

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Vývoj chitosanových nanomateriálů s ligandem pro regenerativní medicínu
Bc. Petra Behančínová

Diplomová práce
2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Petra Behančínová**
Osobní číslo: **C17428**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Vývoj chitosanových nanomateriálů s ligandem pro regenerativní medicínu**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Teoretická část:

- vývoj nanomateriálů v oblastech biomedicíny a regenerace tkání, epidermální růstový faktor
- nově vyvíjené (nano)materiály, způsob imobilizace ligandů
- souhrn detekčních metod proteinů a peptidů
- metody pro hodnocení uvolňování ligandů z (nano)materiálů

Experimentální část:

- metoda entrapmentu modelového proteinu do nanočástic a sledování jeho uvolňování v čase.
- kovalentní vazba a sorpce modelového proteinu na nanovlákná anebo nanočástice.
- srovnání výsledků účinností vazebných technik modelového proteinu na nanomateriály
- výběr metody a materiálu pro vazbu lidského rekombinantního EGF na nanomateriály

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **21. prosince 2018**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že 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, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne

.....

Bc. Petra Behančínová

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych chtěla poděkovat Mgr. Marcele Slovákové, Ph.D. za cenné rady, odborné konzultace a za trpělivost při vedení mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Jiřímu Palarčíkovi, Ph.D. z Ústavu enviromentálního a chemického inženýrství za pomoc s analýzou nanočástic.

V poslední řadě bych ráda poděkovala i své rodině a partnerovi za jejich veškerou podporu v průběhu celého mého studia.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá přípravou a charakterizací nanočástic a nanovláken z chitosanu s vázanými proteiny pro svůj potenciál v oblasti cíleného doručování a dlouhodobého uvolňování léčiv. Do nanomateriálů byl metodou entrapmentu, adsorpcí a karbodiimidovou metodou vázán ovalbumin. Pomocí protein nescifických analytických metod byla hodnocena účinnost vazby a míra uvolnění ovalbuminu z nosičů. Z výsledků účinností vazby byla vybrána vhodná koncentrace pro vazbu epidermálního růstového faktoru metodou entrapmentu na chitosanové nanočástice a byla sledována míra jeho uvolnění z nanočástic.

KLÍČOVÁ SLOVA

Chitosan, nanočástice, nanovlákná, alginát sodný, epidermální růstový faktor, drug delivery systém

TITLE

Development of Chitosan Nanomaterials With Ligand for the Purposes of Regenerative Medicine.

ANNOTATION

The subject of this diploma thesis is the preparation and characterization of nanoparticles and nanofibers with bound proteins generated from chitosan because of their potential for targeted delivery and long-term drug release. Ovalbumin has been bound to the nanomaterials by entrapment, adsorption, and carbodiimide method. The binding efficiency and release rate of ovalbumin from the carriers was evaluated by protein-non-specific analytical methods. A suitable concentration for epidermal growth factor binding by entrapment method to chitosan nanoparticles was selected through the comparison of binding efficiency and the rate of its release from the nanoparticles was monitored.

KEYWORDS

Chitosan, nanoparticle, nanofiber, sodium alginate, epidermal growth factor, drug delivery systems

OBSAH

Úvod	15
1 Teoretická část.....	16
1.1 Aplikace nanotechnologií v regenerativní medicíně a drug delivery systémech..	16
1.1.1 Nanovláknna	16
1.1.2 Nanočástice	17
1.2 Růstové faktory drug delivery systémů	19
1.2.1 Epidermální růstový faktor	20
1.2.2 Fibroblastový růstový faktor.....	21
1.2.3 Destičkový růstový faktor.....	22
1.3 Příprava nanomateriálů pro biomedicínu.....	22
1.3.1 Metody přípravy nanočástic.....	22
1.3.2 Výroba nanovláken	25
1.3.3 Charakterizace biomateriálů	27
1.3.4 Polymery využívané k přípravě nanomateriálů	30
1.4 Metody imobilizace ligandů	35
1.4.1 Adsorpce	36
1.4.2 Entrapment.....	36
1.4.3 Crosslinking	37
1.4.4 Enkapsulace	37
1.4.5 Kovalentní imobilizace	38
1.5 Metody detekce proteinů a peptidů.....	39
1.5.1 Přímé spektrofotometrické metody.....	39
1.5.2 Kolorimetrické metody	40
1.5.3 Fluorescenční stanovení.....	43
1.5.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	43
1.5.5 Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu	44
1.5.6 Isoelektrická fokusace.....	46
1.5.7 Imunochemické metody detekce	46
1.6 <i>In vitro</i> studie uvolňování léčiv z nanosystémů.....	49
2 Cíl práce	51

3	Experimentální část.....	52
3.1	Přístroje a pomůcky	52
3.2	Reagencie a chemikálie	53
3.2.1	Použitá nanovlákná	53
3.2.2	Použitá reagencie a chemikálie.....	53
3.3	Zachycení ovalbuminu do chitosanových nanočástic.....	55
3.3.1	Hodnocení účinnosti zachycení ovalbuminu	56
3.4	Sledování uvolňování proteinu z připravených nanočástic	56
3.5	Karbodiimidová vazba ovalbuminu na chitosanová nanovlákná	57
3.6	Karbodiimidová vazba ovalbuminu na chitosanové nanočástice	58
3.7	Adsorpce ovalbuminu na chitosanová nanovlákná.....	59
3.8	Adsorpce ovalbuminu na chitosanové nanočástice	60
3.9	Zapouzdření chitosanových částic s ovalbuminem do alginátu sodného	60
3.10	Zachycení epidermálního růstového faktoru do nanočástic	62
3.11	Sledování uvolňování epidermálního růstového faktoru z připravených nanočástic	62
3.12	Stanovení koncentrace proteinu bicinchoninovou metodou.....	63
3.12.1	Příprava kalibrační závislosti koncentrace ovalbuminu	63
3.12.2	Stanovení koncentrace ovalbuminu na částicích	64
3.12.3	Stanovení koncentrace ovalbuminu na nanovláknách	65
3.13	Měření hydrodynamické velikosti částic	65
3.14	Polyakrylamidová elektroforéza proteinů s SDS.....	66
3.15	Polyakrylamidová elektroforéza proteinů s SDS a tricinem.....	68
4	Výsledky a diskuse.....	70
4.1	Příprava chitosanových nanočástic s ovalbuminem metodou zachycení	70
4.1.1	Hodnocení metody entrapmentu ovalbuminu do nanočástic	76
4.2	Příprava nanočástic z chitosanu a alginátu sodného s ovalbuminem	78
4.3	Imobilizace ovalbuminu na chitosanové nanomateriály.....	81
4.3.1	Karbodiimidová vazba na chitosanová nanovlákná.....	82
4.3.2	Karbodiimidová vazba na chitosanové nanočástice	83

4.3.3	Hodnocení karbodiimidové vazby ovalbuminu na nanomateriály	84
4.4	Adsorpce ovalbuminu na nanomateriály	85
4.4.1	Adsorpce na chitosanová nanovlákna.....	86
4.4.2	Adsorpce na chitosanové nanočástice.....	87
4.4.3	Hodnocení metody sorpce ovalbuminu na nanomateriály.....	88
4.5	Zachycení epidermálního růstového faktoru do nanočástic	90
4.6	Sledování uvolňování proteinů z nanočástic	94
4.6.1	Sledování uvolňování ovalbuminu z nanočástic.....	94
4.6.2	Sledování uvolňování růstového faktoru z nanočástic	95
5	Závěr.....	97
	Použitá literatura	99

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Znázornění struktury některých typů nanočástic	17
Obrázek 2: Znázornění struktury EGFR.....	21
Obrázek 3: Typické uspořádání zařízení pro elektrostatické zvlákňování	26
Obrázek 4: SEM snímky chitosanových nanovláken a nanočástic	30
Obrázek 5: Schéma imobilizačních technik.	36
Obrázek 6: Znázornění účinku SDS na proteiny	44
Obrázek 7: Separace proteinů v polyakrylamidovém gelu.....	45
Obrázek 8: Znázornění uspořádání isoelektrické fokusace	46
Obrázek 9: Znázornění metody Western blottingu.....	47
Obrázek 10: Znázornění principu ELISA testu	48
Obrázek 11: Znázornění difúzního a erozního uvolňování aktivních látek z nanočástic ...	50
Obrázek 12: Distribuce DLS připravených CS/TPP nanočástic bez ovalbuminu.....	71
Obrázek 13: Distribuce DLS připravených CS/TPP nanočástic s 0,5 mg ovalbuminu.....	72
Obrázek 14: Distribuce DLS připravených CS/TPP nanočástic s 0,25 mg ovalbuminu....	74
Obrázek 15: Distribuce DLS připravených CS/TPP nanočástic s 0,15 mg ovalbuminu....	75
Obrázek 16: Distribuce DLS připravených CS/TPP částic.	79
Obrázek 17: Distribuce DLS připravených ALG-CS částic.....	80
Obrázek 18: SDS-PAGE ovalbuminu imobilizovaného na nanovlákná karbodiimidovou metodou a nespecifickou sorpcí proteinu.....	82
Obrázek 19: SDS-PAGE ovalbuminu imobilizovaného na nanočástice karbodiimidovou metodou.....	83
Obrázek 20: SDS-PAGE ovalbuminu imobilizovaného metodou sorpce na nanovlákná..	86
Obrázek 21: SDS-PAGE ovalbuminu imobilizovaného metodou sorpce na nanočástice..	87
Obrázek 22: Tricin-SDS-PAGE epidermálního růstového faktoru	91
Obrázek 23: Distribuce DLS připravených CS/TPP nanočástic s EGF.	93

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Různé charakteristiky a stručné aplikace nanosystémů	18
Tabulka 2: Techniky hodnocení fyzikálně-chemických vlastností nanomateriálů	27
Tabulka 3: Příprava kalibrační řady pro BCA metodu	64
Tabulka 4: Příprava polyakrylamidových gelů pro SDS-PAGE	67
Tabulka 5: Příprava gelů pro Tricin-SDS PAGE	69
Tabulka 6: Charakteristika CS/TPP nanočástic se zachyceným ovalbuminem (0,5 mg) metodou BCA	73
Tabulka 7: Charakteristika CS/TPP nanočástic se zachyceným ovalbuminem (0,25 mg) metodou BCA	75
Tabulka 8: Charakteristika CS/TPP nanočástic se zachyceným ovalbuminem (0,15 mg) metodou BCA	76
Tabulka 9: DLS velikost připravených CS/TPP částic	77
Tabulka 10: DLS velikost připravených ALG-CS částic	78
Tabulka 11: Charakteristika CS/TPP nanočástic s enkapsulovaným ovalbuminem metodou BCA	81
Tabulka 12: Porovnání výsledků karbodiimidové metody a nespecifické sorpce proteinu na nanovlákně metodou BCA	83
Tabulka 13: Stanovení koncentrace ovalbuminu kovalentně vázaného na nanočásticích metodou BCA	84
Tabulka 14: Stanovení koncentrace ovalbuminu na chitosanových nanovlákněch, účinnosti sorpce a sorpční kapacity nosiče metodou BCA	87
Tabulka 15: Stanovení koncentrace ovalbuminu na CS/TPP nanočásticích, účinnosti sorpce a sorpční kapacity nosiče metodou BCA	88
Tabulka 16: DLS velikost CS/TPP nanočástic s EGF (0,15 mg a 0,25 mg)	92
Tabulka 17: Charakteristika CS/TPP nanočástic s EGF (0,15 mg a 0,25 mg) výpočtem účinnosti entrapmentu a entrapmentové kapacity nosiče nepřímo metodou BCA	94

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Kalibrační křivka pro stanovení koncentrace proteinu metodou BCA.....	73
Graf 2: Srovnání účinností entrapmentu ovalbuminu do CS/TPP nanočástic	76
Graf 3: Srovnání vazebných kapacit CS/TPP nanočástic se zachyceným ovalbuminem	77
Graf 4: Stanovení koncentrace vázaného ovalbuminu na chitosanových nanomateriálech karbodiimidovou metodou a metodou entrapmentu	85
Graf 5: Stanovení koncentrace vázaného ovalbuminu na chitosanových nanomateriálech metodou sorpce a metodou entrapmentu.....	89
Graf 6: Srovnání účinností sorpce ovalbuminu na chitosanové nanomateriály.....	89
Graf 7: Srovnání vazebných kapacit CS/TPP nanočástic a chitosanových nanovláken	90
Graf 10: Kalibrační křivka pro stanovení koncentrace proteinu metodou BCA.....	93
Graf 11: Kumulativní křivka uvolňování ovalbuminu z CS/TPP nanočástic	95
Graf 10: Kumulativní křivka uvolňování EGF z CS/TPP nanočástic.....	96

SEZNAM ZKRATEK

- AFM – mikroskopie atomárních sil
- ALG – alginát sodný
- BCA – bicinchoninová kyselina
- BET – technika podle Brunauera, Emmetta a Tellera
- BSA – bovinní sérový albumin
- c-erbB-1 – receptor epidermálního růstového faktoru
- CS – chitosan
- DLS – dynamický rozptyl světla
- ECM – extracelulární matrix
- ESD – metoda emulgace/difúze rozpouštědla
- EGF – epidermální růstový faktor
- EGFR – receptor epidermálního růstového faktoru
- ELISA – enzymová imunoanalýza
- FEIA – enzymová imunoanalýza s fluorescenční detekcí
- FGF – fibroblastový růstový faktor
- FGF-2 – fibroblastový růstový faktor 2
- FGF-7 – fibroblastový růstový faktor 7
- FGF-10 – fibroblastový růstový faktor 10
- FGF-19 – fibroblastový růstový faktor 19
- HA – kyselina hyaluronová
- HER-1 – receptor epidermálního růstového faktoru
- Her2 – marker karcinomu prsu
- HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
- HS – heparan sulfát
- LEIA – enzymová imunoanalýza s luminiscenční detekcí
- MS – hmotnostní spektrometrie
- MWNT – vícevrstevné uhlíkové nanotrubičky (z angl. multi walled carbon nanotubes)
- OVA – ovalbumin
- PAGE – elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
- PCL – polykaprolakton
- PCS – fotonová korelační spektroskopie
- PDGF – růstový faktor odvozený od destiček

PDLA – kyselina poly-D-mléčná
PDLLA – kyselina poly-D, L-mléčná
PEC – polyelektrolytový komplex
PEG – polyethylenglykol
PGA – kyselina polyglykolová
pI – izoelektrický bod
PLA – kyselina polymléčná
PLGA – kopolymer kyseliny glykolové a DL-mléčné
PLLA – kyselina poly-L-mléčná
PU – polyuretan
PVDF – polyvinylidendifluoridová membrána
SAXS – rozptyl rentgenového záření s malým úhlem (z angl. small angle X-ray scattering)
SDS – dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE – proteinová denaturující elektroforéza
SEM – skenovací elektronová mikroskopie
SWNT – jednostěnné uhlíkové nanotrubičky (z angl. single walled carbon nanotubes)
TEM – transmisní elektronová mikroskopie
TGF- α – transformující růstový faktor α
TPP – tripolyfosfát sodný
TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethan
XRD – rentgenová difrakce

ÚVOD

Nanotechnologie je v současnosti jedním z nejdynamičtěji se rozvíjejících odvětví průmyslu. Jedná se o interdisciplinární vědní obor, který zasahuje do oblasti mnoha technologických i biomedicínských oborů. Nanomateriály jsou atraktivní zejména pro své unikátní vlastnosti, které jsou důsledkem jejich rozměrů. Velmi významným oborem, kde se v dnešní době nanotechnologie a nanomateriály uplatňují, je biomedicína, ve které nabízejí obrovský potenciál z hlediska implantátů a cíleného doručování léků.

K výrobě nanomateriálů je využíván chitosan, biologicky odbouratelný polymer. Chitosan je derivát přírodního polysacharidu chitinu a disponuje celou řadou pozitivních vlastností, mezi které patří jeho vynikající biokompatibilita, biodegradabilita, antimikrobiální aktivita a netoxičita. Jedná se o slibný materiál pro cílené doručování léčiv s řízeným uvolňováním.

V teoretické části této práce jsou uvedeny metody přípravy a charakterizace nanomateriálů, zejména nanovláken a nanočástic z chitosanu. Charakterizace nanomateriálů je nezbytná pro posouzení jejich kvality a bezpečnosti. Dále jsou popsány různé způsoby uchycení ligandů, např. léčiv, enzymů, sond, proteinů, buněk aj., na povrch nosičových systémů, metody detekce proteinů a peptidů a *in vitro* studie uvolňování léčiv z nanosystémů. Součástí rešerše je i využití růstových faktorů v rámci drug delivery systémů. Růstové faktory a cytokiny hrají důležitou roli při hojení ran, ale kvůli své nízké stabilitě mají krátký poločas rozpadu a je tedy nezbytné jejich opakované podávání. Pro překonání těchto nevýhod a pro cílené a udržitelné uvolňování se vyvíjejí systémy enkapsulovaných růstových faktorů začleněním do biologických materiálů, jako je chitosan.

V experimentální části se tato diplomová práce zabývá metodou entrapmentu proteinu do struktury chitosanových nanočástic a studiem účinnosti vazby při použití různých koncentrací proteinu. Jsou zde porovnávány metody vazby proteinů na chitosanové nanomateriály, a to pomocí účinností vazby modelového proteinu ovalbuminu na nanovlákná i nanočástice metodami sorpce, entrapmentu, enkapsulace a karbodiimidovou metodou. V druhé části se experimentální práce zabývá tvorbou chitosanových nanočástic se zapouzdřeným epidermálním růstovým faktorem metodou entrapmentu. U vybraných nosičů je sledována míra uvolňování proteinů z nanočástic v čase.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Aplikace nanotechnologií v regenerativní medicíně a drug delivery systémech

Nanotechnologie je interdisciplinární vědní obor zasahující do oblasti chemie, biologie, fyziky, medicíny, textilního průmyslu a mnoha dalších oborů. Jedná se o soubor technik a metod zpracovávající materiály v měřítku atomů a molekul. Nano znamená nanometr (nm), jedna miliardtina (10^{-9}) metru. Velikost struktur materiálů se pohybuje v měřítku několika nanometrů (menších než 100 nm) minimálně v jednom rozměru. Výroba nanomateriálů je významná nejen pro to, že jsou tyto objekty tisíckrát menší než při použití běžných technologií, ale zejména pro své jedinečné vlastnosti, které jsou důsledkem uvedených rozměrů [1; 2; 3]. Obecně jsou vlastnosti nanomateriálů atraktivní pro mnoho chemických a biologických aplikací, které mohou pomoci lidskému zdraví. Nanotechnologie nabízejí obrovský potenciál z hlediska implantátů a velkou příležitostí se zdají být metody doručování léků, protože vlastnosti polymerních nanomateriálů mohou být navrženy pro cílenou přepravu a doručení [3].

1.1.1 Nanovlákná

Nanovlákná jsou technické textilie s vysokou přidanou hodnotou. Jedná se o speciálně vyráběná vlákna o průměru menším než 500 nm. Mají řadu jedinečných vlastností, které jsou zaručeny jejich velikostí [4; 5].

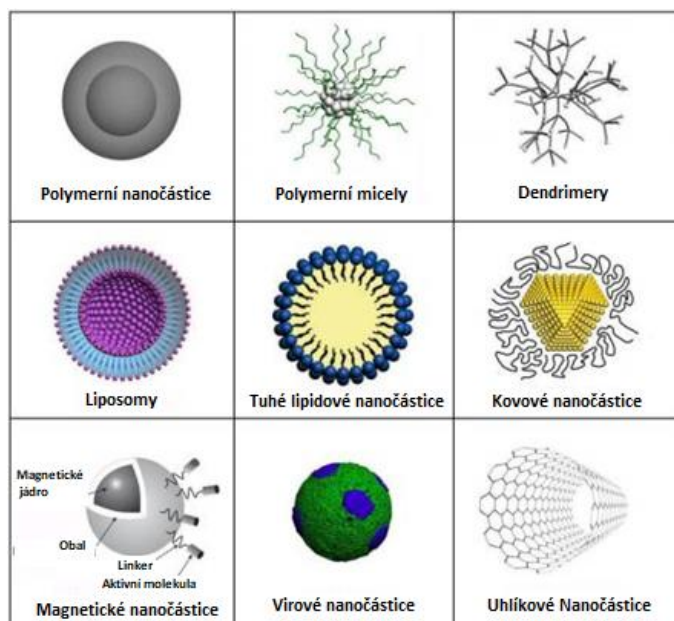
Mezi vlastnosti nanovláken patří například jejich obrovský měrný povrch, nízká hustota, vysoká porozita, výborné mechanické vlastnosti v poměru ke hmotnosti a možnost aditivovat nanovláknenný materiál. Dále mají nanovlákná malou velikost pórů, kdy póry mezi nanovláknny mají rozměry cca 10-20 nm, takže jimi neprojdou bakterie, viry, ani alergen. Póry však umí propustit molekuly vzduchu. Velkou výhodou je i průměr nanovláken, který můžeme řídit podle toho, na jaké aplikace je potřebujeme [4; 5].

Použití nanovláken je velmi široké a jejich jedinečné vlastnosti jim umožňují různé aplikace. Potenciál mají ve všech odvětví průmyslu [5]. V oblasti medicíny se nanovlákná využívají například k výrobě nanovláknenných obvazů s obsahem molekul antibakteriálního stříbra na ochranu popálenin a rozsáhlých otevřených ran. Nanovlákná modifikovaná s biologickými ligandy (antibiotika, enzymy, růstové faktory atd.), tzv. biofunkční nanovlákná, mají velké

množství aplikací, nejvíce však dominuje oblast biomedicíny. V biomedicině mohou nanovlákná sloužit jako „vozidla“ v systémech dodávání léků, ve tkáňovém inženýrství nebo hojení ran [6]. Využití nanovláken jako podpory imobilizace enzymů bylo poprvé popsáno *Jia et al.* v roce 2002 [7]. Bylo prokázáno, že nanovlákná vyrobená metodou elektrospinningu poskytují vynikající podporu enzymové imobilizace vzhledem k jejich vysokému poměru povrchu k objemu a efektivního zatížení. Nanovlákná mohou být vyráběna v různých formách a z různých syntetických materiálů a přírodních polymerů, poskytují velkou funkční povrchovou flexibilitu [6].

1.1.2 Nanočástice

Nanočástice mají obrovský potenciál jako účinný systém dodávání léků. Liší se velikostí, ale obecně se pohybují od 100 do 1000 nm. Jako nosiče léků se nanočástice většinou používají velikostně do 100 nm alespoň v jednom rozměru a sestávají z různých biologicky odbouratelných materiálů, jako jsou přírodní nebo syntetické polymery, lipidy nebo kovy [8; 9]. Nanočástice využívající se pro doručování léků se mohou podle struktury rozdělovat na polymerní micely, polymerní nanočástice, liposomy, dendrimery, virové nanočástice, nanotrubičky, fullereny, tuhé lipidové, kovové a magnetické částice [10]. Struktury možných polymerních nanočástic jsou zobrazeny na obrázku 1.



Obrázek 1: Znárodnění struktury některých typů nanočástic. Převzato a upraveno podle [10].

Nanočástice jsou buňkami přijímány účinněji než větší makromolekuly, a z tohoto důvodu by mohly být použity jako účinné transportní a distribuční systémy [8]. Nanočástice obsahující zapouzdřené, dispergované, absorbované nebo konjugované léky mají jedinečné charakteristiky, které mohou vést k vylepšenému výkonu v různých dávkových formách [11]. Různé prominentní rysy a aplikace nanosystémů jsou uvedeny v tabulce 1 [10]. Pro terapeutické aplikace mohou být léky buď integrovány do matrice částic, nebo připojeny k jejich povrchu. Nanočástice mohou být použity při cíleném podávání léku v místě onemocnění, aby se zlepšila absorpce špatně rozpustných léčiv, cílení léčiv na specifické místo a biologická dostupnost léčiva [8; 9].

Nanočástice na bázi chitosanu, připravované z chitosanu nebo jeho derivátů, získaly jako nosiče léků větší pozornost, protože vykazují lepší stabilitu, nízkou toxicitu a poskytují všestranné způsoby podávání. Další nespornou výhodou těchto částic jsou jejich jednoduché metody přípravy. Chitosanové částice vykazují pozitivní povrchový náboj a mukoadhezivní vlastnosti. Chitosan vykazuje nízkou toxicitu jak *in vitro*, tak i některých *in vivo* modelů [12; 13].

Tabulka 1: Různé charakteristiky a stručné aplikace nanosystémů. Převzato a upraveno podle [10].

Typy nanosystémů	Velikost (nm)	Charakteristika	Aplikace
<i>Uhlíkové nanotrubic</i>	0,5-3 průměr a 20-1000 délka	Třetí alotropická krystalická forma uhlíkových vrstev je buď jednovrstvá (jednotěnné nanotrubic, SWNT) nebo vícevrstevná (vícestěnné nanotrubic, MWNT). Tyto krystaly mají pozoruhodnou sílu a jedinečné elektrické vlastnosti (vodivé, polovodivé nebo izolační)	Funkcionalizace vylepšuje rozpustnost, proniká do cytoplazmy buňky a do jádra, nosič pro dodávání genů a peptidů
<i>Dendrimery</i>	<10	Vysoce rozvětvený, téměř monodisperzní polymerní systém produkovaný řízenou polymerací; tři hlavní části – jádro, větve a vrch	Dlouhodobě cirkulující, řízené dodávání bioaktivních látek, cílené dodávání bioaktivních látek k makrofágům, cílení na játra
<i>Liposomy</i>	50-100	Fosfolipidové vezikuly, biokompatibilní, všestranné, dobrá účinnost zachycení, snadná nabídka	Dlouhodobě cirkulující, nabízí pasivní a aktivní doručení genů, proteinů, peptidů a dalších

<i>Kovové nanočástice</i>	<100	Zlaté a stříbrné koloidy, velmi malá velikost vedoucí k velkému povrchu dostupného pro funkcionalizaci, stabilní	Dodávání léků a genů, vysoce citlivé diagnostické zkoušky, vylepšení tepelné ablace a radio-terapie
<i>Nanokrystaly kvantových teček</i>	2-9,5	Polovodivý materiál syntetizován s prvky II-VI a III-V sloupce, velikost mezi 10 a 100 Å, jasná fluorescence, úzká emise, široké UV excitace a vysoká fotostabilita	Dlouhotrvající vícebarevné zobrazování jaderných buněk; DNA hybridizace, imunotesty; receptorem zprostředkovaná endocytóza; značení markeru nádoru prsou Her2 na povrchu nádorových buněk
<i>Polymerní micely</i>	10-100	Blokují amfifilní kopolymerové micely, biostabilní, vysoké zachycení léčiva, užitečné zatížení	Dlouhodobě cirkulující, cíleně specifické aktivní a pasivní dodávání léků, diagnostický význam
<i>Polymerní nanočástice</i>	10-1000	Biologicky rozložitelné, biokompatibilní, nabízí kompletní ochranu léku	Vynikající nosič pro kontrolované a dlouhodobé dodávání léků, povrchově upravené nanočástice mohou být použity pro aktivní a pasivní doručení bioaktivních látek

1.2 Růstové faktory drug delivery systémů

Jak je dobře známo v oboru imunologie, růstové faktory a cytokiny hrají důležitou roli při hojení ran. Mnoho předchozích studií prokázalo různé výhody exogenních růstových faktorů, jako jsou epidermální růstové faktory (EGF), růstový faktor fibroblastů (FGF) a růstový faktor odvozený od destiček (PDGF). Tyto výrobky jsou však často drahé a vyžadují vícenásobné podávání, jelikož mají růstové faktory kvůli jejich nízké stabilitě krátký poločas rozpadu. Pro překonání těchto nevýhod a pro cílené a udržitelné uvolňování růstových faktorů bez nutnosti jejich opakovaného podávání se vyvíjejí systémy enkapsulovaných růstových faktorů začleněním do biologických materiálů, jako je chitosan, kyselina hyaluronová, kolagen, dextran a fibrin [14].

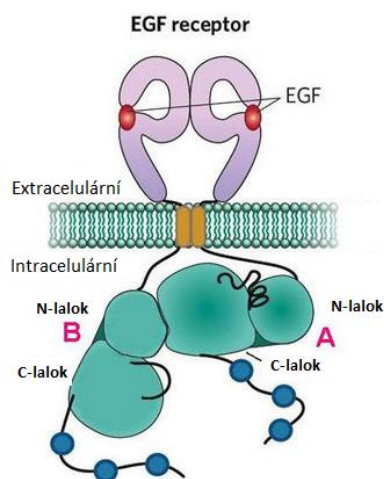
1.2.1 Epidermální růstový faktor

Epidermální růstový faktor (EGF) je 53-aminokyselinový polypeptid, který může ovlivnit proliferaci a diferenciaci široké škály buněk [15]. Je sekretován destičkami, makrofágy a fibroblasty a působí parakrinně na keratinocyty [16]. Pravděpodobně je spolu s transformujícím růstovým faktorem α (TGF- α) produkován lokálně v mnoha tkáních spíše jako lokální růstový faktor než jako systémový hormon [15]. Bylo zjištěno, že EGF urychluje migraci keratinocytů, a tak podporuje reepitelizaci [16]. Existuje také důkaz, že EGF hraje roli při karcinogenezi, a že EGF-stimulovaný růstový regulační systém je zapojen do proliferace maligních buněk [15]. Studie *in vitro* dále prokázaly zvýšenou regulaci EGF po akutním poškození, což významně zrychluje reepitelizaci a zvyšuje elasticitu v ranách. Klinické studie léčby chronických ran dále ukazují, že přidavek lokálně aplikovaného EGF zvyšuje epitelizaci a zkracuje dobu hojení kožních štěpů, žilních a diabetických vředů. Nedostatek údajů prokazující významný přínos aplikace EGF, spolu s údaji poukazujícími na jeho roli při rozvoji nádoru, významně zbrzdily jeho další terapeutické využití [17].

Pokud je EGF dodáván systémem jako jsou polymery, genová terapie nebo elektroponované nanovlákná, tak může být užitečný pro osoby s chronickými ranami. Tyto techniky totiž udržují růstový faktor kontinuální, udržují jeho přítomnost v ráně a předcházení jeho rychlé degradaci [16]. I když je EGF široce uznáván za účast v regeneračním procesu, tak jen málo studií dokumentuje jeho účinek na akutní rány, když je jeho uvolňování udržováno po určitou dobu jeho zapouzdřením do hydrogelu na bázi emulze. Účinky EGF dodávaného mikročásticemi a nanočásticemi na bázi alginátu nebo lipidů v modelu chronické rány diabetických vředů byly ukázány v dřívějších studiích, ale účinek uvolňování EGF z nosičů v akutních ranách je ještě třeba objasnit. Studie *Kang S. W. et al. v roce 2017* [14] prokázala snadné a užitečné využití nanočástic z kyseliny hyaluronové pro trvale udržované dodávání EGF do místa akutního poranění. Částice byly schopné se vázat na ECM dermální vrstvy, degradovat během 14 dní a stabilně uvolňovat EGF, a tak přispívat k procesu remodelace [14].

EGF stejně jako TGF- α aktivuje receptor EGF (EGFR) [15]. Receptor epidermálního růstového faktoru, také známý jako HER-1 nebo c-erbB-1, je transmembránový glykoprotein, který tvoří jednoho ze čtyř členů rodiny erbB receptorů tyrosinkinázy. EGFR se skládá z extracelulární domény vázající ligandy, transmembránové oblasti pronikající cytoplazmatickou membránou a intracelulární domény s tyrosinkinázovou aktivitou. Struktura EGFR je znázorněna na obrázku 2. Na EGFR se váže více ligandů, jejich vazba vede k autofosforylaci receptorové tyrosinkinázy a k následné aktivaci signálních transdukčních cest, které se podílejí na regulaci

buněčné proliferace, diferenciaci a přežití. Nejdůležitějšími ligandy pro EGFR jsou EGF a TGF- α . Mezi další ligandy patří amfiredulin, heparin vázající EGF a betacellulin. Vazba ligandu na EGFR vede k homo- nebo heterodimerizaci receptoru na povrchu buněk, následovanou internalizací dimerizovaného receptoru. Po dimerizaci a internalizaci následuje autofosforylace tyrosinkinázové domény. Fosforylované zbytky tyrosinkinázy slouží jako vazebná místa pro přijímání signálu transduktorů a aktivátorů intracelulárních substrátů, jako je Ras, které pak stimuluje intracelulární signální transdukční kaskádu. Přestože je EGFR přítomen v normálních buňkách, je také nadměrně exprimován v řadě nádorových buněčných linií a byl spojen i se špatnou prognózou. Aktivace EGFR hraje také roli v rezistenci na chemoterapii a radiční léčbu v nádorových buňkách [18; 19]. *In vitro* studie ukazují, že aktivace EGFR hraje důležitou roli při reepitelizaci zvýšením proliferace keratinocytů a buněčnou migrací při akutních poranění [16].



Obrázek 2: Znárodnění struktury EGFR. Převezato a upraveno podle [20].

1.2.2 Fibroblastový růstový faktor

Fibroblastový růstový faktor (FGF) patří do velké skupiny růstových faktorů zahrnující 23 členů, kteří sdílí sekvenci a strukturní podobnost. FGF využívají parakrinní a endokrinní signalizaci ke zprostředkování nesčetných biologických a patofyziologických procesů, včetně angiogeneze, hojení ran, embryonálního vývoje a regulace metabolismu [21]. Jsou produkovány keratinocyty, fibroblasty, endotelovými buňkami, buňkami hladké svaloviny, chondrocyty a mastocyty [16]. Různé biologické funkce FGF závisí na jejich vazbě na kofaktorový heparan sulfát (HS) nebo specifický protein Klotho. Díky svým rozsáhlým funkcím jsou členové skupiny FGF a jejich receptory důležitými cíli při vývoji léků. Bylo prokázáno, že v rámci rodiny FGF jsou FGF-2, FGF-7 a FGF-10 neoddelitelnou součástí při hojení kožních ran. Nedávno

byla objevena i klíčová role endokrinně působících podskupin FGF-19 při udržování homeostázy žlučových kyselin, fosfátu a glukózy, což vyvolává nový farmakologický potenciál této rodiny [21; 22]. *In vitro* studie ukazují, že využití FGF ve spojení s chitosanovými nanočásticemi vykazuje dlouhodobé uvolňování FGF z částic, kdy bylo pozvolné uvolňování pozorované až 35 dní. Dále zvýšená proliferace fibroblastů *in vitro* také prokázala dodávání růstových faktorů z částic pro buněčnou signalizaci. Chitosanové částice s FGF ovlivnily schopnost buněk proliferovat a diferencovat se, následovalo lepší připojení a adheze [23].

1.2.3 Destičkový růstový faktor

Růstový faktor odvozený od trombocytů (PDGF) je dimerní růstový faktor složený z monomerů spojených disulfidickou vazbou. Čtyři jednotlivé řetězce (A, B, C, D) se skládají z pěti dimerů (AA, AB, BB, CC a DD) [24]. PDGF jsou hlavními mitogeny pro mnoho buněčných typů mezenchymálního původu a pro některé buňky, které jsou původem neuroektodermu, jako oligodendrocyty. PDGF je primárně produkován destičkami, vaskulárními endotelovými buňkami, pericyty a Kupfferovými buňkami. PDGF má vlastnosti chemoatraktantu a podílí se na tvorbě kostí, erythropoéze, hojení ran a angiogeneze. Dále se podílí i na normálním vývoji mozku, ledvin a kardiovaskulárních a respiračních systémů [25].

Nanočástice konjugované s PDGF umožňují kontrolované uvolňování PDGF po dlouhou dobu, až 42 dnů. Byly zkoumány liposomové nanočástice a nanočástice z biologicky odbouratelného polymeru (PLGA-PEG). Liposomové oproti polymerním nanočásticím vykazovaly vyšší účinnost zatížení PDGF, i když oba typy částic vykazovaly podobné velikosti. Dále byla vytvořena i kolagenová vlákna obsahující PDGF, u kterých byla potvrzena jejich biokompatibilita a schopnost v krátké době zvýšit proliferaci kmenových buněk odvozených od tukové tkáně, což poukazuje na využití těchto vláken pro opravu a regeneraci pojivové tkáně např. šlach [26].

1.3 Příprava nanomateriálů pro biomedicínu

1.3.1 Metody přípravy nanočástic

Metody přípravy nanočástic lze rozdělit do dvou základních skupin, a to na metody kondenzační a dispergační. U kondenzačních nebo také bottom-up (zdola-nahoru) metod se nanočástice vytváří přímo z jednotlivých atomů a molekul, kdy jde vlastně o slučování jednotlivých

atomů do větších částic. V současnosti je tento způsob přípravy nanočástic nejvyužívanější, lze takto připravit vysoce dispergované a poměrně monodisperzní koloidní soustavy. Kondenzace lze dosáhnout buď fyzikálními nebo chemickými reakcemi. V případě dispergačních, top-down (shora-dolů), metod se jde cestou od makrolátky k nanostruktuře, kdy se fyzikálními postupy vytváří stále menší částice z většího celku. Vznik disperzní soustavy touto cestou vyžaduje vynaložení práce, kterou je nutno dodat k překonání působících mezimolekulárních sil. K postupnému zmenšování materiálu částic může docházet např. ultrazvukem, laserovou ablací, nebo i mletím [27; 28].

V posledních letech se do popředí zájmu dostala aplikace chitosanových nanočástic jako transportního systému. Pro přípravu chitosanových nanočástic bylo vyvinuto a publikováno několik metod. Výběr vhodné metody závisí na konkrétních faktorech, jako jsou teplotní a chemická stabilita, velikost částic, stabilita konečného produktu a další [29]. V současné době se jedná především o pět metod, které jsou popsány níže. Z toho jsou nejrozšířenějšími metodami ionotropní gelování a komplex polyelektrolytů, protože se jedná o metody jednoduché a nepoužívají se organická rozpouštědla [30].

Ionotropní gelování

Principem vzniku částic je iontové zesíťování mezi chitosanem, který je kationtové povahy a aniontovým zesíťovacím činidlem. Chitosan je rozpuštěn ve vodném roztoku kyseliny octové, a to v přítomnosti nebo v nepřítomnosti stabilizačních činidel (např. poloxamer), za účelem získání kladně nabitého chitosanu. K roztoku je následně po kapkách přidáván za stálého míchání a při laboratorní teplotě roztok zesíťovacího činidla, kterým může být např. tripolyfosfát sodný (TPP) nebo sulfát sodný. Zesíťovací činidla jsou polyaniony, které účinkem elektrostatických sil interagují s opačně nabitým chitosanem. Tímto způsobem dojde k vytvoření chitosan-tripolyfosfátového nebo chitosan-sulfátového komplexu. Chitosan díky tomu precipituje za vzniku sférických částic [30; 29; 31].

Obvykle se velikost částic pohybuje od 20 do 200 nm a 550 až 900 nm [32]. Při zvyšování koncentrace chitosanu a při zvyšování poměru polymeru ku polyaniontu bylo pozorováno zvyšování kompaktnosti a velikosti částic. Dále lze také velikost a povrchový náboj částic modifikovat změnou poměru chitosanu ku stabilizátoru [30]. Dle studie *Biró et al. V roce 2006* [33], která studovala vliv zesíťovacích činidel na vznik částic, dochází s použitím TPP jako zesíťovacího činidla k tvorbě většího množství částic s daleko menší velikostí než při použití sulfátu sodného [33]. Částice dále vykazují menší velikosti a vyšší stabilitu v přítomnosti chloridu sod-

ného. Důvodem je to, že pokud se monovalentní sůl, jako je chlorid sodný, přidá k rozpouštědлу, je vystavena elektrostatickému odpuzování mezi kladně nabitými aminovými skupinami na skeletu chitosanu. To způsobí zvýšení pružnosti polymerních řetězců v roztoku a tím se zvýší jeho stabilita [30].

Polyelektrolytové komplexy

Polyelektrolytový komplex (PEC) je velmi jednoduchá metoda, která nevyžaduje žádné obtížné podmínky a částice vznikají spontánně. PEC jsou tvořeny interakcí mezi záporně a kladně nabitým polymerem v důsledku poklesu hydrofilnosti kvůli neutralizaci jejich náboje. Přidáním roztoku aniontu (např. roztoku DNA) do chitosanu rozpuštěného v kyselině octové, za stálého míchání a laboratorní teplotě, se tak mohou spontánně tvořit chitosanové nanočástice. Vzniklé částice mohou být velikostně v rozmezí od 50 až 700 nm [30; 32; 12]. Výhoda PEC je, že proces může být prováděn ve vodném roztoku při nízkých teplotách, což poskytuje větší šanci na zachování aktivity zapouzdřených látek. Hlavní nevýhodou je však špatná stabilita částic a nízké zachycení léčiva [12]. Tyto PEC komplexy se využívají jako transportní systém pro dodávání proteinů, peptidů, léků a plazmidové DNA [32].

Metoda reverzních micel

Tato metoda se vyznačuje tím, že se nepoužívají žádná zesíťovací činidla, ani toxická organická rozpouštědla. Reverzní micely jsou monodisperzní sférické agregáty molekul povrchově aktivních látek (např. dodecylsírán sodný, cetrimoniumbromid apod.) o velikosti 1-10 nm obsahující mikroskopická polární jádra. Hydrofilní sloučeniny, jako jsou biomolekuly, jsou tedy solubilizovány uvnitř polárního jádra reverzních micel. Reverzní micely vznikají přidáváním vodného roztoku chitosanu za stálého míchání k organickému rozpouštědлу obsahujícímu povrchově aktivní látku. Touto metodou lze získat ultrajemné nanočástice s úzkou distribucí velikostí [30; 34].

Mikroemulzní metoda

Při této metodě se povrchově aktivní látka, surfaktant, rozpustí v organickém rozpouštědle, kterým je hexan. Do směsi surfaktantu a hexanu se následně za stálého míchání a laboratorní teplotě přidává chitosan v roztoku kyseliny octové společně s glutaraldehydem. Nanočástice se tvoří v přítomnosti surfaktantu. Směs se nechává přes noc za stálého míchání, aby se dokončil zesíťovací proces mezi funkčními aminoskupinami chitosanu a glutaraldehydu, který zde působí jako zesíťovací činidlo. Organické rozpouštědlo se poté odstraňuje odpařením za nízkého

tlaku a přebytek surfaktantu se odstraňuje vysrážením s chloridem vápenatým a následnou centrifugací. Při této technice je pozorována velmi úzká distribuce velikostí a velikost může být řízena koncentrací glutaraldehydu při přípravě částic. Tato metoda vede k tvorbě částic menších než 100 nm. Mezi hlavní nevýhody patří použití antigenního činidla glutaraldehydu a zdlouhavost procesu [30; 32; 12]. Dále také není možné do nanočástic začlenit bílkoviny nebo peptidy, protože se mohou kovalentním zesíťováním poškodit [30].

Metoda emulpace/difúze rozpouštědla (ESD)

Jedná se o modifikovanou metodu vyvinutou společností Niwa et. al. využívající PLGA. Emulze se získává vstříkáním organické fáze do roztoku chitosanu obsahující stabilizační činidlo, jako je poloxamer za stálého míchání, následovaného vysokotlakou homogenizací. Emulze se následně zředí velkým množstvím vody. Precipitace polymeru nastává v důsledku rozptýlení organického rozpouštědla do vody, čímž se vytvoří nanočástice [30]. Hlavními nevýhodami je použití organických rozpouštědel a odstranění velkých objemů vody ze suspenze. Během emulze dochází také k úniku ve vodě rozpustných léčiv do nasycené vodné vnější fáze. Tato metoda se ukázala jako vhodná pro zapouzdření hydrofobních léků. Metoda je reprodukovatelná, jednoduchá a je pozorována úzká distribuce velikostí [32].

1.3.2 Výroba nanovláken

Za účelem výroby nanovláken byly prozkoumány různé techniky, avšak jako jedna z nejúčinnějších technik používaných k výrobě polymerních nanovláken byla uznána technika elektrostatického zvlákňování (elektrospinningu) [5]. Typické uspořádání zařízení pro elektrostatické zvlákňování je znázorněno na obrázku 3. Elektrospinnovací proces zvaný jako NanospiderTM umožnil výrobu nanovláken v průmyslovém měřítku. Nanovláknata vyrobená touto technologií jsou vynikající pro jejich vysokou homogenitu průměru vláken a homogenitu vrstev. Takto vyráběná nanovláknata jsou atraktivní i z komerčního hlediska [3; 35].

Technologie NanospiderTM je unikátní technologie zvlákňování z volné hladiny roztoků polymerů nebo tavenin v silném elektrostatickém poli bez použití trysek. Tato technologie se zakládá na zajímavém objevu, že je možné zvlákňovat nejen za pomoci kapiláry z kapky polymeru procházejícího tryskou do elektrického pole, ale z celé tenké vrstvy roztoku polymeru [35]. Základním prvkem stroje jsou dvě elektrody, mezi nimiž existuje elektrostatické pole. Spodní elektroda má tvar válce, který je ponořen do roztoku polymeru. Válec se otáčí a vynáší tenkou vrstvu roztoku do elektrostatického pole, které z roztoku vytáhne dlouhá vlákna až ke

druhé elektrodě. Zde vlákna narazí na podkladovou textilií, na které jsou vynášena ven ze stroje. Je to tedy velice jednoduchý princip – za všechno mohou elektrostatické síly, které z polymeru vyděloují vlákno na podklad. Klíčové jsou samozřejmě vlastnosti polymerů, řada parametrů jako jejich vodivost nebo viskozita musí být nastavena tak, aby proces výroby nanovláken fungoval [35; 3].



Obrázek 3: Typické uspořádání zařízení pro elektrostatické zvlákňování [36].

Elektrospinnovací proces je typický způsob umělé výroby nanovláken z polymerních roztoků. Z důvodu relativní snadnosti a flexibility kterou tento proces nabízí, se ukázal i jako nejoblíbenější způsob přípravy chitosanových nanovláken. Chitosan má však vysokou viskozitu, která omezuje jeho spřádání. Tento problém je vyřešen aplikací alkalického zpracování, které hydrolyzuje chitosanové řetězce a snižuje tak jejich molekulovou hmotnost. Roztoky upraveného chitosanu ve vodné 70-90% kyselině octové produkují nanovlákna s odpovídající kvalitou a stabilitou. Snížení koncentrace kyseliny octové v rozpouštědle zvyšuje střední průměr nanovláken. Optimálních nanovláken se dosahuje s chitosanem, který byl hydrolyzován 48 hodin. Výzkumy dokázaly, že ani alkalické zpracování, ani proces elektrostatického zvlákňování nemění chemickou povahu polymeru [37].

Chitosanová nanovlákna se dají připravit také za použití přístroje Star Burst ze suchého prášku chitosanu, který se získává deacetylací chitinového prášku ze skořápek krabů. Tento systém využívá vysokotlaký vodní proud. Zatímco je proces elektrostatického zvlákňování procesem bottom-up (zdola-nahoru), protože spojuje jednotlivé molekuly do nanovláken, systém Star Burst je považován za přístup top-down (shora-dolů). Chitosanový prášek, který byl hrubě rozdrcen mletím, má vláknitou strukturu. Agregáty vláknitého chitosanu se po zpracování pomocí Star Burst nejprve rozpadají na mikrovlákna a poté na nanovlákna. Výsledná vlákna se

pohybují v měřítku desítek nanometrů a mají velmi jemnou nanovláknennou síť. Využití systému Star Burst k vytvoření nanovláken má oproti elektrostatickému zvláknování několik výhod, včetně nízkých nákladů na energii, možnost velkoobjemové výroby, vynikající tvarovatelnosti a nejsou zde použita žádná organická rozpouštědla [38].

1.3.3 Charakterizace biomateriálů

Charakterizace nanomateriálů je nezbytná pro posouzení jejich kvality, bezpečnosti a pro rozvoj nanomedicíny [39]. V tabulce 2 jsou shrnuty některé hlavní techniky hodnocení fyzikálně-chemických vlastností nanomateriálů.

Tabulka 2: Techniky hodnocení fyzikálně-chemických vlastností nanomateriálů. Převzato a upraveno podle [39; 40].

Technika	Analyzované vlastnosti materiálu
<i>Rentgenová difrakce (XRD)</i>	velikost krystalů, stupeň a orientace krystalinity, chemické složení a krystalická fáze
<i>Rozptyl rentgenového záření s malým úhlem (SAXS)</i>	velikost a tvar částic, prostorové rozložení částic v médiu, interakce částic, interatomické vzdálenosti
<i>Zeta potenciál</i>	stabilita povrchového náboje a struktura materiálu
<i>Dynamický rozptyl světla (DLS)</i>	velikost a distribuce velikostí částic
<i>Porozimetrie</i>	velikost a objem pórů, plocha povrchu
<i>Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)</i>	velikost a distribuce velikostí částic, struktura/tvar, stabilita, identifikace elementárního složení
<i>Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)</i>	struktura/tvar, stabilita, velikost a distribuce velikostí částic
<i>Mikroskopie s polarizovaným světlem</i>	Anizotropie
<i>Mikroskopie atomárních sil (AFM)</i>	Velikost, struktura, tvar, sorpce, disperze, agregace a vlastnosti povrchu materiálu
<i>UV-VIS spektroskopie</i>	Velikost materiálu
<i>Technika podle Brunauera, Emmetta a Teller (BET)</i>	Velikost, distribuce pórů

Nejdůležitějšími parametry charakterizace nanočástic je jejich distribuce velikostí a morfologie. Je velmi důležité pochopit, jak vlastnosti nanomateriálů ovlivňují jejich distribuci a chování *in vivo*. Velikost částic může být určena mnoha moderními metodami, ale výběr té nejlepší závisí na informacích požadovaných pro konkrétní aplikaci. Bylo zjištěno, že velikost částic ovlivňuje uvolňování léčiva. Menší částice mají větší plochu povrchu. Léčivo nanášené na menší částice tak bude vystaveno především na povrchu částic, což vede k jeho rychlému uvolňování. Naopak léky uvnitř větších částic difundují pomalu. Nevýhodou menších částic je jejich tendence agregovat během skladování a transportu disperze nanočástic. Proto existuje kompromis mezi minimální velikostí a maximální stabilitou částic. Navíc může být velikostí částic ovlivněna i degradace polymeru. Bylo zjištěno, že např. rychlost degradace lineárního kopolymeru kyseliny mléčné a glykolové (PLGA) roste s rostoucí velikostí částic *in vitro* [41; 39; 42].

Dynamický rozptyl světla

V současné době je dynamický rozptyl světla (DLS), známý také jako fotonová korelační spektroskopie (PCS), nejoblíbenější a nejrychlejší metodou určování velikosti částic. Metoda DLS je založena na fluktuacích způsobených Brownovou difúzí sférických částic, kde má Brownův pohyb částic vztah k ekvivalentnímu hydrodynamickému průměru. Monochromatické světlo (laser) dopadající na roztok sférických částic s Brownovým pohybem způsobí Dopplerův posun, což se projeví změnou vlnové délky dopadajícího světla. Tato změna souvisí s velikostí částic. Nevýhodou této metody je to, že nanomateriály mají tendenci ve vodě agregovat, měnit svoji velikost a povrchové vlastnosti, což vede k různým interakcím s molekulami vody, které částice oklopují. V důsledku toho může být velikost naměřená pomocí DLS nadhodnocena. Na druhou stranu DLS umožňuje měření za fyziologických podmínek napodobující chování *in vivo*. DLS se obvykle využívá k rychlému stanovení velikosti částic monodisperzních vzorků, k identifikaci přítomnosti agregátů ve vzorcích připravených různými postupy a ke studiu stability částic v závislosti na čase a/nebo změnách teploty [41; 39].

Zeta potenciál

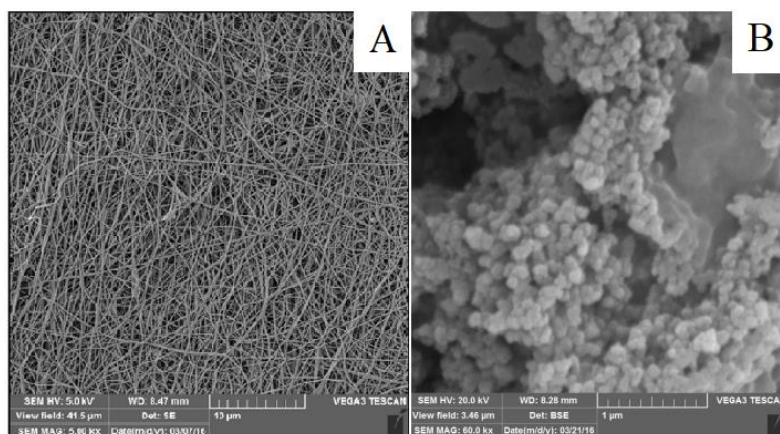
Povaha a intenzita povrchového náboje částic určuje jejich interakci s biologickým prostředím a také jejich elektrostatické interakce s bioaktivními sloučeninami. Koloidní stabilita je analyzována zeta potenciálem nanočástic. Tento potenciál je nepřímým měřením povrchového náboje a je to potenciál na rovině skluzu mezi částicí a sdruženou dvojrůstvou s obklopujícím rozpouštědlem. K odvození stability částic se obvykle využívá hodnota ± 30 mV. Hodnoty zeta

potenciálu vyšší než +30 mV a nižší než -30 mV poukazují na stabilní podmínky, zatímco hodnoty mezi -30 mV a +30 mV indukují nestabilní podmínky podporující agregaci, koagulaci a flokulaci částic. Zeta potenciál může poskytovat i informace týkající se povahy materiálu zapouzdřeného uvnitř částic nebo potaženého povrchu. Nulová hodnota zeta potenciálu je vyjádřena hodnotou izoelektrického bodu (pI), a proto musí být posouzena také hodnota pI vybraného ligandu před vazbou na nanočásticový nosič. Zeta potenciál je vysoce citlivý na změny prostředí jako je pH a iontová síla. Z tohoto důvodu nemohou opakované a přesné měření zředěného roztoku poskytnout skutečnou hodnotu koncentrované suspenze [41; 39].

Skenovací elektronová mikroskopie

Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) provádí morfologickou kontrolu s přímou vizualizací. Přes to, že techniky založené na elektronové mikroskopii nabízejí řadu výhod v morfologické a rozměrové analýze, poskytují jen omezené informace o rozložení velikosti a skutečné průměrné populaci. Hlavním omezením SEM je rozlišení obrázků, které omezuje jeho aplikaci na vzorky o velikosti ~ 200 nm. Analýza SEM vyžaduje jednoduchou přípravu vzorků a může být použita pouze pro určité biologické materiály v důsledku degradace způsobené elektronovým paprskem. Pro charakterizaci pomocí SEM musí být nejprve roztok částic převeden na suchý prášek, který se pak aplikuje do držáku vzorku a následně se za použití rozprašovacího zařízení potáhne povlakem vodivého kovu, např. zlatem. Vzorek se skenuje zaostřeným jemným paprskem vysokoenergetických elektronů. Povrchové charakteristiky jsou získány ze sekundárních elektronů emitovaných z povrchu vzorku. Nanočástice musí být schopny odolat podtlaku a elektronový paprsek může poškodit polymer. Průměrná velikost získaná pomocí SEM je srovnatelná s výsledky DLS. Tyto techniky jsou však časově náročné, nákladné a často vyžadují doplňující informace o distribuci velikosti [41; 39].

Snímky pořízené SEM chitosanových nanovláken a nanočástic jsou znázorněny na obrázku 4. K pozorování struktury nanovláken (s plošnou hmotností 2,8 g/m²) i nanočástic byl použit přístroj VEGA3 TESCAN s detektorem primárních elektronů a vzorky byly pro zvýšení vodivosti potaženy vrstvou zlata (0,2 nm) za použití Balzerova prachového postřikovacího zařízení. Snímky nanovláken byly zhotoveny při zvětšení 5 000x a morfologie vzorků nanočástic byla pozorována při zvětšení 6 000x [6; 43].



Obrázek 4: SEM snímky chitosanových nanovláken (A) a nanočástic (B). Zvětšení nanovláken 5 000x a nanočástic 6 000x. Převzato a upraveno podle [6; 43].

1.3.4 Polymery využívané k přípravě nanomateriálů

K výrobě biomateriálů se používají biologicky odbouratelné polymery. Takovéto polymery jsou žádoucí, protože se rozpadají, vylučují nebo jsou absorbovány. Nepotřebují nijak odstranit, ani nevyžadují žádné chirurgické zákroky. Mimo jiné by měly být polymery biokompatibilní a neměly by vyvolávat imunitní reakce. Navíc by produkty degradace polymerů měly být netoxické, metabolizované a snadno odstranitelné. Biologicky odbouratelné polymery jsou vhodné zejména pro biomedicínské aplikace, jako jsou např. implantáty, dodávání léků, lékařské zákroky aj. Jejich rychlost rozkladu by měla být srovnatelná s procesem hojení ran. Biodegradovatelné polymery můžeme rozdělit na přírodní (polysacharidy a proteiny) a syntetické (estery, amidy, ethery a urethany) [44].

Přírodní polymery umožňují život na zemi. Mezi takové polymery patří bílkoviny, peptidy, enzymy, RNA a DNA. Jiné přírodní polymery zahrnují polypeptidy a polysacharidy. Mezi jejich další výhody mimo jejich přirozený původ patří nenákladnost a přítomnost reaktivních míst, které umožňují konjugaci, chemické modifikace a zesílení. Sami o sobě mohou však vyvolávat biologickou aktivitu, což není vždy žádoucí. Mohou se tak objevovat nežádoucí imunitní a následně zánětlivé reakce. Nejčastěji využívané přírodní polymery jsou popsány níže [44; 45].

Syntetické polymery jsou téměř stejně rozmanité, jako ty přírodní. Na základě monomerních jednotek lze dosáhnout širokého spektra fyzikálních a chemických vlastností. Oproti přírodním polymerům mají přesně známé složení, jsou méně nákladné a lze jejich kombinací vytvořit různé kopolymery s odlišnými vlastnostmi. V důsledku chybějících signálů pro rozpoznání bu-

něk však vykazují tyto materiály horší buněčnou adhezi. Existují i polymery s velmi pokročilými mechanickými vlastnostmi, jako jsou polymery s velkou tvarovou pamětí, které se mohou deformovat a vracet do původního tvaru na základě stimulu, kterým může být pH, teplota, světlo nebo magnetické pole. V následující části jsou popsány některé důležité biologicky rozložitelné polymery [46; 45].

Chitosan je druhým nejhojnějším biopolymerem v přírodě, který je hlavní složkou exoskeletu korýšů a hmyzu. Mimo jiné se vyskytuje i v buněčné stěně kvasinek a hub. Jedná se o derivát přírodního polysacharidu chitinu, který je plně acetylovaný [47; 48]. Chitosan je lineární polysacharid skládající se z jednotek glukosaminu s náhodně lokalizovanými N-acetylglukosaminovými skupinami [48]. Stejně jako chitin je izolován z buněčných stěn plísní a exoskeletů. Komerčně se chitosan vyrábí částečnou deacetylací chitinu. V mírně kyselých roztocích s hodnotou pH pod 6,5, např. v kyselině octové a kyselině mravenčí, je chitosan rozpustný [49; 47]. Disponuje řadou pozitivních vlastností, kterými je vynikající biokompatibilita, vysoká bioaktivita, biologická rozložitelnost, selektivní propustnost, absorpční kapacita a antimikrobiální aktivita. Mimo jiné má schopnost vytvářet vlákna, gely a filmy. Tyto vlastnosti poskytují chitosanu uplatnění v řadě aplikací. Příkladem využití chitosanu je jeho použití jako nosiče léčiv pro řízené uvolňování a také podporuje hojení vředů a lézí [50; 47; 48].

Alginát je biokompatibilní, biologicky odbouratelný, hydrofilní a poměrně ekonomický přirozeně se vyskytující polymer obsažený v buněčných stěnách různých druhů hnědých řas (*Phaeophyceae*). Výběh druhu je založen na hojnosti výskytu řas a nemá vliv na kvalitu samotného polymeru. Navíc některé druhy bakterií čeledí *Pseudomonas* a *Azobacter* produkují alginát jako exopolysacharid [51; 50]. Díky své biokompatibilitě, relativně nízkým nákladům, nízké toxicitě a snadnému gelování po přidání mono- nebo divalentních kationtů našel alginát uplatnění v řadě biomedicínských aplikací [52; 53]. Pro gelování alginátů jsou nejčastěji používány sodné a vápenaté ionty. Tento mechanismus tvorby gelu je však těžké ovládat a nevede k jednotné struktuře [51]. Algináty se pro enzymatickou imobilizaci používají ve formě perliček, hydrogelů nebo kapslí [53]. Díky své strukturní podobnosti s extracelulární matrix živých tkání nachází alginátové hydrogely uplatnění při transplantaci buněk, dodávání bioaktivních činidel, jako jsou malé chemické látky a proteiny a při hojení ran jako obvazy. Alginátové obvazy v místě rány minimalizují bakteriální infekci a usnadňují hojení. Alginátové gely mohou být navíc podávány do těla orálně i injekčně minimálně invazivním způsobem, což umožňuje

rozsáhlé farmaceutické aplikace. Přestože byla biokompatibilita alginátu *in vitro* i *in vivo* rozsáhle vyhodnocována, stále existují diskuse o vlivu různých úrovní čistoty alginátu. Vzhledem k tomu, že se alginát získává z přírodních zdrojů, mohou být přítomny různé nečistoty, jako jsou těžké kovy, endotoxiny, proteiny a polyfenolické sloučeniny. Nečistotám zbývajícím v alginátu může být přičítána imunogenní odezva na injekčních nebo implantačních místech. Alginát s velmi vysokou čistotou se získává čištěním víceúrovňovým extrakčním procesem [52].

Celulóza je vzhledem ke své mechanické odolnosti součástí stěn buněk rostlin a v některých případech i součástí bakteriální buněčné stěny (např. *Acetobacter sp.*). Jedná se o nejdůležitější a nejrozšířenější přírodní polymer na zemi [50; 49]. Celulózu tvoří několik stovek monosacharidových jednotek glukózy a tvoří tak lineární polysacharid. Nerozpustnost celulózy je jejím hlavním omezením pro její využití. Nanokompozity celulózy způsobily převrat ve zdravotnictví a jsou používány hlavně v oblasti vazivového a tkáňového inženýrství a hojení ran. Celulóza je vhodná pro tvorbu hydrogelů, které se mimo jiné využívají i k absorpci těžkých kovů a dodávání léků [49].

Želatina, přírodní polymer odvozený z kolagenu, je díky své biokompatibilitě a biologické rozložitelnosti běžně využívána pro biomedicínské a farmaceutické aplikace [49]. Z kolagenu se želatina získává hydrolytickou degradací. Kyselou degradací se vyrábí želatina typu A, zatímco alkalickou degradací vzniká želatina typu B. Želatinové roztoky vytváří po ochlazení gelovité struktury, což činí želatinu zajímavou pro aplikace tkáňového inženýrství [51]. Nevýhodou želatiny je však její snadná rozpustnost ve vodě (již při 37 °C) a rozpad gelů již při pokojové a nižší teplotě. Pokud je však používána ve spojení s biologicky odbouratelnými syntetickými polymery, lze tyto nevýhody snadno překonat [54]. Díky svým netoxickým, bioaktivním a biologicky odbouratelným vlastnostem je želatina atraktivní i pro kontrolované uvolňování [49]. Na rozdíl od kolagenu želatina nevyvolává žádnou významnou antigenitu. Díky své dostupnosti a relativně nízké ceně je želatina využívána jako biomateriál pro hojení ran [55].

Kolagen je biopolymer, který je snadno dostupný a má široké uplatnění díky svým vlastnostem, mezi které patří biologická odbouratelnost, biokompatibilita a vysoká všestrannost. Navíc je netoxický, snadno se absorbuje v těle a má velmi nízkou antigenitu. Kolagen tvoří základní stavební hmotu pojivových tkání a je nejhojnějším proteinem u savců, tvoří asi 20-30 % celkového tělního proteinu. Izolace kolagenu se provádí z různých zdrojů, např. hovězí a kuřecí kůže

a šlachy a kosti poraženého skotu. Dále se izolace provádí i z biologických odpadů, což je nákladově velice efektivní. Kolagenová molekula se skládá ze tří polypeptidových řetězců navzájem navinutých jako v trojvláknovém lanu [56; 57]. Funkční skupiny přítomné v kolagenu, jako je aminoskupina a karboxyskupina, pomáhají při modifikaci kolagenu, které vyhovují různým účelům aplikace, např. hojení ran, dodávání léků a aplikace v tkáňovém inženýrství. Jako matrice pro dodávání léků se využívá kolagen ve formě gelu vzhledem ke svým charakteristickým vlastnostem, kterými jsou propustnost, biokompatibilita a injektabilita. Pro kontrolované dodávání léků a prodloužení uvolňování léku se využívají kolagen-syntetické polymerní kompozity a difuzní membrány na bázi kolagenu [57].

Kyselina hyaluronová (HA) je biokompatibilní, biologicky odbouratelný mukoadhezivní polysacharid s negativním nábojem a velkou molekulovou hmotností. HA je lineární glykosaminoglykan tvořený z N-acetyl-D-glukosaminu a kyseliny glukuronové. Vyskytuje se téměř ve všech biologických tekutinách a tkáních [47; 58]. Přesto, že je HA téměř všudypřítomná v lidském těle a jiných obratlovců, její nejvyšší množství se nachází v extracelulární matrix (ECM) měkkých pojivových tkání a kloubní tekutině [58]. HA je přítomna i u některých bakteriích, ale chybí u hub, rostlin a hmyzu [58]. Asi polovina HA lidského těla je v kůži, která imobilizuje vodu a udržuje tak stlačitelnost pokožky. V kůži dále slouží jako vychytávač volných radikálů produkovaných působením ultrafialovým (UV) světlem slunce na kůži. Mezi její další vlastnosti řadíme protizánětlivost a elasticitu [58]. Polymery HA se používají při přípravě gelů, které se využívají jako matrice pro přepravu léků. Dále se využívají pro hojení ran, léčbě syndromu suchého oka aj. [47].

Karagenan pochází z červených mořských řas *Rhodophyceae*. Jedná se o obecný název pro rodinu gelotvorných a viskozitních polysacharidů s velkou molekulovou hmotností. Karagenan je lineární aniontový polysacharid obsahující sulfátové skupiny. [47; 59] Karagenany jsou velké, vysoce flexibilní molekuly, které mají schopnost vytvářet při pokojové teplotě různé gely [60]. Karagenan byl konzistentně používán k imobilizaci různých enzymů, jako je lipáza a je považován za dobrou náhražku želatiny [59].

Polyuretan (PU) vzniká polyadici diisokyanátů a diolů nebo diaminů (polymočovina) v přítomnosti katalyzátoru za vzniku karbamátové (uretanové) vazby. PU jsou biokompatibilní, biostabilní a tvarovatelné polymery [61]. Využití PU nachází např. při výrobě obvazů na rány, kdy působí jako polopropustná membrána chránící ránu před okolním prostředím a bakteriál-

ním vstupem. Polopropustnost PU vytváří v ráně vhodné vlhké prostředí. Vzhledem k významné tkáňové biokompatibilitě byly dále uplatněny i při výrobě kardiostimulátorů a cévních implantátů. PU je však špatně přilnavý. Tento nedostatek se dá odstranit potažením PU kolagenem, nebo peptidy na bázi kolagenu, což značně zvyšuje adhezi buněk a také zvyšuje biokompatibilitu [62].

Kopolymer kyseliny glykolové a DL-mléčné (PLGA; angl. poly(lactic-co-glycolic acid) se připravuje kopolymerací kyseliny polymléčné (PLA) a kyseliny polyglykolové (PGA). Kopolymerací se minimalizují nevýhody individuálních PLA a PGA.

PGA byl jedním z prvních materiálů svého druhu, který byl studován pro biomedicínské aplikace. Využití nalézá převážně v tkáňovém inženýrství a uplatňuje se i při dodávání léků. Mezi jeho významné vlastnosti patří vysoká krystalinita, která vykazuje velkou mechanickou pevnost a malou rozpustnost v běžných rozpouštědlech. Tyto vlastnosti však způsobují i problémy při výrobě PGA. Využití PGA omezuje i jeho vyšší stupeň degradace, což vede ke zvýšení kyselosti okolních tkání, čímž dochází ke vzniku zánětu [61].

PLA je opticky aktivní a je k dispozici ve čtyřech různých stereoizomerních formách, kterými jsou kyselina poly-L-mléčná (PLLA), kyselina poly-D-mléčná (PDLA), kyselina poly-D, L-mléčná (PDLLA) a kyselina mléčná. PLLA a PDLA jsou dostupné v krystalické formě, zatímco PDLLA a kyselina mléčná jsou amorfní s nízkou mechanickou pevností. PLLA a PDLLA jsou slibné biodegradabilní polymery pro biomedicínské aplikace. Přítomnost methylové skupiny činí PLLA více hydrofobní než PGA, a proto vykazuje PLLA delší dobu degradace. PLLA byla použita pro celou řadu biomedicínských aplikací, např. jako nosiče v tkáňovém inženýrství. PDLLA se využívají hlavně při dodávání léků [61].

PLGA má mnoho důležitých vlastností, jako je biokompatibilita, mechanická pevnost a snadná manipulace v požadovaných velikostech a tvarech [62]. Mezi významné vlastnosti PLGA patří rychlá degradace, která je vhodná pro dodávání léků, vakcín, proteinů, peptidů a makromolekul. PLGA vykazuje i výbornou bioadhezi a schopnost buněčné proliferace, díky čemuž se hodí na aplikace tkáňového inženýrství [61]. Významné množství výzkumů je zaměřeno na aplikaci kopolymerů PLA-PGA jako stehů, svorek, spon a výstužních materiálů [63].

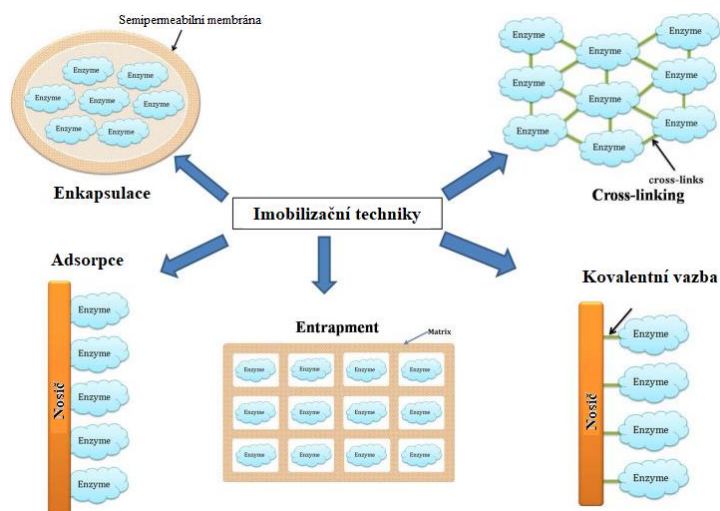
Polyethylenglykol (PEG) je flexibilní polymer na bázi éteru. Díky tomu, že je hydrofilní, neimunogenní a biokompatibilní je PEG žádoucím materiálem pro obvazy na hojení ran. PEG

vykazuje dobrou afinitu s růstovými faktory, jako je např. EGF, a tak mohou být spojeny a růstové faktory tak mohou být zacíleny přímo do místa rány. Smícháním polymeru s chitosanem a PLGA se stabilizují jeho mechanické, tepelné a krystalické vlastnosti [64].

Polykaprolakton (PCL) má jedinečné mechanické vlastnosti, které z něj činí dokonalý biokompatibilní, biodegradabilní a biologicky resorbovatelný polymer. PCL je semikrystalický polyester, který je netoxický a lze ho snadno zpracovat do různých tvarů a forem. Využívá se hojně v oblasti tkáňového inženýrství. Degradace PCL je pomalejší než degradace PLA, používá se na dlouhodobé implantáty. Produktem degradace PCL je kyselina kapronová. PCL elektrospinnová vlákna jsou vhodná pro léčbu chronických a akutních ran. Materiál PCL má však špatné antimikrobiální vlastnosti. Z tohoto důvodu jsou do matrice PCL zabudovávány nanočástice stříbra, zajišťuje se tak odolnost vůči mikrobiální kontaminaci [62].

1.4 Metody imobilizace ligandů

Imobilizační techniky lze rozdělit na reversibilní a ireversibilní. Adsorpce, vazba disulfidickými můstky, afinitní vazba a chelatace se řadí mezi imobilizační techniky reversibilní. Mezi ireversibilní imobilizační techniky patří kovalentní vazba, entrapment, crosslinking a enkapsulace [65]. Na obrázku 5 je znázorněno schéma některých imobilizačních technik. Metody imobilizace se dají využít i v různých kombinacích, nicméně žádná metoda, ani použitý nosič není ideální pro všechny typy biomolekul a jejich různé aplikace. To je způsobeno např. odlišnými chemickými vlastnostmi a složením enzymů, různými vlastnostmi substrátů a produktů a různými způsoby použití [66]. Nanomateriály působí jako velmi účinné nosné materiály vzhledem k jejich ideálním vlastnostem pro vyvážení klíčových faktorů, které určují účinnost biokatalyzátorů. Na nanomateriály lze imobilizovat např. léčiva, enzymy, proteiny, sondy, buňky aj. Nanočástice poskytují biokompatibilní prostředí pro enzymatickou imobilizaci a jsou ideálními nosiči i díky jejich malé velikosti a velkému povrchu. Bylo zjištěno, že stabilita a aktivita enzymů se díky imobilizaci na nanomateriálech zvyšuje [67]. Metody jsou postaveny na imobilizaci enzymů, jelikož byly enzymy v rámci této problematiky nejvíce a rozsáhle studovány. Vazby jiných biomolekul se neliší.



Obrázek 5: Schéma imobilizačních technik. Převzato a upraveno podle [68].

1.4.1 Adsorpce

Adsorpce enzymů (nebo buněk) na nerozpustných nosičích je nejstarší a nejjednodušší technika enzymové imobilizace. Jedná se o reversibilní povrchovou interakci mezi inertním nosičem a enzymem, kdy se enzym adsorbuje na vnější povrch nosiče. Při adsorpci se uplatňují slabé (nízko energické) síly, jako jsou iontové interakce, vodíkové vazby, Van der Waalsovy síly a hydrofobní interakce [67; 69]. I když se jedná o velmi slabé síly, tak ve velkém počtu poskytují dostatečnou vazebnou pevnost [67; 69]. Metoda je poměrně levná, rychlá a snadná na provedení. Oproti jiným metodám dochází k zachování vysokého stupně aktivity enzymu, protože nedochází ke kovalentní chemické vazbě a díky tomu ani k modifikaci struktury. Setkáváme se však i s nevýhodami, mezi které patří zejména desorpce enzymů z nosiče vlivem změnami teploty, pH nebo iontové síly [67; 69]. Používané nosné materiály mohou být organické (např. škrob, celulóza), anorganické (např. oxid hlinitý, silikagel) a modifikované sepharosy (zesíťená agaróza) a iontoměničové pryskyřice [70]. Výběr adsorbentu závisí především na minimalizaci úniku použitého enzymu a zabránění poškození a chemické modifikaci enzymu [69].

1.4.2 Entrapment

Jednou z nejjednodušších technik imobilizace je entrapment (zachycení). Tato metoda může být použita nejen k imobilizaci enzymů, ale i celých buněk. Jedná se o metodu ireversibilní, kdy jsou enzymy nebo buňky imobilizovány fyzikálním „zachycením“ uvnitř polymeru, nebo

gelové matrice. Protein obklopují monomerní jednotky nosiče, které v jeho přítomnosti polymerizují a tím ho uzavírají do mřížky [70; 50; 71]. Na stabilizaci proteinu na matici se podílejí nekovalentní nebo kovalentní vazby [59].

Jde o rychlou a levnou techniku. Mezi největší nevýhodu metody patří možnost, že mohou nízkomolekulární enzymy z matrice uniknout. Dále se setkáváme s omezenou difúzí pórů a omezenou kapacitou matrice nosiče [70; 71].

Fyzikálně-chemické vlastnosti matrice v gelové formě mají významný vliv na reakce zachyceného biologicky aktivního materiálu v gelu [69]. Kvůli množství a velikosti pórů je u této metody důležitý výběr materiálu, ze kterého je nosič vyroben. Kritický parametr při výběru matrice je velikost pórů a ta je nastavena tak, aby zabraňovala ztrátě enzymu, zajistila dostatečnou pevnost struktury, ale také umožňovala volný pohyb substrátu a produktu. Běžně používanými maticemi jsou želatina, karagenan, alginát, agar a polyakrylamidový gel [70; 69; 50].

Rozdíl mezi zachycovací technikou a adsorpcí a kovalentní vazbou je, že enzym je sice omezen pohybem struktury gelové mřížky, ale zároveň je v roztoku volný [69].

1.4.3 Crosslinking

Metoda Crosslinking (zesítování) je charakteristická tím, že na rozdíl od ostatních metod nevyžaduje žádný nosič. Molekuly enzymů jsou imobilizovány vytvářením vzájemných kovalentních vazeb mezi sebou prostřednictvím polyfunkčních činidel. Nejpoužívanějším polyfunkčním činidlem je glutaraldehyd. Při použití glutaraldehydu jsou vazby mezi enzymy nevratné a mohou odolat extrémnímu pH a teplotě [69; 70]. Glutaraldehyd je poměrně levný a stabilní, pro zesítování některých enzymů je však nevhodný [67]. Dalšími používanými činidly jsou diazoniové soli, hexamethylendiisokyanát a toluendiisothiokyanát. Polyfunkční činidla mohou denaturovat nebo strukturně modifikovat enzym, což vede ke ztrátě jeho katalytických vlastností, a to se pokládá za největší nevýhody této metody. Tato technika je levná, jednoduchá a široce používaná v průmyslových aplikacích [69; 70].

1.4.4 Enkapsulace

Enkapsulace je podobná technice entrapmentu (zachycení) a jedná se tedy také o metodu ireversibilní imobilizace. Enzymy jsou uzavírány do polopropustné membrány obvykle ve formě kapslí. Enzymy nebo buňky jsou omezeny stěnou polopropustné membrány, uvnitř prostoru se však pohybují volně [50; 71]. Polopropustnost membrány umožňuje volný tok živin a substrátů, a přitom udržuje enzym uvnitř kapsle. [50] Zároveň je díky kapsli enzym chráněn

před vnějšími podmínkami prostředí. Účinnost enkapsulace závisí na stabilitě enzymů uvnitř kapsle [69; 50]. Enkapsulace lze dosáhnout například tvorbou liposomálních vesikul nebo pomocí nanočástic [71]. Důležitým faktorem, stejně jako u entrapmentu, je velikost pórů [50]. Setkáme se i s možností vzniku ruptury membrány, což je problém spojený s difúzí, kdy se produkty z reakce rychle akumulují [69].

Jako kapsle mohou být použity i biologické buňky. Známým příkladem takových kapslí je použití erytrocytů. Erytrocytární membrána je propustná pro malé molekuly. V hypotonickém prostředí erytrocyty nabobtnají, rozšiřují buněčnou membránu a rozšiřují tak svou průchodnost. V tomto stavu se mohou enzymy dostat dovnitř erytrocytu a zároveň dochází i k uvolňování erytrocytárních proteinů. Vrácení těchto zvětšených erytrocytů do izotonického roztoku umožňuje buněčné membráně se vrátit zpět do normálního stavu a enzymy uvnitř buňky již nemohou uniknout [69].

Pro zapouzdření jsou vhodné biopolymery jako je chitosan, kyselina alginová, celulóza a maltodextrin. Populární jsou i dvouvrstvé mikrokapsle, které jsou tvořeny z dvou různých biopolymerů [50]. Touto metodou můžeme imobilizovat i několik enzymů najednou, vzniká tak multienzymový komplex [71].

1.4.5 Kovalentní imobilizace

Tato technika je široce využívaná a k imobilizaci enzymů dochází vytvořením kovalentních vazeb mezi enzymem a nosičem [70]. Vazba vzniká mezi funkčními skupinami přítomnými na povrchu nosiče a povrchovými funkčními skupinami enzymu, protože tyto funkční skupiny enzymu nejsou zodpovědné za jeho katalytickou aktivitu [67; 69]. Kovalentní spojení se objevuje v důsledku postranního řetězce aminokyselin enzymů, jako je arginin, kyselina asparagová, histidin a stupně reaktivity založené na různých funkčních skupinách, jako je imidazol, indolyl aj. [59] Reakce musí být provedeny za podmínek, které nezpůsobují ztrátu enzymové aktivity a nesmí být použitými činidly ovlivněno aktivní místo enzymu [67].

Nosič obvykle vyžaduje před navázáním enzymu předběžnou úpravu [70]. Peptidově modifikované povrchy používané pro enzymatickou vazbu mají za následek vyšší specifickou aktivitu a stabilitu s řízenou orientací na proteiny [59]. Spojení mezi nosičem a enzymem může být dosaženo buď přímou vazbou mezi složkami nebo prostřednictvím interkalačního článku s různou délkou, který se nazývá spacer [67]. Výběr specifického nosiče je ovlivněn mnoha faktory,

jedním z nejdůležitějších pro udržení enzymové aktivity je hydrofilnost. Populárními pro imobilizaci jsou tedy hydrofilní nosiče, jako jsou polysacharidové polymery (např. celulóza, škrob, dextran a agaróza). Dalšími populárními nosiči jsou porézní skla a porézní oxid křemičitý [69].

Kovalentní vazba se skládá ze dvou kroků. Prvním krokem je aktivace funkčních skupin na povrchu nosiče specifickým činidlem a druhá přidáním enzymu, který s aktivovaným povrchem nosiče vytvoří kovalentní vazbu. Obvykle je aktivační reakce navržena tak, aby na nosiči vznikly silné elektrofilní (elektronově deficientní) funkční skupiny. K aktivaci hydroxylových skupin v polysacharidových materiálech se nejčastěji používá Bromkvan (CNBr) [69]. Hlavní roli během imobilizace hraje zesilovací činidlo, které udržuje strukturní a funkční vlastnosti enzymů. Takovýmto běžně používaným činidlem je glutaraldehyd [59].

Metoda je jen zřídka využívána pro imobilizaci buněk, protože používaná činidla pro tvorbu kovalentních vazeb jsou obvykle cytotoxická a je obtížné nalézt podmínky, kdy mohou být buňky imobilizovány bez poškození [50]. Nevýhodou je i skutečnost, že vlivem vzniklé kovalentní vazby dochází ke ztrátě enzymové aktivity [70].

Jedná se o důležitou techniku enzymové imobilizace, protože kovalentní vazby obvykle poskytují silnější vazby mezi enzymem a nosičem v porovnání s jinými metodami, jako je například nekovalentní adsorpční imobilizace [71].

1.5 Metody detekce proteinů a peptidů

1.5.1 Přímé spektrofotometrické metody

Přímá spektrofotometrická stanovení lze provádět díky přítomnosti chromoforů v molekulách proteinů, které absorbují v UV oblasti spektra. Jde o nedestruktivní metodu a pracuje se s křemennými kyvetami. Chromoforem je peptidová vazba a je zde velká závislost na aminokyselinovém složení proteinu.

Přímé měření absorbance bílkovin pro jejich kvantifikaci se provádí buď při 280 nm, nebo při 205 nm. V blízké UV oblasti (280 nm) není velká citlivost, v daleké UV oblasti (205 nm) pak dochází ke značné interferenci. Při měření v daleké UV oblasti je nutno precizně volit pufr (aby neabsorboval), vzorky by měly být zbaveny malých částic (a tím i opalescence) centrifugací, pokud možno bez velkého obsahu kyslíku. Při 205 nm se měří především čisté bílkoviny, protože přítomnost ostatních absorbujících příměsí negativně ovlivňuje při této vlnové délce výsledky měření [72; 73].

Vzhledem k tomu, že UV absorpce při 280 nm je dána aromatickými aminokyselinami (hlavně tryptofan a tyrosin), je nutná jejich přítomnost. Přítomnost nukleových kyselin však významně ovlivňuje výsledky měření silnou absorbancí nukleotidů. Tato interference se eliminuje měřením při dvou vlnových délkách zároveň (280 nm a 260 nm) a početní korekcí podle rovnice Christiana a Warburga:

$$c [\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}] = (1,55 \cdot A_{280}) - (0,76 \cdot A_{260}) \quad [72]$$

1.5.2 Kolorimetrické metody

Na rozdíl od přímého spektrofotometrického stanovení lze kolorimetrické metody použít při měření směsí proteinů o neznámém složení, jsou však složitější na provedení. Výběr vhodné metody pro daný vzorek je založen na vlastních možnostech analýzy a řídí se několika kritérii, mezi která patří citlivost, interferující příměsi, délka provedení, množství a charakter proteinu, požadavek na přesnost i ekonomická náročnost. Vzhledem k tomu, že jsou metody závislé na složení proteinu, je nutné uvést použitý standard [72; 74].

Dnes se preferují spektrofotometrické metody. Kjeldahlova metoda (stanovení dusíku po mineralizaci), refraktometrie nebo gravimetrie jsou již minulostí.

Všechny zmíněné metody jsou destruktivní, vzorek je pro další analýzu nepoužitelný [72].

Biuretová reakce

Důkaz peptidové vazby neboli Biuretová reakce je kvalitativní analýza. Jedná se o reakci, která je založena na tvorbě charakteristicky zbarvené komplexní měďnaté soli. Sloučeniny obsahující v molekule dvě a více amidových nebo peptidových vazeb (-CO-NH, nebo -CO-NH₂) tvoří s měďnatými ionty (Cu²⁺) v alkalickém prostředí červenofialově zbarvené chelátové komplexy, které se měří při 540 nm [74].

Reakci neposkytují jen bílkoviny, ale i jejich štěpné produkty, peptony a polypeptidy. Odstín (intenzita) zbarvení produktu je podmíněn délkou řetězce peptidu, a tedy počtem peptidových vazeb. Peptidy se dvěma, čtyřmi a více zbytky aminokyselin vytvářejí komplex červený a tripeptidy fialový. Dipeptidy a jednotlivé aminokyseliny tuto reakci neposkytují [75].

Základními složkami reagentie jsou octan měďnatý (zdroj Cu²⁺), jodid draselný (zabraňuje autooxidaci Cu²⁺ → Cu⁺), hydroxid sodný (pro alkalické prostředí), vinan sodno-draselný (pro stabilizaci činidla a snížení tvorby zákalu) a detergent (pro lepší rozpustnost proteinů) [76].

Název reakce je odvozen od „biuretu“, triviálního názvu sloučeniny, která vzniká ze dvou molekul močoviny při jejím zahřívání. V této látce je přítomna amidová vazba analogická peptidové vazbě v proteinech a jedná se o nejjednodušší sloučeninu poskytující pozitivní reakci [74].

Hlavní výhodou této metody je, že je lineární v širokém rozsahu koncentrace bílkovin, zároveň je však ale metoda málo citlivá (1-20 mg), tudíž je vhodná pro vzorky s vyšším obsahem bílkovin. Interference s touto metodou poskytuje glukosa, amonné sole a některé fosfáty [74]. Pro kalibraci metody jsou nutné standardy (BSA, ovalbumin) [76].

Metoda s bicinchoninovou kyselinou

Metoda s bicinchoninovou kyselinou (BCA, 2,2-bichinolin-4,4-dikarboxylová kyselina) pro stanovení bílkovin byla představena v roce 1985 Paulem K. Smithem. Jedná se o kolorimetrickou metodu, která využívá sodné soli kyseliny BCA ke spektrofotometrickému stanovení celkových proteinů. Reakce je založena na redukci Cu^{2+} iontu na Cu^+ iont peptidovou vazbou a na následné chelataci Cu^+ iontu sodnou solí BCA za vzniku barevného komplexu. Reakce probíhá v alkalickém prostředí. Redukce Cu^{2+} iontu je způsobena cysteinem, tryptofanem, tyrosinem a peptidovými vazbami [74; 77; 78].

Činidlo se připravuje smísením roztoků sodné soli BCA v alkalickém prostředí (100 dílů) a sulfátu měďnatého (1 díl). Všechna činidla jsou při pokojové teplotě stabilní 2 roky a pracovní činidlo je stabilní po dobu 24 hodin [77].

Měření se provádí při 562 nm, kdy má fialová barva vzniklého komplexu své absorpční maximum. Rovněž se ale měření může provádět i při vlnové délce mezi 550-570 nm s minimální (méně než 10%) ztrátou signálu [78; 77]. Výhodami této metody jsou její citlivost, která je na úrovni Lowryho metody, avšak je rychlejší a snazší než Lowryho metoda. Dále mezi výhody patří odolnost vůči detergentům, vysoká stabilita činidel a barevného komplexu při laboratorní teplotě. Setkáme se však i s menšími interferencemi (např. redukující sacharidy, amonné ionty), kdy je některé možné eliminovat selektivním srážením bílkovin trichloroctovou kyselinou před reakcí s CBA [74; 77].

Pro kalibraci je nutný standard, kterým je BSA. Lineární pracovní rozsah pro BCA metodu je od 20-2000 $\mu\text{g/ml}$ [78].

Lowryho metoda

Tato metoda vylepšuje méně citlivou Biuretovu metodu. Citlivost biuretové reakce je zvýšena přidavkem Folin-Ciocalteuova fenolového činidla. Činidlo obsahuje kyseliny fosfomolybdenové a fosfowolframové, které se redukují tyrosinovými zbytky (ale i tryptofanem a cysteinem) proteinů a barví se modře. Principem je nejprve provedení biuretové reakce, kdy vzniká fialovomodrý komplex a pak přidavek Folinova činidla. Lowryho metoda mnohem více závisí na složení proteinu než Biuretova metoda a je citlivá na změny pH, kdy by se pH reakční směsi mělo udržet v mezích 10-10,5 [74; 77; 79].

Maximální absorbance vzniklého modrého komplexu se měří při 750 nm. Citlivost této metody se pohybuje v rozmezí od 2 do 100 µg. Zbarvení vzniklého komplexu však není v čase stabilní a závisí na množství tyrosinu a tryptofanu. Pro kalibraci jsou nutné standardy (BSA, ovalbumin). Nevýhodou metody je úzký interval pH reakční směsi, ve kterém je použitelná. Použití malých objemů vzorku (relativně vůči objemu reakční směsi) umožňuje tuto nevýhodu odstranit [79; 77]. Látky interferující s Lowryho metodou jsou aminokyseliny, některé pufrы, lipidy, cukry, soli, nukleové kyseliny, sulfhydrylové reagenty, amoniové ionty a thiolové sloučeniny. Tyto látky je nutno před měřením odstranit (např. vysrážením proteinů a následnou centrifugací) [79].

Metoda Bradfordové

Principem metody je adsorpční vazba barviva Coomassie brilliant Blue v kyselém prostředí na molekulu proteinu, kdy dochází k posunu absorpčního maxima barviva ze 465 nm na 595 nm, a tím dochází i ke změně barvy roztoku z hnědé na intenzivně modrou. Vzrůst absorbance při 595 nm může být použit jako měřítko koncentrace bílkovin [80].

Na vazbě se podílejí hydrofobní a iontové interakce. Závisí na obsahu bazických (zvláště argininu), ale i aromatických aminokyselin. Reagencie pro toto stanovení obsahuje barvivo Coomassie brilliant Blue, methanol a kyselinu fosforečnou. Jedná se o metodu velmi populární díky její rychlosti (cca 5 min). Vybarvení reakce je stabilní nejméně hodinu a test je jednoduchý, rychlý a snadno zautomatizovatelný [81; 80].

Řada látek však interferuje, negativně zejména detergenty (SDS, Triton). Nedává tedy tak spolehlivé výsledky jako obdobně citlivá BCA metoda, kde tyto látky neruší. Citlivost je vyšší než u Lowryho a BCA metody (1 µg/ml), lineární kalibrace max. po 20 µg proteinu. Kalibračním standardem je BSA [77].

Ninhydrinová metoda po kyselé hydrolyze proteinů

Při tomto stanovení jsou proteiny nejprve hydrolyzovány 6% kyselinou sírovou při 100 °C na aminokyseliny. Dále jsou hydrolyzáty neutralizovány a aminokyseliny kvantifikovány derivatizací ninhydridem. Měření absorbance probíhá při 570 nm, kdy je kalibračním standardem leucin. Většina proteinů, kromě těch, které mají neobvyklé složení (např. vysoký obsah prolinu, síry nebo sacharidů), poskytuje při použití leucinu jako kalibračního standardu uspokojivé výsledky. Jedná se o časově náročnou metodu a jednotlivé aminokyseliny při reakci neposkytují stejný „barevný výtěžek“ [74; 82].

Při stanovení neinterferují fenoly a podobné sloučeniny jako při stanovení Folinovým činidlem, a dokonce ani báze nukleových kyselin. Interferují však amonné ionty, které se ninhydridem silně barví. Pokud se před hydrolyzou proteiny vysráží kyselinou trichloroctovou, amonné ionty zůstanou v supernatantu [74; 82].

Metoda se osvědčuje při stanovení proteinů v pevném a suchém materiálu, který lze získat z rostlin [74].

1.5.3 Fluorescenční stanovení

Fluorimetrické stanovení proteinů je založeno na reakci primárních aminoskupin v proteinu (Lysin, N-koncová aminoskupina) s o-ftalaldehydem. Měření probíhá po přidavku hydroxidu sodného. Každý vzorek se měří pouze jednou, protože ozáření snižuje intenzitu fluorescence. Excitační vlnová délka je při 340 nm a emise je mezi 440 a 455 nm.

Toto stanovení ruší pufrы s obsahem primárních aminoskupin (Tris). Nejlépe používaným pufrem je borátový pufr o pH 10,4. Citlivost metody můžeme zvýšit hydrolyzou proteinů před měřením [77; 73].

1.5.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) je separační a současně analytická metoda, která se využívá ke stanovení koncentrace proteinů ve vzorku nebo k izolaci jednotlivých složek směsi v kombinaci s dalšími identifikačními technikami jako je např. hmotnostní spektrometrie (MS). Díky spojení MS s HPLC se ukázalo, že je tato technika vysoce výkonná pro identifikaci a charakterizaci proteinů i v komplexních směsích, a to díky své přesnosti, citlivosti a správnosti. MS je vedle vlastní identifikace proteinů vhodná i pro charakterizaci posttranslačních modifikací. HPLC je založena na rozdílné distribuci jednotlivých složek mezi stacionární fází, která je ukotvena uvnitř kolony a mobilní

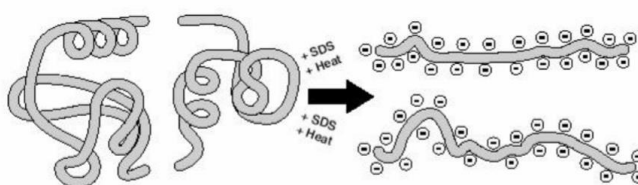
fází, která protéká celým systémem. Separované složky vzorku jsou vnášeny na začátek kolony do proudu mobilní fáze a opouštějí ji v pořadí, v jakém jsou v koloně zadržovány. Nejvíce zadržované složky opouštějí kolonu jako poslední, naopak nejméně zadržované složky jako první. Citlivost metody závisí na volbě použitého detektoru a pohybuje se v rozmezí od pg/ml až µg/ml [83; 80].

Nejčastěji využívanými typy k separaci jsou iontově-výměnná chromatografie a chromatografie na obrácené fázi. Iontově-výměnná chromatografie je založena na vratné výměně iontů mezi mobilní a stacionární fází, tedy na množství nabitých skupin v molekule, kdežto chromatografie na obrácené fázi závisí na celkové polaritě molekuly [83].

1.5.5 Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PAGE) je elektroforetická metoda používaná k separaci proteinů podle jejich velikosti (rozdílné relativní molekulové hmotnosti, udává se v kDa). Elektroforézu lze využít i jako součást vícerozměrné analýzy ke kvalitativnímu stanovení bílkovin metodou Westernblottingu, kde je nutný předstupeň separace.

Principem elektroforézy je rozdílná migrace proteinů, nebo jiných makromolekul nesoucích elektrický náboj v gelu ve stejnosměrném elektrickém poli. Jedná se o metodu srovnávací. Pro srovnávání používáme vhodné proteinové standardy neboli markery o známé molekulové hmotnosti [84; 85]. PAGE se používá v kombinaci s dodecylsulfátem sodným (SDS), který se přidává ke vzorku proteinu. SDS je detergent, pevně se váže k proteinu, denaturuje ho a mění jeho tvar. Negativní náboj navázaného SDS překrývá vlastní náboj proteinu a uděluje mu tak negativní náboj. Proteiny pak putují k anodě [85; 84]. Na obrázku 6 je znázorněn účinek SDS na proteiny.

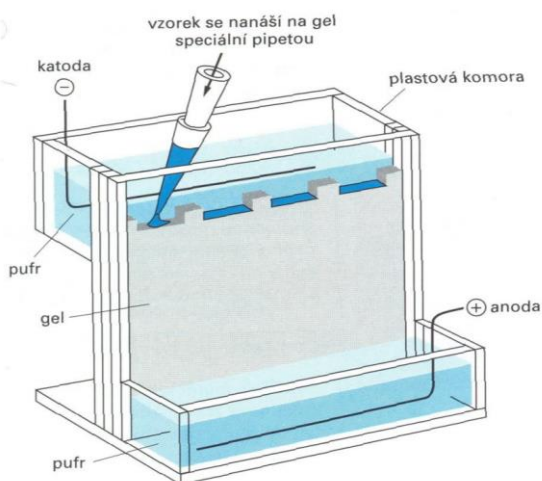


Obrázek 6: Znázornění účinku SDS na proteiny [84].

Separace proteinů se nejčastěji provádí v polyakrylamidovém gelu (obrázek 7), který je vhodný pro separaci proteinů o molekulové hmotnosti 5-250 kDa. Gely jsou vytvořeny polymerací akrylamidu a N,N'-methylenbisakrylamidu, a lze je vyrobit v různých koncentracích a o různých velikostech pórů. Velikost pórů určuje poměr složek akrylamidu a bisakrylamidu

v gelu. Póry v gelu se se vzrůstající koncentrací akrylamidu zmenšují. Porositu lze zvolit podle očekávaného spektra látek a přidá-li se ke vzorku bílkovin merkaptoethanol, redukuje se tak disulfidické vazby a je možné určit např. molekulovou hmotnost podjednotek bílkoviny [84].

Pohyblivost proteinů v gelu ovlivňuje řada faktorů, jako je velikost, tvar, hustota náboje a koncentrace akrylamidu, kdy se vzrůstající koncentrací pohyblivost klesá. Malé proteiny cestují akrylamidovým gelem rychleji, proteiny o velké molekulové hmotnosti se pohybují směrem k anodě pomaleji [84].



Obrázek 7: Separace proteinů v polyakrylamidovém gelu [85].

Detekce rozdělených proteinů na gelu se provádí pomocí barvení gelů, kdy nejběžnějšími způsoby jsou barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue, dusičnanu stříbrného nebo fluorescenčními barvami. Zcela výjimečně se využívá i negativní barvení chloridem měďnatým [84].

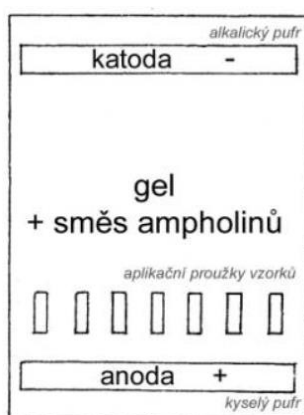
Při barvení Coomassie Brilliant blue se gely ponoří do roztoku obsahujícího alkohol a barvivo zvané Coomassie modř (Coomassie brilliant blue). Proteiny jsou v tomto roztoku jednak denaturovány a tím i fixovány a jednak se vytvářejí komplexy barvivo-protein. Přebytek barviva se odstraní vymýváním gelu kyselým roztokem, nebo elektroforetickým odbarvením. Tímto způsobem se dají detegovat mikrogramová množství rozdělených proteinů.

Citlivější metodou je barvení stříbrem, kdy je možno detegovat až 0,1 ng proteinu v jednom proužku. Je popsána celá řada postupů, všechny jsou však založeny na principu redukce stříbrného iontu na kovové stříbro formaldehydem v alkalickém prostředí uhličitanu sodného. Přesný mechanismus reakce s peptidovými řetězci ale není znám. Po elektroforetické separaci a barvení je následně možné gely po přenesení do elektronické podoby kvantitativně vyhodnocovat denzitometricky [74].

1.5.6 Isoelektrická fokusace

Jedná se o variantu elektroforézy, kde je podpurným médiem polyakrylamidový gel obsahující směs amfolytů. Amfolyty jsou polymery o nízké molekulové hmotnosti vytvářející v gelu gradient pH [85]. Uspořádání isoelektrické fokusace je zobrazeno na obrázku 8.

Isoelektrická fokusace je založena na pohybu proteinů gelem, kdy jsou vystaveny gradientu pH. Změnou pH se mění iontový náboj, který proteiny nesou. Pohyb proteinů se zastaví, dostanou-li se do oblasti takového pH, při kterém nemají žádný náboj tzv. izoelektrický bod. Isoelektrický bod je charakteristickou vlastností proteinů. Proteiny jsou soustředěny (fokusovány) do úzké zóny (odpovídající rozmezí až 0,01 pH) kolem svého izoelektrického bodu, což se projeví velmi ostrými proužky, které jsou pokládány za výhodu této metody [74; 85].



Obrázek 8: Znázornění uspořádání isoelektrické fokusace [86].

1.5.7 Imunochemické metody detekce

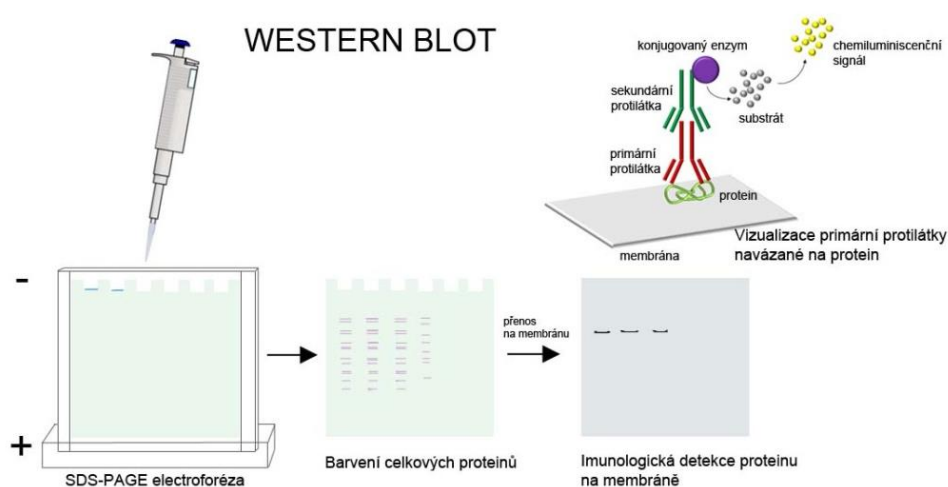
Westernblotting

Western blotting (imunoblotting, protein blotting) je citlivá imunologická metoda pro detekci elektroforeticky oddělených proteinů (obrázek 9). Metoda se používá pro kvalitativní nebo semikvantitativní detekci určitého proteinu ve vzorku. Tato technika byla rozvíjena nezávisle několika skupinami v roce 1979 a později byla nazvána "western blotting" kvůli její analogii k jižnímu (southern blotting) a severnímu (northern blotting) blotování [87; 88].

Charakteristickým znakem je přenos komplexního proteinového vzoru, který byl rozdělen SDS-PAGE na pevný podklad, který slouží jako nosič pro všechny následné imunochemické reakce. Pevným podkladem může být např. nitrocelulósová nebo polyvinylidendifluoridová

(PVDF) membrána. Detekce proteinů přenesených na membráně probíhá prostřednictvím primárních protilátek, kdy se vzniklý imunokomplex vizualizuje vazbou značené sekundární protilátky nebo značeného proteinu. Přítomnost sekundární protilátky je detekována fluorescenčně, nebo chemiluminiscenčně, a to v závislosti na značení, které sekundární protilátka nese. Velikost signálu je vyhodnocována srovnáním s naneseným proteinovým markerem, což je komerčně dostupná směs proteinů o známé velikosti [87; 88].

Mezi výhody této metody patří snadnější detekce proteinu a zabránění nespecifickým interakcím. Western blotting našel důležité klinické aplikace při autoimunitním onemocnění, alergii, infekčním onemocněním a dalším [87; 88].



Obrázek 9: Znázornění metody Western blottingu [88].

ELISA

ELISA (angl. enzyme-linked immunosorbent assay) je jednou z nejpoužívanějších imunologických metod sloužících k detekci protilátek. Princip této metody je znázorněn na obrázku 10. Metoda funguje na bázi imunoenzymatické reakce a lze s ní detekovat i antigen. ELISA využívá dvou základních vlastností imunoglobulinů, a to schopnost se vázat na povrch plastů a schopnost vázat enzymy na Fc fragmenty imunoglobulinových molekul [89].

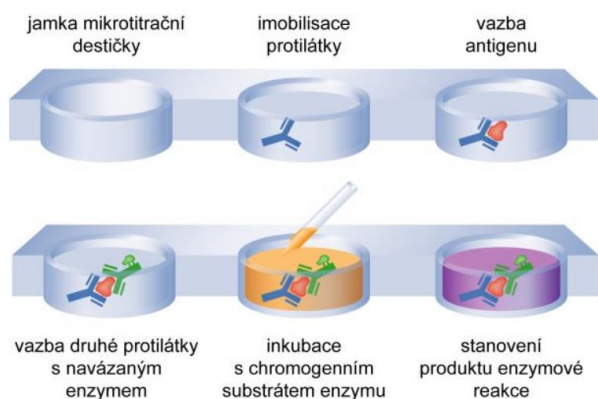
Pro průkaz specifických protilátek a antigenů existuje řada různých modifikací testu, všechny jsou však založené na specifické interakci protilátky s antigenem, kdy jsou antigen nebo protilátka značené enzymem. Navázání enzymu se pak znázorní reakcí se substrátem za vzniku barevného produktu. Výsledná detekce je podle druhu substrátu pro daný enzym fotometrická (např. ELISA), fluorometrická (FEIA) nebo luminometrická (LEIA). Oproti jiným

imunologickým metodám je ELISA mnohem přesnější a je považována za vysoce citlivou a specifickou [89; 90].

Základními složkami testu jsou antigen a protilátka, které jsou buď detekovány ve vzorku, nebo známé a komerčně připravované. Dále konjugát, kdy se jedná o protilátku proti protilátce, na které je navázaný enzym a substrát, což je chemická látka, která reaguje s enzymem a způsobí tak barevnou změnu. Nejčastěji používaným enzymem je peroxidasa, nebo alkalická fosfatasa [89; 91].

Při průkazu protilátky je pevná fáze, kterou je např. jamka polystyrenové destičky, pokryta antigenem. Do jamky destičky je přidán vyšetřovaný vzorek obsahující specifické protilátky. Po promytí je přidán ještě enzymem značený antiglobulin (antisérum), což je zvířecí protilátka proti lidskému imunoglobulinu, tzv. konjugát. Po dalším promytí je aplikován substrát. Dojde ke vzniku barevné reakce. Intenzita výsledného zbarvení konečného produktu je přímo úměrná koncentraci hledané protilátky. Pomocí kalibrační křivky sestavené ze standardních vzorků se odečítají příslušné hodnoty v neznámém vzorku. Hodnocení lze provést i pomocí cut-off standardu, tzv. indexu (poměr absorbance vzorku k absorbanci cut-off standardu). Cut-off je lidské sérum obsahující protilátky v hraničních koncentracích. V některých případech se provádí pouze hodnocení kvalitativní [90].

Metoda se nejčastěji používá pro stanovení specifických protilátek u řady infekčních onemocnění [90].



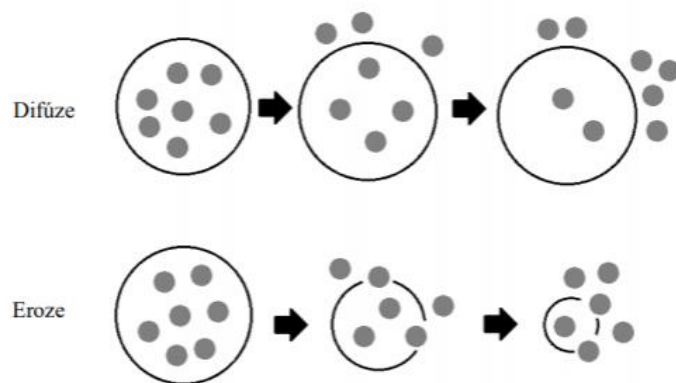
Obrázek 10: Znázornění principu ELISA testu [91].

1.6 *In vitro* studie uvolňování léčiv z nanosystémů

V posledních letech vzrůstá zájem o využití nanomateriálů jako nosičů léčiv, a to především díky výhodám, které jsou těmto materiálům přisuzovány. Polymerní nanočásticové systémy jsou pro dodávání léčiv schopné lokálního a trvalého podávání, usnadňují zlepšení terapeutického indexu léčiv, jsou schopny kontrolovat uvolňování léčiva apod. [92; 93].

Jedním z nejvíce studovaných parametrů při vývoji nanočástic s imobilizovaným léčivem je *in vitro* hodnocení uvolňování léčiva z polymerního nosiče. Řízeného uvolňování léčiv z polymerních systémů se typicky dosahuje regulací rychlosti biodegradace polymeru a difúze léčiva z polymerní matrice. U polymerních systémů se uvolňování léčiva typicky vztahuje k tomu, jak jsou molekuly léčiva transportovány z výchozí pozice v polymerním nosiči na vnější povrch nosiče a nakonec, jak jsou uvolňovány do okolního prostředí [92; 93]. K uvolňování léčiv může docházet pomocí dvou hlavních mechanismů, a to difúzí nebo erozním mechanismem, které jsou znázorněny na obrázku 11 [94]. Systémy fungující na principu difúze uvolňují aktivní látku na základě rozdílů koncentrací uvnitř a vně polymerní matrice. Další šíření uvolněné látky je ovlivněno její rozpustností a difuzivitou v závislosti na vlastnostech aktivní účinné látky a polymerním nosičem [93; 94]. Naproti tomu, princip eroze spočívá v postupném uvolňování aktivní látky do okolního prostředí pomocí rozpadu polymeru, ke kterému dochází v důsledku přítomnosti hydrolyticky nebo enzymaticky štěpitelné vazby. Erozi je možné rozdělit do dvou skupin, a to na objemovou a povrchovou. Objemová eroze nastává, když je průnik vody do polymeru rychlejší než eroze povrchu polymeru. Dochází tak spíše k rychlému a nežádoucímu uvolnění aktivní látky při celkovém rozpadu polymerního nosiče. O povrchovou erozi se jedná v případě, kdy je rychlost degradace povrchu vyšší než rychlost difúze vody do polymeru. Taková eroze je žádoucí, a to z důvodu, že je možné řídit rychlost uvolňování pomocí velikosti povrchu částic [93; 94].

Uvolňování léčiv z polymerních nanočástic závisí na několika faktorech, jako například na způsobu přípravy a velikosti nanočástic, množství enkapsulované látky a reakčních podmínkách (teplota, iontová síla, pH) [93].



Obrázek 11: Znárodnění difúzního a erozního uvolňování aktivních látek z nanočástic [94].

In vitro hodnocení uvolňování léčiva je účinným nástrojem ve vývoji nových produktů, poskytuje informace o chování lékové formy a využívá se i pro posouzení účinnosti a bezpečnosti léku. Tento parametr je také důležitý jako prostředek na podporu stanovení bioekvivalence metodami *in vivo*. Obecně jsou *in vitro* studie uvolňování prováděny při fyziologické teplotě (37 °C), ale v některých případech bylo uvolňování zkoumáno i při zvýšených teplotách pro charakterizaci uvolňování léčiva z různých lékových forem [93]. Pro stanovení tohoto parametru nebyly vyvinuty žádné oficiální metody, ani nebylo dosaženo shody o nejlepší metodě, která by měla být pro toto hodnocení použita. Výběr metody závisí na množství a chemické povaze léku. Důležitou roli hraje také požadovaná citlivost a specifita stanovení, i časová a finanční náročnost. Používají se různé techniky, jako je např. UV-VIS spektroskopie nebo HPLC, či elektromigrační nebo imunoanalytické metody [93; 95; 96].

2 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo zavést metodu entrapmentu vybraného proteinu do chitosanových nanočástic, dále připravit chitosanové nanočástice a nanovlákná s vázaným proteinem různými metodami a pomocí technik analytické chemie sledovat účinnost vazby vybraného proteinu na nanomateriály. Porovnáním výsledků účinností vazebných technik modelového proteinu na nanomateriály byla vybrána vhodná metoda a materiál pro vazbu lidského rekombinantního epidermálního růstového faktoru na nanomateriály a byla sledována míra uvolnění faktoru z nanomateriálu v čase.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy Kern ABT-220-5DM (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- Analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments, GmbH, Göttingen, Německo)
- Analyzátor velikosti částic Zetasizer Instrument, software 7.03 (Malvern Instrument Ltd., Velká Británie)
- Analyzátor Z-potenciálu a velikosti částic HORIBA se softwarem SZ-100 (HORIBA Ltd, Horiba France SAS, Francie)
- Aparatura pro diskontinuální elektroforézu Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, Hercules, CA USA)
- Centrifuga Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Fotografovací stanice ChemiDoc™ XRS+ System s Image Lab™ softwarem (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Jednorázové kyvety polystyrenu, Brand P-Lab
- Křemenné kyvety – Semimikrokyveta SM/Q5, optická délka 5 mm (Exacta + Optech, Mnichov, Německo)
- Magnetické míchadlo Big Squid (IKA-WERKE, Německo)
- Magnetické míchadlo LAVAT MM4 (LAVAT a.s., Chotutice, Česká republika)
- Mini-rotátor Biosan Bio-RS-24 (Biosan Laboratories, Inc., Warren, Spojené státy americké)
- pH metr model Orion 420A (Orion Pacific Pty Ltd, Denistone East, Austrálie)
- Stanice pro produkci deionizované vody TKA Smart2Pure (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Spektrofotometr Labsystems Multiskan RC (Labsystems Diagnostics Oy, Helsinki Vantaa, Finsko)
- Termostat INCU-Line (VWR International Ltd, Lutterworth, Leicestershire, Velká Británie)
- Třepačka Vortex mixer Wx (Velp Scientifica, Usmate, Itálie)
- Třepačka Mini-Rocker MR-1 Biosan (Biosan Laboratories, Inc., Warren, Spojené státy americké)
- Ultrazvuk Sonorex Digitec (Bandelin, Německo)

- Běžné laboratorní pomůcky – laboratorní sklo (kádinky, odměrné nádoby, odměrné válce), lékovky s víčkem a gumovými uzávěry, mikrozkuřavky Eppendorf, mikropipety Eppendorf a Biohit, mikrotitrační destičky, dělené Petriho misky, plastové nádoby (více velikostí), plastové pinzety

3.2 Reagencie a chemikálie

3.2.1 Použité nanovlákná

Použitá nanovlákná z chitosanu byla připravena technikou elektrospinningu s použitím struny (Nanospider™) a poskytnuta Ing. M. Munzarovou ze společnosti Nanovia s.r.o. [97].

- Označení vzorku: 2013-1
- Datum přípravy: 2013
- Hmotnost vzorku: 20 g materiálu na 1 m²
- Způsob síťování: teplem při 130 °C po dobu 1 hodiny
- Podkladový materiál: modrý polypropylen spunbond

3.2.2 Použité reagencie a chemikálie

- Albumin from chicken egg white, A7641, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO USA)
- Sodium tripolyphosphate (tripolyfosfát sodný, TPP) - Mr = 367.86, Na₅O₁₀P₃, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Spojené státy americké)
- Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit, 23235, Pierce Biotechnology (Rockfor, IL, USA)
- Akrylamid – Mr = 71.08, C₃H₅NO, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- *N,N'*-methylen-bis-akrylamid, Mr = 154.17, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Spojené státy americké)
- *N*-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt (sulfo-NHS) – Mr = 217.13, C₄H₄NNaO₆S, 56485-1G, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Spojené státy americké)
- *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) - Mr = 191.70, C₈H₁₇N₃·HCl, EC 247-361-2, E6383-1G, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Spojené státy americké)

- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan ($C_4H_{11}NO_3$) p.a., Lachema a.s. (Neratovice, Česká republika)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) - Mr = 288,37, $NaC_{12}H_{25}SO_4$, Lachema a.s. (Neratovice, Česká republika)
- Persíran amonný p.a. – Mr = 228.18, $(NH_4)_2S_2O_8$, Lachema a.s. (Neratovice, Česká republika)
- *N,N,N',N'*- tetramethylethylendiamin (TEMED) - Mr = 116.24, $C_6H_{16}N_2$, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Spojené státy americké)
- Glycin – Mr = 75.07, $C_2H_5NO_2$, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Spojené státy americké)
- Bio-Safe Coomassie G-250 Stain (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Precision Plus Protein Unstained Standards (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Kyselina chlorovodíková – Mr = 36,46, HCl, Lach-Ner, s.r.o. (Neratovice, Česká republika)
- Octan sodný p.a. (bezvodý) - Mr = 82,04 g/mol, CH_3COONa , Penta s.r.o. (Chrudim, Česká republika)
- Kyselina octová 99% p.a. – Mr = 60,05 g/mol, $\rho = 1,055 \text{ g/cm}^3$, CH_3COOH , Penta s.r.o. (Chrudim, Česká republika)
- Chlorid draselný p.a. - Mr = 74,55, KCl, Penta s.r.o. (Chrudim, Česká republika)
- Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát p.a. - Mr = 358,14 g/l, $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$, Penta s.r.o. (Chrudim, Česká republika)
- Sodium dihydrogenphosphate dihydrate (Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát) – Mr = 156,01 g/l; 1 M $NaH_2PO_4 \cdot 2 H_2O$, Lach-Ner, s.r.o. (Neratovice, Česká republika)
- Sodium chloride G.R. (chlorid sodný) - M = 58,44 g/mol, NaCl, Lach-Ner, s.r.o. (Neratovice, Česká republika)
- Dihydrogenfosforečnan draselný – M = 136,09 g/mol, KH_2PO_4 , Lach-Ner, s.r.o. (Neratovice, Česká republika)
- Chlorid vápenatý bezvodý – Mr = 110,9 g/l, $CaCl_2$, Penta s.r.o. (Chrudim, Česká republika)
- Chitosan (deacetylated chitin, Poly(D-glucosamine) – low molecular weight, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Spojené státy americké)
- Alginic acid sodium salt (alginát sodný, algin, sodium alginate) - Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Spojené státy americké)

- HEPES (N-2Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic Acid) - pak = 7,5 at 25 °C, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Spojené státy americké)
- Tricin – Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Spojené státy americké)
- Epidermální růstový faktor (recombinant epidermal growth factor, EGF) - Prospec-Tany Technogene Ltd. (East Brunswick, Spojené Státy Americké)

3.3 Zachycení ovalbuminu do chitosanových nanočástic

Principem přípravy chitosanových nanočástic s ovalbuminem (OVA) bylo zachycení neboli entrapment ovalbuminu (OVA) v průběhu tvorby nanočástic ionotropním gelováním chitosanu (CS) jako polykationtu, s anionty tripolyfosfátu (TPP). Metoda byla upravena podle [98].

Použité roztoky

- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
- 2,28 mM roztok TPP - 0,84 mg/ml v deionizované vodě
- 25 mM acetátový pufr pH 5,2
- 0,2% roztok chitosanu, 0,1 g chitosanu rozpuštěn v 50 ml 25 mM acetátového pufru pH 5,2 a dáno na magnetické míchadlo na 16 hodin
- Zásobní roztok ovalbuminu o koncentraci 1 mg/ml ve 25 mM acetátovém pufru pH 5,2
- Roztok 1 M kyseliny octové

Postup

Na magnetickém míchadle bylo k 0,2% roztoku chitosanu v objemu 1,144 ml ve skleněné lékovce přidáno 0,5 ml roztoku OVA obsahujícího 0,150 mg nebo 0,250 mg nebo 0,5 mg OVA. K roztoku byl pomalu přikapáván v objemu 0,822 ml za stálého míchání roztok TPP. Směs byla následně inkubována po dobu 2 hodin na magnetickém míchadle při laboratorní teplotě. Touto metodou byly připraveny 3 mg částic s ovalbuminem.

Po inkubaci bylo ze suspenze částic o objemu 2,466 ml odebráno 2x po 1 mg částic ke stanovení koncentrace proteinu zachyceného do nanočástic. Z takto odebraných vzorků bylo dále ještě odebráno 250 µg částic, které byly uchovány při 4 °C v acetátovém pufru o celkovém

objemu 1,5 ml pro analýzu hydrodynamické velikosti částic (DLS) na přístroji Malvern Instrument. Ve zbylých celkem 2x 750 µg částic byla stanovena koncentrace zachyceného proteinu metodou BCA. Dále byla metodou BCA ze zbylé suspenze částic (1,026 ml) nepřímo stanovena koncentrace proteinu v roztoku po vazbě a promývacích frakcích, kdy byly částice promyty 3x 1,5 ml 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,3. S promýváním vždy probíhala i centrifugace (5 minut, 5000 otáček za minutu), aby bylo možné oddělit promývací frakce od částic.

3.3.1 Hodnocení účinnosti zachycení ovalbuminu

U všech vzorků nanočástic s ovalbuminem byla vypočítána účinnost vazby a vazebná kapacita nosiče [31]. Tyto parametry byly vypočteny nepřímým způsobem ze stanovení proteinu z roztoků, pomocí testu BCA. Účinnost entrapmentu vyjadřuje procento hmotnosti proteinu zachyceného v polymerním nosiči ve vztahu k počátečnímu množství vloženého proteinu (rovnice 1). Kapacita nosiče udává procento hmotnosti proteinu, který je zachycen v nanovláčkách nebo nanočásticích (rovnice 2).

$$\text{Účinnost entrapmentu (\%)} = \frac{\text{celkový vložený protein} - \text{nenavázaný protein po vazbě}}{\text{celkový vložený protein}} \cdot 100 \quad (1)$$

$$\text{Kapacita nosiče (\mu g)} = \frac{\mu\text{g vloženého proteinu} - \mu\text{g nenavázaného proteinu}}{\text{mg CS nanovláček / nanočástic v suchém stavu}} \quad (2)$$

3.4 Sledování uvolňování proteinu z připravených nanočástic

Metoda sledování uvolňování proteinu byla převzata a upravena podle [98; 99].

Použité roztoky

- PBS pufr pH 7,4
- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
- 0,1 M fosfátový pufr pH 5,5
- 2,28 mM roztok TPP - 0,84 mg/ml v deionizované vodě

- 0,2% roztok chitosanu, 0,1 g chitosanu rozpuštěn v 50 ml 25 mM acetátového pufru pH 5,2 a dáno na magnetické míchadlo na 16 hodin
- Zásobní roztok ovalbuminu o koncentraci 1 mg/ml ve 25 mM acetátovém pufru pH 5,2
- Roztok 1 M kyseliny octové

Postup

Z roztoku nanočástic se zachyceným proteinem (0,25 mg a 0,5 mg OVA) připravených metodou ionotropního gelovatění byl odebrán objem s obsahem 4 mg částic. Vzorky částic byly připraveny v tripletu a centrifugovány 5 minut při 5 000 otáčkách za minutu. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant, který byl uschován pro stanovení koncentrace proteinu metodou BCA. Částice byly následně resuspendovány do 1 ml PBS pufru o pH 7,4 a inkubovány za mírného třepání při 37 °C (0,5 mg OVA), anebo při laboratorní teplotě za mírného otáčení (0,25 mg OVA) anebo byly částice resuspendovány v 0,1 M fosfátovém pufru o pH 5,5 a inkubovány za mírného třepání při 37 °C (0,5 mg OVA). Supernatant (1 ml) byl odebírán v časových intervalech - 15 a 45 minut, 2, 4, 24, 48 a 72 hodin včetně centrifugace (5 minut, 5000 otáček za minutu). Poté byly částice znovu resuspendovány do 1 ml příslušného pufru.

Množství uvolněného proteinu ve frakcích bylo stanoveno metodou BCA. Protein byl stanoven ve vazebném roztoku před vazbou a v roztoku po vazbě do nanočástic.

3.5 Karbodiimidová vazba ovalbuminu na chitosanová nanovlákna

Imobilizace ovalbuminu na nanovlákna byla provedena karbodiimidovou metodou. Byl použit postup pro jednokrokovou metodu a metoda byla provedena v tripletu podle [43].

Použité roztoky

- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3 s 1 M NaCl
- Zásobní roztok ovalbuminu o koncentraci 1 mg/ml v 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,3
- Roztok sulfo-NHS - 1,25 mg sulfo-NHS v 200 μ l 0,1M fosfátového pufru pH 7,3, rozpuštěný těsně před vazbou
- Roztok EDC - 7,5 mg EDC v 200 μ l 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3, rozpuštěný těsně před vazbou

Postup

Zvážený vzorek nanovláken (3x) o rozměrech 1,5x1,5 cm byl 1x promyt 0,1 M fosfátovým pufrům o pH 7,3. Poté bylo k nanovláknům v rychlém sledu přidáno 200 µl roztoku EDC, 200 µl roztoku sulfo-NHS a po rychlém promíchání 500 µl roztoku ovalbuminu (0,5 mg). Reakční směs byla doplněna na celkový objem 1 ml 0,1 M fosfátovým pufrům o pH 7,3 a inkubována za mírného otáčení 16 hodin (přes noc) při 4 °C.

Po inkubaci byla nanovlákná s imobilizovaným proteinem promyta:

- 3x 1 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3; (každý mililitr byl jímán zvlášť)
- 1x 1 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3 s 1 M NaCl

Pro stanovení koncentrace proteinu na vzorku nanovláken byla provedena metoda BCA. Souběžně s kovalentní vazbou byl jako slepý vzorek připraven vzorek nanovláken s proteinem bez přidání EDC a Sulfo-NHS.

3.6 Karbodiimidová vazba ovalbuminu na chitosanové nanočástice

Použité roztoky

- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3 s 1 M NaCl
- Roztok sulfo-NHS - 1,25 mg sulfo-NHS v 200 µl 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3, rozpuštěn těsně před vazbou
- Roztok EDC - 7,5 mg EDC v 200 µl 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3, rozpuštěn těsně před vazbou
- Zásobní roztok ovalbuminu o koncentraci 1 mg/ml v 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,3
- 2,28 mM roztok TPP - 0,84 mg/ml v deionizované vodě
- 25 mM acetátový pufr pH 5,2
- Roztok 1 M kyseliny octové

Postup

Chitosanové nanočástice byly připraveny metodou ionotropního gelování chitosanu s anionty TPP podle metody 3.3. Nanočástice (4 mg) byly centrifugovány po dobu 5 minut při 5 000 otáčkách za minutu. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a nanočástice byly promyty 1x 1 ml deionizované vody a znovu centrifugovány s odstraněním supernatantu. Experiment byl proveden v dubletu.

K nanočásticím bylo v rychlém sledu přidáno 200 μ l roztoku EDC, 200 μ l roztoku sulfo – NHS a po rychlém promíchání 500 μ l roztoku ovalbuminu (0,5 mg). Reakční směs byla doplněna na celkový objem 1 ml 0,1 M fosfátovým pufrům o pH 7,3 a inkubována za mírného otáčení 16 hodin (přes noc) při 4 °C.

Po inkubaci byly nanočástice s imobilizovaným ovalbuminem centrifugovány a promyty:

- 3x 1 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3
- 1x 1 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3 s 1 M NaCl

Stanovení množství imobilizovaného proteinu na nanočásticím bylo provedeno metodou BCA.

3.7 Adsorpce ovalbuminu na chitosanová nanovlákná

Podmínky adsorpce ovalbuminu na nanovlákná byly odvozeny z karbodiimidové vazby, bez použití aktivačních činidel.

Použité roztoky

- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
- Zásobní roztok ovalbuminu o koncentraci 1 mg/ml v 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,3

Postup

Zvážený vzorek nanovláken (3x) o rozměrech 1,5x1,5 cm byl 1x promyt 0,1 M fosfátovým pufrům o pH 7,3. Poté bylo k nanovláknům přidáno 500 μ l 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,3

a 500 µl roztoku ovalbuminu (0,5 mg). Reakční směs byla inkubována za mírného otáčení 16 hodin (přes noc) při 4 °C.

Stanovení koncentrace sorbovaného ovalbuminu na vzorku nanovláken a v supernatantech bylo provedeno metodou BCA.

3.8 Adsorpce ovalbuminu na chitosanové nanočástice

Použité roztoky

- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
- Zásobní roztok ovalbuminu o koncentraci 1 mg/ml v 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,3

Postup

Vzorky chitosanových nanočástic (4 mg) byly promyty 1x 1 ml deionizované vody. Následně byly nanočástice centrifugovány (5 minut, 5000 otáček za minutu), byl odstraněn supernatant a částice byly 1x promyty deionizovanou vodou. Poté bylo k nanočásticím přidáno 500 µl 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,3 a 500 µl roztoku ovalbuminu (0,5 mg). Reakční směs byla inkubována za mírného otáčení 16 hodin (přes noc) při 4 °C. Vše bylo provedeno v dubletu.

Pro stanovení koncentrace sorbovaného proteinu na nanočásticích metodou BCA byly uchovávány i vazebné roztoky a roztoky po vazbě.

3.9 Zapouzdření chitosanových částic s ovalbuminem do alginátu sodného

Nanočástice se zachyceným proteinem připravené metodou ionotropního gelování byly v dalším kroku smíchány s 1% roztokem alginátu sodného v 0,1 M fosfátovém pufru o pH 7,3. Nanočástice potažené alginátem sodným byly dále resuspendovány do vodného roztoku CaCl₂ (0,524 mmol/l, pH 7,0) na podporu zesílení a stabilizaci alginátové vrstvy na povrchu nanočástic s proteinem. Metoda byla převzata a upravena podle [98; 31].

Použité roztoky

- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
- 2,28 mM roztok TPP - 0,84 mg/ml v deionizované vodě
- 25 mM acetátový pufr pH 5,2
- 0,2% roztok chitosanu, 0,1 g chitosanu rozpuštěn v 50 ml 25 mM acetátového pufru pH 5,2 a dáno na magnetické míchadlo na 16 hodin
- Zásobní roztok ovalbuminu o koncentraci 1 mg/ml ve 25 mM acetátovém pufru pH 5,2
- 1% roztok alginátu sodného v 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,3
- 50 mM HEPES pufr pH 7,4 s 0,524 mM CaCl₂
- 0,524 mM roztok CaCl₂ pH 7 v deionizované vodě
- Roztok 1 M kyseliny octové

Postup

Chitosanové nanočástice s ovalbuminem byly připraveny metodou ionotropního gelování podle kapitoly 3.3. Ze suspenze částic s ovalbuminem byl odebrán aliquot nanočástic (2 mg), který byl centrifugován 5 minut při 5000 otáčkách za minutu. Celý supernatant byl odebrán a částice byly promyty 1x v 1 ml deionizované vody. Poté byly částice doplněny do 0,5 ml 0,1 M fosfátovým pufrům o pH 7,3. Suspenze částic byla následně pomalu přikapávána za stálého míchání na magnetickém míchadle a laboratorní teplotě k 0,5 ml 1% roztoku alginátu sodného rozpuštěného v 0,1 M fosfátovém pufru o pH 7,3 (5 mg/0,5 ml) v lékovce. Inkubace probíhala za stálého míchání po dobu 20 minut. Po inkubaci byla suspenze centrifugována (5 minut, 5000 otáček za minutu). Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a částice byly promyty deionizovanou vodou, aby došlo k odstranění přebytečného alginátu sodného. Poté byly částice doplněny do 1 ml 0,524 mM CaCl₂ v deionizované vodě. Po 10 minutách v klidu bylo ze suspenze částic odebráno 2x 0,250 mg částic, částice byly doplněny do 1,5 ml deionizovanou vodou a byla změřena hydrodynamická velikost částic (DLS) na přístroji Horiba.

V supernatantech po zapouzdření ovalbuminu do nanočástic a po zabalení nanočástic do 1% roztoku alginátu sodného bylo provedeno stanovení koncentrace uvolněného proteinu z nanočástic metodou BCA. Výsledné hodnoty jsou průměrem z dubletu a metoda byla provedena také s nanočásticemi bez zachyceného ovalbuminu.

3.10 Zachycení epidermálního růstového faktoru do nanočástic

Metoda byla převzata a upravena podle [14; 100].

Použité roztoky

- 2,28 mM roztok TPP - 0,84 mg/ml v deionizované vodě
- 0,2% roztok chitosanu, 0,1 g chitosanu rozpuštěn v 50 ml 25 mM acetátového pufru pH 5,2 a dáno na magnetické míchadlo na 16 hodin
- Roztok 1 M kyseliny octové
- Zásobní roztok EGF o koncentraci 1 mg/ml v deionizované vodě
- 25 mM acetátový pufr pH 5,2
- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3

Postup

Metodou ionotropního gelovatění chitosanu s anionty TPP byly připraveny nanočástice se zachyceným EGF. Na magnetickém míchadle bylo k 0,2% roztoku chitosanu v objemu 1,3 ml ve skleněné lékovce přidáno 0,5 ml roztoku EGF obsahujícího 0,150 mg nebo 0,250 mg EGF. Následně byl ke směsi pomalu přikapáván v objemu 0,9 ml roztok TPP za stálého míchání. Směs byla inkubována 2 hodiny na magnetickém míchadle při laboratorní teplotě. Takto bylo připraveno 3,356 mg částic s EGF. Vzorky byly připraveny v tripletu. Ze suspenze částic bylo odebráno 0,250 mg částic pro analýzu hydrodynamické velikosti částic (DLS) na přístroji Horiba.

3.11 Sledování uvolňování epidermálního růstového faktoru z připravených nanočástic

Použité roztoky

- PBS pufr pH 7,4
- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3

Postup

Nanočástice (3 mg) se zachyceným proteinem (0,150 mg a 0,250 mg) byly separovány z roztoku za použití centrifugace 5 minut při 5 000 otáček za minutu. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant, který byl uschován pro stanovení koncentrace proteinu metodou BCA. Dále byly nanočástice resuspendovány do 1 ml PBS pufru o pH 7,4 a inkubovány za mírného třepání při 37 °C. Supernatant (1 ml) byl odebírán v časových intervalech - 15 a 30 minut, 1, 3, 24, 48, 72 a 96 hodin včetně centrifugace (5 000 otáček za minutu). Poté byly částice znovu resuspendovány do 1 ml PBS pufrům o pH 7,4.

Ve frakcích byla sledována koncentrace uvolněného proteinu metodou BCA. Pomocí metody BCA byla také sledována koncentrace proteinu ve vazebném roztoku a v roztoku po vazbě. Vypočtené hodnoty jsou průměrem z dubletu.

3.12 Stanovení koncentrace proteinu bicinchoninovou metodou

Bicinchoninová metoda neboli metoda BCA, je kolorimetrická metoda využívající sodné soli bicinchoninové kyseliny ke spektrofotometrickému stanovení proteinů. Principem stanovení koncentrace ovalbuminu na částicích/nanovláčkách bylo spektrofotometrické stanovení vzniklého fialovomodrého komplexu, který vzniká redukcí Cu^{2+} iontu na Cu^+ iont peptidovou vazbou proteinu a následnou chelatací Cu^+ iontu sodnou solí bicinchoninové kyseliny (viz kapitola 1.5.2). Použitý postup byl převzat z Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit.

Použité roztoky

- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
- Zásobní roztok ovalbuminu o koncentraci 1 mg/ml v 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,3

3.12.1 Příprava kalibrační závislosti koncentrace ovalbuminu

Postup

Kalibrační řada o koncentracích 200; 40; 20; 10; 5; 2,5; 1; 0,5 a 0 μg proteinu do 1 ml byla připravena z OVA (zásobní roztok 2 mg/ml) dle tabulky č. 1. K přípravě roztoku OVA byl navážen 1 mg OVA a rozpuštěn v 0,5 ml fosfátového pufru o pH 7,3. Připravené kalibrační

roztoky v mikrozkuvkách byly pipetovány po 150 μ l do mikrotitrační destičky. Dále bylo přidáno 150 μ l BCA roztoku. BCA roztok byl připraven z reagensů v BCA kitu (25 dílů reagentie A, 24 dílů B a 1 díl reagentie MC). Vše bylo připraveno v dubletu a inkubováno po dobu 2 hodin při 37 °C. Následně byla na spektrofotometru Multiscan změřena absorbance při 570 nm.

Tabulka 3: Příprava kalibrační řady pro BCA metodu.

	0,1 M Fosfátový pufr [ml]	OVA 2 mg/ml [μl]	Konečné OVA [μg/ml]
A	0,900	100	200
B	0,980	20	40
C	0,990	10	20
D	0,995	5	10
E	0,9975	2,5	5
F	0,99875	1,25	2,5
G	0,9995	0,5	1
H	0,99975	0,25	0,5
I	1	0	0

3.12.2 Stanovení koncentrace ovalbuminu na částicích

Postup

Vzorky byly připraveny v dubletu. Vzorky nanočástic v mikrozkuvce byly centrifugovány 5 minut při 5 000 otáčkách za minutu. Po centrifugaci byl odebrán veškerý supernatant, k částicím bylo přidáno 150 μ l 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,3 a roztok BCA o objemu 150 μ l. Takto připravené částice byly inkubovány na rotátoru při 37 °C po dobu 2 hodin. Supernatanty po vazbě a promývací frakce byly pipetovány po 150 μ l do mikrotitrační destičky, dále k nim bylo přidáno 150 μ l roztoku BCA a vzorky byly inkubovány při 37 °C po dobu 2 hodin. Po inkubaci byly částice centrifugovány (5 minut, 5 000 otáček za minutu), supernatant byl přenesen do mikrotitrační destičky a všechny vzorky byly změřeny na spektrofotometru Multiscan při 570 nm. Jako slepý vzorek sloužil fosfátový pufr o pH 7,3 anebo samotné chitosanové částice bez ovalbuminu. Od naměřených absorbancí vzorků byla odečtena absorbance

slepého vzorku a koncentrace proteinu byla vyhodnocena metodou kalibrační přímky. Stanovení koncentrace proteinu na chitosanových nanočásticích bylo provedeno ve 4 opakováních a koncentrace proteinu byla přepočtena na 4 mg částic.

3.12.3 Stanovení koncentrace ovalbuminu na nanovláčkách

Postup

Vzorky byly připraveny v dubletu. Ke vzorkům nanovláček v mikrozkuhavce bylo po promytí přidáno 150 μ l 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,3 a 150 μ l roztoku BCA. Takto připravená nanovláčka byla inkubována při 37 °C na rotátoru po dobu 2 hodin. Supernatanty po vazbě a promývací frakce byly pipetovány po 150 μ l do mikrotitrační destičky, dále k nim bylo přidáno 150 μ l roztoku BCA a vzorky byly inkubovány při 37 °C po dobu 2 hodin v inkubátoru. Po inkubaci byly všechny vzorky přeneseny do mikrotitrační destičky a byla změřena absorbance při 570 nm pomocí spektrofotometru Multiscan. Jako slepý vzorek sloužil fosfátový pufr o pH 7,3 anebo nanovláčka bez ovalbumin. Od naměřených absorbancí vzorků byla odečtena absorbance slepého vzorku a koncentrace proteinu byla vyhodnocena metodou kalibrační přímky. Stanovení koncentrace proteinu na chitosanových nanovláčkách bylo provedeno ve 3 opakováních.

3.13 Měření hydrodynamické velikosti částic

Použité roztoky

- 25 mM acetátový pufr pH 5,2

Postup

Pro měření hydrodynamické velikosti částic bylo odebráno 250 μ g připravených částí, které byly doplněny na celkový objem 1,5 ml příslušným puftrem. Takto připravené vzorky nanočástic byly odeslány ke změření hydrodynamických velikostí (DLS) na oddělení chemického inženýrství FCHT, kde měření provedl Ing. Jiří Palarčík, Ph.D. na přístroji Malvern Instruments využívající software verze 7.03. Měření DLS bylo také provedeno na přístroji Horiba (software SZ-100) na KBBV. Průměrná velikost nanočástic byla měřena při laboratorní teplotě pod úhlem

173° v jednorázových kyvetách (Brand GMBH, P-LAB). Každé měření bylo provedeno ve 12 opakováních po 30 sekundách. Data byla statisticky vyhodnocena a s výstupem hodnot DLS byly udány směrodatné odchylky.

3.14 Polyakrylamidová elektroforéza proteinů s SDS

Metoda byla převzata z [101].

Použité roztoky

- 30% roztok směsi akrylamidu a bisakrylamidu - 0,24 g bisakrylamidu, 8,77 g akrylamidu v 30 ml deionizované vody
- 10 % roztok SDS - 1,0176 g SDS v 10 ml deionizované vody
- 10% roztok persíranu amonného - 0,11 g persíranu amonného v 1 ml deionizované vody
- Elektrodotový (veronalový) pufr - 0,025 M Tris, 0,192 M glycin s 0,1% SDS pH 8,3-8,6
- 1,5 M Tris-HCl pufr pH 8,8
- 1,0 M Tris-HCl pufr pH 6,8
- Roztok G: 100 mM Tris-HCl pufr pH 6,8 s 4% SDS, 20% glycerolem a 0,2% bromfenolovou modří
- Roztok 6 M kyseliny chlorovodíkové
- Fixační roztok: 5% kyselina octová + 50% ethanol (50 ml ledové kyseliny octové, 500 ml ethanolu, doplněno na celkový objem 1000 ml)

Postup pro dělení proteinů

Principem elektroforézy v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE) je rozdílná migrace proteinů, nebo jiných makromolekul nesoucích elektrický náboj v gelu ve stejnosměrném elektrickém poli. Lihem očištěná skla byla umístěna a zafixována do stojánku na rovné ploše. Do jednorázové plastové zkumavky byl podle Tabulky 4 připraven 10% dělicí gel, který byl ihned napipetován mezi připravená skla až po rysku a následně byl převrstven deionizovanou vodou. Polymerace trvala 20–30 minut dělicí. Mezi gelem a vrstvou deionizované vody se vytvořilo ostré rozhraní a deionizovaná voda byla odstraněna pomocí filtračního papíru. Dále byl podle tabulky 4 připraven 5% zaostřovací gel, který byl napipetován až po okraj skel na dělicí gel. Poté byla mezi skla vložena plastová šablona s 10 jamkami.

Do 15 minut gel zpolymeroval. Skla s připravenými gely byla vyjmuta ze stojánku a umístěna do elektroforetické aparatury. Následně byla odstraněna šablona s 10 jamkami a vzniklé jamky byly vypláchnuty 3x elektrodoým pufrem. Vzorky proteinů k analýze byly připraveny smícháním v poměru 1:1 se vzorkovým pufrem G. Takto připravené vzorky byly promíchány a po vařeny 2 minuty v termobloku při teplotě 100 °C. Pomocí Hamiltonovy pipety bylo do jamek v gelu napipetováno 15 µl připravených vzorků. Do jamky byl pipetován i bílkovinný standard v objemu 5 µl. Do elektroforetické aparatury a vnitřního prostoru mezi dvěma skly s gely byl nalit elektrodoý pufr v ekvivalentním množství k počtu gelů. Elektroforetické dělení probíhalo při konstantním napětí 180 V, maximálně 30 mA na jeden gel a po dobu 45 minut, až čelo separovaných látek doputovalo skoro až na úroveň dolního okraje skel.

Postup pro barvení gelů

Gel byl následně přenesen do Petriho misky, propláchnut po dobu 5 minut 3x deionizovanou vodou, ponořen na 20 minut do fixačního roztoku, poté 30 minut rehydratován v deionizované vodě a následně převrstven barvicím roztokem Coomasie Brilliant blue při laboratorní teplotě. Po 1 hodině byl gel odbarvován deionizovanou vodou až do odbarvení pozadí gelu (cca 40 minut). Obarvený gel byl vyfocen pomocí přístroje ChemiDoc XRS+ se softwarem Image Lab™ a fotografie gelu byla vyhodnocena v programu ImageLab. Molekulové hmotnosti vzorků byly vyhodnoceny podle markerového standardu molekulových hmotností.

Tabulka 4: Příprava polyakrylamidových gelů pro SDS-PAGE.

	5% zaostrřovací gel [ml]	10% dělicí gel [ml]
Destilovaná voda	1,4	2,0
Roztok A	0,33	1,65
Roztok B	-	1,25
Roztok C	0,25	-
Roztok D	0,02	0,05
Roztok E (přidán poslední)	0,02	0,05
TEMED	0,002	0,002

3.15 Polyakrylamidová elektroforéza proteinů s SDS a tricinem

Metoda byla převzata z [102].

Použité roztoky

- Roztok A1: 49,5% T, 6% C - 46,5% (w/v) akrylamid a 3,0% (w/v) bisakrylamid
- Roztok A2: 49,5% T, 3% C - 48% (w/v) akrylamid a 1,5% (w/v) bisakrylamid
- Roztok B: 3,0 M Tris-HCl pH 8,45 s 0,3% SDS (gelový pufr)
- Roztok C: 10% (w/v) persíran amonný
- Roztok D: TEMED
- Pufr pro vzorky (BIO-RAD): 200 mM Tris-HCl pH 6,8, 40% glycerol, 2% SDS, 0,04% Coomassie Blue G250
- Elektrodotový pufr: 0,1 M Tris, 0,1 M tricín, 0,1% SDS
- Fixační roztok: 5% kyselina octová + 50% ethanol (50 ml ledové kyseliny octové, 500 ml ethanolu, doplněno na celkový objem 1000 ml)
- 10 % roztok glutaraldehydu: 5 ml 50% glutaraldehydu + 20 ml deionizované vody
- Roztok amoniakálního stříbra: 20 % dusičnan stříbrný byl přikapáván k roztoku (10,2 ml deionizované vody, 0,7 ml vodného roztoku amoniaku a 119,5 µl 9 M hydroxidu sodného) do vzniku světlehnědého zákalu. Poté byl roztok doplněn na 100 ml deionizovanou vodou.
- Vyvolávací roztok: 0,05% kyselina citrónová + 0,04% formaldehyd (250 mg kyseliny citrónové, 540 µl 37% formaldehydu doplněno na celkový objem 500 ml deionizovanou vodou)
- Ustalovací roztok: 5% kyselina octová (50 ml ledové kyseliny octové do 1000 ml deionizované vody)

Postup dělení proteinů

Postup polyakrylamidové elektroforézy proteinů s SDS a tricinem (Tricin-SDS PAGE) je obdobný klasické SDS-PAGE elektroforéze se změnou přípravy gelů, vzorků a podmínkami dělení. Rovněž byla použita aparatura pro diskontinuální elektroforézu (BIO-RAD).

Do jednorázových plastových zkuševých káderek byl podle tabulky 5 připraven zaostřovací a dělicí gel. Nejprve byl připraven dělicí gel, který byl po napipetování mezi skla převrstven 1-2 ml gelového pufru s deionizovanou vodou v poměru 1:3. Polymerace trvala 30-60 minut. Dále byl

podle tabulky 5 připraven i zaostřovací gel, který byl napipetován až po okraj skel na dělicí gel. Poté byla mezi skla vložena plastová šablona s 10 jamkami. Vzorky proteinů k analýze byly připraveny smícháním s puforem pro vzorky v poměru 1:1 (15 μ l + 15 μ l) a povařeny 3 minuty při teplotě 100 °C v termobloku. Pomocí Hamiltonovy pipety bylo do jamek gelu napipetováno 15 μ l připravených vzorků a polypeptidový proteinový standard v objemu 4 μ l. Elektroforetické dělení probíhalo nejprve při 30 V, 0,03 A při laboratorní teplotě 30 minut a po uplynutí této doby probíhalo dělení dále při 4 °C při 100 V a 0,06 A po dobu 1-2 hodiny.

Postup pro barvení gelů

Gel s rozdělenými proteiny byl následně přenesen do Petriho misky, propláchnut po dobu 10 minut deionizovanou vodou a ponechán 30 minut ve fixačním roztoku. Následně byl gel rehydratován v deionizované vodě, ponořen na 30 minut do roztoku glutaraldehydu, promyt 6x po 10 minutách deionizovanou vodou a převrstven roztokem amoniakálního stříbra při laboratorní teplotě (12-15 minut). Obarvený gel byl vyfocen pomocí přístroje ChemiDoc XRS+ se softwarem Image LabTM a fotografie gelu byla vyhodnocena v programu ImageLab. Molekulové hmotnosti vzorků byly vyhodnoceny podle markerového standardu molekulových hmotností.

Tabulka 5: Příprava gelů pro Tricin-SDS PAGE.

	Zaostřovací gel [ml]	Dělicí gel [ml] (Mr 5-20 kDa) tj. 16,5% T, 6%C
Destilovaná voda	2,1	1,666
Roztok A1	-	1,666
Roztok A2	0,25	-
Roztok B	0,775	1,666
Roztok C	0,025	0,025
Roztok D	0,0025	0,0025

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Cílem této práce bylo připravit nanovláknenné a nanočásticové nosiče z chitosanu s imobilizovaným proteinem a sledovat účinnost vazby proteinu na nanomateriály. Jedním z cílů bylo zavedení metody vazby modelového proteinu ovalbuminu do chitosanových nanočástic pomocí entrapmentu. Nanočástice byly připraveny ionotropním gelovatěním chitosanu, jako polykationtu, s anionty tripolyfosfátu v poměru 2:1. Tento poměr chitosanu s tripolyfosfátem pro přípravu částic byl optimalizován v [43]. Další možností pro tvorbu částic bylo použití alginátu sodného pro vytvoření vrstvy na chitosanových částicích. U připravených částic je sledována velikost pro potvrzení jejich úspěšné tvorby a dále účinnost vazby proteinu do nanočástic. Pro srovnání účinnosti vazby proteinu do částic byly využity i další známé způsoby vazby na nanočástice, a také na nanovláknna, s plošnou hmotností 20 g/m², která byla poskytnuta Ing. M. Munzarovou ze společnosti Nanovia s.r.o., a to metoda sorpce a karbodiimidová metoda. Účinnosti vazebných technik byly srovnány na základě přímého měření proteinu imobilizovaného na nanomateriál a nepřímě - výpočtem účinnosti vazby a vazebné kapacity nosiče.

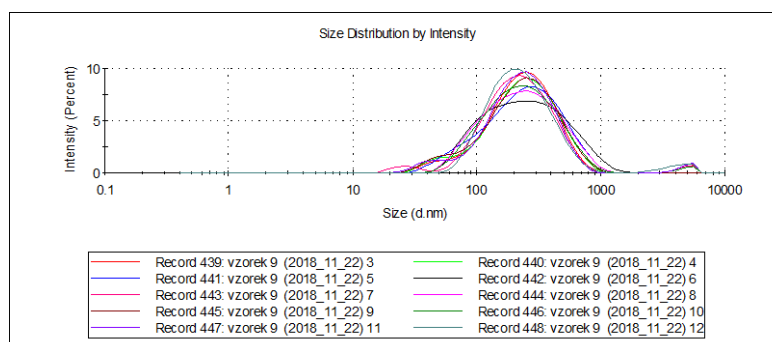
Dalším cílem práce bylo zvolit vhodné podmínky nově zavedené metody entrapmentu pro vazbu lidského rekombinantního epidermálního růstového faktoru do nanočástic, a sledovat jeho účinnost vazby. EGF je v *in vivo* podmínkách sekretován destičkami, makrofágy a fibroblasty a působí parakrinně na keratinocyty. Má tedy prokázané hojivé účinky v kůži a je možné uvažovat o jeho využití v oblasti drug delivery systémů. U modelového systému CS/TPP nanočástic s ovalbuminem a u CS/TPP nanočástic se zachyceným EGF byla také sledována míra uvolnění proteinů v čase. Pro vyhodnocení uvolňování proteinu z nanočástic byla použita metoda kumulativní křivky, která vyjadřuje koncentraci uvolněného proteinu v promývacích frakcích v čase. Testy uvolňování *in vitro* se běžně používají jako ukazatel chování nanomateriálů *in vivo*.

4.1 Příprava chitosanových nanočástic s ovalbuminem metodou zachycení

Cílem tohoto experimentu bylo připravit chitosanové nanočástice s ovalbuminem metodou zachycení neboli entrapmentu. Molekulová hmotnost chitosanu použitého pro přípravu částic udaná výrobcem byla 50-190 kDa. Struktura chitosanu obsahuje primární i sekundární hydroxyskupiny a reaktivní volné aminoskupiny, které z něj ve vodných roztocích činí polykationt.

Principem přípravy chitosanových nanočástic, jak je popsáno v kapitole 3.3, bylo ionotropní gelovatění chitosanu s anionty tripolyfosfátu (TPP) [43]. Samotný proces tvorby nanočástic je založen na spojení opačně nabitých molekul pomocí elektrostatických interakcí. Při entrapmentu ovalbuminu během tvorby nanočástic dochází k jeho zachycení do struktury částic. Při pH pracovního roztoku 5,2 (25 mM acetátový pufr) je chitosan pozitivně nabitý (NH_3^+ , pKa acetylovaných skupin je 6,5). Ovalbumin je na základě blízkosti svého izoelektrického bodu (pI 4,5) pH pracovního roztoku negativně nabitý a s chitosanem se přitahuje. Roztok ovalbuminu byl přidáván přímo do roztoku chitosanu a k této směsi byl pomalu přikapáván polyaniont TPP, díky kterému docházelo ke srážení a tvorbě částic. Podmínkou bylo vytvořit homogenní suspenze polymerních nanočástic.

Částice připravené z chitosanu a tripolyfosfátu podle kapitoly 3.3 byly resuspendovány v acetátovém pufru o pH 5,2 a charakterizovány měřením hydrodynamické velikosti částic (DLS) popsaném v kapitole 3.13. Velikost částic byla $183,4 \pm 2,7$ nm a je srovnatelná s velikostí uvedenou v [98]. Také byla sledována distribuce velikostí těchto částic, která ukazuje na mono- nebo polydisperzitu částic (obrázek 12). Výsledky na obrázku 12 ukazují na homogenní suspenzi částic.



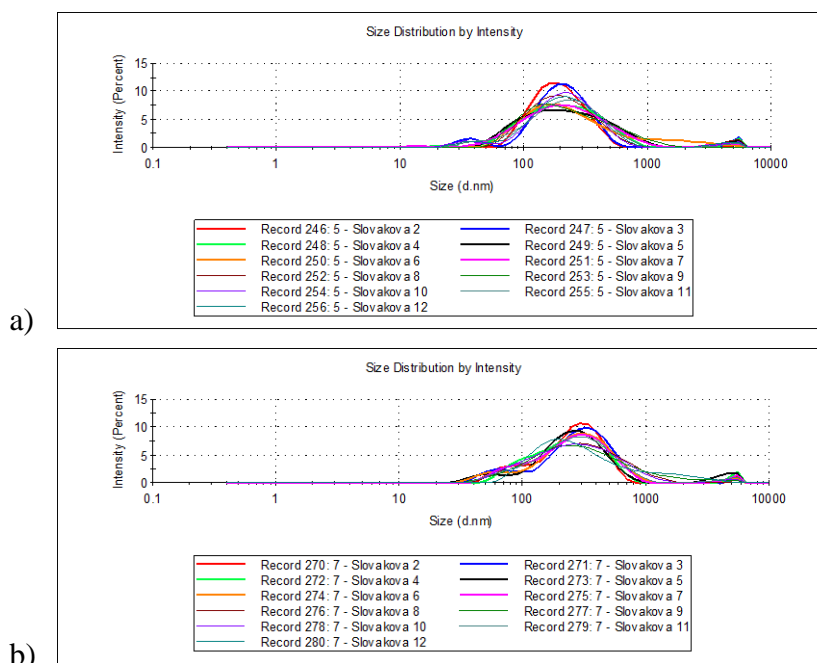
Obrázek 12: Distribuce DLS připravených CS/TPP nanočástic bez ovalbuminu (2 měření vypuštěna). Měřeno na přístroji Zetasizer Malvern Instrument.

Koncentrace ovalbuminu byla pro přípravu částic optimalizována. Byly použity roztoky ovalbuminu o koncentraci 0,5 mg, 0,25 mg a 0,15 mg ovalbuminu v 0,5 ml acetátového pufru o pH 5,2.

Pro přípravu částic se zachyceným ovalbuminem byly zvoleny dva odlišné postupy vycházející z metody v kapitole 3.3. První způsob zachovává objem roztoků chitosanu s proteinem a tripolyfosfátu, přičemž je ovalbumin rozpuštěn v roztoku chitosanu. Druhý způsob zahrnuje

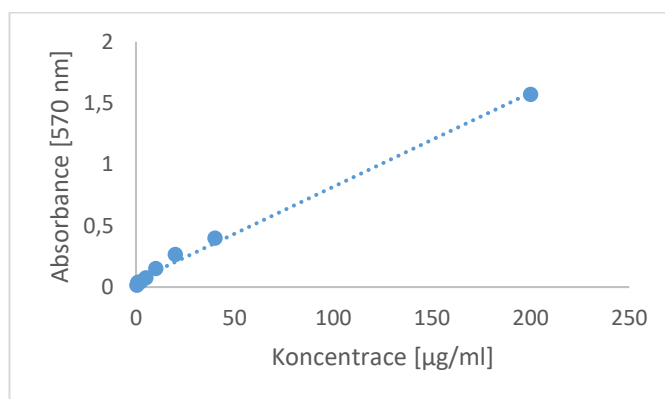
navýšení objemu směsi o roztok ovalbuminu (1mg/ml). Nanočástice s navázkou 0,5 mg ovalbuminu byly nejprve připraveny podle postupu popsaného v kapitole 3.3, kdy docházelo k zachování objemového poměru roztoků CS:TPP 2:1. Další příprava částic s navázkou 0,5 mg ovalbuminu probíhala podle stejného postupu, avšak se změnou celkového objemu roztoku, kdy docházelo k navýšení celkového objemu přidáním 0,5 ml roztoku ovalbuminu do roztoku CS, kdy se zachovával objemový poměr CS:TPP 2,6:1. Dle postupu s navýšením celkového objemu byly připraveny celkem 4 mg částic.

U připravených částic s 0,5 mg ovalbuminu byla v acetátovém pufru o pH 5,2 měřena DLS velikost částic a distribuce velikostí (obrázek 13) podle metody 3.13. Velikost připravených částic metodou se zachováním celkového objemu roztoku byla $181,7 \pm 5,7$ nm a u částic s navýšením celkového objemu roztoku se velikost pohybovala v rozmezí $200,2 \pm 4,9$ nm. Distribuce velikostí částic na obrázku 13 ukazuje na mírnou polydisperzitu u postupu jak s navýšením, tak i se zachováním celkového objemu roztoku. Podmínkou bylo vytvořit homogenní suspenzi chitosanových nanočástic a tato podmínka byla u obou postupů splněna. Suspenze připravených částic byly bez pozorovaných shluků a částice měly rovnoměrně rozptýlený opaleskující zákal v celém objemu.



Obrázek 13: Distribuce DLS připravených CS/TPP nanočástic s 0,5 mg ovalbuminu. Měřeno na přístroji Zetasizer Malvern Instrument. a) při zachování celkového objemu roztoku (1 měření vypuštěna), b) při navýšení celkového objemu roztoku (1 měření vypuštěno).

Koncentrace proteinu v připravených částicích byla stanovena metodou BCA podle kapitoly 3.12.2. Pro stanovení přesné koncentrace ovalbuminu vázaného na částicích byla připravena příslušná závislost absorbance barevného produktu na koncentraci proteinu (kapitola 3.12.1). Z výsledných hodnot absorbancí byla zhotovena kalibrační závislost absorbance na koncentraci ovalbuminu (graf 1). Kalibrační rovnice byla $y = 0,0077x + 0,0522$ s hodnotou spolehlivosti $R^2 = 0,9952$.



Graf 1: Kalibrační křivka ovalbuminu o koncentraci 2 mg/ml pro stanovení koncentrace proteinu metodou BCA (počet opakování: 2).

Výsledné hodnoty koncentrace proteinu v připravených částicích jsou uvedeny v tabulce 6. Pro sledování účinnosti entrapmentu ovalbuminu v částicích byl zvolen nepřímý způsob hodnocení stanovení ovalbuminu v roztocích před vazbou a po vazbě, a také přímé stanovení ovalbuminu na částicích. Pro výpočet účinnosti entrapmentu byla použita rovnice 1 (kapitola 3.3.1), která vyjadřuje procento hmotnosti proteinu zachyceného v polymerním nosiči ve vztahu k počátečnímu vloženému proteinu. Pro výpočet kapacity nosiče byla použita rovnice 2, jejímž výsledkem je procento proteinu, který je zachycen v nanomateriálu.

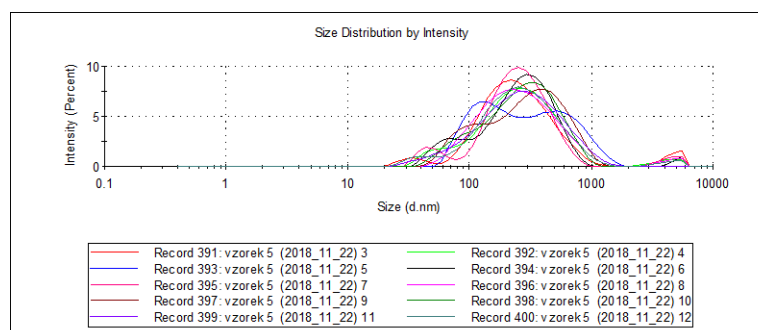
Tabulka 6: Charakteristika CS/TPP nanočástic s ovalbuminem (0,5 mg) přímou detekcí ovalbuminu na částicích a výpočtem účinnosti entrapmentu a entrapmentové kapacity nosiče metodou BCA (počet opakování: 4).

Navážka proteinu [mg]	Ovalbumin/NP – přímá detekce [µg/4mg]	Účinnost entrapmentu [%]	Entrapmentová kapacita nosiče [µg/4mg]	Poznámka
0,5	284,5 (± 5,6) (49,1 %)	45,4	65,8 (13,2 %)	Zachování celkového objemu
0,5	203,5 (± 8,9) (36,2 %)	36,9	51 (10,2 %)	Navýšení celkového objemu

Z nepřímého hodnocení lze vidět, že je vazebná kapacita nosiče i účinnost vazby proteinu na nanočástice u postupu se zachováním celkového objemu roztoku vyšší, a tedy tento postup můžeme hodnotit jako účinnější. Zároveň z přímého měření koncentrace ovalbuminu na nanočásticích vyplývá, že u postupu se zachováním celkového objemu roztoku došlo také k zachycení většího množství ovalbuminu do částic (49,1 %). Postupem s navýšením celkového objemu roztoku bylo do nanočástic navázáno pouze 36,3 % z celkového vloženého proteinu (0,5 mg) na 4 mg částic. Nižší procentuální hodnota účinnosti entrapmentu získaná z přímého stanovení koncentrace ovalbuminu na částicích, je pravděpodobně ovlivněna vazbou ovalbuminu do vnitřní struktury nanočástic, která je pro reagentie metody BCA nepřístupná.

V dalších experimentech byla snížena koncentrace ovalbuminu na 0,15 mg a 0,25 mg ovalbuminu v 0,5 ml acetátového pufru o pH 5,2. Byl použit postup se zachováním celkového objemu roztoku, který se v předchozím experimentu ukázal jako účinnější. Při optimalizaci byla hledána nejnižší možná účinná koncentrace proteinu v částicích.

Nejprve byl pro přípravu částic s ovalbuminem metodou entrapmentu použit roztok ovalbuminu o koncentraci 0,25 mg ovalbuminu v 0,5 ml acetátového pufru o pH 5,2. U připravených částic byla v acetátovém pufru o pH 5,2 měřena DLS velikost částic a distribuce velikostí podle metody 3.13. Velikost připravených částic byla $203,6 \pm 2,1$ nm. Ve srovnání s velikostí částic s 0,5 mg ovalbuminu, kdy byla velikost připravených částic $181,7 \pm 5,7$ nm, vykazovaly částice s 0,25 mg ovalbuminu zvětšení velikosti. Distribuce velikostí na obrázku 14 ukazuje na mírnou polydisperzitu. Suspenze připravených CS/TPP částic s 0,25 mg ovalbuminu byla homogenní, bez pozorovaných shluků a částice měly rovnoměrně rozptýlený opaleskující zákal v celém objemu.



Obrázek 14: Distribuce DLS připravených CS/TPP nanočástic s 0,25 mg ovalbuminu (2 měření vypuštěna). Měřeno na přístroji Zetasizer Malvern Instrument.

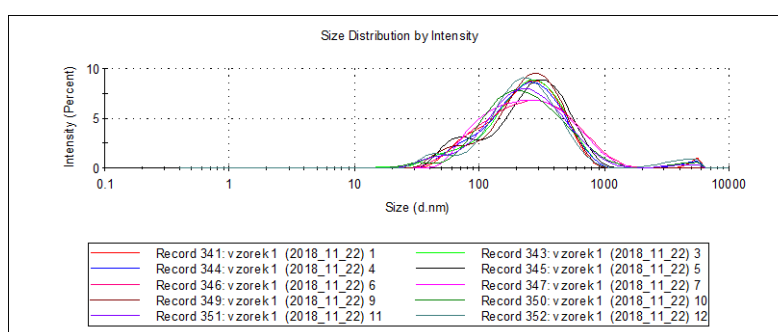
U připravených nanočástic byla stanovena účinnost entrapmentu ovalbuminu do částic přímou a nepřímou metodou, a také entrapmentová kapacita nosiče nepřímou metodou (tabulka 7).

Tabulka 7: Charakteristika chitosanových nanočástic s ovalbuminem (0,25 mg) přímou detekcí ovalbuminu na částicích a výpočtem účinnosti entrapmentu a entrapmentové kapacity nosiče metodou BCA (počet opakování: 4).

Navážka proteinu [mg]	Ovalbumin/NP – přímá detekce [μg/4mg]	Účinnost entrapmentu [%]	Entrapmentová kapacita nosiče [μg/4mg]
0,25	130,8 (± 40,7) (44,1 %)	58,1	43,1 (17,2 %)

Účinnost entrapmentu ovalbuminu do nanočástic vypočítaná nepřímou metodou byla 58,1 %. Nižší procentuální hodnota účinnosti entrapmentu získaná z přímého stanovení koncentrace ovalbuminu na částicích, je pravděpodobně ovlivněna vazbou ovalbuminu do vnitřní struktury nanočástic, která je pro reagentie metody BCA nepřístupná.

V dalším experimentu byla pro přípravu částic s ovalbuminem metodou entrapmentu použita navážka ovalbuminu 0,15 mg v 0,5 ml acetátového pufru o PH 5,2. Velikost připravených částic byla $184,1 \pm 2,4$ nm. Distribuce velikostí na obrázku 15 ukazuje na poměrně homogenní suspenzi. Suspenze částic s 0,15 mg ovalbuminu byla po přípravě homogenní, bez pozorovaných shluků a částice měly rovnoměrně rozptýlený opaleskující zákal v celém objemu.



Obrázek 15: Distribuce DLS připravených CS/TPP nanočástic s 0,15 mg ovalbuminu (2 měření vypuštěna). Měřeno na přístroji Zetasizer Malvern Instrument.

U připravených částic byla přímou a nepřímou metodou stanovena účinnost entrapmentu ovalbuminu do částic. Nepřímou metodou byla stanovena i entrapmentová kapacita nosiče. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulce 8.

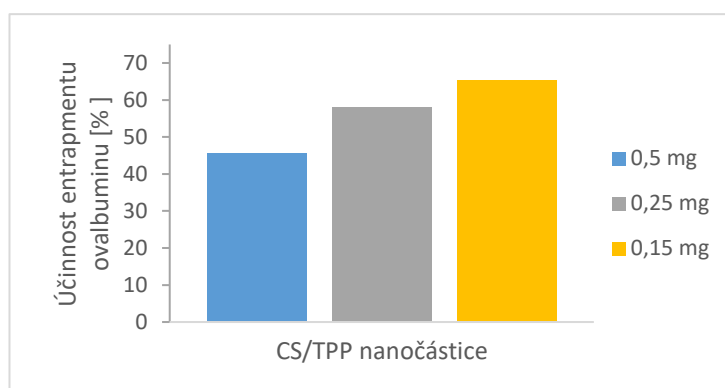
Tabulka 8: Charakteristika CS/TPP nanočástic s ovalbuminem (0,15 mg) přímou detekcí ovalbuminu na částicích a výpočtem účinnosti entrapmentu a entrapmentové kapacity nosiče metodou BCA (počet opakování: 4).

Navážka proteinu [mg]	Ovalbumin/NP – přímá detekce [$\mu\text{g}/4\text{mg}$]	Účinnost entrapmentu [%]	Entrapmentová kapacita nosiče [$\mu\text{g}/4\text{mg}$]
0,15	65,7 (\pm 13,6) (31,6 %)	65,2	33,9 (22,6 %)

Z přímého měření koncentrace ovalbuminu na 4 mg částic a nepřímým hodnocením účinnosti entrapmentu vyplývá, že se do nanočástic zachytilo 31,6-65,2 % z celkového množství vloženého ovalbuminu. Nižší procentuální hodnota účinnosti entrapmentu získaná z přímého stanovení koncentrace ovalbuminu na částicích, je pravděpodobně ovlivněna vazbou ovalbuminu do vnitřní struktury nanočástic, která je pro reagentie metody BCA nepřístupná.

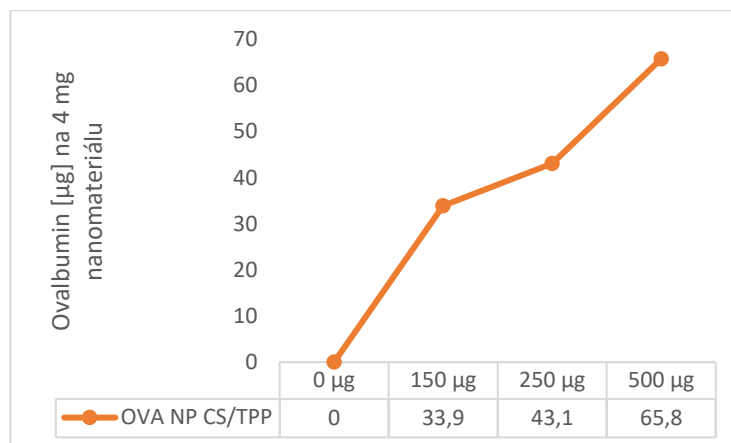
4.1.1 Hodnocení metody entrapmentu ovalbuminu do nanočástic

Z předchozích výsledků bylo pro všechny navážky ovalbuminu provedeno srovnání účinností entrapmentu ovalbuminu (graf 2) a entrapmentové kapacity nosiče (graf 3) nepřímým stanovením koncentrace proteinu na nanočásticích metodou BCA.



Graf 2: Srovnání účinností entrapmentu ovalbuminu do CS/TPP nanočástic nepřímým stanovením metodou BCA (vztaženo na 4 mg částic).

Dle nepřímého hodnocení na grafu 2 lze vidět, že se účinnost entrapmentu ovalbuminu do nanočástic pohybuje mezi 45,4-65,2 % a se snižujícím se množstvím ovalbuminu do nanočástic se účinnost zvyšuje.



Graf 3: Srovnání vazebných kapacit CS/TPP nanočástic s ovalbuminem metodou entrapmentu (vztaženo na 4 mg částic).

Dle nepřímého hodnocení v grafu 3 lze vidět, že se vazebná kapacita nosiče se zvyšujícím množstvím navázaného proteinu zvyšuje.

Také DLS velikost připravených částic byla hodnocena z pohledu koncentrace vloženého ovalbuminu (tabulka 9).

Tabulka 9: Hydrodynamická velikost připravených částic – CS/TPP bez ovalbuminu, CS/TPP s vázaným ovalbuminem (0,5 mg, 0,25 mg a 0,15 mg) (počet opakování: 4).

Navážka proteinu [mg]	Průměr d [nm]	Směrodatná odchylka [nm]
CS/TPP nanočástice bez ovalbuminu		
0	183,4	2,7
CS/TPP nanočástice s ovalbuminem		
0,5	181,7	5,7
0,25	203,6	2,1
0,15	184,1	2,4

Z výsledné tabulky vyplývá, že DLS velikost připravených nanočástic s ovalbuminem se ve všech koncentracích ovalbuminu pohybovala v rozmezí 181-203 nm. Odchylka v DLS velikosti (0,25 mg ovalbuminu) může být způsobena vlivem nově připraveného zásobního roztoku chitosanu. Porovnáním částic s ovalbuminem s částicemi bez navázaného proteinu lze (kromě navážky 0,25 mg ovalbuminu, kde hrají roli i jiné faktory) říci, že vázáním ovalbuminu do částic nedocházelo k výrazným změnám ve velikosti částic.

4.2 Příprava nanočástic z chitosanu a alginátu sodného s ovalbuminem

Přestože mají chitosanové nanočástice jako nosičové systémy v rámci drug delivery systému četné výhody, jejich vlastnosti, jako je omezená schopnost kontrolovaného uvolňování zachycených látek a snadná rozpustnost částic v kyselém prostředí, brání jejich dalšímu vývoji [5]. Cílem dalšího experimentu bylo připravené chitosanové nanočástice se zachyceným ovalbuminem zabalit do vrstvy alginátu sodného, který by mohl tyto překážky překonat. Studie prokázaly, že alginát sodný zvyšuje stabilitu chitosanových nanočástic s navázaným proteinem a zabraňuje rychlé degradaci proteinu na nanočásticích v rámci drug delivery systému [3].

V přípravě alginát-chitosanových nanočástic (ALG-CS nanočástic) docházelo nejprve k entrapmentu ovalbuminu do CS/TPP nanočástic a poté potahování neboli enkapsulace nanočástic alginátem sodným procesem ionotropního gelování podle kapitoly 3.9 za laboratorní teploty na magnetickém míchadle. Pro entrapment byly zvoleny dvě navážky ovalbuminu, 0,15 mg a 0,25 mg. ALG-CS nanočástice byly po přípravě resuspendovány v 0,524 mM CaCl₂ o pH 7, který sloužil jako zesilovací činidlo k posílení a stabilizaci ALG-CS částic [98].

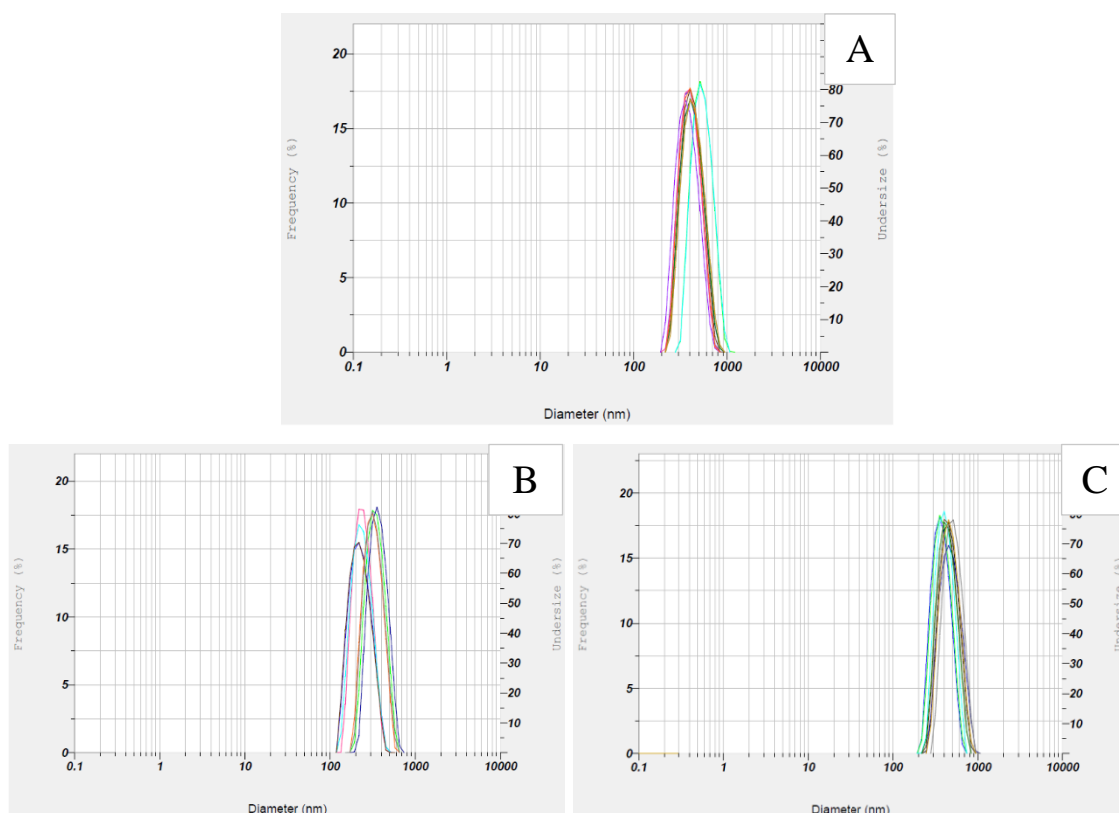
U vzniklých ALG-CS částic byla měřena hydrodynamická velikost částic podle kapitoly 3.13 a byla sledována účinnost vazby nebo uvolnění ovalbuminu při tvorbě částic. Pro srovnání byly potahovány vrstvou alginátu sodného i částice bez zachyceného ovalbuminu. Výsledky DLS a distribuce velikostí jsou uvedeny v tabulce 10. Homogenita připravených částic je znázorněna na obrázku 16 a 17.

Tabulka 10: Hydrodynamická velikost připravených částic – bez OVA, s OVA (0,15 mg a 0,25 mg), ALG-CS částic a ALG-CS částic s OVA (0,15 mg a 0,25 mg) (počet opakování: 3).

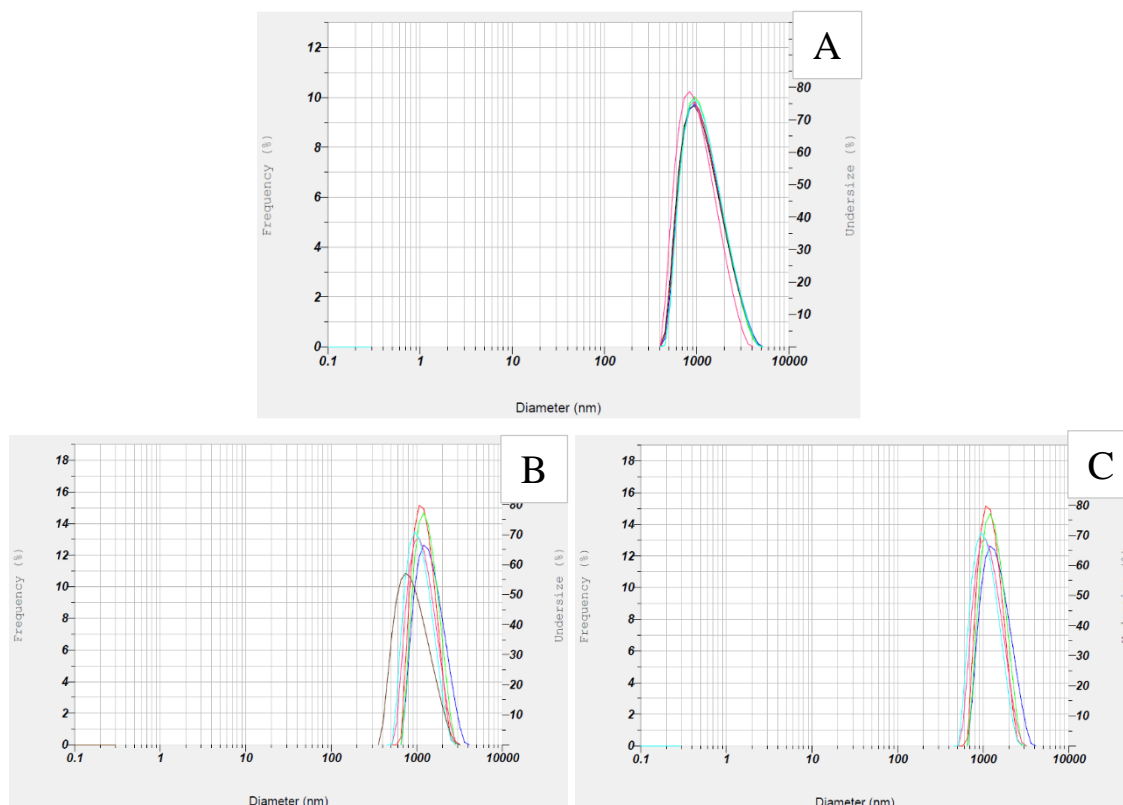
Typ nanočástic	Průměr d [nm]	Směrodatná odchylka [nm]
CS/TPP nanočástice	261,7	± 52,9
CS/TPP nanočástice s 0,25 mg OVA	230,1	± 31,7
CS/TPP nanočástice s 0,15 mg OVA	198,8	± 20,3
ALG-CS nanočástice	860,9	± 164,5
ALG-CS nanočástice s 0,15 mg OVA	859-6623	-
ALG-CS nanočástice s 0,25 mg OVA	1220-6180	-

U výsledků DLS velikostí CS/TPP nanočástic (bez alginátu sodného) je možné sledovat snižování velikostí částic po zapouzdření proteinu do částic, a zároveň snižování velikosti částic se snižujícím se množstvím imobilizovaného proteinu. Nejmenší velikost vykazovaly CS/TPP částice s 0,15 mg zapouzdřeného ovalbuminu, které se velikostně pohybovaly v rozmezí 178,8-218,8 nm.

DLS velikosti ALG-CS nanočástic bez ovalbuminu se pohybovaly velikostně v rozmezí 861 ± 165 nm. DLS velikosti ALG-CS nanočástic s ovalbuminem se pohybovaly u obou koncentrací proteinu (0,15 mg a 0,25 mg) ve vysokém rozpětí velikostí (859-6623 nm) a řada DLS částic nebyla měřitelná vůbec, na což poukazovala přítomnost shluků a agregátů v měřených vzorcích. Důvod pro velké rozmezí ALG-CS částic zřejmě souvisí s výsledným nábojem CS/TPP s ovalbuminem, které interagují s alginátem sodným a tvoří homogenní suspenze částic. Problémy s distribucí velikostí ALG-CS částic také dokládá obrázek 17. I zde je patrná velká velikost částic a nehomogenní distribuce velikostí.



Obrázek 16: Distribuce DLS připravených CS/TPP částic. Měřeno na přístroji Horiba. a) CS částice (2 měření vypuštěna), b) CS částice s 0,15 mg OVA (4 měření vypuštěna), c) CS částice s 0,25 mg OVA (3 měření vypuštěna).



Obrázek 17: Distribuce DLS připravených ALG-CS částic. Měřeno na přístroji Horiba. a) ALG-CS částice (6 měření vypuštěno), b) ALG-CS částice s 0,15 mg OVA (6 měření vypuštěno), f) ALG-CS částice s 0,25 mg OVA (7 měření vypuštěno).

V dalších experimentech jsme se zaměřili i na optimalizaci podmínek (reakční prostředí, množství částic, rychlost míchání, postup smíchání roztoku alginátu sodného a nanočástic). Částice vykazovaly větší shluky a agregáty, nebo byly vzorky zcela neměřitelné. Dosažené výsledky z tabulky 10 a obrázku 17 poukazují na velkou změnu CS vlastností ve spojení s daným proteinem a znemožnění přípravy ALG-CS nanočástic do stovek nm. Problém s tvorbou částic by mohlo pomoci vysvětlit sledování Zeta potenciálu částic.

U připravených ALG-CS částic bylo přes problémy s velikostí připravených částic provedeno stanovení účinnosti enkapsulace ovalbuminu do nanočástic a enkapsulační kapacity nosiče. Hodnoty koncentrace proteinu pro nepřímé hodnocení účinnosti enkapsulace a vazebné kapacity nosiče byly stanoveny metodou BCA podle postupu 3.12.2 a jsou uvedeny v tabulce 11.

Tabulka 11: Charakteristika CS/TPP nanočástic s ovalbuminem přímou detekcí ovalbuminu na částicích a výpočtem účinnosti enkapsulace a enkapsulační kapacity nosiče metodou BCA (počet opakování: 4).

Typ nanočástic	Účinnost enkapsulace [%]	Enkapsulační kapacita nosiče [µg/4mg]
Částice s 0,15 mg ovalbuminu	52,9	23 (15,3 %)
Částice s 0,25 mg ovalbuminu	51,8	32,1 (12,8 %)

Výsledky z nepřímého měření koncentrace zachyceného ovalbuminu do nanočástic poukazují na to, že se u množství 0,15 mg vázaného ovalbuminu zachytilo do nanočástic 52,9 % z celkového množství vloženého proteinu a u množství 0,25 mg ovalbuminu vázaného na částice bylo zachyceno do částic 51,8 % z celkového množství vloženého proteinu. Enkapsulační kapacita CS/TPP nanočástic se se vzrůstajícím množstvím vázaného ovalbuminu do částic zvyšovala. Výsledky zcela odpovídají výsledkům měření v kapitole 4.1, kdy se sledovala míra účinnosti vazby ovalbuminu do nanočástic metodou entrapmentu. Množství proteinu v roztoku po inkubaci částic s alginátem sodným nebylo možné metodou BCA detekovat. Důvodem mohla být interference alginátu sodného s reagensy BCA metody, popřípadě nízká koncentrace proteinu, která byla pod limitem detekce metody.

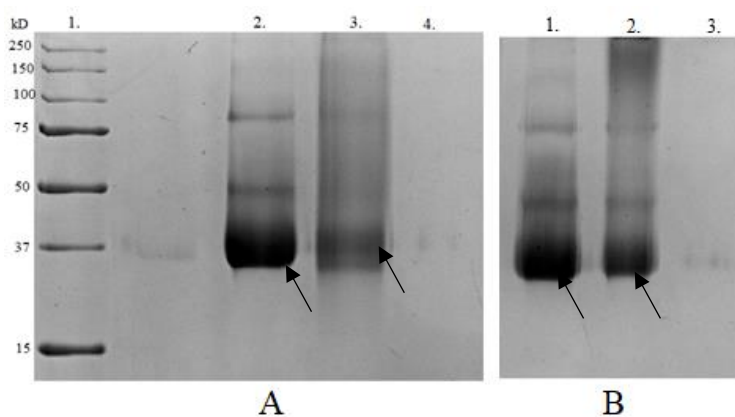
4.3 Imobilizace ovalbuminu na chitosanové nanomateriály

Imobilizace ovalbuminu na nanovlákná a nanočástice vyrobené z chitosanu byla provedena kovalentní karbodiimidovou metodou. Cílem experimentů bylo stanovit účinnost vazby ovalbuminu (0,5 mg) na nanovláknenné a nanočásticové nosiče z chitosanu a porovnat tyto výsledky s metodami entrapmentu a enkapsulace ovalbuminu.

Během karbodiimidové metody dochází k vytvoření amidové vazby mezi hydroxylovou skupinou chitosanu a aminovou skupinou ovalbuminu. Ke zprostředkování vazby byly použity jako aktivační činidla *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) a *N*-hydroxysulfosuccinimide sodium salt (NHS). Přednostně dochází k reakci s karboxylovou skupinou EDC za vzniku meziprojektu *O*-acylisomocoviny, která poté zreagovala s aminovou skupinou proteinu, čímž došlo ke vzniku amidové vazby. Jedná se o silnou kovalentních vazbu, která je nevratná.

4.3.1 Karbodiimidová vazba na chitosanová nanovlákná

U karbodiimidové metody uvedené v kapitole 3.5 se vytváří amidová vazba mezi aminovou skupinou ovalbuminu a hydroxylovou skupinou chitosanu. Na nanovlákná s plošnou hmotností 20 g/m² o rozměrech 1,5 x 1,5 cm bylo navázáno 0,5 mg ovalbuminu po dobu 16 hodin při 4 °C s promývacími kroky. Úspěšné proběhnutí vazby bylo ověřeno metodou SDS-PAGE podle kapitoly 3.14 (obrázek 18A). Pro porovnání nespecifické sorpce proteinu byla metoda použita bez aktivačních látek (EDC, NHS) dle kapitoly 3.5 (obrázek 18B).



Obrázek 18: SDS-PAGE ovalbuminu (0,5 mg) imobilizovaného na nanovlákná karbodiimidovou metodou (A) a nespecifickou sorpcí proteinu (B). A) Pozice: 1 - marker, 2 - vazebný roztok OVA, 3 - roztok po vazbě, 4 - promývací frakce; B) Pozice: 1 - vazebný roztok OVA, 2 - roztok po vazbě nespecifickou sorpcí proteinu, 3 - promývací frakce. Barveno Coomasie Brilliant blue; 10% dělicí gel.

Z výsledků SDS-PAGE elektroforézy (obrázek 18A) lze pozorovat snížení koncentrace ovalbuminu po vazbě, a tak je možné předpokládat úspěšnou imobilizaci proteinu na nanovlákná. Snížení koncentrace ovalbuminu v roztocích po vazbě je patrný i na výsledném gelu SDS-PAGE elektroforézy pro porovnání nespecifické sorpce proteinu (obrázek 18B), která sloužila jako kontrola pro karbodiimidovou metodu. V obou případech nedošlo k vymývání proteinu v promývacích krocích.

Množství imobilizovaného ovalbuminu na nanovláknách bylo stanoveno metodou BCA při 570 nm podle kapitoly 3.12.3. V tabulce 12 jsou uvedeny vypočítané hodnoty koncentrace ovalbuminu na nanovláknách karbodiimidovou metodou i nespecifickou sorpcí proteinu. Slepým vzorkem pro nanovlákná s navázaným ovalbuminem byly použity nanovlákná bez proteinu.

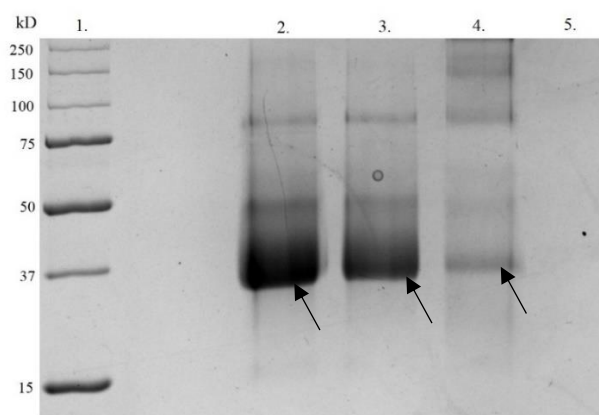
Tabulka 12: Porovnání výsledků karbodiimidové metody a nespecifické sorpce proteinu na nanovlákná metodou BCA (počet opakování: 3).

Způsob vazby	Ovalbumin/NF – přímá detekce [$\mu\text{g}/4 \text{ mg}$]
Kovalentně	45,5 ($\pm 2,9$) (8,8 %)
Nespecifická sorpce (bez EDC, NHS)	18,2 ($\pm 2,6$) (3,8 %)

Na nanovlákná bylo karbodiimidovou metodou navázáno pouze 8,8 % ovalbuminu na 4 mg nanovlákná. Z toho bylo nespecificky adsorbováno 3,8 % ovalbuminu. Výsledné hodnoty koncentrací ovalbuminu na nanovláknách mohou být ovlivněny vazbou nebo sorpcí ovalbuminu do vnitřní struktury nanovlákná, která je pro metodu BCA méně přístupná.

4.3.2 Karbodiimidová vazba na chitosanové nanočástice

Imobilizace ovalbuminu karbodiimidovou metodou na nanočástice byla provedena podle kapitoly 3.6. CS/TPP nanočástice byly připravené metodou ionotropního gelování polykationtu chitosanu s polyaniontem tripolyfosfátu (TPP) v poměru 2:1 v prostředí acetátového pufru o pH 5,2 za laboratorní teploty. Velikost vzniklých nanočástic byla 200 nm. Na 4 mg CS/TPP nanočástic bylo imobilizováno 0,5 mg ovalbuminu po dobu 16 hodin při 4 °C s promývacími kroky. Pro ověření vazby ovalbuminu na částice byla provedena metoda SDS-PAGE podle kapitoly 3.14 (obrázek 19).



Obrázek 19: SDS-PAGE ovalbuminu (0,5 mg) imobilizovaného na nanočástice karbodiimidovou metodou. Pozice: 1 - marker, 2 - vazebný roztok ovalbuminu, 3 - roztok po vazbě, 4 - promývací frakce, 5 - promývací frakce. Barveno Coomassie Brilliant blue; 10% dělicí gel.

Z výsledků SDS-PAGE elektroforézy (obrázek 19) lze pozorovat snížení koncentrace ovalbuminu po vazbě na nanočástice. Také můžeme na výsledném elektroforeogramu pozorovat přítomnost proteinu v první promývací frakci, což pravděpodobně odpovídá uvolněnému ovalbuminu z nanočástic, který byl na nanočástice vázán nespecifickou sorpcí. Předpokládáme tak úspěšnou vazbu proteinu na nanočástice.

Množství vázaného ovalbuminu na nanočásticích bylo stanoveno metodou BCA podle kapitoly 3.12.2. V tabulce 13 jsou uvedeny vypočítané hodnoty koncentrace ovalbuminu na nanočásticích. Slepým vzorkem pro nanočástice s navázaným ovalbuminem byly použity nanočástice bez proteinu.

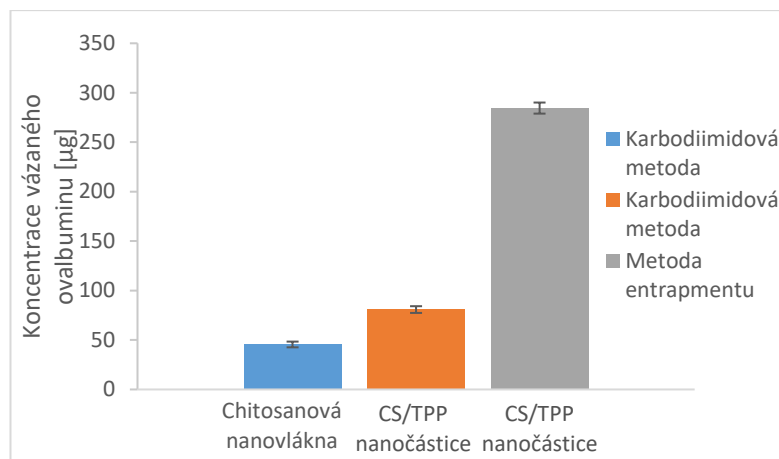
Tabulka 13: Stanovení koncentrace ovalbuminu kovalentně vázaného na nanočásticích metodou BCA (počet opakování: 2).

Navážka proteinu [mg]	Ovalbumin/NP – přímá detekce [$\mu\text{g}/4 \text{ mg}$]
0,5	80,8 ($\pm 3,4$) (14,1 %)

Karbodiimidovou metodou bylo na CS/TPP nanočástice navázáno celkem 14,1 % ovalbuminu na 4 mg částic.

4.3.3 Hodnocení karbodiimidové vazby ovalbuminu na nanomateriály

Ze získaných výsledků karbodiimidové vazby ovalbuminu a metody entrapmentu ovalbuminu na chitosanové materiály bylo provedeno srovnání účinnosti vazby ovalbuminu z přímého měření proteinu metodou BCA na CS/TPP nanočásticích a chitosanových nanovláčkách (graf 4). Na nanovláčka i nanočástice bylo vázáno 0,5 mg ovalbuminu.



Graf 4: Stanovení koncentrace vázaného ovalbuminu na chitosanových nanomateriálech karbodiimidovou metodou a metodou entrapmentu přímou kvantifikací (vztaženo na 4 mg nanomateriálu).

Z výsledků lze říci, že byl ovalbumin nejlépe vázán metodou entrapmentu do nanočástic, a nejméně účinně byl vázán karbodiimidovou metodou na nanovlákná. Na nanočástice bylo vázáno karbodiimidovou metodou 80,8 µg ovalbuminu na 4 mg částic a na nanovlákná 45,5 µg ovalbuminu na 4 mg nanovlákná. Metodou entrapmentu bylo do CS/TPP nanočástic zachyceno 284,5 µg ovalbuminu na 4 mg částic.

4.4 Adsorpce ovalbuminu na nanomateriály

Imobilizace ovalbuminu na nanovlákná a nanočástice vyrobené z chitosanu byla provedena metodou adsorpce. Principem adsorpce je interakce mezi ovalbuminem a nanovlákným/nanočásticovým nosičem z chitosanu, kdy se uplatňují nízkoenergetické síly a ovalbumin se sorbuje na vnější strukturu materiálu. Adsorpce je metodou snadnou, rychlou a reversibilní.

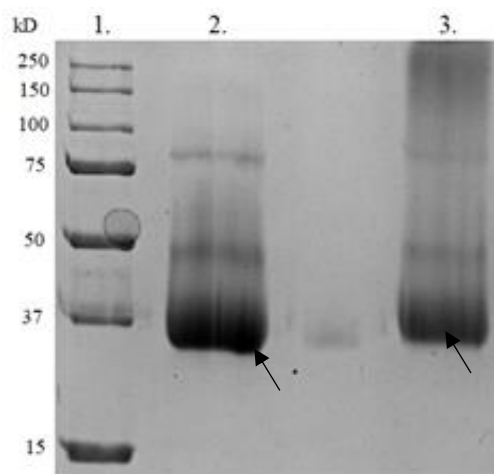
Cílem experimentů bylo sledovat účinnost sorpce ovalbuminu na nanomateriály z chitosanu a porovnat tyto výsledky s metodou entrapmentu ovalbuminu.

Byla použita chitosanová nanovlákná nanovia 2013-1 s plošnou hmotností 20 g/m² a chitosanové nanočástice připravené metodou ionotropního gelování chitosanu, jako polykationtu, s polyaniontem tripolyfosfátu (TPP) v poměru 2:1 v prostředí acetátového pufru o pH 5,2 za laboratorní teploty. Slepým vzorkem pro nanovlákná i nanočástice s navázaným proteinem byly použity nanovlákná a nanočástice bez proteinu. Pro roztoky byl slepým vzorkem fosfátový pufr o pH 7,3.

4.4.1 Adsorpce na chitosanová nanovlákná

Na nanovlákná z chitosanu s plošnou hmotností 20 g/m² o rozměrech 1,5 x 1,5 cm bylo pomocí sorpce navázáno 0,5 mg ovalbuminu podle metody z kapitoly 3.7. Sorpce probíhala po dobu 16 hodin při 4 °C na 3 vzorky nanovlákná. Váha nanovlákn byla přibližně 4 mg.

Pro kontrolu sorpce ovalbuminu na nanovlákná byla provedena i SDS-PAGE elektroforéza podle kapitoly 3.14 (obrázek 20).



Obrázek 20: SDS-PAGE ovalbuminu (0,5 mg) imobilizovaného na nanovlákněch metodou sorpce. Pozice: 1 - marker, 2 - vazebný roztok ovalbuminu, 3 - roztok po vazbě. Barveno Coomassie Brilliant blue; 10% dělicí gel.

Z výsledků SDS-PAGE elektroforézy (obrázek 20) lze pozorovat patrné snížení koncentrace ovalbuminu po sorpci na nanovlákná. Lze tak předpokládat úspěšnou sorpci proteinu na nanovlákná.

Koncentrace sorbovaného ovalbuminu na nanovlákněch byla stanovena metodou BCA podle kapitoly 3.12.3. V tabulce 14 jsou uvedeny hodnoty z přímého stanovení koncentrace sorbovaného ovalbuminu na nanovlákněch a vypočítané hodnoty z nepřímého hodnocení účinnosti sorpce a sorpční kapacity nosiče stanovené metodou BCA.

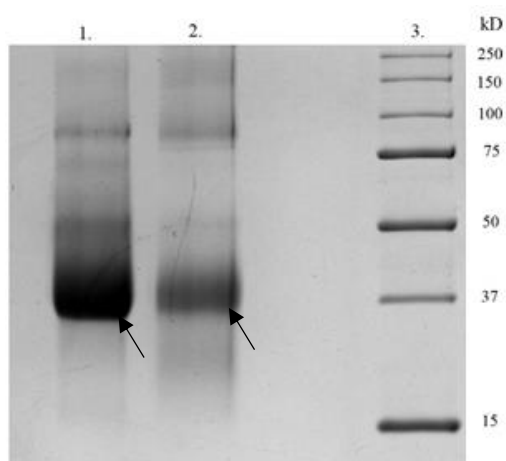
Tabulka 14: Stanovení koncentrace ovalbuminu na chitosanových nanovláčkách, účinnosti sorpce a sorpční kapacity nosiče metodou BCA (počet opakování: 3).

Navážka proteinu [mg]	Ovalbumin/NF – přímá detekce [μg/4 mg]	Účinnost sorpce [%]	Sorpční kapacita nosiče [μg/4mg]
0,5	27,4 (± 2,6) (5,5 %)	13,7	17,1 (3,4 %)

Z přímého měření koncentrace ovalbuminu na 4 mg nanovláčka vyplývá, že se na nanovláčka metodou sorpce navázalo 5,5 % z celkového množství vloženého proteinu. Nepřímou metodou byla účinnost sorpce vypočítána na 13,7 %. Nižší procentuální hodnota účinnosti sorpce získaná z přímého měření koncentrace ovalbuminu na nanovláčkách, je pravděpodobně ovlivněna sorpcí ovalbuminu do vnitřní struktury nanovláčka, která je pro reagentie metody BCA méně přístupná.

4.4.2 Adsorpce na chitosanové nanočástice

Sorpce 0,5 mg ovalbuminu na 4 mg CS/TPP byla provedena podle metody popsané v kapitole 3.8. Sorpce probíhala po dobu 16 hodin při 4 °C za mírného otáčení. Pro kontrolu sorbovaného množství ovalbuminu na nanočásticích byla provedena SDS-PAGE podle kapitoly 3.14 (obrázek 21).



Obrázek 21: SDS-PAGE ovalbuminu (0,5 mg) imobilizovaného na nanočásticích metodou sorpce. Pozice: 1 - vazebný roztok OVA, 2 - roztok po vazbě, 3 - marker. Barveno Coomassie Brilliant blue; 10% dělicí gel.

Na výsledném elektroforeogramu je patrný úbytek koncentrace sorbovaného ovalbuminu po sorpci na nanočástice. Proto je možné předpokládat úspěšnou sorpci proteinu na nanočástice.

Úspěšnost sorpce byla dále ověřena přímým stanovením koncentrace proteinu na nanočásticích metodou BCA podle kapitoly 3.12.2. Metodou BCA byly stanoveny i hodnoty koncentrace ovalbuminu nepřímým hodnocením účinnosti sorpce a sorpční kapacity nosiče (tabulka 15).

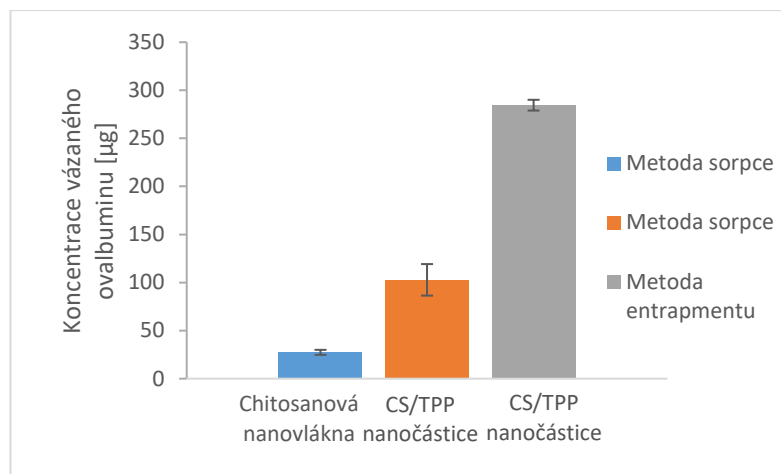
Tabulka 15: Stanovení koncentrace ovalbuminu na CS/TPP nanočásticích, účinnosti sorpce a sorpční kapacity nosiče metodou BCA (počet opakování: 4).

Navážka proteinu [mg]	Ovalbumin/NP – přímá detekce [μg/4 mg]	Účinnost sorpce [%]	Sorpční kapacita nosiče [μg/4mg]
0,5	102,8 (± 16,4) (19,6 %)	23,7	31,1 (6,2 %)

Z přímého měření koncentrace ovalbuminu na 4 mg nanočástic a nepřímým hodnocením účinnosti sorpce vyplývá, že se na nanočástice metodou sorpce navázalo 19,6-23,7 % z celkového množství vloženého proteinu. Nižší procentuální hodnota účinnosti sorpce získaná z přímého měření koncentrace ovalbuminu na nanočásticích, je pravděpodobně ovlivněna sorpcí ovalbuminu do vnitřní struktury nanočástic, která je pro reagentie metody BCA nepřístupná.

4.4.3 Hodnocení metody sorpce ovalbuminu na nanomateriály

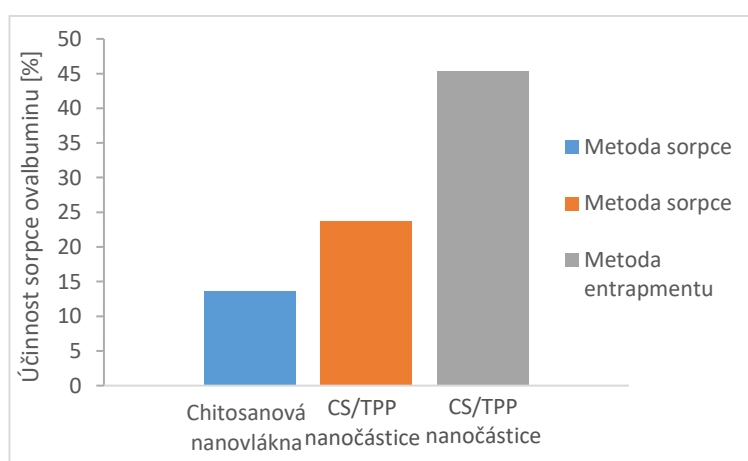
Ze získaných výsledků bylo provedeno srovnání účinností sorpce ovalbuminu z přímého měření proteinu metodou BCA na chitosanových nanovláčkách a na CS/TPP nanočásticích s metodou entrapmentu (graf 5). Na nanovláčka i nanočástice bylo sorbováno celkem 0,5 mg ovalbuminu.



Graf 5: Stanovení koncentrace vázaného ovalbuminu na chitosanových nanomateriálech metodou sorpce a metodou entrapmentu přímou kvantifikací (vztaženo na 4 mg nanomateriálu).

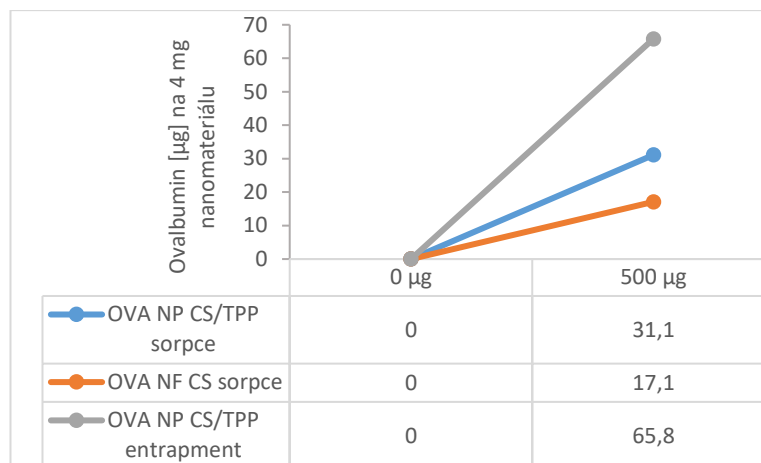
Z výsledků vyplývá, že byl ovalbumin nejúčinněji vázán metodou entrapmentu, poté následuje metoda sorpce na CS/TPP nanočástice. Na nanočástice bylo sorbováno 102,8 µg ovalbuminu na 4 mg částic a na nanovlákná 27,4 µg ovalbuminu na 4 mg nanovlákná. Metodou entrapmentu bylo do CS/TPP nanočástic zachyceno 284,5 µg ovalbuminu na 4 mg částic.

Dále bylo provedeno srovnání účinností sorpce ovalbuminu (graf 6) a sorpční kapacity nosiče (graf 7) s entrapmentem ovalbuminu nepřímým stanovením koncentrace proteinu na CS/TPP nanočásticích a chitosanových nanovlákných metodou BCA.



Graf 6: Srovnání účinností sorpce ovalbuminu na chitosanové nanovlákná a CS/TPP nanočástice s metodou entrapmentu (vztaženo na 4 mg nanomateriálu).

Dle nepřímého hodnocení lze říci, že nejvyšší účinnost je získána metodou entrapmentu ovalbuminu, poté následuje metoda sorpce ovalbuminu na CS/TPP a sorpce na chitosanová nanovlákná.



Graf 7: Srovnání vazebných kapacit CS/TPP nanočástic a chitosanových nanovláken se sorbovaným ovalbuminem s metodou entrapmentu (vztaženo na 4 mg nanomateriálu).

Podle nepřímého hodnocení můžeme vidět, že je vazebná kapacita CS/TPP nanočástic s ovalbuminem vyšší u entrapmentu a u sorpce než u chitosanových nanovláken s ovalbuminem.

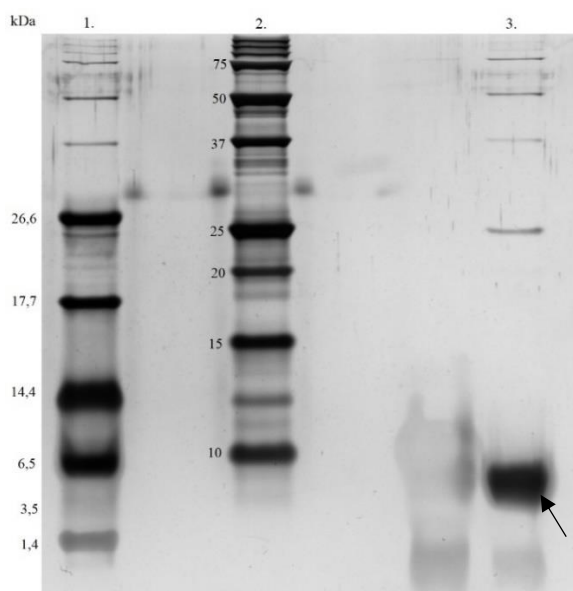
4.5 Zachycení epidermálního růstového faktoru do nanočástic

V této práci byla pro vazbu ovalbuminu na chitosanové nanovláčka a CS/TPP nanočástice zavedena metoda entrapmentu, a byla porovnána s metodami sorpce a karbodiimidové metody. U každé metody byla hodnocena účinnost vazby ovalbuminu na nanomateriál z přímého měření proteinu na nanomateriálu a nepřímo výpočtem účinnosti vazby a vazebné kapacity nosiče metodou BCA. Z jednotlivých výsledků byly připraveny souhrnné grafy (grafy 4-7), podle kterých byla vybrána nejvhodnější metoda vazby, materiál a koncentrace pro vazbu lidského rekombinantního epidermálního růstového faktoru (EGF). Z výsledků vazeb s ovalbuminem je zřejmé, že metoda entrapmentu do CS/TPP nanočástic vykazuje nejvyšší účinnost a zároveň i vazebnou kapacitu nosiče, která se se zvyšujícím množstvím navázaného proteinu zvyšovala. Účinnost entrapmentu do CS/TPP nanočástic se zvyšovala se snižujícím množstvím vázaného proteinu. Pro vazbu růstového faktoru byla tedy zvolena metoda entrapmentu do CS/TPP nanočástic a dvě navážky, 0,15 mg a 0,25 mg EGF.

Cílem experimentu bylo vytvořit polymerní nanočástice se zachyceným lidským rekombinantním epidermálním růstovým faktorem metodou entrapmentu. EGF je produkován

v *E. Coli* a purifikován patentovanými chromatografickými technikami. Jedná se o jediný nelykosylovaný polypeptidový řetězec obsahující 53 aminokyselin s molekulovou hmotností 6,2 kDa. Roztok EGF je stabilní při 4 °C po dobu 2-7 dní. Lyofilizovaný EGF je stabilní při 25 °C po dobu tří týdnů a pro dlouhodobé skladování se doporučuje EGF uchovávat při teplotě pod -18 °C [103].

Před začátkem experimentů byla provedena analýza na polyakrylamidové elektroforéze proteinů s SDS a tricinem (Tricin-SDS PAGE) pro ověření čistoty EGF popsané v kapitole 3.15 (obrázek 22). Na výsledném elektroforeogramu lze v pozici 3 vidět jediný protein EGF, s odpovídající molekulovou hmotností. Mimo tento protein je u vzorku viditelná kontaminace pravděpodobně způsobená nedostatečným promytím Hamiltonovy pipety před dávkováním vzorku.



Obrázek 22: Tricin-SDS-PAGE epidermálního růstového faktoru (1 µg). Pozice: 1 - polypeptidový marker s merkaptoethanolem (1,4-26,6 kDa), 2 - marker (250-10 kDa), 3 - EGF a merkaptoethanolem (1 µg). Barveno amoniakálním stříbrem; 16,5% dělicí gel.

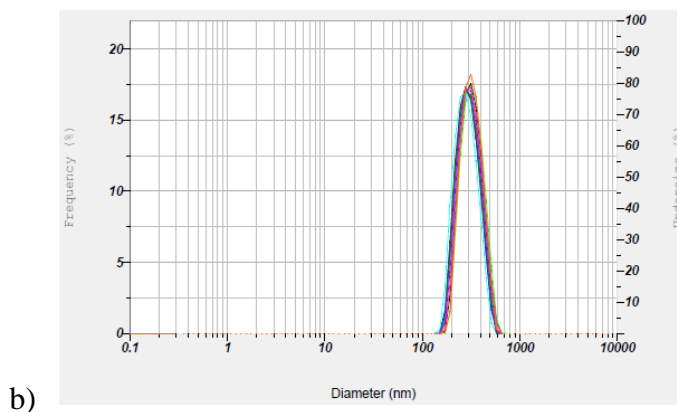
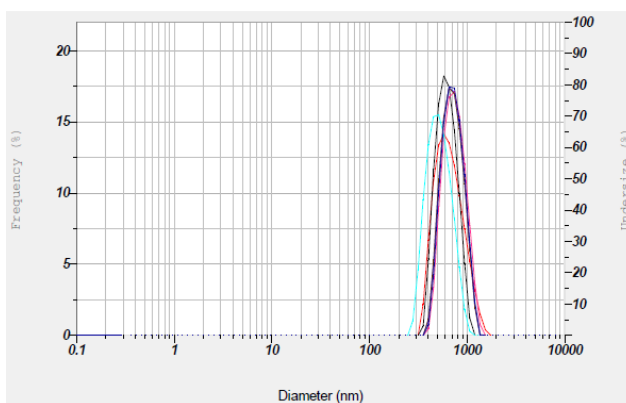
Podle kapitoly 3.10 byly připraveny CS/TPP nanočástice s EGF metodou entrapmentu. Principem přípravy částic bylo ionotropní gelovatění chitosanu s anionty tripolyfosfátu (TPP), kdy docházelo během tvorby nanočástic k zachycení EGF do částic. Roztok EGF byl přidáván přímo do roztoku chitosanu, protože na základě blízkosti svého izoelektrického bodu (pI 4,43) pH pracovního roztoku je EGF negativně nabitý a s chitosanem se tak při pH 6,2 přitahuje. K této směsi byl pomalu přikapáván aniont TPP, díky kterému docházelo ke srážení a tvorbě částic. Byly zvoleny dvě navážky EGF (0,15 mg a 0,25 mg), které byly zvoleny na základě

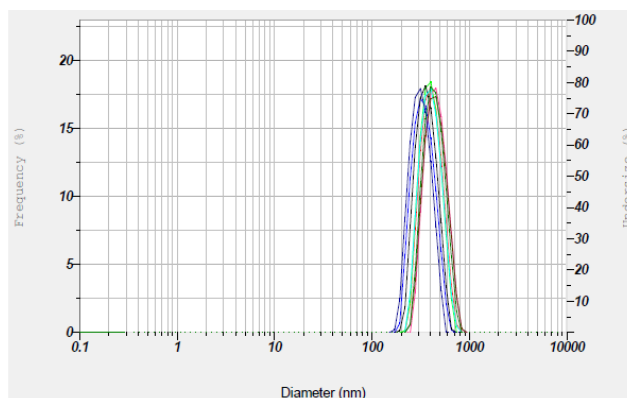
výsledků s použitím ovalbuminu v kapitole 4.1, s ohledem na účinnost vazby a vazebnou kapacitu nosiče.

Jednou z analýz účinnosti entrapmentu bylo měření DLS velikostí částic v deionizované vodě podle kapitoly 3.13. Velikosti částic jsou uvedeny v tabulce 16 a uvedené hodnoty jsou průměrem z tripletů. DLS velikosti nanočástic se pohybovaly v rozmezí 193-239 nm. Jako kontrolní vzorky sloužily CS/TPP nanočástic bez zachyceného EGF. Distribuce velikostí částic se zachyceným EGF zobrazené na obrázku 23 ukazují na mírně nehomogenní suspenze v deionizované vodě.

Tabulka 16: Hydrodynamická velikost připravených CS/TPP nanočástic s EGF (0,15 mg a 0,25 mg) (počet opakování: 3).

Navážka proteinu [mg]	Průměr d [nm]	Směrodatná odchylka [nm]
0	242,1	± 23
0,15	204	± 12
0,25	215,0	± 22,6





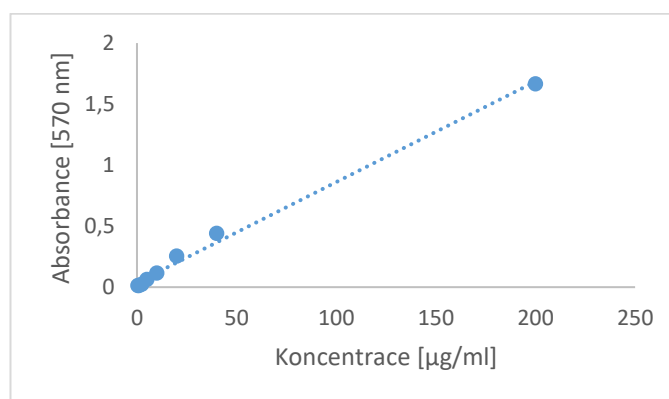
c)

Obrázek 23: Distribuce DLS připravených CS/TPP nanočástic s EGF. Měřeno na přístroji Horiba.

- a) CS částice bez EGF (4 měření vypuštěna), b) CS částice s 0,150 mg EGF (1 měření vypuštěno),
c) CS částice s 0,250 mg EGF (3 měření vypuštěna).

U vytvořených CS/TPP částic s EGF byla dále sledována účinnost entrapmentu a entrapmentová kapacita nosiče, a to nepřímou metodou stanovením koncentrace růstového faktoru v roztoku před vazbou a po vazbě metodou BCA z kapitoly 3.13.2 (tabulka 17).

Pro stanovení přesné koncentrace růstového faktoru byla nejprve připravena podle kapitoly 3.12.1 kalibrační křivka závislosti absorpance barevného produktu na koncentraci proteinu (graf 8), která byla vyjádřena rovnicí lineární regrese $y = 0,0082x + 0,0369$ s hodnotou spolehlivosti $R^2 = 0,9946$. Kalibrační rovnice byla použita ke sledování účinnosti vazby růstového faktoru na CS/TPP nanočástice.



Graf 8: Kalibrační křivka ovalbuminu o koncentraci 2 mg/ml pro stanovení koncentrace proteinu metodou BCA (počet opakování: 2).

Tabulka 17: Charakteristika CS/TPP nanočástic s EGF (0,15 mg a 0,25 mg) výpočtem účinnosti entrapmentu a entrapmentové kapacity nosiče nepřímo metodou BCA (počet opakování: 3).

Navážka proteinu [mg]	Účinnost entrapmentu [%]	Entrapmentová kapacita nosiče [μg/4mg]
0,15	39,3	25,2 (16,8 %)
0,25	15,6	9,5 (3,8 %)

Dle nepřímého hodnocení lze vidět, že se účinnost entrapmentu EGF do CS/TPP nanočástic se snižujícím množstvím vázaného proteinu zvyšuje. Zároveň je možné pozorovat, že se se snižujícím množstvím vázaného EGF zvyšuje i entrapmentová kapacita nosiče.

4.6 Sledování uvolňování proteinů z nanočástic

U CS/TPP nanočástic se zachycenými proteiny použitými v této práci byla sledována míra uvolňování proteinu do 0,1 M fosfátového pufru o pH 5,5 a PBS pufru o pH 7,4 při 37 °C, a také do PBS pufru o pH 7,4 při laboratorní teplotě podle metody v kapitole 3.4 a 3.11. Uvolňování proteinu z nanočástic je ovlivněno jak vlastnostmi nanomateriálu, tj. chemickými, strukturálními a fyzikálními vlastnosti, tak vlastnostmi samotného proteinu (pI), způsobem vazby proteinu k nanomateriálu a i reakčními podmínkami jako např. teplotou, iontovou silou a pH [6]. Testy uvolňování *in vitro* se běžně používají jako ukazatel chování nanomateriálů *in vivo* a obecně jsou prováděny převážně při fyziologické teplotě (37 °C) [93].

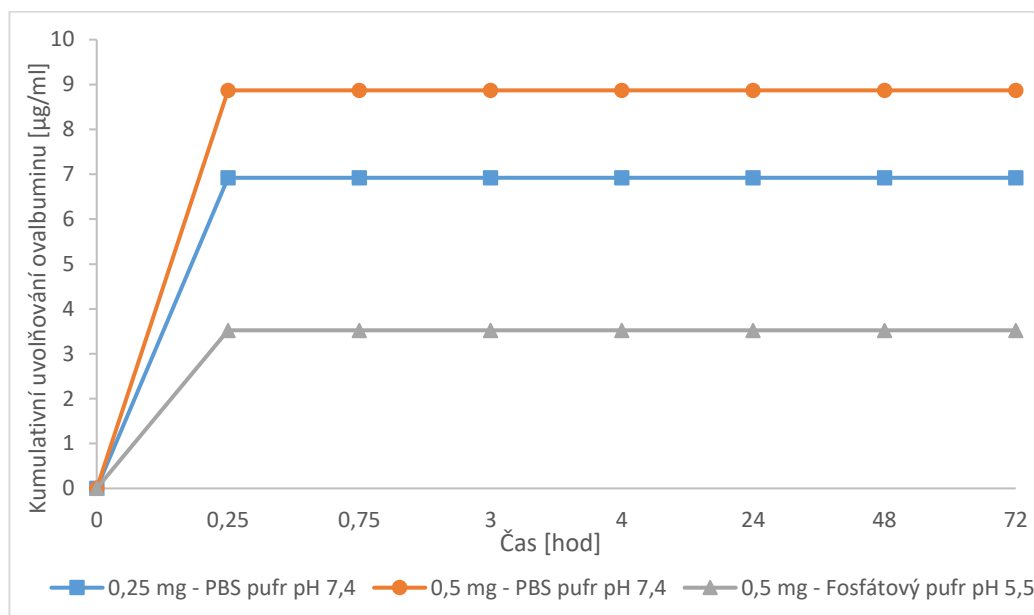
4.6.1 Sledování uvolňování ovalbuminu z nanočástic

Do CS/TPP nanočástic byl metodou entrapmentu zachycen ovalbumin o množství 0,25 mg a 0,5 mg. Vzorky byly v 1 ml příslušného pufru a celý objem supernatantu byl v časových intervalech (15 minut až 72 hodin) několikrát vyměněn. Pro tento experiment byla zvolena laboratorní teplota (25 °C) a fyziologická teplota (37 °C). Obvykle jsou v těchto experimentech využívány fyziologické roztoky PBS anebo fosfátový pufr. Experiment byl proveden při fyziologickém pH 7,4 a při kyseljším pH 5,5, kdy bylo cílem přiblížit pH kůže.

Uvolňování 0,25 mg ovalbuminu z CS/TPP nanočástic bylo sledováno za mírného otáčení při laboratorní teplotě v PBS pufru o pH 7,4 a uvolňování 0,5 mg OVA z CS/TPP částic

při 37 °C za mírného třepání v PBS pufru o pH 7,4 a 0,1 M fosfátovém o pufru pH 5,5. Koncentrace proteinu ve frakcích byla stanovena pomocí metody BCA z kapitoly 3.12.2.

Pro vyhodnocení uvolňování ovalbuminu z nanočástic byla použita metoda kumulativní křivky uvedené v [98], která vyjadřuje koncentraci uvolněného proteinu v promývacích frakcích v čase. Kumulativní křivka uvolňování ovalbuminu z CS/TPP nanočástic je znázorněna na grafu 9.



Graf 9: Kumulativní křivka uvolňování ovalbuminu z CS/TPP nanočástic v promývacích frakcích (vztaženo na 4 mg částic; počet opakování: 3).

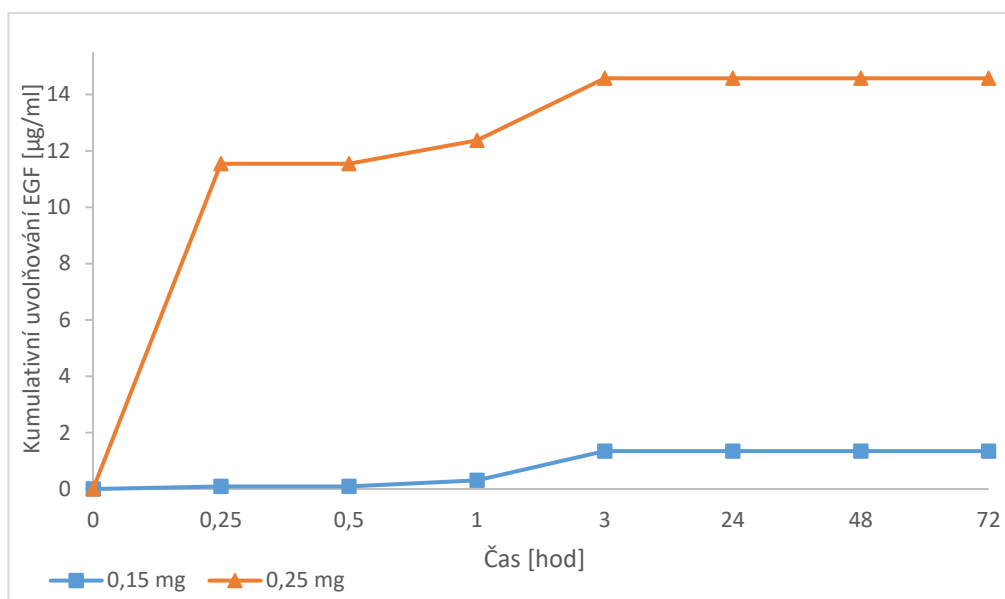
Z výsledků sledování uvolňování lze v obou případech (0,25 mg i 0,5 mg) pozorovat, že se z nanočástic uvolnilo malé množství proteinu pouze v prvních 15 minutách a dál k uvolňování proteinu nedocházelo, bez ohledu na zvolené pH roztoků. S ohledem na velkou molekulovou hmotnost ovalbuminu (42,7 kDa) lze předpokládat nízkou rychlost uvolnění. Protein pravděpodobně zůstává zapouzdřen uvnitř částic a k jeho uvolnění by mohlo dojít pouze degradací chitosanových částic.

4.6.2 Sledování uvolňování růstového faktoru z nanočástic

U polymerních nanočástic s epidermálním růstovým faktorem vytvořených metodou etrapmentu byla sledována míra uvolnění růstového faktoru z nanočástic v čase, při 37 °C za mírného třepání do PBS pufru o pH 7,4 podle metody z kapitoly 3.11.

Vzorky připravených nanočástic s EGF (3 mg) byly v 1 ml PBS pufru o pH 7,4 a celý objem supernatantu byl několikrát v časových intervalech (15 minut až 96 hodin) vyměněn. Koncentrace uvolněného růstového faktoru v odebraných frakcích byla stanovena pomocí metody BCA z kapitoly 3.12.2.

Pro vyhodnocení uvolňování EGF z nanočástic byla použita metoda kumulativní křivky podle [98], která vyjadřuje koncentraci uvolněného proteinu v promývacích frakcích v čase. Kumulativní křivka uvolňování EGF z CS/TPP nanočástic je znázorněna na grafu 10.



Graf 10: Kumulativní křivka uvolňování EGF (0,25 mg; 0,15 mg) z CS/TPP nanočástic v promývacích frakcích (vztaženo na 3 mg částic; počet opakování: 3).

Z výsledků sledování uvolňování EGF z CS/TPP nanočástic lze pozorovat pozvolné uvolňování proteinu z částic v prvních 2 hodinách u obou množství EGF (0,15 mg a 0,25 mg) vázaného do částic. U množství 0,25 mg EGF pozorujeme také největší množství uvolněného proteinu již v prvních 15 minách. Uvolnění EGF z počátku experimentu může souviset s jeho malou molekulovou hmotností, ale může být také vysvětleno zbytkovým sorbovaným proteinem v povrchové vrstvě částic. U časů sledování 24 hodin a déle nedocházelo ke zvýšenému uvolňování proteinu. Protein zůstal zapouzdřen uvnitř částic a k jeho uvolnění by došlo zřejmě degradací částic.

5 ZÁVĚR

V této diplomové práci byly studovány různé vazby modelového proteinu ovalbuminu na nanovlákně a nanočásticové nosiče z chitosanu. Nejprve byla zavedena metoda entrapmentu ovalbuminu do chitosanových nanočástic a byl sledován vliv koncentrace proteinu pro přípravu částic a účinnost vazby. S ohledem na účinnost entrapmentu a entrapmentové kapacity nosiče byla vyšší účinnost pozorována u koncentrace 0,25 mg a 0,15 mg ovalbuminu na 4 mg částic. Částice byly také charakterizovány pomocí měření jejich hydrodynamické velikosti, kdy nebyl pozorován výrazný vliv zachyceného ovalbuminu na velikost částic. Naměřená velikost částic byla v obou koncentracích v rozmezí 180-203 nm.

Připravené chitosanové nanočástice se zachyceným ovalbuminem byly dále zabaleny do alginátu sodného, který může zvyšovat stabilitu nanočástic s ligandem. Alginát-chitosanové částice s ovalbuminem vykazovaly přítomnost shluků a agregátů a jejich DLS velikost se pohybovala ve velkém rozmezí (859-6623 nm). Problém s přípravou částic by mohlo pomoci vyřešit sledování zeta potenciálu částic v jednotlivých krocích přípravy.

Ovalbumin byl pomocí kovalentní karbodiimidové vazby a sorpce imobilizován na nanočástice a nanovlákně z chitosanu. Cílem bylo porovnání účinnosti vazby ovalbuminu na nanomateriály s metodou entrapmentu a výběr vhodné metody a materiálu pro vazbu lidského rekombinantního epidermálního růstového faktoru (EGF). Účinnost vazby ovalbuminu odlišnými metodami byla hodnocena pomocí BCA stanovení. U jednotlivých metod byly zaznamenány velké rozdíly v účinnosti vazby. Nejvyšší účinnost vazby (65,2 %) a vazebnou kapacitu nosiče (22,6 %) vykazovaly chitosanové nanočástice se zachyceným ovalbuminem metodou entrapmentu.

EGF byl navázán do CS/TPP nanočástic metodou entrapmentu. U nanočástic s navážkami 0,15 mg a 0,25 mg EGF měly naměřené DLS velikosti hodnoty v rozmezí 193-239 nm. Distribuce velikostí částic poukazovala na mírně nehomogenní suspenze. Stanovením proteinu u obou připravených částic bylo zjištěno, že se účinnost entrapmentu EGF do nanočástic i vazebná kapacita nosiče se vzrůstající navážkou proteinu snižovala.

U CS/TPP nanočástic s ovalbuminem i u nanočástic s EGF byla sledována míra uvolňování proteinů z nanočástic v čase do roztoků o pH 5,5 a 7,4 a teplotách 25 a 37 °C. Z kumulativních křivek uvolňování ovalbuminu do 0,1 M fosfátového pufru o pH 5,5 při 25 °C a do PBS pufru o pH 7,4 při 25 a 37 °C vyplynulo, že docházelo k uvolnění malé koncentrace proteinu pouze v prvních 15 minutách. K dalšímu uvolnění by zřejmě muselo dojít degradací částic. Výsledky

uvolňování EGF z nanočástic do PBS pufru o pH 7,4 při 37 °C poukazovaly na pozvolné uvolňování proteinu v prvních 2 hodinách u obou zachycených koncentrací EGF (0,15 mg a 0,25 mg ve 4 mg částic) do částic. U množství 0,25 mg EGF bylo pozorováno také největší množství uvolněného proteinu již v prvních 15 minách. U dalších časů k uvolňování proteinu nedocházelo.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] DENDISOVÁ, M., JENIŠTOVÁ, A., PARCHAŇSKÁ-KOKAISLOVÁ, A. et al. The use of infrared spectroscopic techniques to characterize nanomaterials and nanostructures: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2018, vol. 1031, p. 1-14.
- [2] BHUSHAN, B. *Springer handbook of nanotechnology*. Springer, 2010, p. 1-11. ISBN: 978-3-642-02524-2.
- [3] SCHODEK, D. FERREIRA, P., ASHBY, M. *Nanomaterials, Nanotechnologies and Design*. Elsevier Science, 2009, p. 467-500. ISBN: 9780750681490.
- [4] NAFIGATE CORPORATION. About nanofibers [online]. 2019 [cit. 2018-12-10]. Dostupné z: <http://www.nafigate.com/en/about-nanofibers>.
- [5] WEI, Q. *Functional Nanofibers and their Applications*. Elsevier Science, 2012, p. 415-427. ISBN: 978-0-85709-069-0.
- [6] SRBOVÁ, J., SLOVÁKOVÁ, M., KŘÍPALOVÁ, Z. et al. Reactive and Functional Polymers: Covalent biofunctionalization of chitosan nanofibers with trypsin for high enzyme stability. *Reactive and Functional Polymers*. 2016, vol. 104, p. 38-44.
- [7] JIA, H., ZHU, G., VUGRINOVICH, B. W. et al. Enzyme-carrying polymeric nanofibers prepared via electrospinning for use as unique. *Biotechnol.* 2002, vol. 18, p. 1027-1032. DOI: 10.1021/bp020042m.
- [8] SURI, S. S., FENNIRI, H., SINGH, B. Nanotechnology-based drug delivery systems. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*. 2007, vol. 2, no. 16, p. 1-6.
- [9] RIZVI, S. A. A., SALEH, A. M. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2018, vol. 26, no. 1, p. 64-70.
- [10] KHODABANDEHLOO, H., ZAHEDNASAB, H., HAFEZ, A. A. Nanocarriers Usage for Drug Delivery in Cancer Therapy. *Iranian Journal of Cancer Prevention*. 2016, vol. 9, no. 2, p. 1-7.
- [11] BAMRUNGSAP, S., ZHAO, Z., CHEN, T. et al. Nanotechnology in Therapeutics: A Focus on Nanoparticles as a Drug Delivery System. *Nanomedicine*. 2012, vol. 7, no. 8, p. 1253-1271.
- [12] MOHAMMED, M., Jaweria, S., WASAN, K. et al. An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 2017, vol. 9, no. 4, p. 2-26.

- [13] SHADE, P. J., YADAVA, S. K., PATIL, P. S. Development and Characterization of Chitosan Nanoparticles Containing Erthromycin Estolate. *Journal of Pharmaceutical Applications*. 2014, vol. 5, no. 1, p. 1-7.
- [14] KANG, S. W., CHOI, J. J., KIM, H. N. et al. EGF-Loaded Hyaluronic Acid Based Micro-particles as Effective Carriers in a Wound Model. *Particle and Particle Systems Characterization*. 2017, vol. 34, no. 5, p. 1-5.
- [15] KLIJN, J. G. M., BERNS, P. M. J. J., SCHMITZ, P. I. M. et al. The Clinical Significance of Epidermal Growth Factor Receptor (EGF-R) in Human Breast Cancer: A Review on 5232 Patients. *Endocrine Reviews*. 1992, vol. 13, no. 1, p. 3-17.
- [16] BARRIENTOS, S., STOJADINOVIC, O., GOLINKO, M. S. et al. PERSPECTIVE ARTICLE: Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*. 2008, vol. 16, no. 5, p. 585-601.
- [17] BODNAR, R. J. Epidermal Growth Factor and Epidermal Growth Factor Receptor: The Yin and Yang in the Treatment of Cutaneous Wounds and Cancer. *Advances in Wound Care*. 2013, vol. 2, no. 1, p. 24-29.
- [18] HERBST, R. S. Review of epidermal growth factor receptor biology. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 2004, vol. 59, no. 2, p. 21-26.
- [19] FRANKLIN, W. A., VEVE, R., HIRSCH, F. R. et al. Epidermal growth factor receptor family in lung cancer and premalignancy. *Seminars in Oncology*. 2002, vol. 29, no. 1, p. 3-14.
- [20] GERBIN, C. S. Activation of ERBB Receptors. *Nature Education*. 2010, vol. 3, no. 9, p. 35.
- [21] HUI, Q., JIN, Z., LI, X. et al. FGF Family: From Drug Development to Clinical Application. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, vol. 19, no. 7, p. 1-15.
- [22] BEENKEN, A., MOHAMMADI, M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2009, vol. 8, no. 3, p. 235-253.
- [23] RAJAM, M., PULAVENDRAN, S., ROSE, C. et al. Chitosan nanoparticles as a dual growth factor delivery system for tissue engineering applications. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011, vol. 410, no. 1-2, p. 145-152. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.02.065.
- [24] SHRIVATS, A. R., ALVAREZ, P., SCHUTTE, L. et al. Bone Regeneration. *Principles of Tissue Engineering*. 2014, p. 1201-1221.
- [25] RAICA, M., CIMPEAN, A. M. Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)/PDGF Receptors (PDGFR) Axis as Target for Antitumor and Antiangiogenic Therapy. *Pharmaceutics*. 2010, vol. 3, no. 3, p. 572-599.

- [26] CHENG, X., TSAO, C., SAUL, J. M. et al. Comparison of Two Nanoparticle Formulations for Localized Delivery of Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) from Aligned Collagen Fibers. *Pharmaceutical Nanotechnology*. 2013, vol. 1, no. 2, p. 105-114. DOI: 10.2174/2211738511301020006.
- [27] AROLE, V. M., MUNDE, S. V. Fabrication of nanomaterials by top-down and bottom-up approaches – An overview. *Journal of Advances in Applied Sciences and Technology*. 2014, vol. 1, no. 2, p. 89-93.
- [28] HORIKOSHI, S., SERPONE, N. Introduction to Nanoparticles. *Microwaves in Nanoparticle Synthesis: Fundamentals and Applications*. 2013, p. 1-24. DOI: 10.1002/9783527648122.ch1.
- [29] KUBELKOVÁ, K., FRYDRYCHOVÁ, S., PEJCHAL, J. Chitosan – prototype polymer nanoparticles with transport capacity. *Military Medical Science Letters*. 2018, vol. 87, no. 2, p. 82-91.
- [30] DIVYA, K., JISHA, M. S. Chitosan nanoparticles preparation and applications. *Environmental Chemistry Letters*. 2018, vol. 16, no. 1, p. 101-112.
- [31] Borges, O., TAVARES, J. SOUSA, A. et al. Evaluation of the immune response following a short oral accination schedule with hepatitis B antigen encapsulated into alginate-coated chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007, vol. 32, no. 4-5, p. 278-290.
- [32] GUPTA, S., JASSAL, P. S., ChAND, N. Chitosan Nanoparticles: Synthesis and Their Applications. *Journal of Basic and Applied Engineering Research*. 2016, vol. 3, no. 8, p. 686-689.
- [33] BIRÓ, E., NÉMETH, Á. SZ., SISAK CS. Et al. Preparation and functionalization of chitosan nanoparticles. PREPARATION AND FUNCTIONALIZATION OF CHITOSAN NANOPARTICLES. *Conference paper*. 2015, p. 1-5.
- [34] KAFSHGARI, M. H., KHORRAM, M., MANSOURI, M. et al. Preparation of alginate and chitosan nanoparticles using a new reverse micellar system. *Iranian Polymer Journal*. 2012, vol. 21, no. 2, p. 99-107.
- [35] GATE2BIOTECH. Technologie Nanospider společnosti ELMARCO [online]. 2007 [cit. 2018-10-09]. Dostupné z: <http://www.gate2biotech.cz/nanospider-technologie/>.
- [36] SODOMKA, L. Simple theoretical considerations to nanofiber spinning. *Nanocon*. 2009, p. 1-16
- [37] HOMAYONI, H., RAVANDI, S. A. H., VALIZADEH, M. Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization. *Carbohydrate Polymers*. 2009, vol. 77, no. 3, p. 656-661.

- [38] DUTTA, A. K., KAWAMOTO, N., SUGINO, G. et al. Simple preparation of chitosan nanofibers from dry chitosan powder by the Star Burst system. *Carbohydrate Polymers*. 2013, vol. 97, no. 2, p. 363-367.
- [39] MANAIA, E. B., ABUÇAFY, E. P., CHIARI-ANDRÉO, B. G. et al. Physicochemical characterization of drug nanocarriers. *International Journal of Nanomedicine*. 2017, vol. 12, p. 4991-5011.
- [40] ŠIRC, J., HOBZOVÁ, R., KOSTINA, N. et al. Morphological Characterization of Nanofibers: Methods and Application in Practice. *Journal of Nanomaterials*. 2012, p. 1-14.
- [41] KONWAR, R., AHMED, A. B. Nanoparticle: an overview of preparations, characterization and application. *International Research Journal of Pharmacy*. 2016, vol. 4, no. 4, p. 47-57.
- [42] MAHMOOD, S., MANDAL, U. K., CHATTERJEE, B. et al. Advanced characterizations of nanoparticles for drug delivery: investigating their properties through the techniques used in their evaluations. *Nanotechnology Reviews*. 2017, vol. 6, no. 4, p. 1-14.
- [43] SLOVÁKOVÁ, M., KRATOCHVILOVÁ, V., PALARČÍK, J. et al. Chitosan nanofibers and nanoparticles for immobilization of microbial collagenase. *Vlákna a textil*. Univerzita Pardubice. 2016, vol. 3, p.193-198.
- [44] KUNDURU K. R., BASU, A., DOMB, A. J. Biodegradable Polymers: Medical Applications. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*. 2016, p. 1-22.
- [45] MOHAMED, A., XING, M. Nanomaterials and nanotechnology for skin tissue engineering. *Journal of Burns and Trauma*. 2012, vol. 2, no. 1, p. 29-41. ISSN: 2160-2026/IJBT1201002.
- [46] MAITZ, M. F. Applications of synthetic polymers in clinical medicine. *Biosurface and biotechnology*. 2015, p. 161-176.
- [47] YADAV, P., YADAV, H., SHAH, V. G. et al. Biomedical Biopolymers, their Origin and Evolution in Biomedical Sciences: A Systematic Review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2015, vol. 9, no. 9, p. 21-25.
- [48] DUTTA, P. K., DUTTA, J. Multifaceted Development and Application of Biopolymers for Biology, Biomedicine and Nanotechnology. *Advances in Polymer Science*. 2013, p. 122-127. ISBN: 978-3-642-40122-0.
- [49] IKRAM, S., AHMED S. Natural polymers – Derivatives, Blends and Composites. *Polymes science and technology*. 2016, vol. 1, p. 120-180. ISBN: 978-1-63485-831-1.
- [50] GÓRECKA, E., JASTRZEBSKA, M. Immobilization Techniques And Biopolymer Carriers – A Review. *Biotechnology and Food Sciences*. 2011, vol. 75, no. 1-2, p. 1-17.

- [51] VLIERBERGH, S., GRAULUS, G. J., KESHARI, S. Porous hydrogel biomedical foam scaffolds for tissue repair. *In Woodhead Publishing Series in Biomaterials*. 2014, vol. 76, p. 335-390.
- [52] LEE, K. Y., MOONEY, D. J. Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in polymer Science*. 2012, vol. 37, no. 1, p. 106-126.
- [53] ZDARTA, J., MEYER, A. S., JESIONOWSKI, T. et al. Developments in support materials for immobilization of oxidoreductases: A comprehensive review. *Advances in colloid and interface science*. 2018, vol. 258, p. 1-20.
- [54] FUKUNISHI, T., SHINOKA, T. Nanofiber composites in vascular tissue engineering. *Nanifiber Composites for Biomedical Applications*, 2017, p. 455-481.
- [55] MOHITI-ASLI, M., LOBOA, E. G. Nanofibrous smart bandages for wound care. *Wound Healing Biomaterials*, 2016, vol. 2, p. 483-499.
- [56] KHAN, R., KHAN, M. H. Use of collagen as a biomaterial: An update. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2013, vol. 17, no. 4, p. 539-542.
- [57] MUTHUKUMAR, T., SREEKUMAR, G., SASTRY, T. P. et al. Collagen as potential biomaterial in biomedical applications. *Reviews on Advanced Materials Science*. 2018, vol. 53, p. 29-39..
- [58] KOGAN, G., ŠOLTÉS, L., STERN, R. et al. Hyaluronic acid: A natural biopolymer with a board range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*. 2007, vol. 29, no. 1, p. 17-25.
- [59] DATTA, S., CHRISTENA, L. R., RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *Biotech*. 2012, vol. 3, no. 1, p. 1-9.
- [60] MAHADEVAPPA, Y., KITTUR, A. A., KAMBLE, R. Polymer Synthesis and Processing. *Natural and synthetic Biomedical Polymers*. 2014, p. 1-31.
- [61] KUNDURU K. R., BASU, A., DOMB, A. J. Biodegradable Polymers: Medical Applications. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*. 2016, p. 1-22.
- [62] MIR, M., ALI, M. N., BARAKULLAH, A. et al. Synthetic polymeric biomaterials for wound healing: a review. *Progress in Biomaterials*. 2018, vol. 7, no. 1., p. 1-21.
- [63] ONAR, N. Usage Of Biopolymers In Medical Applications. *Conference paper*. 2004, p. 1-7.
- [64] MIR, M., FATIMA, S., ASAD A., et al. Synthetic polymeric biomaterials for wound healing: a review. *Progress in biomaterials*. 2018. p. 1-21.

- [65] KRISHMAMOORTHY, S., BANERJEE, A., ROYCHOUHDURY, A. Immobilized Enzyme Technology: Potentiality and Prospects. *Journal of Enzymology and Metabolism*. 2015, vol. 1., no. 1, p. 1-11.
- [66] AHMAD, A. H., REYHANEH, S., FABIO, V. et al. Enzyme immobilization: an update. *Journal of Chemical Biology*. 2013, vol. 6, no. 4, p. 185-205.
- [67] AHMAD, R., SARDAR, M. Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*. 2015, vol. 4, no. 2, p. 1-8
- [68] SIRISHA, V. L., ANKITA, J., AMITA, J. Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes. *Advances in food and nutrition research*. 2016, vol. 79, p. 179-211.
- [69] HASSA, M., TAMER, T. M., OMER, A. M. Methods of Enzyme Immobilization. *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research*. 2016, vol. 7, no. 6, p. 385-392.
- [70] JHA, N. Immobilization of Enzymes and Cells: Methods, Effects and Applications [online]. [cit. 2019-01-15]. Dostupné z: <http://www.biologydiscussion.com>. (<http://www.biologydiscussion.com/enzymes/immobilization/immobilization-of-enzymes-and-cells-methods-effects-and-applications/10208>).
- [71] CAO, L. Carrier-bound Immobilized Enzymes. *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim*. 2005, p. 169-551. ISBN: 3-527-31232-3.
- [72] RACEK, J. Klinická biochemie. *Praha: Galén*. 2006, s. 329. ISBN: 8072623249.
- [73] Klouda, P.; 2003. Moderní analytické metody. Pavel Klouda, s. 132. ISBN 808636907-2.
- [74] KÁŠ, J., KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O. Laboratorní techniky biochemie. Praha. 2006, s. 208. ISBN: 80-7080-586-2.
- [75] OKUTACU, B., DINCER, A., HABIB, O. et al. Comparison of five methods for determination of total plasma protein concentration. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2007, vol. 5, no. 70, p. 709-711.
- [76] DUMAS, B., BAYSE, D. D., CARTER, R. J. et al. A candidate reference method for determination of total protein in serum, I. Development and validation. *Clinical Chemistry*. 1981, vol. 10, no. 27, p. 1642-1650.
- [77] THERMO SCIENTIFIC. *Thermo Scientific Pierce Protein Assay Technical Handbook*. 2010, vol. 2, p. 15-21.
- [78] SMITH, P. K., KROHN, R.I., HERMANSON, G. T. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*. 1985. vol. 1, no. 150, p. 76-85.

- [79] LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. et al. Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1951, vol. 193, no. 1, p. 265-75.
- [80] BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976, vol. 72, no. 1-2, p. 248-254.
- [81] SONO, K., KANAMORI, K., SHIBA, A. et al. Automatic assay of urinary protein using Coomassie Brilliant Blue G-250. *Analytical Biochemistry*. 1981, vol. 1, 113, p. 197-201.
- [82] PERRETT, D., NAYUNI, N. K. Efficacy of current and novel cleaning technologies (Pro-Reveal) for assessing protein contamination on surgical instruments. *Woodhead publishing*. 2014, p. 598-619.
- [83] RATILIO, D., DELLA CORTE, A., D'IMPERIO, M. et al. Proteomics: Bases for protein complexity understanding. *Trombosis Research*. 2012, vol. 129, no. 3, p. 257-262.
- [84] HAMES, B. Gel electrophoresis of proteins: a practical approach, 3rd ed. *Oxford University Press*. 1998, p. 13-78. ISBN 0199636419.
- [85] FORNAGUERA, C., SOLANS, C. Methods for the In Vitro Characterization of Nanomedicines—Biological Component Interaction. *Journal of personalized medicine*. 2017, vol. 7, no. 2, p. 1-16.
- [86] FRIEDMAN, D. B., HOVING, S., WESTERMEIER, R. Isoelectric Focusing and Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Methods in Enzymology*. 2009, vol. 463, p. 515-540.
- [87] TOWBIN, H., STAEBELIN, T., GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979, vol. 76, no. 9, p. 4350-4354.
- [88] LABGUIDE. Western blot [Online]. 2014 [cit. 2018-11-15]. Dostupné z: <http://labguide.cz/metody/western-blot/>.
- [89] LABORATORYINFO. ELISA: Principle, Procedure, Types, Applications and Animation [online]. 2019 [cit. 2018-11-15]. Dostupné z: <https://laboratoryinfo.com/elisa/>.
- [90] HNASKO, R. ELISA. *Methods and protocols*. 2015, p. 51-78. ISBN: 9781493927418.
- [91] KODÍČEK, M. ELISA. *Elektronické výkladové slovníky - pilotní projekt BIOCHEMIE* [Online]. [cit. 2018-10-18]. Dostupné z: https://vydavatelstvi-old.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/elisa.html.
- [92] DE ANDRADE, D. F., ZUGLIANELLO, C., POHLMANN, A. R. et al. Assessing the *In Vitro* Drug Release from Lipid-Core Nanocapsules: a New Strategy Combining Dialysis Sac and a Continuous-Flow System. *AAPS PharmSciTech*. 2015, vol. 16, no. 6, p. 1409-1417.

- [93] KAMALY, N., YAMEEN, B., WU, J. et al. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. *Chemical Reviews*. 2016, vol. 116, no. 4, p. 2602-2663.
- [94] ZULEGER, S., LIPPOLD, B. C. Polymer particle erosion controlling drug release. I. Factor influencing drug release and characterization of the release mechanism. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001, vol. 217, no. 1-2, p. 139-152.
- [95] DI MARTINO, A., SEDLARIK, V. Amphiphilic chitosan-grafted-functionalized polylactic acid based nanoparticles as a delivery system for doxorubicin and temozolomide co-therapy. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014, vol. 474, no. 1-2, p. 134-145.
- [96] DEVA PRASAD, V. Nanoparticulate drug delivery systems, *in vitro* drug release test methods. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2017, vol. 8, no. 3, p. 103-119.
- [97] COSTA, P., SOUSA, L. M. J. Review: Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2000, vol. 13, no. 2, p. 123-133.
- [98] BISWAS, S., CHATTOPADHYAY, M., SEN, K. K. et al. Development and characterization of alginate coated low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for oral vaccine delivery in mice. *Carbohydrate Polymers*. 2015, vol. 121, p. 403-410.
- [99] BORGES, O., CORDEIRO-DA-SILVA, A., ROMEIJ, S. et al. Uptake studies in rat Peyer's patches, cytotoxicity and release studies of alginate coated chitosan nanoparticles for mucosal vaccination. *Journal of Controlled Release*. 2006, vol. 114, p. 348-358.
- [100] TANAKA, A., NAGATE, T., MATSUDA, H. Acceleration of Wound Healing by Gelatin Film Dressings with Epidermal Growth Factor. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2005, vol. 67, no. 9, p. 909-913.
- [101] LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970, vol. 227, p. 680-685.
- [102] OAKLEY, B. R., KIRSH, D. R., MORRIS, N. R. A simplified ultra sensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. 1980, vol. 105, no. 2, p. 361-363.
- [103] PROSPEC. EGF HUMAN. [Online] *Prospec-Tany Technogene Ltd.*[online]. 2016 [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: https://www.prospecbio.com/egf_human.