

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

**Příprava nosiče s imobilizovanou lakázou pro kontrolovanou oxidaci
hyaluronanu**

Bc. Aneta Vonšovská

Diplomová práce
2018

Vysoká škola: **Univerzita Pardubice**

Fakulta: **chemicko-technologická**

Katedra: **biologických a biochemických věd**

Školní rok: **2016/2017**

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

pro **Bc. Anetu Vonšovskou**

obor **Analýza biologických materiálů**

Název tématu: Příprava nosiče s imobilizovanou lakázou pro kontrolovanou oxidaci hyaluronanu

Anglický název tématu: Preparation of the carrier with immobilized Laccase for controlled oxidation of hyaluronan

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

Vypracovat teoretickou rešerši o možnostech selektivní modifikace hydroxylových skupin hyaluronanu s cílem zavést aktivní skupiny využívané k vazbě ligandů pro bioaplikace. Zpracovat informace o používaných činidlech a se zaměřením na kombinaci s enzymem lakázou. Struktura a vlastnosti enzymu lakázy, její zdroje.

Experimentální část:

Stanovení aktivity solubilní lakázy pomocí vybraných nízkomolekulárních substrátů.
Imobilizace lakázy na různé typy magnetické částic, ověření aktivity, skladovací a operační stability.
Oxidace hyaluronanu o různých velikostech pomocí vybraných oxidačních činidel a v kombinaci se solubilní a imobilizovanou lakázou.
Optimalizace podmínek, určení vhodné kombinace použitých oxidačních činidel.

Seznam odborné literatury: české a zahraniční odborné publikace o dané problematice, vědecké databáze Sciencedirect, WOS, MedLine atd.

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byl jsem seznámen 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.

V Pardubicích dne 11. 5. 2018

Bc. Aneta Vonšovská

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé diplomové práce RNDr. Lucii Korecké, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky, bez kterých by tato diplomová práce nevznikla. Dále patří poděkování doc. Ing. Martinu Adamovi, Ph.D. z Katedry analytické chemie za provedení FTIR analýz vzorků a pomoc s vyhodnocením získaných dat. A na závěr děkuji mé rodině a nejbližším za jejich trpělivost a nepřetržitou podporu po celou dobu mého studia.

ANOTACE

Cílem diplomové práce bylo připravit nosič s imobilizovanou lakázou, který byl následně použitý při selektivní oxidaci kyseliny hyaluronové, konkrétně hydroxylových skupin na aldehydové. Lakáza v systému jednak zajišťuje regeneraci použitého oxidačního činidla (např. TEMPO) a zároveň umožňuje eliminovat další látky (NaOCl, NaBr). Teoretická část se zabývá strukturou a vlastnostmi enzymu lakázy a stejně tak i kyseliny hyaluronové. Pozornost je věnována používaným oxidačním činidlům se zaměřením na kombinaci s enzymem lakázou. V rámci experimentální části práce byl enzym lakáza imobilizován na vybrané druhy magnetických částic a stanovena její aktivita po imobilizaci. Byly zavedeny metody cílené oxidace kyseliny hyaluronové s využitím vybraných oxidačních činidel. Výsledková část shrnuje dosažené výsledky, byly vytipovány magnetické částice vhodné pro imobilizaci lakázy a při oxidaci kyseliny hyaluronové byla hledána nejúčinnější metoda oxidace s cílem zavedení aldehydových skupin vhodných pro následné zesíťování molekuly kyseliny hyaluronové do nanočástic.

KLÍČOVÁ SLOVA

kyselina hyaluronová, lakáza, enzymová aktivita, TEMPO, magnetické částice, imobilizace, oxidace

TITLE

Preparation of the carrier with immobilized Laccase for controlled oxidation of hyaluronan

ANNOTATION

The aim of the thesis was to prepare carriers with immobilized laccase, which was subsequently used in selective oxidation of hyaluronic acid, namely hydroxyl groups on aldehyde. Laccase system but also ensures the regeneration of the oxidizing agent (e.g. TEMPO) and also allows to eliminate additional agents (NaOCl, NaBr). The theoretical part deals with the structure and properties of the enzyme laccase as well as hyaluronic acid. Attention is paid to the oxidants, which are used, with a focus on combination with the enzyme laccase. In the experimental part of the thesis the laccase enzyme was immobilized on

selected types of magnetic particles and its activity determined after immobilization. Methods of targeted oxidation of hyaluronic acid have been introduced using selected oxidizing agents. The result section summarizes the results obtained, magnetic particles suitable for the immobilization of the laccase were selected and the most efficient oxidation method was sought for the oxidation of hyaluronic acid to introduce aldehyde groups suitable for subsequent crosslinking of the hyaluronic acid molecule into the nanoparticles.

KEYWORDS

hyaluronic acid, laccase, enzymatic activity, TEMPO, magnetic particles, immobilization, oxidation

Obsah

0 Úvod.....	11
1 Teoretická část	12
1.1 Kyselina hyaluronová.....	12
1.1.1 Chemická struktura HA	12
1.1.2 Syntéza a biodegradace HA.....	13
1.1.3 Výskyt HA.....	14
1.1.4 Funkce a vlastnosti HA	15
1.1.5 Biopolymerní nanočástice	17
1.2 Mediátorový systém	19
1.3 Oxidační činidla	20
1.3.1 Chlornan sodný (NaOCl).....	20
1.3.2 Oxidační činidlo 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO)	21
1.3.3 Jodistan sodný (NaIO ₄).....	24
1.4 Lakáza	26
1.4.1 Lakáza a její struktura	26
1.4.2 Výskyt a vlastnosti lakáz	28
1.5 Substráty pro enzym lakázu	29
1.5.1 Substrát 2,2' - azinobis [3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina]-diamoniová sůl (ABTS).....	30
1.5.2 Substrát 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyd (syringaldazin)	31
2 Experimentální část.....	33
2.1 Elektroforetické metody	34
2.1.1 Polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS- PAGE)	34
2.1.2 Barvení roztokem amoniakálního stříbra	36
2.2 Metody - lakáza.....	37

2.2.1 Stanovení aktivity solubilní lakázy pomocí substrátu Syringaldazinu	37
2.2.2 Stanovení aktivity solubilní lakázy pomocí substrátu diamoniové soli 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny)	38
2.2.3 Imobilizace lakázy na magnetickou makroporézní perlovou celulózu s -OH funkčními skupinami	39
2.2.4 Stanovení aktivity lakázy imobilizované na magnetické makroporézní perlové celulóze pomocí substrátu Syringaldazinu	40
2.2.5 Stanovení aktivity lakázy imobilizované na magnetické makroporézní perlové celulóze pomocí substrátu diamoniové soli 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny)	40
2.2.6 Imobilizace lakázy na magnetické částice s –COOH nebo –NH ₂ skupinou.....	41
2.2.7 Stanovení aktivity lakázy imobilizované na magnetických částicích s –COOH nebo –NH ₂ skupinou pomocí substrátu syringaldazinu.....	42
2.2.8 Stanovení aktivity imobilizované lakázy na magnetických částicích s –COOH nebo –NH ₂ skupinou pomocí diamoniové soli 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny)	43
2.2.9 Imobilizace lakázy na magnetickou makroporézní perlovou celulózu s hydrazidovými funkčními skupinami	43
2.2.10 Stanovení aktivity lakázy imobilizované na magnetické hydrazidové perlové celulóze pomocí substrátu Syringaldazinu	44
2.2.11 Stanovení aktivity lakázy imobilizované na magnetické hydrazidové perlové celulóze pomocí substrátu diamoniové soli 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny)	45
2.3 Metody – oxidace kyseliny hyaluronové	46
2.3.1 Oxidace kyseliny hyaluronové pomocí 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxylu s přídavkem chlornanu sodného, bromidu sodného a diaminobenzidinu.....	46
2.3.2 Oxidace kyseliny hyaluronové pomocí 0,1 M TEMPO za přítomnosti imobilizované a solubilní lakázy, diaminobenzidinu, chlornanu sodného a bromidu sodného.....	47

2.3.3 Oxidace kyseliny hyaluronové pomocí 0,03 M TEMPO za přítomnosti imobilizované lakázy s přídavkem diaminobenzidinu	49
2.3.4 Oxidace kyseliny hyaluronové pomocí jodistanu sodného	50
2.4 Analýza vzorků oxidované kyseliny hyaluronové infračervenou spektrometrií s Fourierovou transformací (FT-IR).....	51
3 Výsledky a diskuse	52
3.1 Ověření čistoty solubilní lakázy pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE).....	54
3.2 Stanovení aktivity solubilní lakázy	55
3.2.1 Stanovení aktivity solubilní lakázy pomocí substrátu Syringaldazinu.....	55
3.2.2 Stanovení aktivity solubilní lakázy pomocí substrátu diamoniové soli 2,2'- azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny)	56
3.3 Imobilizace lakázy na vybrané magnetické částice a stanovení její aktivity	58
3.3.1 Stanovení aktivity imobilizované lakázy na MPC a HMPC	59
3.3.2 Stanovení aktivity imobilizované lakázy na částicích s funkčními skupinami – COOH nebo –NH ₂	61
3.4 Operační aktivita a skladovací stabilita.....	63
3.5 Oxidace kyseliny hyaluronové.....	66
4 Závěr	77
5 Seznam použité literatury	78

Seznam zkratek a značek

HA	kyselina hyaluronová (z angl. hyaluronic acid)
TEMPO	2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl
NaIO ₄	jodistan sodný
NaBr	bromid sodný
NaCl	chlorid sodný
NaOCl	chlornan sodný
DAB	diaminobenzidin
ABTS	diamoniová sůl 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny)
SGZ	4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyd azin (syringaldazin)
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
S-NHS	Sulfo-NHS (N-hydroxysulfosuccinimide)
MPC	magnetická makroporézní perlová celulóza
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného
PGMA-40% EDMA	glycidyl methacrylate-40% ethylenedimethacrylate
HEMA-40% EDMA	hydroxyethyl methacrylate-40% ethylenedimethacrylate
GAG	glykosaminoglykan
PVP	polyvinylpyrrolid

0 Úvod

Kyselina hyaluronová (HA) je díky svým kyselým a hydroxylovým skupinám ve své molekule ideálním kandidátem na chemickou modifikaci, má široké uplatnění nejen v oblasti biomedicínských aplikací. Z tohoto pohledu je významná i její biokompatibilita a biodegradabilita, kdy je využitelná v oblasti cílené distribuce léčiv nebo jako nosič různých bioaktivních látek.

Modifikací, která následně umožňuje zesíťování do 3D struktur, je oxidace právě hydroxylových nebo karboxylových skupin kyseliny hyaluronové. Pro oxidaci jsou využívána různá činidla, např. 1.3.2 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxylem (TEMPO), jeho kombinace s NaOCl a NaBr pro oxidaci hydroxylových skupin, nebo NaIO₄ pro oxidaci karboxylových skupin molekuly. V kombinaci s TEMPO existují v literatuře studie, které využívají enzym lakázu, která dokáže TEMPO regenerovat a udržet ho tak v reaktivní formě.

Cílem této diplomové práce proto bylo otestovat možnosti oxidace molekuly kyseliny hyaluronové s využitím enzymu lakázy, se kterým již bylo v laboratoři imunochemie pracováno v rámci jiného výzkumu. Při oxidaci kyseliny hyaluronové je lakáza přidávána do reakční směsi v solubilní formě. S ohledem na řadu výhod, které přináší použití imobilizovaných enzymů jsme se v práci zaměřili na přípravu nosiče s imobilizovanou lakázou a použít ho pro cílenou oxidaci kyseliny hyaluronové. Jedním z cílů bylo i využití oxidované kyseliny hyaluronové, v součinnosti s jinou diplomovou prací realizovanou na stejném pracovišti, pro přípravu nanočástic určených jako potenciální radioprotektivum plic po ozařování. Tento krok se však s ohledem na dosažené výsledky nepodařilo zrealizovat.

1 Teoretická část

1.1 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová (HA) patří mezi polysacharidy vyskytující se přirozeně ve všech živých organismech. Za fyziologických podmínek se HA vyskytuje jako sodná sůl (označovaná jako hyaluronan). To znamená, že se může vyskytovat jak v kyselé formě jako kyselina hyaluronová nebo ve formě zásadité jako soli, které převažují ve tkáních [15, 17, 18, 19]. Při hodnotách pH vyšších, než je její pKa (pKa = 2,9) má charakter aniontového polysacharidu [1, 3].

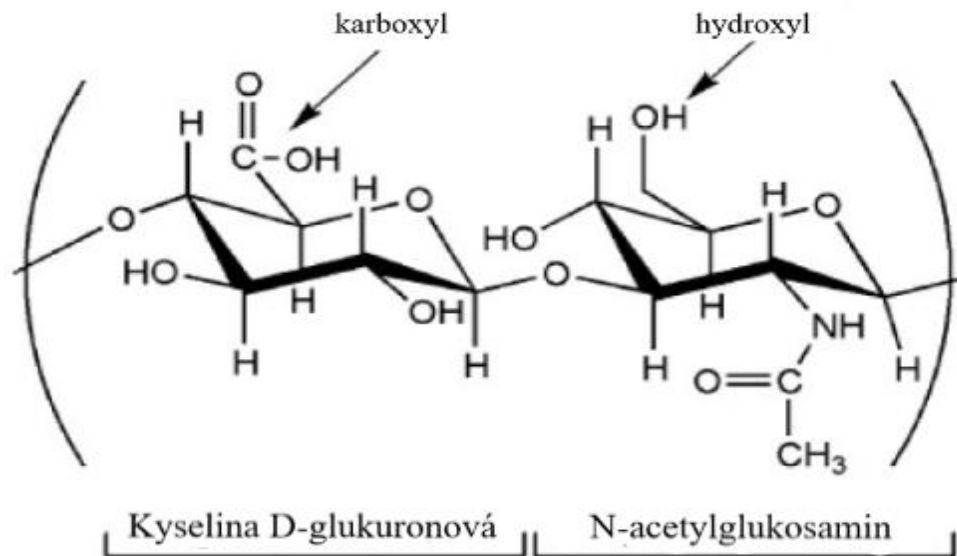
Kyselina hyaluronová byla poprvé izolovaná v roce 1934 jako neznámá chemická látka z očního sklivce hovězího dobytka. Karl Meyer a John Palmer, kteří působili na Kolumbijské univerzitě v New Yorku, tuto neznámou látku pojmenovali právě jako kyselinu hyaluronovou. Poprvé byla HA komerčně používána v roce 1942 jako náhražka vaječného bílku v pekařství. V 50. letech pak došlo k první lékařské aplikaci hyaluronanu, kdy byl použit jako sklovitá náhrada během oční chirurgie [24].

HA může být extrahována z hovězího sklivce a z dalších živočišných tkání, např. kohoutího hřebínku nebo lidské pupečnickové šňůry. V současnosti se však HA většinou získává fermentací *Str. zooepidemicus* [1, 3].

1.1.1 Chemická struktura HA

Ze strukturního hlediska je kyselina hyaluronová negativně nabitý lineární glykosaminoglykan, který je tvořen opakujícími se disacharidovými jednotkami, složenými z $\beta(1,3)$ -D-glukuronové kyseliny a $\beta(1,4)$ -N-acetyl-D-glukosaminu v poměru 1:1 (viz obrázek 1). Hodnoty molární hmotnosti řetězců jsou vysoké, pohybují se v rozmezí 0,2 – 10 MDa. Nejčastější rozsah molární hmotnosti je 2 – 5 MDa [20]. Jednotlivé monomery mají ve své struktuře nepolární vodíkové atomy a polárnější postranní řetězce. Zatímco vodíkové atomy jsou umístěny ve stericky méně příznivé axiální poloze, polární řetězce jsou tvořeny skupinami, jakou jsou např. hydroxylové nebo karboxylové. Tyto polární řetězce jsou ve stericky výhodnější ekvatoriální pozici. Toto uspořádání přispívá k energetické stabilitě HA, která ovlivňuje její chování ve vodných roztocích [21]. Odlišností HA od ostatních glykosaminoglykanů je to, že se neváže na proteinové jádro a neobsahuje sulfátovou skupinu

[22]. Difrakcí rentgenovým zářením bylo potvrzeno, že soli HA mohou tvořit levotočivou jednovláknovou šroubovici se třemi disacharidovými jednotkami na jednu otáčku [23].



Obrázek 1: Struktura kyseliny hyaluronové. Převzato a upraveno z [96].

1.1.2 Syntéza a biodegradace HA

HA je produkována jak prokaryotickými, tak eukaryotickými buňkami. Většina glykosaminoglykanů je tvořena v Golgiho aparátu. Kyselina hyaluronová je přirozeně syntetizována enzymaticky pomocí skupiny integrálních membránových proteinů, tzv. hyaluronan syntáz HAS (z angl. hyaluronic acid synthase). Jsou to membránové enzymy, které syntetizují HA na vnitřním povrchu plazmatické membrány. Pomocí struktur podobných pórům je poté syntetizovaná HA vytlačována do extracelulárního prostředí. U obratlovců se vyskytují 3 typy HAS: HAS1, HAS2 a HAS3. V závislosti na tom, kterým membránovým proteinem je HA tvořena, se během syntézy určuje její konkrétní velikost. Uvádí se, že HAS1 a HAS2 syntetizují HA o vysoké molekulové hmotnosti (>500 kDa), zatímco HAS3 je spojen se syntézou HA o nižší molekulové hmotnosti (<300 kDa) [46, 47]

Asi třetina z celkového množství HA v lidském těle je každý den degradována a znovu syntetizována. Poločas rozpadu kyseliny hyaluronové v krvi je 3 - 5 minut, v kůži méně než jeden den a v chrupavce 1 až 3 týdny. Hyaluronan je v těle rozkládán převážně enzymatickou cestou, kde se uplatňují *hyaluronoglukosaminidázy*, známější pod názvem *hyaluronidázy*. HA

je degradována hydrolýzou β -1,4-glykosidické vazby na fragmenty různých velikostí v závislosti na typu *hyaluronidázy* [47, 48].

1.1.3 Výskyt HA

Kyselina hyaluronová je široce zastoupena v různých tkáních lidského těla (viz tabulka 1). Především v extracelulární matrix, pokožce, kloubní chrupavce, synoviální tekutině, očním sklivci nebo jak již bylo zmíněno, v buněčné stěně některých bakterií (např. *Str. zooepidemicus*) [12, 13, 14, 16].

Tabulka 1: Výskyt HA a její koncentrace v různých tkáních. Převzato z [45].

Tkáň nebo tělesná tekutina	Koncentrace (mg/ml)	Poznámky
Kohoutí hřebínek	7500	Živočišná tkáň s největším obsahem HA.
Lidská pupeční šňůra	4100	Tkáň s relativně vysokou molekulární hmotností HA.
Synoviální tekutina	1400 – 3600	Objem synoviální tekutiny se zvyšuje při zánětlivých stavech. To vede k poklesu koncentrace HA.
Oční sklivec	140 – 340	Koncentrace HA se zvyšuje při zranění tkáně.
Pokožka (epidermis)	100	Koncentrace HA je vyšší kolem buněk, které syntetizují HA.
Hrudní míza	0,2 – 50	-
Moč	0,1 - 0,3	Moč je významným zdrojem enzymu hyaluronidáza.
Sérum	0,01 - 0,1	HA je ve vyšší koncentraci v séru starších lidí, stejně jako u pacientů s artritidou a cirhózou jater.

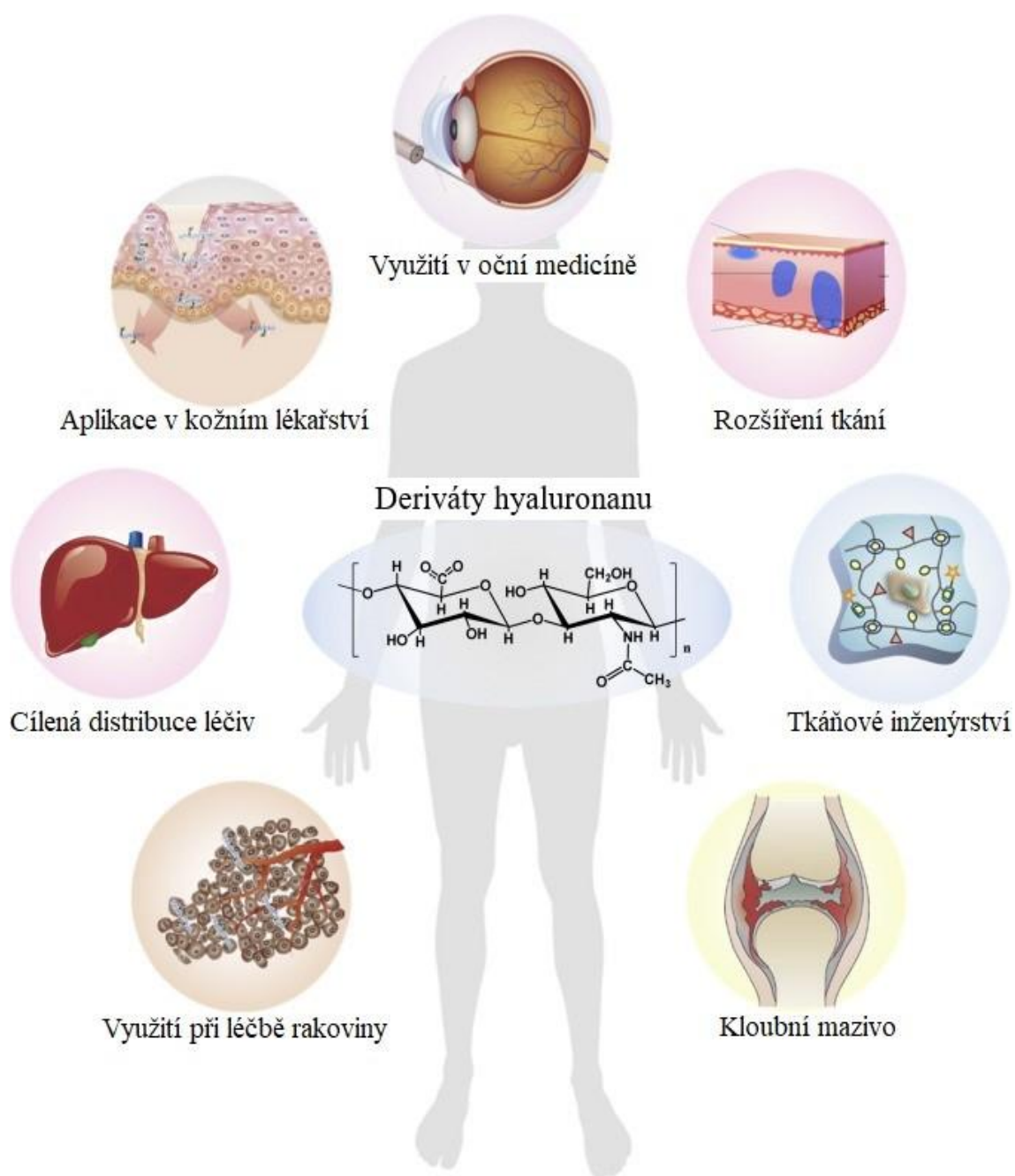
1.1.4 Funkce a vlastnosti HA

Biologická funkce kyseliny hyaluronové závisí na její molekulové hmotnosti. HA o vysoké molekulové hmotnosti organizuje extracelulární matrix, zatímco HA o nízké molekulové hmotnosti najdeme v poraněných tkáních nebo nádorech. Ve farmaceutickém průmyslu se uplatňuje HA s vysokou molekulovou hmotností, stejně tak i v plastické chirurgii nebo léčbě popálenin či artritid, kdy je injekčně aplikována přímo do kolenního kloubu [1, 2, 3]. Oproti tomu HA s nízkou až střední molekulovou hmotností se uplatňuje v prozánětlivých mechanismech. Stimuluje makrofágy k produkci zánětlivých chemokinů, indukuje interferony a cytokiny IL-12 [44] (viz obrázek 2).

Kyselina hyaluronová je součástí synoviální tekutiny a díky svým viskózním a elastickým vlastnostem působí v kloubech jako lubrikant, který tlumí tlakové nárazy a snižuje nadměrné tření [45].

Mezi další výjimečné funkce kyseliny hyaluronové patří její protizánětlivé vlastnosti, kdy napomáhá při regeneraci poškozené tkáně. Urychluje hojení zánětů a ran nejen na kůži, ale i na epitelu sliznic (např. děložního čípku, dutiny ústní) [15]. Pro své hydratační účinky, kdy je schopná vázat vodu, nachází uplatnění při artroskopických a endoskopických operacích, při terapii močové inkontinence, osteoporóze a přidává se i do očních nebo nosních kapek. Pro její schopnost obnovovat pružnost pokožky a redukovat vrásky je často přidávána do kosmetických výrobků [19]. Dále má HA schopnost vyměňovat ionty prostřednictvím negativního náboje proteoglykanu (jednomocné proti dvojmocným kationtům). Moduluje zánět indukci cytokinů a chemokinů, zháší volné radikály, ovlivňuje proliferaci a diferenciaci buněk [17, 18].

Kapoor a kolektiv (2011) popisují hyaluronan jako nejhojněji zastoupený vysokomolekulární glykosaminoglykan (GAG) v extracelulární matrix měkkých periodontálních tkání. Jejich studie ukazují, že HA vykazuje protizánětlivé a antibakteriální účinky při léčbě zánětu dásní a parodontitidy. Lokálně se používá např. jako 0,2% roztok pro léčbu aftů v dutině ústní. Komerčně se jedná o přípravky s hyaluronátem sodným v kombinaci s polyvinylpyrrolidonem (PVP) a glycyrrhetinovou kyselinou. Každá ze složek má svoje specifické vlastnosti. PVP je hydrofilní polymer zlepšující tkáňovou hydrataci. Kyselina glycyrrhetinová má protizánětlivé vlastnosti, které pomáhají při hojení vředů [25].



Obrázek 2: Souhrn biomedicínských aplikací kyseliny hyaluronové nebo jejích derivátů. Převzato a upraveno z [91].

1.1.5 Biopolymerní nanočástice

Kyselina hyaluronová má řadu vlastností, které lze využít v oblasti biomedicínských aplikací. Konkrétně, HA je biokompatibilní, biologicky odbouratelný, netoxický a neimunogenní polymer s vysokou afinitou k vodě. Kromě toho přítomnost několika kyselých a hydroxylových skupin v molekule HA je ideálním kandidátem na chemickou modifikaci [83].

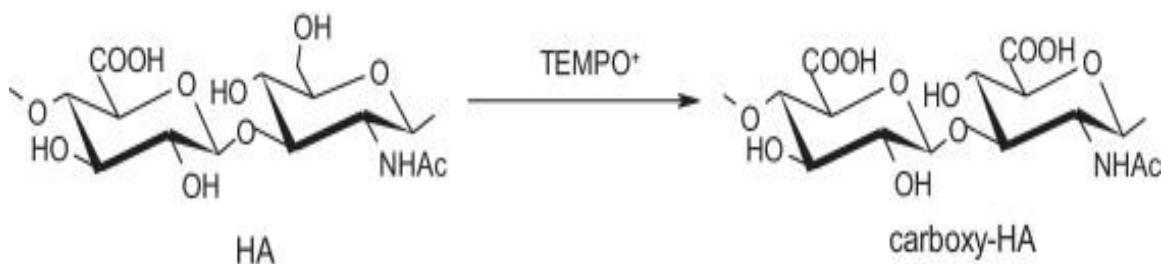
První navržené biopolymerní nanočástice (NPs, z angl. nanoparticles) byly tvořeny albuminem a biologicky nerozložitelnými syntetickými polymery, jako je polyakrylamid nebo polymethylakrylát. Riziko toxického zatížení organismu vyvolané nedegradovatelnými polymery je sníženo navržením nanočástic z biokompatibilních, biologicky rozložitelných a neimunogenních polymerů [69, 70]. Proto jsou používány přírodní polymery, jako jsou proteiny, polypeptidy a polysacharidy s přesně definovanou strukturou, která je klíčová pro jejich funkci *in vivo* [71, 72]. Mezi nejčastěji používané biopolymery hned vedle celulózy, chitosanu, albuminu, kolagenu, škrobu či alginátu patří právě i kyselina hyaluronová [70].

Stabilní HA nanočástice lze získat kovalentním zesílením karboxylových skupin nacházejících se na lineárním řetězci kyseliny hyaluronové pomocí diaminu (např. 2,2'-(ethyldioxy)bis(ethylamin)) v přítomnosti ve vodě rozpustného karbodiimidu ve vodním prostředí, jak bylo popsáno v článku Magdolna Bodnára, který byl publikován v roce 2009 [73, 74].

Karbodiimidy jsou tzv. síťující činidla, která vytváří amidové vazby mezi karboxylovou a aminoskupinou nebo fosforamidové vazby mezi fosfátem a aminy. Jedná se nejznámější typ síťujících činidel, které účinně tvoří konjugáty mezi dvěma molekulami bílkovin, mezi peptidy a proteiny, mezi oligonukleotidy a proteiny a dalšími molekulami. Rozlišují se dva typy karbodiimidů, ve vodě rozpustné a ve vodě nerozpustné. Při reakci karbodiimidu s karboxylovou kyselinou dochází ke vzniku vysoce reaktivního meziprojektu, derivátu karbodiimidu O-acylisourey, který má velmi krátkou životnost. Tento derivát poté reaguje s nukleofilní skupinou, jako je amino skupina, za vzniku amidové vazby a za současného uvolnění substituované močoviny. Výsledkem této reakce je chemické zesílení sousedních HA řetězců a tvorba nanočástic [75, 76].

Derivatizací karboxylových, hydroxylových nebo acetamidových skupin je možné ovlivnit fyzikálně chemické a biologické vlastnosti HA a vyvinout tak nové produkty pro biomedicínu a kosmetiku. Například oxidace C6 primárních hydroxylových skupin N-

acetyl-d-glukosaminové jednotky HA poskytuje kyselinu polyuronovou, tj. karboxy-HA (nebo perkarboxylovanou HA) (viz obrázek 3). Karboxy-HA se výrazně liší ve vlastnostech od přirozené kyseliny hyaluronové, protože má lepší rozpustnost ve vodě a neobvykle vysokou stabilitu vůči působení hyaluronidázy, což je důležité např. pro vývoj léků s prodlouženým účinkem [82].



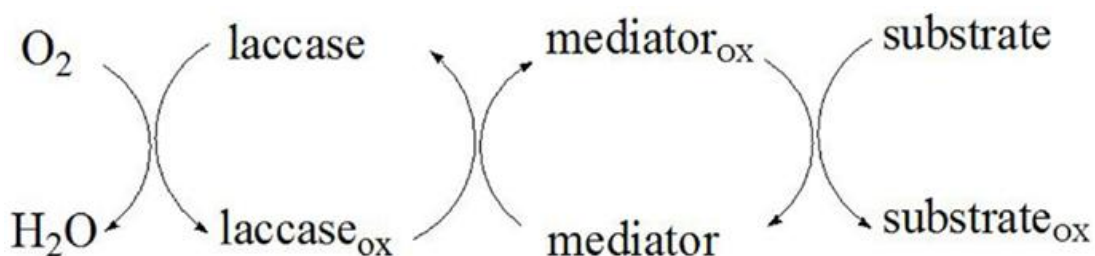
Obrázek 3: Oxidace HA prostřednictvím TEMPO. Převzato z [77].

Systém 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO)-NaBr-NaOCl může oxidovat složku C6 primárních hydroxylových skupin ve vodě rozpustných polysacharidů. Bromid sodný a chlornan sodný hrají roli katalyzátorů a regeneračních činidel TEMPO *in situ*. Řízená oxidace alkoholů za účelem získání aldehydů, ketonů nebo derivátů karboxylových kyselin patří mezi náročnější transformace v organické chemii. Velké množství použitých oxidačních činidel byly peroxidy, oxidy chrómu nebo činidla na bázi síry. Nicméně současné obavy týkající se životního prostředí jsou důvodem ke snahám o nahrazení toxických činidel a hledání nových přístupů schopných pracovat za příznivějších podmínek [81]. Halogenidy obsažené v systému TEMPO-NaBr-NaOCl mohou znečistit životní prostředí. Místo NaOCl a NaBr by alternativou regenerace TEMPO bylo použití oxidačních enzymů, jako jsou peroxidázy a lakázy. Konkrétně, lakázy byly označeny jako ekologicky šetrné oxidanty, protože katalyzují oxidaci TEMPO a jiných mediátorů redukcí kyslíku produkující pouze vodu [78, 80]. Lakáza, která má redox potenciál v rozmezí 0,7-0,9 V, snadno stabilizuje oxylové radikálové formy TEMPO do oxoamoniového iontu (E 0,2 V). Tento ion je skutečný oxidant, zatímco lakáza regeneruje TEMPO z vytvořeného hydroxylaminu. K opětovnému vytvoření oxoamoniového iontu by došlo buď kyselou disproportionací TEMPO nebo další oxidací lakázou [79].

1.2 Mediátorový systém

Mediátor je malá chemická sloučenina, která je oxidována enzymem lakázou a následně redukována substrátem. Vzhledem k tomu, že substrát kvůli své velikosti nemůže vstoupit do aktivního místa lakázy, působí mediátor jako nosič elektronů mezi enzymem a substrátem [40]. V počátečním reakčním kroku se mediátor oxiduje na stabilní meziproducty s vysokým redoxním potenciálem. Po kinetické reakci, která je řízená difuzí, je oxidovaný mediátor přiblížen k aktivnímu místu enzymu a tím je dosaženo cílového substrátu. Výsledkem je, že je substrát oxidován meziproducty, které nemohou být přímo oxidovány lakázou, zatímco oxidovaný mediátor je redukován na počáteční formu [41]. Celý mechanismus oxidace substrátu lakázou je znázorněn na obrázku 4.

Ideální mediátor by měl být netoxický, účinný, se stabilními oxidovanými a redukovanými formami, které nebrání enzymatické reakci. Mediátor by navíc měl být schopen průběžně udržovat cyklickou redoxní konverzi [42].



Obrázek 4: Mechanismus oxidace substrátu. Převzato z [92].

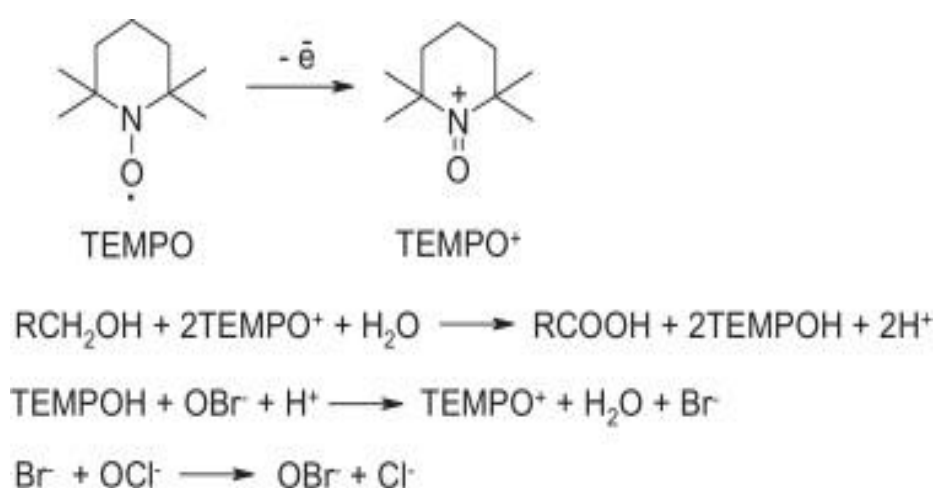
1.3 Oxidační činidla

Oxidačních činidel, která se používají v kombinaci s enzymem lakázou, je několik. Přičemž se k nim řadí především 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO), jodistan sodný (NaIO_4), chlornan sodný (NaOCl) a další. Dále budou tato oxidační činidla podrobně popsána.

1.3.1 Chlornan sodný (NaOCl)

Chlornan sodný představuje levné a zároveň silné oxidační činidlo, které se používá v běžných aplikacích jako dezinfekční a bělicí činidlo. Z chemického hlediska je chlornan sodný jako pevná látka nestabilní. Komerčně jsou však dostupné až 40% roztoky, v nichž jsou obvykle obsaženy i vedlejší produkty výroby jako jsou hydroxid sodný a chlorid sodný. V případě okyselení nebo zahřívání dané reakce se z roztoku chlornanu sodného do vzduchu uvolňuje chlór. Jestliže je chlornan použit jako oxidační činidlo spolu s amoniakem nebo látkami, které mohou vytvářet amoniak, může dojít ke vzniku chloraminů, které jsou toxické a mají výbušný charakter [63].

Oxidační systém pro C6-oxidaci HA obvykle obsahuje chlornan sodný jako stechiometrický oxidant, nitroxylradikál 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO) jako katalyzátor a bromid sodný jako kokatalyzátor (viz obrázek 5). Vyšší konverze primárních alkoholových skupin HA na karboxylové skupiny (80-100%) se dosáhne oxidací v alalkalickém médiu (pH 10) při teplotě 0 °C a v reakčním čase 70-80 minut [77].



Obrázek 5: Mechanismus C6-oxidace HA Převzato z [77].

1.3.2 Oxidační činidlo 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO)

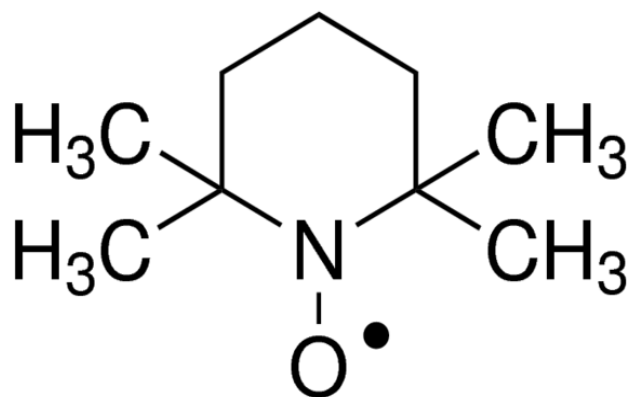
Volné radikály jsou částice, které mají jeden nepárový elektron a vysokou reaktivitu, což má za následek velmi krátkou dobu jejich života. Známý jsou však také radikály, které lze izolovat, skladovat a pracovat s nimi jako s čistými látkami. Takové radikály jsou označovány jako stabilní radikály [53]. Velkou skupinou v této části organické chemie jsou takzvané nitroxidy, což jsou organické látky obsahující N-O radikál. Typickým představitelem této skupiny je právě TEMPO [54].

TEMPO (2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl) je stabilní tetraalkylnitroxylový radikál patřící do skupiny oxidačních katalyzátorů (mediátorů). Je jedním z nejúčinnějších mediátorů při lakázové katalýze. Předmětem studie [27] bylo jeho četné využití v organické syntéze, včetně oxidace alkoholů, sulfidů a organokovových sloučenin. Reakce, kterých se účastní TEMPO, lze obecně provádět v organickém rozpouštědle nebo dvoufázových reakčních systémech. Tyto systémy poskytují aldehydy nebo ketony. Dále mohou reakce probíhat ve vodě, kde jsou rozpustné hydroxylované substráty, jako jsou cukry, oxidovány na glukuronáty [27].

Procesy využívající kyslík a 5% činidlo TEMPO umožňují docílit ekologicky neškodných reakcí jako alternativy oproti jiným oxidacím, při kterých byla doposud užívána chromová činidla [62].

TEMPO je heterocyklická sloučenina červenooranžové barvy [50]. Vzhledem k jeho vlastnostem, jak již bylo uvedeno výše, ho považujeme za jeden z nejoblíbenějších nitroxylových radikálů. Byl objeven Lebedevem a Kazarnovskim, kteří jej v roce 1960 poprvé syntetizovali [56].

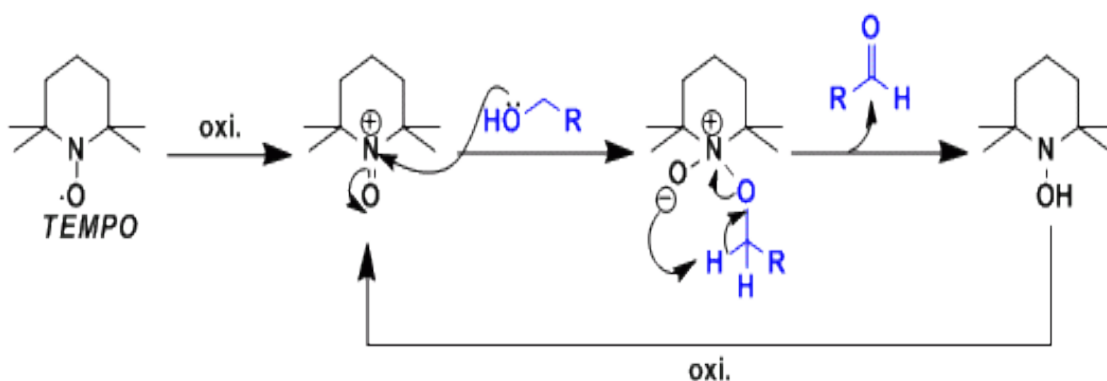
Poměrně dobrou stabilitu TEMPO zaručuje patrně rezonance nevázaných elektronů na atomu dusíku. Druhým důvodem je i sterická ochrana poskytovaná čtyřmi methylovými skupinami, jež sousedí s aminoskupinou (viz obrázek 6). Uvedené čtyři methylové skupiny se považují za inertní substituenty, zatímco jakékoli CH centrum, sousedící s aminoskupinou, by bylo touto aminoskupinou ovlivněno [68].



Obrázek 6: Struktura TEMPO. Převzato z [97].

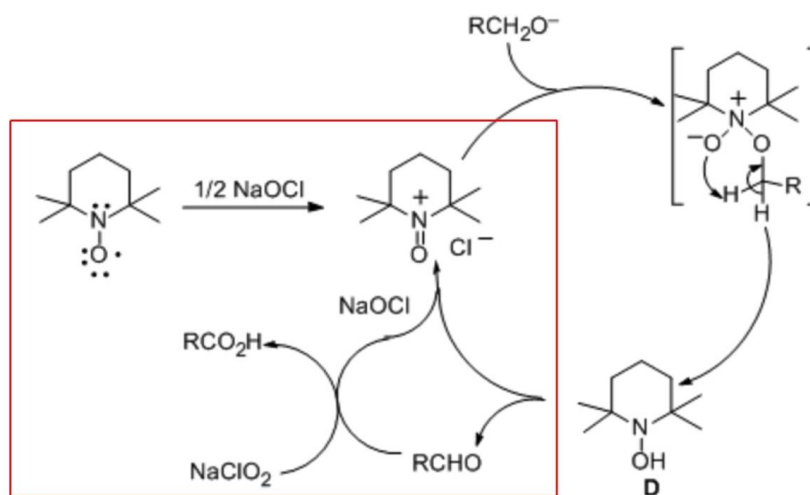
TEMPO se vyrábí oxidací z odpovídajícího tetramethylpiperidinu nebo tetramethylpiperidinhydroxidu. Je však možné jej získat také z několika komerčních produktů. Z nejdůležitějších aplikací činidla TEMPO je jeho použití při oxidaci několika organických substrátů, jako jsou např. aminy, fenoly, aniliny, zejména pak primární a sekundární alkoholy [50].

Mechanismus reakce TEMPO je uveden na obrázku 7. Ten lze popsat následujícím způsobem: vlivem sekundárního oxidantu je TEMPO nebo příbuzná stabilizační látka transformována do oxoamoniové soli, která je zde v roli primárního oxidačního činidla. Na základě tohoto působení dojde k přeměně alkoholu na příslušný aldehyd. Díky tomu se vyprodukuje hydroxylamin, jenž je dále oxidován na radikál TEMPO, a tím je dokončen celý katalytický cyklus [64].



Obrázek 7: Reakční mechanismus TEMPO. Převzato z [98].

V molekule TEMPO je mezi atomy dusíku a kyslíku nepárový elektron. Během oxidace polysacharidů je NO^+ odvozený od TEMPO ve slabě alkalickém prostředí redukován na hydroxylamin. Nitrosoniový iont reaguje s hydroxylaminem, kdy dochází k regeneraci TEMPO a sám NO^+ se ve směsi kontinuálně regeneruje primárním oxidačním činidlem, což je v tomto případě chlornan sodný (viz obrázek 8). Díky tomuto mechanismu probíhá primární alkoholová oxidace s vysokou selektivitou a výsledným produktem je aldehyd [29].



Obrázek 8: Mechanismus reakce zprostředkovaný TEMPO/NaOCl. Převzato z [99].

TEMPO se také používá jako činidlo pro oxidaci primárních alkoholů na kyseliny. Lze však také použít jiné typy TEMPO (deriváty, jako např. 4-methoxy-TEMPO, 4-hydroxy-TEMPO nebo 4-acetamido-TEMPO), které jsou stejně účinné [49, 60, 66]. Aby oxidace byla dostatečně efektivní, postačí 1% činidlo, ačkoliv se doporučuje, vzhledem k nízké ceně a díky tomu, že je snadná jeho eliminace během zpracování, aby byla použita alespoň 4-10% koncentrace [59]. TEMPO se často používá jako katalyzátor v kombinaci s dalším činidlem, jako je např. chlornan sodný [50].

Klíčovým faktorem, který ovlivňuje redox potenciál TEMPO a jeho analogů, je charakter funkčních skupin navázaných na cyklu. Ukázalo se, že nejvyšší vliv má nahrazení substituentů nacházejících se v bezprostřední blízkosti nitroxylové skupiny, tj. v polohách C-2 a C-6 [55, 57, 61].

Tento fakt je možné využít při navrhování substitucí TEMPO derivátů, používaných v biologických systémech, kde jsou redukovány různými redukovadly, jako např. askorbátovým aniontem, a proto je jejich využití „*in vivo*“ omezené. Výměna metylových

skupin v TEMPO derivátech za ethylové či cyklohexylové vedla k významnému snížení schopnosti redukce při „*in vitro*“ pokusech [55, 61].

Reakce s různými organokovovými sloučeninami RM (M = Li, Mg, Zn, Cu, Sm, Ti, Zr) jsou podmíněny přítomností dvou ekvivalentů TEMPO, které v prvním kroku atakuje atom kovu, přičemž vzniká uhlíkatý radikál R· a ten následně reaguje s druhou molekulou TEMPO [65]. Pokud necháme působit stechiometrické množství TEMPO jako oxidovadla s arylovými, alkenylovými nebo alkynylovými Grignardovými činidly (obecný vzorec R-Mg-X), nastane tzv. „Homo-coupling.“ Jde o pojmenování reakcí, kdy ze dvou identických molekul dostaneme jednu novou, z nich složenou [57].

1.3.3 Jodistan sodný (NaIO₄)

Jedná se o anorganickou sloučeninu, sodnou sůl kyseliny jodisté. Podobně jako jiné jodistany existuje ve dvou formách., přičemž NaIO₄ je jodistanem monosodným. K výrobě jodistanu sodného se využívá dihydrogenjodistan trisodný (Na₃H₂IO₆). Vyrobit jej lze však také oxidační reakcí jodičnanů za pomoci chlóru a hydroxidu sodného [67].

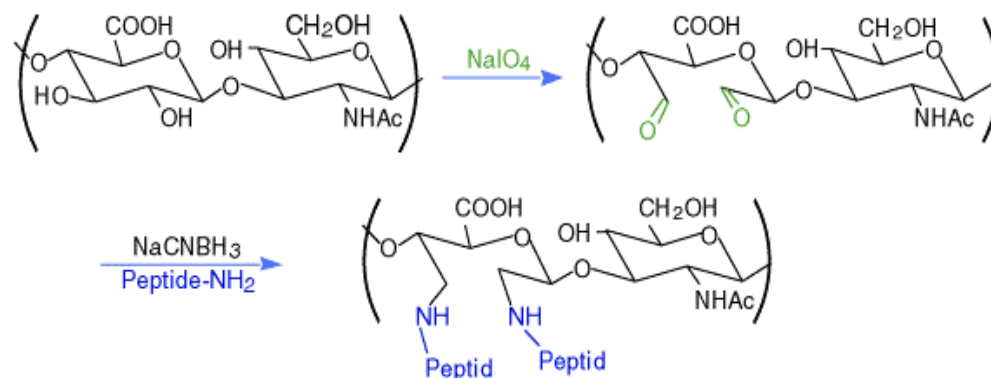
NaIO₄ je využíván v řadě aplikací, např. za účelem otevření sacharidových kruhů mezi vicinálními dioly, což vede k odštěpení dvou aldehydových skupin. Jedná se vlastně o reakci, která se aplikuje pro účel značkování sacharidů prostřednictvím fluorescenčních molekul, příp. jiných látek, např. biotinu [58].

Jodistan sodný může být použit pro oxidaci hydroxylových skupin na sousedních atomech uhlíku, čímž se vytvoří reaktivní aldehydové zbytky vhodné pro sloučení s molekulami obsahujícími amin nebo hydrazid. Reakce probíhá se dvěma sousedními sekundárními hydroxylovými skupinami, aby se mezi sebou štěpila vazba uhlík-uhlík a vytvořily se dvě koncové aldehydové skupiny [52].

Když je některý ze sousedních hydroxylů primárním hydroxylem, reakce s jodistanem uvolňuje jednu molekulu formaldehydu a zbytek koncového aldehydu na původní diolovou sloučeninu. Tyto reakce mohou být použity k vytvoření zesíťovacích míst v sacharidech nebo glykoproteinech pro následnou konjugaci molekul obsahujících amin redukční aminací. Jodistan sodný reaguje s deriváty 2-aminoethanolu, které obsahují primární amin a sekundární hydroxylovou skupinu na sousedních atomech uhlíku. Oxidací dochází ke štěpení vazby uhlík-uhlík, čímž vznikne koncová aldehydová skupina na straně, která měla původní hydroxylový zbytek. Tato reakce může být použita pro vytvoření reaktivních aldehydů na N-terminálních serinových zbytcích peptidů [51]

Molekuly obsahující polysacharidové řetězce mohou být oxidovány tak, aby obsahovaly reaktivní aldehydové zbytky oxidací jodistanem sodným. Jakékoliv sousední atomy uhlíku obsahující hydroxylové skupiny budou ovlivněny štěpením vazby uhlík-uhlík a přeměnou hydroxylů na aldehydy. Glykoproteiny mohou být oxidovány tímto způsobem za vzniku reaktivních meziproduktů vhodných pro zesíťovací postupy zahrnující redukční aminaci. Tato konjugační technika může řídit vazebný proces od polypeptidově aktivních oblastí, čímž pomáhá udržovat katalytickou aktivitu nebo vazebná místa [52].

Jodistan sodný se také používá při oxidaci kyseliny hyaluronové. Při této oxidaci jsou vicinální hydroxylové skupiny na polysacharidovém kruhu HA oxidovány za vzniku dvou aldehydových skupin v každé oxidované monomerní jednotce (viz obrázek 9). Ethylenglykol se do této reakce přidává z důvodu inaktivace nezreagovaného jodistanu sodného [40].



Obrázek 9: Oxidace HA pomocí NaIO_4 . Převzato z [102].

1.4 Lakáza

Lakáza (EC 1.10.3.2 p-difenol: O₂ oxidoreduktáza) patří do větší skupiny enzymů, tzv. modrých multi-měďových oxidáz. Nejčastějšími reakcemi, které lakázy katalyzují, jsou vazby volných radikálů, které vytvářejí dimerní produkty nebo polymerní sloučeniny a oxidační karboxylace. Oxidace substrátů je spojena s redukcí molekulárního kyslíku a vznikem dvou molekul vody. V přítomnosti mediátorů mají lakázy širší rozsah a mohou oxidovat sloučeniny s redox potenciálem vyšším než jejich vlastní [4]. Využívají tak katalyzovaného reakčního mechanismu, pro který je potřeba minimálně čtyř atomů mědi. Enzymy mají vliv na imunitu, patogenitu a morfogenezi organismů a také na metabolický obrat komplexních organických látek, jako jsou např. huminové látky nebo lignin. Lakázy jsou také užitečné biokatalyzátory pro různé biotechnologické aplikace. Ještě nedávno se lakázy vyskytovaly pouze v eukaryotních organismech (houbách, hmyzích a vyšších rostlinách), ale nyní mají i rozšířené rozdělení i v prokaryotách (nejčastěji rod *Bacillus* a *Streptomyces*) [6, 93].

1.4.1 Lakáza a její struktura

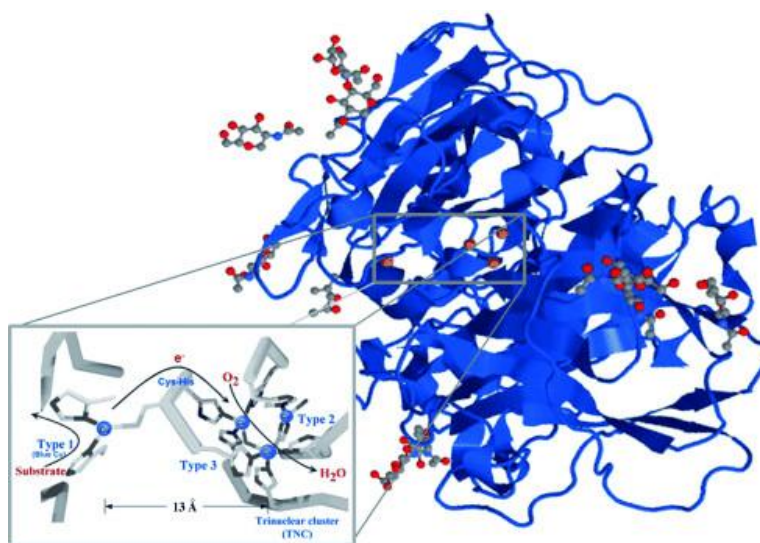
Lakázy se vyskytují jako monomerní nebo polymerní glykoproteiny, přičemž většina fungálních lakáz je uváděna jako monomery, dimery nebo tetramery. Jak již bylo zmíněno, monomer obsahuje čtyři atomy mědi. Sacharidová část je tvořena mannosou, N-acetylglukosaminem a galaktosou [31].

První krystalická trojrozměrná struktura lakázy z *Trametes versicolor* (viz obrázek 10) byla publikována v roce 2002 [4]. Molekulová hmotnost monomerní lakázy je typicky v rozsahu 60-110 kDa a její molekula je tvořena z 10-50 % sacharidy a 500-700 aminokyselinami [30]. Předpokládá se, že vysoký obsah sacharidů v proteinové molekule je zodpovědný za lepší termostabilitu, a to až do 70 °C [37]. Navíc glykosylace ovlivňuje sekreci a aktivitu enzymu [38]. Většina bílo-hnilobných hub produkuje více než jeden izoenzym, který se liší stupněm glykosylace, aminokyselinovou sekvencí, molekulovou hmotností, pI a substrátovou specificitou [39]. Čtyři atomy mědi v aktivním místě hrají významnou roli v katalytických mechanismech lakázy a řadíme je do tří typů podle jejich funkčních a spektroskopických charakteristik [5]. Pomocí elektronové paramagnetické rezonance tyto atomy mědi rozdělujeme na modrý (typ 1), normální (typ 2) a spojený dvojjádrový měděný úsek (typ 3), u kterého jsou měděná místa antiferomagneticky spojená prostřednictvím ligandu histidinu. Spektroskopie kombinovaná s krystalografií poskytuje

podrobný popis aktivních míst lakázy. Rentgenová absorpční spektroskopie a magnetický cirkulární dichroismus (MCD) prokazují, že centra typu 2 a 3 vytváří trinukleární měděný shluk s ohledem na interakci exogenního ligandu včetně reakce s dioxygenem. Atomy mědi typu 2 koordinují s dvěma histidinovými ligandy a vodou [26].

Atom mědi typu 1 koordinuje s jedním cysteinem, jedním methioninem a dvěma histidinovými molekulami [34]. Dále přispívá k intenzivnímu modrému zbarvení lakázy se silnou adsorpcí elektronů při vlnové délce 600 nm. Typ 2 se dvěma histidiny a molekulou vody je bezbarvý, tedy bez absorpce ve viditelném spektru. Existují tři histidiny jako ligandy ke každému atomu mědi typu 3 s antiferomagnetickou vazbou a hydroxylovým můstkem mezi měděným párem, který vykazuje slabou UV absorpci při vlnové délce 330 nm [4]. Jeden atom mědi typu 2 a dva typu 3 tvoří tři jaderný střed, který katalyzuje fixaci a redukci kyslíku na vodu. Stabilitu enzymu přímo ovlivňují vodíkové a solné můstky vyskytující se mezi atomy mědi. Všechny čtyři atomy mědi jsou v nativní formě plně oxidovány (Cu^{2+}) [33]

Rozlišujeme několik desítek lakáz, které se od sebe liší v aktivitě, struktuře, velikosti a ve spektru katalyzovaných sloučenin. Lakázy katalyzují redukci kyslíku na vodu za současné oxidace substrátu, kterým je typicky katechol (o-dihydroxyfenol) nebo hydrochinon (p-dihydroxyfenol). Lakázy neoxidují tyrosin a vyžadují ve svých reakcích pouze kyslík. Tím se liší od enzymů tyrosinázy a peroxidázy [7, 8].). A na základě vlastností mědi typu 1-3 jsou lakázy rozděleny na lakázy s vysokým (0,6-0,8 V) nebo nízkým (0,4-0,6 V) redox potenciálem [35]. Například lakázy vylučované bílými hnilobnými houbami *T. versicolor* a *Neurospora grassa* mají vysoký redox potenciál 0,78-0,80 V [36].



Obrázek 10: Lakáza, *Trametes versicolor*. Převzato z [94].

1.4.2 Výskyt a vlastnosti lakáz

Již více než 100 let je známá biologická oxidace fenolických sloučenin na chinony nebo jejich polymerace zprostředkovaná působením enzymů, takzvaných fenol oxidáz. Mezi tyto enzymy zahrnujeme právě i lakázy. Podílí se na syntéze ligninu a jsou vylučovány kořeny. U hub jsou převážně vylučovány do okolí, tzv. extracelulární lakázy, ale jejich aktivita byla zjištěna i intracelulárně. S největší pravděpodobností asociují s buněčnou stěnou a podílejí se na růstu mycelia, syntéze melaninů a na tvorbě myceliálních provazců [7, 8]. Mezi fungálními lakázami je velká variabilita v indukčním mechanismu, stupni polymorfismu, fyzikálně-chemických a kinetických vlastnostech. Po přidání induktorů do kultivačního média může dojít u některých druhů k biosyntéze nových extracelulárních forem [10]. Jednou ze základních vlastností lakáz je přímý vztah redox potenciálu (E^0) k energii potřebné k odstranění elektronu z redukčního substrátu [26].

Skupina substrátů pro lakázy je velmi široká. V podstatě jakýkoliv substrát s vlastnostmi podobnými jako p-difenol je lakázou oxidován. Dobrymi substráty jsou jednoduché difenoly, jako je hydrochinon a katecholy nebo monofenoly jako je krezol nebo kyselina askorbová [11]. Dalšími substráty jsou pak guaiacol a 2,6-dimethoxyfenol. Lakázy jsou také schopné katalyzovat oxidace jiných substituovaných polyfenolů, aromatických aminů, benzenthioolů a řady jiných sloučenin [10].

V matrici stěn rostlinných buněk je oxidativní polymerací monolignolů tvořen lignin. Peroxidázy, které jsou hojně zastoupeny ve všech buněčných stěnách, byly dlouho považovány za hlavní katalyzátory těchto reakcí. Některé studie však prokazují, že lakázy, vylučované do sekundárních stěn vaskulární tkáně, jsou také schopné polymerizovat monolignoly za přítomnosti kyslíku [11].

Molekulárně biologickými metodami byly podrobně studovány transkripce a exprese u lakázy. Při typické reakci lakázy podléhá fenolický substrát oxidaci s jedním elektronem, kdy vznikne aryloxyradikál, který je ve druhém stupni oxidace převeden na chinon. Ten, stejně jako produkt volných radikálů, podléhá neenzymatickým účinkům kopulační reakce vedoucí k polymeraci [10].

Katalytický účinek lakáz může být velmi silně potlačen různými činidly. Malé anionty, jako jsou halogenidy, hydroxidy, kyanidy, azidy nebo třeba fluoridy, se vážou na měď typu 2 a 3 a tím inhibují katalytický účinek lakázy [5].

Lakáza také katalyzuje oxidaci 3-hydroxyantranilové kyseliny (3-HAA) na kyselinu cinnabarinovou (CA – cinnabarinic acid), která má velký klinický význam, protože kyselina 3-hydroxyantranilová je produkována mononukleárními fagocyty iniciovanými interferonem γ . Dále bylo prokázáno, že 3-HAA působí rovněž jako silný vychytávač reaktivních forem kyslíku. Na druhou stranu je kyselina cinnabarinová (CA) jedním z hlavních produktů oxidace 3-HAA, což napovídá, že by lakáza mohla předcházet oxidačnímu poškození tkání. Touto vlastností je lakáze podobný protein ceruloplazmin [32].

1.5 Substráty pro enzym lakázu

Lakázy mají různé fyziologické role, jako je syntéza a degradace ligninu, ale především slouží jako katalyzátory při oxidaci široké škály substrátů. Mezi tyto substráty zahrnujeme polyfenoly, substituované fenoly, diaminy a anorganické sloučeniny. Zpočátku dochází na atomu mědi typu 1 k jednoelektronové oxidaci redukovatelného substrátu. Oxidace je spojena se čtyřelektronovou redukcí dioxygenu na vodu, která probíhá na trinukleárním měděném klastru obsahujícím atomy mědi typu 2 a 3. Dále katalýza probíhá pouze se substrátem a dioxygenem, proto není potřeba dalšího proteinu transportujícího elektrony nebo drahých kofaktorů [84].

Většina substrátů jsou fenoly s redoxním potenciálem blízkým nebo nižším, než je redox potenciál lakázy. Fenoly nebo aromatické aminy jsou převáděny na radikály, které mohou v závislosti na reakčních podmínkách polymerizovat, vedou k tvorbě chinonů nebo mohou projít alkylačním štěpením. Pokud má potenciální substrát velkou molekulu, vyčnívá do aktivního místa (například substráty podobné ligninu), pak je zapotřebí použití mediátorů. Mediátory jsou oxidovány enzymem lakázou a potom tyto oxidované formy oxidují jiné substráty, které jsou příliš objemné pro vstup do aktivního místa, nebo jsou nepoužitelné vzhledem k jejich struktuře/náboji nebo příliš vysokému redox potenciálu. Tyto mediátory jsou během reakce recyklovány [86].

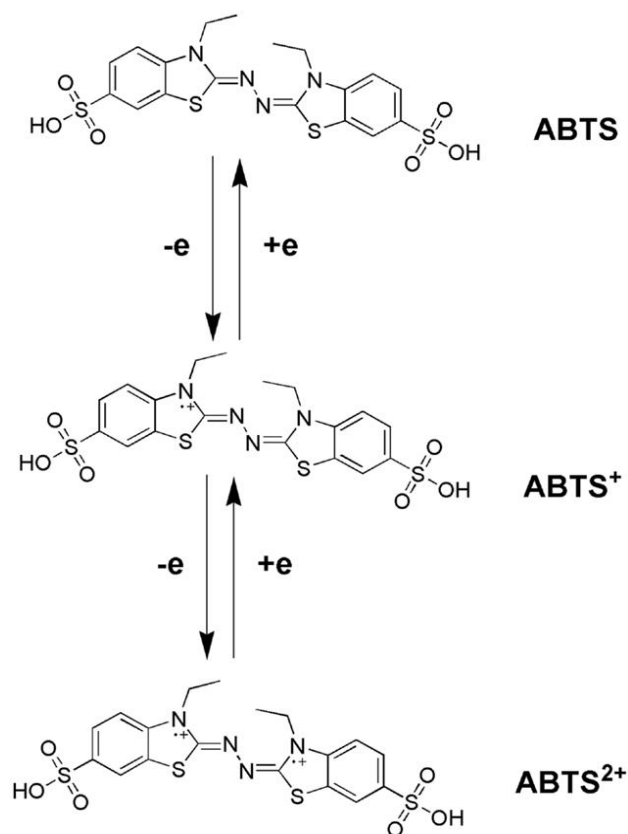
Substráty využívané pro stanovení aktivity enzymu lakázy jsou většinou kolorimetrické. Vlivem enzymatické reakce vznikají barevné produkty, které je možné stanovit spektrofotometricky (viz tabulka 2). Jen u kyseliny vanilové neměříme barvu produktu, ale zákal.

Tabulka 2: Substráty pro stanovení aktivity lakázy a vlnové délky, při kterých jsou monitorovány vznikající produkty enzymové reakce. Převzato a upraveno z [100].

Substrát	Vlnová délka (nm)
ABTS	414
Acetosyringon	520
Eugenol	370
Fenol	420
Katechol	400
Kyselina ferulová	430
Kyselina vanilová	350
Methyl vanilát	370
Syringaldazin	525
Syringaldehyd	370
4-hydroxyacetofenon	260
4-hydroxybenzoová kyselina	260

1.5.1 Substrát 2,2' - azinobis [3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina]-diamoniová sůl (ABTS)

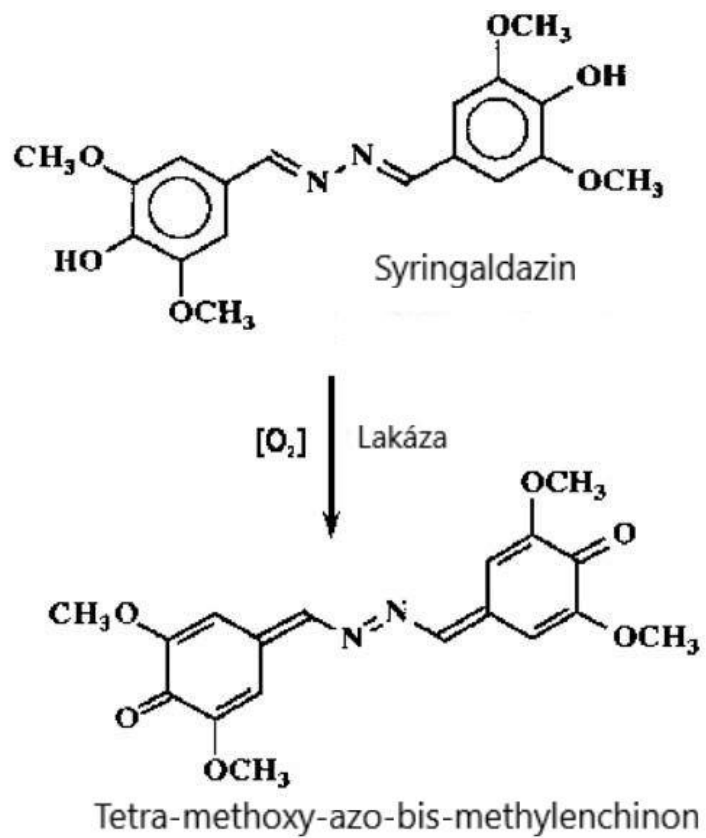
ABTS (2,2' - azinobis [3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina]-diamoniová sůl) je snadno oxidován různými peroxidázami, lakázami a volnými radikály na kationtový radikál $ABTS^+$. Koncentrace intenzivně zeleno-modře zbarveného kationtového radikálu koreluje s enzymovou aktivitou. $ABTS^+$ může být dále oxidován na dikation ($ABTS^{2+}$). Na obrázku 11 je znázorněná přeměna ABTS během oxidace. Redoxní potenciál polooxidovaného a plně oxidovaného ABTS je 0,68, resp. 1,09 V [43].



Obrázek 11: Oxidace ABTS v přítomnosti lakázy. Převzato z [92].

1.5.2 Substrát 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyd (syringaldazin)

Syringaldazin (SGZ) je chromogenní substrát pro enzym lakázu, který je středně rozpustný ve vodě a jeho reakční produkt je dobře definován. Oxidace difenolického syringaldazinu zahrnuje uvolnění dvou protonů. Princip katalyzované oxidace SGZ je následující: za aerobních podmínek lakáza katalyzuje oxidaci syringaldazinu, čímž vzniká tetra-methoxy-azo-bis-methylenchinon (viz obrázek 12). Takto vytvořený produkt fialové barvy je měřen spektrofotometricky při vlnové délce 525 nm [87, 88].



Obrázek 12: Katalyzovaná oxidace syringaldazinu enzymem lakázou. Převzato z [101].

2 Experimentální část

Přístroje a pomůcky

- pH metr model Boeco BT-600 (Boeco Germany, Hamburg, Německo)
- Magnetický separátor Dynal MPC-S (Dynal, Carlsbad, CA, USA)
- Rotátor Bio RS-24 (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- Analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments GmbH, Göttingen, Německo)
- Předvážky KERN 440-33N (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- Aparatura pro vertikální elektroforézu Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)
- Zdroj napětí PowerPac 200 (Bio-Rad, USA)
- Termoblok Block heater Grant Bio BTD (grant Instruments Ltd., Cambridgeshire, UK)
- Mikrostříkačka Hamilton – 100 µl (Hamilton AG, Bonaduz, Švýcarsko)
- Termostat Biological Thermostat BT 120 M (Laboratorní přístroje Praha, Praha, ČR)
- Dokumentační stanice s CCD kamerou ChemiDoc™ XRS+ System se softwarem Image Lab™ (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)
- Mikrozukmavky (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Automatické pipety Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Centrifuga MiniSpin® (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- MicroSpin G-25 kolona (Amersham, Biosciences, Anglie)
- Dialyzační membrány MWCO 12 400 D, 23 mm (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Infračervený spektrofotometr s Fourierovou transformací Nicolet iS50 (Nicolet CZ s.r.o., Praha, ČR).
- Vakuový koncentrátor Concentrator plus 5305 (Eppendorf, Německo)

2.1 Elektroforetické metody

2.1.1 Polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE)

Chemikálie:

- Akrylamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N,N'-methylenbisakrylamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, p.a. (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Dodecylsulfát sodný (SDS), (Penta, Praha, ČR)
- Persíran amonný (Lachema, Neratovice, ČR)
- N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Glycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Glutaraldehyd 50% roztok ve vodě (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Standard molekulových hmotností (10-250 kDa): Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- TEMED (N,N,N,N-tetramethyldiamin) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Vzorový roztok G, 2x Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Lakáza, *Trametes versicolor* (EC 1.10.3.2) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (0,66 I.U./1 mg lyofilizátu)
- Ostatní chemikálie čistoty p.a. (Lachema, Brno, ČR)

Roztoky:

- Roztok A: 30 % směs akrylamidu a bisakrylamidu
- Roztok B: 1,5 M Tris-HCl pufr pH 8,8
- Roztok C: 1,0 M Tris-HCl pufr pH 6,8
- Roztok D: 10 % roztok SDS
- Roztok E: 10 % roztok persíranu amonného (připravuje se vždy čerstvý, těsně před použitím)
- Elektrodový pufr: 0,025 M Tris, 0,192M glycin s 0,1 % SDS pH 8,3 – 8,6
- Zásobní roztok lakázy 2 mg/ml v destilované vodě

Postup:

Nejprve byla skla důkladně vyleštěna etanolem a sestavena aparatura. Poté byly dle tabulky 3 napipetovány roztoky pro přípravu dělicího gelu v pořadí A, B, D a TEMED, směs byla promíchána. Nakonec byl přidán i roztok E a po opatrném promíchání byla směs ihned pipetována mezi skla. Dělicí gel byl převrstven destilovanou vodou a nechán 20-30 minut aby došlo k polymerizaci. Po vytvoření ostrého rozhraní mezi vodou a gelem byla voda opatrně odsáta pomocí filtračního papíru.

Mezitím byl dle tabulky 3 připraven zaostřovací gel stejným způsobem jako gel dělicí, s výjimkou toho, že místo roztoku B byl přidán roztok C. Po přidání roztoku E byla směs lehce promíchána a ihned pipetována na polymerizovaný dělicí gel. Mezi skla byla vložena šablona s 10 jamkami. Během 15 minut došlo k polymerizaci gelu mezi skly.

Tabulka 3: Příprava polyakrylamidových gelů pro SDS-PAGE.

	5% zaostřovací 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	0,02	0,05
TEMED	0,002	0,002

Skla byla opatrně vyjmuta ze stojánku a přemístěna do speciálního držáku a poté do elektroforetické vany. Šablona byla odstraněna a jamky byly promyty elektrodovým pufrem, který byl poté nalit do elektroforetické vany po rysku.

Ze zásobního roztoku lakázy bylo pipetováno 2,5 μ l a přidáno 2,5 μ l vzorkového roztoku tak, aby výsledné množství lakázy ve vzorku byl 5 μ g. Další vzorek obsahoval 10 μ g lakázy, tudíž bylo pipetováno 5,0 μ l zásobního roztoku lakázy a přidáno 5,0 μ l vzorkového roztoku. Vzorky byly zahřáty 3 minuty při 98°C. Takto připravené vzorky byly pipetovány pomocí Hamiltonovy pipety po 10 μ l do každé jamky mezi skla. Standardu (markeru) bylo napipetováno 3 μ l pro barevní amoniakálním stříbrem. Hamiltonova pipeta byla vždy po každém použití 5x propláchnuta etanolem a poté 5x destilovanou vodou.

Nádoba pro separaci byla uzavřena víkem a pomocí konektorů připojena ke zdroji napětí. Bylo nastaveno konstantní napětí na hodnotu 180 V a proud max. 30 mA/1 gel. Elektroforetická separace probíhala tak dlouho, dokud čelo s bromfenolovou modří ze vzorkového roztoku nedoputovalo téměř na úroveň dolního okraje skel (cca 45 minut). Po skončení elektroforetického dělení byl nejprve vypnut zdroj napětí a až poté otevřeno víko a vylit elektrodový pufr. Po vyndání aparatury z nádoby byla skla vyjmuta a gely opatrně přeneseny do Petriho misky pro barvení.

2.1.2 Barvení roztokem amoniakálního stříbra

Roztoky:

- Fixační roztok: 5% kyselina octová + 50% ethanol (50 ml ledové kys. octové, 500 ml ethanolu, doplněno na 1000 ml a skladováno při laboratorní teplotě).
- 10% roztok glutaraldehydu (20 ml 50% glutaraldehydu do 100 ml destilované vody, připraven vždy čerstvý).
- Roztok amoniakálního stříbra: 20% dusičnan stříbrný (2 g/10 ml destilované vody – skladován při laboratorní teplotě) byl přikapáván k roztoku (21 ml destilované vody, 1,4 ml vodného roztoku amoniaku a 239 µl 9M hydroxidu sodného) až do vzniku světle hnědého zákalu. Poté byl roztok doplněn na 100 ml destilovanou vodou. Celá příprava roztoku probíhala v digestoři za použití ochranných brýlí.
- Vyvolávací roztok: 0,05% kyselina citrónová + 0,04% formaldehyd (250 mg kyseliny citrónové, 540 µl 37% formaldehydu do 500 ml destilované vody (skladován při pokojové teplotě).
- Ustalovací roztok: 5% kyselina octová (50 ml ledové kys. octové do 1000 ml destilované vody (skladován při laboratorní teplotě).

Postup:

Po vlastním elektroforetickém dělení byl gel propláchnut vodou a fixován přes noc při 4°C ve fixačním roztoku. Gel byl poté asi 30 minut rehydratován v destilované vodě a poté dalších 30 minut inkubován s 10% glutaraldehydem při laboratorní teplotě. Poté byl gel promyt destilovanou vodou (6 x 10 minut) a dále inkubován 15 minut v roztoku amoniakálního stříbra. Po promytí destilovanou vodou byl gel vyvoláván ve vyvolávacím roztoku. Následně byl přenesen do ustalovacího roztoku, ve kterém mohl být i skladován.

2.2 Metody - lakáza

2.2.1 Stanovení aktivity solubilní lakázy pomocí substrátu Syringaldazinu

Chemikálie:

- Syringaldazin (4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyd azin, SGZ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Lakáza, *Trametes versicolor* (EC 1.10.3.2) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (0,66 I.U./1 mg lyofilizátu)

Roztoky:

- 0,05 M K-acetátový pufr pH 4,5
- 5 mM substrátový roztok SGZ v methanolu

Postup:

Byl připraven zásobní roztok solubilní lakázy o koncentraci 10 mg/ml (6 I.U.) v K-acetátovém pufru. Podle tabulky 4 byla připravena kalibrační řada enzymu. Z těchto kalibračních roztoků bylo pro vlastní stanovení pipetováno 100 μ l do kyvety, přidáno 893 μ l K-acetátového pufru a 7 μ l roztoku SGZ. Absorbance byla měřena při vlnové délce $\lambda = 525$ nm ve 30s intervalech po dobu 15 minut.

Tabulka 4: Kalibrační řada solubilní lakázy.

I.U.	lakáza (μ l)	K-acet. pufr (μ l)	Výsledná koncentrace (I.U./1ml)
0,01	16,5	983,5	0,001
0,02	33	967	0,002
0,03	50	950	0,003
0,04	66	934	0,004
0,05	83	917	0,005
0,06	100	900	0,006
0,08	133,3	866,7	0,008
0,1	166,6	833,4	0,01

2.2.2 Stanovení aktivity solubilní lakázy pomocí substrátu diamoniové soli 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny)

Chemikálie:

- Diamoniová sůl 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny) (ABTS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Lakáza, *Trametes versicolor* (EC 1.10.3.2) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (0,66 I.U./1 mg lyofilizátu)

Roztoky:

- 0,05 M K-acetátový pufr pH 4,5
- 5 mM substrátový roztok ABTS v 0,05 M K-acetátovém pufru pH 4,5

Postup:

Byl připraven zásobní roztok solubilní lakázy o koncentraci 10 mg/ml (6 I.U.) v K-acetátovém pufru. Podle tabulky 5 byla připravena kalibrační řada. Z těchto kalibračních roztoků bylo pro vlastní stanovení pipetováno 100 μ l do kyvety, přidáno 891 μ l K-acetátového pufru a 9 μ l roztoku ABTS. Absorbance byla měřena při vlnové délce $\lambda = 414$ nm ve 30s intervalech po dobu 8 minut.

Tabulka 5: Kalibrační řada lakázy

I.U.	lakáza (μ l)	K-acet. pufr (μ l)	Výsledná koncentrace (I.U./1ml)
0,01	16,5	983,5	0,001
0,02	33	967	0,002
0,03	50	950	0,003
0,04	66	934	0,004
0,05	83	917	0,005
0,06	100	900	0,006
0,08	133,3	866,7	0,008
0,1	166,6	833,4	0,01

2.2.3 Imobilizace lakázy na magnetickou makroporézní perlovou celulózu s -OH funkčními skupinami

Chemikálie:

- Lakáza, *Trametes versicolor* (EC 1.10.3.2) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (0,66 I.U./1 mg lyofilizátu)
- Magnetická makroporézní perlová celulóza L1459-3 (velikost částic 80-100 μm , -OH funkční skupiny) (Iontosorb MG 100)
- Jodistan sodný (NaIO_4), p.a., (Reanal, Budapešť, Maďarsko)
- Kyanoborohydrid sodný (NaCNBH_3) (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Švýcarsko)
- Ostatní chemikálie čistoty p.a. (Lachema, Brno, ČR)

Roztoky:

- 0,05 M K-acetátový pufr pH 4,5
- 0,05 M K-acetátový pufr pH 4,5 s 1 M NaCl
- 0,05 M K-acetátový pufr pH 4,5 s 5 mM CuCl_2
- 0,2 M roztok NaIO_4 v destilované vodě

Postup:

0,5 ml sedimentované magnetické makroporézní perlové celulózy (MPC) bylo promyto 5x destilovanou vodou (1 ml). Nosič byl vždy separován pomocí magnetického separátoru. Poté bylo přidáno 0,5 ml 0,2 M NaIO_4 a následovala inkubace 90 minut při laboratorní teplotě ve tmě a za mírného otáčení na rotátoru. Po oxidaci byl nosič promyt 10x destilovanou vodou a 5x 0,05 M K-acetátovým pufrům pH 4,5 (vždy 1 ml). K nosiči bylo následovně přidáno 6 I.U. lakázy v 0,5 ml 0,05 M K-acetátového pufru pH 4,5 a probíhala inkubace 10 minut při laboratorní teplotě za mírného otáčení na rotátoru. Poté byly ke směsi přidány 3 mg kyanoborohydridu sodného v 50 μl 0,05 M K-acetátového pufru pH 4,5. Následovala inkubace přes noc při 4 °C za mírného otáčení na rotátoru. Po inkubaci byl nosič s imobilizovanou lakázou 5x promyt 0,05 M K-acetátovým pufrům pH 4,5, 5x 0,05 M K-acetátovým pufrům pH 4,5 s 1 M NaCl a 5x 0,05 M K-acetátovým pufrům pH 4,5 s 5 mM CuCl_2 (vždy 1 ml). Nosič s imobilizovanou lakázou byl skladován v 0,05 M K-acetátovém pufru s 5 mM CuCl_2 při 4 °C.

2.2.4 Stanovení aktivity lakázy imobilizované na magnetické makroporézní perlové celulóze pomocí substrátu Syringaldazinu

Chemikálie:

- Syringaldazin (4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyd azin, SGZ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Magnetická makroporézní perlová celulóza L1459-3 (velikost částic 80-100 μm , -OH funkční skupiny) (Iontosorb MG 100) s imobilizovanou lakázou, *Trametes versicolor* (EC 1.10.3.2) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (0,66 I.U./1 mg lyofilizátu)

Roztoky:

- 0,05 M K-acetátový pufr pH 4,5
- 5 mM substrátový roztok SGZ v methanolu

Postup:

Směs nosiče s imobilizovanou lakázou byla promíchána a pomocí magnetu separovány částice od supernatantu. Pro stanovení aktivity bylo do kyvety pipetováno 50 μl sedimentované magnetické perlové celulózy s imobilizovanou lakázou, přidáno 943 μl 0,05 M K acetátového pufru pH 4,5 a 7 μl zásobního roztoku SGZ. Absorbance byla měřena na spektrofotometru v 30 s intervalech, kdy 20 sekund byla směs míchána, následovala 10 sekund separace částic magnetem a měření absorbance. Měření probíhalo po celkovou dobu 10 minut při vlnové délce $\lambda=525$ nm.

2.2.5 Stanovení aktivity lakázy imobilizované na magnetické makroporézní perlové celulóze pomocí substrátu diamoniové soli 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny)

Chemikálie:

- Diamoniová sůl 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny) (ABTS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Magnetická makroporézní perlová celulóza L1459-3 (velikost částic 80-100 μm , -OH funkční skupiny) (Iontosorb MG 100) s imobilizovanou lakázou, *Trametes versicolor* (EC 1.10.3.2) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (0,66 I.U./1 mg lyofilizátu)

Roztoky:

- 0,05 M K-acetátový pufr pH 4,5
- 5 mM substrátový roztok ABTS v 0,05 M K-acetátovém pufru pH 4,5

Postup:

Směs nosiče s imobilizovanou lakázou byla promíchána a pomocí magnetu separovány částice od supernatantu. Pro stanovení aktivity bylo do kyvety pipetováno 50 μ l sedimentované magnetické perlové celulózy s imobilizovanou lakázou, přidáno 941 μ l 0,05 M K acetátového pufru pH 4,5 a 9 μ l zásobního roztoku ABTS. Absorbance byla měřena na spektrofotometru v 30 s intervalech, kdy 20 sekund byla směs míchána, následovala 10 sekund separace částic magnetem a měření absorbance. Měření probíhalo po celkovou dobu 10 minut při vlnové délce $\lambda=414$ nm.

2.2.6 Imobilizace lakázy na magnetické částice s –COOH nebo –NH₂ skupinou

Chemikálie:

- Magnetické částice PGMA-40% EDMA, ProMAG, HEMA-40% EDMA (–COOH funkční skupiny, velikost částic 4 μ m) (ÚMCH AVČR, Praha)
- Magnetické částice SiMAG-carboxyl (funkční skupiny –COOH), SiMAG-amine (funkční skupiny –NH₂, velikost částic 1 μ m) (Chemicell, Berlín, Německo)
- 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid (EDAC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Sodná sůl N-hydroxysulfosukcinimidu (sulfo-NHS) (Chemika 56 485, FLUKA-Riedel de Haen, Německo)
- Lakáza, *Trametes versicolor* (EC 1.10.3.2) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (0,66 I.U./1 mg lyofilizátu)
- Ostatní chemikálie čistoty p.a. (Lachema, Brno, ČR)

Roztoky:

- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
- Roztok EDAC (7,5 mg/0,2 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3)
- Roztok sulfo-NHS (1,25 mg/0,2 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3)

Postup:

1 mg magnetických částic s karboxylovými nebo aminoskupinami byl promyt 5x 0,1 M fosfátovým pufrům pH 7,3 (vždy 1 ml). Magnetické částice byly odděleny pomocí magnetického separátoru a supernatant odpipetován.

Dále bylo k částicím přidáno 0,2 ml roztoku EDAC a 0,2 ml roztoku sulfo-NHS a směs byla promíchána. Poté byla přidána lakáza, 1,5 I.U. v 0,5 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3 a 0,1 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3 pufru, aby byl výsledný reakční objem 1 ml. Směs byla promíchána a inkubována 3 hodiny za mírného otáčení na rotátoru. Po inkubaci byl nosič s imobilizovanou lakázou promyt 10x 0,1 M fosfátovým pufrům pH 7,3 (vždy 1 ml). V tomto pufru byl také skladován při teplotě 4 °C.

2.2.7 Stanovení aktivity lakázy imobilizované na magnetických částicích s -COOH nebo -NH₂ skupinou pomocí substrátu syringaldazinu

Chemikálie:

- Syringaldazin (4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyd azin, SGZ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Nosič s imobilizovanou lakázou, *Trametes versicolor* (EC 1.10.3.2) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (0,66 I.U./1 mg lyofilizátu)

Roztoky:

- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
- 5 mM substrátový roztok SGZ v methanolu

Postup:

Směs nosiče s imobilizovanou lakázou byla promíchána a pomocí magnetu separovány částice od supernatantu. Pro stanovení aktivity bylo do kyvety pipetováno 400 µl suspenze částic s imobilizovaným enzymem, přidáno 543 µl 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3 a 7 µl zásobního roztoku SGZ. Absorbance byla měřena na spektrofotometru ve 2 minutových intervalech, kdy 1,5 minuty byla směs míchána, následovala 30 s separace částic magnetem a měření absorbance. Měření probíhalo po celkovou dobu 20 minut při vlnové délce $\lambda=525$ nm.

2.2.8 Stanovení aktivity imobilizované lakázy na magnetických částicích s -COOH nebo -NH₂ skupinou pomocí diamoniové soli 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny)

Chemikálie:

- Diamoniová sůl 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny) (ABTS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Nosič s imobilizovanou lakázou, *Trametes versicolor* (EC 1.10.3.2) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (0,66 I.U./1 mg lyofilizátu)

Roztoky:

- 0,1 M fosfátový pufr pH 7,3
- 5 mM substrátový roztok ABTS v 0,05 M K-acetátovém pufru pH 4,5

Postup:

Směs nosiče s imobilizovanou lakázou byla promíchána a pomocí magnetu separovány částice od supernatantu. Pro stanovení aktivity bylo do kyvety pipetováno 400 μ l suspenze částic s imobilizovaným enzymem, přidáno 541 μ l 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3 a 9 μ l zásobního roztoku ABTS. Absorbance byla měřena na spektrofotometru ve 2 minutových intervalech, kdy 1,5 minuty byla směs míchána, následovala 30 s separace částic magnetem a měření absorbance. Měření probíhalo po celkovou dobu 20 minut při vlnové délce $\lambda=414$ nm.

2.2.9 Imobilizace lakázy na magnetickou makroporézní perlovou celulózu s hydrazidovými funkčními skupinami

Chemikálie:

- Lakáza, *Trametes versicolor* (EC 1.10.3.2) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (0,66 I.U./1 mg lyofilizátu)
- Magnetická makroporézní perlová celulóza L 1682 s hydrazidovými funkčními skupinami (velikost částic 125-250 μ m) (ÚMCH AVČR, Praha)
- Jodistan sodný (NaIO₄), p.a., (Reanal, Budapešť, Maďarsko)
- Etylenglykol (C₆H₆O₂), p.a., (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Ostatní chemikálie čistoty p.a. (Lachema, Brno, ČR)

Roztoky:

- 0,1 M K-acetátový pufr pH 5,5
- 0,05 M K-acetátový pufr pH 4,5
- 0,05 M K-acetátový pufr pH 4,5 s 0,5 M NaCl
- 0,05 M K-acetátový pufr pH 4,5 s 5 mM CuCl₂
- 0,1 M NaIO₄ v destilované vodě

Postup:

Prvním krokem byla oxidace lakázy jodistanem sodným, kdy 3 I.U. lakázy (0,0045 g) v 1 ml 0,1 M K-acetátového pufru pH 5,5 byly smíchány se 110 µl 0,1 M NaIO₄, aby byla jeho výsledná koncentrace ve směsi 0,01 M. Enzym byl oxidován za mírného otáčení na rotátoru 30 minut při 4 °C. Oxidace byla poté zastavena přidávkem 3 µl etylenglykolu a směs byla inkubována 10 minut na rotátoru při 4 °C. Následovalo odsolení enzymu pipetováním 0,5 ml oxidovaného enzymu do odsolovací MicroSpin G-25 kolony. Centrifugace 10 minut při 1300 otáčkách/minutu. Po odsolení byl roztok enzymu přidán k 0,25 ml sedimentovaného nosiče, který byl nejdříve 5x promyt 0,05 M K-acetátovým pufrům pH 4,5 (1 ml). Takto byla směs inkubována přes noc při 4 °C za mírného otáčení na rotátoru. Po imobilizaci byl nosič 10x promyt 0,05 M K-acetátovým pufrům pH 4,5 s 5 mM CuCl₂. Ve stejném pufru nosič s imobilizovanou lakázou byl také skladován při teplotě 4 °C.

2.2.10 Stanovení aktivity lakázy imobilizované na magnetické hydrazidové perlové celulóze pomocí substrátu Syringaldazinu

Chemikálie:

- Syringaldazin (4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyd azin, SGZ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Magnetická makroporézní perlová celulóza L 1682 s hydrazidovými funkčními skupinami (velikost částic 125-250 µm) (ÚMCH AVČR, Praha) s imobilizovanou lakázou, *Trametes versicolor* (EC 1.10.3.2) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (0,66 I.U./1 mg lyofilizátu)

Roztoky:

- 0,05 M K-acetátový pufr pH 4,5
- 5 mM substrátový roztok SGZ v methanolu

Postup:

Směs nosiče s imobilizovanou lakázou byla promíchána a pomocí magnetu separovány částice od supernatantu. Pro stanovení aktivity bylo do kyvety pipetováno 30 μl sedimentované magnetické hydrazinové perlové celulózy s imobilizovanou lakázou, přidáno 963 μl 0,05 M K acetátového pufru pH 4,5 a 7 μl zásobního roztoku SGZ. Absorbance byla měřena na spektrofotometru v 1 minutových intervalech, kdy 45 sekund byla směs míchána, následovala 15 sekund separace částic magnetem a měření absorbance. Měření probíhalo po celkovou dobu 20 minut při vlnové délce $\lambda=414$ nm.

2.2.11 Stanovení aktivity lakázy imobilizované na magnetické hydrazidové perlové celulóze pomocí substrátu diamoniové soli 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny)

Chemikálie:

- Diamoniová sůl 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny) (ABTS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Magnetická makroporézní perlová celulóza L 1682 s hydrazidovými funkčními skupinami (velikost částic 125-250 μm) (ÚMCH AVČR, Praha) s imobilizovanou lakázou, *Trametes versicolor* (EC 1.10.3.2) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (0,66 I.U./1 mg lyofilizátu)

Roztoky:

- 0,05 M K-acetátový pufr pH 4,5
- 5 mM substrátový roztok ABTS v 0,05 M K-acetátovém pufru pH 4,5

Postup:

Směs nosiče s imobilizovanou lakázou byla promíchána a pomocí magnetu separovány částice od supernatantu. Pro stanovení aktivity bylo do kyvety pipetováno 30 μl sedimentované magnetické hydrazinové perlové celulózy s imobilizovanou lakázou, přidáno 961 μl 0,05 M K acetátového pufru pH 4,5 a 9 μl zásobního roztoku ABTS. Absorbance byla měřena na spektrofotometru v 1 minutových intervalech, kdy 45 sekund byla směs míchána, následovala 15 sekund separace částic magnetem a měření absorbance. Měření probíhalo po celkovou dobu 20 minut při vlnové délce $\lambda=414$ nm.

2.3 Metody – oxidace kyseliny hyaluronové

2.3.1 Oxidace kyseliny hyaluronové pomocí 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxylu s přidavkem chlornanu sodného, bromidu sodného a diaminobenzidinu

Chemikálie:

- 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Diaminobenzidin (DAB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina hyaluronová (1,8 MDa, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Roztoky:

- 0,5 M roztok TEMPO v 20% methanolu
- 0,05 M acetátový pufr pH 5,5
- 10% roztok NaOCl v destilované vodě
- 0,5 mM roztok NaBr v destilované vodě
- Zásobní roztok HA o koncentraci 1,5 mg/ml v destilované vodě, který 24h bobtnal
- Zásobní roztok DAB o koncentraci 1 mg/ml v destilované vodě

Postup:

Ze zásobního roztoku HA byl pipetován 1 mg (0,666 ml) do šesti zkumavek. Roztok TEMPO byl do každé zkumavky přidán o různé koncentraci, jednalo se o koncentraci 0,01 M, 0,03 M a 0,1 M (viz tabulka 6). Všechny vzorky byly doplněny na objem 2 ml 0,05 M acetátovým pufrům pH 5,5. Do všech zkumavek bylo přidáno 86 μ l 10% roztoku NaOCl tak, aby byla výsledná koncentrace ve směsi 7,0 mmol/l. A hned poté bylo přidáno 0,000102 g NaBr, aby byla výsledná koncentrace ve směsi 0,5 mmol/l (viz tabulka 6).

Vzorky se nechaly 1 hodinu míchat na rotátoru a poté bylo do každé zkumavky přidáno po 100 μ g roztoku DAB (100 μ l). Po přidání DAB byly vzorky inkubovány na rotátoru při 4 °C do druhého dne. Druhý den byla směs přepipetována do dialyzačních střívek, která byla ponořena do acetátového pufru o koncentraci 0,05 M a pH 5,5. Takto probíhala dialýza až do dalšího dne a během této doby byl pufr 3x vyměněn. Na závěr proměřena absorbance v závislosti na vlnové délce.

Tabulka 6: Přehled jednotlivých složek, jejich koncentrace a objem ve vzorcích

	1	2	3
HA, 1 mg (0,666 ml)	✓	✓	✓
TEMPO, 0,01M	✓	-	-
TEMPO, 0,03M	-	✓	-
TEMPO, 0,1 M	-	-	✓
NaOCl, 7 mmol/l (86 µl)	✓	✓	✓
NaBr, 0,5 mmol/l (0,1 mg)	✓	✓	✓
DAB, 100 mg (100 µl)	✓	✓	✓

2.3.2 Oxidace kyseliny hyaluronové pomocí 0,1 M TEMPO za přítomnosti imobilizované a solubilní lakázy, diaminobenzidinu, chlornanu sodného a bromidu sodného

Chemikálie:

- 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Diaminobenzidin (DAB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Lakáza, *Trametes versicolor* (EC 1.10.3.2) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (0,66 I.U./1 mg lyofilizátu)
- Magnetická makroporézní perlová celulóza L1459-3 (velikost částic 80-100 µm, -OH funkční skupiny) (Iontosorb MG 100) s imobilizovanou lakázou, *Trametes versicolor* (EC 1.10.3.2) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (0,66 I.U./1 mg lyofilizátu)
- Kyselina hyaluronová (1,8 MDa, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Chlornan sodný (NaOCl) (Lachema, Brno, ČR)
- Bromid sodný (NaBr) (Lachema, Brno, ČR)

Roztoky:

- 0,05 M K-acetátový pufr pH 5,5
- 0,5 M roztok TEMPO v 20% methanolu
- Zásobní roztok HA o koncentraci 1,5 mg/ml v destilované vodě, který 24h bobtnal
- Zásobní roztok DAB o koncentraci 1 mg/ml v destilované vodě

Postup:

Ze zásobního roztoku HA byl pipetován 1 mg (0,666 ml) do pěti zkumavek. Do každé zkumavky bylo přidáno 400 μ l zásobního roztoku TEMPO, aby byla výsledná koncentrace ve směsi 0,1 M. Přidáním 934 μ l 0,05 M K-acetátového pufru pH 5,5 byl celkový objem doplněn na 2,0 ml.

Dále byla do dvou zkumavek doplněná solubilní lakáza (3 I.U.) a do jedné z nich ještě navíc chlornan sodný a bromid sodný. Do dalších dvou bylo přidáno 200 μ l sedimentovaného nosiče (MPC) s imobilizovanou lakáza a do jedné z nich opět chlornan sodný a bromid sodný. V páté zkumavce byl k TEMPO a HA přidán chlornan sodný a bromid sodný (viz tabulka 7).

Po hodinové oxidaci na rotátoru bylo do všech zkumavek přidáno 100 μ g DAB (100 μ l). Inkubační doba byla do druhého dne při 4°C a poté byla směs nepipetována do dialyzačních střívek a ta byla ponořena do 0,05 M K-acetátového pufru pH 5,5. Po proběhlé dialýze do dalšího dne byla u vzorků proměřena absorbance v závislosti na vlnové délce.

Tabulka 7: Přehled jednotlivých složek, jejich koncentrace a objem ve vzorcích

	1	2	3	4	5
HA, 1 mg (0,666 ml)	✓	✓	✓	✓	✓
TEMPO, 0,1 M (400 μ l)	✓	✓	✓	✓	✓
Solubilní lakáza (3 I.U.)	✓	✓	-	-	-
Imobilizovaná lakáza (200 μ l)	-	-	✓	✓	-
NaOCl, 7 mmol/l (86 μ l)	✓	-	✓	-	✓
NaBr, 0,5 mmol/l (0,1 mg)	✓	-	✓	-	✓
DAB, 100 mg (100 μ l)	✓	✓	✓	✓	✓

2.3.3 Oxidace kyseliny hyaluronové pomocí 0,03 M TEMPO za přítomnosti imobilizované lakázy s přidavkem diaminobenzidinu

Chemikálie:

- 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Diaminobenzidin (DAB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Magnetická makroporézní perlová celulóza L1459-3 (velikost částic 80-100 μm , -OH funkční skupiny) (Iontosorb MG 100) s imobilizovanou lakázou, *Trametes versicolor* (EC 1.10.3.2) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (0,66 I.U./1 mg lyofilizátu)
- EDC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- S-NHS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina hyaluronová (1,8 MDa, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Roztoky:

- 0,05 M K-acetátový pufr pH 5,5
- 0,5 M roztok TEMPO v 20% methanolu
- Zásobní roztok HA o koncentraci 1,5 mg/ml v destilované vodě, který 24h bobtnal
- Zásobní roztok DAB o koncentraci 1 mg/ml v destilované vodě

Postup:

Ze zásobního roztoku HA byl pipetován 1 mg (0,666 ml) do čtyř zkumavek. Do všech bylo přidáno 120 μl zásobního roztoku TEMPO, aby byla výsledná koncentrace ve směsi 0,03 M. Doplněno na celkový objem 2,0 ml přidáním 1,214 ml 0,05 M K-acetátového pufru pH 5,5. Do dvou ze čtyř zkumavek bylo přidáno 200 μl sedimentovaného nosiče (MPC) s imobilizovanou lakázou.

Po hodinové oxidaci na rotátoru bylo do jedné zkumavky s imobilizovanou lakázou a TEMPO a do jedné s přidavkem TEMPO, ale bez enzymu, přidáno 7,5 mg EDC a 1,25 mg S-NHS (viz tabulka 8). Do všech zkumavek bylo přidáno 100 μg DAB (100 μl). Inkubační doba byla do druhého dne a poté byla směs napipetována do dialyzačních střívek a ta byla ponořena do 0,05 M K-acetátového pufru pH 5,5. Po proběhlé inkubaci do dalšího dne byla u vzorků proměřena absorbance v závislosti na vlnové délce.

Tabulka 8: Přehled jednotlivých složek, jejich koncentrace a objem ve vzorcích

	1	2	3	4
HA, 1 mg (0,666 ml)	✓	✓	✓	✓
TEMPO, 0,03M (120 ml)	✓	✓	✓	✓
Imobilizovaná lakáza (200 ml)	✓	✓	-	-
EDC (7,5 mg)	✓	-	✓	-
S-NHS (1,25 mg)	✓	-	✓	-
DAB, 100 mg (100 ml)	✓	✓	✓	✓

2.3.4 Oxidace kyseliny hyaluronové pomocí jodistanu sodného

Chemikálie:

- Diaminobenzidin (DAB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina hyaluronová (1,8 MDa, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Jodistan sodný, p.a., (NaIO₄) (Reanal, Budapešť, Maďarsko)
- Etylenglykol, p.a., (C₆H₆O₂) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Roztoky:

- 0,05 M K-acetátový pufr pH 5,5
- Zásobní roztok HA o koncentraci 1,5 mg/ml v destilované vodě, který 24h bobtnal
- 0,2 M roztok NaIO₄ v destilované vodě
- Zásobní roztok DAB o koncentraci 1 mg/ml v destilované vodě

Postup:

Do mikrozkušavky bylo pipetováno ze zásobního roztoku HA 1 mg (0,666 ml) a 1,0 ml roztoku jodistanu sodného tak, aby jeho výsledná koncentrace ve směsi byla 0,1 mol/l. Objem byl doplněn na 2,0 ml 0,05 M K-acetátovým pufrem pH 5,5.

Směs se nechala oxidovat 2 hodiny při laboratorní teplotě na rotátoru ve tmě. Po proběhlé oxidaci bylo přidáno 30 µl etylenglykolu. Poté byla směs napipetována do dialyzačních střívek a dialýza se nechala probíhat do dalšího dne do destilované vody při laboratorní teplotě.

Ke směsi bylo po dialýze přidáno 50 μl roztoku DAB a opět následovala 24 hodinová dialýza v prostředí destilované vody při laboratorní teplotě.

2.4 Analýza vzorků oxidované kyseliny hyaluronové infračervenou spektrometrií s Fourierovou transformací (FT-IR)

Před vlastní analýzou byly vzorky oxidované kyseliny hyaluronové (viz. 2.3) odpařeny do sucha ve vakuovém koncentrátoru Concentrator plus 5305 (Eppendorf, Německo). FT-IR analýza byla provedena na jednoparskovém IČ spektrometru Nicolet iS50 (Nicolet CZ s.r.o., Praha, ČR). Oblast snímání spektra 4000 - 400 cm^{-1} , rozlišení 4 cm^{-1} a počet scanů 25. Spektrum bylo zaznamenáváno reflexní technikou proti vzduchu.

3 Výsledky a diskuse

Tato diplomová práce byla součástí výzkumu v oblasti přípravy nanočástic z kyseliny hyaluronové, které jsou následně testovány jako potenciální radioprotektivum plic při ozařování. Vlastní příprava nanočástic byla předmětem jiné diplomové práce realizované na stejném pracovišti.

Nanočástice jsou obvykle syntetizovány zesíťováním polymerní molekuly kyseliny hyaluronové chemickými činidly. Stupeň zesíťování pak ovlivňuje velikost nanočástic a tím i jejich potenciální aplikaci. V literatuře existují informace o způsobu cílené modifikace kyseliny hyaluronové oxidačními činidly (např. 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl nebo jodistan sodný) [40, 77]. Navíc může být proces modifikace ovlivněn i přidavkem enzymu lakázy. Ta v systému jednak zajišťuje regeneraci oxidačního činidla (např. TEMPO) a umožňuje eliminovat další látky (NaOCl, NaBr) [78, 80].

Cílem diplomové práce byla oxidace kyseliny hyaluronové vybranými oxidačními činidly. Záměrem byla oxidace primární alkoholové skupiny sacharidu, obsaženého ve struktuře HA, na karbonylovou skupinu, která by mohla být následně využita pro snadné síťování HA do nanočástic nebo vazbu biologicky aktivních látek. Současně jsme se zaměřili na přípravu nosiče s imobilizovanou lakázou, který byl následně použit při reakcích cílené oxidace kyseliny hyaluronové. Výhodou použití imobilizovaného enzymu místo jeho solubilní formy spočívá v možném opakovaném použití a snadné eliminaci z reakční směsi. Pro porovnání byla do našich experimentů zahrnuta i lakáza solubilní, která je zmíněna i v literatuře.

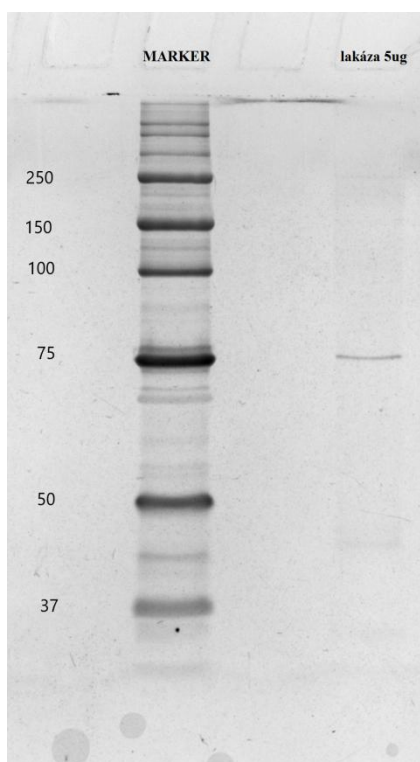
Celá diplomová práce se skládá ze dvou hlavních částí. Jedna část byla věnována experimentům s enzymem lakázou. Nejprve byla stanovena aktivita solubilní lakázy pomocí vybraných nízkomolekulárních substrátů, syringaldazinu (SGZ) a diamoniové soli 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny (ABTS). Poté byla lakáza imobilizovaná na vybrané typy magnetických částic a po imobilizaci bylo ověřeno, zda si zachovává aktivitu. Byly sledovány i parametry operační a skladovací stability lakázy.

Druhá část byla zaměřena na oxidaci kyseliny hyaluronové (HA) o různé velikosti (30 kDa a 1,8 MDa) vybranými oxidačními činidly, 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxylem (TEMPO) a jodistanem sodným. Jednotlivé způsoby oxidace se od sebe lišily přidavkem

dalších látek podporujících nebo naopak zastavujících oxidaci HA, koncentrací TEMPO a funkčními skupinami, které při oxidaci vznikaly. Bylo také testováno, zda přidavek solubilní a zejména imobilizované lakázy ovlivní účinnost oxidace. Pro ověření oxidace HA byla použita nepřímá metoda, založená na spontánní reakci vzniklé aldehydové skupiny po oxidaci s diaminobenzidinem, který lze detegovat spektrofotometricky. Byla provedena i analýza IČ spektra, konkrétně FT-IR (z angl. fourier-transform infrared spectroscopy) pro potvrzení přítomnosti aldehydových funkčních skupin.

3.1 Ověření čistoty solubilní lakázy pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE)

SDS-PAGE byla použita pro ověření čistoty komerčního enzymu lakázy izolovaného z hub *Trametes versicolor* a ověření molekulové hmotnosti solubilního enzymu. Separace probíhala na 10% polyakrylamidovém gelu s následným barvením roztokem amoniakálního stříbra.



Obrázek 13: SDS-PAGE analýza komerčně dodávané lakázy z *Trametes versicolor*. 10% polyakrylamidový gel. Barvení gelu dusičnanem stříbrným. Podmínky separace: 180 V, 30 mA. Marker (kDa), lakáza 5 µg.

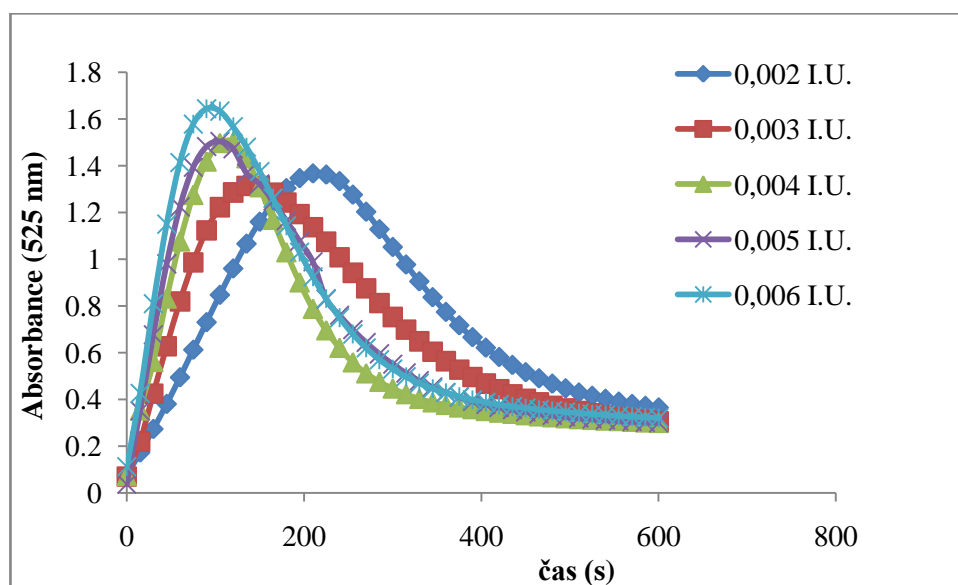
Z výsledků na obrázku 13 je patrné, že molekulová hmotnost lakázy je 75 000 Da, což koresponduje s literaturou. Současně nejsou přítomny další kontaminující proteiny. Tento komerčně dodávaný enzym byl tedy vhodný pro další experimenty.

3.2 Stanovení aktivity solubilní lakázy

Dříve než byl připraven nosič pro imobilizovanou lakázu, bylo nutné stanovit aktivitu enzymu pomocí vybraných substrátů. Aktivita byla stanovena metodou zavedenou na našem pracovišti a publikovanou Rotkovou a kol. v roce 2009 [95] s mírnou modifikací pro naše podmínky. Pro stanovení aktivity byly použity dva substráty, Syringaldazin (SGZ) a diamoniová sůl 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny) (ABTS).

3.2.1 Stanovení aktivity solubilní lakázy pomocí substrátu Syringaldazinu

Při enzymatické přeměně substrátu Syringaldazinu (SGZ) lakázou dochází k rychlé precipitaci oxidačního produktu, který má fialovou barvu. Přeměna substrátu byla měřena kineticky ve 30 s intervalech (viz obrázek 14) při vlnové délce 525 nm podle postupu uvedeného v kapitole 2.2.1 Rozsah koncentrací solubilní lakázy byl zvolen 0,002 I.U./1ml - 0,006 I.U./1ml Byla sestrojena kalibrační závislost změny absorbance za čas 90 s pro jednotlivé koncentrace (I.U.) lakázy (viz obrázek 14, tabulka 10).

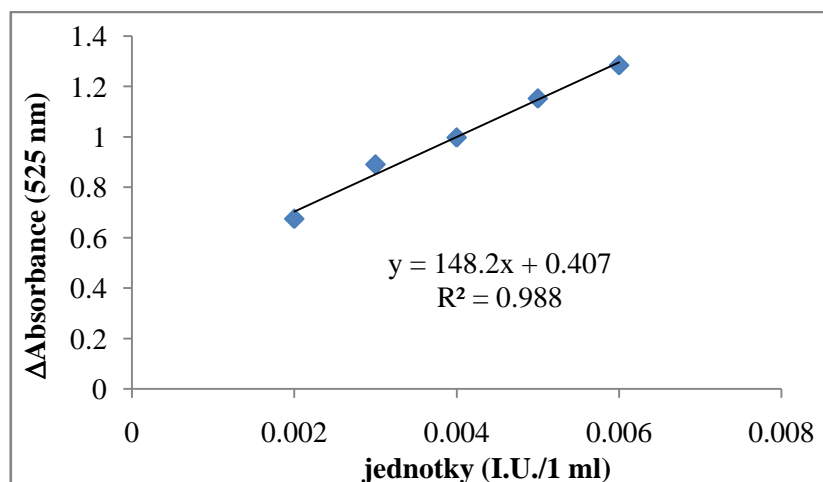


Obrázek č 14: Závislost absorbance na čase pro přeměnu substrátu solubilní lakázou z *Trametes versicolor*, různé koncentrace roztoků solubilní lakázy.

Pro sestrojení kalibrační přímky byla použita lineární vzestupná část jednotlivých křivek, která odpovídá přírůstku produktu v čase. Z této lineární oblasti bylo pro výpočet aktivity použito rozmezí 15 s – 105 s pro všechny koncentrace lakázy. Ze získaných hodnot (viz tabulka 10) byla sestrojena závislost změny absorbance za 90 s na koncentraci lakázy v I.U./ml (viz obrázek 15).

Tabulka 10: Změny absorbance za 90 s a koncentrace lakázy použité pro stanovení aktivity pomocí substrátu SGZ

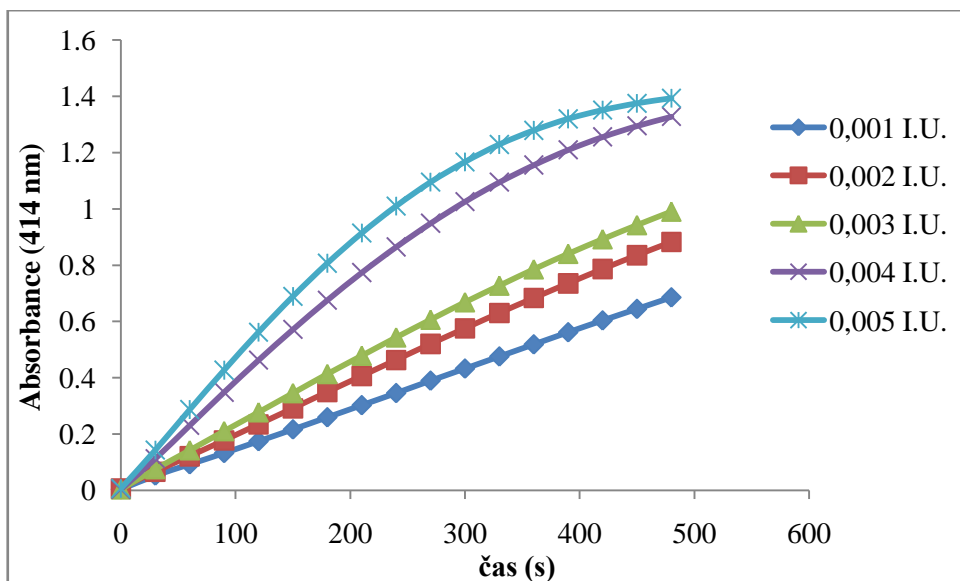
I.U.	$\Delta A/90$ s
0,002	0,675
0,003	0,891
0,004	0,998
0,005	1,153
0,006	1,285



Obrázek 15: Kalibrační přímka solubilní lakázy *Trametes versicolor* stanovená pomocí substrátu Syringaldazinu.

3.2.2 Stanovení aktivity solubilní lakázy pomocí substrátu diamoniové soli 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny)

I v případě substrátu ABTS probíhalo měření kineticky, v tomto případě při 414 nm podle postupu uvedeného v kapitole 2.2.2. Při přeměně substrátu ABTS odpovídá lineární část křivky opět přírůstku produktu za čas (viz obrázek 16). Rozsah koncentrací roztoků solubilní lakázy byl zvolen 0,001 I.U./1ml - 0,005 I.U./1ml Absorbance byla měřená v 30 s intervalech při vlnové délce 414 nm. Byla sestrojena kalibrační závislost změny absorbance za čas 210 s pro jednotlivé koncentrace lakázy v I.U./ml (viz obrázek 16).

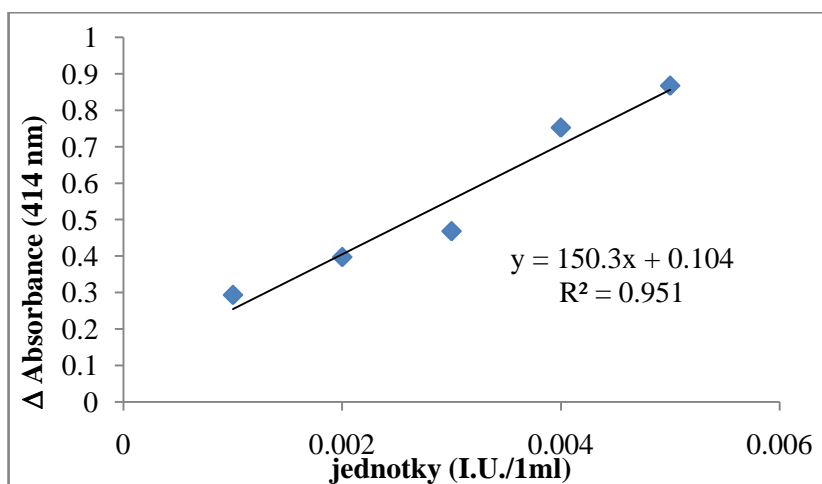


Obrázek 16: Kinetika přeměny substrátu ABTS solubilní lakázou *Trametes versicolor* o různé koncentraci.

Pro sestrojení kalibrační přímky byla použita vzestupná část křivky, která odpovídá přírůstku produktu v čase a bylo vybráno časové rozmezí 30 s – 240 s pro všechny koncentrace lakázy. Z hodnot uvedených tabulce 11 byla sestrojena závislost změny absorbance za čas 210 s na jednotkách lakázy (viz obrázek 17).

Tabulka 11: Změny absorbance za 210 s a koncentrace lakázy použité pro stanovení aktivity pomocí substrátu ABTS

I.U.	$\Delta A/210$ s
0,001	0,293
0,002	0,397
0,003	0,468
0,004	0,752
0,005	0,867



Obrázek 17: Kalibrační přímka solubilní lakázy *Trametes versicolor* stanovená pomocí substrátu ABTS.

3.3 Imobilizace lakázy na vybrané magnetické částice a stanovení její aktivity

Po ověření aktivity solubilní lakázy bylo vytipováno a otestováno různé magnetické částice pro imobilizaci lakázy.

Byly vybrány magnetické částice komerčně dostupné a částice syntetizované na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR (ÚMCH). Jejich přehled a vlastnosti jsou uvedené v tabulce 12. Částice se lišily materiálem, velikostí a funkčními skupinami použitými pro imobilizaci. Hydrazidová magnetická perlová celulóza (HMPC) byla použita pro svoji specifickou vazbu orientovanou na –OH skupiny, což znamená, že molekula enzymu musí být glykosylována.

Tabulka 12: Přehled vybraných magnetických částic, jejich velikost, funkční skupina a výrobce.

Magnetické částice	Velikost	Funkční skupina	Výrobce
Magnetická makroporézní perlová celulóza (MPC)	80 - 100 μm	-OH	Ionosorb MG 100 (Ústí n.L., ČR)
Hydrazidová magnetická makroporézní perlová celulóza (HMPC)	125 - 250 μm	-NH-NH ₂	ÚMCH AV ČR (Praha, ČR)
SiMAG-amin	1 μm	-NH ₂	Chemicell GmbH (Berlín, Německo)
SiMAG-carboxyl	1 μm	-COOH	Chemicell GmbH (Berlín, Německo)
HEMA-40% EDMA	4 μm	-COOH	ÚMCH AV ČR (Praha, ČR)
PGMA-40% EDMA	4 μm	-COOH	ÚMCH AV ČR (Praha, ČR)
ProMAG	0,88 μm	-COOH	ÚMCH AV ČR (Praha, ČR)

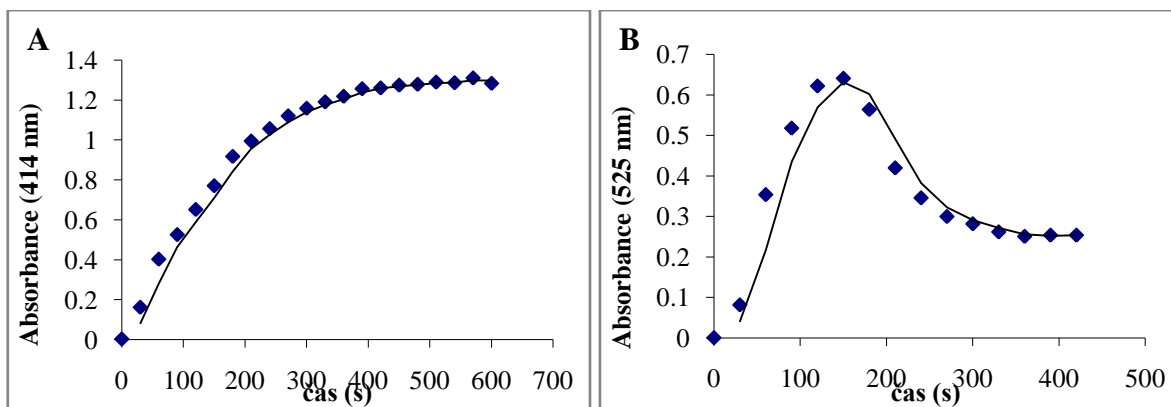
Postupy imobilizací lakázy z *Trametes versicolor* na jednotlivé magnetické částice jsou popsány v předešlých kapitolách experimentální části. Imobilizace lakázy na funkční skupiny –OH u magnetické makroporézní perlové celulózy (MPC) probíhá za stabilizace vazby kyanoborohydridem sodným, jehož přídávku předcházela oxidace lakázy pomocí jodistanu sodného. Při imobilizaci na částice SiMAG-amin, SiMAG-carboxyl, PGMA-40% EDMA a ProMAG byla použita karbodiimidová metoda s přídávkem EDC a S-NHS. Při orientované imobilizaci na HMPC byla lakáza nejdříve oxidována NaIO₄, oxidace byla zastavena přídávkem ethylenglykolu a vlastní imobilizaci předcházelo ještě odsolení vzorku na MicroSpin G-25 koloně. Aktivita po imobilizaci na MPC a HMPC byla vztažena na množství sedimentovaného nosiče (0,5 ml nebo 1 ml), kdežto u menších magnetických částic na 1 mg suspenze částic.

3.3.1 Stanovení aktivity imobilizované lakázy na MPC a HMPC

Po imobilizaci lakázy na dané magnetické částice je nutné ověřit její aktivitu. Aktivita byla stanovena pomocí dvou substrátů, SGZ a ABTS. Při stanovení aktivity imobilizované lakázy se bral sedimentovaný nosič, u MPC 50 µl a u HMPC 30 µl. U menších magnetických částic se bere suspenze nosiče s imobilizovaným enzymem (100 µg).

Pro stanovení aktivity imobilizované lakázy na magnetické perlové celulóze bylo bráno 50 µl sedimentovaného nosiče s imobilizovaným enzymem. Měření probíhalo dle postupu popsaného v kapitole 2.2.5 a 2.2.11. Absorbance byla měřena kineticky v 30 s intervalech, kdy 20 sekund byla směs míchána, následovala 10 sekund separace částic magnetem a měření absorbance. Měření probíhalo po celkovou dobu 10 minut a byla monitorována absorbance při vlnové délce $\lambda=525$ nm pro substrát SGZ a $\lambda=414$ nm pro substrát ABTS.

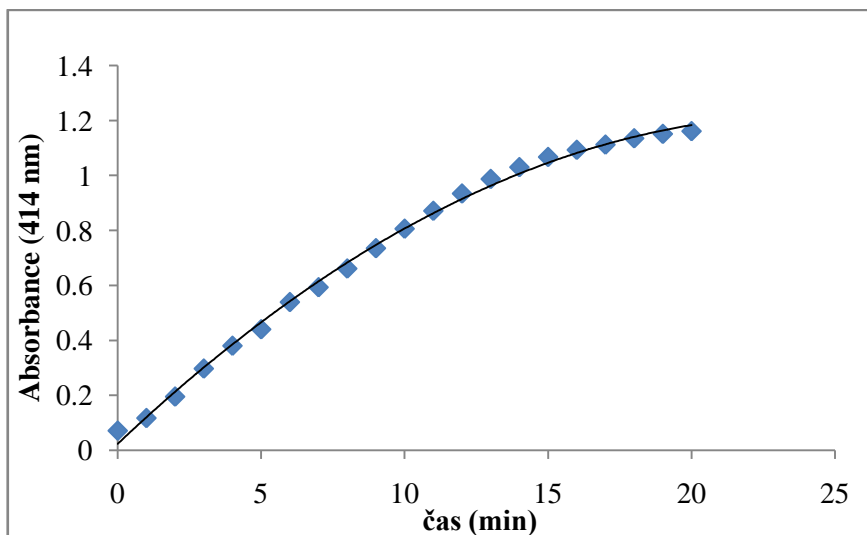
Z grafu (viz obrázek 18) byly vybrány změny absorbance za čas 30 s – 210 s (tj. 180 s) pro substrát ABTS a za čas 30 s – 90 s (tj. 60 s) pro substrát SGZ. Z kalibrace pak byla vypočítána aktivita imobilizované lakázy 0,004 I.U./1ml pro substrát SGZ a 0,096 I.U./1ml pro substrát ABTS (viz tabulka 13).



Obrázek 18: Kinetika přeměny substrátu ABTS (A) a SGZ (B) imobilizovanou lakázou *Trametes versicolor* na makroporézní magnetické perlové celulóze.

Pro stanovení aktivity lakázy imobilizované na hydrazidové magnetické perlové celulóze bylo bráno 30 μ l sedimentovaného nosiče s imobilizovaným enzymem. Měření probíhalo dle postupu viz kapitola 2.2.11. Absorbance byla měřena na spektrofotometru v minutových intervalech, kdy 45 sekund byla směs míchána, následovala 15 sekund separace částic magnetem a měření absorbance. Měření probíhalo po celkovou dobu 20 minut.

Z grafu (viz obrázek 19) byla vybrána změna absorbance za čas 60 s–240 s (tj, 180 s) a jejím dosazením do rovnice regrese byla vypočítána aktivita 0,035 I.U./1ml pro substrát ABTS (viz tabulka 13).



Obrázek 19: Kinetika přeměny substrátu ABTS imobilizovanou lakázou *Trametes versicolor* na hydrazidové magnetické perlové celulóze.

3.3.2 Stanovení aktivity imobilizované lakázy na částicích s funkčními skupinami –COOH nebo –NH₂

Pro stanovení aktivity lakázy imobilizované na magnetických částicích s funkčními skupinami –COOH nebo –NH₂ bylo v prvních pokusech bráno 100 µl suspenze nosiče s imobilizovaným enzymem a poté 400 µl suspenze, protože se nám nepodařilo dosáhnout hodnot, které by umožňovaly vyhodnocení a výpočet aktivity. Ani přes zvýšení množství částic s imobilizovaným enzymem nebylo možné aktivitu u některých magnetických částic stanovit. Reakce probíhala velmi pomalu, nebylo možné získat změny absorbance za dané časové rozmezí, díky kterým bychom měli vyhodnotit aktivitu z kalibrace získané pro solubilní lakázu. Ani další zvýšení množství magnetických částic nevedlo k vyhodnotitelným výsledkům. Při použití substrátu ABTS se nám podařilo stanovit aktivitu pouze pro lakázu imobilizovanou na částice SiMAG-amin a HEMA-40% EDMA (viz souhrnná tabulka 13). Pro částice SiMAG-amine však byla aktivita velice nízká, a proto i tyto částice byly z dalších experimentů vyřazeny

Vzhledem k tomu, že jsme využívali metodu stanovení aktivity, která byla již optimalizovaná a publikovaná a v případě MPC, HMPC a HEMA se podařilo získat enzymaticky aktivní nosič, neprováděli jsme další optimalizace (např. změnu koncentrace substrátu, teplotu apod.). Pro naše další experimenty pak byly využívány připravené aktivní nosiče. Nejvyšší aktivity bylo dosaženo imobilizací enzymu na nosič MPC.

Tabulka 13: Přehled aktivit imobilizované lakázy z *Trametes versicolor* na vybrané magnetické částice

Magnetická částice	Substrát	Výrobce	Funkční skupina	Aktivita
Magnetická makroporézní perlová celulóza	SGZ	Ionosorb MG 100	OH	0,004 I.U./1ml
	ABTS			0,096 I.U./1ml
Hydrazidová magnetická perlová celulóza	ABTS	ÚMCH AVČR	NH-NH ₂	0,035 I.U./1ml
SiMAG-amin	ABTS	Chemicell	NH ₂	0,0007 I.U./1ml
HEMA-40% EDMA	ABTS	ÚMCH AVČR	OH	0,0047 I.U./1ml
SiMAG-carboxyl	SGZ/ABTS	Chemicell	COOH	NA
PGMA-40% EDMA	SGZ/ABTS	ÚMCH AVČR	COOH	NA
ProMAG	SGZ/ABTS	ÚMCH AVČR	COOH	NA

3.4 Operační aktivita a skladovací stabilita

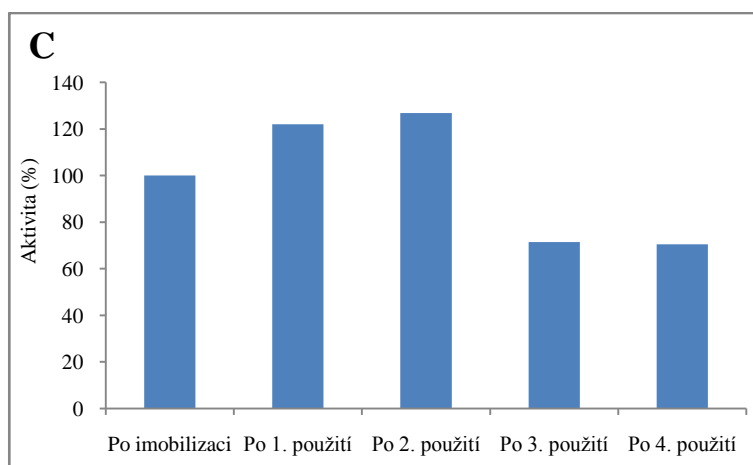
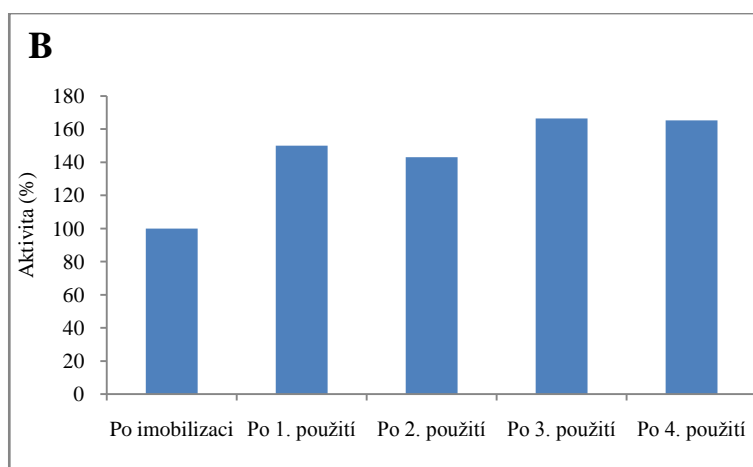
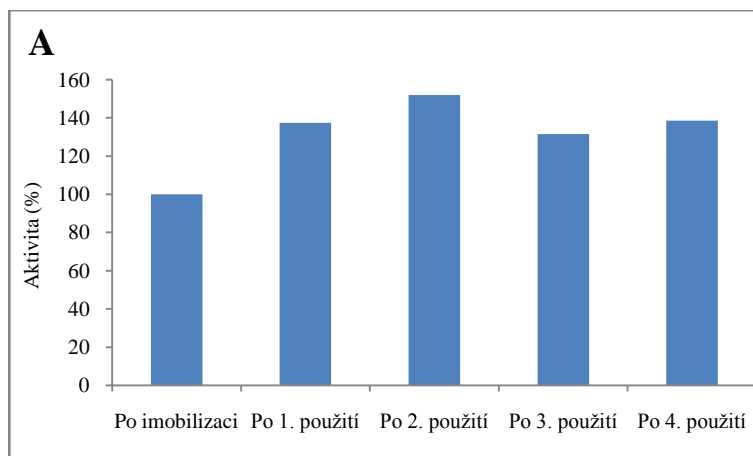
Nejen aktivita enzymu po imobilizaci je důležitým parametrem připravených nosičů, ale také operační aktivita a skladovací stabilita. Při operační aktivitě zjistíme, zda imobilizovaný enzym ztrácí svoji aktivitu při vícenásobném použití. Skladovací stabilita nám ukáže, zda se s dobou uskladnění mění i aktivita imobilizovaného enzymu.

Na základě předchozích výsledků byly vybrány nosiče MPC, HMPC a HEMA-40% EDMA, a u nich byla testována operační a skladovací stabilita. Operační stabilita byla ověřena opakovaným stanovením aktivity imobilizované lakázy u jednoho alikvotu částic s imobilizovanou lakázou, abychom zjistili, zda enzym ztrácí s používáním svoji aktivitu. Částice byly vždy mezi jednotlivým měřením promyty 0,05 M K-acetátovým pufrům pH 4,5.

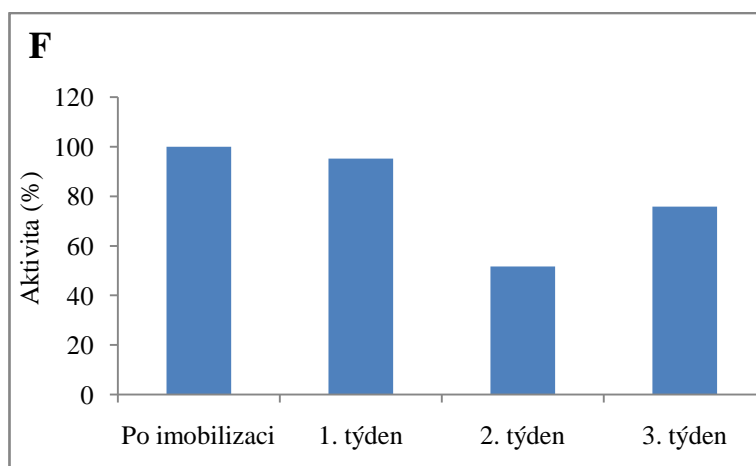
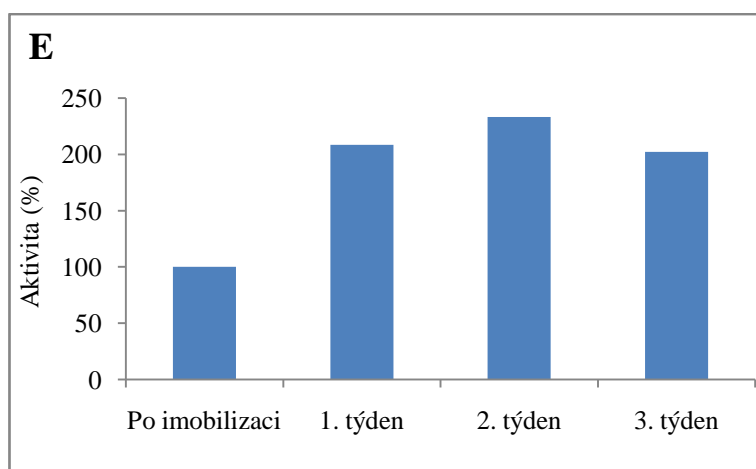
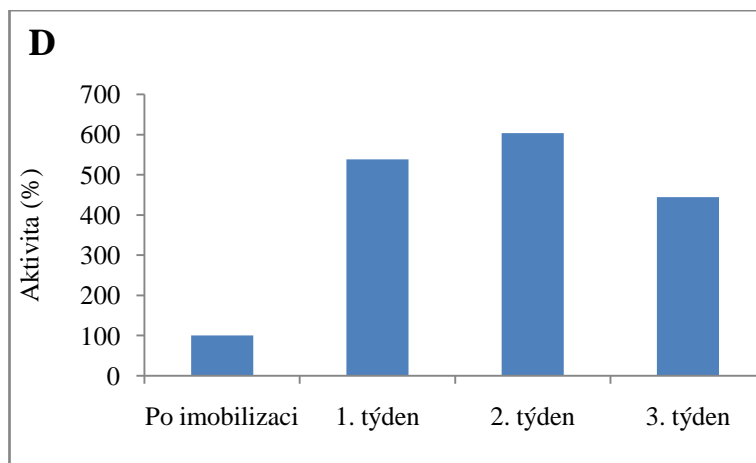
Skladovací stabilita byla ověřena stanovením aktivity vždy u čerstvého alikvotu po týdenních intervalech, abychom zjistili, zda enzym skladováním neztrácí svoji aktivitu. Nosiče s imobilizovanou byly po dobu skladování uchovány při 4 °C. Při všech stanoveních aktivity byl jako substrát použit ABTS a stanovení bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 2.2.5.

Při porovnání všech tří nosičů (viz obrázek 20, A-C) je viditelné, že lakáza imobilizovaná na magnetickou makroporézní perlovou celulózu (MPC) a hydrazidovou magnetickou perlovou celulózu (HMPC) neztrácí svoji aktivitu ani po 4. použití. Vzestup enzymové aktivity při druhém použití je běžný jev, který je u imobilizovaných enzymů pozorován, a může být způsoben aktivací enzymu substrátem. V případě nosiče HEMA-40% EDMA byl pozorován pokles aktivity již po druhém použití.

Skladovací stabilitu můžeme pozorovat na obrázcích D-F. Z grafů (viz obrázek 21, D-F) je viditelné, že skladování imobilizované lakázy na magnetické makroporézní perlové celulóze (MPC) a hydrazinové magnetické perlové celulóze (HMPC) její aktivitu nijak zásadně nesnižuje. Pokles byl zaznamenán až po 3. týdnu uskladnění. Aktivita imobilizované lakázy na magnetické částice HEMA-40% EDMA se skladováním zdatelně snižuje, proto byl tento nosič s dalších experimentů vyřazen.



Obrázek 20, A-C: Operační aktivita lakázy z *Trametes versicolor* imobilizované na: A) MPC, B) HMPC, C) HEMA-40% EDMA. Substrát ABTS, měřeno při vlnové délce $\lambda=414$ nm ve 2 minutových intervalech po dobu 20 minut.



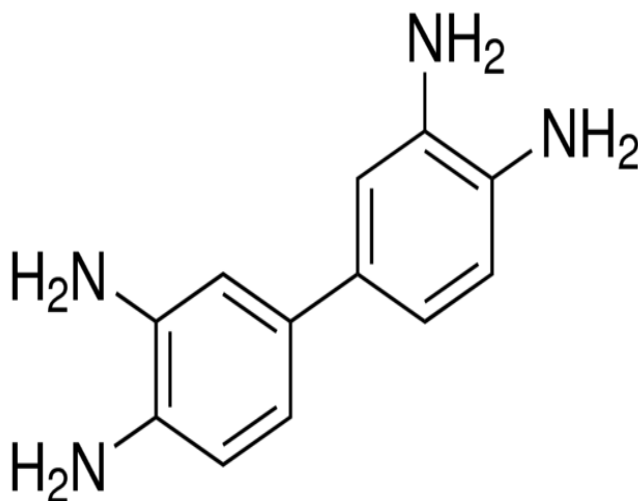
Obrázek 21, D-F: Skladovací stabilita lakázy z *Trametes versicolor* imobilizované na: A) MPC, B) HMPC, C) HEMA-40% EDMA. Substrát ABTS, měřeno při vlnové délce $\lambda=414$ nm ve 2 minutových intervalech po dobu 20 minut.

Ověřením operační aktivity a skladovací stability se jeví magnetická makroporézní perlová celulóza (MPC) a hydrazinová magnetická perlová celulóza (hydrazin. MPC) jako nejvíce vhodné nosiče pro imobilizaci lakázy. Pro experimenty s oxidací kyseliny hyaluronové pak byla vybrána MPC, která měla po imobilizaci nejvyšší aktivitu.

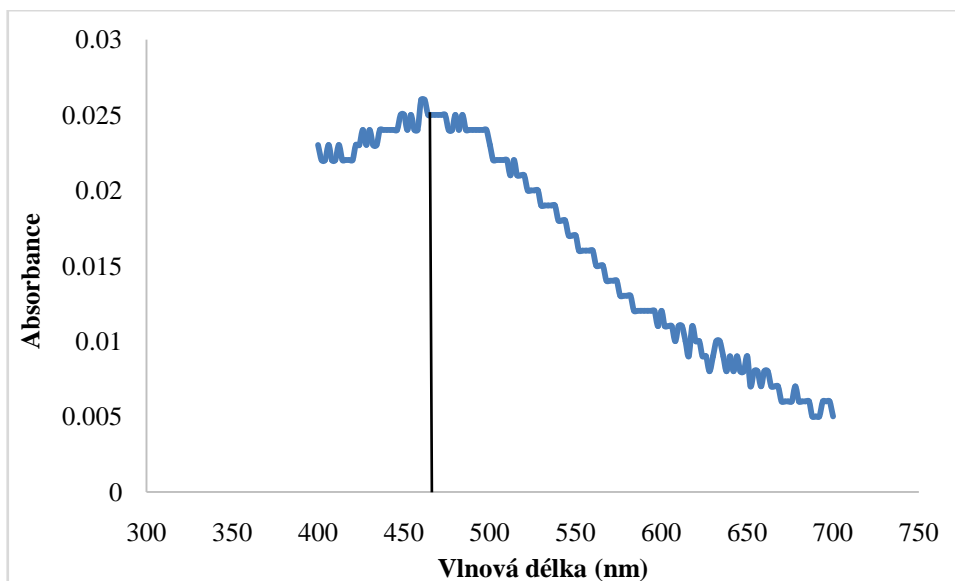
3.5 Oxidace kyseliny hyaluronové

Dle literatury může oxidace kyseliny hyaluronové, resp. jejích -OH skupin, probíhat až na úroveň karboxylu [77]. Avšak naším cílem bylo, aby produktem oxidace HA byl aldehyd. Důležitým krokem bylo najít vhodnou metodu pro prokázání přítomnosti aldehydových skupin, dostupnou v naší laboratoři a využitelnou pro průběžné ověřovací experimenty. Aldehydovou skupinu jsme se rozhodli prokázovat nepřímo s předpokladem vazby reaktivní látky obsahující aminoskupinu, konkrétně diaminobenzidinu (DAB) (viz obrázek 22). Ten lze detegovat spektrofotometricky, při jeho absorpčním maximu 465 nm [90]. Předpokládali jsme, že pokud by oxidace probíhala až na karboxyl, nemělo by spontánně dojít k navázání DAB. U vybraných vzorků pak byla provedena i FTIR analýza (viz obrázek 32, 33). Všechny vzorky jsme nechali dialyzovat, aby došlo k přečištění vzorku a odstranění nezreagovaných složek.

Diaminobenzidin (DAB) má absorpční maximum při vlnové délce okolo 465 nm (viz obrázek 23). Tato námi získaná hodnota se shoduje s hodnotou uvedenou v literatuře [90]. Při této vlnové délce jsme z našich spekter odečetli hodnoty absorbancí pro každý vzorek a vytvořili sloupcové grafy (viz obrázky 26, 28)

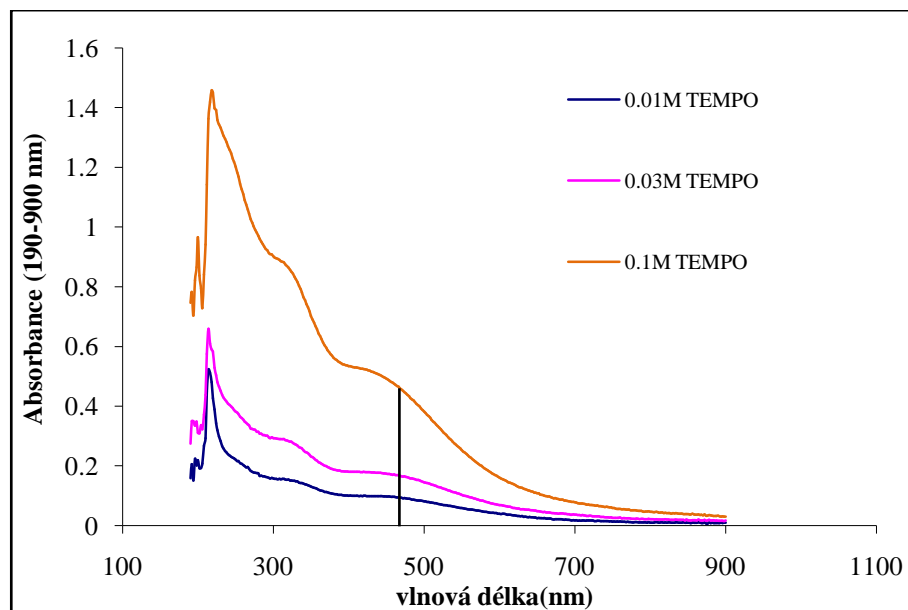


Obrázek 22: Struktura diaminobenzidinu. Převzato z [103].



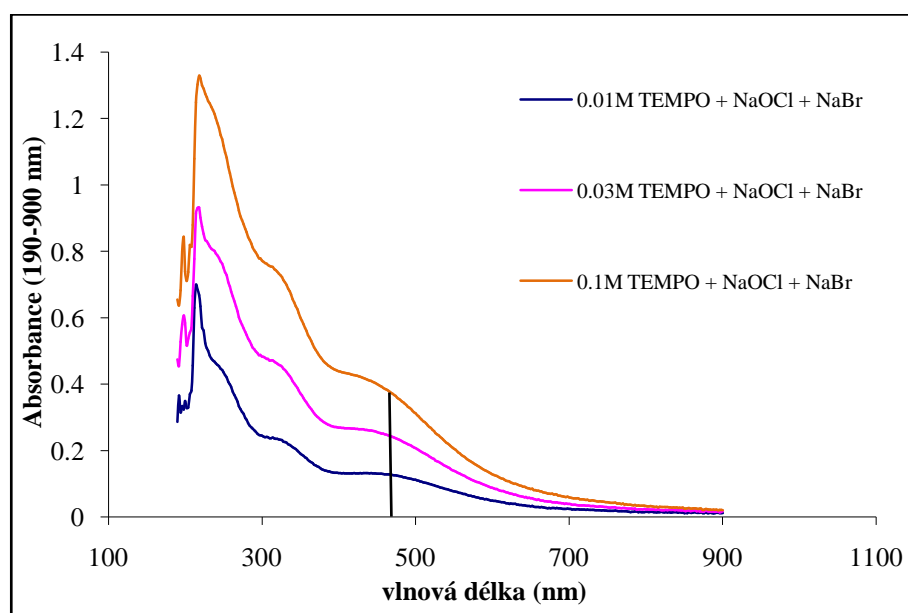
Obrázek 23: Závislost absorbance na vlnové délce pro diaminobenzidin (100 µg/ml). Absorpční maximum odpovídající $\lambda=465$ nm je vyznačené černou čarou. Spektrum bylo proměřeno v rozmezí vlnových délek 400 – 700 nm.

V našich prvních experimentech jsme nejdříve oxidovali HA pomocí TEMPO o různé koncentraci. Jednalo se o koncentrace: 0,01 M, 0,03 M a 0,1 M. Zkoušeli jsme variantu s i bez přídavku chlornanu sodného a bromidu sodného (viz obrázek 24, 25). Systém TEMPO-NaOCl-NaBr je používán právě za účelem získání aldehydů. Během této oxidace je NO^+ odvozený od TEMPO redukován na hydroxylamin. Nitrosioniový iont reaguje s hydroxylaminem, kdy dochází k regeneraci TEMPO a sám NO^+ se ve směsi kontinuálně regeneruje právě chlornanem sodným [29, 81]. Tato metoda je bez přítomnosti jak solubilní, tak imobilizované lakázy. Absorbance byla proměřena v rozmezí vlnových délek 190 – 900 nm. Podrobnější postup najdeme v kapitole 2.3.1.



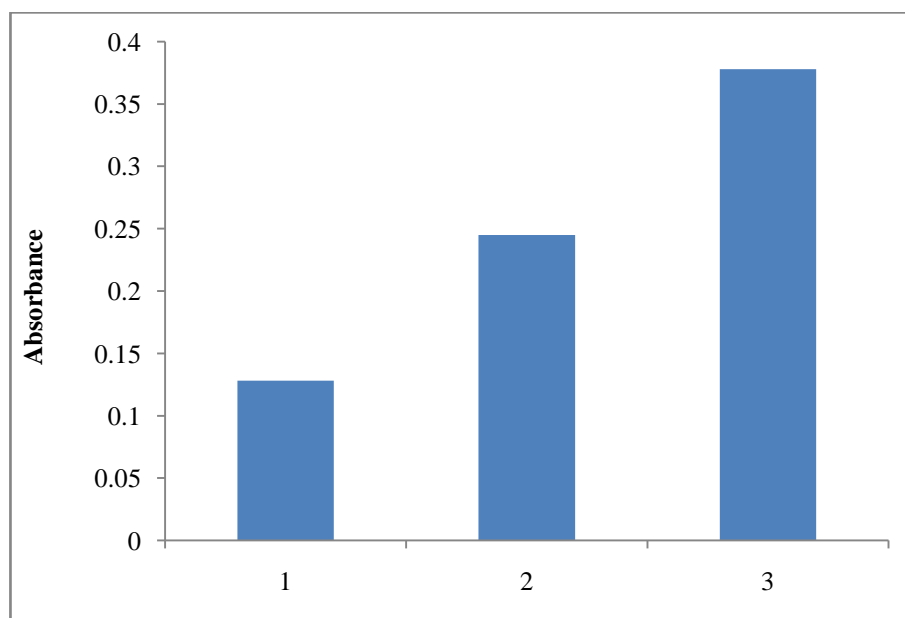
Obrázek 24: Závislost absorbance na vlnové délce pro oxidaci HA pomocí TEMPO o různé koncentraci s přidavkem DAB.

Množství oxidované HA o velikosti 1,8 MDa bylo 1 mg na 2 ml reakčního objemu. Absorbance byla měřena v rozmezí vlnových délek 190-900 nm. Absorpční maximum DAB pro odečet absorbance je vyznačeno černou čarou (465 nm). Píky při nižších vlnových délkách mohou pocházet z ostatních složek kyseliny hyaluronové.



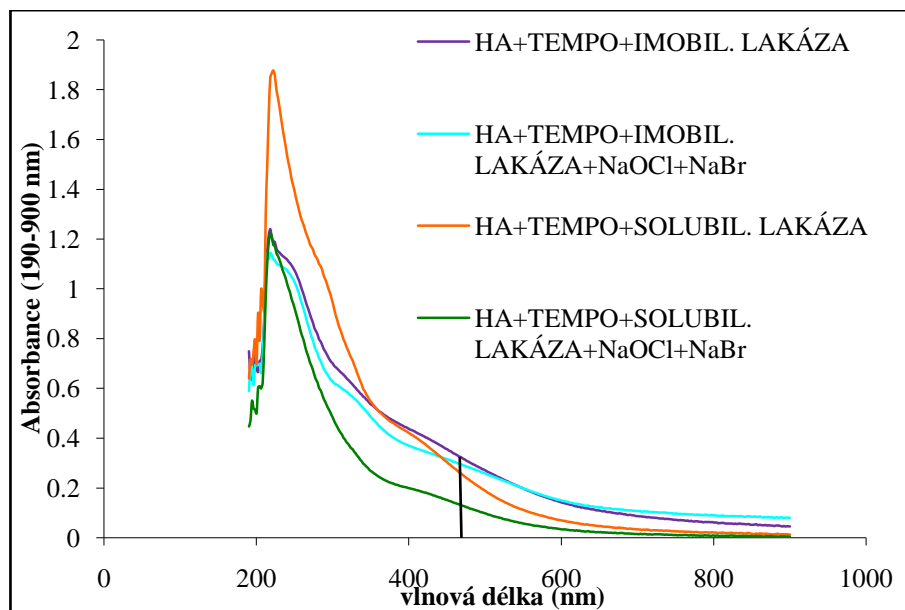
Obrázek 25: Závislost absorbance na vlnové délce pro oxidaci HA pomocí TEMPO o různé koncentraci s přidavkem DAB, NaOCl a NaBr.

Množství oxidované HA o velikosti 1,8 MDa bylo 1 mg na 2 ml reakčního objemu. Absorbance byla měřena v rozmezí vlnových délek 190-900 nm. Absorpční maximum DAB, při kterém byly odečteny hodnoty absorbance je vyznačeno černou čarou v grafu a odpovídá 465 nm. Píky při nižších vlnových délkách pocházejí z ostatních složek reakční směsi.



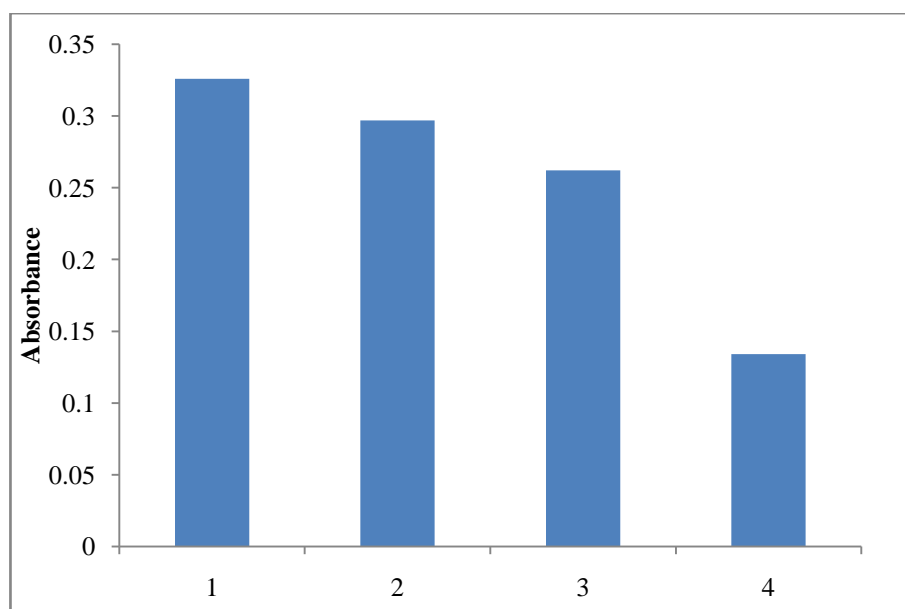
Obrázek 26: Absorbance odečtené při absorpčním maximu DAB, tj. $\lambda=465$ nm. 1 - 0,01 M TEMPO+NaOCl+NaBr, 2 - 0,03 M TEMPO+NaOCl+NaBr, 3 - 0,1 M TEMPO+NaOCl+NaBr.

Při další oxidaci HA o velikosti 1,8 MDa jsme použili 0,1 M TEMPO, s kterým bylo v předešlých experimentech dosaženo teoreticky nejlepších výsledků, ale za přídavku imobilizované (200 μ l sedimentovaného nosiče) a solubilní lakázy (3 I.U.), chlornanu sodného a bromidu sodného a následně po oxidaci opět diaminobenzidinu. Absorbance byla proměřena v rozmezí vlnových délek 190 – 900 nm. Podrobnější postup najdeme v kapitole 2.3.1.



Obrázek 27: Závislost absorbance na vlnové délce pro oxidaci HA pomocí 0,1 M TEMPO v přítomnosti solubilní a imobilizované lakázy s přidavkem DAB, NaOCl a NaBr.

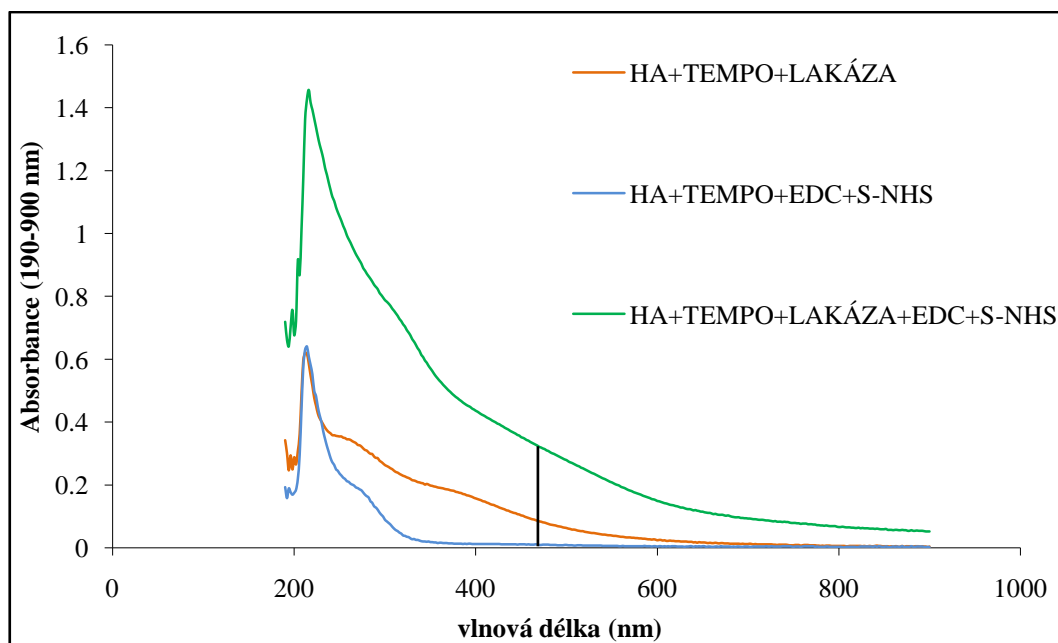
Množství oxidované HA o velikosti 1,8 MDa bylo 1 mg na 2 ml reakčního objemu. Absorbance byla měřena v rozmezí vlnových délek 190-900 nm. Absorpční maximum DAB, při kterém byly odečteny hodnoty absorbance je vyznačeno černou čarou v grafu a odpovídá 465 nm. Píky při nižších vlnových délkách pocházejí z ostatních složek reakční směsi.



Obrázek 28: Absorbance odečtené při absorpčním maximu DAB, tj. $\lambda=465$ nm. 1 – HA+TEMPO+imobil. lakáza, 2 – HA+TEMPO+imobil. lakáza+NaOCl+NaBr, 3 – HA+TEMPO+solubil. lakáza, 4 – HA+TEMPO+solubil. lakáza+NaOCl+NaBr.

Porovnáním sloupcových grafů (viz obrázek 26, 28), podle nevyšších hodnot změřené absorbance vzorků, můžeme vyhodnotit, že největší množství kyseliny hyaluronové bylo oxidováno použitím 0,1 M TEMPO v kombinaci s NaOCl a NaBr. V dalším experimentu je prokazatelné (viz obrázek 28), že je systém TEMPO-NaOCl-NaBr účinný i společně s imobilizovanou lakázou na makroporézní magnetické perlové celulóze (MPC). Avšak největší oxidační schopnosti prokazuje 0,1 M TEMPO v kombinaci s imobilizovanou lakázou na MPC.

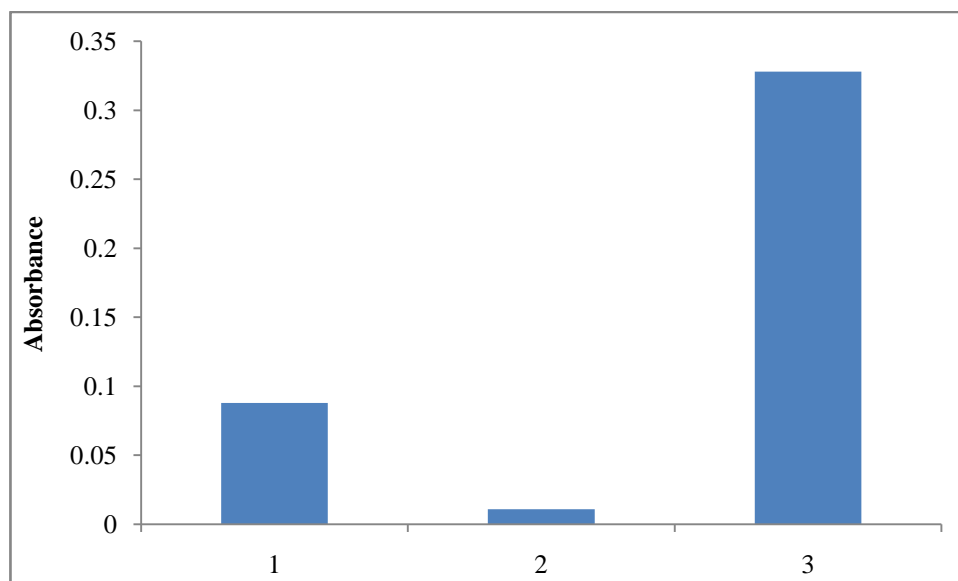
Pro další plánované experimenty jsme předpokládali, že pokud by došlo k oxidaci hydroxylových skupin až na skupiny karboxylové, po oxidaci přidávaný diaminobenzidin by se nenavázal. K vazbě by došlo v případě, že vzniklé karboxylové skupiny by byly aktivovány přidavkem karbodiimidu (EDC) a N-hydroxysulfosukcinimidu (S-NHS). Pokud oxidace proběhla na požadovanou karboxylovou skupinu, přidavek EDC a S-NHS nebude mít žádný vliv. Experiment byl proveden za stejných podmínek, pouze po oxidaci s přidavkem EDC a S-NHS podle postupu uvedeného v kapitole 2.3.3. Výsledky jsou uvedeny na obrázcích 29 a 30.



Obrázek 29: Závislost absorbance na vlnové délce pro oxidaci HA pomocí 0,03 M TEMPO v přítomnosti imobilizované lakázy s přidavkem DAB, EDC a S-NHS.

Množství oxidované HA o velikosti 1,8 MDa bylo 1 mg na 2 ml reakčního objemu. Absorbance byla měřena v rozmezí vlnových délek 190-900 nm. Absorpční maximum DAB,

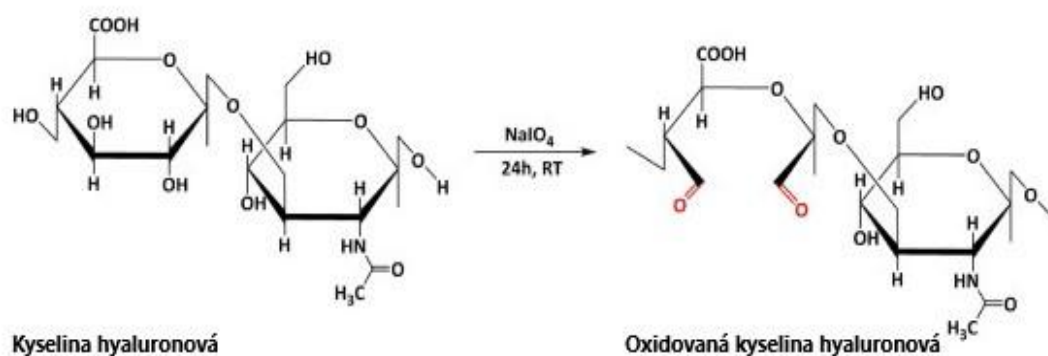
při kterém byly odečteny hodnoty absorbance je vyznačeno černou čarou v grafu a odpovídá 465 nm.



Obrázek 30: Absorbance odečtené při absorpčním maximu DAB, tj. $\lambda=465$ nm 1 – HA+TEMPO+imobil. lakáza, 2 – HA+TEMPO+EDC+S-NHS, 3 – HA+TEMPO+imobil. lakáza+EDC+S-NHS.

Při porovnání obrázků 28 a 30 můžeme říct, že přidavek EDC a S-NHS neměl na vznik aldehydových skupin žádný vliv. Protože hodnoty absorbancí pro vzorky, ve kterých je obsažena HA+TEMPO+imobilizovaná lakáza, jsou stejné s i bez přídavku EDC a S-NHS.

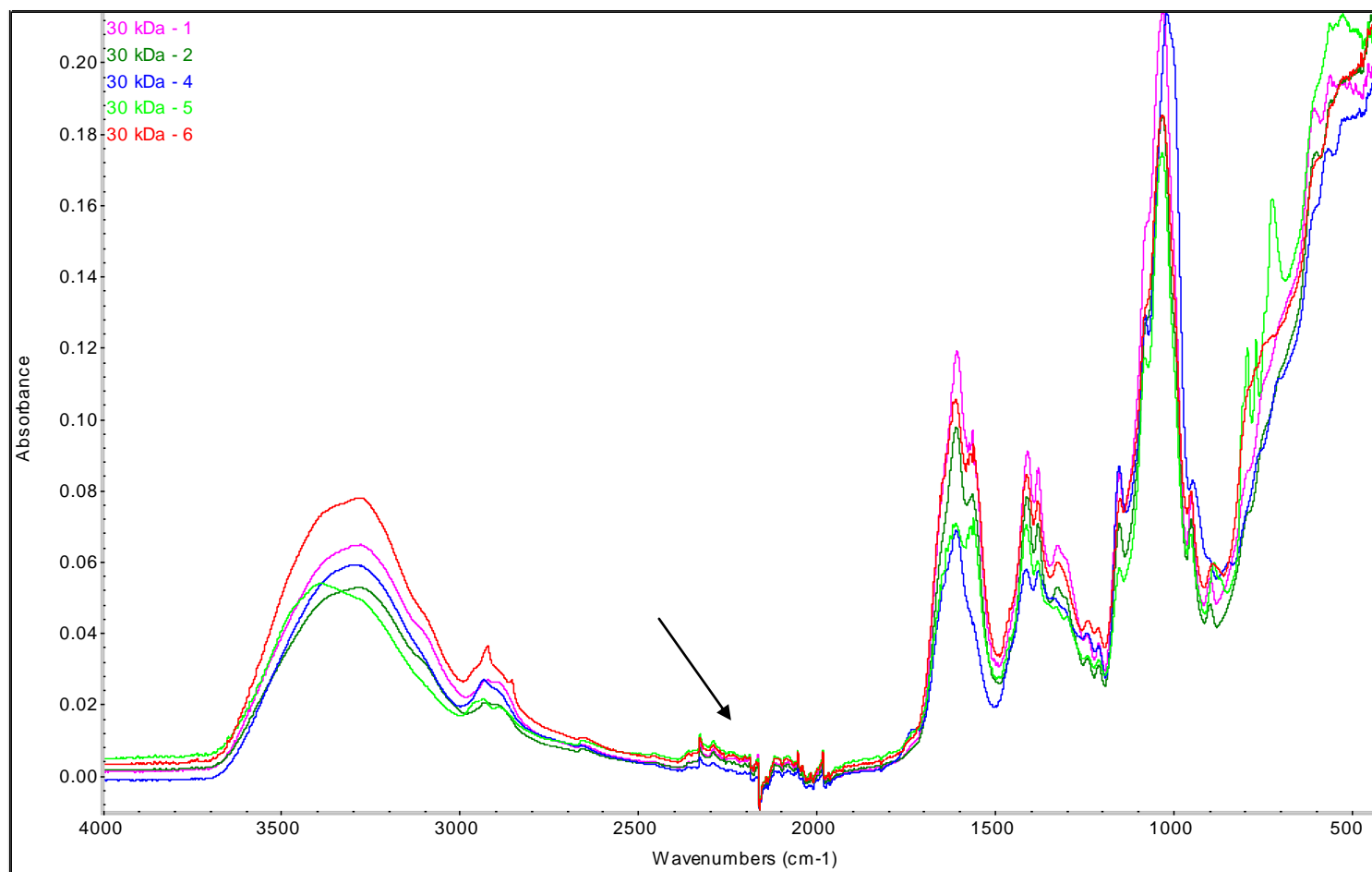
Dalším oxidačním činidlem kyseliny hyaluronové, které jsme zkoušeli, byl jodistan sodný, který by měl HA oxidovat na aldehyd [89]. Proto byl do našeho experiment zařazen jako standardní srovnávací metoda. Ke vzorku byla opět přidána reaktivní látka diaminobenzidin, která by se po oxidaci vážala na vzniklé aldehydové skupiny (viz obrázek 31). Detekce probíhala stejně jako u oxidace pomocí TEMPO, spektrofotometricky v rozmezí vlnových délek 190-900 nm a byla odečítána hodnota absorbance při 465 nm. Oxidované množství imobilizované lakázy o velikosti 1,8 MDa bylo 1 mg v reakčním objemu 2ml. Postup metody je podrobně popsán v kapitole 2.3.4.



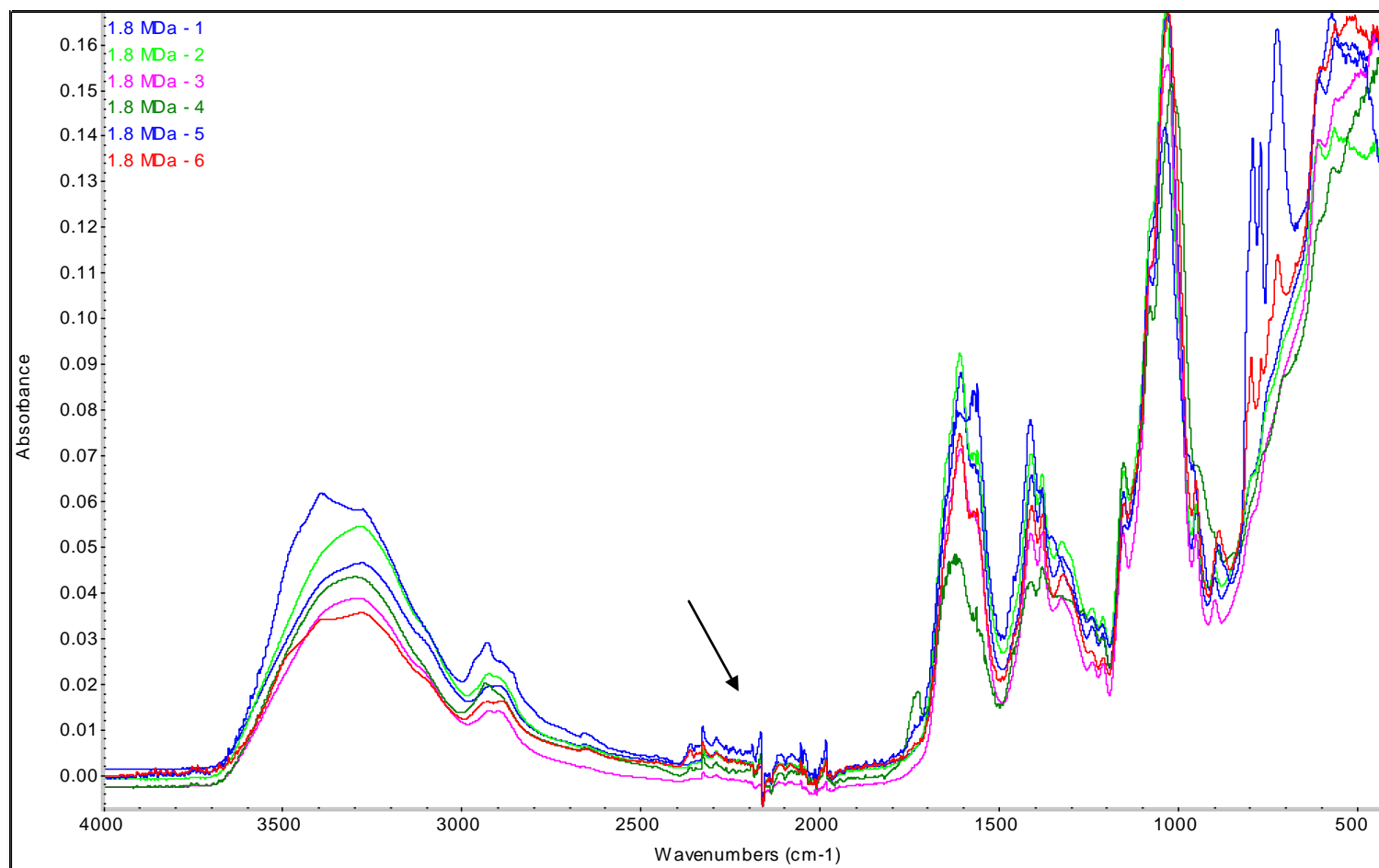
Obrázek 31: Schéma mechanismu oxidace HA pomocí NaIO_4 . Převzato a upraveno [89].

Bohužel výsledky zvolené nepřímé metody neposkytly jednoznačné a průkazné výsledky, protože výsledky absorpčních měření byly stejné jako v předešlých měřeních.

Podářilo se nám výsledky experimentu doplnit o infračervenou spektrometrii s Fourierovou transformací (FTIR) oxidované kyseliny hyaluronové. Pro analýzu byly vybrány vzorky oxidované kyseliny hyaluronové o velikosti 30 kDa a 1,8 MDa a byla použita oxidační činidla stejná, jako v předešlých experimentech, a to bez a s přítomností solubilní nebo imobilizované lakázy. Analýza probíhala za podmínek uvedených v kapitole 2.4. a infračervená spektra jsou zobrazena na obrázcích 32 a 33..



Obrázek 32: IČ spektrum. Velikost HA je 30kDa. Aldehydová skupina vyznačena šipkou. 1 - HA + TEMPO, 2 - HA + TEMPO + NaOCl + NaBr, 3 - HA + TEMPO + imobilizovaná lakáza (200ul sedimentovaného nosiče), 4 - HA + TEMPO + solubilní lakáza (3 I.U.), 5 - HA + TEMPO + NaOCl + NaBr + imobilizovaná lakáza, 6 - HA + NaIO₄.



Obrázek 33: IČ spektrum. Velikost HA je 180Da. Aldehydová skupina vyznačena šipkou. 1 - HA + TEMPO, 2 - HA + TEMPO + NaOCl + NaBr, 3 - HA + TEMPO + imobilizovaná lakáza (200ul sedimentovaného nosiče), 4 - HA + TEMPO + solubilní lakáza (3 I.U.), 5 - HA + TEMPO + NaOCl + NaBr + imobilizovaná lakáza, 6 - HA + NaIO₄.

Na obou infračervených spektrech (viz obrázky 32, 33) můžeme pozorovat pík odpovídající karbonylové skupině. Jednalo se o vzorek obsahující oxidovanou kyselinu hyaluronovou, TEMPO a solubilní lakázu. U vzorku obsahující HA s větší molekulovou hmotností (1,8 MDa) je pík více viditelný. Může to být způsobené vznikem většího množství karbonylových skupin, což se odvíjí od většího počtu OH skupin v původní molekule HA.

FTIR analýza naznačuje, že by účinek lakázy mohl být pozitivní, avšak nejlepších výsledků bylo dosaženo pouze se solubilní lakázou. Důvodem může být větší množství solubilní lakázy než imobilizované. Experimenty již nebylo možné zopakovat s takovým množstvím nosiče, které by odpovídalo množství solubilní lakázy. V rámci dalších experimentů na toto téma by bylo třeba celé řady dalších optimalizací, ať už s množstvím činidel a jejich poměrů, tak různým množstvím enzymu. Zároveň by se mohla testovat i jiná činidla, která by byla po oxidaci vázána na modifikovanou kyselinu hyaluronovou a také byla lépe kvantifikovatelná.

4 Závěr

Jedním z hlavních cílů diplomové práce bylo připravit enzymaticky aktivní nosič s imobilizovanou lakázou s využitím magnetických částic a ověření její aktivity pomocí vybraných substrátů, jednalo se o Syringaldazin (SGZ) a diamoniovou sůl 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny) (ABTS). Nejlepší výsledky jsme pozorovali u magnetické makroporézní perlové celulóze (MPC), hydrazidové magnetické perlové celulóze (HMPC) a HEMA-40% EDMA. Tyto magnetické částice byly dále použity pro stanovení operační aktivity a skladovací stability, kde jsme si jejich vyhovující vlastnosti potvrdili.

Nosič s lakázou imobilizovanou na MPC byl dále použit při kontrolované oxidaci kyseliny hyaluronové (HA). Do experimentu byly zařazeny i vzorky se solubilní lakázou. Produktem oxidace měly být aldehydové skupiny, které jsme zjišťovali vazbou reaktivní látky, v našem případě diaminobenzidinu (DAB). Vyzkoušeli jsme oxidační činidla 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO) a jodistan sodný (NaIO_4). Bohužel žádné z experimentů nedávaly zvolenou metodou průkazné výsledky, proto jsme na závěr vzorky analyzovali pomocí infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací (FT-IR), kde jsme ve spektru pozorovali přítomnost aldehydových skupin v molekule produktu, a to u jednoho ze vzorků. Pozitivním výsledkem bylo, že se jednalo o vzorek, který byl oxidován za přítomnosti enzymu lakázy, ale jeho solubilní formy.

Tato práce se zabývala úplně novým tématem a veškeré výsledky jsou výsledky pouze prvotních experimentů. V rámci dalšího výzkumu v dané oblasti by byla nutná řada dalších optimalizací pro lepší a průkaznější výsledky.

Na závěr mělo také dojít k propojení naší práce s další diplomovou prací, kdy měla být oxidovaná kyselina hyaluronová použita pro tvorbu nanočástic. Bohužel k tomuto propojení nedošlo z důvodu nedokončení dané diplomové práce.

5 Seznam použité literatury

- [1] AMADO, I. R., VÁZQUEZ, J. A., PASTRANA, L., TEIXEIRA, J. A. Cheese whey: A cost-effective alternative for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. *Food Chemistry*, 2016, 198, 54-61.
- [2] SIMULESCU, V., KALINA, M., MONDEK, J., PEKAŘ, M. Long-term degradation study of hyaluronic acid in aqueous solutions without protection against microorganisms. *Carbohydrate Polymers*. 2016, 137, 664-668.
- [3] LALEVÉE, G., SUDRE, G., MONTEBAULT, A., MEADOWS, J., MALAISE, S., CRÉPET, A., DAVID, L., DELAIR, T. Polyelectrolyte complexes via desalting mixtures of hyaluronic acid and chitosan—Physicochemical study and structural analysis. *Carbohydrate Polymers*. 2016, 154, 86-95.
- [4] PIONTEK, K. Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, 277 (40), 37663-37669.
- [5] STOILOVA, I., KRASTANOV, A., STANCHEV, V. Properties of crude laccase from *Trametes versicolor* produced by solid-substrate fermentation. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2010, 01 (03), 208-215.
- [6] CLAUS, H. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*. 2004, 35 (1-2), 93-96.
- [7] BALDRIAN, P. Fungal laccases – occurrence and properties. – *FEMS Microbiology Reviews*. 2006, 30: 215–242.
- [8] BURKE, R. M., CAIRNEY, J. W. G. Laccases and other polyphenols oxidases in ecto- and ericoid mycorrhizal fungi. – *Mycorrhiza*. 2002, 12: 105–116.
- [9] KULYS, J., VIDZIUNAITE, R. Kinetics of laccase-catalysed TEMPO oxidation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2005, 37 (1-6), 79-83.
- [10] DURÁN, N., A ROSA, M., D'ANNIBALE, A., GIANFREDA, L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002, 31 (7), 907-931.
- [11] MAYER, A. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*. 2002, 60 (6), 551-565.
- [12] BALAZS, E. A., LAURENT, T. C., JEANLOZ, R. W. Nomenclature of hyaluronic acid. *Biochemical Journal*. 1986; 235 (3): 903.

- [13] TOOLE, B. P., WIGHT, T. N., TAMMI, M I. Hyaluronan-Cell Interactions in Cancer and Vascular Disease. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, 277 (7), 4593-4596.
- [14] TURLEY, E. A., NOBLE, P. W., BOURGUIGNON, L. Y. W. Signaling Properties of Hyaluronan Receptors. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, 277 (7), 4589-4592.
- [15] NEO, H., ISHIMARU, J-I., KURITA, K., N GOSS, A. The effect of hyaluronic acid on experimental temporomandibular joint osteoarthritis in the sheep. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 1997, 55 (10), 1114-1119.
- [16] HASCALL, V. Intracellular hyaluronan: a new frontier for inflammation? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2004, 1673 (1-2), 3-12.
- [17] BARBUCCI, R., LAMPONI, S., BORZACCHIELLO, A., AMBROSIO, L., FINI, M., TORRICELLI, P., GIARDINO, R. Hyaluronic acid hydrogel in the treatment of osteoarthritis. *Biomaterials* 2002, 23, 4503–4513.
- [18] MEDINA, J. M., THOMAS, A., DENEGAR, C. R. Knee osteoarthritis: Should your patient opt for hyaluronic acid injection? *Journal of Family Practice*. 2006, 8, 667–675.
- [19] UTHMAN, I. Intra-articular therapy in osteoarthritis. *Postgraduate Medical Journal*. 2003, 79 (934), 449-453.
- [20] SLÍVA, J., MINÁRIK, J. Hyaluronát – nejen pasivní pozorovatel, nýbrž aktivní modulátor imunních reakcí. *New EU Magazine of Medicine*, 2009, roč. 1, č. 2, s. 75-79.5
- [21] SCOTT, J. E., et al. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. Hyaluronan is a very efficient network-forming polymer. *Biochem J*. 1991, vol. 274, no. 3, p. 699-705.
- [22] STUHLMEIER, K. M. Aspects of the biology of hyaluronan, a largely neglected but extremely versatile molecule. *Wien Med Wochenschr*, 2006, vol. 56, p. 563-568.
- [23] VOET, D., VOETOVÁ, J. G. *Biochemie*. Nakladatelství Victoria Publishing a.s., Praha 1995, 1362 s. ISBN 80-85605-44-9.
- [24] MEYER, K., PALMER, J. W. The polysaccharide of the vitreous humor. *Journal of Biology and Chemistry*. 1934, 107, 629–634.
- [25] KAPOOR, P., SACHDEVA, Shabina, SACHDEVA, Silone. Topical hyaluronic acid in the management of oral ulcers. *Indian Journal of Dermatology*. 2011, 56 (3), 300-302.
- [26] RIVERA-HOYOS, C. M., MORALES-ÁLVAREZ, E. D., POUTOU-PIÑALES, R. A., PEDROZA-RODRÍGUEZ, A. M., RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R., DELGADO-BOADA, J. M. Fungal laccases. *Fungal Biology Reviews*. 2013, 27 (3-4), 67-82.

- [27] CIRIMINNA, R., PAGLIARO, M. Industrial Oxidations with Organocatalyst TEMPO and Its Derivatives. *Organic Process Research & Development*. 2010, 14 (1), 245-251.
- [28] MAJCHERCZYK, A., JOHANNES, C., HÜTTERMANN, A. Oxidation of aromatic alcohols by laccase from *Trametes versicolor* mediated by the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) cation radical and dication. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1999, 51 (2), 267-276.
- [29] BRAGD, P. L., VAN BEKKUM, H., BESEMER, A. C. TEMPO-Mediated Oxidation of Polysaccharides: Survey of Methods and Applications. *Topics in Catalysis*. 2004, 27 (1-4), 49-66.
- [30] MENDONÇA MACIEL, M. J., CASTRO E SILVA, A., TELLES RIBEIRO, H. C. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: a review. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2010, 13 (6), 0-0.
- [31] SHRADDHA, R. S., SEHGAL, S., KAMTHANIA, M., KUMAR, A. Laccase: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications. *Enzyme Research*. 2011, 1-11.
- [32] KARMALI, A. The Possible Role of Mushroom Nutrition as a Delivery Agent for Enzyme Therapy in Cancer Care-Chemical and Biological Properties of Mushroom Nutrition. *Mycology News – Vol.1, Edition 7, 2007*.
- [33] HILDÉN, K., HAKALA, T. K., LUNDELL, T. Thermotolerant and thermostable laccases. *Biotechnology Letters*. 2009, 31 (8), 1117-1128.
- [34] PALMIERI, G., GIARDINA, P., BIANCO, C., FONTANELLA, B., SANNIA, G. Copper Induction of Laccase Isoenzymes in the Ligninolytic Fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000, 66 (3), 920-924.
- [35] GUTIÉRREZ, A., DEL RÍO, J. C., IBARRA, D., et al. Enzymatic Removal of Free and Conjugated Sterols Forming Pitch Deposits in Environmentally Sound Bleaching of Eucalypt Paper Pulp. *Environmental Science & Technology*. 2006, 40 (10), 3416-3422.
- [36] MIKOLASCH, A., SCHAUER, F. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009, 82 (4), 605-624.
- [37] YAROLOV, I., SKOROBOGATKO, V., VARTANOV, S., and VARFOLOMEYEV, D. Laccase-properties, catalytic mechanism, and applicability. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1994, 49, 257–280.
- [38] XU, H., LAI, Y. Z., SLOMCZYNSKI, D., NAKAS, J. P., TANENBAUM, S. W. *Biotechnology Letters*. 19 (10), 957-960.

- [39] MANSUR, M., E. ARIAS, M., COPA-PATINO, J. L., FLARDH, M., GONZALEZ, A. E. The White-Rot Fungus *Pleurotus ostreatus* Secretes Laccase Isozymes with Different Substrate Specificities. *Mycologia*. 2003, 95 (6), 1013.
- [40] LI, K., XU, F., ERIKSSON, K. E. Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65, 2654–2660.
- [41] CALL, H. P., MÜCKE, I. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process). *Journal of Biotechnology*. 1997, 53 (2-3), 163-202.
- [42] MOROZOVA, O. V., SHUMAKOVICH, G. P., SHLEEV, S. V., YAROLOV, Y. I. Laccase-mediator systems and their applications: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2007, 43 (5), 523-535.
- [43] SCOTT, S. L., CHEN, W. J., BAKAC, A., ESPENSON, J. H. Spectroscopic parameters, electrode potentials, acid ionization constants, and electron exchange rates of the 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) radicals and ions. *The Journal of Physical Chemistry*. 1993, 97 (25), 6710-6714.
- [44] HODGE-DUFOUR, J., NOBLE, P. W., NORTON, M. R., BAO, C., WYSOKA, M., BURDICK, M. D., PURÉ, E. Induction of IL-12 and chemokines by hyaluronan requires adhesion-dependent priming of resident but not elicited macrophages. *Journal of Immunology*. 1997, 159 (5), 2492-2500.
- [45] KOGAN, G., ŠOLTÉS, L., STERN, R., GEMEINER, P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*. 2006, 29 (1), 17-25.
- [46] LEE, J. Y., SPICER, A. P. Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Current Opinion in Cell Biology*. 2000, 12 (5), 581-586.
- [47] PAPAKONSTANTINO, E., ROTH, M., KARAKIULAKIS, G. Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. *Dermato-Endocrinology*. 2014, 4 (3), 253-258.
- [48] TAMMI, M. I., DAY, A. J., TURLEY, E. A. Hyaluronan and Homeostasis: A Balancing Act. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, 277 (7), 4581-4584.
- [49] ANELLI, L., BIFFI, P. C., MONTANARI, F., QUICI, S. Fast and selective oxidation of primary alcohols to aldehydes or to carboxylic acids and of secondary alcohols to ketones mediated by oxoammonium salts under two-phase conditions. *The Journal of Organic Chemistry*. 1987, 52 (12), 2559-2562.

- [50] BARRIGA, S. 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO). *Synlett*. 2001, 2001 (04), 0563.
- [51] GEOGHEGAN, K. F., STROH, J. G. Site-directed conjugation of nonpeptide groups to peptides and proteins via periodate oxidation of a 2-amino alcohol. Application to modification at N-terminal serine. *Bioconjugate Chemistry*. 2002, 3 (2), 138-146.
- [52] HERMANSON, G. T. *Bioconjugate Techniques*. 3rd ed. Cambridge: Academic Press, 2013, 1200 p. ISBN: 9780123822390.
- [53] CHATGILIALOGLU, C., STUDER, A. *Encyclopedia of Radicals in Chemistry, Biology and Materials: Basic Concepts and Methodologies*. 1st. ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2012, 2324 p.
- [54] IBERT, M., MARSAIS, F., MERBOUH, N. BRÜCKNER, CH. Determination of the side-products formed during the nitroxide-mediated bleach oxidation of glucose to glucaric acid. *Carbohydrate Research*. 2002, 337 (11), 1059-1063.
- [55] KIRILYUG, I. A. et al. Synthesis of the tetraethyl substituted pH-sensitive nitroxides of imidazole series with enhanced stability towards reduction. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2004, Vol. 2, Issue 4, pp. 1025-1030.
- [56] LEBEDEV, O. L., KAZARNOVSKII, S. N. Catalytic oxidation of aliphatic amines with hydrogen peroxide. *Russian Journal of General Chemistry*, 1960, Vol. 30, No. 5, p. 1631-1635.
- [57] MARX, L., CHIARELLI, R., GUIBERTEAU, T., RASSAT, A. A comparative study of the reduction by ascorbate of 1,1,3,3-tetraethylisindolin-2-yloxy and of 1,1,3,3-tetramethylisindolin-2-yloxy. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*. (8), 1181-1182.
- [58] MCMURRY, J. *Organic Chemistry*. 8th ed. Singapore: Brooks/Cole Cengage Learning, 2011. ISBN 978-0-840054-53-1.

- [59] NICOLAOU, K. C., BODDY, C. N. C., NATARAJAN, S., YUE, T.-Y., LI, H., BRÄSE, S., RAMANJULU, J. M. New Synthetic Technology for the Synthesis of Aryl Ethers: Construction of C-O-D and D-O-E Ring Model Systems of Vancomycin. *Journal of the American Chemical Society*. 1997, 119 (14), 3421-3422.
- [60] NOULA, C., LOUKAS, V., KOKOTOS, G. An Efficient Method for the Synthesis of Enantiopure ω -Amino Acids with Proteinogenic Side Chain. *ChemInform*. 2003, 34 (3). DOI: 10.1002/chin.200303170.
- [61] OKAZAKI, S., MANNAN, Md A., SAWAI, K., MASUMIZU, T., MIURA, Y., TAKESHITA, K. Enzymatic reduction-resistant nitroxyl spin probes with spirocyclohexyl rings. *Free Radical Research*. 2009, 41 (10), 1069-1077.
- [62] ORGANIC CHEMISTRY PORTAL. TEMPO, 2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxy. Organic Chemistry Portal [online], 2018a.
- [63] ORGANIC CHEMISTRY PORTAL. Sodium Hypochlorite, Bleach, NaOCl. *Organic Chemistry Portal* [online], 2018b.
- [64] RAGHAVAN, S., REDDY, S. R. Practical, efficient, stereoselective, formal synthesis of (2R,3R,4R)-3-hydroxy-4-methylproline. *Tetrahedron Letters*, 2003, Vol. 44, Issue 40, pp. 7459-7462.
- [65] ROOT, K. S., HILL, C. L., LAWRENCE, L. M., WHITESIDES, G. M. The mechanism of formation of Grignard reagents: trapping of free alkyl radical intermediates by reaction with tetramethylpiperidine-N-oxyl. *Journal of the American Chemical Society*. 1989, 111 (14), 5405-5412.
- [66] STOHRER, J. et al. Preparation of alkyne-carboxylic acids and alkyne alcohol esters of alkyne-carboxylic acids by oxidation of alkyne alcohols. US Patent 20030158439 A1, 2003.

- [67] WEE, A. G., SLOBODIAN, J., FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, M. A., AGUILAR, E. Sodium Periodate. *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2001, 2006-09-15.
- [68] ZANOCCO, A. L., CAÑETEM, A., MELENDEZ, M. X. A kinetic study of the reaction between 2p – methoxyphenyl-4-phenyl-2-oxazolin-5-one and 2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyln-oxide. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*. 2000, 45 (1).
- [69] SUNDAR, S., KUNDU, J., KUNDU, S. C. Biopolymeric nanoparticles. *Science and Technology of Advanced Materials*. 2010, 11 (1), 014104. DOI: 10.1088/1468-6996/11/1/014104.
- [70] VALO, H. *Biopolymer-Based Nanoparticles for Drug Delivery*. Finsko, Helsinki, 2012. Disertační práce. Helsinská univerzita. Vedoucí práce Doc. Leena Peltonen, Doc. Timo Laaksonen, Prof. Jouni Hirvonen.
- [71] NITTA, S. K., NUMATA, K. Biopolymer-Based Nanoparticles for Drug/Gene Delivery and Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013, 14 (1), 1629-1654. DOI: 10.3390/ijms14011629.
- [72] MOHAN, S., OLUWAFEMI, O. S., KALARIKKAL, N., THOMAS, S., SONGCA, S. P. Biopolymers – Application in Nanoscience and Nanotechnology. In: PARVEEN, Farzana Khan, ed. *Recent Advances in Biopolymers*. InTech, 2016. DOI: 10.5772/62225.
- [73] MARODA, M., BODNÁR, M., BERKÓ, S. Preparation and investigation of a cross-linked hyaluronan nanoparticles system. *Carbohydrate Polymers*. 2011, 83 (3), 1322-1329. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.09.039.
- [74] BODNÁR, M., DARÓCZI, L., BATTÁ, G., BAKÓ, J., HARTMANN, J. F., BORBÉLY, J. Preparation and characterization of cross-linked hyaluronan nanoparticles. *Colloid and Polymer Science*. 2009, 287 (8), 991-1000. DOI: 10.1007/s00396-009-2061-9.
- [75] SEHGAL, D., VIJAY, I. K. A Method for the High Efficiency of Water-Soluble Carbodiimide-Mediated Amidation. *Analytical Biochemistry*. 1994, 218 (1), 87-91. DOI: 10.1006/abio.1994.1144.
- [76] HERMANSON, G. T. *Bioconjugate techniques*. Third edition. Amsterdam: Elsevier, 2013. ISBN 01-238-2240-8.

- [77] PONEDEL'KINA, I. Y., KHAIBRAKHMANOVA, E. A., TYUMKINA, T. V., ROMADOVA, I. V., ODINOKOV, V. N. Stoichiometric C6-oxidation of hyaluronic acid by oxoammonium salt TEMPO + Cl⁻ in an aqueous alkaline medium. *Carbohydrate Polymers*. 2015, 130, 69-76. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.04.054
- [78] PEI, J., YIN, Y., SHEN, Z., BU, X. ZHANG, F. Oxidation of primary hydroxyl groups in chito oligomer by a laccase-TEMPO system and physico-chemical characterisation of oxidation products. *Carbohydrate Polymers*. 2016, 135, 234. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.08.099.
- [79] QUINTANA, E., RONCERO, M. B., VIDAL, T., VALLS, C. Cellulose oxidation by Laccase-TEMPO treatments. *Carbohydrate Polymers*. 2017, 157, 1488-1495. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.11.033.
- [80] BOTELHO DA SILVA, S., KROLICKA, M., VAN DEN BROEK, L. A. M., FRISSEN, A. E., BOERIU, C. G. Water-soluble chitosan derivatives and pH-responsive hydrogels by selective C-6 oxidation mediated by TEMPO-laccase redox system. *Carbohydrate Polymers*. 2018, 186, 299-309. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.01.050.
- [81] DÍAZ-RODRÍGUEZ, A., MARTÍNEZ-MONTERO, L., LAVANDERA, I., GOTOR, V., GOTOR-FERNÁNDEZ, V. Laccase/2,2,6,6-Tetramethylpiperidinoxyl Radical (TEMPO): An Efficient Catalytic System for Selective Oxidations of Primary Hydroxy and Amino Groups in Aqueous and Biphasic Media. *Advanced Synthesis & Catalysis*. 2014, 356 (10), 2321-2329. DOI: 10.1002/adsc.201400260.
- [82] CRESCENZI, V., FRANCESCANGELI, A., RENIER, D., BELLINI, D. New Hyaluronan Chemical Derivatives. Regioselectively C(6) Oxidized Products. *Macromolecules*. 2001, 34 (18), 6367-6372. DOI: 10.1021/ma0102363.
- [83] LARRAÑETA, E., HENRY, M., IRWIN, N. J., TROTTER, J., PERMINOVA, A. A. DONNELLY, R. F. Synthesis and characterization of hyaluronic acid hydrogels crosslinked using a solvent-free process for potential biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*. 2018, 181, 1194-1205. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.12.015.
- [84] GUPTA, N., LEE, F. S., FARINAS, E. T. Laboratory evolution of laccase for substrate specificity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2010, 62 (3-4), 230-234. DOI: 10.1016/j.molcatb.2009.10.012.

- [85] LI, N.-N., FU, Ch.-P., ZHANG, L.-M.. Using casein and oxidized hyaluronic acid to form biocompatible composite hydrogels for controlled drug release. *Materials Science and Engineering: C*. 2014, 36, 287-293. DOI: 10.1016/j.msec.2013.12.025.
- [86] MOT, A. C., SILAGHI-DUMITRESCU, R. Laccases: Complex architectures for one-electron oxidations. *Biochemistry (Moscow)*. 2012, 77 (12), 1395-1407. DOI: 10.1134/S0006297912120085.
- [87] TETIANEC, L., CHALECKAJA, A., VIDZIUNAITE, R., KULYS, J., BACHMATOVA, I., MARCINKEVICIENE, L., MESKYS, R. Development of a laccase/syringaldazine system for NAD(P)H oxidation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2014, 101, 28-34. DOI: 10.1016/j.molcatb.2013.12.013.
- [88] HOLM, K. A., NIELSEN, D. M., ERIKSEN, J. Automated colorimetric determination of recombinant fungal laccase activity in fermentation samples using syringaldazine as chromogenic substrate. *Journal of Automatic Chemistry*. 1998, 20 (6), 199-203. DOI: 10.1155/S1463924698000261.
- [89] SU, Wen-Yu, CHEN, Yu-Chun, LIN, Feng-Huei. Injectable oxidized hyaluronic acid/adipic acid dihydrazide hydrogel for nucleus pulposus regeneration. *Acta Biomaterialia*. 2010, 6 (8), 3044-3055. DOI: 10.1016/j.actbio.2010.02.037
- [90] FAHIMI, H. D., HERZOG, V. A colorimetric method for measurement of the (peroxidase-mediated) oxidation of 3,3'-diaminobenzidine. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2016, 21 (5), 499-502. DOI: 10.1177/21.5.499.
- [91] KIM, H., JEONG, H., HAN, S. BEACK, S., HWANG, B. W. Myeonghwan SHIN, Seung Soo OH a Sei Kwang HAHN. Hyaluronate and its derivatives for customized biomedical applications. *Biomaterials*. 2017, 123, 155-171. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.01.029. ISSN 01429612.
- [92] CHRISTOPHER, L. P., YAO, B., JI, Y. Lignin Biodegradation with Laccase-Mediator Systems. *Frontiers in Energy Research*. 2014, 2. DOI: 10.3389/fenrg.2014.00012.
- [93] MARTINS, L. O., DURÃO, P., BRISSOS, V., LINDLEY, P. F. Laccases of prokaryotic origin: enzymes at the interface of protein science and protein technology. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2015, 72 (5), 911-922.
- [94] BETANCOR, L., JOHNSON, G. R., LUCKARIFT, H. R. Stabilized Laccases as Heterogeneous Bioelectrocatalysts. *ChemCatChem*. 2013, 5 (1), 46-60. DOI: 10.1002/cctc.201200611.

- [95] ROTKOVÁ, Jana, Romana ŠULÁKOVÁ, Lucie KORECKÁ, Pavla ZDRAŽILOVÁ, Miroslava JANDOVÁ, Jiří LENFELD, Daniel HORÁK a Zuzana BÍLKOVÁ. Laccase immobilized on magnetic carriers for biotechnology applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2009, 321 (10), 1335-1340. DOI: 10.1016/j.jmmm.2009.02.034.
- [96] LIU, Long, Yanfeng LIU, Jianghua LI, Guocheng DU a Jian CHEN. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microbial Cell Factories*. 2011, 10 (1), 99-. DOI: 10.1186/1475-2859-10-99.
- [97] Sigma Aldrich, Merc KGaA, Darmstadt, Germany, ©2018. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/214000?lang=en®ion=CZ>
- [98] Chem-Station, ©2014. Dostupné z: <https://en.chem-station.com/reactions-2/2014/03/tempo-oxidation.html>
- [99] Oxidation of primary alcohols to carboxylic acids with sodium chlorite catalyzed by tempo and bleach: 4-methoxyphenylacetic acid. *Organic Syntheses*. 2005, 81, 195-. DOI: 10.15227/orgsyn.081.0195.
- [100] PARDO, I., CAMARERO, S. Exploring the Oxidation of Lignin-Derived Phenols by a Library of Laccase Mutants. *Molecules*. 2015, 20 (9), 15929-15943. DOI: 10.3390/molecules200915929.
- [101] MICHOTA-KAMINSKA, A., WRZOSEK, B., BUKOWSKA, J. Resonance Raman Evidence of Immobilization of Laccase on Self-Assembled Monolayers of Thiols on Ag and Au Surfaces. *Applied Spectroscopy*. 2016, 60 (7), 752-757. DOI: 10.1366/000370206777887035.
- [102] GlycoForum, Biomaterials from Chemically-Modified Hyaluronan, ©2001. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA18/HA18.pdf>.
- [103] Sigma Aldrich, Merc KGaA, Darmstadt, Germany, ©2018. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/d12384?lang=en®ion=CZ>