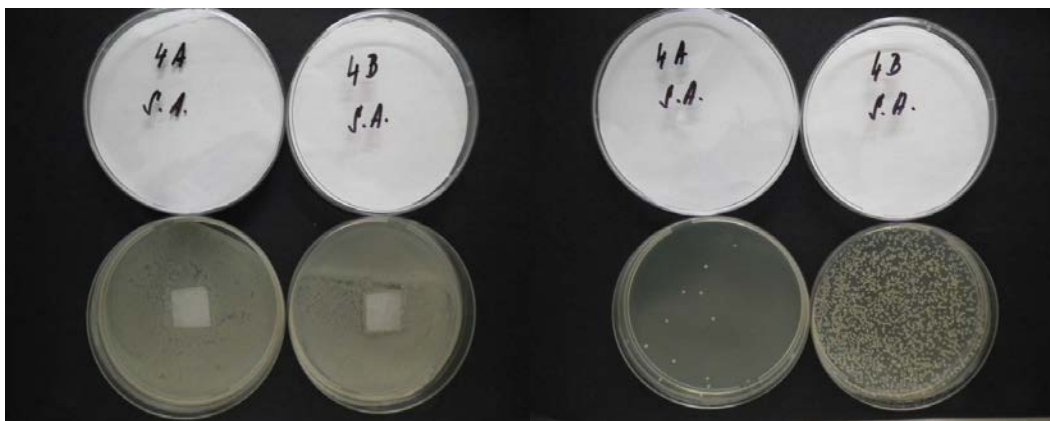
Další možností, která se ke sterilizaci běžně používá (a nebylo možné ji využít) je ozáření vzorků pomocí UV-C, které rozkládá nebo narušuje organické složky a zejména bílkoviny, ze kterých jsou enzymy tvořeny. Nevhodnost použití UV-C záření pro sterilizaci dokazuje i studie na podobných materiálech, jako jsou předkládány v této disertační práci. Po sterilizaci UV-C chitosanových nanovláken s imobilizovanou collagenázou z *Clostridium histolyticum* ($\gamma = 253,7$ nm, vzdálenost 1 m, doba 30 min) se snížila katalytická aktivita enzymu o 13 % (Slováková et al. 2015).

Protože existuje studie (Gupta et al. 2013), která dokazuje sterilizační účinky i UV-A záření, byla vyzkoušena i tato metoda. UV-A záření se vyznačuje vlnovou délkou 315 až 400 nm. Podle výsledků Oshita a kolektivu (2007) nemělo žádný sterilizační efekt záření s vlnovou délkou 405 nm, ale záření s vlnovou délkou 365 a 385 již vykazovalo vysokou sterilizační aktivitu. Jako modelové vzorky pro zkoušky sterilizace pomocí UV-A záření byla použita křemičitá nanovlákná stabilizovaná na teplotu 260 °C / 2 hod., nebo 550 °C / 2 hod., silanizace byla provedena pomocí metody A-EDC a imobilizovány byly opět 3 enzymy zvláště – proteáza z *Aspergillus oryzae*, bromelain ze stonku ananasu a trypsin z hovězího pankreatu. Popis vzorků je níže v Tabulce 10. Vzorky byly ozářeny pomocí UV-A záření o vlnové délce $\lambda = 375$ nm po dobu 90 min z jedné a 90 min z druhé strany vzorku. Následně byla testována antibakteriální aktivita metodami AATCC 147 a AATCC 100 podle normy ČSN EN ISO 20645.

Při metodě AATCC 147 je 1 ml bakteriálního kmene *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* (SA) o koncentraci 10^8 CFU/ml vyočkován jednotlivě na Petriho misku s Nutrient agarem č. 2., která obsahuje zkoumaný vzorek o rozměrech 1,8 x 1,8 cm. Kultivace trvá 24 hodin při 37 °C. Na Obrázku 23 jsou výsledky tohoto testu pro vzorek označený 260_N_B (Tabulka 10) s použitím kmene *Staphylococcus aureus*. U tohoto vzorku nebyl objeven náznak halo zóny.

Na Obrázku 24 je výsledek stejného vzorku po testování pomocí metody AATCC 100, kde bylo aplikováno 100 μ l bakteriálního inokula o koncentraci 10^5 CFU/ml na vzorek o velikosti 1,8 x 1,8 cm. Vzorek byl umístěn do kontejneru a kultivován 24 hod / 37 °C. Po 24 hodinách bylo přidáno 10 ml fyziologického roztoku, vzorek byl zvortexován – protřepán – a byl odebrán 1 ml roztoku na Petriho misku s Nutrient agarem č. 2. Následovala kultivace 24 hod při 37 °C. Každý vzorek byl proveden v tripletu. Je vidět, že po ozáření pomocí UV-A (vzorek 4A) přežilo na vláknech jen nepatrné množství bakterií. Neupravený vzorek nanovláken s imobilizovaným bromelainem vykazoval výrazně nižší antibakteriální aktivitu.

Tento fakt byl potvrzen u opakovaných antibakteriálních testů metodou AATCC100. Vždy byl ale výrazně vyšší efekt na antibakteriální aktivitu při ozáření UV-A záření pro kmen *Staphylococcus aureus* než pro *Escherichia coli*. Jedná se o porovnání nanovláken funkcionalizovaných pomocí metody A-EDC s použitím proteázy z *Aspergillus oryzae*, kde průměr počtu kolonií z triplikátu byl 570 kolonií S.A. (Obrázek 25) a v případě stejného vzorku ozářeného UV-A byl průměrný počet kolonií 1 (Obrázek 26).



Obrázek 23: Výsledky testu AATCC 147, kde nebyl prokázán vznik halo zóny ani u vzorku sterilizovaného pomocí UV-A (4A) i nesterilizovaného (4B).

Obrázek 24: Porovnání počtu kolonií *Staphylococcus aureus* mezi vzorky po ozáření UV-A (4A) a bez ozáření (4B), metoda testu AATCC 100.



Obrázek 25: Výsledek testu AATCC100 pro nanovlákná s imobilizovaným enzymem bez ozáření UV-A. Průměrný počet kolonií *S.A.* byl 570.



Obrázek 26: Výsledek testu AATCC100 pro nanovlákná s imobilizovaným enzymem po ozáření UV-A. Průměrný počet kolonií *S.A.* byl 1 kolonie.

Antibakteriální aktivita vzorků po ozáření se sice zvýšila, protože ale existuje jen velmi málo studií, které poukazují na dostatečnou sterilizaci UV-A zářením a muselo by být provedeno velmi mnoho testů pro dokázání tohoto tvrzení, bylo od této metody sterilizace upuštěno. Proto v této práci nejsou ani uvedeny všechny výsledky antibakteriálních testů. Naopak jako velmi překvapivý se ukázal ale vliv UV-A záření na proteolytickou aktivitu imobilizovaných enzymů. U všech 6 vzorků, které byly podrobeny antibakteriálním testům, byla změřena i proteolytická aktivita před ozářením a po ozáření UV-A. Aktivita byla měřena při teplotě 37 °C a pH = 7 pomocí Lowryho metody. U pěti vzorků ze šesti se aktivita po ozáření vzorku zvýšila. Pouze u vzorku stabilizovaného na teplotu 260 °C, funkcionalizovaného pomocí metody A-EDC s imobilizovaným trypsinem se proteolytická aktivita mírně snížila (viz. Tabulka 10). Ozáření UV-A zřejmě tedy napomáhá zvýšit stabilitu enzymů, a tím i jeho aktivitu. Při in vitro testování vyrobených vzorků na prasečí kůži bylo prokázáno, že proteolytická aktivita imobilizovaných enzymů je dostačující k odstranění nekrotické tkáně (viz. kapitola 3.10) a stabilita vzorků byla také dobrá (viz. kapitola 4.3.), proto se již vzorky po výrobě neozářovaly UV-A. Opět by to znamenalo nutnost velkého množství dalších testů.

Tabulka 10: Vliv ozáření pomocí UV-A na proteolytickou aktivitu enzymů.

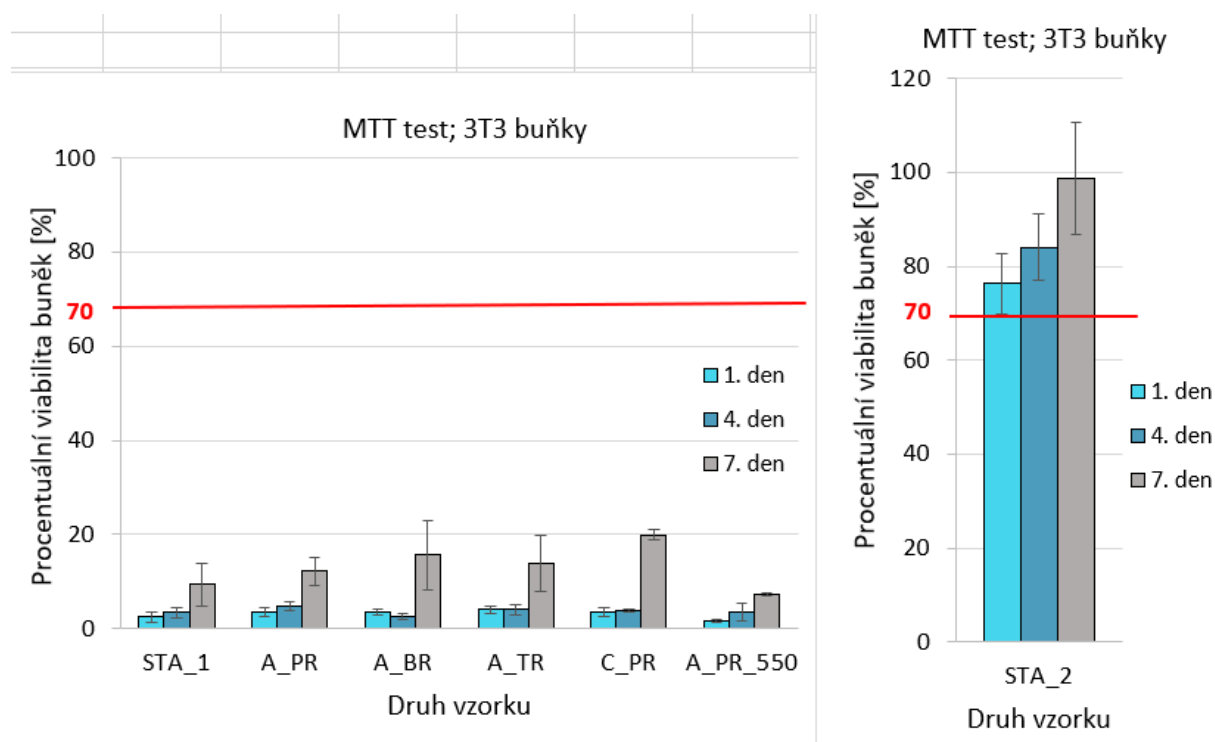
Označení	Teplota stabilizace	Metoda funkcionalizace	Enzym	Aktivita proteázy [Units / mg nanovláken]	
				Bez ozáření	Po ozáření UV-A
260_ST	260 °C	-----	----	0,005 ± 0,001	0,009 ± 0,001
260_G_P		C-GLU	Proteáza	0,301 ± 0,010	0,367 ± 0,018
260_N_P		A-EDC	Proteáza	0,323 ± 0,014	0,464 ± 0,018
260_N_B		A-EDC	Bromelain	0,241 ± 0,011	0,314 ± 0,036
260_N_T		A-EDC	Trypsin	0,299 ± 0,023	0,231 ± 0,025
550_N_P	550 °C	A-EDC	Proteáza	0,412 ± 0,016	0,414 ± 0,020

Další testy antibakteriální aktivity již v rámci této práce prováděny nebyly, protože stěžejním bodem bylo navrhnout materiál pro bezbolestné odstranění tkáně, ne materiál s antibakteriální aktivitou. Nízká antibakteriální aktivita by se u vzorků mohla objevit z toho důvodu, že enzymy díky proteolytické aktivitě rozkládají také proteiny, kterými se bakterie udržují na materiálu.

3.5.2 Sterilizace ethylenoxidem

Vyzkoušena byla i metoda sterilizace pomocí studeného etylenoxidu, po které následovalo 14 dní odvětrání vzorků. Po této době byly vzorky podrobeny cytotoxickým testům podle normy ČSN EN ISO 10993-5. Konkrétně byla použita metoda MTT (více o metodě v kapitole

3.6.1) a byly použity 3T3-SA myší fibroblasty (pasáž 16, nasazeno $5 \cdot 10^3$ buněk / 96well). Testy byly prováděny přímým kontaktem. Složení média bylo následující: DMEM High Glucose, 10% FBS, 1% ATB, 1% L-glutamin a bylo měněno každé 3 dny. Nasazena byla i pozitivní a negativní kontrola, ze kterých byla vypočítána 100% míra viability buněk. Hodnoty byly průměrovány z 10 vzorků od každého. Proliferace buněk byla jasně nejvyšší 7. testovaný den (testovací dny: 1., 4. a 7. den) u všech vzorků, přesto byla ale hodnota proliferace velmi nízká (Obrázek 27 vlevo). Při porovnání výsledků MTT testu standardních křemičitých nanovláken stabilizovaných na teplotu 260 °C a sterilizovaných pomocí ethylenoxidu (označeno na levém grafu obrázku jako STA_1) a stejných křemičitých vláken sterilizovaných v autoklávu (označeno na pravém grafu obrázku jako STA_2), byla proliferace vláken po autoklávování vyšší zhruba desetkrát. Proto byl ethylenoxid označen za špatnou metodu sterilizace a dále nepoužíván. Všechny vzorky na levém grafu byly sterilizovány pomocí ethylenoxidu. Díky grafu napravo bylo prokázáno, že sterilizace v autoklávu nemá negativní vliv na viabilitu buněk. Tuto metodu sterilizace není z důvodu vysoké teploty ale možné použít u nanovláken s imobilizovanými enzymy, proto byla hledána další alternativa.



Obrázek 27: MTT test viability 3T3 buněk – graf nalevo: standard sterilizovaný ethylenoxidem (STA_1), nanovlákná funkcionalizovaná metodou A-EDC s proteázou (A_PR), nanovlákná funkcionalizovaná metodou A-EDC s bromelianem (A_BR), nanovlákná funkcionalizovaná metodou A-EDC s trypsinem (A_TR), nanovlákná funkcionalizovaná metodou C-GLU s proteázou (A_PR), nanovlákná stabilizovaná na teplotu 550 °C a funkcionalizovaná metodou A-EDC s proteázou (A_PR_550). Graf napravo: standard sterilizovaný v autoklávu (STA_2).

3.5.3 Sterilizace ethanolem

Ethanol je velmi dobrou metodou sterilizace pro křemičitá nanovlákná, bohužel tomu již tak není v případě enzymů, protože stejně jako působí ethanol na bakterie (denaturuje proteiny, dehydratuje buňky a rozpouští lipidy v buněčných membránách), tak působí i na enzymy a díky denaturaci proteinů inhibuje aktivitu enzymů (Dai et al. 2016). Dokázala to opět i studie s chitosanovými nanovláknami s imobilizovanou kolagenázou z *Clostridium histolyticum*, (sterilizace po dobu 5 min v 80% ethanolu, poté 10 minut v 50% ethanolu a nakonec byla vlákna promyta třikrát ve sterilní destilované vodě.), kdy se aktivita imobilizované kolagenázy po tomto druhu sterilizace zmenšila o 33 % (Slováková et al. 2015). Nejčastěji se používá ke sterilizaci roztok 60–80% ethanolu, který je možný tedy použít bez problému až do fáze funkcionalizace nanovláken, protože ještě v tomto kroku je ethanol standardně používán jako rozpouštědlo.

3.5.4 Sterilizace polyvalentními alkoholy

Jako další metodou sterilizace byly postupně testovány polyvalentní alkoholy – propylenglykol a glycerol. K této metodě se přešlo na základě patentu Process for sterilization of enzyme contaminated by bacteria (US4612169A), ve kterém byl dokázán sterilizační efekt polyvalentních (kombinovaných) alkoholů s 2 až 3 hydroxylovými skupinami (Iwasaki et al. 1986). Jedná se tedy o látky: glycerol, ethylenglykol, propylenglykol, 1,3-butandiol, 1,4-butandiol, 2,3-butandiol, 1,5-pentandiol, 1,6-hexandiol, 1,2-butandiol, 1,2,4-butanetriol, 1,2,6-hexanetriol a podobně. Testy uvedenými v patentu bylo dokázáno, že tyto alkoholy ve více jak třicetiprocetním vodném roztoku (dobu reakce 3 hodiny až 5 dnů, teplota 20 až 40 °C), mají sterilizační účinek enzymů. V patentu je přímo uvedeno, že princip sterilizačního účinku není jasný, ale předpokládá se, že tyto polyvalentní alkoholy výrazně zvyšují osmotický tlak bakterií. Z uvedených polyvalentních alkoholů se v medicíně využívá (a za všeobecně bezpečný je považován) glycerol a propylenglykol (Gaunt et al. 1972). Podle výsledků z (Iwasaki et al. 1986) byl ke sterilizaci použit buď 52% propylenglykol, nebo 52% glycerol (dobu reakce 3 hodiny, teplota 40 °C). Avšak v našem případě došlo po vyndání vláken z roztoku glycerolu k výraznému zhoršení manipulace s nanovláknami, která se úplně rozpadala. Dále byl tedy využit pouze roztok propylenglykolu.

Zvlákněná křemičitá nanovlákná s teplotou stabilizace 180 °C / 2 hod. byla ponořena buď do 52% propylenglykolu, nebo 70% ethanolu a tyto vzorky byly podrobeny MTT testu

cytotoxicity buněk (více o metodě v kapitole 3.6.1) a výsledky testu na Obrázku 39 v kap. 4.3). Použity byly buňky 3T3 (myší fibroblasty). Viabilita buněk sterilizovaných propylenglykolem byla několikanásobně nižší než při použití ethynolu. Testována byla i proteolytická aktivita imobilizovaných enzymů na křemičitá nanovlákná nesterilizovaných a sterilizovaných propylenglykolem (více o principu měření proteolytické aktivity je uvedeno v kapitole 3.4.). Enzymatická aktivita se ve všech třech případech po sterilizaci propylenglykolem snížila, což není opět žádoucí.

3.5.5 Sterilizace pomocí filtrace kapalin

Přešlo se tedy k metodě sterilizace pomocí filtrace. Filtrace kapalin je možná pomocí filtrů s průměrem pórů 0,22 μm (Jornitz et al. 2007). Protože není možné nyní zajistit z provozních důvodů sterilní prostředí pro výrobu nanovláken (na přístroji Nanospider™) a následné sterilní prostředí při teplotní stabilizaci, byl nakonec zaveden proces dvoustupňové sterilizace. Vlákná byla po zvlákňování, tepelné stabilizaci, silanizaci a prvním kroku funkcionalizace sterilizována pomocí ethanolu. Dále byly všechny další reagenty sterilizovány pomocí filtrace přes filtry s průměrem pórů 0,22 μm a bylo již dále pracováno pouze ve sterilním biohazard boxu. Porovnání všech metod sterilizace je uvedeno v Tabulce 11.

Tabulka 11: Metody sterilizace biodegradabilních vzorků.

Princip	Druh	Testování	Výsledek	Poznámka
Zahřívání	Autoklávování	Ne	-	
Záření	Gama	Ne	-	
	UV	UV-C ne UV-A ano	- Zvýšení proteolytické aktivity imobil. enzymů	Tabulka 10
Chemické	Ethylenoxid	Ano, Testy viability buněk	Zvýšení cytotoxicity materiálu	Obrázek 27
	Ethanol	Ano, Testy viability, Testy aktivity	Možné použít pouze do kroku funkcionalizace	Obrázek 41 Obrázek 34
	Propylenglykol	Ano, Testy viability, Testy aktivity	Zvýšení cytotoxicity materiálu, snížení aktivity enzymů	Obrázek 41,
	Glycerol	Ano, ale vlákna se rozpadala	Změny struktury vláken	
Mechanické	Filtrace	Ano, Testy viability, Testy aktivity	Vhodné od kroku funkcionalizace vláken	Obrázek 41, 34

3.6 Testování cytotoxicity vyrobených materiálů in vitro

U všech léčebných preparátů je vždy nutné dodržet posloupnost požadovaných testů in vitro a poté in vivo. Je vždy nutné testovat, zda buňky přežijí při kontaktu s daným materiálem (testy cytotoxicity), zda materiály nepodporují vznik nežádoucích chemických sloučenin a zda nepodporují růst bakterií. Testování se provádí v souladu s normou ČSN EN ISO 10993-5, kde je také uvedeno, že snížení životaschopnosti buněk o více než 30 % oproti kontrole je považováno za cytotoxický účinek. Testy in vitro je možné provádět buď formou přímého kontaktu (na nanomateriály s imobilizovanými enzymy by byly přímo aplikovány buněčné linie) nebo formou extraktu (výluhu). Pokud byl použit výluh, byla vysušená nanovlákna před testy cytotoxicity zvážena a výluh byl prováděn v médiu. Pokud není uvedeno jinak, byla použita koncentrace 0,25 ml média na 1 mg nanovláken. Základní testy cytotoxicity se velmi často provádí pomocí myších fibroblastů, poté se přechází k lidským liniím (endoteliální buňky, fibroblasty, osteoblasty, keratinocyty). Záleží vždy na předpokládaném využití vyvíjených materiálů.

Nejčastěji je cytotoxicita testována buď pomocí metody MTT, XTT, AlamarBlue nebo cck-8. Použité metody jsou popsány v následujících podkapitolách a výsledky jsou uvedeny v kap. 4.2.

3.6.1 Test viability buněk – metoda MTT

Metoda využívá (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT), který je mitochondriálními dehydrogenázami dýchacího řetězce redukován na modrofialový formazan. Tento formazan je v dalším kroku rozpuštěn dimethylsulfoxidem proto, aby bylo možné stanovit jeho koncentraci spektrofotometricky. Absorbance roztoku je měřena při vlnové délce 570 nm. Čím vyšší procento životaschopných buněk bylo v jamce, tím vyšší je absorbance a tím nižší byla cytotoxicita zkoumaného materiálu. Pokud testujeme tedy cytotoxicitu nanovláken, je možné buňky vystavit přímému kontaktu s nanovláknem, nebo vytvořit výluh z těchto nanovláken. Při testování cytotoxicity materiálu, nebo roztoku se vždy stanoví více dnů, kdy bude test MTT proveden, například 1., 4. a 7. den. pokusu. Celý postup tohoto testu je uveden například v (Roche 2016).

3.6.2 Test viability buněk – metoda cck-8

Jedná se obdobu metody MTT. Opět je pomocí metody zjišťována viabilita a proliferace buněk, které jsou vystaveny přímému kontaktu nebo výluhu zkoumaného materiálu, nebo roztoku. Používá se Dojindova vysoce rozpustná tetrazoliová sůl WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrofenyl) -3- (4-nitrofenyl) -5- (2,4-disulfofenyl) -2H-tetrazolium, monosodná sůl), která je redukována dehydrogenázovou aktivitou v buňkách za vzniku žlutého formazanu. Ten je rozpustný v tkáňovém kultivačním médiu. Množství formazanového barviva, generovaného aktivitou dehydrogenáz v buňkách, je přímo úměrné počtu živých buněk. Míru viability je možné určit proměřením absorbance při vlnové délce 450 nm, podrobný postup testu je popsán v (Dojindo Molecular Technologies, Inc. 2016).

3.6.3 Test viability buněk – metoda AlamarBlue

Test je založen na schopnosti živých buněk redukovat resazurin (původní název pro Alamar Blue) na resorufin. K redukci dochází při spotřebě kyslíku metabolismem buněk (díky mitochondriálním enzymům) a vzniká růžové fluorescentní barvivo. Resorufin je možné detekovat spektrofotometricky nebo fluorometricky. Výsledky jsou opět vyhodnocovány oproti kontrole. Je možné použít výluh i přímý kontakt. Více o metodě v publikaci (O'Brien et al. 2000). Nevratná redukce resazurinu na resorufin může probíhat i díky mitochondriálním enzymům (De Fries and Mistuhashi, 1995). Výhodou testu AlamarBlue kromě cenové dostupnosti je, že nevykazuje žádné cytotoxické účinky při nízkých koncentracích vůči buňkám (při expozici maximálně 4 hodiny) (Gloeckner et al., 2001), a tak testované buňky nejsou zničeny, což umožňuje provádět na stejné sadě buněk další měření (Schreer et al., 2005).

Hlavní výhodou metody AlamarBlue proti dalším dvěma uvedeným je netoxičnost metody. Je tedy možné provádět na stejné sadě buněk další měření. Výhodou metody cck-8 proti metodě MTT je vyšší citlivost. V prvním letech výzkumu na mé disertační práci kolegyně z tkáňových laboratoří, které mi pomáhaly s testy, používaly metodu MTT, později všechny ale optimalizovaly a používaly metodu cck-8 nebo AlamarBlue.

3.7 Testování stability nanovláken s imobilizovanými enzymy

Enzymy jsou imobilizovány na vhodné materiály zejména proto, aby byla prodloužena jejich stabilita, nebo aby bylo možné je použít opakovaně. V našem případě jde zejména o prodloužení stability, aby enzymy na nanovlákněch byly aktivní po delší dobu od výroby tohoto materiálu. Testování stability bylo tedy důležitým krokem v této disertační práci. Bylo testováno, za jakých skladovacích podmínek se udrží nejvyšší aktivita enzymů po co nejdelší dobu a jaký proteolytický enzym je nejstabilnější.

Po elektrostatickém zvlákňování byla křemičitá nanovláknina vždy uchovávána v obalu z hliníkové folie, v zip sáčku ve tmě, při pokojové teplotě. Před prvním krokem úpravy povrchu nanovláken byla nanovláknina vždy v sušárně vyhřátá na teplotu 150 °C po dobu 2 hodin pro zničení vazeb mezi povrchem nanovláken a naabsorbovanými molekulami z okolí. Dále byla nanovláknina zpracována podle jedné z výše uvedených metod v kapitole 3.2. Enzymy byly vždy imobilizovány na povrch nanovláken ihned po funkcionalizaci povrchu. V rámci testů stability byla nanovláknina s enzymy uchována v hliníkové folii, v zip obalu buď při pokojové teplotě, v lednici při teplotě 4–6 °C anebo v mrazáku při teplotě 18–20 °C. V této kapitole jsou uvedeny modelové testy stability po 7 a 30 dnech pro metodu úpravy A-EDC s imobilizovanou proteázou (Tabulka 12) a pro metodu s využitím kyseliny glutarové (Tabulka 13). Kyselina glutarová byla v koncentraci 2 % rozpuštěna ve fosfátové pufru s hodnotou pH = 7,2. V případě použití kyseliny glutarové se proteolytická aktivita výrazně snížila již po 7 dnech. Další výsledky testů stability jsou uvedeny v kapitole 4.3.

Tabulka 12: Reziduální proteolytická aktivita proteázy po 7 a 30 dnech skladování v závislosti na teplotě skladování, metoda úpravy nanovláken A-EDC.

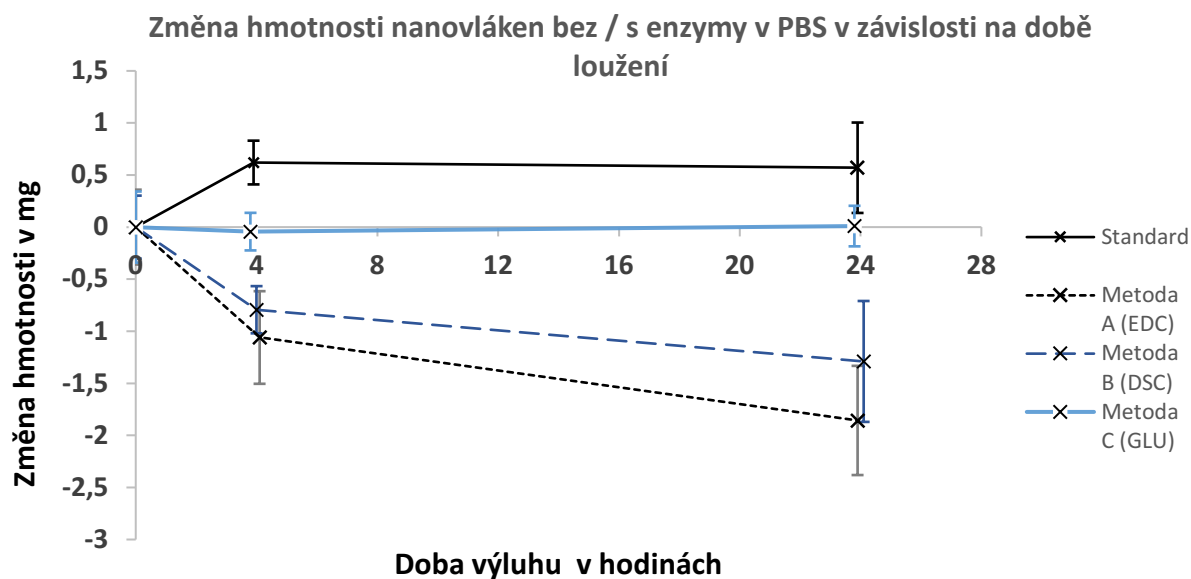
Metoda A-EDC		Proteolytická aktivita po 7 dnech			Proteolytická aktivita po 30 dnech		
		Teplota skladování [°C]			Teplota skladování [°C]		
Enzym		-20	4	21	-20	4	21
	PR	100 %	97 %	89 %	97 %	96 %	75 %

Tabulka 13: Reziduální proteolytická aktivita proteázy po 7 a 30 dnech skladování v závislosti na teplotě skladování, metoda úpravy nanovláken: APTES a kyselina glutarová.

Metoda s kys. glutarovou		Proteolytická aktivita po 7 dnech			Proteolytická aktivita po 30 dnech		
		Teplota skladování [°C]			Teplota skladování [°C]		
Enzym		-20	4	21	-20	4	21
	PR	52 %	43 %	41 %	13 %	4 %	9 %

3.8 Testování rozpustnosti nanovláken s enzymy

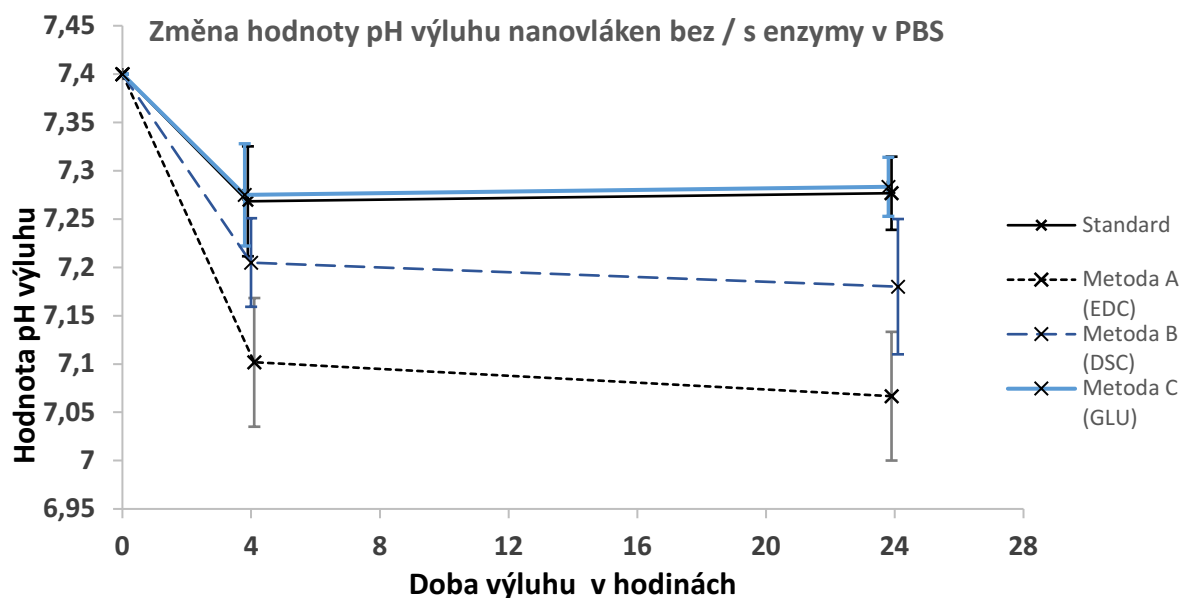
Další analýza byla provedena pomocí měření změny hmotnosti nanovláken při louhování vzorků v 0,1 M fosfátovém pufru (PBS) s pH = 7,4. Nanovlákná o rozměru cca 1 x 1 cm (vždy hmotnost 5–6 mg) byla nejprve zvážena a poté vložena do 3 ml PBS. Po 4 a 24 hodinách byly vzorky vyjmuty, vysušeny při 23 °C v sušárně přes noc a poté byly znovu zváženy. Tento druh měření byl proveden pro standard křemičitých nanovláken bez enzymu, pro metodu A-EDC, metodu B-DSC a srovnávací metodu C-GLU vždy s imobilizovaným 2% enzymem proteázou z *Aspergillus oryzae*. Testy byly prováděny v tripletu a výsledky jsou znázorněny na Obrázku 26. Počáteční hmotnost byla vždy zprůměrována a do grafu byly poté uvedeny změny hmotnosti mezi počátkem pokusu a vylouženými vlákny po 4, popř. po 24 hodinách. Z grafu je patrné, že pouze u standardu se hmotnost po 4 i po 24 hodinách zvýšila od původní hmotnosti. Tento fakt zřejmě souvisí s vysokou reaktivitou povrchu nanovláken. Samotná křemičitá nanovlákná s SI-OH vazbami na povrchu naabsorbují na svůj povrch molekuly obsažené ve fosfátovém pufru. U metody A-EDC i metody B-DSC došlo vždy ke snížení hmotnosti, a tedy je patrné, že dochází k vymývání použitých chemikálií při úpravě povrchu, které nejsou kovalentně navázány, ale jsou navázány méně pevnou vazbou. Tento fakt potvrzuje i výrazné snížení cytotoxicity vzorků bez oplachu PBS a po oplachu 2 x 2 hodiny v PBS – viz. Obrázek 41 a 42 v kap. 4.2. Ke snížení hmotnosti částečně samozřejmě také dochází díky rozpouštění samotných nanovláken. Protože ale podle in vitro testů na prasečí kůži (viz. kap. 3.10.), vlákna s enzymy svůj hlavní účel plní i po vymývání v PBS, byl krok promývání v PBS zařazen na konec procesu výroby nanovláken. U metody A-EDC a B-DSC dochází k nejrychlejší ztrátě hmotnosti právě v prvních 4 hodinách. Jsem si samozřejmě vědoma, že tento fakt vnáší chybu do měření proteolytické aktivity, protože je aktivita vztažena na hmotnost nanovláken a ne ve všech testech v disertační práci byla aktivita měřena až po vymývání v PBS.



Obrázek 28: Graf závislosti změny hmotnosti vzorků nanovláken bez / s imobilizovanými enzymy v mg výluhu nanovláken po 4 a 24 hodinách.

3.9 Testování změny pH roztoku po louhování nanovláken s enzymy

Podobně jako v kapitole 3.7 byly vzorky o rozměru cca 1 x 1 cm (vždy hmotnost 5–6 mg) ponořeny do 3 ml 0,1 M fosfátovém pufru s pH = 7,4. Po 4 a 24 hodinách byla nanovláčka vyjmuta a byla měřena změna hodnoty pH výluhu. Tento druh měření byl proveden pro standard křemičitých nanovláken bez enzymu, pro metodu A-EDC, metodu B-DSC a srovnávací metodu C-GLU vždy s imobilizovaným 2% enzymem proteázou z *Aspergillus oryzae*. Z výsledků je opět patrné, že k největší změně – snížení hodnoty pH – dochází v prvních 4 hodinách a u všech vzorků. Největší změna hodnoty pH výluhu se projevila u vzorku připraveného metodou A-EDC. Tento fakt koreluje i s největší změnou hmotnosti na Obrázku 26. Pokud tedy dochází k snížení hmotnosti vzorku (tedy jeho rozpouštění a výluhu), dochází zároveň ke snížení hodnoty pH výluhu.



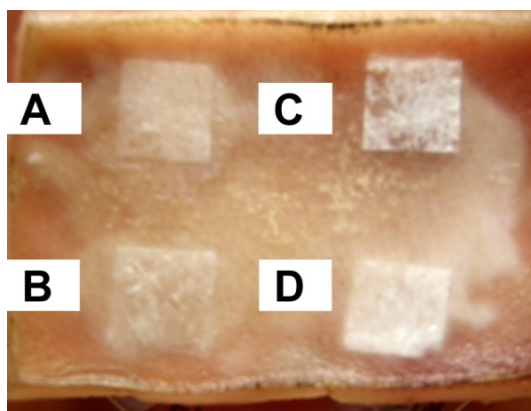
Obrázek 29: Graf závislosti změny hodnoty pH výluhu nanovláken bez / s imobilizovanými enzymy po 4 a 24 hodinách.

3.10 In vitro testy na prasečí kůži

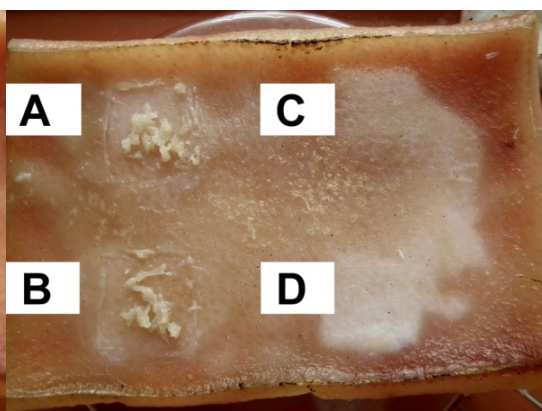
Byly také provedeny in vitro testy působení proteolytických enzymů na popáleniny vytvořené na prasečí kůži. Na popálenou prasečí kůži byly umístěny vzorky nanovláken s rozměry 1,8 x 1,8 cm. Nanovlákná s prasečí kůží byla ponechána ve vlhkém prostředí po dobu 24 hodin v inkubátoru při teplotě 37 °C. Další den byla vlákna odebrána z povrchu kůže a bylo okamžitě vidět, že v případě nanovláken s imobilizovaným proteolytickým enzymem šla popálená kůže oddělit od spodiny rány s minimálním úsilím, pouze velmi malým tlakem skalpelu nebo dokonce pouze opláchnutím destilovanou vodou. V případě standardů bez enzymů nedošlo vůbec k oddělení popálené kůže od spodiny rány.

V rámci modelového testování byla nanovlákná stabilizována na 260 °C po dobu 2 hodin a byl porovnán zároveň vliv UV-A záření. V prvním případě se jednalo o nanovlákná upravená pomocí metody A-EDC s enzymem proteáza s *Aspergillus oryzae* (Obrázek 30 a 31, bez ozáření UV-A = vzorek A, po ozáření UV-A zářením = B), vedle byly umístěny standardy vláken bez enzymu (bez ozáření = vzorek C, po ozáření ultrafialovým zářením = D). V tomto makroměřítku nebyly pozorovány žádné vlivy UV-A záření. Po působení nanovláken s enzymy

bylo možné znekrotizovanou tkáň jemně setřít, což v případě nanovláken bez enzymů možné nebylo.

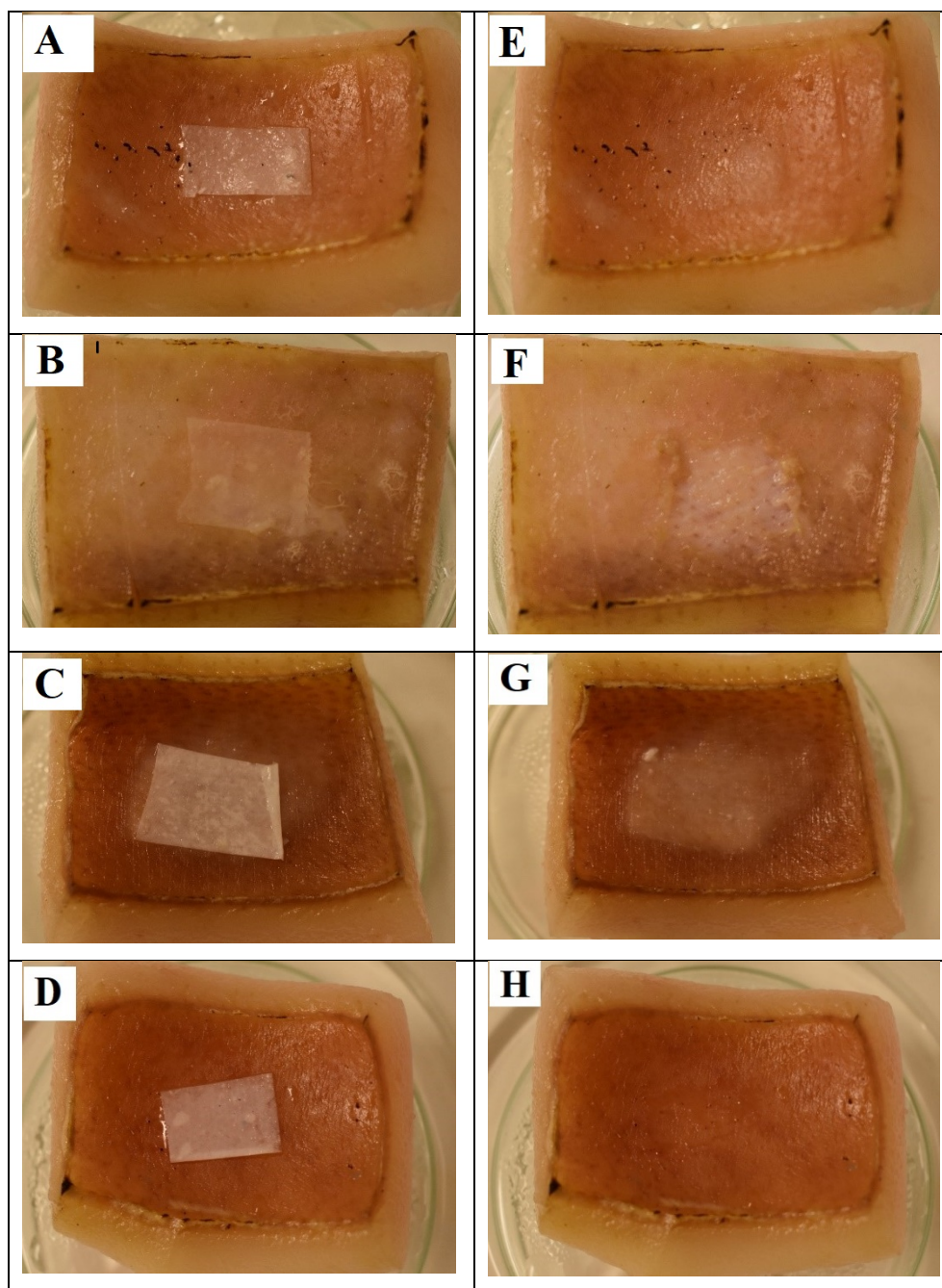


Obrázek 30: Prasečí kůže s nanovláknem po 24 hodinách inkubace. Nanovlákná upravená metodou A-EDC s proteázou bez ozáření (A), s proteázou po ozáření UV-A (B), standard bez ozáření (C), po ozáření (D).



Obrázek 31: Prasečí kůže po odstranění nanovláken a mírném setření míst. Nanovlákná upravená metodou A-EDC s proteázou bez ozáření (A), s proteázou po ozáření UV-A (B), standard bez ozáření (C), po ozáření (D).

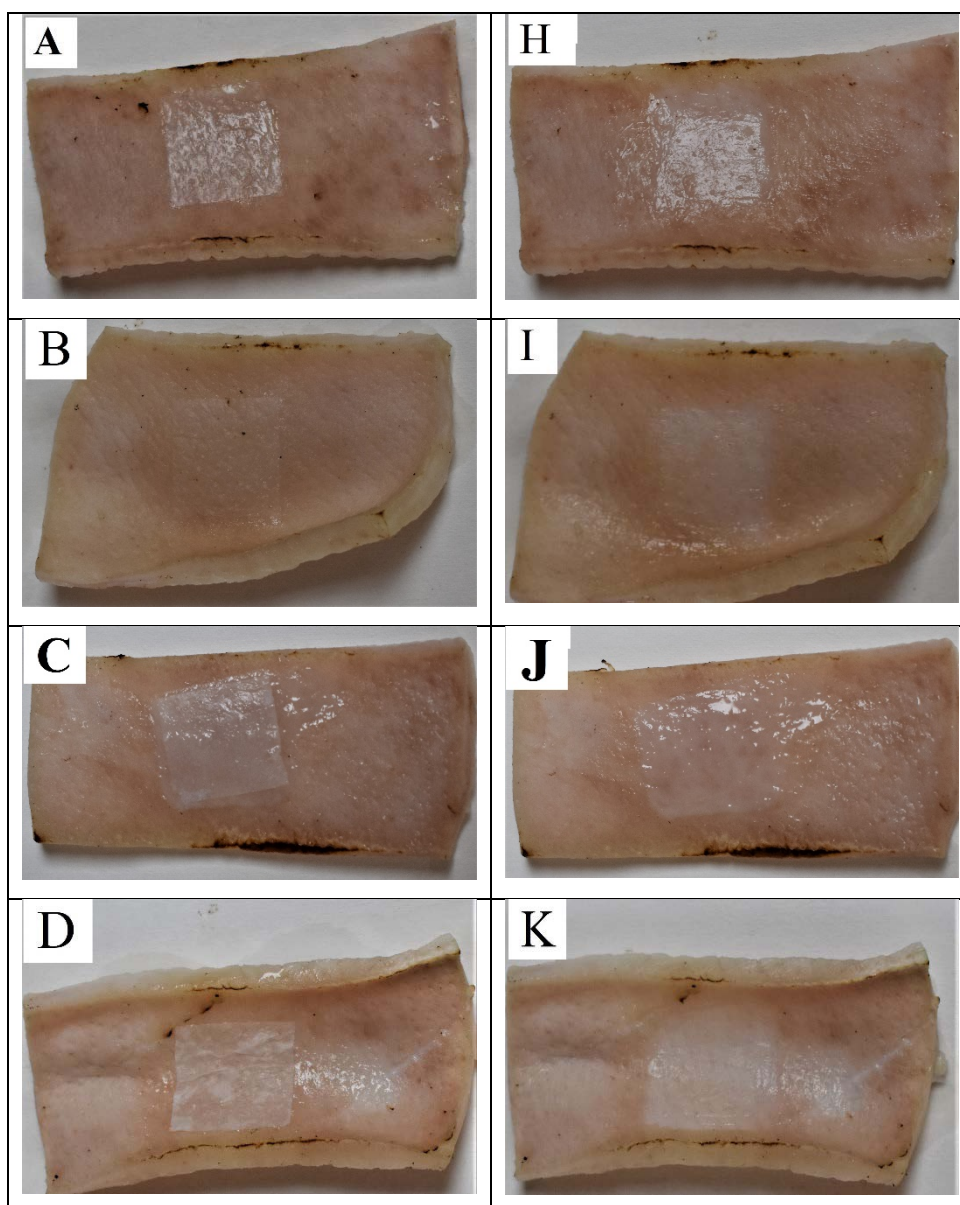
V dalších testech byla použita křemičitá nanovlákná stabilizovaná na teplotu 180 °C. Metoda testu byla stále stejná a výsledky jsou uvedeny na Obrázku 32. Testována byla nanovlákná upravená metodou A-EDC s proteázou z *Aspergillus oryzae* (označeno A a E), dále s metodou B-DSC se stejnou proteázou (označeno B a F), nebo s trypsinem (označeno C a G). Porovnání proběhlo opět se standardem nanovláken, které nebyly nijak upraveny (označeno D a H). Z fotografií je dobře znatelné, že nejlépe bylo možné nekrotickou tkáň jemně setřít po použití nanovláken upravených metodou B-DSC s proteázou. V prvním případě došlo pouze k malému narušení nekrotické tkáně a ve třetím případě k odstranění pouze povrchové části nekrózy. Po působení standardu opět nedošlo k žádné změně.

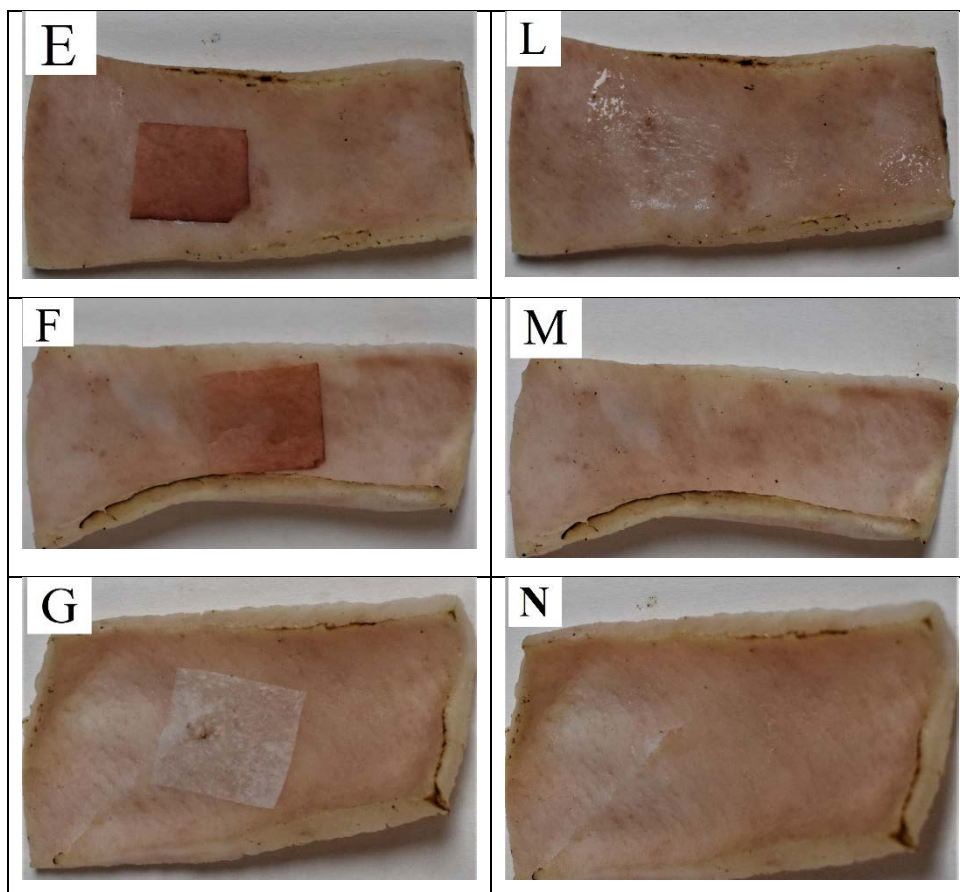


Obrázek 32: Prasečí kůže po 24 hodinách inkubace, v levém sloupci s nanovlákný, v pravém po odstranění nanovláken. Nanovlákná upravena metodou A-EDC s proteázou (A, E) upravena metodou B-DSC s proteázou (B, F), upravena metodou B-DSC s trypsinem (C, G), standard bez úpravy (D, H).

Výsledky stejných testů jsou uvedeny i na Obrázku 33. Zde bylo testováno větší množství vzorků. Porovnán je vliv všech tří metod a proteázy a trypsinu. Vzorky upravené metodou A-EDC s proteázou jsou označeny A a H, upraveny stejnou metodou, ale s trypsinem jsou označeny B a I. Nanovlákná upravena metodou B-DSC s proteázou jsou označena C a J, s trypsinem D a K. Pro porovnání byla testována i nanovlákná upravena metodou C-GLU s proteázou, označeno E a L a s trypsinem je označeno F a M. Jako poslední můžete vidět vliv

neupraveného standardu nanovláken – označeno G a N. U metody A-EDC a metody B-DSC byl prokázán vždy větší vliv proteázy než trypsinu. V případě použití proteázy došlo k odstranění nekrózy v celé její šířce. U použití trypsinu došlo k odstranění pouze povrchové části nekrózy, přičemž ke kompaktnějšímu odstranění došlo v případě metody B-DSC. Při úpravě nanovláken pomocí metody C-GLU nedošlo k tak dokonalému odstranění jako v předchozích dvou případech. Při použití proteázy došlo alespoň k odstranění povrchní části nekrózy, po působení trypsinu ale nedošlo již k žádnému odstranění nekrózy. Bez působení na nekrózu opět byla pozorována i standardní nanovlákná.





Obrázek 33: Prasečí kůže po 24 hodinách inkubace, v levém sloupci s nanovláknky, v pravém po odstranění nanovláken. Nanovláknka upravena metodou A-EDC s proteázou (A, H), s trypsinem (B, I), upravena metodou B-DSC s proteázou (C, J), s trypsinem (D, K), upravena metodou C-GLU s proteázou (E, L), s trypsinem (F, M), standard bez úpravy (G, N).

4 Výsledky

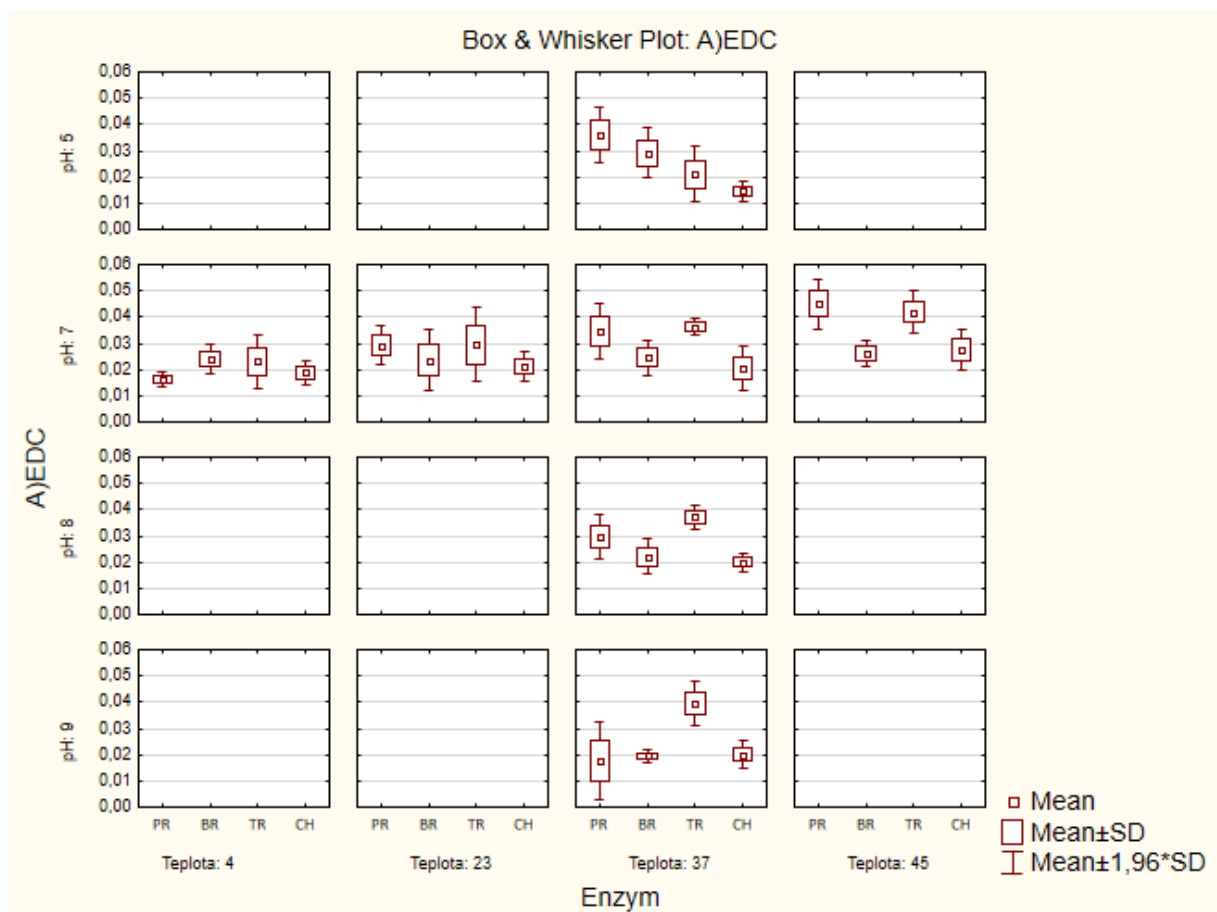
Dílčí výsledky jednotlivých testů byly uvedeny již v kapitole 3, kde byly uvedeny i nekvantifikovatelné výsledky. V kapitole 4.1 jsou uvedeny zejména výsledky, které byly zpracovány pomocí statistického programu. Použit byl program TIBCO Statistica. Všechny naměřené výsledky byly rozděleny podle druhu výsledku do 3 skupin tak, aby byly porovnatelné.

4.1 Vliv metody funkcionalizace, hodnoty pH a teploty na aktivitu enzymů

Největší skupinu výsledků tvořily testy proteolytické aktivity imobilizovaných enzymů v závislosti na metodě imobilizace – metoda A-EDC, metoda B-DSC a metoda C-GLU, zároveň v závislosti na teplotě (4, 23, 37 nebo 45 °C), hodnotě pH (5, 7, 8 nebo 9) a druhu proteolytického enzymu (PR, BR, TR, CH). Tyto výsledky proteolytické aktivity byly vždy uvedeny v jednotkách Units/mg nanovláken, byly mezi sebou tedy porovnatelné. Očekávaným výstupem této skupiny testů bylo označení nejlepší metody imobilizace a nejvhodnějšího proteolytického enzymu, který bude vykazovat vysokou aktivitu za podmínek odpovídajících v popálené tkáni – hodnotě pH = 8 a teplotě 37 °C. Protože výroba každé série vzorků trvá 1 až 2 dny a testování aktivity trvá další celý den, z časových a zejména finančních důvodů nebyly provedeny všechny testy v závislosti na všech 4 proměnných. Nebylo tedy možné při hodnocení vždy použít vícerozměrnou statistiku a výsledky byly hodnoceny pomocí deskriptivní statistiky, post hoc testů, testů pro analýzu rozptylu atd. Výchozími podmínkami pro všechna měření aktivity enzymů je teplota 37 °C a hodnota pH = 7,0, proto pokud byla testována aktivita v závislosti na teplotě, byla hodnota pH vždy 7,0 a obráceně, pokud byla testována aktivita v závislosti na hodnotě pH, byla teplota reakce vždy 37 °C.

4.1.1 Vliv metody funkcionalizace nanovláken

Nejvíce testů bylo provedeno pro metodu A-EDC, kde byla aktivita imobilizovaných enzymů měřena v závislosti na teplotě, hodnotě pH a druhu imobilizovaného enzymu. Na Obrázku 34 je vidět box plot statistika pro ty kombinace hodnoty pH a teploty, které byly pro metodu A-EDC měřeny.



Obrázek 34: Box plot statistika pro metodu A-EDC. Mean znamená průměr, mean±SD označuje směrodatnou odchylku od průměru a mean±1,96*SD označuje 95% interval spolehlivosti. Osa y vždy znázorňuje proteolytickou aktivitu enzymů v jednotkách Units/mg nanovláken.

Proveden byl také post hoc test, který na rozdíl od ANOVY nepotvrdí pouze, že mezi skupinami existuje rozdíl, ale zjistí i, které skupiny jsou odlišné od ostatních. Konkrétně byl použit LSD (least significant difference) test, který aplikuje standardní t-testy na všechny možné páry středních hodnot vybraných skupin. Předpokladem pro použití post hoc testů jsou stejné rozptyly skupin. Rozdíly mezi skupinami byly testovány na hladině významnosti $\alpha = 5\%$. Pro kontrolu byl použit ještě ze skupiny post hoc testů Tukeyův HSD (honestly significant difference) test a bylo vždy porovnáno, zda LSD a HSD test označil vždy stejné dvě porovnávané skupiny vzorků za odlišné na hladině významnosti 5 %. Všechny vzorky byly provedeny ve 12ti opakováních.

V Tabulce 14 je uveden výsledek LSD testu pro metodu A-EDC teplotu 4 °C a pH = 7. Hodnoty označené červeně se liší na hladině významnosti 5 % a hodnoty označené černě se na této hladině významnosti neliší. Protože byla tato statistika provedena pro všechny naměřené kombinace pH a teploty, je možné vytvořit Tabulku 13. V té je uvedeno, u kterého enzymu byla

proteolytická aktivita za daných podmínek nejvyšší a nejnižší. Pokud je mezi dvěma enzymy znaménko =, nelišila se jejich aktivita na hladině významnosti 5 %. Z Tabulky 15 je tedy patrné, že nejvyšší aktivita byla u enzymu proteáza (PR) detekována ve 4 případech, pro bromelain (BR) v 1 případě, pro trypsin (TR) v 6 případech a pro chymotrypsin ani v jednom případě. Nejvyšší proteolytickou aktivitu za různých podmínek vykazuje tedy trypsin a dále proteáza.

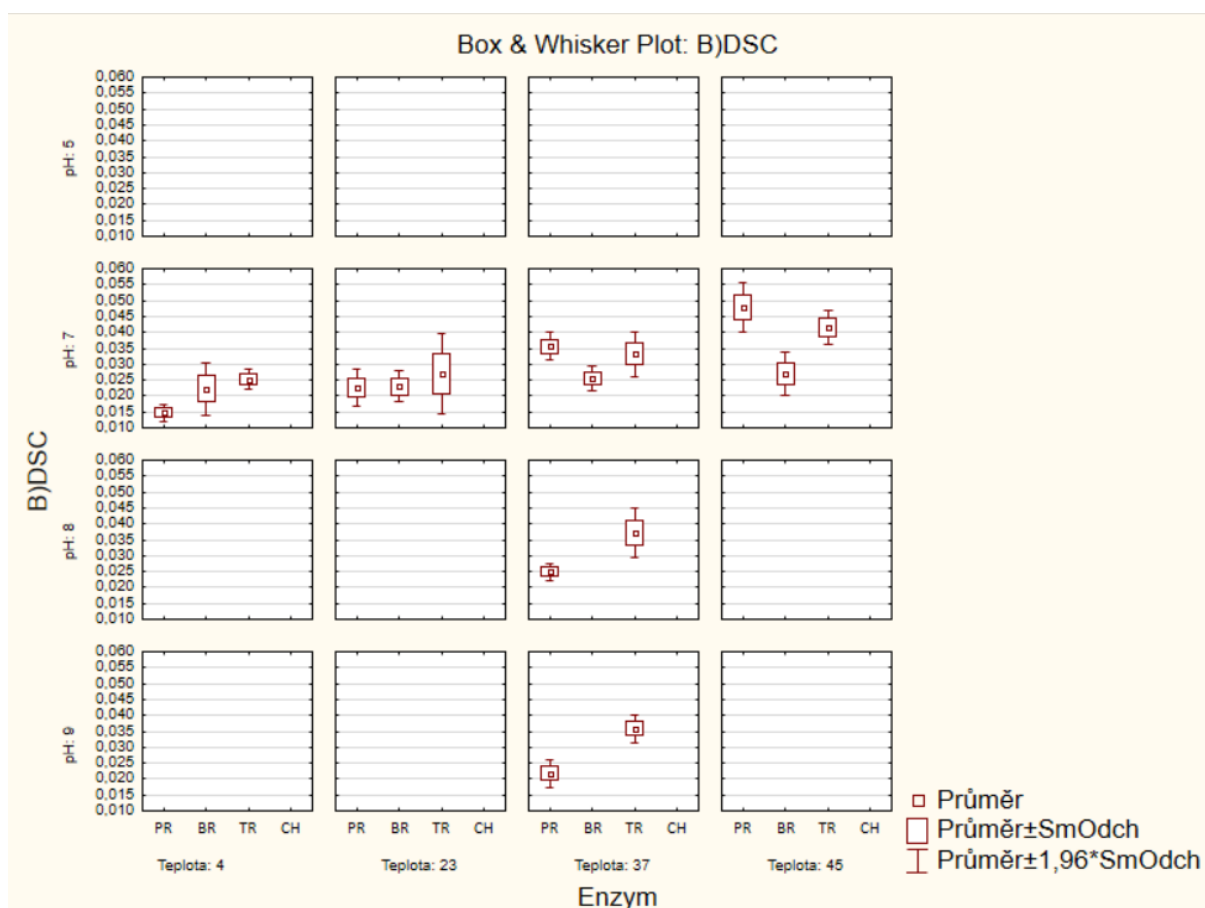
Tabulka 14: LSD test pro porovnání všech možných párů středních hodnot vybrané skupiny – červeně označené se liší, černě označené se neliší, metoda A-EDC, teplota = 4 °C, pH = 7.

Teplota=4, pH=7 LSD test; variable A)EDC (Spreadsheet1) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,00001, df = 44,000					
Cell No.	Enzym	{1}	{2}	{3}	{4}
1	PR		0,000001	0,000011	0,063582
2	BR	0,000001		0,474234	0,000458
3	TR	0,000011	0,474234		0,003703
4	CH	0,063582	0,000458	0,003703	

Tabulka 15: Porovnání aktivity enzymů bromelain (BR), trypsin (TR), proteáza (PR) a chymotrypsin (CH) pro metodu A-EDC. V 6 případech ze 7 byla největší proteolytická aktivita naměřena u trypsinu.

Metoda A (EDC)		Teplota reakce ve °C		
Hodnota pH	4	23	37	45
5			PR>BR>TR>CH	
7	BR=TR>PR=CH	PR=TR>BR=CH	PR=TR>BR>CH	PR=TR>BR=CH
8			TR>PR>BR=CH	
9			TR>PR=BR=CH	

Již výše bylo uvedeno, proč byla další měření prováděna v menším rozsahu. Byl vyřazen enzym chymotrypsin, nebyla již měřena hodnota pH = 5 a po testech stability vzorků (viz. kap. 4.3., Tabulka 18 a Tabulka 19) byl také vyřazen bromelain. Na Obrázku 35 je tedy přehled box plot statistik naměřených pro metodu B-EDC. Opět byl proveden Tukeův HSD test a na jeho základě bylo možné vytvořit Tabulku 16. V té jsou porovnány proteolytické aktivity enzymů a opět byla nejvyšší aktivita v případě trypsinu (pro 4 případy ze 6), v jednom byla nejvyšší aktivita při použití proteázy a v jednom případě byla aktivita proteázy a trypsinu stejná. Nikdy nebyla proteolytická aktivita nejvyšší při využití bromelainu, což je jeden z důvodů, proč při testech závislosti na hodnotě pH již nebyl dále používán.

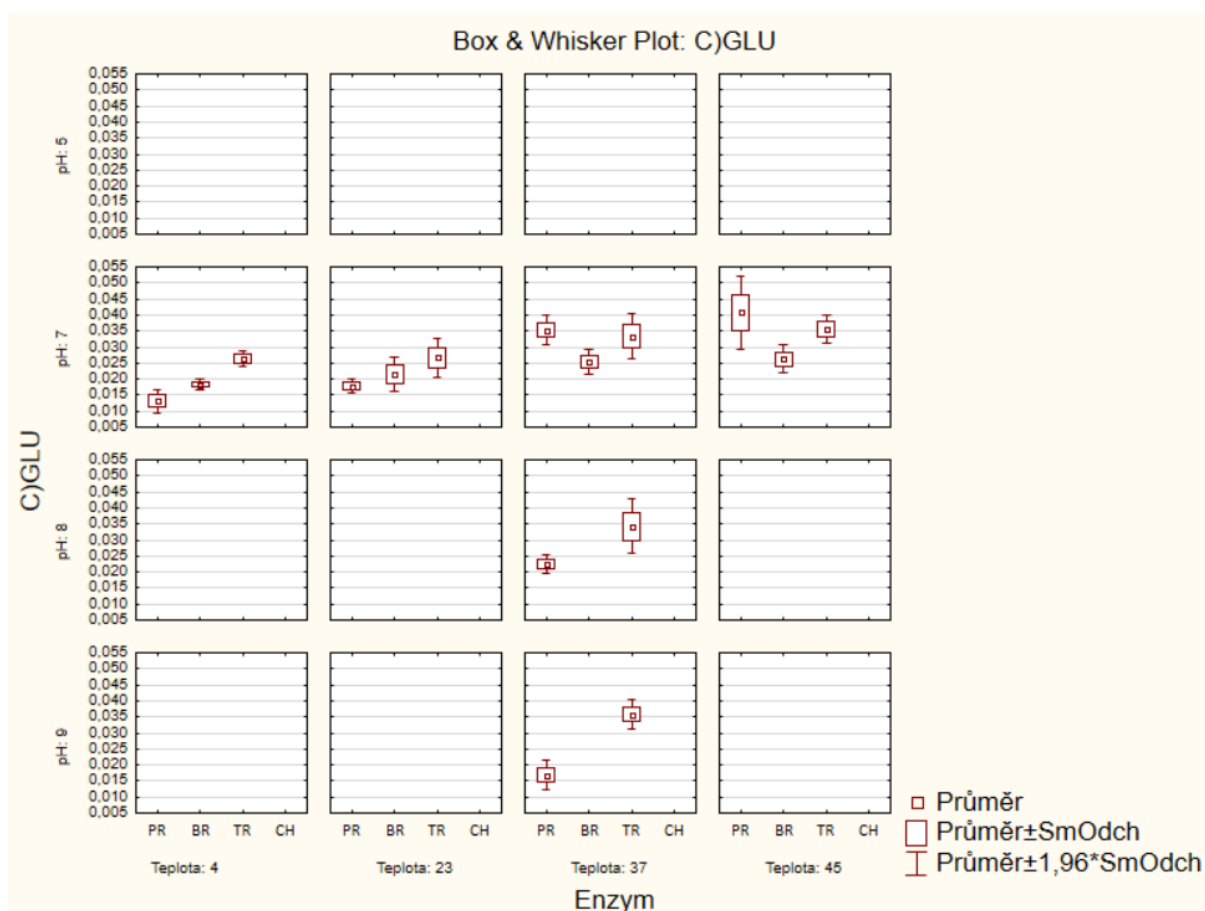


Obrázek 35: Box plot statistika pro metodu B (DSC). Mean znamená průměr, $\text{mean} \pm \text{SD}$ označuje směrodatnou odchylku od průměru a $\text{mean} \pm 1,96 * \text{SD}$ označuje 95% interval spolehlivosti. Osa y vždy znázorňuje proteolytickou aktivitu enzymů v jednotkách Units/mg nanovláken.

Tabulka 16: Porovnání aktivity enzymů bromelain (BR), trypsin (TR) a proteáza (PR) pro metodu B-DSC. V 6 případech ze 7 byla největší proteolytická aktivita naměřena u trypsinu.

Metoda B (DSC)		Teplota reakce ve °C			
Hodnota pH		4	23	37	45
7		TR>BR>PR	TR>BR=PR	PR=TR>BR	PR>TR>BR
8				TR>PR	
9				TR>PR	

Pro porovnání byly provedeny stejné testy pro metodu imobilizace C-GLU, jako pro metodu B-DSC. Výsledná box plot deskriptivní statistika je na Obrázku 36. I v tomto případě byl proveden Tukeyův HSD test a na jeho základě bylo možné vytvořit Tabulku 17. Výsledky jsou velmi podobné jako v případě metody B-DSC. Pouze v jednom případě (teplota = 23 °C a pH = 7) byla aktivita proteázy nižší na hladině významnosti 5 % než u bromelainu. U metody B-DSC nebyl rozdíl mezi těmito dvěma enzymy významný.



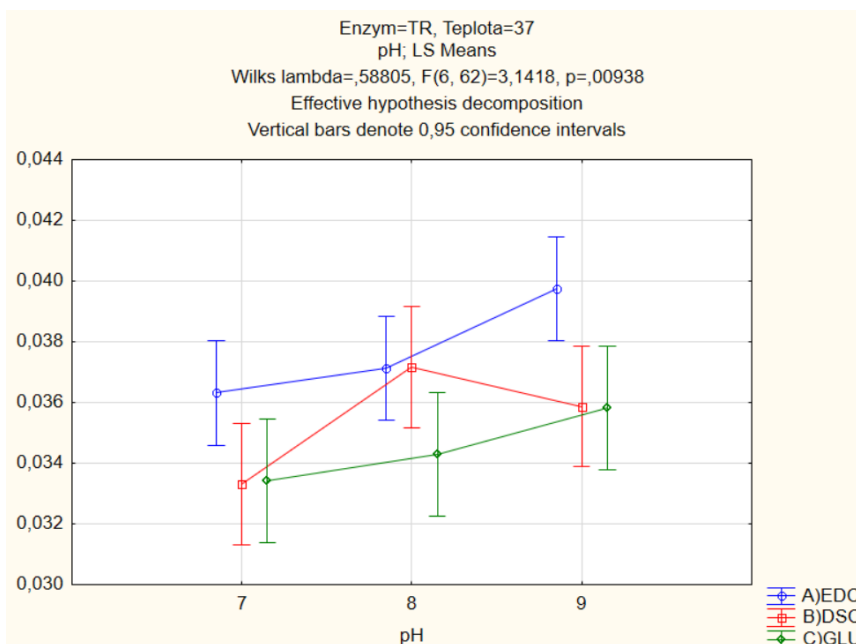
Obrázek 36: Box plot statistika pro metodu C-GLU. Mean znamená průměr, mean±SD označuje směrodatnou odchylku od průměru a mean±1,96*SD označuje 95% interval spolehlivosti. Osa y vždy znázorňuje proteolytickou aktivitu enzymů v jednotkách Units/mg nanovláken.

Tabulka 17: Porovnání aktivity enzymů bromelain (BR), trypsin (TR) a proteáza (PR) pro metodu C-GLU. V 6 případech ze 7 byla největší proteolytická aktivita naměřena u trypsinu.

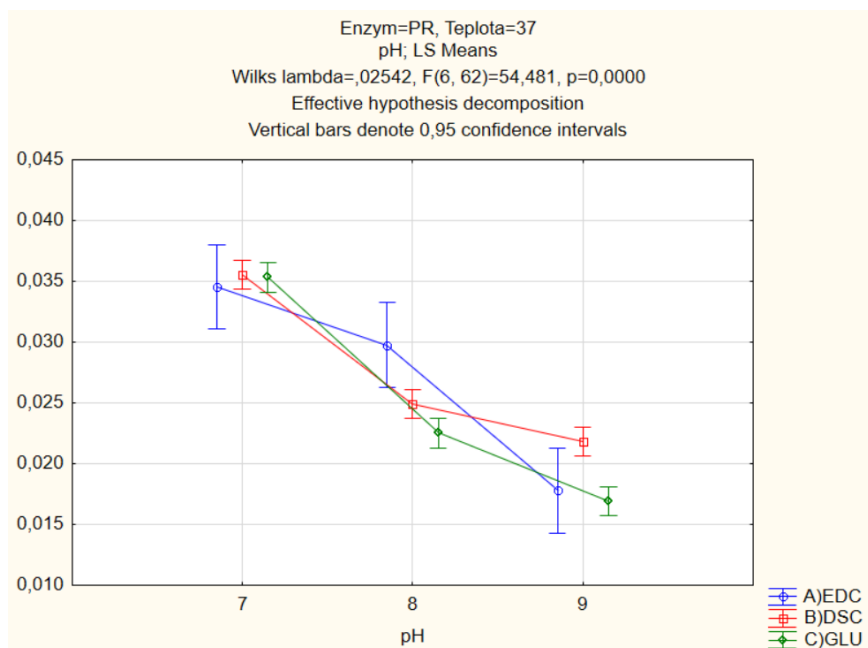
Metoda C (GLU)	Teplota reakce ve °C			
Hodnota pH	4	23	37	45
7	TR>BR>PR	TR>BR>PR	PR=TR>BR	PR>TR>BR
8			TR>PR	
9			TR>PR	

Z těchto výsledků vyplývá, že nejvyšší proteolytická aktivita byla nejčastěji naměřena u enzymu trypsin. Akorát ve dvou případech byla vyšší aktivita u proteázy (nejprve v případě pH = 5 při a t = 37 °C a taky v případě pH = 7 a t = 45 °C). V 5 případech byla aktivita proteázy a trypsinu stejná. Pokud se zaměříme na porovnání metod funkcionalizace, můžeme vidět na Obrázku 37 rozdíly v aktivitě trypsinu podle zvolené metody a hodnoty pH, na Obrázku 38 rozdíly v aktivitě proteázy. V případě nejdůležitějších podmínek reakce, pH = 8 a t = 37 °C, byla aktivita trypsinu vždy vyšší než aktivita proteázy. Z hlediska metody

funkcionalizace bylo prokázáno, že aktivita trypsinu byla stejná pro metodu A-EDC a B-DSC, pro metodu C-GLU byla mírně nižší. V případě proteázy byla aktivita nejvyšší pro metodu A-EDC, mírně nižší byla pro metodu B-DSC a opět nejnížší pro metodu C-GLU. Celkově je ale z výsledků patrné, že metoda funkcionizace výrazný vliv na aktivitu imobilizovaných enzymů nemá. K porovnání byla použita mnohazměrná analýza rozptylu. Testovací statistika – Wilksova lambda slouží k testování hypotézy odlišnosti průměrů znaků v jednotlivých třídách, čím více se blíží číslo k hodnotě 1, tím se průměry v jednotlivých třídách liší méně, opak platí, čím více se číslo blíží k hodnotě 0. Z Obrázků 37 a 38 a jejich hodnot na nich je patrné, že průměry v případě použití trypsinu se liší méně, než průměry v případě proteázy. Je to dáno zejména tím, že aktivita proteázy je více závislá na hodnotě pH než u trypsinu.



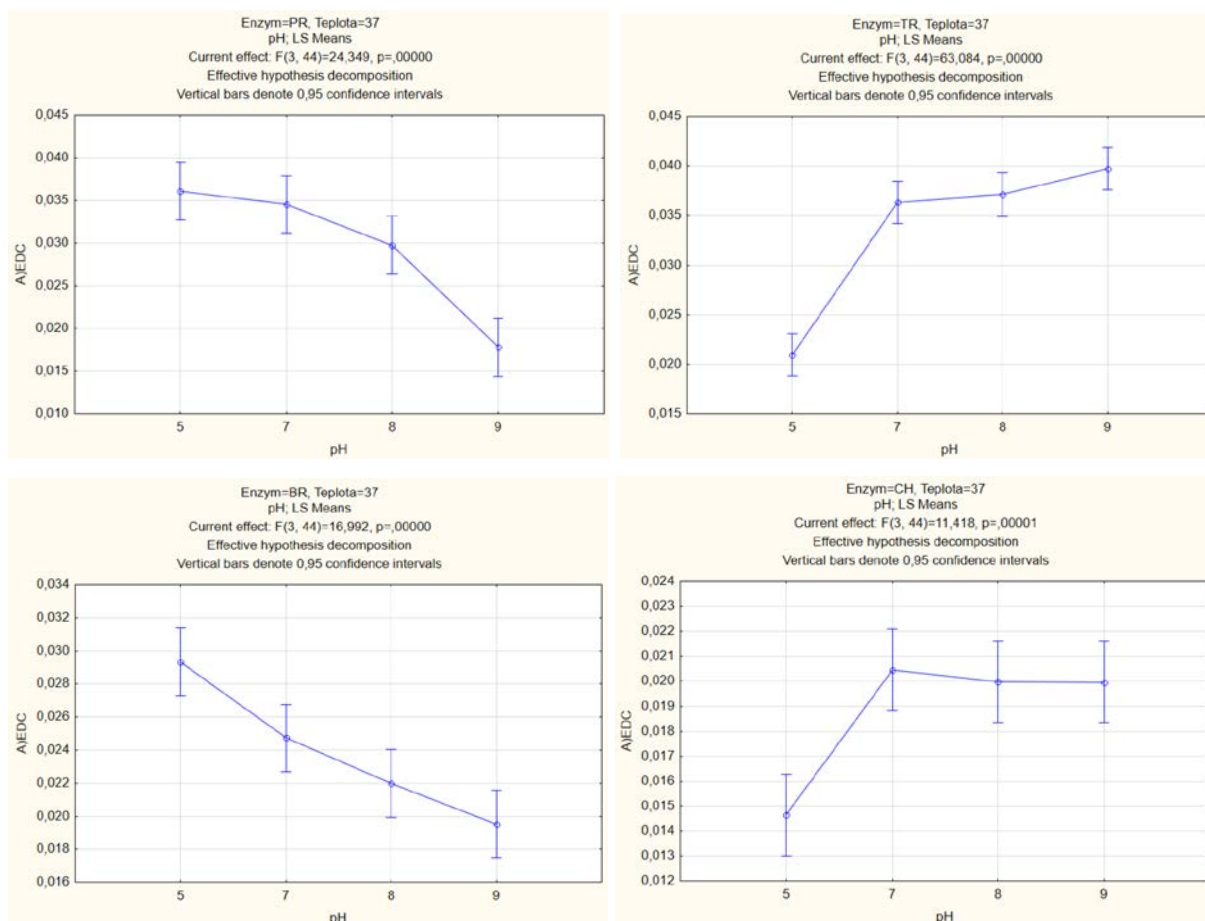
Obrázek 37: Graf vícerozměrné statistiky proteolytické aktivity trypsinu v závislosti na hodnotě pH a metodě funkcionizace nanovláken, vertikální sloupce označují 0,95 intervaly spolehlivosti. Osa y znázorňuje proteolytickou aktivitu enzymů v jednotkách Units/mg nanovláken.



Obrázek 38: Graf vícerozměrné statistiky proteolytické aktivity proteázy v závislosti na hodnotě pH a metodě funkcionalizace nanovláken, vertikální sloupce označují 0,95 intervaly spolehlivosti. Osa y znázorňuje proteolytickou aktivitu enzymů v jednotkách Units/mg nanovláken.

4.1.2 Vliv hodnoty pH na proteolytickou aktivitu enzymů

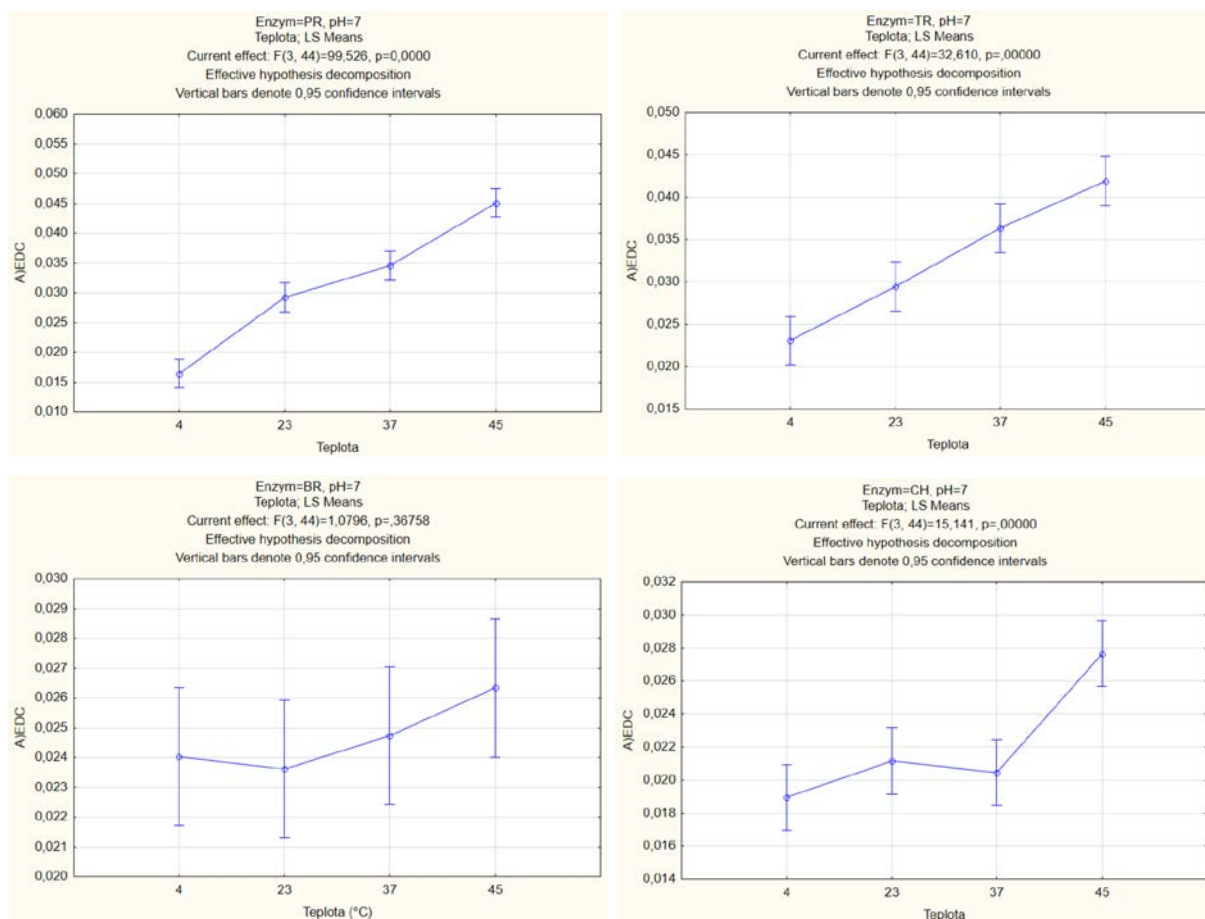
Na Obrázku 37 je možné vidět pH závislost jednotlivých enzymů pro metodu úpravy nanovláken A-EDC. V měřeném rozsahu pH hodnot se aktivita proteázy a bromelianu se zvyšujícím pH snižuje a u trypsinu a chymotrypsinu naopak zvyšuje. Pokud bychom porovnali výsledky z těchto grafů s uváděnými pH optimy z Tabulky 9, neshoduje se uvedené a naměřené optimum pouze u bromelainu (nejvyšší aktivita byla naměřena při hodnotě pH = 5, ale v tabulce je uvedeno 6,5-7,5). Toto může nastat právě důsledkem imobilizace enzymu na substrát, kdy se mírně změní konformační struktura enzymu a zvýší se jeho stabilita. Proto se vždy doporučuje, proměřit tyto závislosti znovu po imobilizaci. Pokud srovnáme proteolytickou aktivitu enzymů v jednotkách Units/mg nanovláken (osa y na Obrázku 39), tak nejvyšší aktivita byla v rozmezí pH = 7–9 měřena u trypsinu, mírně nižší u proteázy (zde se o všem při pH = 9 aktivita již výrazně snižuje), ještě nižší u bromelianu a nejnižší u chymotrypsinu. Pro použití při léčbě popálenin samozřejmě vyžadujeme enzym, který vykazuje nejvyšší aktivitu v uvedeném intervalu pH a zároveň jeho aktivita je nejméně na této hodnotě závislá. Podle uvedených výsledků toto splňuje trypsin.



Obrázek 39: Grafy závislosti proteolytické aktivity (vždy osa y) imobilizovaných enzymů metodou A-EDC na hodnotě pH – proteáza vlevo nahoře, trypsin vpravo nahoře, bromelain vlevo dole, chymotrypsin vpravo dole. Osa y vždy znázorňuje proteolytickou aktivitu enzymů v jednotkách Units/mg nanovláken.

4.1.3 Vliv teploty na proteolytickou aktivitu enzymů

Podobně byla proměřena i závislost aktivity na teplotě. Výsledné grafy jsou uvedeny na Obrázku 40. Všechny měřené enzymy mají nejvyšší aktivitu ze zvolených teplot při $t = 45$ °C. Je to dáno zejména tím, že kromě trypsinu (kde je uvedené pH optimum již při $t = 40$ °C, viz. Tabulka 9) je u všech enzymů teplotní optimum ještě vyšší než je nejvyšší měřená teplota v této disertaci. Vyšší teplota než 45 °C nebyla ale testována z toho důvodu, že by nebylo možné na popálenině kůže vyšší teplotu aplikovat. Rozdíl v aktivitě mezi 4 a 45 °C byl u proteázy 0,029 Units/mg nanovláken, u trypsinu 0,019 Units/mg nanovláken, u bromelianu 0,002 Units/mg nanovláken a u chymotrypsinu 0,006 Units/mg nanovláken. Nejvíce tedy závisí aktivita na teplotě v případě proteázy a trypsinu, je to ovšem dáno zejména tím, že u těchto dvou enzymů je aktivita při vyšších teplotách výrazně vyšší než u bromelainu a chymotrypsinu.



Obrázek 40: Grafy závislosti proteolytické aktivity (vždy osa y) imobilizovaných enzymů metodou A (EDC) na teplotě – proteáza vlevo nahoře, trypsin vpravo nahoře, bromelain vlevo dole, chymotrypsin vpravo dole. Osa y vždy znázorňuje proteolytickou aktivitu enzymů v jednotkách Units/mg nanovláken.

4.2 Vliv metody imobilizace enzymů na cytotoxicitu

Dílčí výsledky testů cytotoxicity buněk již byly uvedeny na Obrázku 27 v kap. 3.5.2. Hlavním výsledkem testu byla 10ti násobně vyšší cytotoxicita materiálu v případě standardních křemičitých nanovláken stabilizovaných na teplotu 260 °C sterilizovaných ethylenoxidem proti stejnému vzorku sterilizovanému v autoklávu. Po těchto testech byl hledán jiný způsob sterilizace. Ač se sterilizace ethylenoxidem používá ve zdravotnictví (viz. Norma ČSN EN ISO 10993-7 Biologické hodnocení zdravotnických prostředků: Rezidua při sterilizaci ethylenoxidem), na nanovlákná s enzymy má negativní vliv i po 14ti denním odvětrání. Zpomalení proliferace fibroblastů na elektrostaticky zvlákněných biodegradabilních polyesterech sterilizovaných ethylenoxidem proti sterilizovaným stejným vzorkům ethanolem, uvádí i další publikace (Horakova et al. 2018).

V rámci dalšího testu cytotoxicity provedeného výluhem po dobu 24 hodin v mediu DMEM a měřeného metodou cck-8, byl mimo jiné testován i vliv sterilizace ethanolem a propylenglykolem. Použity byl 3T3 myší fibroblasty (pasáž 21, nasazeno $1 \cdot 10^4$ buněk / 96well). Složení média bylo následující: DMEM High Glucose, 10% FBS, 1% ATB, 1% L-glutamin. Nasazena byla i pozitivní a negativní kontrola, ze kterých byla vypočítána 100% míra viability buněk. Hodnoty byly průměrovány z 10 vzorků od každého. Kolorimetrický test byl proveden po 24 hodinách kultivace výluhu s buňkami. Výsledky tohoto testu jsou uvedeny v grafu vlevo na Obrázku 41. Sterilizace standardních křemičitých nanovláken probíhala buď v 70% ethanolu (vzorek STA_1), nebo pomocí 52% propylenglykolu (vzorek STA_2). Sterilizace vzorků s imobilizovanými enzymy probíhala kombinací ethanolu a filtrace kapalin (viz níže). Z grafu vlevo je opět patrné, že vzorky (kromě standardu sterilizovaného ethanolem byly cytotoxické). Nové vzorky ze stejné série byly tedy ještě v biohazard boxu opláchnuty 2x na 2 hodiny ve fosfátovém pufru (PBS) a byly provedeny stejné testy (Obrázek 41, graf vpravo). Viabilita buněk se u všech vzorků zvýšila. Jako netoxické materiály byly pro buňky 3T3 poté označeny vzorky B_BR (metoda B-DSC s bromelainem), C_BR (metoda C-GLU s bromelainem) a STA_1 (standard nanovláken sterilizovaný ethanolem), přičemž pro vzorek C_BR bylo toto rozhodnutí označeno za sporné vzhledem k směrodatné odchylce. V tomto testování byl použit i vzorek označený jako D_BR. Jednalo se o metodu D – vzorek nanovláken upravený pouze DSC bez předchozí silanizace a karboxylace (viz. Kap. 3.2.2 a Tabulka 8). Tento vzorek byl ale označen jako cytotoxický před oplachem i po oplachu a nebyl tedy dále v disertaci používán. Sterilizace propylenglykolem byla také označena za nevhodnou a sterilizace vzorků probíhala již vždy následujícím způsobem.

Sterilizace u metody A-EDC

Nanovlákná byla zvlákněna, tepelně stabilizována, poté silanizována pomocí APTES a karboxylována pomocí SU. Po tomto kroku byla nanovlákná sterilizována vždy 10 min. postupně 100%, 70% a 50% ethanolem ředěným deionizovanou vodou. Nanovlákná byla předána do sterilního biohazard boxu a všechny další chemikálie (EDC, NHS, pufr, enzymy v pufru) byly filtrovány pomocí filtrů s průměrem pórů 0,22 μm .

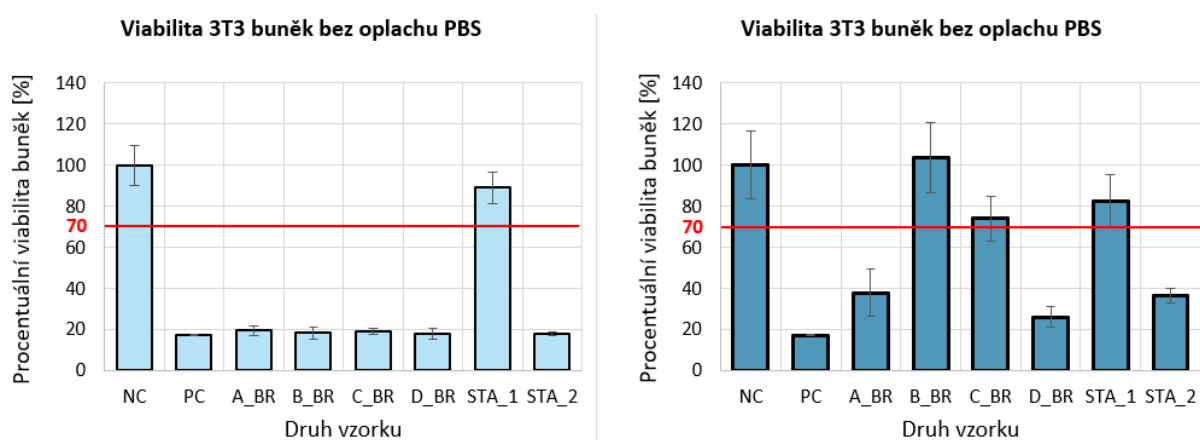
Sterilizace u metody B-DSC

Nanovlákná byla zvlákněna, tepelně stabilizována, poté silanizována pomocí APTES a karboxylována pomocí SU a funkcionalizována pomocí DSC. Po tomto kroku byla nanovlákná sterilizována vždy 10 min. postupně 100%, 70% a 50% ethanolem ředěným deionizovanou vodou. Nanovlákná byla předána do sterilního biohazard boxu a všechny další

chemikálie (pufr s enzymy i bez enzymů) byly filtrovány pomocí filtrů s průměrem pórů 0,22 μm .

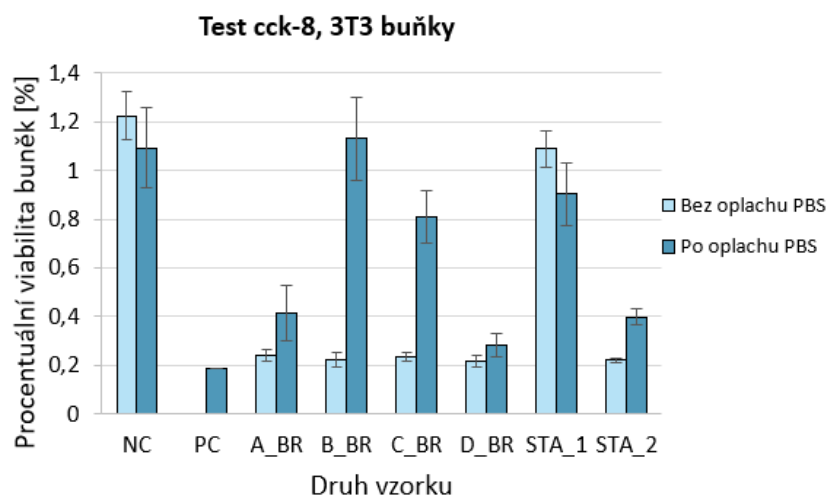
Sterilizace u metody C-DSC

Nanovláknina byla zvlákněna, tepelně stabilizována, poté silanizována pomocí APTES. Po tomto kroku byla nanovláknina sterilizována vždy 10 min. postupně 100%, 70% a 50% ethanolem ředěným deionizovanou vodou. Nanovláknina byla předána do sterilního biohazard boxu a všechny další chemikálie (GLU, pufr s enzymy i bez enzymů) byly filtrovány pomocí filtrů s průměrem pórů 0,22 μm .



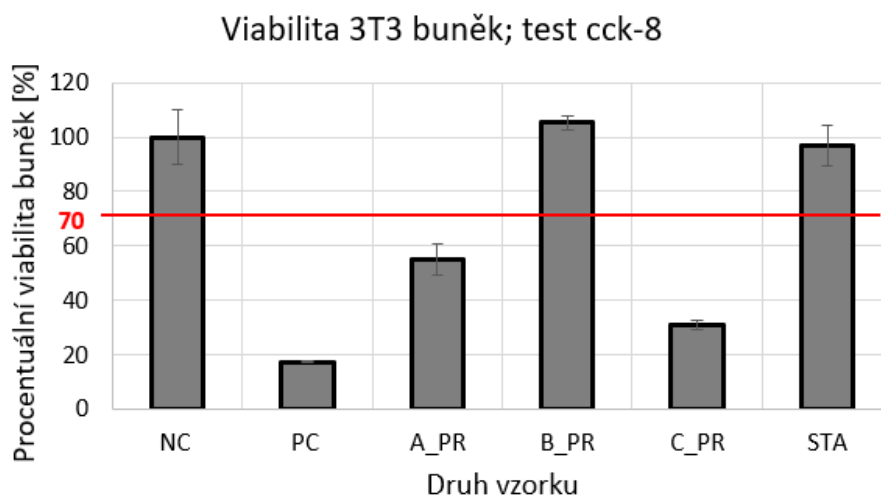
Obrázek 41: Procentuální viabilita 3T3 buněk, test cck-8: negativní kontrola (NC), pozitivní kontrola (PC), metoda A-EDC s bromelainem (A_BR), metoda B-DSC s bromelainem (B_BR), metoda C-GLU s bromelainem (C_BR) metoda D s bromelinem (D_BR), standard sterilizovaný ethanolem (STA_1), standard sterilizovaný propylenglykolem (STA_2).

Porovnání změny viability buněk před oplachem fosfátovým pufrém a po oplachu bylo ještě zpracováno do grafu na Obrázku 42.



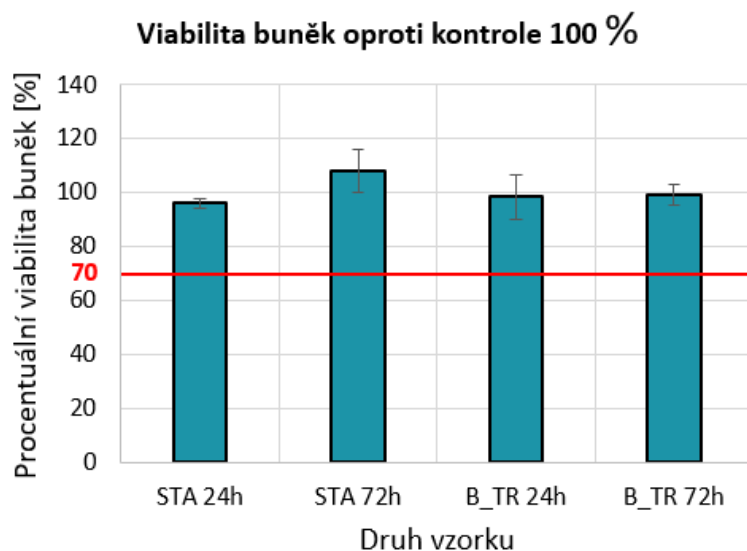
Obrázek 42: Porovnání viability 3T3 buněk před oplachem a po oplachu PBS: negativní kontrola (NC), pozitivní kontrola (PC), metoda A-EDC s bromelainem (A_BR), metoda B-DSC s bromelianem (B_BR), metoda C-GLU s bromelianem (C_BR) metoda D s bromelinem (D_BR), standard sterilizovaný ethanolem (STA_1), standard sterilizovaný propylenglykolem (STA_2).

V dalším kroku byla měřena proteolytická aktivita imobilizovaných enzymů před oplachem a po oplachu PBS. Protože se proteolytická aktivita na hladině významnosti 5 % statisticky významně nesnížila, byly provedeny další testy cytotoxicity s vybranými materiály po oplachu v PBS (Obrázek 43). Protože při testech stability materiálu se ukázal bromelain jako nejméně stabilní enzym z testovaných (více v kap. 4.3.) a při testech proteolytické aktivity vykazoval nižší aktivitu než proteáza a trypsin, byly další testy provedeny s proteázou. Použita byla opět metoda cck-8 a 3T3 myši fibroblasty (pasáž 14, nasazeno $1 \cdot 10^4$ buněk / 96well). Složení média bylo následující: DMEM High Glucose, 10% FBS, 1% ATB, 1% L-glutamin. Nasazena byla i pozitivní a negativní kontrola, ze kterých byla vypočítána 100% míra viability buněk. Hodnoty byly průměrovány z 10 vzorků od každého. Vzorky byly 2x opláchnuty v PBS po dobu 2 hodin, poté byly vytvořeny výluhy v DMEM po dobu 24 hodin. Kolorimetrický test byl proveden po dalších 24 hodinách kultivace výluhu s buňkami. Z testovaných vzorků byl opět vyhodnocen jako netoxický vzorek upravený metodou B-DSC s proteázou. Mírně toxický byl vzorek s úpravou metodou A-EDC a více s metodou C-GLU.



Obrázek 43: Procentuální viabilita 3T3 buněk, test cck-8: negativní kontrola (NC), pozitivní kontrola (PC), metoda A-EDC s proteázou (A_BR), metoda B-DSC s proteázou (B_BR), metoda C-GLU s proteázou (C_BR), standard sterilizovaný ethanolem (STA).

Pro potvrzení výsledků byla ještě testována viabilita 3T3 buněk výluhem metodou AlamarBlue pro metodu úpravy nanovláken B-EDC s trypsinem. Standard byl sterilizován ethanolem, vzorek s trypsinem dvoustupňovou sterilizací ethanolem a filtrací kapalin. Vzorky byly provedeny v tripletu, opět promyty v PBS a následně byl proveden výluh buď 24 hodin nebo 72 hodin. Výsledky oproti kontrole (100 %) jsou uvedeny na Obrázku 44. Testovaný standard nanovláken i vzorku se prokázaly jako netoxické pro 3T3 buňky.



Obrázek 44: Procentuální viabilita 3T3 buněk, test AlamarBlue: výluh 24 hodin standardu nanovláken (STA 24h), výluh 72 hodin standardu nanovláken (STA 72h), výluh 24 hodin nanovláken upravených metodou B-DSC s trypsinem (B_TR 24h), výluh 72 hodin nanovláken upravených metodou B-DSC s trypsinem (B_TR 72h).

Celkově testy cytotoxicity prokázaly jako nevhodnou metodu sterilizace buď pomocí propylenglykolu, nebo ethylenoxidu. Vhodná je pouze sterilizace kombinovaná ethanol–filtrací kapalin. Z metod úpravy povrchu nanovláken se netoxická prokázala metoda B-DSC. Použitý proteolytický enzym neměl vliv na cytotoxicitu buněk.

4.3 Vliv podmínek skladování na stabilitu imobilizovaných enzymů

Nakonec byly provedeny testy stability materiálů – zajímalo nás zejména zachování proteolytické aktivity enzymů. Vzorky byly uchovávány buď v mrazáku ($t = -20\text{ }^{\circ}\text{C}$), v lednici ($t = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$), nebo v laboratorní skřínce ($t = 21\text{ }^{\circ}\text{C}$). Po 90 dnech a po 180 dnech byla změřena aktivita imobilizovaných enzymů podle Lowryho metody (viz. kap. 3.4). Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 18 (pro metodu A-EDC) a v Tabulce 19 (pro metodu B-DSC). Průměrovány byly ze 3 vzorků. Jako 100% proteolytická aktivita byla vždy zvolena hodnota naměřená ihned po výrobě nanovláken s imobilizovaným enzymem. Na strukturu a manipulovatelnost nanovláken neměla teplota skladování vzorků žádný vliv.

Tabulka 18: Reziduální proteolytická aktivita enzymů po 90 a 180 dnech skladování v závislosti na teplotě skladování, metoda úpravy nanovláken A-EDC.

Metoda A-EDC		Proteolytická aktivita po 90 dnech			Proteolytická aktivita po 180 dnech		
		Teplota skladování [$^{\circ}\text{C}$]			Teplota skladování [$^{\circ}\text{C}$]		
Enzym		-20	4	21	-20	4	21
	PR	94 %	97 %	70 %	81 %	85 %	68 %
	BR	64 %	65 %	61 %	31 %	19 %	27 %
	TR	122 %	96 %	103 %	85 %	63 %	71 %

Tabulka 19: Reziduální proteolytická aktivita enzymů po 90 a 180 dnech skladování v závislosti na teplotě skladování, metoda úpravy nanovláken B-DSC.

Metoda B-DSC		Proteolytická aktivita po 90 dnech			Proteolytická aktivita po 180 dnech		
		Teplota skladování [$^{\circ}\text{C}$]			Teplota skladování [$^{\circ}\text{C}$]		
Enzym		-20	4	21	-20	4	21
	PR	90 %	95 %	62 %	82 %	73 %	62 %
	BR	50 %	70 %	55 %	20 %	25 %	27 %
	TR	98 %	100 %	94 %	92 %	93 %	79 %

Celkově byly výsledky testů stability vzhledem k hlavnímu úkolu disertační práce velmi příznivé. Kovalentně navázané enzymy si udržely svoji aktivitu i po 180 dnech. Pro uchování aktivity enzymů se neosvědčila laboratorní teplota, protože v tomto případě byla aktivita

enzymů nejnižší, jak po 90 i 180 dnech. Z hlediska metody imobilizace nebyl mezi vzorky rozdíl. Metoda imobilizace tedy nemá vliv na zbytkovou aktivitu enzymů. Prokázáno bylo, že bromelain má nejnižší zbytkovou aktivitu – byl tedy označen za nestabilní. Pro proteázu a trypsin byla reziduální aktivita vyšší při použití teploty skladování -20 °C. Pokud si budeme všímat výsledků nejlepší metody úpravy – metoda B-DSC a nejlepšího enzymu – trypsin, reziduální proteolytická aktivita enzymu byla po 90 dnech 98 % a po 180 dnech stále 92 %. Tímto byl úkol disertační práce splněn.

5 Doporučení na pokračování ve výzkumu

Rozhodně bych velmi nerada ukončila výzkum v této oblasti v den odevzdání disertační práce. Myslím si, že téma je dobře rozvedeno a má smysl v něm pokračovat. Ať bych pokračovala já, nebo někdo jiný. V závěru práce se vytríbily hlavní směry, kterými by bylo dobré se zabývat. Optimalizován byl přesný postup úpravy povrchu nanovláken a vhodný enzym. Proto bych se spíše zaměřila na testování cytotoxicity in vitro na lidských keratinocytech výluhem i kontaktem a dále na testování in vivo. Níže je uvedeno, z jakého důvodu nebyla práce zaměřena více na testování kinetiky imobilizovaných enzymů. Tyto druhy testování bych tedy do budoucího plánu také navrhla. Z laboratorních testů lze ještě provést v rámci testů na prasečí kůži porovnání aplikace nanovláken s enzymy a komerčně dostupných mastí a hydrogelů s obsahem proteolytických enzymů. Určitě má smysl se více zaměřit i na překvapivé výsledky související s ozářením pomocí UV-A (zvýšení proteolytické aktivity enzymů, antibakteriální aktivita atd.) Před uvedením vzorků do praxe je jistě nezbytný také krok chemické analýzy – jaké prvky a sloučeniny, v jaké koncentraci a za jakých podmínek by se z nanovláken s enzymy při aplikaci na nekrózu uvolňovaly.

6 Diskuze a závěr

Dovolila jsem si diskuzi a závěr spojit, protože si myslím, že spolu tyto dvě části práce souvisí. Začala bych shrnutím výsledků práce. Byla provedena rozsáhlá řešerše tématu, optimalizována metoda úpravy nanovláken, která není cytotoxická pro fibroblasty (metoda B s využitím N,N'-Disuccinimidyl karbonátu), byl vybrán nejvhodnější proteolytický enzym – trypsin z hovězího pankreatu. Byla optimalizována metoda sterilizace vzorků (kombinovaná metoda ethanol–filtrace kapalin). Účinnost vytvořených materiálů byla ověřena in vitro testy na prasečí kůži a testy stability materiálů až po dobu 180 dnů.

Hlavní myšlenka disertační práce – navázat na úspěšnou metodu výroby křemičitých nanovláken a využít je k imobilizaci proteolytických enzymů, je výborný, i když opravdu těžký úkol. Stejně jako v jiných inovativních odvětvích výzkumu, je zde prostor pro úplně nový směr, vlastní myšlenky, ale zároveň narazíte na problém, že byste po modelových testech museli provést ještě nepřeberné množství opakovaných testů, abyste tento fakt ověřili a dostatečně prokázali, protože odborná literatura na toto téma neexistuje. Zde mluvím například o vlivu UV-A záření na sterilizaci vzorků a aktivitu enzymů.

Zejména v prvních letech práce existovalo velmi málo studií s imobilizací enzymů na nanovlákná – u imobilizovaných enzymů se ale určovala jejich aktivita jinak než u volných enzymů v roztoku. Připočítáme-li k tomu nepřeberné množství substrátů (v našem případě kasein), které se využívají ke stanovení proteolytické aktivity enzymů, dostaneme několik prací, kde je aktivita enzymu vždy vyjádřena v jiných jednotkách – metody jsou mezi sebou tedy neporovnatelné.

Samozřejmě jsem si vědoma nedostatků – zejména velké rozsáhlosti práce na úkor počtu opakování testů a často nedostatečného vysvětlení chemických procesů v každém kroku praktické části. Při sestavování osnovy práce jsme s paní docentkou samozřejmě ale nepředpokládaly, že se práce takto rozvětví – jmenovala bych například problém se sterilizací vzorků, kterému nakonec bylo věnováno několik měsíců, nebo problém s optimalizací metody měření proteolytické aktivity. Opravdu hodně těchto metod je optimalizováno na volné enzymy, poté existují substráty pouze pro jeden druh proteolytického enzymu, my ovšem potřebovaly porovnat aktivitu co nejširší skupiny proteolytických enzymů. Toto je také vysvětlení, proč se práce více nevěnovala kinetice enzymů. Zde by byl jistě prostor pro rozsáhlejší testování. Z hlediska vysvětlení všech

chemických procesů si myslím, že jsem se studiu tohoto tématu jako student oboru Materiálové inženýrství a textilní technika věnovala maximálním možným způsobem. Jinak by z tohoto hlediska jistě vypadala disertační práce organického chemika.

Pokud se zaměřím na nedostatky práce, jsem si vědoma ještě jedné věci – občasného poangličtění názvů. V několika případech ani čeští odborníci nepoužívají české názvy, nebo jen velmi zřídka a orientují se pouze v názvech anglických. Tento problém jsem většinou řešila dodržováním jednoho způsobu popisu, popř. jsem se řídila jednou literaturou, anebo jsem vyhledala, jaký název se používá nejčastěji.

Při hledání vhodné metody imobilizace enzymů mi byla nápomocna kniha *Bioconjugate Techniques* (Hermanson 2008). V knize s 1230 stranami jsem ovšem neobjevila chemikálii, kterou by bylo možné použít na náš případ imobilizace enzymů a v jejím bezpečnostním listu bych se dočetla, že je naprosto bezpečná. Tohoto faktu jsem si tedy vědoma a proto jsem se také věnovala opakovaným testům cytotoxicity, které měly jasně podle normy označit vzorky cytotoxické a netoxické. Z hlediska bezpečnosti při použití chemikálií samozřejmě také závisí na koncentraci látky (v našem případě jsou koncentrace velmi nízké) a na době kontaktu nanovláken s popáleninou. *In vitro* testy na prasečí kůži potvrdily, že není nutné aplikovat nanovlákná s enzymy delší dobu než 24 hodin. Podle rozsahu a stupně nekrózy by se spíše tato doba zkracovala. Biokompatibilita samotných křemičitých nanovláken zde také již řešena nebyla, protože byla již předmětem studií paní docentky Lovětinské-Šlamborové a pana docenta Exnara. Opět ale nepředpokládáme, že by nanovlákná byla na ráně déle jak 24 hodin. Pokud by nekróza nebyla za tuto dobu odstraněna v celém svém rozsahu, byl by po 24 hodinách vzorek nanovláken nahrazen novým.

Při testech cytotoxicity jsem se v tkáňových laboratořích často také setkávala s otázkou, proč využívám k odstranění nekrózy trypsin a očekávám, že se na vzorku bude dobře dařit buňkám (bude zde probíhat jejich růst a proliferace). V tkáňových laboratořích se totiž tento enzym používá pro oddělení buněk od dna kultivačních lahvíček. Pokud by někomu opravdu vadilo použití trypsinu ve spojitosti s označením – vyhovující materiál pro bezbolestné odstranění nekrózy – můžeme tedy použít proteázu, která dosahovala neméně dobrých výsledků. Šlo by ovšem pouze o slovíčkaření, protože enzymy mají stejný proteolytický účinek. V našem případě je samozřejmě trypsin používán v menší koncentraci. V principu má ale stejný úkol jako při práci s tkáněmi – rozdělit proteinovou vazbu mezi nekrotickou a zdravou tkání (jako v tkáňové laboratoři rozdělit proteinovou vazbu mezi buňkami a kultivační lahvíčkou).

Naším úkolem bylo vymyslet, jak bezbolestně oddělíme zdravou a nekrotickou tkáň, nanovláknina by se tedy používala v první fázi hojení rány, v této fázi ale nepředpokládáme růst nových zdravých buněk, čemuž by trypsin bránil.

Upozornila bych ještě na jeden problém, který jsem při výběru tématu disertační práce neviděla a díky kterému, bych si toto téma znovu zřejmě nevybrala. Jedná se o finanční náročnost metody. Enzymy a chemikálie potřebné k práci byly mnohdy několikanásobně dražší než finanční potřeby mých kolegů – studentů doktorského studia. Díky této skutečnosti se dokončení disertace velmi prodloužilo. Již jsem v práci uvedla jeden z mnoha příkladů – enzym kolagenáza se z rešerše jevil, jako velmi vhodný pro mé účely, z důvodu financí by bylo ale možné ho pořídit až ve čtvrtém roku doktorského studia. Opět by se tedy musely opakovat všechny testy.

Po přiznání všech nedostatků práce, kterých jsem si vědoma a zopakování dosažených výsledků si na jednu stranu uvědomuji, že některé nedostatky práce jsou sice výrazné, ale na druhou jsem si připomněla, co všechno bylo dokázáno. Bylo provedeno opravdu rozsáhlé, komplexní měření, které díky časové náročnosti výroby nanovláken, jejich úpravy a testování, zabralo tolik času, jako mnohdy více jiných disertačních prací dohromady. A o to s větší radostí nyní disertační práci předkládám a doufám v pokračování výzkumu. Nejsem rozhodně zastáncem moderního způsobu výzkumu – s minimálním množstvím analýz a výsledků in vitro přejít k testování in vivo na zvířatech, nyní si ovšem myslím, že po testech in vitro na lidských kožních buňkách je tato práce připravena se posunout právě do tohoto bodu.

Seznam bibliografických citací

AL-ARABI, Yassir B., Maher NADER, Michael NADER, Ali Reza HAMIDIAN-JAHROMI a D. A. WOODS, 2007. The effect of the timing of antibiotics and surgical treatment on infection rates in open long-bone fractures: a 9-year prospective study from a district general hospital. *Injury* [online]. **38**(8), 900–905. ISSN 0020-1383. Dostupné z: doi:10.1016/j.injury.2007.02.043

AL-KHATEEB, T. H. a Y. NUSAIR, 2008. Effect of the proteolytic enzyme serrapeptase on swelling, pain and trismus after surgical extraction of mandibular third molars. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* [online]. **37**(3), 264–268. ISSN 0901-5027. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijom.2007.11.011

ALLEN FOEGEDING, E. a D.K. LARICK, 1986. Tenderization of beef with bacterial collagenase. *Meat Science* [online]. **18**(3), 201–214. ISSN 03091740. Dostupné z: doi:10.1016/0309-1740(86)90034-3

BAHR, S., N. MUSTAFI, P. HÄTTIG, A. PIATKOWSKI, G. MOSTI, K. REIMANN, M. ABEL, V. DINI, J. RESTELLI, Z. BABADAGI-HARDT, F. ABBRITTI, T. EBERLEIN, T. WILD a K. BANDL, 2011. Clinical efficacy of a new monofilament fibre-containing wound debridement product. *Journal of Wound Care* [online]. **20**(5), 242–248. ISSN 0969-0700. Dostupné z: doi:10.12968/jowc.2011.20.5.242

BAYAT, Samaneh, Nafise AMIRI, Elham PISHAVAR, Fatemeh KALALINIA, Jebrail MOVAFFAGH a Maryam HASHEMI, 2019. Bromelain-loaded chitosan nanofibers prepared by electrospinning method for burn wound healing in animal models. *Life Sciences* [online]. **229**, 57–66. ISSN 00243205. Dostupné z: doi:10.1016/j.lfs.2019.05.028

BEAUCHAMP, R.O., Jr. CLAIR M.B. St., T.R. FENNELL, D.O. CLARKE, K.T. MORGAN a F.W. KARI, 1992. A Critical Review of the Toxicology of Glutaraldehyde. *Crit. Rev. Toxicol.* **22**(3–4), 143–174.

BEAVEN, G. H., E. R. HOLIDAY a E. M. JOPE, 1950. The ultra-violet absorption spectra of the aromatic amino acids in proteins and related compounds. *Discussions of the Faraday Society* [online]. **9**, 406. ISSN 0366-9033. Dostupné z: doi:10.1039/df9500900406

BOUZA, C., A. MUNOZ a J.M. AMATE, 2005. Efficacy of modern dressings in the treatment of leg ulcers: a systematic review. *Wound Repair and Regeneration*. **13**(3), 218–229.

BOWLER, P. G., S. A. JONES, B. J. DAVIES a E. COYLE, 1999. Infection control properties of some wound dressings. *Journal of Wound Care* [online]. **8**(10), 499–502. ISSN 0969-0700. Dostupné z: doi:10.12968/jowc.1999.8.10.26356

BRADFORD, Marion M, 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. **72**, 248–254.

BRIGIDO, Stephen A., 2006. The use of an acellular dermal regenerative tissue matrix in the treatment of lower extremity wounds: a prospective 16-week pilot study. *International Wound*

Journal [online]. **3**(3), 181–187. ISSN 1742-4801. Dostupné z: doi:10.1111/j.1742-481X.2006.00209.x

BROWN, L. L., H. T. SHELTON, G. H. BORNSIDE a I. COHN, 1978. Evaluation of wound irrigation by pulsatile jet and conventional methods. *Annals of Surgery* [online]. **187**(2), 170–173. ISSN 0003-4932. Dostupné z: doi:10.1097/00000658-197802000-00013

BUCK, F. F., A. J. VITHAYATHIL, M. BIER a F. F. NORD, 1962. On the mechanism of enzyme action. 73. Studies on trypsins from beef, sheep and pig pancreas. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. **97**, 417–424. ISSN 0003-9861. Dostupné z: doi:10.1016/0003-9861(62)90099-1

BUGG, Tim, 2004. *Introduction to enzyme and coenzyme chemistry*. 2nd ed. Oxford, UK ; Malden, MA, USA: Blackwell Pub. ISBN 978-1-4051-1452-3.

CARDINAL, Matthew, David E. EISENBUD, David G. ARMSTRONG, Charles ZELIN, Vickie DRIVER, Christopher ATTINGER, Tania PHILLIPS a Keith HARDING, 2009. Serial surgical debridement: a retrospective study on clinical outcomes in chronic lower extremity wounds. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* [online]. **17**(3), 306–311. ISSN 1524-475X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1524-475X.2009.00485.x

CARUSO, Daniel M., Kevin N. FOSTER, Sigri A. BLOME-EBERWEIN, John A. TWOMEY, David N. HERNDON, Arnold LUTERMAN, Paul SILVERSTEIN, Jeffrey R. ANTIMARINO a Gregory J. BAUER, 2006. Randomized clinical study of Hydrofiber dressing with silver or silver sulfadiazine in the management of partial-thickness burns. *Journal of Burn Care & Research: Official Publication of the American Burn Association* [online]. **27**(3), 298–309. ISSN 1559-047X. Dostupné z: doi:10.1097/01.BCR.0000216741.21433.66

COTTAM, Emily, David W. L. HUKINS, Kenneth LEE, Christopher HEWITT a Mike J. JENKINS, 2009. Effect of sterilisation by gamma irradiation on the ability of polycaprolactone (PCL) to act as a scaffold material. *Medical Engineering & Physics* [online]. **31**(2), 221–226. ISSN 1350-4533. Dostupné z: doi:10.1016/j.medengphy.2008.07.005

CUATRECASAS, Pedro a Indu PARIKH, 1972. Adsorbents for affinity chromatography. Use of N-hydroxysuccinimide esters of agarose. *Biochemistry* [online]. **11**(12), 2291–2299. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi00762a013

ČIHÁK, Radomír, Miloš GRIM, Rastislav DRUGA, Milan MED a Ivan HELEKAL, 2001. *Anatomie*. Praha: Grada. ISBN 978-80-7169-970-5.

DAESCHLEIN, Georg, Wolfgang LEHNERT, Andreas ARNOLD, Hermann HAASE a Michael JÜNGER, 2010. Hygienic safety of a new hydrodynamic wound debridement system. *Dermatologic Surgery: Official Publication for American Society for Dermatologic Surgery [et Al.]* [online]. **36**(9), 1426–1438. ISSN 1524-4725. Dostupné z: doi:10.1111/j.1524-4725.2010.01653.x

DAI, Zheng, Jennifer RONHOLM, Yiping TIAN, Benu SETHI a Xudong CAO, 2016. Sterilization techniques for biodegradable scaffolds in tissue engineering applications. *Journal of Tissue Engineering* [online]. **7**, 204173141664881. ISSN 2041-7314, 2041-7314. Dostupné z: doi:10.1177/2041731416648810

DANDAVATE, Vrushali, Hareshkumar KEHARIA a Datta MADAMWAR, 2009. Ethyl isovalerate synthesis using *Candida rugosa* lipase immobilized on silica nanoparticles prepared in nonionic reverse micelles. *Process Biochemistry* [online]. **44**(3), 349–352. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2008.11.001

DANILOVA, Iveta a Irena LOVĚTINSKÁ-ŠLAMBOŘOVÁ, 2016. Immobilization of enzymes on the silica nanofibers for burns treatment, NANOCON 2016 - Conference Proceedings, 8th International Conference on Nanomaterials - Research and Application, Ostrava, TANGER Ltd., ISBN: 9788087294710, s. 509–513, 5 pages, 2016.

DANILOVA, Iveta, Irena LOVĚTINSKÁ-ŠLAMBOŘOVÁ, Veronika ZAJÍCOVA, Lukáš VOLESKÝ a Miroslava RYSOVÁ, 2014. Immobilization of Esterase Enzyme onto Silica Nanofibers for Biomedical Applications. *TEXTILE TECHNOLOGIES*. **21**(2), 3–11.

DE CASTRO, Ruann Janser Soares a Helia Harumi SATO, 2014. Protease from *Aspergillus oryzae*: Biochemical Characterization and Application as a Potential Biocatalyst for Production of Protein Hydrolysates with Antioxidant Activities. *Journal of Food Processing* [online]. **2014**, 1–11. ISSN 2356-7384, 2314-839X. Dostupné z: doi:10.1155/2014/372352

DISSEMOND, J., 2006. Modern wound dressings for the therapy of chronic wounds. *Der Hautarzt; Zeitschrift Fur Dermatologie, Venerologie, Und Verwandte Gebiete* [online]. **57**(10), 881–887. ISSN 0017-8470. Dostupné z: doi:10.1007/s00105-005-1054-y

DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC., 2016. *CK04: Cell Counting Kit-8* [online]. 2016. B.m.: Dojindo, USA. [vid. 2020-04-16]. Dostupné z: https://www.dojindo.com/TechnicalManual/Manual_CK04.pdf

DRUGINFO, 2007. FIBRINOLYSIN W/DNASE - TOPICAL OINTMENT: Drug Info. *DrugInfo* [online] [vid. 2019-12-28]. Dostupné z: <http://www.druginfo.info/categories/1817-FIBRINOLYSIN-W-DNASE-TOPICAL-OINTMENT>

DRYBURGH, Nancy, Fiona SMITH, Jayne DONALDSON a Melloney MITCHELL, 2008. Debridement for surgical wounds. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* [online]. (3), CD006214. ISSN 1469-493X. Dostupné z: doi:10.1002/14651858.CD006214.pub2

ENEROTH, Magnus a William H. VAN HOUTUM, 2008. The value of debridement and Vacuum-Assisted Closure (V.A.C.) Therapy in diabetic foot ulcers. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* [online]. **24 Suppl 1**, S76-80. ISSN 1520-7552. Dostupné z: doi:10.1002/dmrr.852

EPA, 1985. *U.S. Environmental Protection Agency. Health and Environmental Effects Profile for Epichlorohydrin*. [online]. 1985. B.m.: Environmental Criteria and Assessment Office, Office of Health and Environmental Assessment, Office of Research and Development, Cincinnati, OH. Dostupné z: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-09/documents/epichlorohydrin.pdf>

EVANS, P., 2002. Larvae therapy and venous leg ulcers: reducing the „yuk factor“. *Journal of Wound Care* [online]. **11**(10), 407–408. ISSN 0969-0700. Dostupné z: doi:10.12968/jowc.2002.11.10.26445

FALABELLA, Anna F., 2006. Debridement and wound bed preparation. *Dermatologic Therapy* [online]. **19**(6), 317–325. ISSN 1396-0296. Dostupné z: doi:10.1111/j.1529-8019.2006.00090.x

FISCHER, L. a F. PEISSKER, 1998. A covalent two-step immobilization technique using itaconic anhydride. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **49**(2), 129–135. ISSN 1432-0614. Dostupné z: doi:10.1007/s002530051148

FRAENKEL-CONRAT, H., 1957. [11] Methods for investigating the essential groups for enzyme activity. In: *Methods in Enzymology* [online]. B.m.: Academic Press, s. 247–269 [vid. 2020-01-11]. Dostupné z: doi:10.1016/0076-6879(57)04059-8

GAUNT, I. F., F. M. CARPANINI, P. GRASSO a A. B. LANSDOWN, 1972. Long-term toxicity of propylene glycol in rats. *Food and Cosmetics Toxicology* [online]. **10**(2), 151–162. ISSN 0015-6264. Dostupné z: doi:10.1016/s0015-6264(72)80193-7

GRAY, David, Claire ACTON, Sian FUMAROLA a Paul CHADWICK, 2011. Consensus guidance for the use of debridement techniques in the UK. *Wounds UK*. **7**(1), 8.

GUISAN, Jose M., ed., 2006. *Immobilization of enzymes and cells*. 2nd ed. Totowa, N.J: Humana Press. Methods in biotechnology, 22. ISBN 978-1-58829-290-2.

GUO, S. a L.A. DIPIETRO, 2010. Factors Affecting Wound Healing. *Journal of Dental Research* [online]. **89**(3), 219–229. ISSN 0022-0345. Dostupné z: doi:10.1177/0022034509359125

GUPTA, Asheesh, Pinar AVCI, Tianhong DAI, Ying-Ying HUANG a Michael R. HAMBLIN, 2013. Ultraviolet Radiation in Wound Care: Sterilization and Stimulation. *Advances in Wound Care* [online]. **2**(8), 422–437. ISSN 2162-1918, 2162-1934. Dostupné z: doi:10.1089/wound.2012.0366

HARTMANN, 2016. Debridement | Léčba rány. *Ošetření ran: Praktický portál pro odborníky a pacienty* [online] [vid. 2019-11-25]. Dostupné z: <https://www.lecbarany.cz/odbornik/typy-lecby/debridement>

HEALTHPOINT, LTD., 2019. Xenaderm Ointment - FDA prescribing information, side effects and uses. *Drugs.com* [online] [vid. 2019-12-28]. Dostupné z: <https://www.drugs.com/pro/xenaderm-ointment.html>

HERMANSON, Greg T., 2008. *Bioconjugate techniques*. 2nd edition. San Diego: Academic Press. ISBN 978-0-12-370501-3.

HESTERBERG, T.W. a G.A. HART, 1999. Health and safety aspects of fiber glass. In: *Fifteenth Annual Battery Conference on Applications and Advances: Fifteenth Annual Battery Conference on Applications and Advances (Cat. No.00TH8490)* [online]. Long Beach, CA, USA: IEEE, s. 135–140 [vid. 2019-12-28]. ISBN 978-0-7803-5924-6. Dostupné z: doi:10.1109/BCAA.2000.838394

HORAKOVA, J., P. MIKES, A. SAMAN, V. JENCOVA, A. KLAPSTOVA, T. SVARCOVA, M. ACKERMANN, V. NOVOTNY, T. SUCHY a D. LUKAS, 2018. The effect of ethylene oxide sterilization on electrospun vascular grafts made from biodegradable polyesters.

Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications [online]. **92**, 132–142. ISSN 1873-0191. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2018.06.041

HORN, H. J., E. G. HOLLAND a L. W. HAZLETON, 1957. Food Additives, Safety of Adipic Acid as Compared with Citric and Tartaric Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. **5**(10), 759–762. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf60080a007

HOROBIN, Adele J., Kevin M. SHAKESHEFF a David I. PRITCHARD, 2005. Maggots and wound healing: an investigation of the effects of secretions from *Lucilia sericata* larvae upon the migration of human dermal fibroblasts over a fibronectin-coated surface. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* [online]. **13**(4), 422–433. ISSN 1067-1927. Dostupné z: doi:10.1111/j.1067-1927.2005.130410.x

CHAMBERS, P. L. a M. J. ROWAN, 1982. The toxicity of p-benzoquinone on the central nervous system of the cockroach. *Archives of Toxicology. Supplement. = Archiv Fur Toxikologie. Supplement* [online]. **5**, 107–111. ISSN 0171-9750. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-68511-8_19

CHANDRASEKARAN, Arun Richard, J. VENUGOPAL, S. SUNDARRAJAN a S. RAMAKRISHNA, 2011. Fabrication of a nanofibrous scaffold with improved bioactivity for culture of human dermal fibroblasts for skin regeneration. *Biomedical Materials* [online]. **6**(1), 015001. ISSN 1748-605X. Dostupné z: doi:10.1088/1748-6041/6/1/015001

CHANDRASEKARAN, Muthusamy, 2015. *Enzymes in Food and Beverage Processing*. B.m.: CRC Press. ISBN 978-1-4822-2130-5.

CHANG, Antje, Ida SCHOMBURG a D SCHOMBURG, 1991. *Enzyme handbook*. 5 5 [online] [vid. 2020-02-23]. ISBN 978-3-642-76729-6. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-76729-6>

CHEN, Yi, Yu XIN, Hailin YANG, Ling ZHANG, Yuran ZHANG, Xiaole XIA, Yanjun TONG a Wu WANG, 2013. Immobilization and stabilization of cholesterol oxidase on modified sepharose particles. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. **56**, 6–13. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.01.026

INGAVLE, Ganesh C. a J. Kent LEACH, 2014. Advancements in electrospinning of polymeric nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *Tissue Engineering. Part B, Reviews* [online]. **20**(4), 277–293. ISSN 1937-3376. Dostupné z: doi:10.1089/ten.TEB.2013.0276

IWASAKI, Taisuke, Yoshihiko HONDA, Fumio NAGAOKA, Sadao AOKI, Kazuo HORIGOME a Ruyzo IMADA, 1986. Process for sterilization of enzyme contaminated by bacteria [online]. US4612169A. [vid. 2020-03-22]. 16. září 1986. Dostupné z: <https://patents.google.com/patent/US4612169/en>

JIRSAK, Oldrich, Filip SANETRNIK, David LUKAS, Vaclav KOTEK, Lenka MARTINOVA a Jiri CHALOUPEK, 2005. A method of nanofibres production from a polymer solution using electrostatic spinning and a device for carrying out the method [online]. WO2005024101A1. [vid. 2019-12-28]. 17. března 2005. Dostupné z: <https://patents.google.com/patent/WO2005024101A1/en>

JORNITZ, Maik J., Maik W. JORNITZ a Theodore H. MELTZER, 2007. *Filtration and Purification in the Biopharmaceutical Industry*. B.m.: CRC Press. ISBN 978-0-8493-7954-3.

KIM, Jungbae, Jay W. GRATE a Ping WANG, 2006. Nanostructures for enzyme stabilization. *Chemical Engineering Science* [online]. **61**(3), Biomolecular Engineering, 1017–1026. ISSN 0009-2509. Dostupné z: doi:10.1016/j.ces.2005.05.067

KLEINE, M. W., G. M. STAUDER a E. W. BEESE, 1995. The intestinal absorption of orally administered hydrolytic enzymes and their effects in the treatment of acute herpes zoster as compared with those of oral acyclovir therapy. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* [online]. **2**(1), 7–15. ISSN 0944-7113. Dostupné z: doi:10.1016/S0944-7113(11)80042-5

KÖNIG, M., W. VANSCHIEDT, M. AUGUSTIN a H. KAPP, 2005. Enzymatic versus autolytic debridement of chronic leg ulcers: a prospective randomised trial. *Journal of Wound Care* [online]. **14**(7), 320–323. ISSN 0969-0700, 2052-2916. Dostupné z: doi:10.12968/jowc.2005.14.7.26813

LOMANT, A. J. a G. FAIRBANKS, 1976. Chemical probes of extended biological structures: synthesis and properties of the cleavable protein cross-linking reagent [35S]dithiobis(succinimidyl propionate). *Journal of Molecular Biology* [online]. **104**(1), 243–261. ISSN 0022-2836. Dostupné z: doi:10.1016/0022-2836(76)90011-5

LOVĚTINSKÁ-ŠLAMBOŘOVÁ, Irena, Petr EXNAR, Lenka VATAHOVÁ a Iveta DANILOVA, 2014. Křemičitá nanovlákna pro léčbu chronických ran. *Zdravotnické Listy*. **2**(4), 6–13. ISSN 1339-3022.

LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR a R.J. RANDALL, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265, 1951. *The Journal of Biological Chemistry*. **193**(1), 265–275.

MAJNO, Guido a Isabelle JORIS, 1995. Apoptosis, Oncosis, and Necrosis. **146**(1), 13.

MAREK, Miroslav, Pavel RAUCH, Jan KÁŠ, Petr EXNAR a Ján GALOCI, 1989. Způsob přípravy nosičů s imobilizovanými protilátkami pro imunochemické stanovení. Most, 258181. 15. březen 1989.

MATEO, Cesar, Jose M. PALOMO, Gloria FERNANDEZ-LORENTE, Jose M. GUISAN a Roberto FERNANDEZ-LAFUENTE, 2007. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. **40**(6), 1451–1463. ISSN 0141-0229. Dostupné z: doi:10.1016/j.enzmictec.2007.01.018

MAXIM, L. Daniel, John G. HADLEY, Russell M. POTTER a Ron NIEBO, 2006. The role of fiber durability/biopersistence of silica-based synthetic vitreous fibers and their influence on toxicology. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* [online]. **46**(1), 42–62. ISSN 0273-2300. Dostupné z: doi:10.1016/j.yrtph.2006.05.003

MEDIWOUND LTD., 2018. Discover Enzymatic Surgery. *Nexobrid* [online] [vid. 2019-12-28]. Dostupné z: <https://www.nexobrid.com/>

MITRA, Tapas, G SAILAKSHMI a A GNANAMANI, 2014. Could glutaric acid (GA) replace glutaraldehyde in the preparation of biocompatible biopolymers with high mechanical and

thermal properties? *Journal of Chemical Sciences* [online]. **126**(1), 127–140. ISSN 0974-3626, 0973-7103. Dostupné z: doi:10.1007/s12039-013-0543-2

MOZHAEV, Vadim V., Virginus A. ŠIKŠNIS, Nikolay S. MELIK-NUBAROV, Nida Z. GALKANTAITE, Gervydas J. DENIS, Eugenius P. BUTKUS, Boris Yu ZASLAVSKY, Nataliya M. MESTECKINA a Karel MARTINEK, 1988. Protein stabilization via hydrophilization. *European Journal of Biochemistry* [online]. **173**(1), 147–154. ISSN 1432-1033. Dostupné z: doi:10.1111/j.1432-1033.1988.tb13978.x

NAJAFABADI, Alireza Hassani, Ali TAMAYOL, Nasim ANNABI, Manuel OCHOA, Pooria MOSTAFALU, Mohsen AKBARI, Mehdi NIKKHAH, Rahim RAHIMI, Mehmet R. DOKMECI, Sameer SONKUSALE, Babak ZIAIE a Ali KHADEMHOSEINI, 2014. Biodegradable nanofibrous polymeric substrates for generating elastic and flexible electronics. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)* [online]. **26**(33), 5823–5830. ISSN 1521-4095. Dostupné z: doi:10.1002/adma.201401537

O'BRIEN, J., I. WILSON, T. ORTON a F. POGNAN, 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry* [online]. **267**(17), 5421–5426. ISSN 0014-2956. Dostupné z: doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x

O'BRIEN, Mark, 2002. Exploring methods of wound debridement. *British Journal of Community Nursing*. 10–18. ISSN 1462-4753.

OSHITA, Tomohiro, Keiko SHINTANI, Mai KATAYAMA, Takahiro EMOTO, Masatake AKUTAGAWA, Akira TAKAHASHI a Yohsuke KINOCHI, 2007. *An Investigation of the Sterilization Effect of 385nm UVA-LED* [online]. 2007. B.m.: The University of Tokushima, Tokushima, Japan. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/ba9c/0a0d92682644a50287593b1536b7d0289750.pdf>

OSTI, E., 2008. Skin Ph Variations from the Acute Phase to Re-Epithelialization in Burn Patients Treated with New Materials (Burnshield®, Semipermeable Adhesive Film, Dermasilk®, and Hyalomatrix®). Non-Invasive Preliminary Experimental Clinical Trial. *Annals of Burns and Fire Disasters*. **21**(2), 73–77. ISSN 1592-9558.

PAPRČKOVÁ, Markéta, 2014. *STUDIUM ROZPOUŠTĚNÍ ANORGANICKÝCH NANOVLÁKEN NA BÁZI OXIDU KŘEMIČITÉHO VE VODNÉM PROSTŘEDÍ V ZÁVISLOSTI NA JEJICH TEPELNÉ STABILIZACI*. Liberec. Bakalářská práce. Technická Univerzita v Liberci.

PAPRČKOVÁ, Markéta, 2017. *Studium rozpouštění křemičitých nanovláken ve vybraných tělních tekutinách v závislosti na podmínkách jejich zpracování*. Liberec. Diplomová práce. Technická Univerzita v Liberci.

PARLAK, Mahmut, Duran USTEK a Aziz TANRISEVEN, 2013. A novel method for covalent immobilization of dextranase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* [online]. **89**, 52–60. ISSN 1381-1177. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcatb.2012.12.013

PETKOVA, Galina A., Kamil ZÁRUBA a Vladimír KRÁL, 2012. Synthesis of silica particles and their application as supports for alcohol dehydrogenases and cofactor immobilizations: Conformational changes that lead to switch in enzyme stereoselectivity. *Biochimica et*

Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics [online]. **1824**(6), 792–801. ISSN 15709639. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbapap.2012.03.010

PLIKK, P, K ODELIUS, M HAKKARAINEN a A.C. ALBERTSSON, 2006. Finalizing the properties of porous scaffolds of aliphatic polyesters through radiation sterilization. *Biomaterials* [online]. **27**(31), 5335–5347. ISSN 0142-9612, 1878-5905. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2006.06.024

POSPÍŠILOVÁ, MUDr Alena, 2009. Základní principy péče o chronickou ránu. *Interní. Med.* **11**(3), 129–133.

PÜLLEN, Rupert, Rüdiger POPP, Peter VOLKERS a Ingo FÜSGEN, 2002. Prospective randomized double-blind study of the wound-debriding effects of collagenase and fibrinolysin/deoxyribonuclease in pressure ulcers. *Age and Ageing* [online]. **31**(2), 126–130. ISSN 0002-0729. Dostupné z: doi:10.1093/ageing/31.2.126

PURKRTOVÁ, Zita, 2012. Imobilizace pokus o přehled v oblasti enzymů a buněk. In: [online]. Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT, Praha. [vid. 2019-12-28]. Dostupné z: <https://adoc.tips/imobilizace-pokus-o-pehled-v-oblasti-enzym-a-bunk.html>

RAGNARSON-TENNVALL, G. a J. APELQVIST, 1997. Cost-effective management of diabetic foot ulcers. A review. *PharmacoEconomics* [online]. **12**(1), 42–53. ISSN 1170-7690. Dostupné z: doi:10.2165/00019053-199712010-00005

RAMUNDO, Janet a Mikel GRAY, 2008. Enzymatic Wound Debridement. *Journal of wound, ostomy, and continence nursing : official publication of The Wound, Ostomy and Continence Nurses Society / WOCN* [online]. **35**, 273–80. Dostupné z: doi:10.1097/01.WON.0000319125.21854.78

RAMUNDO, Janet a Mikel GRAY, 2009. Collagenase for enzymatic debridement: a systematic review. *Journal of Wound, Ostomy, and Continence Nursing: Official Publication of The Wound, Ostomy and Continence Nurses Society* [online]. **36**(6 Suppl), S4-11. ISSN 1528-3976. Dostupné z: doi:10.1097/WON.0b013e3181bfd83

RAWLINGS, Neil D. a G. SALVESEN, ed., 2013. *Handbook of proteolytic enzymes*. Third edition. Amsterdam: Elsevier/AP. ISBN 978-0-12-382219-2.

RODEHEAVER, G. T., 1999. Pressure ulcer debridement and cleansing: a review of current literature. *Ostomy/Wound Management*. **45**(1A Suppl), 80S-85S; quiz 86S-87S. ISSN 0889-5899.

ROCHE, 2016. Cell Proliferation Kit I (MTT). *sigma-aldrich.com* [online] [vid. 2020-04-02]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Roche/Bulletin/1/11465007001bul.pdf>

RUTTER, P. M., B. CARPENTER, S. S. HILL a I. C. LOCKE, 2000. Varidase: the science behind the medicament. *Journal of Wound Care* [online]. **9**(5), 223–226. ISSN 0969-0700. Dostupné z: doi:10.12968/jowc.2000.9.5.25979

SAXENA, Vishal, Chao-Wei HWANG, Sui HUANG, Quentin EICHBAUM, Donald INGBER a Dennis P. ORGILL, 2004. Vacuum-Assisted Closure: Microdeformations of Wounds and

Cell Proliferation: *Plastic and Reconstructive Surgery* [online]. 1086–1096. ISSN 0032-1052. Dostupné z: doi:10.1097/01.PRS.0000135330.51408.97

SCOPES, Robert K, 2002. Enzyme Activity and Assays. In: JOHN WILEY & SONS, LTD, ed. *Encyclopedia of Life Sciences* [online]. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, s. a0000712 [vid. 2020-02-16]. ISBN 978-0-470-01617-6. Dostupné z: doi:10.1038/npg.els.0000712

SHAPIRA, E., A. GILADI a Z. NEUMAN, 1973. Use of water-insoluble papain (WIP) for debridement of burn eschar and necrotic tissue. Preliminary report. *Plastic and Reconstructive Surgery* [online]. **52**(3), 279–281. ISSN 0032-1052. Dostupné z: doi:10.1097/00006534-197309000-00009

SHERMAN, Ronald A. a Kathleen J. SHIMODA, 2004. Presurgical Maggot Debridement of Soft Tissue Wounds Is Associated with Decreased Rates of Postoperative Infection. *Clinical Infectious Diseases* [online]. **39**(7), 1067–1070. ISSN 1058-4838. Dostupné z: doi:10.1086/423806

SCHMIDT, Ute, Stefan ZSCHOCHE a Carsten WERNER, 2003. Modification of poly(octadecene-alt-maleic anhydride) films by reaction with functional amines. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. **87**(8), 1255–1266. ISSN 1097-4628. Dostupné z: doi:10.1002/app.11527

SILVEIRA, E., M.E. SOUZA-JR, J.C.C. SANTANA, A.C. CHAVES, A.L.F. PORTO a E.B. TAMBOURGI, 2009. Expanded Bed Adsorption of Bromelain (E.C. 3.4.22.33) from Ananas Comosus Crude Extract. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. **26**(1), 149–157. ISSN 0104-6632.

SIMON, Patric E., 2019. Skin Wound Healing: Overview, Hemostasis, Inflammatory Phase [online]. [vid. 2019-11-22]. Dostupné z: <https://emedicine.medscape.com/article/884594-overview>

SINGER, F. a H. OBERLEITNER, 1996. [Drug therapy of activated arthrosis. On the effectiveness of an enzyme mixture versus diclofenac]. *Wiener Medizinische Wochenschrift (1946)*. **146**(3), 55–58. ISSN 0043-5341.

SIPOS, Tibor a Joseph R. MERKEL, 1970. Effect of calcium ions on the activity, heat stability, and structure of trypsin. *Biochemistry* [online]. **9**(14), 2766–2775. ISSN 0006-2960, 1520-4995. Dostupné z: doi:10.1021/bi00816a003

SLAMBOROVA, Irena, Veronika ZAJIKOVA, Petr EXNAR a Jarmila STUDNICKOVA, 2014. Nanofiber structure with immobilized organic agents and the method of its preparation [online]. WO2014026656A1. [vid. 2019-12-28]. 20. únor 2014. Dostupné z: <https://patents.google.com/patent/WO2014026656A1/en>

SLOVÁKOVÁ, Marcela, M. SRBOVÁ, M. MUNZAROVÁ, P. DVOŘÁKOVÁ a Z. BÍLKOVÁ, 2015. Testing of Collagenase Covalently Linked to Chitosan Nanofibers for Biomedical Applications. In: *NANOCON 2015 - 7th International Conference on Nanomaterials - Research and Application, Conference Proceedings*. s. 1–6.

SMITH & NEPHEW, INC., 2002. The relationship between pH and wound healing. *CADESORB: Protease Modulating Ointment* [online] [vid. 2020-02-18]. Dostupné

z: <https://www.smith-nephew.com/belgique/produits-old/cadesorb-/cadesorb--simple-science/the-relationship-between-ph-and-wound-healing/>

SMITH & NEPHEW, INC., 2008. Collagenase SANTYL* Ointment. *WoundSource* [online] [vid. 2019-12-28]. Dostupné z: <http://www.woundsource.com/product/collagenase-santyl-ointment>

SMITH, Robert G., 2008. Enzymatic debriding agents: an evaluation of the medical literature. *Ostomy/Wound Management*. **54**(8), 16–34. ISSN 0889-5899.

SMYTH, H.F., C.P. CARPENTER, C.S. WEIL, U.C. POZZANI a J.A. STRIEGEL, 1962. Range-finding toxicity data: List V. *Am Ind Hyg Assoc J*. **23**, 95–107.

SRBOVÁ, Jana, Marcela SLOVÁKOVÁ, Zuzana KŘÍPALOVÁ, Monika ŽÁRSKÁ, Martina ŠPAČKOVÁ, Denisa STRÁNSKÁ a Zuzana BÍLKOVÁ, 2016. Covalent biofunctionalization of chitosan nanofibers with trypsin for high enzyme stability. *Reactive and Functional Polymers* [online]. **104**, 38–44. ISSN 1381-5148. Dostupné z: [doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2016.05.009](https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2016.05.009)

STANNARD, James P., David A. VOLGAS, Rena STEWART, Gerald MCGWIN a Jorge E. ALONSO, 2009. Negative pressure wound therapy after severe open fractures: a prospective randomized study. *Journal of Orthopaedic Trauma* [online]. **23**(8), 552–557. ISSN 1531-2291. Dostupné z: [doi:10.1097/BOT.0b013e3181a2e2b6](https://doi.org/10.1097/BOT.0b013e3181a2e2b6)

STROHAL, Robert, Joachim DISSEMOND, J. Jordan O'BRIEN, Alberto PIAGGESI, Rytis RIMDEIKA, Tamla YOUNG a Jan APELQVIST, 2013. EWMA document: Debridement. An updated overview and clarification of the principle role of debridement. *Journal of wound care* [online]. **22**(1), 5. Dostupné z: [doi:10.12968/jowc.2013.22.sup1.s1](https://doi.org/10.12968/jowc.2013.22.sup1.s1)

STRYJA, Jan, 2006. Úloha débridementu v léčení ran. *Léčba ran* [online]. **2**(6) [vid. 2019-11-25]. Dostupné z: <http://www.cslr.cz/download/MT2006-06-15lowres.pdf>

STUDNIČKOVÁ, J., M. MARŠÁLKOVÁ, Petr EXNAR, J. GRABMÜLLEROVÁ a J. MÜLLEROVÁ, 2007. THERMAL PROPERTIES OF SILICON OXIDE NANOFIBERS. In: *6th International Conference - TEXSCI 2007*.

SÚKL, 2019. IRUXOL MONO. *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online] [vid. 2019-12-28]. Dostupné z: http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data%5Batc_group%5D=D03BA52&data%5Bwith_adv%5D=0

SWARNALATHA, Venkatanarasimhan, Rani ALURI ESTHER a Raghavachari DHAMODHARAN, 2013. Immobilization of α -amylase on gum acacia stabilized magnetite nanoparticles, an easily recoverable and reusable support. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* [online]. **96**, 6–13. ISSN 13811177. Dostupné z: [doi:10.1016/j.molcatb.2013.05.022](https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.05.022)

SZOKOLY, Miklós a Petra ARADI, 2013. Modern wound treatment with devices working according to various physical principles. *Biomechanica Hungarica* [online]. [vid. 2019-11-25]. ISSN 20600305, 20604475. Dostupné z: [doi:10.17489/biohun/2013/1/02](https://doi.org/10.17489/biohun/2013/1/02)

TALBERT, Joey N. a Julie M. GODDARD, 2012. Enzymes on material surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. **93**, 8–19. ISSN 0927-7765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2012.01.003

TAMAYOL, Ali, Mohsen AKBARI, Nasim ANNABI, Arghya PAUL, Ali KHADEMHOSEINI a David JUNCKER, 2013. Fiber-based tissue engineering: Progress, challenges, and opportunities. *Biotechnology Advances* [online]. **31**(5), 669–687. ISSN 1873-1899. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2012.11.007

THIRUVOTH, FrijiMeethale, DeviPrasad MOHAPATRA, DineshKumar SIVAKUMAR, RaviKumar CHITTORIA a Vijayaraghavan NANDHAGOPAL, 2015. Current concepts in the physiology of adult wound healing. *Plastic and Aesthetic Research* [online]. **2**(5), 250. ISSN 2347-9264. Dostupné z: doi:10.4103/2347-9264.158851

VASHIST, Sandeep Kumar, Edmond LAM, Sabahudin HRAPOVIC, Keith B. MALE a John H. T. LUONG, 2014. Immobilization of Antibodies and Enzymes on 3-Aminopropyltriethoxysilane-Functionalized Bioanalytical Platforms for Biosensors and Diagnostics. *Chemical Reviews* [online]. **114**(21), 11083–11130. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr5000943

VODRÁŽKA, Zdeněk, 1992. *Biochemie: [učebnice pro výuku na školách pro inženýry chemie]. [Seš.] 1, [Seš.] 1.* Praha: Academia: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 978-80-200-0438-3.

VODRÁŽKA, Zdeněk, Jan KÁŠ a Pavel RAUCH, 1991. *Enzymologie: [určeno pro stud. enzymového a biomedicálního inženýrství a pro postgrad. kursy.* Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 978-80-7080-124-6.

WALSH, Gary, 2002. *Proteins: biochemistry and biotechnology.* Chichester ; New York: J. Wiley. ISBN 978-0-471-89906-8.

WANSZELBAUM, Aharon, 2016. Honey gauze Revamil used for treating and healing burns. *BiologiQ* [online]. Dostupné z: <https://www.biologiq.nl/UserFiles/Honey%20gauze%20Revamil%20used%20for%20treating%20and%20healing%20burns%20-%20%20dr%20Wanszelbaum.pdf>

WEIRON DYNAMICS, S.R.O., 2018a. Pana-Veyxal® Salbe. *Veyx - veterinární přípravky* [online] [vid. 2019-12-28]. Dostupné z: <http://www.veyx.cz/panaveyxal>

WEIRON DYNAMICS, S.R.O., 2018b. SunLitan® PA Zink spray. *Veyx - veterinární přípravky* [online] [vid. 2019-12-28]. Dostupné z: <http://www.veyx.cz/pa-zink>

WEST, James D., Chelsea E. STAMM, Haley A. BROWN, Samantha L. JUSTICE a Kevin A. MORANO, 2011. Enhanced Toxicity of the Protein Cross-Linkers Divinyl Sulfone and Diethyl Acetylenedicarboxylate in Comparison to Related Monofunctional Electrophiles. *Chemical Research in Toxicology* [online]. **24**(9), 1457–1459. ISSN 0893-228X. Dostupné z: doi:10.1021/tx200302w

WRIGHT, J. Barry a Lei SHI, 2003. Accuzyme® Papain-Urea Debriding Ointment: A Historical Review. *Wounds*. **15**(5), 133–142.

YEWALE, Tatyaso, Rekha S. SINGHAL a Alankar A. VAIDYA, 2013. Immobilization of inulinase from *Aspergillus niger* NCIM 945 on chitosan and its application in continuous inulin hydrolysis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* [online]. **2**(2), 96–101. ISSN 18788181. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcab.2013.01.001

YOO, Hyuk Sang, Taek Gyoung KIM a Tae Gwan PARK, 2009. Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. **61**(12), 1033–1042. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2009.07.007

YUNOKI, Shunji, Toshiyuki IKOMA, Akira MONKAWA, Kazushi OHTA, Junzo TANAKA, Shinichi SOTOME a Kenichi SHINOMIYA, 2006. Influence of γ Irradiation on the Mechanical Strength and In Vitro Biodegradation of Porous Hydroxyapatite/Collagen Composite. *Journal of the American Ceramic Society* [online]. **89**(9), 2977–2979. ISSN 1551-2916. Dostupné z: doi:10.1111/j.1551-2916.2006.01151.x

ZHANG, Shihan, Yongqi LU a Xinhuai YE, 2013. Catalytic behavior of carbonic anhydrase enzyme immobilized onto nonporous silica nanoparticles for enhancing CO₂ absorption into a carbonate solution. *International Journal of Greenhouse Gas Control* [online]. **13**, 17–25. ISSN 17505836. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijggc.2012.12.010

ZUCCA, Paolo a Enrico SANJUST, 2014. Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms. *Molecules* [online]. **19**(9), 14139–14194. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules190914139