



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta textilní



VÝVOJ NANOVLÁKENNÝCH NOSIČŮ PRO BIOMEDICÍNSKÉ APLIKACE

Ing. Iveta Zvercová (rozená Danilová)

AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE

Název disertační práce: Vývoj nanovláknenných nosičů pro biomedicínské aplikace
Autor: Ing. Iveta Zvercová (rozená Danilová)
Obor doktorského studia: Textilní technika a materiálové inženýrství
Forma studia: Prezenční

Školitelka: Doc. Mgr. Irena Šlamborová, Ph.D.

Složení komise pro obhajobu disertační práce:

předseda:
prof. Ing. Jakub Wiener, Ph.D. FT TUL, katedra materiálového inženýrství

místopředseda:
prof. RNDr. Oldřich Jirsák, CSc. FT TUL, katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

prof. Ing. Karel Kolář, CSc. (oponent) Přírodovědecká fakulta UK Praha, katedra chemie

prof. Ing. Ivan Stibor, CSc. FP TUL, katedra chemie

doc. Ing. Lukáš Čapek, Ph.D. FT TUL, katedra technologií a struktur

doc. Ing. Ladislav Burgert, CSc. (oponent) Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická

Ing. Jiří Chvojka, Ph.D. FT TUL, katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

S disertační prací je možno seznámit se na studijním oddělení doktorského studia Fakulty textilní Technické univerzity v Liberci.

Doktorské studium

Seznam zkoušek	Vybrané partie z biochemie, 13.10.2014 Tkáňové inženýrství, datum složení zkoušky 1.6.2015 Matematická statistika a analýza dat, 31.3.2015 Optika pevných látek, 11.2.2016 Experimentální technika oboru, 9.3.2017
SDZ	Státní doktorská zkouška vykonána dne 21.03.2018 s celkovým hodnocením prospěl(a).

Pedagogická činnost

Výuka	Lékařské přístroje a zařízení, 2015-2019 /50 % přednášející i cvičící/ Biofyzika, radiologie a technika nukleární medicíny, 2014-2015, /asistence při cvičení/ Funkcionalizace nanomateriálů, 2016-2017, /asistence při cvičení/ Ošetř. péče u akut. a krit. stavů 1,2,3; 2016-2019 /asistence při cvičení/
Vedení DP a BP	Simona Knoppová, <i>Zdravotní rizika spojená s využitím ultrazvuku ve zdravotnictví a průmyslu</i> , BP, 2017 Tereza Kadlecová, <i>Využití terapeutického ultrazvuku v medicíně a rehabilitaci</i> , BP, 2018 Nikola Bulířová, <i>Vizualizace biologických vzorků pomocí fluorescenční mikroskopie</i> , BP, 2018 Jiří Janeček, <i>Tvorba scénářů pro patientský simulátor SIMMAN a jejich využití při výuce oboru všeobecná sestra</i> , BP, odevzdáno, obhajoba 6/2020 Adéla Delongová, <i>Tvorba scénářů první pomoci s využitím simulačních figurín</i> , BP, odevzdáno, obhajoba 6/2020 Bc. Pavla Mušková, <i>Optimalizace manévru pro stanovení maximální volní síly svalů ruky a předloktí při hodnocení lokální svalové zátěže metodou integrované elektromyografie</i> , DP, obhajoba 8/2020

Výzkumné projekty

SGS 21097: Vývoj modifikovaných křemičitých nanovláken pro imobilizaci biomolekul, spoluřešitel, 2015

SGS 21154: Vývoj a testování modifikovaných křemičitých nanovláken s imobilizovanými látkami pro biomedicínské aplikace, spoluřešitel, 2016

Ostatní projekty

Edutech a Dětská univerzita: Lektor kroužku Biomedicína, 2015-2019.

SESKUPIT: Univerzita Pardubice, 2016-2017

IP 12395: Propagace FZS TUL a jejích stávajících i nově akreditovaných oborů, řešitel, 2016-2018

Anotace

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

Annotation

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

Obsah

Anotace	5
Annotation	6
1 Přehled současného stavu problematiky	9
2 Cíle disertační práce	10
3 Popis vlastního řešení	10
3.1 Enzymatický debridement jako bezbolestné odstranění nekrózy	11
3.1.1 Mechanismus účinku enzymů	11
3.1.2 Enzymy v mastech a hydrogelech	12
3.2 Výroba křemičitých nanovláken a jejich teplotní stabilizace	12
3.3 Metoda měření proteolytické aktivity enzymů	13
3.3.1 Lowryho metoda	13
3.3.2 Jednotky proteolytické aktivity	13
4 Původní výsledky	13
4.1 Základní charakteristiky nanovláken a jejich vizualizace	14
4.2 Vliv teploty stabilizace na vlastnosti nanovláken a aktivitu enzymů	15
4.3 Úprava povrchu nanovláken	17
4.3.1 Silanizace povrchu nanovláken	17
4.3.2 Funkcionalizace povrchu silanizovaných křemičitých nanovláken.....	18
4.3.3 Metoda úpravy nanovláken A-EDC	19
4.3.4 Metoda úpravy nanovláken B-DSC.....	20
4.3.5 Metoda úpravy nanovláken C-GLU	20
4.4 Imobilizace enzymů a vliv reakčních podmínek na jejich aktivitu	20
4.4.1 Testování aktivity enzymů v závislosti na metodě funkcionalizace nanovláken.....	22
4.4.2 Testování proteolytické aktivity enzymů v závislosti na hodnotě pH	23
4.4.3 Testování proteolytické aktivity v závislosti na teplotě	24
4.5 Sterilizace vyrobených vzorků	25
4.6 Testování cytotoxicity vyrobených materiálů in vitro	28
4.7 In vitro testy na prasečí kůži	30
4.8 Testování stability nanovláken s imobilizovanými enzymy	30
5 Zhodnocení výsledků	31
6 Doporučení na pokračování práce	33
7 Seznam publikovaných prací studenta DSP	34
8 Seznam použité literatury	35
9 Curriculum Vitae	37

10	Stručná charakteristika dosavadní odborné, výzkumné a vědecké činnosti	38
11	Vyjádření školitelky doktorandky	39
12	Oponentské posudky disertační práce	41

1 Přehled současného stavu problematiky

Zatím ani v moderní medicíně nebyl objeven způsob, jakým by bylo možné bezbolestně a efektivně odstranit nekrotickou tkáň 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 prvním kroku – odstranění devitalizované části tkáně, která má porušené krevní zásobení, nemá šanci na zhojení, prodlužuje dobu hojení, a zejména zvyšuje riziko vzniku infekce. 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).

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 adherovaná 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).

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 porositě

se k ráně dostane kyslík, vlákna jsou neadherentní a exsudát tedy může vytékat z rány (Lovětinská-Šlamborová et al. 2014).

2 Cíle disertační práce

V disertační práci se snažíme docílit dvou hlavních bodů – optimalizovat metodu imobilizace proteolytických enzymů na křemičitá nanovlákna a zvolit vhodný enzym pro účely enzymatického debridementu. V současné době je znám způsob imobilizace enzymů 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 všemy jednotlivými kroky, které následují po elektrostatického zvláknění solu obsahujícího tetraorthoxysilan až po testování stability, cytotoxicity, antibakteriálních vlastností a in vitro testování proteolytické aktivity enzymů na prasečí kůži. Testován je vliv teploty stabilizace křemičitých nanovláken ihned po elektrostatickém zvláknění na strukturu nanovláken, proteolytickou aktivitu enzymů a cytotoxicitu, dále několik sloučenin určených k modifikaci a funkcionalizaci povrchu křemičitých nanovláken a jejich vliv na proteolytickou aktivitu, cytotoxicitu, rozpustnost a stabilitu vytvořených vzorků.

Druhého cíle práce jsem se snažila dosáhnout pomocí testů závislosti proteolytické aktivity imobilizovaných enzymů na hodnotě pH i na teplotě. In vitro testy na prasečí kůži a testy stability vzorků z hlediska aktivity enzymů byly testovány jak v závislosti na způsobu úpravy nanovlákněného povrchu tak v závislosti na druhu proteolytického enzymu.

3 Popis vlastního řešení

Jako podpůrný materiál pro enzymatický debridement byla použita křemičitá nanovlákna a zkoumány byly možnosti chemické úpravy jejich povrchu takové, aby mohlo dojít ke kovalentní imobilizaci proteolytických enzymů. Popsána byla metoda s využitím glutaraldehydu. Jedná se o jednu z nejpoužívanějších metod, ovšem v jiném než medicínském prostředí. Glutaraldehyd není biokompatibilní (Chen et al. 2013), pro buňky je toxický (Beauchamp et al. 1992) a využívá se spíše jako dezinfekce. Metoda byla ale použita jako srovnávací a hlavním úkolem disertační práce bylo nahradit právě tento ligand.

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 zvláknění, a byl tedy ve 2% nebo 4% koncentraci součástí přímo vytvořených nanovláken. V případě, kdy byla pro zvýšení stabilizace těchto vláken použita metoda prokřížení pomocí glutaraldehydu, byl materiál pro lidské kožní fibroblasty cytotoxický (konkrétně při použití 4% roztoku bromelainu). Přitom jinak byla samotná chitosanová nanovlákna, chitosanová nanovlákna s 2 % i 4 % bromelainu a samotný bromelain pro uvedený druh buněčné linie netoxické.

3.1 Enzymatický debridement jako bezbolestné odstranění nekrózy

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. Evropská asociace pro management ran 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). Druhů debridementu existuje celá řada. Mezi aktivní metody patří debridement chirurgický, mechanický, hydrochirurgický a ultrazvukový, k pasivním metodám řadíme debridement chemický, autolytický, biologický, podtlakový a enzymatický. Jednotlivé druhy debridementu se mezi sebou velmi často kombinují. Nejčastěji se používá chirurgický debridement. Jedná se o nejrazantnější, nejrychlejší, ale též nejradikálnější formu debridementu. Provádí se pomocí skalpelu, nůžek, exkochleačních lžiček, pinzet apod. Metoda je to tedy velmi bolestivá. Ovšem všechny druhy debridementu mají nějaké nevýhody.

Nevýhodou enzymatického debridementu je finanční náročnost a nestabilita enzymů. Výhodou je pouze lokální působení enzymu, které nepoškozuje okolní zdravou tkáň. Metoda je mnohem rychlejší než autolytický debridement.

3.1.1 Mechanismus účinku enzymů

Hlavní funkcí enzymů je urychlení reakcí bez ovlivnění složení rovnovážné směsi, neboť zvyšují rychlost reakce oběma směry. Důležitou funkcí enzymů je zajištění specifického průběhu reakcí bez vzniku vedlejších produktů a jejich přesné návaznosti a koordinace (Vodrážka 1992).

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 (Vodrážka et al. 1991).

Přiblížení takto složitého procesu je uvedeno proto, aby bylo lépe pochopitelné, proč je aktivita enzymu výrazně závislá na hodnotě pH, teploty a přítomnosti inhibitorů. Každý enzym má tedy své pH optimum a teplotní optimum, které se ovšem při kovalentní imobilizaci enzymu na substrát může lišit od optima pro volný enzym. V praktické části disertace bylo tedy nezbytné podrobit nanovláknům s imobilizovanými enzymy testům závislosti proteolytické aktivity enzymů na hodnotě pH a teplotě.

3.1.2 Enzymy v mastech a hydrogelech

V této kapitole byl také vysvětlen důvod, proč je smyslem disertační práce navázat enzymy na nanovláknům – ta totiž dokáží přesně kopírovat povrch rány, a tedy zajistit přímý kontakt enzymu s nekrotickou tkáně. Pokud by byly použity například příliš nepoddajné obvazy, nezajistíme úplný kontakt s povrchem rány. Enzymy jsou většinou přidávány do mastí nebo gelů a měly by pracovat synergicky s endogenními enzymy pacienta. Bohužel v tomto případě sice zajistíme přímý kontakt s povrchem rány, ale zabraňujeme přístupu kyslíku k ráně a velmi snižujeme možnost konformačních změn uvnitř enzymů (SÚKL 2019).

Provedena byla rozsáhlá rešerše produktů pro enzymatický debridement dostupných v České republice i v zahraničí. Nejčastějšími produkty, které se na trhu objevují, jsou masti s kolagenázou, bromelainem, trypsinem, chymotrypsinem, fibrinolysinem a masti s papain-močovinou. Gely ze streptokinázy a streptodornázy jsou poměrně drahé a byla prokázána i alergie na tyto enzymové gely (Strohal et al. 2013).

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

3.2 Výroba křemičitých nanovláken a jejich teplotní stabilizace

Pro výrobu vzorků napomáhajících bezbolestnému odstranění nekrotické tkáně byla na základě dřívějších výsledků týmu paní docentky Ireny Lovětinské-Šlamborové vybrána křemičitá nanovláknům. 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).

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).

Na základě výsledků z kvalifikačních prací zmíněné studentky, byly vybrány pro tepelnou stabilizaci křemičitých nanovláken tyto hodnoty – 180, 260 a 550 °C. Stabilizace probíhala vždy 2 hodiny. V první části předkládané disertace byla tedy používána křemičitá nanovláknům stabilizovaná na tyto teploty a byl zkoumán jejich vliv na strukturu nanovláken, proteolytickou aktivitu enzymů a cytotoxicitu. Výsledky jsou uvedeny v kapitole 4.2.

3.3 Metoda měření proteolytické aktivity enzymů

Po úspěšné imobilizaci enzymů na nanovlákná byla měřena jejich proteolytická aktivita. Vyzkoušeny byly metody využívající ke kvantifikaci proteolytické aktivity jak ultrafialovou, tak viditelnou oblast záření. V disertační práci jsou uvedeny důvody, proč nakonec nebyly využity metody detekce v UV oblasti – zejména kvůli faktu, že mnoho látek obsažených v pufrech a hlavně samotné aminokyseliny absorbují záření mezi 260 a 280 nm (Beaven et al. 1950). Optimalizovány byly tedy dvě metody, s využitím Folin-Ciocalteuova činidla a Lowryho metoda (Lowry et al. 1951). Spolehlivá metoda měření proteolytické aktivity byla dlouho optimalizována.

3.3.1 Lowryho metoda

Až v případě použití Lowryho metody jsme dostávali reprodukovatelné výsledky měření aktivity enzymů. V této metodě se po reakci enzymu se substrátem 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). Hodnota absorbance byla odečítána při vlnové délce 750 nm. Tento postup se osvědčil a byl poté používán vždy k měření aktivity proteolytických enzymů, výsledky získané metodou s využitím pouze Folin-Ciocalteuova činidla byly zopakovány. Jako substrát byl použit kasein, jako srážecí činidlo kyselina trichloroctová.

3.3.2 Jednotky proteolytické aktivity

K vyjádření výsledku měření se používá několik jednotek. 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 μ molu 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, *M_{vl}* je hmotnost nanovláken vstupujících do reakce v miligramech, *T_r* je čas reakce v minutách a *V_{col}* je objem chemikálií vstupujících do kolorimetrické reakce před měřením absorbance L-tyrosinu pomocí spektrofotometru v mililitrech.

$$\frac{\text{Units}}{\text{mg vláken}} = \frac{\text{nty}_r[\mu\text{mol}] * V_r[\text{ml}]}{M_{vl}[\text{mg}] * T_r[\text{min}] * V_{col}[\text{ml}]} \quad \text{Rovnice 1} \quad (\text{Srbová et al. 2016})$$

4 Původní výsledky

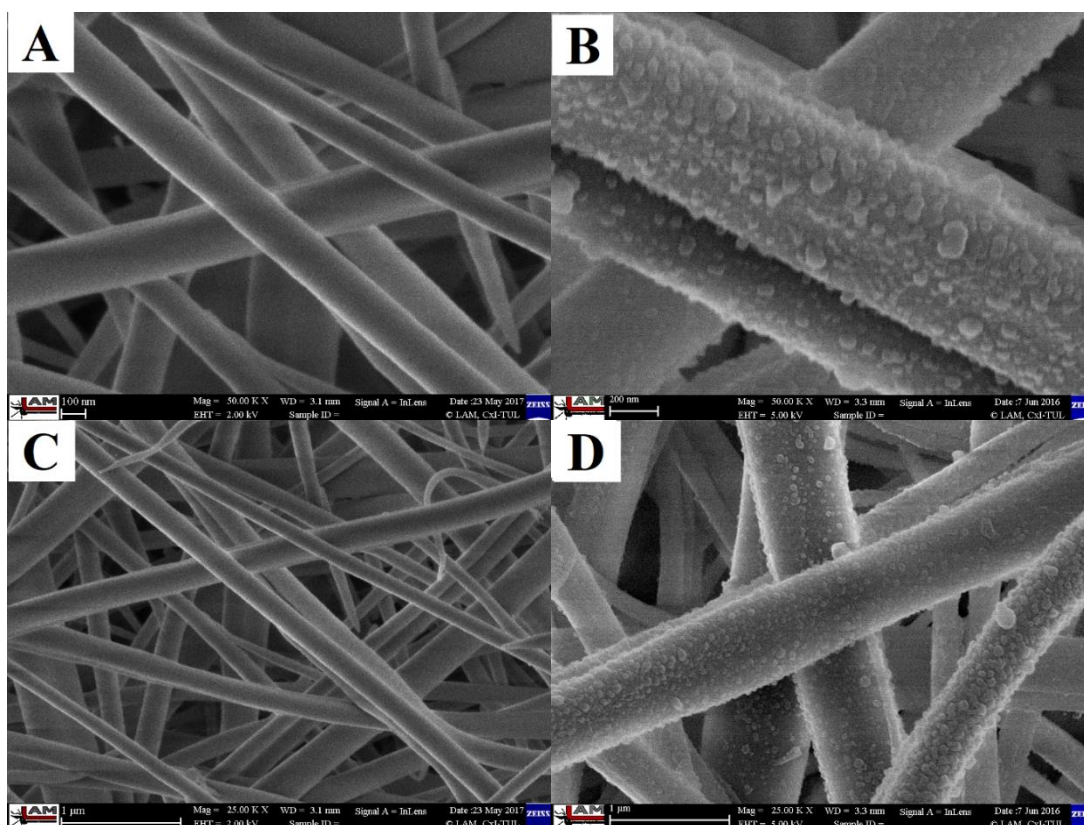
V předkládaném autoreferátu disertační práce nejsou popsány všechny výsledky, kterých bylo během výzkumu dosaženo. Nejvíce času bylo věnováno kroku funkcionalizace nanovláken, optimalizaci Lowryho metody, způsobu sterilizace vyrobených vzorků, testům proteolytické

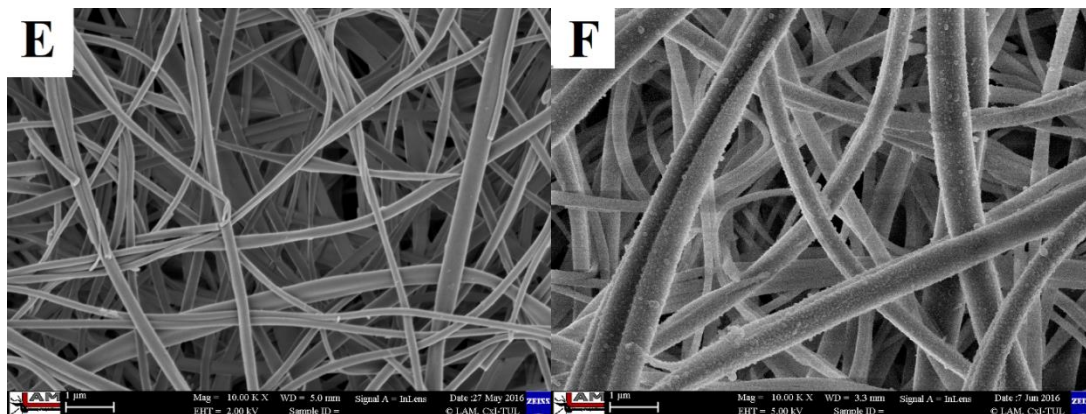
aktivity enzymů za různých podmínek a testům cytotoxicity. Zde jsou uvedeny pouze nejdůležitější výsledky.

Nejsou zde například vůbec uvedeny výsledky testů rozpustnosti nanovláken s enzymy a výsledky testování změny pH roztoku po louhování nanovláken s enzymy v závislosti na použité metodě funkcionalizace povrchu nanovláken. Nejdůležitějším výsledkem těchto testů bylo, že největší změna hmotnosti nanovláken a největší změna hodnoty pH výluhu se projevila u vzorku připraveného metodou A-EDC.

4.1 Základní charakteristiky nanovláken a jejich vizualizace

Křemičitá nanovlákná vyrobená výše popsaným způsobem byla vždy vizualizována pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM). 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. 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. 4.3.4) s imobilizovaným trypsinem (Obrázek 1 B), nebo o metodu úpravy A-EDC (více o metodě v kap. 4.3.3) s imobilizovaným trypsinem (Obrázek 1 D a 1 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.





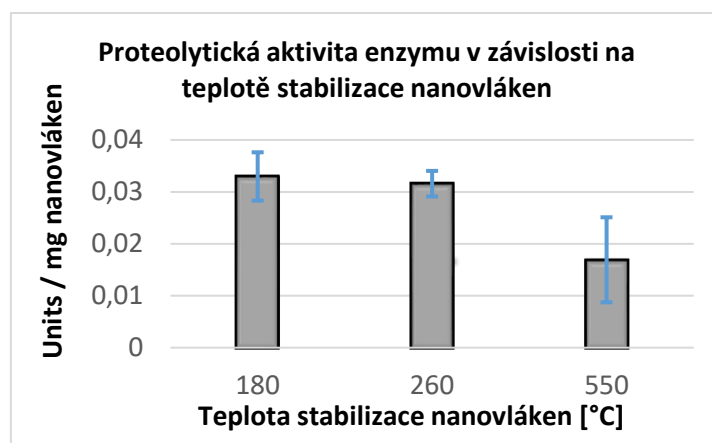
Obrázek 1: SEM snímky standardních nanovláken bez enzymu (A, C a E) a s imobilizovanými enzymy: metoda úpravy B-DSC s trypsinem (B), metoda úpravy A-EDC s trypsinem (D a F). Zvětšení: 50 000 x (A, B), 25 000 x (C, D), 10 000 x (E, F).

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). Snímky jsou uvedeny pouze v disertační práci, protože snímání vzorků pomocí AFM nebylo poté již dále používáno a k zobrazení povrchu byla používána metoda SEM.

4.2 Vliv teploty stabilizace na vlastnosti nanovláken a aktivitu enzymů

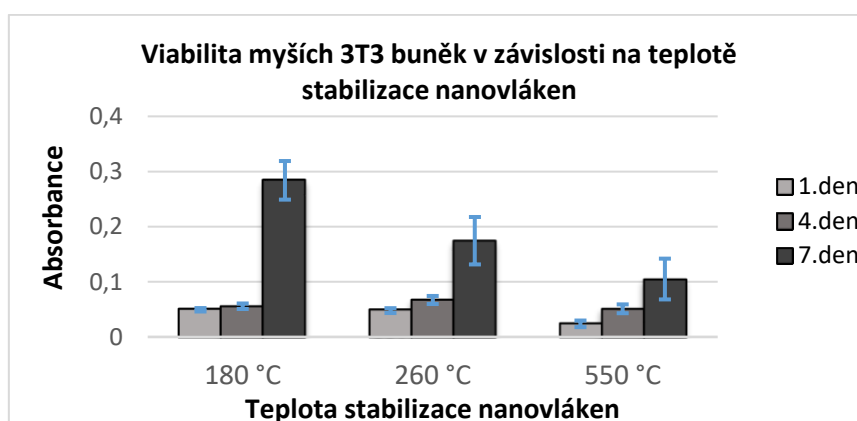
Bylo provedeno měření průměru nanovláken stabilizovaných na teplotu 180, 260 a 550 °C bez enzymu (standardu nanovláken) a s imobilizovaným enzymem (jednalo se o enzym bromelain ze stonku ananasu (EC 3.4.22.32), imobilizace byla provedena pomocí metody A-EDC, více o této metodě je uvedeno v kapitole 4.3.3). Z naměřených dat se zdá, že se zvyšováním teploty stabilizace se zvyšuje průměr vláken, kvůli velké směrodatné odchylce nelze ale toto tvrzení brát jako statisticky významné.

Na Obrázku 2 jsou uvedeny výsledky testu proteolytické aktivity imobilizovaného enzymu PR (proteáza z *Aspergillus oryzae*) v závislosti na teplotě stabilizace křemičitých nanovláken. 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 2: Proteolytická aktivita enzymu PR (proteáza z *Aspergillus oryzae*) imobilizovaného metodou A-EDC při teplotě 37 °C a hodnotě pH = 7 v závislosti na teplotě stabilizace křemičitých nanovláken. Hodnoty byly průměrovány ze 4 vzorků.

Proveden byl také MTT kolorimetrický test měřící metabolickou aktivitu buněk 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 nanovlákná. 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. Z grafu na Obrázku 3 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.



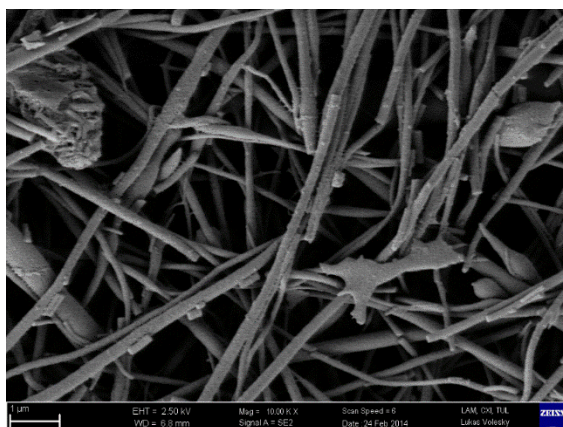
Obrázek 3: Graf závislosti viability myších 3T3 fibroblastů na teplotě stabilizace křemičitých nanovláken. Měřeno 1., 4. a 7. den od nasazení buněk na nanovlákná. Sterilizace pomocí ethylenoxidu, test kontaktem.

4.3 Úprava povrchu nanovláken

Modifikovat povrch nanovláken lze pomocí několika odlišných metod. Úprava povrchu křemičitých nanovláken 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 pojednává disertační práce.

4.3.1 Silanizace povrchu nanovláken

Zde bych se blíže zaměřila na silanizaci povrchu pomocí (3-Aminopropyl)triethoxysilanu (APTES). Provedena byla sice i silanizace pomocí (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilanu, ale při jeho použití došlo k naprosté změně struktury vláken – k porušení vláken, polámání a vzniku „shluků a bublin“ (Obrázek 4). Makroskopicky se zdála nanovlákná podobná spíše folii než nanovláknům. Nepomohla ani výměna rozpouštědla. Proto byl ke kroku silanizace zvolen pouze APTES.



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

Realizovány byly testy týkající se koncentrace APTES a načasování silanizace povrchu křemičitých nanovláken. Množství reaktivních aminoskupin (NH_2) navázaných díky silanizace pomocí APTES na povrch křemičitých nanovláken byl kvantifikován 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.

Tímto způsobem bylo zjištěno, že nejvyšší množství reaktivních aminoskupin při nejmenší koncentraci a nejkratší době silanizace je v případě reakce 2% APTES po dobu 2 hodin. Pomocí metody využívající FITC byl také testován způsob uchování 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 1 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 krok silanizace povrchu nanovláken.

Tabulka 1: 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 (doba 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.

4.3.2 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 nepřehledné množství možných postupů, většina sloučenin, nebo jejich rozpouštědel, ale mohou být pro organismus toxická.

Možnosti funkcionalizace povrchu nanovláken byly opět pečlivě rozebrány v disertační práci, zde bych uvedla pouze výslednou tabulku (Tabulka 2) i s informací, zda postup byl vyzkoušen a jaký byl výsledek. Konkrétní koncentrace, rozpouštědla, postupy a důvody, proč některé chemikálie nebyly ani vyzkoušeny, jsou uvedeny v disertační práci.

Nejvíce byl testován postup s použitím (3-Aminopropyl)triethoxysilan (APTES) k silanizaci povrchu, kde následoval proces dvoustupňové funkcionalizace pomocí sukcinanhydridu (SU) jako anhydridu ke karboxylaci povrchu a NHS esteru vytvořeného z N-hydroxysukcinimidu (NHS) a 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu (EDC). Pro lepší orientaci jsem tento postup označila jako postup A-EDC a je zde rozepsán.

Tabulka 2: 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-dimethylaminopropyl)karbodiimid (EDC), N-Cyklohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)karbodiimid (CMC), N,N'-Disuccinimidyl karbonát (DSC).

Silanizace	Funkcionalizace	Druh testu	Výsledek		
Karboxylace	Testováno				
APTES	Anhydrid	DCC /NHS	NE	-	Doporučuje se nahrazovat pomocí EDC (Hermanson 2008)
APTES	SU	EDC /NHS	ANO	Test proteol. aktivity, testy cytotoxicity.	Obrázek 8, 9, 13, 14
APTES	Anhydrid	CMC /NHS	NE	-	-
APTES	SU	DSC	ANO	Test proteol. aktivity, testy cytotoxicity	Obrázek 7, 14, 15
-	-	DSC	ANO	Testy cytotoxicity	Obrázek 8, 9
APTES	SU	EDC	NE		Výhodnější je požit 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 v disertační práci
		Divinylsulfon	NE		
		Benzochinon	NE		
		Epichlorhydrin	NE		

4.3.3 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.

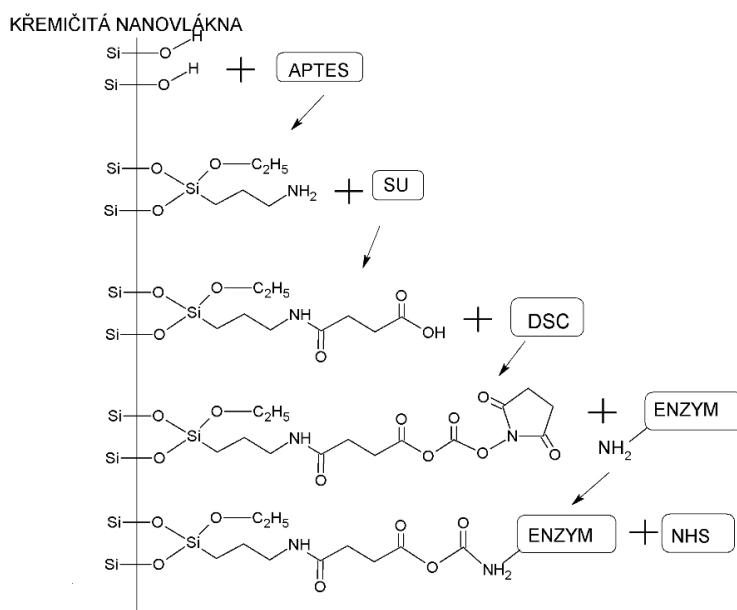
Křemičitá nanovlákná byla silanizována 2% roztokem APTES v 95% roztoku IPA. Reakce probíhala při teplotě 70 °C a po reakci byla nanovlákná dvakrát promyta v ethanolu (EtOH). Následně byla nanovlákná vložena do sušárny, kde byla postupně zvyšována teplota až na 110 °C. Dalším krokem byla karboxylace pomocí sukcinanhydridu. 2% SU byl rozpuštěn v EtOH a nanovlákná byla ponořena do tohoto roztoku o laboratorní teplotě na 2 hodiny. 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. Nyní již bylo možné rozpustit požadovaný enzym v 0,1 M fosfátovém pufru s pH = 7,2 v konečné koncentraci 2 % enzymu.

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.

4.3.4 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. Nanovláknna jsou nejprve silanizována pomocí APTES, poté karboxylována pomocí sukcinanhydridu. Následně byl připraven 2% roztok disukcinimidylkarbonátu v EtOH a nanovláknna byla ponořena na 1 hodinu při pokojové teplotě. Schéma je naznačeno na Obrázku 5.



Obrázek 5: Schéma postupu imobilizace enzymu na křemičitá nanovláknna pomocí modifikace povrchu (3-Aminopropyl)triethoxysilanem a následné funkcionalizace sukcinanhydridem a disukcinimidyl karbonátem.

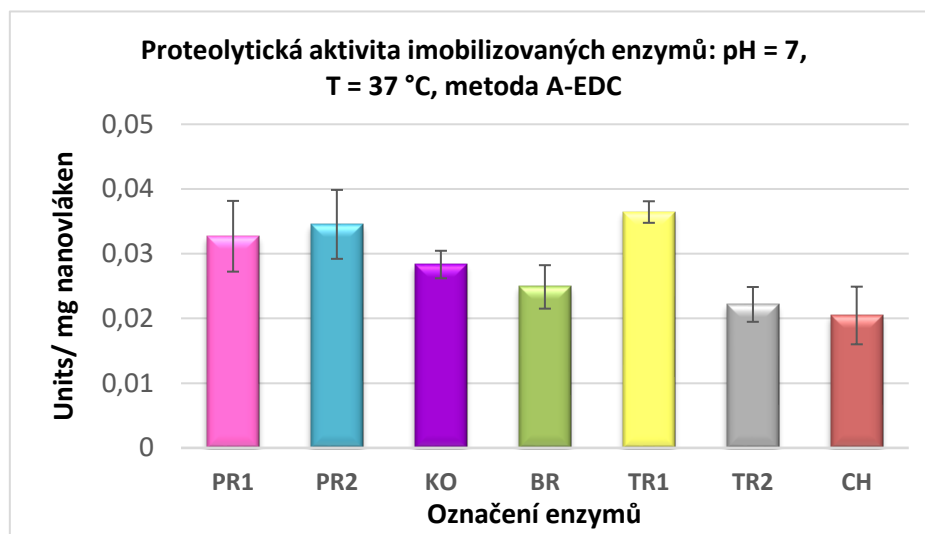
4.3.5 Metoda úpravy nanovláken C-GLU

Tato metoda s využitím glutaraldehydu byla optimalizována a byla používána pouze jako srovnávací. Přesný postup je uveden v disertační práci v kapitole 3.2.5.

4.4 Imobilizace enzymů a vliv reakčních podmínek na jejich aktivitu

Imobilizováno bylo postupně 7 druhů enzymů, byly vybrány enzymy rostlinné, živočišné i bakteriální. Nejprve byly provedeny základní testy aktivity enzymů při standardních podmínkách (teplota 37 °C, pH = 7, Obrázek 6), 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.



Obrázek 6: 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).

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.

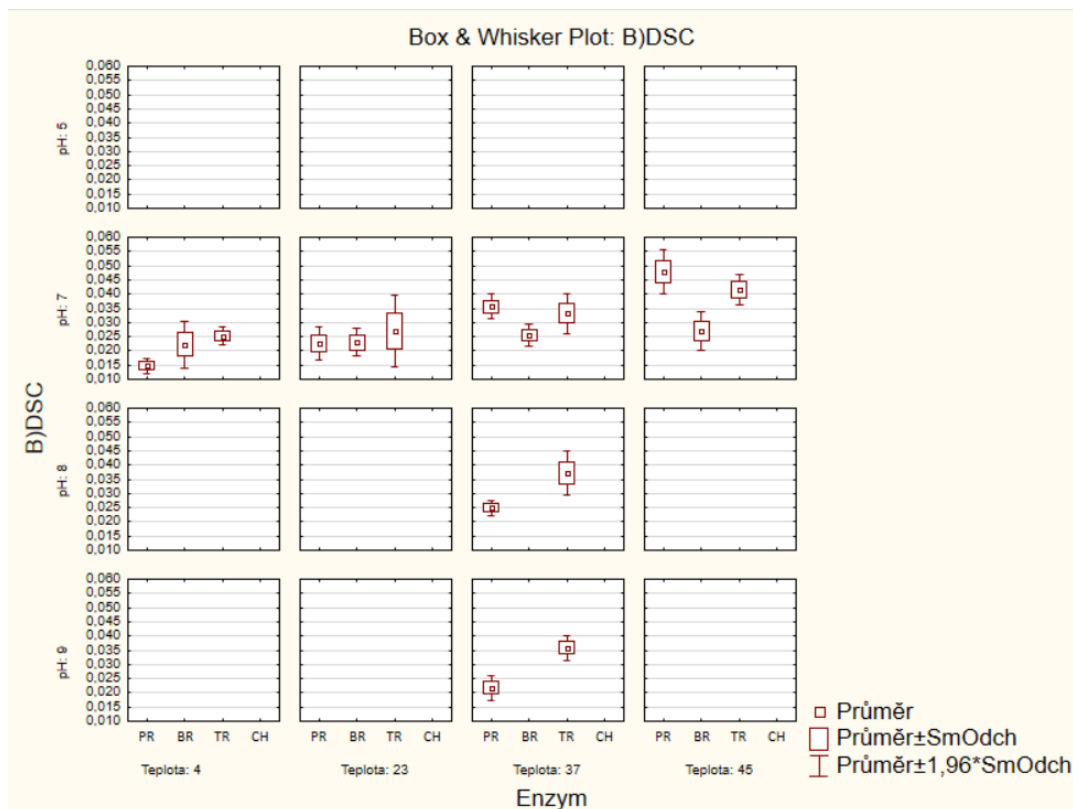
V kapitolách 4.4.1 až 4.4.3 jsou uvedeny výsledky, které byly zpracovány pomocí statistického programu TIBCO Statistica. Všechny naměřené výsledky byly rozděleny podle druhu výsledku do několika skupin tak, aby byly porovnatelné. Největší skupinu výsledků tvořily testy proteolytické aktivity imobilizovaných 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.

Další skupinou výsledků byly testy cytotoxicity v závislosti na použité metodě funkcionalizace, kde očekávaným výsledkem bylo označení metody, která neprokazuje cytotoxicitu vůči buněčným liniím *in vitro* 4.6. Poslední skupinou výsledků byly testy stability vzorků v závislosti na použité metodě funkcionalizace nanovláken i použitým enzymu. Testy *in vitro*

na prasečí kůži nebyly nijak kvantifikovány, sloužily pouze jako vizuální důkaz toho, že vyrobené vzorky splňují svou hlavní funkci.

4.4.1 Testování aktivity enzymů v závislosti na metodě funkcionalizace nanovláken

Nejvíce testů bylo provedeno pro metodu A-EDC. Zde jsou uvedeny výsledky pro metodu B-DSC, která byla vyhodnocena jako nejvhodnější metoda. Na Obrázku 7 je vidět box plot statistika pro ty kombinace hodnoty pH a teploty, které byly pro metodu B-DSC měřeny.



Obrázek 7: Box plot statistika pro metodu B-DSC. 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 3 je uveden výsledek HSD testu pro metodu B-DSC teplotu 37 °C a pH = 7. Protože byla tato statistika provedena pro všechny naměřené kombinace pH a teploty, je možné vytvořit

Tabulku 4. 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 %. Nejvyšší aktivita byla naměřena 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.

Tabulka 3: HSD test pro porovnání všech možných párů středních hodnot vybrané skupiny – červeně označené se liší, černě označené se neliší, metoda B-DSC, teplota = 37 °C, pH = 7.

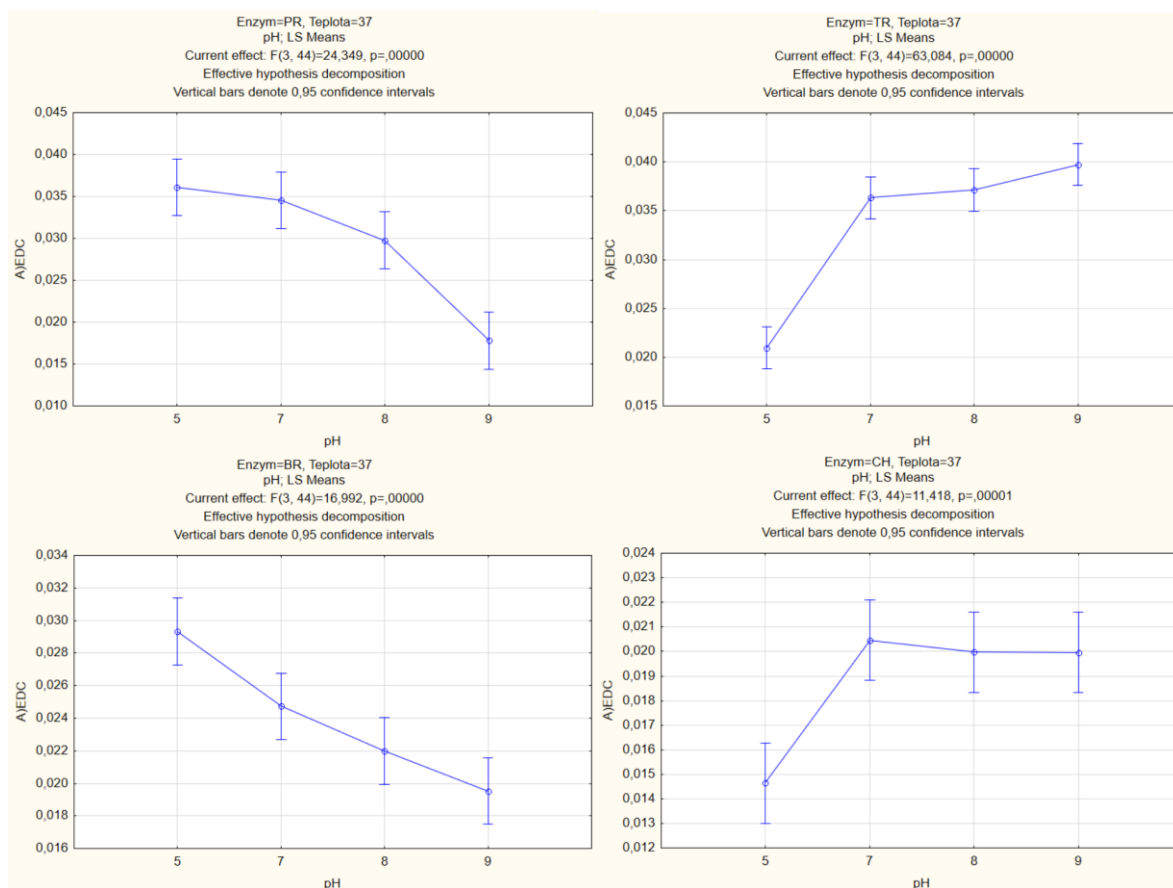
Teplota=37, pH=7 Tukey HSD test; variable B)DSC (Spreadsheet1) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,00001, df = 33,000				
Cell No.	Enzym	{1}	{2}	{3}
1	PR	,03555	0,000126	0,121855
2	BR	0,000126		0,000126
3	TR	0,121855	0,000126	

Tabulka 4: Porovnání aktivity enzymů bromelain (BR), trypsin (TR), proteáza (PR) a chymotrypsin (CH) 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	

4.4.2 Testování proteolytické aktivity enzymů v závislosti na hodnotě pH

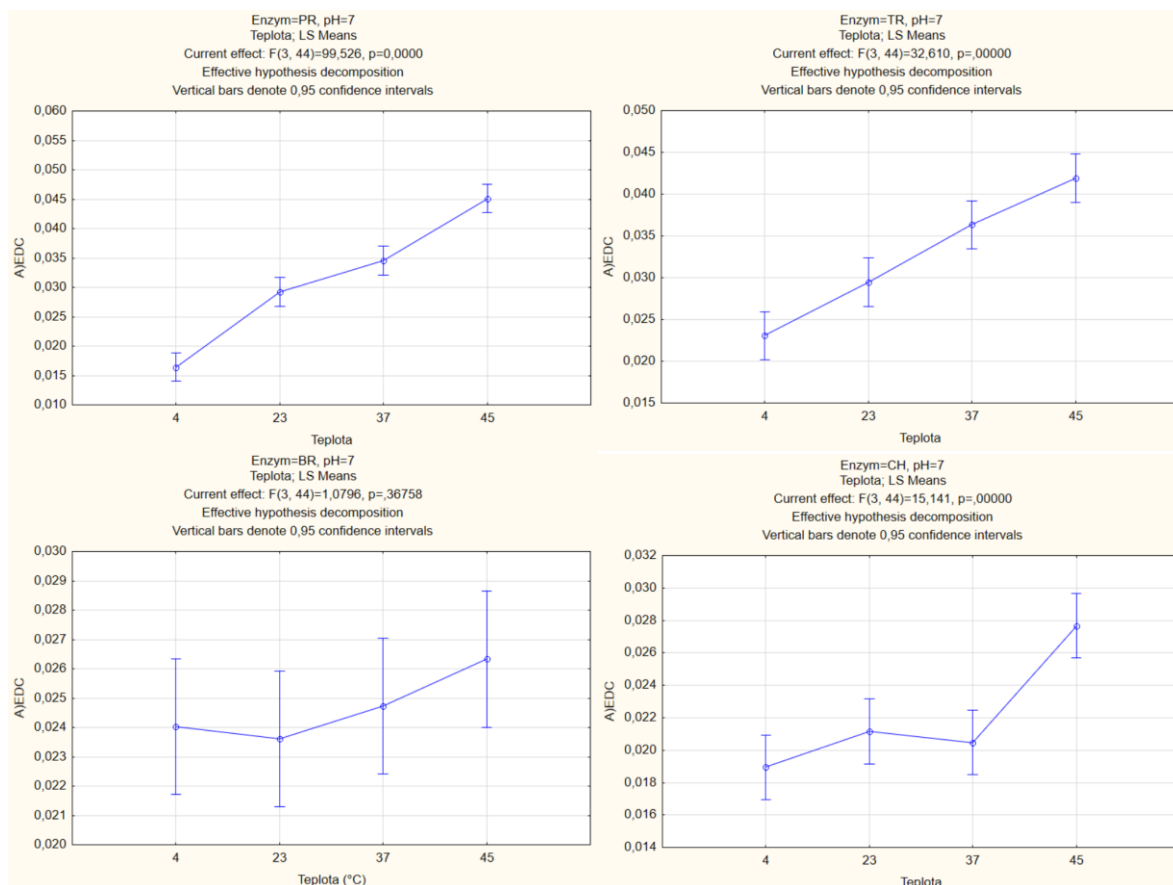
Na Obrázku 8 je možné vidět pH závislost jednotlivých enzymů pro metodu úpravy nanovláken A-EDC. V měřeném rozsahu pH hodnot se aktivita proteázy a bromelianu se zvyšujícím pH snižuje a u trypsinu a chymotrypsinu naopak zvyšuje. Pokud srovnáme proteolytickou aktivitu enzymů v jednotkách Units/mg nanovláken (osa y na Obrázku 8), 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 8: 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.

4.4.3 Testování proteolytické aktivity v závislosti na teplotě

Podobně byla proměřena i závislost aktivity na teplotě. Výsledné grafy jsou uvedeny na Obrázku 9. 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) 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 9: 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

4.5 Sterilizace vyrobených vzorků

Před samotnými testy cytotoxicity bylo nutné vyřešit problém, jak sterilizovat křemičitá nanovlákná s imobilizovanými enzymy. Nejčastější metody sterilizace biodegradabilních vzorků jsou napsány v Tabulce 5. Uveden je i fakt, zda jsme daný druh sterilizace vyzkoušeli a jaký byl výsledek. Většina z obvyklých metod nemohla být použita. 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.

Tabulka 5: 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 6
Chemické	Ethylenoxid	Ano, Testy viability buněk	Zvýšení cytotoxicity materiálu	Obrázek 12
	Ethanol	Ano, Testy viability, Testy aktivity	Možné použít pouze do kroku funkcionalizace	Obrázek 13 Obrázek 7
	Propylenglykol	Ano, Testy viability, Testy aktivity	Zvýšení cytotoxicity materiálu, snížení aktivity enzymů	Obrázek 13,
	Glycerol	Ano, ale vlákna se rozpadala	Změny struktury vláken	
Mechanické	Filtrace	Ano, Testy viability, Testy aktivity	Vhodné od kroku funkcionalizace vláken	Obrázek 13, 7

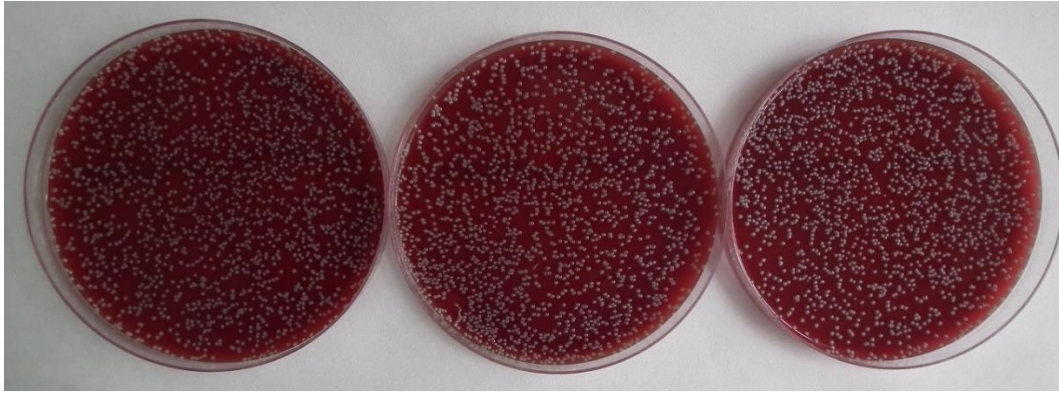
Sterilizace UV-A zářením

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. My jsme otestovali vliv UV-A záření na proteolytickou aktivitu imobilizovaných enzymů (Tabulka 6) a antibakteriální aktivitu (Obrázek 10 a 11). Proteolytická aktivita byla měřena při teplotě 37 °C a pH = 7 pomocí Lowryho metody. Překvapivě se aktivita po ozáření vzorku zvýšila u pěti ze šesti vzorků.

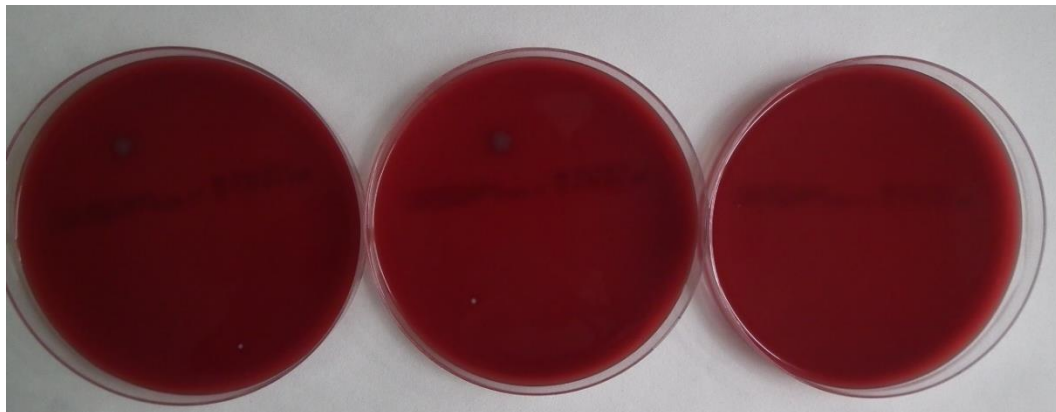
Tabulka 6: Vliv ozáření pomocí UV-A na proteolytickou aktivitu enzymů.

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

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.



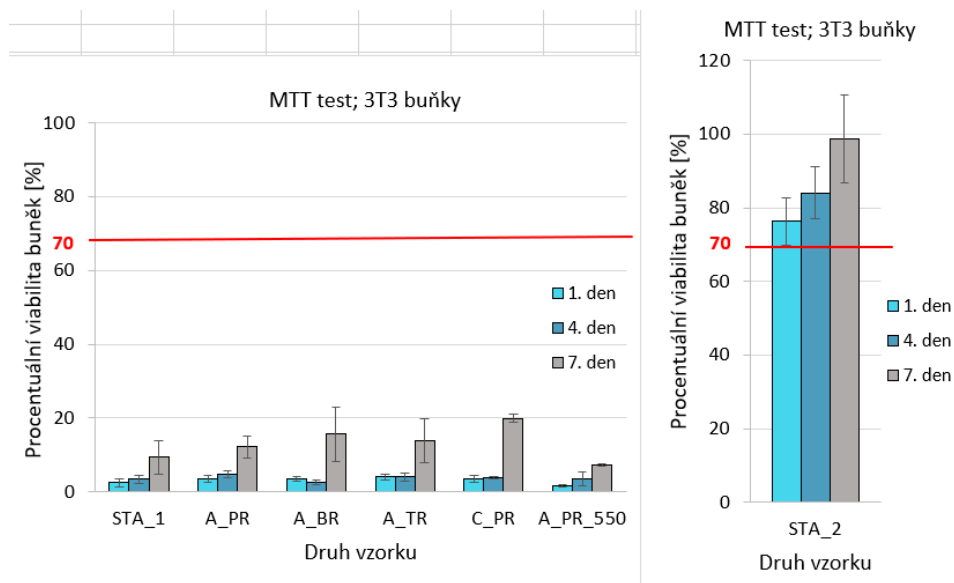
Obrázek 10: Výsledek testu AATCC100 pro nanovláčna s imobilizovaným enzymem bez ozáření UV-A. Průměrný počet kolonií S.A. byl 570.



Obrázek 11: Výsledek testu AATCC100 pro nanovláčna s imobilizovaným enzymem po ozáření UV-A. Průměrný počet kolonií S.A. byl 1 kolonie.

Sterilizace ethylenoxidem

Vyzkoušena byla i metoda sterilizace pomocí studeného ethylenoxidu, po které následovalo 14 dní odvětrání vzorků. Po této době byly vzorky podrobeny cytotoxickým testům MTT. Při porovnání výsledků MTT testu standardních křemičitých nanovláken stabilizovaných na teplotu 260 °C a sterilizovaných pomocí ethylenoxidu (označeno na levém grafu Obrázku 12 jako STA_1) a stejných křemičitých vláken sterilizovaných v autoklávu (označeno na pravém grafu Obrázku 12 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 samotných křemičitých nanovláken 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 12: 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 bromelánem (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).

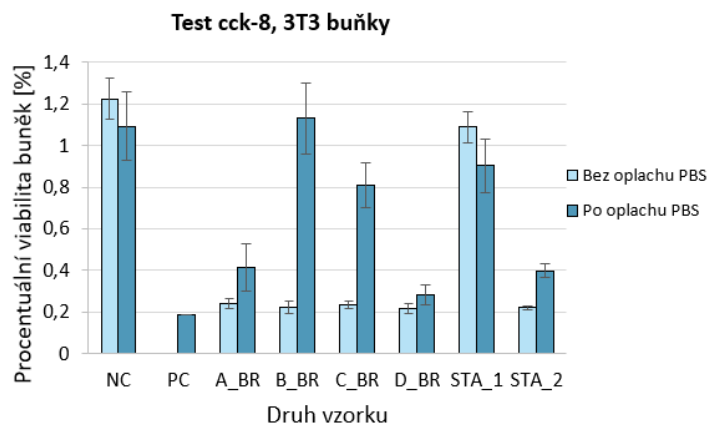
Sterilizace ethanolem a filtrací

Nakonec se optimalizoval postup dvoustupňové sterilizace – pomocí ethanolu a následné filtrace kapalin. Vlákná byla po zvláknění, tepelné stabilizaci, silanizaci a prvním kroku funkcionalizace sterilizována pomocí ethanolu. Dále byly všechny další reagentie sterilizovány pomocí filtrace přes filtry s průměrem pórů 0,22 μm a bylo již dále pracováno pouze ve sterilním biohazard boxu.

4.6 Testování cytotoxicity vyrobených materiálů in vitro

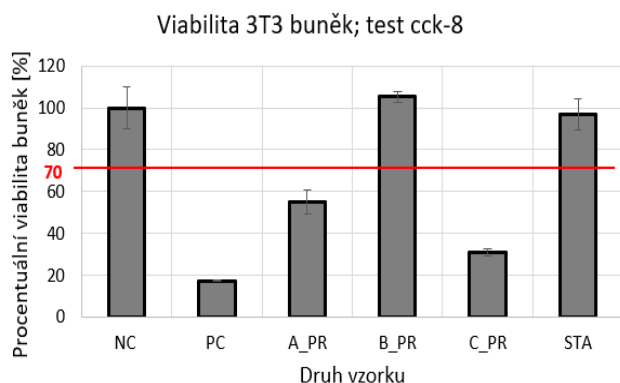
In vitro testování cytotoxicity probíhalo v souladu s normou ČSN EN ISO 10993-5, kde je také uvedeno, že snížení životaschopnosti buněk o více než 30 % oproti kontrole je považováno za cytotoxický účinek. Použity byly metody MTT, cck-8 nebo AlamarBlue.

Bližší informace o jednotlivých testech jsou popsány v disertační práci. Zde bych uvedla zejména výsledky testů cck-8 provedených pomocí 3T3 myších fibroblastů. Na Obrázku 13 jsou uvedeny rozdíly v míře toxicity pro vzorky bez oplachu ve fosfátovém pufru (PBS) a po oplachu 2x na 2 hodiny v PBS. Po oplachu se viabilita buněk u všech vzorků zvýšila. Jako netoxické materiály byly 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. Tyto výsledky jsou také důvodem, proč byla hledána jiná metoda funkcionalizace povrchu nanovláken než metoda A-EDC.

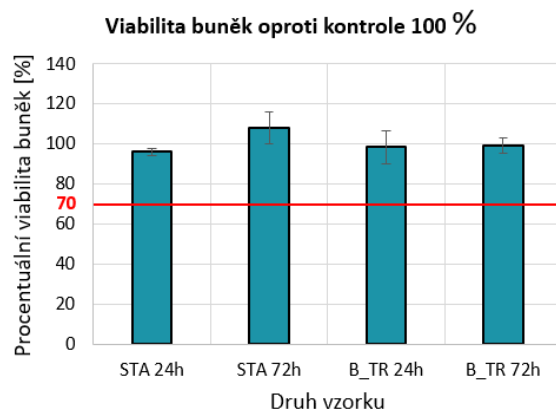


Obrázek 13: Porovnání viability 3T3 buněk před oplachem a po oplachu PBS: negativní kontrola (NC), pozitivní kontrola (PC), metoda A-EDC s bromelainem (A_BR), metoda B-DSC s bromelainem (B_BR), metoda C-GLU s bromelainem (C_BR) metoda D s bromelinem (D_BR), standard sterilizovaný ethanolem (STA_1), standard sterilizovaný propylenglykolem (STA_2)

Pro potvrzení těchto výsledků je uveden na Obrázku 14 graf výsledků testu cck-8. Jedná se o měření cytotoxicity výluhem. Po oplachu vzorků v PBS 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 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. Pro potvrzení výsledků byla ještě testována viabilita 3T3 buněk výluhem metodou AlamarBlue pro metodu úpravy nanovláken B-EDC s trypsinem. Proveden byl výluh buď 24 hodin nebo 72 hodin. Výsledky oproti kontrole (100 %) jsou uvedeny na Obrázku 15. Testovaný standard nanovláken i vzorku se prokázaly jako netoxické pro 3T3 buňky.



Obrázek 14: 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).



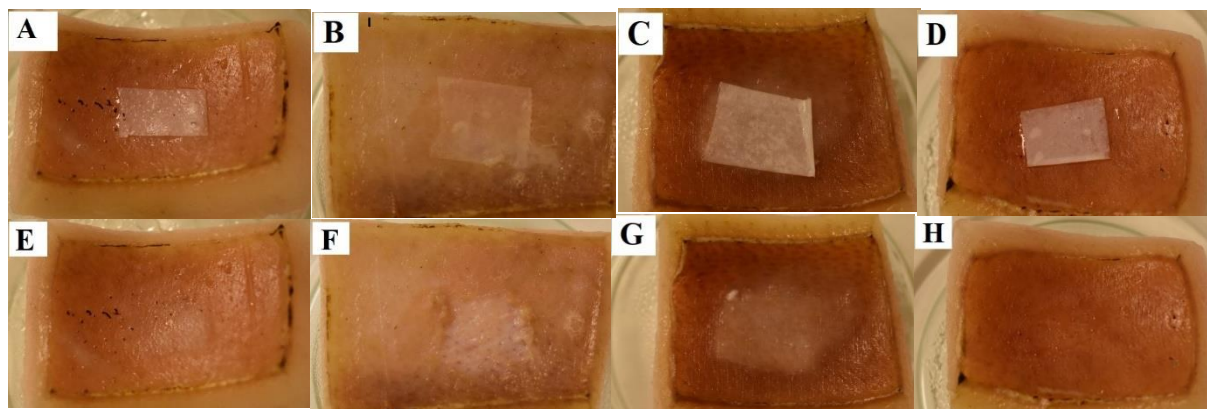
Obrázek 15: Procentuální viabilita 3T3 buněk, test AlamarBlue: výluh 24 hodin standardu nanovláken (STA 24h), výluh 72 hodin standardu nanovláken (STA 72h), výluh 24 hodin nanovláken upravených metodou B-DSC s trypsinem (B_TR 24h), výluh 72 hodin nanovláken upravených metodou B-DSC s trypsinem (B_TR 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.

4.7 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 po dobu 24 hodin. 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.

Příkladem uvádíme na Obrázku 16 snímky nanovláken upravených 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 nedošlo k žádné změně.



Obrázek 16: Prasečí kůže po 24 hodinách inkubace, v levém sloupci s nanovláknem, v pravém po odstranění nanovláken. Nanovláknem upraveným metodou A-EDC s proteázou (A, E) upraveným metodou B-DSC s proteázou (B, F), upraveným metodou B-DSC s trypsinem (C, G), standard bez úpravy (D, H).

4.8 Testování stability nanovláken s imobilizovanými enzymy

Provedeny byly také 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. V Tabulce 7 jsou pro příklad uvedeny výsledky pro metodu B-DSC. 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 7: 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 [°C]			Teplota skladování [°C]		
	-20	4	21	-20	4	21
Enzym						
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. Prokázáno bylo, že bromelain má nejnižší zbytkovou aktivitu – byl tedy označen za nestabilní. Pokud si budeme všimnout 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 Zhodnocení výsledků

Provedena byla rozsáhlá rešerže 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 narážíte na problém, že byste po modelových testech museli provést ještě nepřehledné 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 nanovláken – u imobilizovaných enzymů se ale určovala jejich aktivita jinak než u volných enzymů v roztoku. Připočítáme-li k tomu nepřehledné 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 lahvičkou). 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.

6 Doporučení na pokračování práce

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 vytříbily 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 ozáření 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.

7 Seznam publikovaných prací studenta DSP

h-index: 1

Databáze Web of Science:

FILOVÁ, E., aj. Polycaprolactone foam functionalized with chitosan microparticles – a suitable scaffold for cartilage regeneration. *Physiological Research*. Praha: Institute of Physiology, Czech Academy of Sciences, 2016, roč. 65, č. 1. S. 121 – 131. ISSN 0862-8408. /IF=1,643, 5 citací/

DANILOVÁ, I. a I. LOVĚTINSKÁ ŠLAMBOROVÁ. 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., 2016, s. 509 – 513. ISBN 9788087294710.

LOVĚTINSKÁ ŠLAMBOROVÁ, I., P. EXNAR, I. DANILOVÁ a I. VEVERKOVÁ. Medical and Biochemical Applicability of Silica Nanofibers. *NART 2015: NANOFIBERS, APPLICATIONS AND RELATED TECHNOLOGIES*. Liberec: Technical University of Liberec, 2015, s. 263 – 269. ISBN 978-80-7494-265-5. /1 citace/

EXNAR, P., I. LOVĚTINSKÁ ŠLAMBOROVÁ, I. VEVERKOVÁ a I. DANILOVÁ. Antimicrobial Hybrid Nanolayers Prepared by Sol-Gel Method. *NANOCON 2015 – Conference Proceedings, 7th International Conference on Nanomaterials – Research and Application*. Ostrava: TANGER Ltd., 2015, s. 525 – 529. ISBN 978-80-87294-63-5. /1 citace/

Databáze Scopus:

DANILOVÁ, I. a I. LOVĚTINSKÁ ŠLAMBOROVÁ. Immobilization of Proteolytic Enzymes onto Silica Nanofibers. *Fibres and textiles (Vlákna a textil)*. Bratislava: Slovenská technická univerzita v Bratislave, 2018, roč. 25, č. 4. S. 16 – 19. ISSN 1335-0617.

DANILOVÁ, I., aj. Immobilization of Esterase Enzyme Onto Silica Nanofibers for Biomedical Applications. *Fibres and textiles (Vlákna a textil)*. Bratislava: Slovenská technická univerzita v Bratislave, 2014, roč. 21, č. 2, s. 3 – 11. ISSN 1335-0617. /2 citace/

Ostatní publikace:

PRSTKOVÁ, K., I. DANILOVÁ, M. KRAUSE a Š. MICHETSCHLÄGEROVÁ. XI. Liberecké konference nelékařských oborů a XII. Studentské vědecké konference. Technická Univerzita v Liberci, 2019. [konference].

DANILOVÁ, I. a I. LOVĚTINSKÁ ŠLAMBOROVÁ. Several Types of Ligands for the Covalent Immobilization of Proteolytic Enzymes onto Silica Nanofibers. *Journal of Tissue Science & Engineering: Proceedings of 13th International Conference on Tissue Engineering & Regenerative Medicine*. London: Conference Series LLC Ltd, 2019. S. 54. ISSN 2157-7552.

DANILOVÁ, I. Nanovlákna s enzymy jako vhodný materiál pro enzymatický debridement. *SBORNÍK PŘÍSPĚVKŮ XI. Liberecké konference nelékařských oborů a XII. Studentské vědecké konference*. Liberec: Technická univerzita v Liberci, 2019. S. 20 – 22. ISBN 978-80-7494-494-9.

DANILOVÁ, I. a I. LOVĚTINSKÁ ŠLAMBOROVÁ. Silica Nanofibers with Immobilized Proteolytic Enzyme for Dermal Applications. ICBMBA 2018: The 20th international research conference proceedings. Lisbon:, 2019. S. 1796 – 1799

DANILOVÁ I., I. LOVĚTINSKÁ ŠLAMBOROVÁ. Nové směry v zamezení vzniku biofilmu ve zdravotnickém zařízení. *Hygiena*. 1. vyd. Praha: Státní zdravotní ústav, 2017, roč. 62, č. 3, s. 85-89. ISSN 1802-6281. /recenzovaný časopis/

DANILOVÁ, I. a I. LOVĚTINSKÁ ŠLAMBOROVÁ. Immobilization of Proteolytic Enzymes onto Silica Nanofibers. 9th Central European Conference on Fibre Grade Polymers, Chemical Fibres and Special Textiles, International Ph.D. Students Day. Liberec: Technická univerzita v Liberci, 2017. S. 18 – 21. ISBN 978-80-7494-355-3.

DANILOVÁ, I. a I. LOVĚTINSKÁ ŠLAMBOROVÁ. Immobilization of proteolytic enzymes onto silica nanofibers. *Journal of Tissue Science & Engineering: Conference Proceedings – 7th International Conference on Tissue Engineering & Regenerative Medicine*. Barcelona, 2017. S. 81. ISSN 2157-7552.

DANILOVÁ, I., I. LOVĚTINSKÁ ŠLAMBOROVÁ a P. HOLÝ. Immobilization of Biomolecules on Silica Nanofibers. *Preparation of Ceramic Materials, Proceedings of the XI. International Conference*. 1. vyd. Herľany: Technical University of Košice, 2015. S. 142 – 144. ISBN 978-80-553-2122-6.

LOVĚTINSKÁ ŠLAMBOROVÁ, I., aj. Křemičitá nanovlákná pro léčbu chronických ran. *Zdravotnické Listy*. 1. vyd. Trenčín: Trenčianska univerzita Alexandra Dubčeka v Trenčíně, 2014, roč. 2, č. 4., s. 6 – 13. ISSN 1339-3022. /recenzovaný časopis/

8 Seznam použité literatury

BAYAT, Samaneh, Nafise AMIRI, Elham PISHAVAR, Fatemeh KALALINIA, Jebraail 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

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

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

LOVĚTINSKÁ-ŠLAMBOŘOVÁ, Irena, Petr EXNAR, Lenka VATAHOVÁ a Iveta DANILOVA, 2014. Křemičitá nanovlákná 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.

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.

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

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>

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

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

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

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%5Babc_group%5D=D03BA52&data%5Bwith_adv%5D=0

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

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 biomedicínálního inženýrství a pro postgrad. kursy]*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 978-80-7080-124-6.

9 Curriculum Vitae

Jméno	Ing. Iveta Danilová
Datum narození	8. 11. 1988
Adresa	K Hájku 1708, 50901 Nová Paka
Kontakt	iveta.danilova@tul.cz

VZDĚLÁNÍ

2013 – současnost	Technická univerzita v Liberci, Fakulta textilní <i>Textilní technika a materiálové inženýrství, doktorské studium</i>
2011 – 2013	Technická univerzita v Liberci, Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií <i>Nanotechnologie, 2. leté navazující studium</i>
2008 – 2011	Technická univerzita v Liberci, Ústav zdravotnických studií <i>Biomedicínská technika, 3. leté bakalářské studium</i>
2004 – 2008	Gymnázium a střední odborná škola pedagogická, Nová Paka <i>Všeobecné gymnázium</i>

OSOBNÍ SCHOPNOSTI A DOVEDNOSTI

Jazykové znalosti	Anglický jazyk: aktivní Německý jazyk: začátečník
Odborné dovednosti	Řidičský průkaz skupiny B
Počítačové dovednosti	Velmi dobré uživatelské dovednosti v prostředí MS Office, PowerPoint a internetovém prostředí Základní znalost programovacího prostředí MATLAB
Záliby	Cyklistika, cestování, četba knih, šití a hra na housle
Komunikační schopnosti a organizační dovednosti	Dobré komunikační schopnosti a práce v týmu Spolehlivost, samostatnost a učenlivost

10 Stručná charakteristika dosavadní odborné, výzkumné a vědecké činnosti

Konference:

- 9. Mezinárodní konference: *Preparation of Ceramic Materials*. **1. místo v soutěži mladých** za poster s názvem Immobilization of Biomolecules on Silica Nanofibers. Herľany, 2015.
- 8th International Conference of Nanomaterials *NANOCON 2016*. Poster s názvem Immobilization of enzymes on the silica nanofibers for burns treatment. Brno, 2016.
- 7th International Conference on Tissue Engineering & Regenerative Medicine. Poster s názvem Immobilization of proteolytic enzymes onto silica nanofibers. Barcelona, 2017.
- 13th International Conference on Tissue Engineering & Regenerative Medicine, Paris, 2019. Poster s názvem Several Types of Ligands for the Covalent Immobilization of Proteolytic Enzymes onto Silica Nanofibers
- 9th Central European Conference on Fibre Grade Polymers, Chemical Fibres and Special Textiles, Liberec, 2017. Poster s názvem Immobilization of Proteolytic Enzymes onto Silica Nanofibers. **Cena za nejlepší poster v rámci International Ph.D. Students Day**
- *ICBMBA 2018: The 20th international research conference on Bioceramic Materials for Biomedical Applications*, Lisbon, 2019. Přednáška na téma Silica Nanofibers with Immobilized Proteolytic Enzyme for Dermal Applications. **Cena za nejlepší přednášku konference**
- *International Conference on Nanoscience, Nanotechnology and Advanced Materials (IC2NM)*, Saint Petersburg, 2019. Přednáška na téma Testing of a Suitable Procedure of Immobilization the Proteolytic Enzymes into Silica Nanofibers as a Painless Enzyme Debridement.

Letní škola:

Regenerative Nano-Medicine: From Advanced Delivery Systems to Electronic-Based Devices, Tel Aviv University, 2016. / aktivní účast formou posteru s prezentací/

Comprehensive Summer School on Tissue Engineering: from biology to materials and products validation, Trento, Itálie, 2018.

Kurzy:

- „Funkce a struktura buněčných membrán“, Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha, 2013
- „Scaffoldy a tkáňové inženýrství“, Contipro Biotech, Dolní Dobruč, 2014
- „Charakterizace pevných materiálů“, Projekt SESKUPIT, Univerzita Pardubice, 2017
- „Dotační programy sekce ochrany a podpory veřejného zdraví MZ ČR na zvýšení gramotnosti v komunitách“, Institut postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví, Praha, 2017

Pracovní stáž: *Trenčínská univerzita Alexandra Dubčeka v Trenčíně*, 11-12/2015

11 Vyjádření školitelky doktorandky

Vyjádření školitelky k disertační práci

Disertační práce na téma „Vývoj nanovláknenných nosičů pro biomedicínské aplikace“, kterou vypracovala Ing. Iveta Danilová, je zaměřena na vývoj a optimalizaci postupu imobilizace proteolytických enzymů na křemičitá nanovláknna. Takto připravená nanovláknna jsou určena k bezbolestnému odstranění nekrotické tkáně chronických, těžce se hojících ran. V rámci této práce byla provedena rozsáhlá rešerše zaměřená na současné možnosti odstranění nekrotické tkáně.

Druhá část práce byla zaměřena na nalezení vhodného činidla a optimalizaci nejvhodnějšího postupu kovalentní imobilizace vybraných proteolytických enzymů na nanovláknna. Jako nejvhodnější byl vybrán N,N'-Disuccinimidyl karbonát, který nevykazoval cytotoxicitu.

Dalším úkolem bylo vybrat nejvhodnější proteolytické enzymy, proměřit jejich proteolytickou aktivitu pomocí spektrofotometrických metod za různých podmínek. Sledoval se vliv teploty na stabilitu enzymů, změny hodnot pH, přítomnost inhibitorů a další faktory. Všechny připravené materiály byly testovány na cytotoxicitu.

Účinnost vytvořených nanovláken s imobilizovaným enzymem byla ověřena pomocí in vitro testů na prasečí kůži. V rámci práce byl řešen nejvhodnější způsob sterilizace materiálu tak, aby nedošlo ke snížení proteolytického účinku enzymů. Studována byla také stabilita připraveného materiálu při zachování své účinnosti.

V neposlední řadě byly vtipovány nejvhodnější enzymy, které splňovaly veškerá kritéria materiálu pro odstranění nekrózy.

Předložená disertační práce je velmi aktuální. Řeší téma, které je problematické, protože bezbolestné a šetrné odstranění nekrózy je prvním krokem k léčbě a vlastnímu zahojení

problematických ran. Oceňuji samostatnost a přístup doktorandky, která provedla obrovské množství testů z různých oblastí.

Formální stránka práce je v naprostém pořádku, všechny literární zdroje jsou správně citovány.

Kontrola plagiátorství proběhla dne 27. 5. 2020 a neprokázala žádnou relevantní podobnost s jinou prací.

Předložená práce splňuje všechny požadavky kladené na doktorskou práci.

Proto práci doporučuji k obhajobě.

doc. Mgr. Irena Lovětinská Šlamborová, Ph.D.

KCH FP TUL

V Liberci dne 1. 6. 2020

12 Oponentské posudky disertační práce

Oponentský posudek disertační práce.

Autor práce: *Ing. Iveta Danilová, provdaná Zvercová.*

Název práce: *Vývoj nanovlákných nosičů pro biomedicínské aplikace.*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

doc. Ing. Ladislav Burgert, CSc.

Ústav chemie a technologie makromolekulárních látek.

Fakulta chemicko-technologická.

Univerzita Pardubice.

Pardubice, 6. ledna 2021.

Oponentský posudek disertační práce

Autor: Ing. Iveta Danilová,

Fakulta textilní, TUL Liberec

Název: Vývoj nanovláknenných nosičů pro bimedické aplikace

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

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

S tímto také souvisí struktura praktické části doktorské práce, jak ukazují názvy jednotlivých kapitol (Křemičité nanovláknena a vliv teploty stabilizace na jejich vlastnosti, Úprava povrchu nanovláken, Imobilizace proteolytických enzymů apod.). Autorka sleduje řadu dalších faktorů, vztahujících se k testování proteolytické aktivity enzymů, testování stability nanovláken s imobilizovanými enzymy aj. Završením práce jsou pak *in vitro* testy realizované

se zkoumanými materiály na prasečí kůži. Jedná se o široce pojatý průzkum dané problematiky, který naznačuje perspektivy a další směřování vědecké činnosti v uvedené oblasti, k čemuž se autorka vyjadřuje v kapitole Doporučení na pokračování ve výzkumu. Mezi výstupy náleží např. použití trypsinu z hovězího pankreatu, metoda úpravy nanovláken pomocí DSC (negativní testy na cytotoxicitu). Autorka též navrhla vhodnou metodu sterilizace vzorků.

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

1) Jaký význam má použití karbodiimidů při imobilizaci?

2) S jakým vymezením tématu se počítá do budoucna?

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

prof. Ing. Karel Kolář, CSc.

Katedra chemie a didaktiky chemie

Pedagogická fakulta UK

Praha