



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**INKORPORACE GLUKÓZA OXIDÁZY DO
HYDROGELOVÝCH STRUKTUR**

INCORPORATION OF GLUCOSE OXIDASE INTO HYDROGEL STRUCTURES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Klára Suchá

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1681/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Klára Suchá**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Inkorporace glukóza oxidázy do hydrogelových struktur

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše na využití glukóza oxidázy v medicínských aplikacích a obecné využití v hydrogelech inkorporovaných enzymů.
2. Na základě rešerše navrhnout hydrogely vhodné k inkorporaci glukóza oxidázy a metodiky stanovení její aktivity.
3. Připravit hydrogely s inkorporovanou GO a potvrdit její aktivitu.
4. Zhodnotit tento komplex z hlediska přínosu k uvažovaným medicínským aplikacím.

Termín odevzdání bakalářské práce: 27.5.2022:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Klára Suchá
studentka

doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá inkorporací enzymu glukóza oxidázy do hydrogelových struktur, přičemž byla sledována aktivita enzymu po inkorporaci do hydrogelové struktury. Glukóza oxidáza byla inkorporována do agarózových hydrogelů s různou koncentrací (1 a 2 hm. %). Aktivita glukóza oxidázy byla stanovena pomocí vznikajícího peroxidu vodíku, jehož koncentrace byla měřena pomocí fluorescenční spektroskopie díky fluorescenční sondě Amplexové červení. Bylo zjištěno, že enzym byl aktivní i po inkorporaci do hydrogelu, avšak koncentrace vznikajícího peroxidu vodíku byly nižší ve srovnání s volným enzymem. Dále bylo zjištěno, že enzym reaguje i se samotnou agarózou, tato reakce ale významně neovlivnila reologické vlastnosti hydrogelu.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the incorporation of the enzyme glucose oxidase into hydrogel structures, while the activity of the enzyme after the incorporation into the hydrogel structure was monitored. Glucose oxidase was incorporated into the agarose hydrogel at various concentrations (1 and 2 wt. %). Glucose oxidase activity was determined using the resulting hydrogen peroxide, the concentration of which was measured by fluorescence spectroscopy using an Amplex Red fluorescence probe. The enzyme was found to be active even after incorporation into the hydrogel, but the concentrations of hydrogen peroxide formed were lower compared to the free enzyme. Furthermore, it was found that the enzyme reacts with agarose itself, but this reaction did not significantly affect the rheological properties of the hydrogel.

KLÍČOVÁ SLOVA

Glukóza oxidáza, agaróza, inkorporace enzymu, fluorescenční spektroskopie, aktivita enzymu, reologie

KEY WORDS

Glucose oxidase, agarose, enzyme incorporation, fluorescence spectroscopy, enzyme activity, rheology

SUCHÁ, Klára. Inkorporace glukóza oxidázy do hydrogelových struktur [online]. Brno, 2022 [cit. 2022-05-22]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/138847>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Filip Mravec.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

..... podpis studenta

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala doc. Ing. Filipovi Mravcovi, Ph.D. za jeho odborné rady, věnovaný čas a pomoc při řešení bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Janě Szabové za její ochotu, pomocnou ruku a čas, který mi věnovala při konzultacích. Mé poděkování patří i Ing. Jiřímu Smilkovi, Ph.D. za jeho čas a pomoc s měřením. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svojí rodině, přátelům a partnerovi za jejich podporu při celém studiu.

OBSAH

1	ÚVOD.....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Enzymy.....	8
2.1.1	Aktivita enzymů.....	8
2.1.2	Rychlost enzymaticky katalyzované reakce.....	8
2.2	Oxidoreduktázy.....	9
2.2.1	Glukóza oxidáza a její struktura.....	9
2.2.2	Stabilita glukóza oxidázy.....	10
2.2.3	Inhibitory glukóza oxidázy.....	10
2.2.4	Využití glukóza oxidázy.....	11
2.3	Reaktivní formy kyslíku.....	11
2.3.1	Vliv ROS na hojení ran.....	11
2.4	Gely.....	12
2.4.1	Rozdělení gelů.....	12
2.4.2	Hydrogely.....	12
2.4.3	Agaróza.....	12
2.5	Fluorescence.....	13
2.5.1	Instrumentace.....	15
2.5.2	Typy spekter.....	15
2.6	Detekce produktů enzymové reakce.....	15
2.6.1	Metoda stanovení peroxidu vodíku za použití homovanilové kyseliny.....	16
2.6.2	Metoda stanovení peroxidu vodíku za použití Amplexové červeni.....	16
2.6.3	Metoda stanovení peroxidu vodíku za použití ABTS.....	17
2.7	Reologické vlastnosti hydrogelových struktur.....	17
2.7.1	Viskoelastické látky.....	17
2.7.2	Oscilační testy.....	18
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	20
3.1	Inkorporace glukóza oxidázy do hydrogelu.....	20
3.1.1	Hydrogel na bázi alginátu.....	20
3.1.2	Peptidový hydrogel.....	20
3.1.3	<i>In situ</i> keratinový hydrogel.....	21
3.2	Fluorimetrická detekce produktů.....	22

3.2.1	Amplexová červeň	22
3.3	Kinetika enzymatické reakce	22
3.4	Vliv glukóza oxidázy na hojení ran.....	23
3.5	Shrnutí poznatků z literární rešerše a cíle práce.....	24
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	25
4.1	Použité chemikálie	25
4.2	Příprava roztoků a vzorků gelu	26
4.2.1	Příprava zásobního roztoku fluorescenční sondy	26
4.2.2	Příprava pufru	26
4.2.3	Příprava zásobního roztoku glukózy	26
4.2.4	Příprava zásobních roztoků enzymů	26
4.2.5	Příprava roztoků peroxidu vodíku na měření kalibrační křivky	26
4.2.6	Příprava hydrogelu s inkorporovanou glukóza oxidázou	27
4.3	Měření a zpracování výsledků.....	27
4.3.1	Fluorescence	27
4.3.2	Reologické vlastnosti	28
5	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	29
5.1	Optimalizace detekčního systému	29
5.1.1	Hledání optimálního složení reakční směsi	29
5.1.2	Měření kinetiky enzymové reakce	32
5.2	Měření kalibrační křivky	32
5.3	Měření hydrogelu s inkorporovanou glukóza oxidázou	33
5.4	Účinnost inkorporace glukóza oxidázy do hydrogelu	35
5.5	Reologické vlastnosti hydrogelů s inkorporovanou GOx.....	35
6	ZÁVĚR	38
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	40
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	45
8.1	Seznam použitých zkratk	45
8.2	Seznam použitých symbolů	45
9	PŘÍLOHY.....	46

1 ÚVOD

Hydrogely se v dnešní době těší velkému ohlasu v mnoha odvětvích průmyslu pro jejich všestranné využití. S hydrogely se setkáváme již od roku 1953, kdy na objev hydrogelu navázal český vědec, Otto Wichterle, který hydrogel využil pro výrobu měkké kontaktní čočky. Hydrogely jsou od té doby využívány například ve farmaceutickém průmyslu jakožto kryty ran, v kosmetickém průmyslu pro výrobu masek a v zemědělství pro zlepšování vlastností půd. Se stále rozvíjejícím se farmaceutickým průmyslem a se snahou naleznout nová řešení pro léčbu nemocí začala moderní medicína používat léky s obsahem enzymů například na podporu trávení (enzymy papain, pepsin, pankreatin), k rozpouštění krevních sraženin (např. v léčbě tepenných uzávěrů a mozkových příhod), ale i v lokální podobě k ošetřování nehojících se ran.

Cílem této bakalářské práce je inkorporace enzymu glukóza oxidázy do hydrogelu, kdy inkorporace by neměla výrazně negativně ovlivnit funkčnost tohoto enzymu. Tato práce by mohla přispět do výzkumu týkající se léčby chronických ran, a to právě díky účinkům glukóza oxidázy. Inspirací pro výběr tohoto enzymu byl komerčně dostupný lékařský med, který byl využíván již ve starověkém Egyptě pro jeho hojivé účinky. Tento léčivý efekt bývá částečně připisován glukóza oxidáze, která se v medu přirozeně vyskytuje a med díky ní dostává antiseptický účinek [1].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Enzymy

Enzymy jsou biokatalyzátory, které urychlují chemické reakce v organismech. Umožňují rychlý průběh reakcí za nízkých hodnot teplot, pH a tlaku. Chemicky se jedná o makromolekulární látky bílkovinné povahy. Enzymy se vyznačují výbornou účinností a specifitou ke svým substrátům. Prekurzory enzymů označujeme jako zymogeny a přeměnu na aktivní formu enzymu lze uskutečnit pomocí hydrolýzy části zymogenu [2,3].

Mechanismus účinku enzymů závisí na schopnosti enzymů zvýšit rychlost reakce snížením aktivační energie. V průběhu reakce se enzym (E) váže na substrát (S) a vytváří tak přechodný komplex zvaný enzym-substrát (ES). Na konci reakce je vytvořen produkt (P), enzym zůstává kompletně nezměněn a může vázat další substrát a katalyzovat další reakci. Aktivní místo je specifické místo na enzymu, kde se váže substrát. Strukturální komplementarita mezi enzymem a substrátem umožňuje selektivní řízení enzymatické reakce. Enzym se přizpůsobuje substrátu prostřednictvím konformační změny známé jako indukované přizpůsobení. V aktivním místě se nachází aminokyseliny, které vážou funkční skupiny substrátu a zajišťují tak jeho adekvátní umístění a tvorbu přechodného meziproduktu, který bude následně podroben katalýze [2].

Aktivita enzymu může být ovlivněna různými faktory. Obecně lze říct, že s rostoucí teplotou vzrůstá rychlost enzymově katalyzovaných reakcí. Nad kritickou hodnotou dochází poté k denaturaci enzymu. Druhým případem je vliv pH, kdy pro každý enzym je typické jiné rozmezí optimálních hodnot pH. Posledním příkladem jsou aktivátory a inhibitory enzymů, které jsou schopny modulovat rychlost enzymatické reakce [4].

2.1.1 Aktivita enzymů

Aktivita enzymů je vyjadřována jako rychlost katalyzované reakce, která se stanoví jako množství vytvořeného produktu nebo substrátu spotřebovaného při reakci za daný čas. Nejčastěji popisuje aktivitu jednotka katal, která vyjadřuje množství enzymu, které přemění 1 mol substrátu za 1 sekundu [2,3].

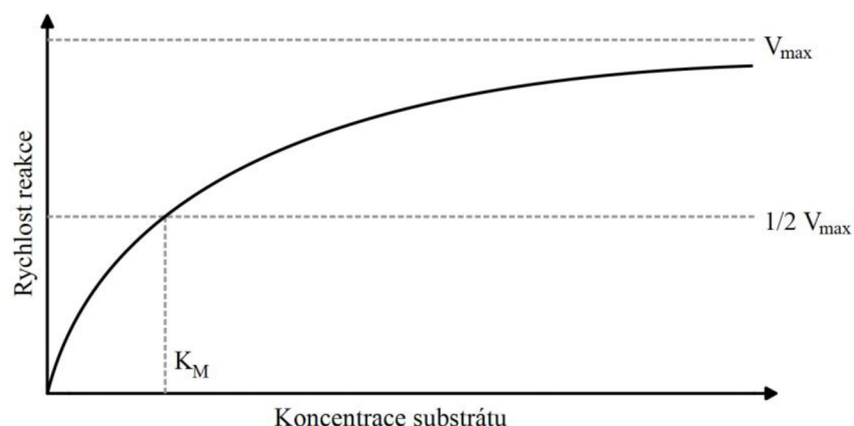
2.1.2 Rychlost enzymaticky katalyzované reakce

Rychlost enzymaticky katalyzované reakce při dané teplotě a pH závisí na koncentraci enzymu a koncentraci substrátu. Za předpokladu, že koncentrace substrátu je v přebytku, pak je počáteční rychlost přímo úměrná koncentraci enzymu.

Na začátku se reakce řídí kinetikou prvního řádu, kdy rychlost je úměrná koncentraci substrátu a poté následuje kinetika nultého řádu s rychlostí dosahující mezní hodnoty V_{\max} (viz Obr. 1). V_{\max} je rychlost reakce, kdy je enzym plně nasycen substrátem, tedy že všechna vazebná místa jsou obsazena. V_{\max} je konstantní pouze pro dané množství enzymu.

Koncentrace substrátu odpovídající polovině maximální rychlosti je známá jako tzv. Michaelisova konstanta (K_M), která je nepřímo úměrná afinitě enzymu k substrátu. K_M je specifická pro každý enzym a je nezávislá na množství enzymu. Vztah mezi reakční rychlostí a koncentrací substrátu je popsán Michaelis-Mentenovou rovnicí (1) [5].

$$V = \frac{V_{\max}S}{K_M + S} \quad (1)$$



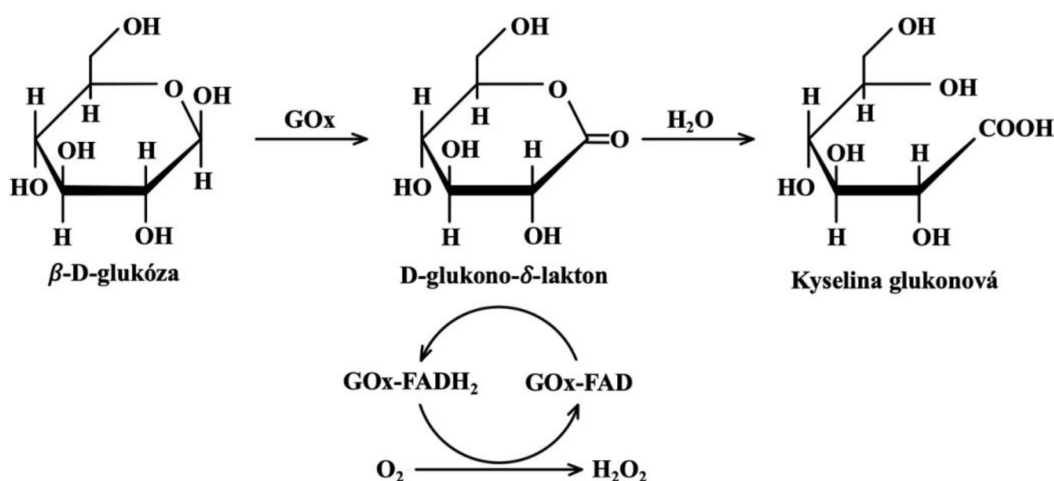
Obr. 1: Grafické znázornění závislosti rychlosti reakce na koncentraci substrátu (převzato a upraveno z [6])

2.2 Oxidoreduktázy

Oxidoreduktázy jsou typy enzymů, které katalyzují oxidačně redukční reakce. Oxidoreduktázy jsou skupinou, která zahrnuje dehydrogenázy a oxidázy. Mezi dehydrogenázy řadíme například laktát dehydrogenázu, alkohol dehydrogenázu a glutamát dehydrogenázu. K oxidázám patří např. kataláza nebo glukóza oxidáza [7]. Hlavní funkcí glukóza oxidázy (GOx, glucose oxidase) je tvorba glukonolaktonu a peroxidu vodíku, který vzniká jako vedlejší produkt reakce. Reakci znázorňuje rovnice (2) [8].



Tuto reakci lze rozdělit na redukční a oxidační část. V redukční reakci katalyzuje GOx oxidaci β -D-glukózy na D-glukono- δ -lakton, který je poté neenzymaticky hydrolyzován na kyselinu glukonovou. Následně je flavinadenin dinukleotid (FAD), který je součástí glukóza oxidázy, redukován na FADH₂. V oxidační části je redukováný GOx zpětně reoxidován kyslíkem za vzniku peroxidu vodíku [9]. Kompletní reakční schéma je znázorněno na Obr. 2.



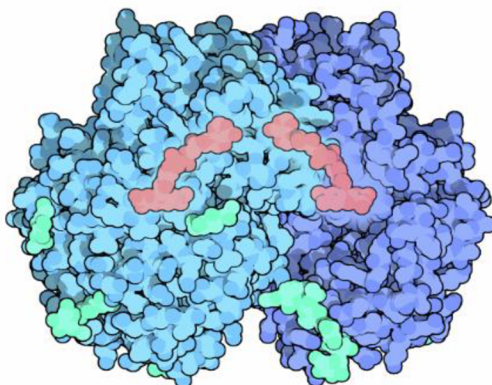
Obr. 2: Reakční mechanismus GOx (převzato z [10])

2.2.1 Glukóza oxidáza a její struktura

Glukóza oxidáza byla objevena v roce 1928 a získává se především z plísní *Aspergillus niger* a *Penicillium amagasakiense*. GOx získaný z *A. niger* je strukturně lehce prodloužený globulární protein velký zhruba 8 nm. [11]. Struktura glukóza oxidázy je podrobněji znázorněna na Obr. 3. GOx se skládá ze dvou polypeptidových řetězců, které jsou navzájem kovalentně

spojeny disulfidickými můstky. Na polypeptidické řetězce je vázána molekula flavinadeninindinukleotidu (FAD) [8,12].

Molekulová hmotnost glukóza oxidázy získané z *A. niger* je přibližně 150 kDa [13]. Molekula je tvořena až z 16 % sacharidovou složkou. GOx produkovaná oběma kmeny plísni má podobné složení sacharidové složky, která se skládá zejména z glukózy, manózy a hexosaminu. GOx vykazuje vysokou selektivitu pro β -D-glukózu a pouze okrajově vykazuje aktivitu s ostatními cukry. β -D-glukóza se oxiduje v přítomnosti molekulárního kyslíku v poloze C1 na δ -glukono-1,5-lakton, který spontánně hydrolyzuje na kyselinu glukonovou. Tyto strukturální vlastnosti a regioselektivita enzymatické reakce umožňují jasné rozlišení mezi glukóza oxidázou a pyranózo oxidázou, která oxiduje D-glukózu v poloze C2 [9].



Obr. 3: Struktura glukóza oxidázy, červeně jsou označeny molekuly FAD, zeleně sacharidová složka a modře jsou znázorněny polypeptidové řetězce [14]

2.2.2 Stabilita glukóza oxidázy

Lyofilizovaná forma glukóza oxidázy vykazuje extrémně stabilní vlastnosti. Při teplotě 0 °C je stabilní po dobu dvou let a při teplotě -15 °C vydrží stabilní až po dobu osmi let [11]. V roztoku je stabilita výrazně ovlivněna vlivem pH, kdy optimální hodnota pro její funkci je 5-7. GOx je také rezistentní vůči proteolýze a stabilita není ovlivněna ani po dlouhodobé expozici trypsinu, pepsinu a papainu. Detergenty mají obecně na stabilitu GOx pouze slabý vliv, ale při reakci konkrétně s iontovými detergenty, jako například dodecylsírán sodný a hexadecyltrimethylamonium bromid, je katalytická aktivita výrazně utlumena. GOx podléhá denaturaci až při teplotách vyšších než 50 °C. Proti vyšším teplotám však může být GOx chráněn pomocí polyhydroxy alkoholů jako je například glycerol [11]. Teplotní optimum GOx se pohybuje mezi 25–30 °C [9].

2.2.3 Inhibitory glukóza oxidázy

Jako inhibitory glukóza oxidázy mohou sloužit už při mikromolárních hodnotách těžké kovy jako například rtuť, olovo a stříbro. Podobný efekt mají také už milimolární hodnoty hydrazinu, hydroxylaminu a fenyhydrazinu. Druhé zmíněné nepůsobí na katalytickou aktivitu úplnou inhibicí, ale pouze sníží enzymatickou aktivitu. Aktivitu také významně snižuje přítomnost aldohexóz, jako například D-arabinóza a 2-deoxy-D-glukóza.

Při absenci dostatečného substrátu k oxidaci, dojde k samotné oxidaci glukóza oxidázy, což zapříčiní narušení celého reakčního mechanismu. Navrátit GOx zpět do původního funkčního stavu lze fotoredukci pomocí světla (vlnová délka 450 nm). Prodloužená expozice světlu ale může narušit flavinové molekuly vázané v molekule glukóza oxidázy. Další možností, jak zpětně vyredukovat GOx je pomocí bisulfátu. Při této reakci dojde ke spojení enzymu a molekuly FAD. Formace tohoto aduktu je efektivnější při nižším pH. Přebytný bisulfát lze odstranit pomocí dialýzy [11].

2.2.4 Využití glukóza oxidázy

Glukóza oxidáza se v posledních letech dostává do popředí výzkumů díky aplikacím v chemickém, farmaceutickém, potravinářském, nápojovém průmyslu, klinické chemii, biotechnologii a dalších průmyslových odvětvích. Glukóza oxidáza je nejrozšířenějším enzymem používaným jakožto analytické činidlo pro stanovení glukózy díky své relativně nízké ceně a výborné stabilitě. Jeho použití sahá od biosenzorů glukózy pro onemocnění diabetes až po konzervační látky a stabilizátory barev [9]. V potravinářském průmyslu našla GOx využití při odstraňování přebytečné glukózy a kyslíku v potravinách a nápojích. Tím lze dosáhnout delší životnosti potravin. Produkovaný peroxid vodíku má bakteriocidní účinky a lze jej poté odstranit z potravin pomocí enzymu kataláza, který peroxid vodíku konvertuje na kyslík a vodu [15].

2.3 Reaktivní formy kyslíku

Kyslík slouží jako esenciální substrát pro vznik molekul ATP. Tento děj je velice důležitý při procesu hojení ran, kde představuje tvorbu energie potřebné pro remodelaci tkáně. Termín radikálové deriváty molekul kyslíku nazývané též jako reaktivní formy kyslíku (ROS, reactive oxygen species) se používá pro molekuly, které obsahují molekuly O_2 , které jsou po přidání elektronu v radikálové, tedy ve vysoce reaktivní formě. Tyto podmínky splňují například molekuly peroxidu s funkční skupinou O_2^{2-} , superoxidy O_2^- , nebo hydroxy skupinou OH^- .

Dalším zástupcem reaktivních forem kyslíku může být i oxid dusnatý NO, jehož skupiny nazýváme reaktivní formy dusíku (RNS, reactive nitrogen species). Tyto skupiny jsou v lidském těle vytvářeny jako součást normální fyziologie oxidace NO. Oxid dusnatý spontánně reaguje s řadou molekul například molekulární O_2 , ROS, NO_2^- . Oxid dusnatý reaguje přímo s radikálovými formami kyslíku, patří tudíž k hlavním zástupcům RNS v biologických systémech. Řada buněk během přirozeného procesu hojení ran vytváří tyto reaktivní molekuly dusíku, mezi ně patří například krevní destičky, makrofágy, fibroblasty a keratinocyty [16].

2.3.1 Vliv ROS na hojení ran

ROS mají také významnou roli v buněčné homeostázi, kde bylo potvrzeno, že zvýšené hodnoty ROS podporují vznik obranné buněčné odezvy. Vysoké dávky ROS by naopak vedly k oxidativnímu stresu, který může končit až buněčnou nekrotizací. Naopak velmi nízké hodnoty ROS také vykazují cytostatické vlastnosti. Dostatečné hodnoty ROS mají schopnost regulovat tvorbu krevních cév (angiogeneze), což umožňuje optimální prokrvení okolí rány. Další schopností je destrukce patogenních látek pomocí ROS přímo v ráně. Molekuly obsahující ROS mohou prudce uvolnit velké množství ROS do okolí, a tím dojde k akutnímu nadbytku těchto forem kyslíku, což vede k apoptóze buněk patogenů.

Peroxid vodíku je jeden z nejstabilnějších reaktivních forem kyslíku a jeho přítomnost v přírodních systémech je hlavně z důvodu redukce kyslíku v systému. Peroxid vodíku je také vytvářen jako meziprodukt reakcí probíhajících v biologických systémech a vyskytuje se současně s enzymem katalázou, který vzniklý peroxid při vyšších hodnotách koncentrace rozkládá. Peroxid vodíku slouží jako hlavní sekundární posel v reakci na vznik rány. Jeho hladiny jsou v okolí rány regulovány pomocí místních antioxidantů. Výhody peroxidu vodíku spočívají především v jednoduchosti jeho samotné syntézy a také v jeho podobnosti s velikostí vody. Molekula je velice malá a nemá žádný náboj, což umožňuje velmi snadnou prostupnost molekuly přes tkáň a membrány. Výhoda také spočívá v tom, že molekula nereaguje tak rychle s okolními molekulami, jako přímé radikály [16].

Topické aplikace ROS intermediátů, které jsou konvertovány na biologicky dostupné molekuly kyslíku, jako například peroxid vodíku a benzoyl peroxid, byly potvrzeny jakožto významné doplňky při terapii chronických ran, jak dokázala studie zkoumající roli peroxidu vodíku při léčení ischemických vředů [17].

2.4 Gely

Gely lze popsat jako systémy, které jsou tvořeny souvislou trojrozměrnou sítí prostupující celým disperzním systémem. Gely vykazují mechanické vlastnosti typické pro tuhý stav, přestože jejich disperzní prostředí je v kapalném stavu. Tento jev je způsoben tím, že disperzní částice se nejsou schopné pohybovat disperzním prostředím nezávisle. Pod pojmem gel rozumíme jak systémy, ve kterých se jako disperzní prostředí vyskytuje voda, takové systémy nazýváme jako hydrogely. Existují však i systémy, ze kterých bylo disperzní prostředí úplně odstraněno vysušením. Takové typy gelů nazýváme jako xerogely [18].

2.4.1 Rozdělení gelů

Reverzibilní gely

Reverzibilní gely jsou typičtější pro makromolekulární gely. Fungují na principu, kdy při vysušení dojde ke zmenšení objemu gelu a do původního objemu je lze převést přidáním disperzního prostředí, tzv. botnáním. Strukturně jsou reverzibilní gely sítě makromolekulárních řetězců spojených pomocí fyzikálních či chemických sil v místech, které se nazývají uzlové body.

Působením fyzikálních sil, jako například van der Waalsových, polárních sil, nebo vodíkových vazeb, dochází ke spojování úseků polymerních řetězců do uzlů a tím dochází ke tvorbě fyzikálně síťovaných gelů [18]. K tvorbě gelu může také dojít pomocí tzv. geometrického síťování, které je charakteristické mechanickým propletením řetězců jako reakce na tepelný pohyb (například agarózový hydrogel) [19].

Kovalentně síťované gely vznikají nejčastěji jako xerogely nebo lyogely v závislosti na přítomnosti disperzního prostředí. Samotný gel představuje nekonečnou síťovou strukturu, která je tvořena chemickými vazbami. Síťová struktura může vznikat různými reakcemi, jako například nelineární kondenzační nebo adiční polymerací monomerů. Dalším způsobem může být síťování lineárních polymerů pomocí vhodných síťovacích činidel (například polysulfidy nebo divinylbenzeny) [18].

Ireverzibilní gely

Ireverzibilní gely můžeme popsat jako gely, které vznikají gelací lyofobních solí, ke které dochází, pokud dojde ke snížení agregátní stálosti soustavy. Pokud dojde k částečnému odstranění svrchní ochranné vrstvy, částice tak ztrácí stabilitu a dojde k agregaci v těchto nestabilních místech. K tomuto narušení stability se nejčastěji používají elektrolyty v koncentracích nižších, než je koagulační práh. Vznikne tak prostupující síť, přičemž nedochází ke koagulaci [18].

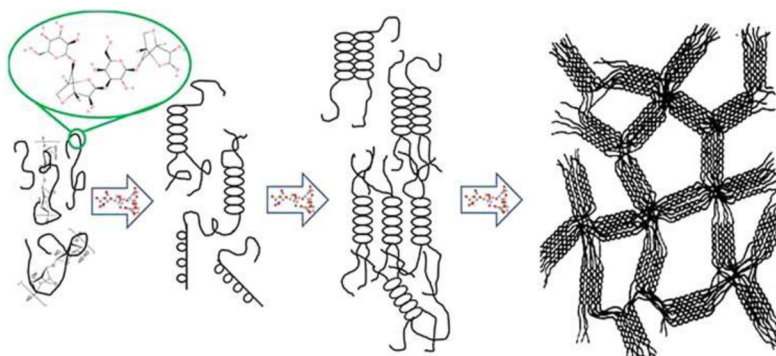
2.4.2 Hydrogely

Z hlediska struktury lze popsat hydrogely jako dvou nebo vícesložkové systémy sestávající z trojrozměrné sítě polymerních řetězců a vody, která vyplňuje prostor mezi makromolekulami. V závislosti na vlastnostech použitého polymeru, a také na povaze a hustotě síťových spojů, mohou takové struktury v rovnováze obsahovat různá množství vody. Typicky v nabobtnalém stavu je hmotnostní podíl vody v hydrogelu mnohem vyšší než hmotnostní podíl polymeru [20].

2.4.3 Agaróza

Agaróza je biokompatibilní polysacharid extrahovaný z buněčných stěn mořských řas, který obsahuje opakující se molekuly agarobiózy (disacharid D-galaktózy a 3,6-anhydro-L-galaktopyranózy). Hydrogel připravený z agarózy vykazuje tzv. termoreverzibilní vlastnosti [21]. Agaróza je nerozpustná ve studené vodě, ale velmi snadno se rozpouští ve vroucí vodě. Po ochlazení tvoří řetězce agarobinózy agregáty, které se seskupují do trojrozměrné, vzájemně

propojené sítě držené pohromadě nekovalentními vodíkovými vazbami. Takto tvořené struktury se svinují do dvojité helikální struktury [22], které jsou znázorněny na Obr. 4. Komerčně dostupné jsou dva hlavní typy agarózy, a to hydroxyetylované agarózy, které tvoří gely s nižší pevností gelu a výrazně nižší teplotou tání a nemodifikované agarózy [23].



Obr. 4: Tvorba agarózového hydrogelu [22]

2.5 Fluorescence

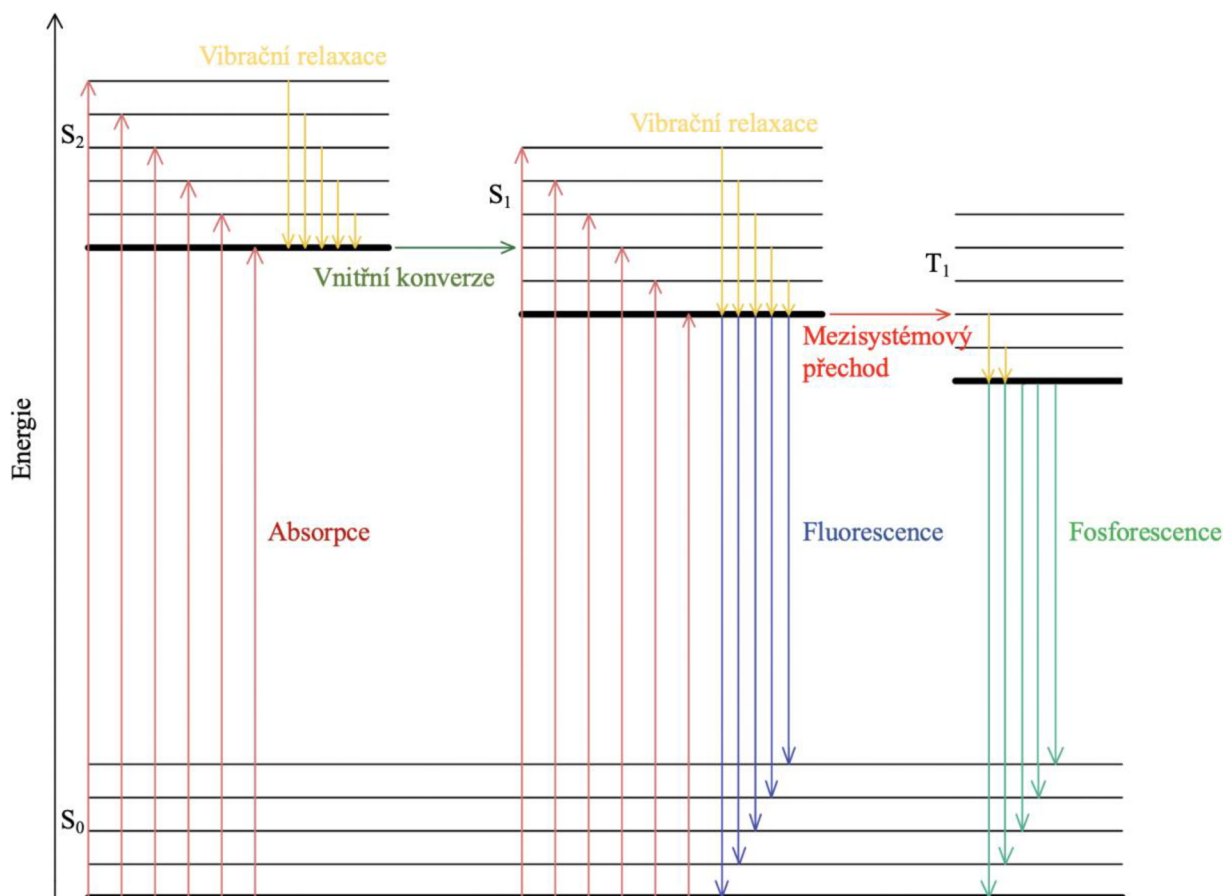
Emisní spektroskopie je velmi citlivým nástrojem potřebným k získávání informací o strukturních a dynamických vlastnostech biologických objektů. Velmi podstatnou úlohu má fluorescenční spektroskopie pro výzkum konformací a dynamismu biologických systémů. Studuje také závislosti emisních vlastností fluoroforů na jejich prostředí, detekovat lze také konformační změny, které mohou nastat v důsledku změny podmínek nebo při interakci systému s malými molekulami [24].

V medicínských aplikacích je jednou z nejčastějších aplikací fluorescenční spektroskopie vysoce přesná kvantifikace molekul DNA a RNA. Do vzorku DNA je přidán fluorofor (často ethidium bromid) a vzorek je vložen do fluorescenčního spektrometru, kde je možné pomocí kalibrační křivky odečíst koncentraci vzorku [25]. Fluorescenční spektroskopie je také používána v několika průmyslových prostředích jako rychlá, neinvazivní technika při hodnocení kontaminace [26]. Existuje také mnoho studií, které naznačují, že fluorescenční spektroskopie je slibná diagnostická technika chorob souvisejících s mikroorganismy [28].

Při jevu zvaném fluorescence dochází ke změnám energetických stavů molekuly bez toho, aniž by došlo ke změně spinu elektronů. Zmíněné přechody energetických stavů jsou z kvantově mechanického hlediska dovolené a délka dosvitu u fluorescence je proto velice nízká (řádově do 10^{-9} sekund). Pro porovnání při fosforescenci dochází ke změně spinu a molekula proto přejde do tripletového stavu, kde může setrvat v excitovaném stavu mnohem déle (řádově i jednotky sekund), protože návrat do singletového stavu je již z kvantově mechanického hlediska zakázaný [29].

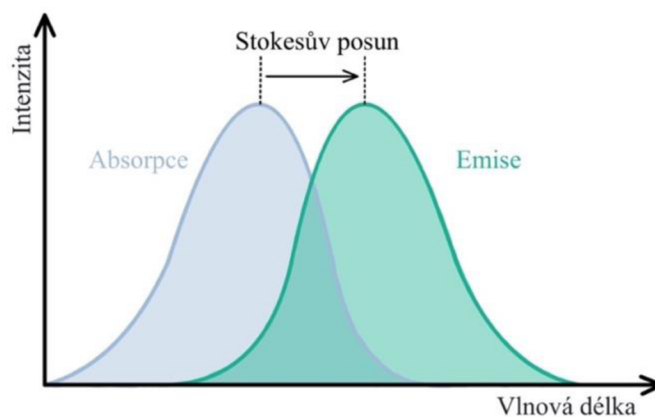
Fotoluminiscenci lze popsat třístupňovým procesem, jehož jednotlivé kroky znázorňuje Perrin-Jabloňského diagram na Obr. 5. Prvním krokem je excitace molekul, které by byly za normálních podmínek v základním elektronovém (označován jako S_0 , elektron se nachází v n nebo π orbitalu) a vibračním stavu. Excitace probíhá do singletového elektronového stavu S_1 nebo S_2 . Následně dochází k vyhasínání excitovaného stavu nezářivými přechody, během kterých dochází k přenosu vibrační energie na okolní molekuly a výsledkem tohoto jevu je přechod zpět na základní vibrační hladinu S_1 . Pokud by při fluorescenci došlo k excitaci až na hladinu S_2 , musí v první řadě dojít k tzv. vnitřní konverzi a následně může dojít k vibrační relaxaci zpět na základní vibrační hladinu S_1 . K deexcitaci a samotnému návratu molekuly do některé z vibračních hladin základního elektronového stavu S_0 může dojít buď nezářivými pochody nebo emisí záření, což popisujeme v případě přechodu ze stavu singletového jako fluorescence [29]. U fosforescence dochází k mezisystémovému přechodu, kdy elektron

přechází ze singletového (S_1) do tripletového stavu (T_1). Tento přechod je spinově zakázaný, proto má delší dobu dosvitu (řádově 10^{-3} – 1 s), než fluorescence [30].



Obr. 5: Schématické znázornění Perrin-Jablonského diagramu (převzato z [30])

Během samotného vyhasínání excitovaného stavu dochází ke ztrátě části energie (díky vibrační relaxaci a vnitřní konverzi). Energie emitovaného fotonu je vždy nižší než energie fotonu excitačního. Rozdíl mezi maximy absorpčního a emisního pásu je pak nazýván jako tzv. Stokesův posun popsáný na Obr. 6.



Obr. 6: Schéma popisující Stokesův posun, převzato a upraveno z [27]

Vztah pro výpočet výtěžku fluorescence (3) vyjadřujeme jako poměr počtu emitovaných fluorescenčních fotonů ku počtu absorbovaných fotonů za jednotku času. Pro reálné vzorky bývá tento poměr málokdy vyšší než 0,7.

$$\phi_F = \frac{\Phi_{em}}{\Phi_{abs}} \quad (3)$$

Fluorescenční spektroskopie se dá využít ke kvantitativnímu stanovení, avšak existuje řada faktorů, které mohou ovlivnit samotné stanovení. Patří mezi ně teplotní změny, které mohou ovlivnit viskozitu měřeného vzorku. Setkat se také můžeme se změnou pH, kdy i relativně malé změny pH mohou způsobit změny spektra fluoroforu.

Efekt vnitřního filtru a reabsorpce se projevuje redukcí intenzity fluorescence v přítomnosti látek, které absorbují excitační nebo emisní záření. Při vysokých koncentracích fluoroforu může také dojít k absorpci záření samotným fluoroforem. Zhášení je způsobeno interakcí excitovaného fluoroforu s okolím, tím může docházet k deexcitaci molekuly prostřednictvím nezářivých přechodů a tím dojde k uvolnění energie bez emise fotonu [29].

2.5.1 Instrumentace

Měření fluorescence v podobě fluorescenčních spekter probíhá pomocí spektrofluorimetrů, pro které je typické použití dvou monochromátorů, abychom mohli nastavit jak excitační, tak emisní vlnovou délku. Fluorescenční záření se ve vzorku šíří všemi směry, sledováno je však v kolmém směru k excitačnímu záření. Zabráníme tak dopadu excitačního spolu s emisním zářením na detektor. Přístroj, který místo monochromátorů využívá jako selektory vlnových délek pouze optické filtry, se nazývá fluorimetr. Zdroj záření musí být volen tak, aby pokryl studovanou oblast UV-VIS. Nejčastěji se jedná o nízkotlakou rtuťovou výbojku nebo xenonovou výbojku. Optický modul se skládá z držáku kyvety, uzávěrky a děliče svazku. Dělič svazku odděluje malou část záření pro použití v referenčním měření. V přístroji se dále nachází detektor, který bývá ve formě fotonásobiče, jehož spektrální rozsah je dán materiálem katody. Pro dostatečné pokrytí celého UV-VIS spektra bývají použity dva fotonásobiče. Citlivost fotonásobiče je omezoována hladinou temného proudu, což je signál, který detektor poskytuje za nepřístupu záření. Odstranit jej lze pomocí pulzního režimu xenonové výbojky, kdy dojde k odpojení detektoru mezi vytvořenými pulzy [29].

Fluorimetrická měření jsou obecně mnohem citlivější než absorpční měření, ale potřebných fluoreskujících látek je poměrně malé množství, neboť musí obsahovat fluorofor. Silné fluorescenční vlastnosti vykazují látky obsahující ve své struktuře konjugovaný systém dvojných vazeb, aromatické sloučeniny, heterocyklické sloučeniny a některé cheláty kovů [29].

2.5.2 Typy spekter

Pomocí excitačních spekter zachycujeme závislost intenzity fluorescence na vlnové délce excitačního záření za konstantní vlnové délky záření emisního. Excitační spektra jsou potřebná k nalezení vhodné vlnové délky záření pro buzení luminiscence. Naopak pomocí emisních spekter sledujeme závislost intenzity fluorescence na vlnové délce emitovaného záření při konstantní vlnové délce excitačního záření.

Pokud porovnáme tvar absorpčního a fluorescenčního pásu spektra, platí zde zrcadlová symetrie pro mnohé organické molekuly. Pokud není geometrické uspořádání jader molekul rozdílné při excitovaném a základním stavu, absorpce i emise má z odpovídajících si vibračních hladin stejnou relativní pravděpodobnost, díky tomu poté dochází, ke již zmíněné symetrii [29].

2.6 Detekce produktů enzymové reakce

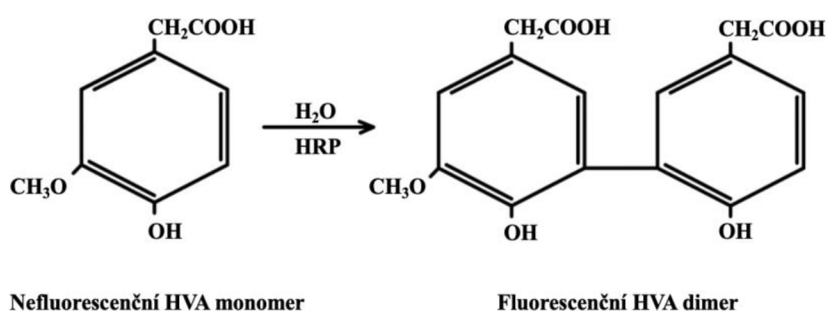
Fluorimetrická stanovení se považují za citlivější a více specifické než spektrofotometrické, protože v drtivé většině případů rozpouštědlo, které absorbuje, tak zpravidla neemituje a chybí

tak pozadí. Obecně je citlivost fluorescence 10–1000krát vyšší ve srovnání s měřením absorbance. Právě proto byla fluorimetrická měření zavedena do imunologických testů pro zlepšení jejich citlivosti [31].

2.6.1 Metoda stanovení peroxidu vodíku za použití homovanilové kyseliny

Kyselina homovanilová (HVA) je hlavním terminálním metabolitem dopaminu, jednoho ze tří katecholaminů produkovaných v mozku. Dopamin je štěpen játry a vylučován močí jako kyselina homovanilová [32].

Kyselina homovanilová bývá používána pro detekci peroxidu vodíku v mitochondriích. Mechanismus spočívá v reakci společně s křenovou peroxidázou, která v přítomnosti peroxidu vodíku oxiduje monomer kyseliny homovanilové na fluorescenční dimer (viz Obr. 7). Stanovení může být použito pro stanovení přítomnosti mitochondrií, protože při jejich přítomnosti dochází k poklesu oxidované formy homovanilové kyseliny [33].

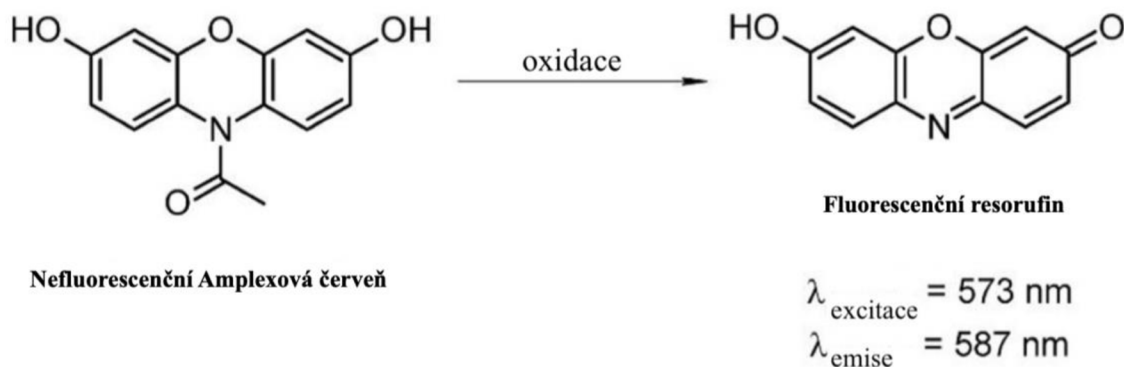


Obr. 7: Mechanismus detekce pomocí homovanilové kyseliny [34]

2.6.2 Metoda stanovení peroxidu vodíku za použití Amplexové červeň

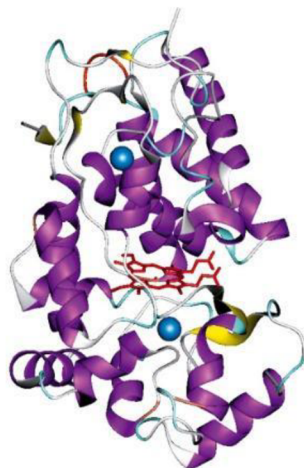
Amplexová červeň (AR, Amplex Red, 10-acetyl-3,7-dihydroxyfenoxazin) je bezbarvý a nefluoreskující derivát resorufinu, který může být například pomocí peroxidu vodíku oxidován na velice silně fluoreskující resorufin (viz Obr. 8) [35].

Resorufin je planární molekula složená ze tří šestičlenných uhlovodíkových kruhů, které obsahují jednu karbonylovou skupinu ve formě aldehydu nebo ketonu. Mezi mnoha fluorofory se resorufin vyznačuje vysokou intenzitou fluorescence, dlouhou délkou excitační/emisní vlnové délky a výrazné schopnosti fluorescenční i kolorimetrické analýzy [36,37]. Amplexová červeň je využívána jako fluorescenční sonda, která se používá k detekci peroxidu vodíku v reakci, kdy je oxidována na resorufin pomocí křenové peroxidázy (HRP) jako katalyzátoru [38].



Obr. 8: Oxidace Amplexové červeň na resorufin [39]

Křenová peroxidáza (HRP, horseradish peroxidase) je enzym skládající se z jediného polypeptidového řetězce, který obsahuje až 308 aminokyselin a jejich zbytků. Ve své struktuře zobrazené na Obr. 9 také obsahuje 4 disulfidické můstky mezi zbytky molekul cysteinu. Další významnou složkou je hemová prostetická skupina, vápenatý iont a sacharidová složka. Enzym se řadí jakožto peroxidáza mezi oxidoreduktázy a akceptorem elektronu je v tomto případě peroxid vodíku [40]. Metoda a její omezení bude blíže specifikována v kapitole 3.2.1.



Obr. 9: Struktura křenové peroxidázy, červeně vyznačená je hemová složka, vápenatý iont modře, fialově jsou vyznačeny struktury α -helix proteinové složky [41]

2.6.3 Metoda stanovení peroxidu vodíku za použití ABTS

Princip detekce s 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonovou kyselinou) (ABTS) spočívá v oxidaci nebo redukci substrátu za katalýzy křenovou peroxidázou. Změna barvy nebo intenzity měřeného signálu odpovídá změně koncentrace stanovovaného peroxidu vodíku. Detekční systém složený z ABTS a křenové peroxidázy je založen na spotřebě peroxidu vodíku křenovou peroxidázou v přítomnosti ABTS, který regeneruje peroxidázu za vzniku radikálového kationtu ($\text{ABTS}^{\cdot+}$) s absorpčním maximem při vlnové délce 414 nm, přičemž intenzita signálu je úměrná množství peroxidu přítomného ve vzorku [42].

2.7 Reologické vlastnosti hydrogelových struktur

Reologie je vědní obor zabývající se tokem a deformací látek vlivem vnějších mechanických sil. Možné jsou dva typy mezního chování. Pokud po účinku vnější síly dojde k deformaci, která vratně vymizí po odstranění vnější síly, mluvíme o elastickém chování, které je popisováno jako ideální Hookovské těleso. Toto chování je často vykazováno tuhými látkami. Naproti tomu pro jednoduché tekutiny je typické viskózní chování, kdy vlivem působení vnější síly hmota teče a tok se zastaví, ale neobráť. V tomto případě se jedná o mezní případ v podobě ideální Newtonovské kapaliny. Mezi těmito dvěma extrémami jsou systémy, jejichž odezva na vnější sílu závisí na době působení a velikosti síly. Tyto systémy se označují jako viskoelastické a řadí se k nim řada koloidně disperzních systémů [18]. Při měření reologických vlastností soustav se obvykle zaměřuje na veličiny jako je tok, viskozita, deformace a viskoelastická.

2.7.1 Viskoelastické látky

Jak bylo již zmíněno, viskoelastické chování popisuje materiály, které vykazují chování někde mezi chováním ideální kapaliny (viskózní) a pevné látky (elastické). Existuje řada reologických technik pro zkoumání viskoelastického chování materiálů. Mezi tyto techniky patří tokové zkoušky, relaxace napětí a oscilační testy [43].

Působení vnější síly na ideální tuhé těleso popisuje nejlépe modelový případ natažené pružiny, kdy pokud na pružinu působí vnější síla, dojde k deformaci (natažení) pružiny. Pokud silové působení odezní, dojde k navrácení pružiny zpět do původního stavu. Tento návrat byl umožněn pomocí elastické síly, která se snaží obnovit mikrostrukturu do původního nedeformovaného stavu. Platí tedy, že aplikované napětí je úměrné výslednému napětí a pružina se tak může navrátit plně do původního stavu. Pokud by byla překročena mez pružnosti pružiny, došlo by k trvalému zdeformování pružiny. Elastické chování materiálů popisuje Hookův zákon a popisovaný případ s pružinou by se řídil Hookovým zákonem (4).

$$G^* = \frac{\tau}{\gamma} \quad (4)$$

kde τ [Pa] je tečné napětí a γ [%] je míra deformace, označována i jako amplituda deformace. G^* [Pa] je tzv. komplexní modul, který je měřítkem tuhosti materiálu a jeho odolnosti vůči způsobené deformaci. Míra deformace může být vyjádřena rovnicí (5).

$$\gamma = \frac{s}{h} \quad (5)$$

kde s [m] je odchylka od původní polohy, kterou způsobuje tečné napětí a h [m] je výška měřeného vzorku.

Pokud by bylo aplikováno napětí na ideální viskózní látku, došlo by k toku, který by pokračoval konstantní rychlostí, dokud by nedošlo k odstranění působící síly. Jelikož ideální viskózní látky jsou kapaliny, dojde k přesunu energie potřebnou pro deformaci do kapaliny a deformace se tak stává trvalou. Nejčastěji dochází k přeměně energie na teplo. Viskózní látky tak lze nejlépe popsat modelem tlumiče, kde dochází k nevratné deformaci.

Naprostá většina materiálů vykazuje chování řadící se do oblasti někde mezi ideálními kapalinami a ideálními pevnými látkami, tyto látky jsou klasifikovány jako viskoelastické. Nejjednodušší model popisující tyto látky se nazývá Maxwellův a jde o kombinaci pružin a tlumičů zapojených v sérii. Dochází tedy jak k elastickému, tak k viskóznímu chování materiálu [43].

2.7.2 Oscilační testy

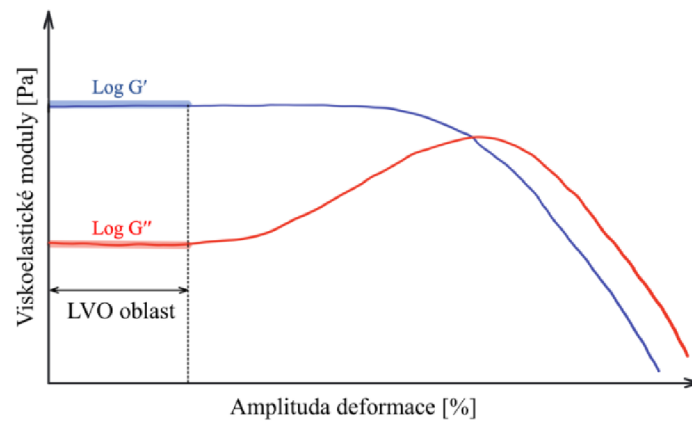
Nejběžnější metodou pro měření viskoelastických vlastností je oscilační měření, kdy měřicí senzor osciluje kolem své rovnovážné polohy v nepřetržitém cyklu (s konstantní amplitudou nebo frekvencí). Při provádění oscilačních testů je vzorek umístěn mezi dvě paralelní desky oddělené od sebe o známou výšku (h). Horní deska poté osciluje tam a zpět při dané amplitudě a frekvenci oscilace. Následně je sledována odezva na stacionární (dolní) desce. Podle míry deformace lze poté určovat viskoelastický charakter látky. Hookův zákon popisuje veličinu G^* jakožto komplexní modul. Jedná se o proměnnou, která se skládá ze dvou složek. První složkou je paměťový modul G' , který charakterizuje elastickou část chování viskoelastického materiálu. Druhou složkou je modul ztrátový G'' , který charakterizuje viskózní část. Vztah mezi oběma moduly vyjadřuje ztrátový úhel v rovnici (6) [43].

$$\operatorname{tg}(\delta) = \frac{G''}{G'} \quad (6)$$

Pokud hodnota ztrátového modulu dosáhne hodnot do 45° , znamená to, že měřený viskoelastický materiál vykazuje s převahou elastické vlastnosti. V opačném případě by převažovaly viskózní vlastnosti [43].

Jedním ze základních oscilačních měření je tzv. amplitudový test. Při amplitudovém testu jsou sledovány viskoelastické moduly (G' , G'') v závislosti na amplitudě deformace při konstantní frekvenci oscilací [43]. Dalším důležitým parametrem je tzv. lineární viskoelastická

oblast (LVO). Výstupem je graf porovnávající závislost obou modulů na amplitudě deformace (Obr. 10). Rozsah LVO oblasti nám dává informace o stabilitě měřeného materiálu, kdy čím delší je tato oblast, tím je materiál odolnější vůči deformaci [44]. Dále lze podle vzájemné polohy viskoelastických modulů zjistit, zda se nacházíme v oblasti charakterizující viskoelastickou látku s převahou elastického modulu a to tak, že pokud modul G' dosahuje vyšších hodnot než modul G'' , znamená to, že náš měřený vzorek je viskoelastická látka s převahou elastického modulu. Dále je sledován bod, ve kterém dojde k protnutí křivek obou modulů, to znamená že v tomto bodě se $G' = G''$. Tento bod je označován jako bod toku, po jehož překročení ($G' < G''$) se z gelové látky stává látka kapalná [45].



Obr. 10: Znárodnění výstupu z amplitudového měření zachycující oblast LVO (převzato a upraveno z [43])

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Inkorporace glukóza oxidázy do hydrogelu

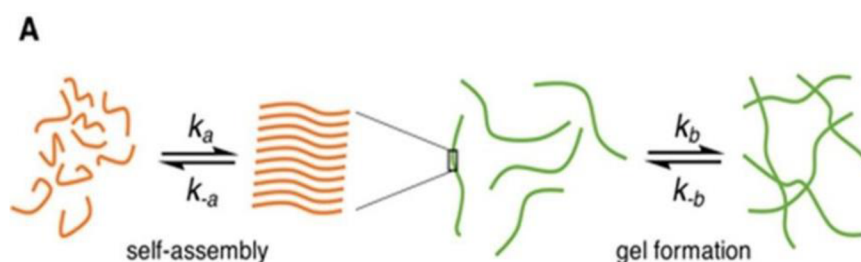
3.1.1 Hydrogel na bázi alginátu

J. R. Roberts, D. W. Ritte a M. J. McShane [46] se ve své studii zabývali inkorporací glukóza oxidázy do hydrogelové struktury na bázi alginátu. Ve studii byla použita metoda enkapsulace enzymu do mikrosfér uhličitanu vápenatého a poté byly tyto sféry obaleny vrstvami polyelektrolytů. Takto pokryté sféry byly inkorporovány do alginátu a došlo ke vzniku tzv. multi-porózního hydrogelu. K uhličitanu vápenatému byl přidán glukono- δ -lakton a došlo tak ke vzniku silnějšího a více homogenního hydrogelu. Tato metoda také dokázala snížit čas gelace hydrogelu. V případě obalení mikrosfér polyelektrolyty došlo k uvolnění glukóza oxidázy pouze do prostoru v blízkosti mikrosféry a nedošlo k prostupu enzymu dále do hydrogelu. Hydrogely zkonstruované bez vrstev polyelektrolytů však vykazovaly jiné vlastnosti. Glukóza oxidáza byla uvolněna i do okolí hydrogelu a byla zachována její enzymatická aktivita. GOx tak může v tomto prostředí reagovat s malými molekulami z vnějšího prostředí hydrogelu.

3.1.2 Peptidový hydrogel

Tým Xue Li a spol. [47] se zabývali řízeným uvolňováním inzulínu pomocí matrice obsahující glukóza oxidázu, katalázu a proteiny vázající glukózu. Výhodou této matrice byla především její schopnost adaptace strukturálním fluktuacím, které byly provázeny fluktuacemi koncentrace glukózy, na jejichž popud došlo k vyloučení inzulínu. Autoři popisovali výhodu proteinů, jakožto stavebních bloků hydrogelu, v jejich biodegradabilitě, biokompatibilitě v porovnání s chemicky syntetizovanými makromolekulárními materiály [47]. Peptidové hydrogely vykazovaly také schopnost spontánní gelace a díky jejich vlastnostem bývaly často využívány v biomedicínských aplikacích a tkáňovém inženýrství jakožto hydrogelové nosiče léčiv [48]. Systémy reagující s GOx byly s výhodou použity s materiály citlivými na změny pH, které jsou degradovány s lokálním poklesem pH, které vzniká, když glukóza podléhá reakci a v mezikroku vzniká kyselina glukonová [47].

Ve studii [47] byl použit peptid syntetizovaný z 4-methylbenzhydrolaminové pryskyřice, který byl syntetizován podle studie Jing Han a spol. [49]. Tvorba peptidového hydrogelu je vyobrazena na Obr. 11. Peptid byl pojmenován IA-0 a byl využit především pro jeho schopnost vzniku reverzibilního samostatně se uspořádávajícího hydrogelu, do kterého může být inkorporována glukóza oxidáza a kataláza [47].



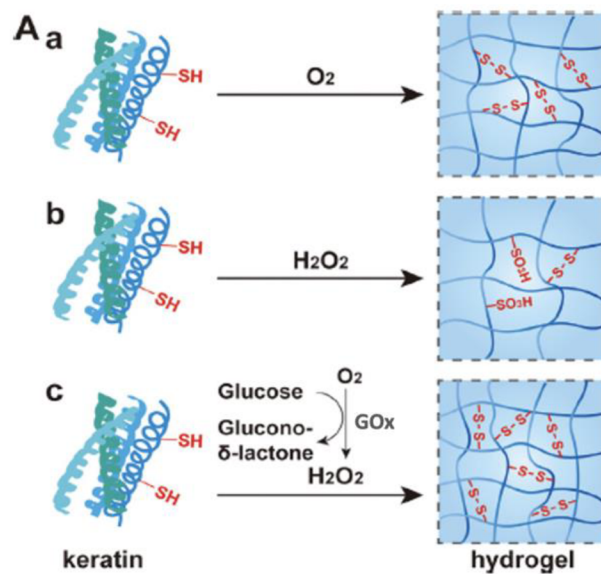
Obr. 11: Tvorba peptidového gelu [50]

V hydrogelu obsahujícím protein IA-0 mohly molekuly glukózy volně difundovat skrz strukturu hydrogelu a mohly tak snadno interagovat s glukóza oxidázou. Přebytečný peroxid vodíku byl poté rozložen katalázou. Při *in vivo* testování hydrogelu na myších byla potvrzena jeho biodegradabilita a efektivní regulace hladiny glukózy v krvi [47].

3.1.3 *In situ* keratinový hydrogel

Tým Yansong Chen a spol. [51] se zabývali vývojem *in situ* gelujícího hydrogelu na bázi keratinů. Keratiny jsou skupinou strukturních proteinů bohatých na cystein, které se v hojném zastoupení vyskytují v kůži. Studie ukázaly, že keratiny mají vlastní schopnost regenerace tkání díky jejich příspěvku k buněčné proliferaci. Při konstrukci samotného hydrogelu využili autoři skutečnost, že glukóza se běžně nachází v tělesných tekutinách, a byl tak vyvinut *in situ* tvořící keratinový hydrogel spouštěný glukózou, který by mohl být přínosem pro pacienty s diabetem.

V předešlém výzkumu tým zjistil, že tato strategie funguje s kyslíkem jakožto oxidačním činidlem. Princip gelace (viz Obr. 12) spočívá v tom, že nejprve byly intramolekulární disulfidové vazby v keratinech štěpeny redukčním činidlem, aby se uvolnily volné thiolové skupiny, které následně vytvořily intermolekulární disulfidové můstky prostřednictvím oxidace kyslíkem. Dochází tak ke spojování řetězců keratinů a tvorbě zesíťovaného gelu. Cílem práce bylo zjistit, zda bude gelace fungovat s oxidačním činidlem ve formě peroxidu vodíku.



Obr. 12: Schématické znázornění tvorby gelu [51]

Jako model pacienta s diabetem byly zvoleny koncentrace 5 a 10 mM glukózy a byla také zvolena koncentrační řada GOx. Pro obě hladiny glukózy se doba gelace snižovala se zvyšující se koncentrací GOx a dosáhla nejkratší hodnoty při 15 U/ml GOx. Vyšší koncentrace glukózy navíc ukázala kratší dobu gelace. Poté byly porovnány vlastnosti GOx gelů s vlastnostmi hydrogelů s oxidačními činidly H_2O_2 a O_2 na třech koncentracích keratinu (10, 15 a 20 obj. %).

U všech typů hydrogelů byla pozorována jednotná mikrostruktura s propojenými póry. Hydrogely s kyslíkem a peroxidem vodíku vykazovaly velikosti pórů v rozmezí 30-60 μm , zatímco hydrogel GOx poskytoval relativně malou velikost pórů, převážně v rozmezí od 25 do 37 μm . Poté byly změřeny mechanické vlastnosti gelu a výsledky ukázaly, že pro každou koncentraci keratinu vykazoval hydrogel z GOx vyšší modul pružnosti G' než hydrogely s kyslíkem a peroxidem vodíku při všech vybraných frekvencích. To indikovalo vyšší tuhost hydrogelu z GOx.

Jak bylo očekáváno, hydrogel s peroxidem vodíku vykazoval nejdelší dobu gelace při každé koncentraci keratinu, pravděpodobně z důvodu prudké oxidace volných thiolových skupin na sulfonátové skupiny. Hydrogel s GOx ve 20 % koncentraci keratinu dosáhl gelace během pouhých 6 minut. Tyto výsledky potvrdily, že metoda oxidace glukózy katalyzovaná GOx umožnila efektivní a rychlý způsob *in situ* gelace keratinu. Bylo prokázáno, že hydrogel s GOx dosáhl gelace *in situ* během 3 minut na lůžkách ran v plné tloušťce u testovaných myší a má potenciál být aplikován jako nosič pro léčivo na podporu hojení ran, nebo použit

samostatně jako účinné krytí ran využitelné pro pacienty s diabetem trpícími na špatně se hojící rány [51].

3.2 Fluorimetrická detekce produktů

3.2.1 Amplexová červeň

Tým Wang a spol. [52] popisují dříve zmíněný způsob stanovení peroxidu vodíku pomocí Amplexové červene a křenové peroxidázy (viz kapitola 2.6.2) jako metodu, která bývá považována za velmi citlivou i při stanovení nanomolárních koncentrací peroxidu vodíku [52]. Výrobce komerčně dostupného kitu obsahujícího AR/HRP uvádí, že reakci lze stanovit až 10 pikomolů peroxidu vodíku v objemu 100 μL [53]. Použití metody AR/HRP je omezeno několika faktory. Při příliš vysokých koncentracích H_2O_2 dochází k oxidaci vzniklého resorufinu na resazurin. Stanovení je také ovlivněno interferencemi s mnoha biologickými molekulami. Dřívější studie [54] potvrdila, že peroxid vodíku může být vytvářen při oxidaci skupin $\text{S}^{-\text{II}}$ v přítomnosti kyslíku a bylo dokázáno, že tyto koncentrace mohou ovlivnit měření při metodě AR/HRP. Jako výsledek je tedy potlačení fluorescence resorufinu. Je proto nutné, aby byly z měřených vzorků odstraněny molekuly $\text{S}^{-\text{II}}$ [52].

Tým Zhao a spol. [55] zkoumali efekt fotooxidace Amplexové červeni, kdy při přítomnosti resorufinu ve směsi s Amplexovou červení vzniká resorufin uměle vlivem fotooxidace, když je Amplexová červeň vystavena světlu. V nepřítomnosti peroxidu vodíku a křenové peroxidázy se absorpční a fluorescenční spektra Amplexové červeni změnila během expozice okolnímu pokojovému světlu nebo instrumentálnímu excitačnímu světlu, což jasně dokazuje, že došlo ke tvorbě resorufinu. Tento proces fotooxidace může mít za následek méně citlivé stanovení peroxidu při expozici okolnímu světlu a potenciálně neplatná měření při vystavení vysoké energii, jako je záření UVA. Na zmíněnou problematiku upozorňuje i komerčně dostupný kit [53], který doporučuje inkubovat reakci před stanovením bez přístupu světla.

Jako velmi často používaný komerčně dostupný kit popisují Rhee a spol. [56] kit založen na HRP v kombinaci s Amplexovou červení nebo AmplifluTM Red (N-acetyl-3,7-dihydroxyfenoxazin). Studie popisuje jako jednu z hlavních výhod stanovení emisního maxima, které leží mimo hodnoty většiny rušivých signálů pozadí z jiných fluoreskujících biologických vzorků. Další výhodou spočívá v širokém rozsahu pH při stanovení.

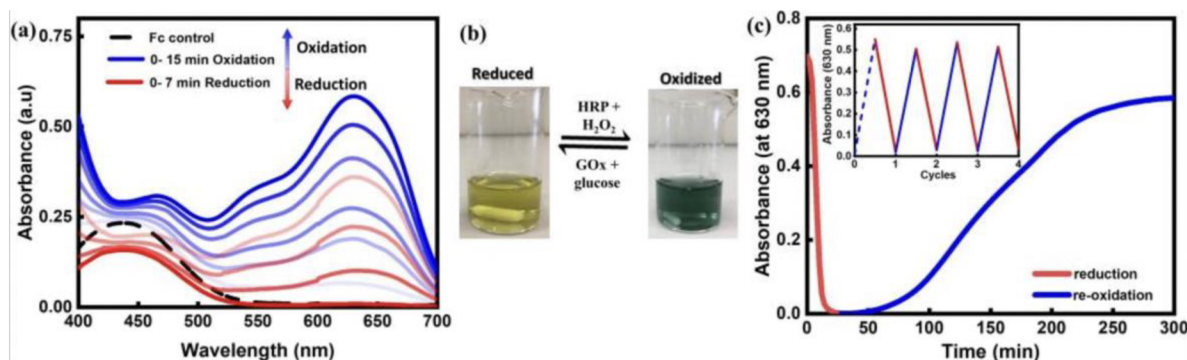
3.3 Kinetika enzymatické reakce

Tým Jain a spol. [57] se ve své studii zabývali kinetikou reakce stanovení peroxidu vodíku. Na detekci peroxidu vodíku vytvářeného pomocí GOx používali ferrocen kyseliny octové (Fc), který byl oxidován pomocí křenové peroxidázy.

Ve studii byla měřena časová závislost absorpance (viz Obr. 13 c) ferrocenu kyseliny octové. Nejprve byla pozorována okamžitá redukce vyznačující se rychlým poklesem absorpce při 630 nm. Následně byla pozorována krátká indukční perioda, která nevykazovala žádnou změnu absorpce, a nakonec bylo pozorováno postupné zvyšování absorpce, dokud nedosáhla maximálních hodnot. Roztok na konci měření viditelně obsahoval oxidovanou formu ferrocenu.

Autoři vysvětlují, že mechanismus kaskádové reakce zahrnuje oxidaci D-glukózy pomocí GOx z velké části podporované jejím kofaktorem FAD za vzniku β -D-glukonátových iontů a FADH_2 . Komplex $\text{GOx}[\text{FADH}_2]$ pak reakcí s molekulárním kyslíkem ztrácí přijatý elektronový pár a tvoří peroxid vodíku a $\text{GOx}[\text{FAD}]$. Takto vytvořený peroxid vodíku působí jako substrát pro křenovou peroxidázu pro další reakce. V kaskádové reakci (GOx , HRP a ferrocen kyseliny octové) by redukovaný $\text{GOx}[\text{FADH}_2]$ mohl buď reagovat s atmosférickým kyslíkem za vzniku peroxidu vodíku nebo s oxidovanou formou ferrocenu za vzniku jeho redukované formy a tak se oxidovat zpět na svou původní formu $\text{GOx}[\text{FAD}]$.

Pro další ověření významu atmosférického kyslíku pro produkci H_2O_2 byly provedeny kontrolní experimenty kaskádové reakce s enzymy HRP, GOx a D-glukózou s ferrocenem a ABTS. Chromoforový substrát ABTS a ferrocen byly použity k analýze tvorby H_2O_2 v přítomnosti a nepřítomnosti O_2 . Je známo, že ABTS v přítomnosti peroxidu vodíku se mění na chromoforový radikálový kationt $ABTS^+$, který absorbuje světlo při 420 nm, zatímco tvorba oxidovaného ferrocenu byla analyzována při 630 nm jako dříve pomocí UV/VIS spektroskopie. V přítomnosti kyslíku, ABTS a ferrocen se rychle přeměnili na $ABTS^+$ a Fc^+ (v daném pořadí). Při reakci s H_2O_2 , v žádném případě nebyla pozorována žádná transformace v nepřítomnosti O_2 . Z výše uvedených experimentů vyplývá, že $GOx[FADH_2]$ nejprve redukuje ionty Fc^+ , čímž okamžitě poskytuje Fc , a poté reaguje s O_2 za vzniku H_2O_2 , který v přítomnosti HRP reformuje oxidační palivo a iniciuje *in situ* re-oxidaci Fc .

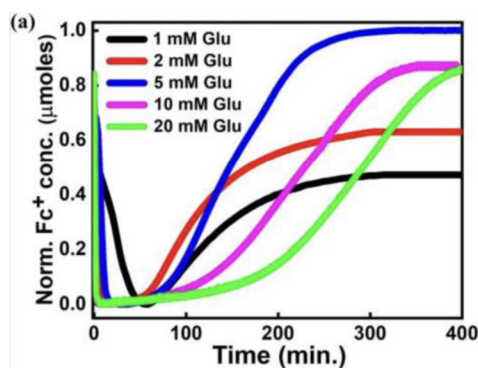


Obr. 13: Podrobné znázornění redukce a reoxidace ferrocenu kyseliny octové [57]

Jak je patrné z Obr. 13, redoxní reakci lze rozdělit do tří hlavních kroků:

- oxidace Fc v přítomnosti oxidačního katalyzátoru HRP a paliva H_2O_2 za vzniku Fc^+
- redukce Fc^+ v přítomnosti GOx a d-glukózy
- generace H_2O_2 *in situ* v důsledku atmosférického O_2

Autoři dále provedli měření časového průběhu reakce GOx, HRP a Fc s různými koncentracemi D-glukózy (viz Obr. 14), kde bylo zjištěno, že doba reoxidace závisí na koncentraci D-glukózy.



Obr. 14: Časový průběh reakce s různými koncentracemi D-glukózy [57]

3.4 Vliv glukóza oxidázy na hojení ran

Tým J. Arul a spol. [58] zkoumal efekt řízeného uvolňování reaktivních forem kyslíku při léčení ran u diabetiků. Aby bylo dosaženo trvalého dodávání ROS do lůžka rány, glukóza oxidáza byla začleněna do kolagenní membrány, která byla aplikována přímo na diabetickou ránu. Pokud by byla GOx nanášena přímo na ránu, došlo by k prudkému nárůstu ROS a takové hodnoty by způsobily vznik oxidativního stresu. V této studii byl jako matrice použit kolagenní film, který byl po inkorporaci enzymu nanášen na ránu. Kolagenní film je porézní matrice

kompatibilní s enzymy, která je schopna chránit enzym před denaturací. Při testování takto vytvořené matrice, byly použity laboratorní krysy, jejichž glykemický index byl upraven pomocí streptozocinu (CAS identifikátor 18883-66-4). Byl pozorován velký nárůst reaktivních forem kyslíku ve sledovaných fibroblastech během zánětlivé fáze hojení. Toto zvýšení hodnot ROS regulovalo antioxidační procesy v granulační fázi hojení a výrazně zlepšilo proliferaci nové tkáně. Výsledky z histologie také dokazují, že došlo k rychlejšímu hojení, než bylo u pozorovací skupiny. Zároveň také byla rána viditelně lépe zhojená a došlo k minimalizaci jizvení.

3.5 Shrnutí poznatků z literární rešerše a cíle práce

Ze zadaných cílů této bakalářské práce vyplývá, že by měl být navržen vhodný systém pro inkorporaci glukóza oxidázy do hydrogelové struktury, aniž by došlo k výraznému útlumu aktivity vybraného enzymu. Ze současného stavu řešené problematiky vyplývá, že pro inkorporaci GOx byly použity alginátové, keratinové a peptidové hydrogely. Příprava těchto zkoumaných hydrogelů je v některých případech poměrně složitá (peptidový hydrogel [47]), a proto byly vybrány agarózové hydrogely, kdy jejich příprava je velice snadná a reprodukovatelná. Agaróza je vhodná pro inkorporaci také z důvodu její biokompatibility [22]. Je také nutno dodat, že agaróza je na fakultě chemické velice dobře prostudována výzkumnou skupinou Biokol a je také možné modifikovat její vlastnosti (například velikost pórů) pomocí pouhého zvýšení koncentrace agarózy.

Jako vhodný způsob měření aktivity enzymu byla vybrána výše popsaná fluorescenční spektroskopie za použití Amplexové červeni jakožto fluorescenční sondy. Pomocí fluorescenční sondy je možné detekovat produkt enzymatické reakce a tím porovnat aktivitu enzymu volného i inkorporovaného v agarózových hydrogelech s různou koncentrací (1 a 2 hm. %). Podle autorů Zhou a spol. [59] je možné stanovit aktivitu glukóza oxidázy jako množství peroxidu vodíku, který tento enzym vygeneruje za určitý čas. Tato metoda by podle získaných poznatků měla být dostačující pro srovnání funkčnosti enzymu při inkorporaci do hydrogelových struktur.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

Fluorescenční sonda	Amplexová červeň (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin) Thermofisher Scientific, Sigma-Aldrich, Tebu-Bio labs č.š.: 1800129, 2390482, AB3253 CAS 119171-73-2 Mr = 257,25 g·mol ⁻¹
Enzymy	Glukóza oxidáza (EC 1.1.3.4.) Carl Roth 280 U/mg substrátu č.š.: 391314505 CAS 9001-37-0 Mr = 150 kDa Křenová peroxidáza (EC 1.11.1.7) Carl Roth 250 U/mg substrátu č.š.: 410299723 CAS 9003-99-0 Mr = 44 kDa
Rozpouštědla	Dimethylsulfoxid (DMSO) Sigma-Aldrich č.š.: 276855-1L CAS 67-68-4 Mr = 78,13 g·mol ⁻¹ Deionizovaná voda Elga Purelab
Gel	Agaróza Condalab č.š.: M00044 CAS 39346-81-1
Ostatní	β-D-glukóza monohydrát Carl Roth č.š.: 401312014 CAS 77938-63-7 Mr = 198,17 g·mol ⁻¹ Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát Penta č.š.: 2105180516 CAS 10039-32-4 Mr = 358,14 g·mol ⁻¹

Ostatní	Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát
	Penta
	č.š.: 2009290915Z
	CAS 13472-35-0
	Mr = 156,01 g.mol ⁻¹
	Peroxid vodíku
	Sigma-Aldrich
	č.š.: 23909648
	CAS 7722-84-1
	Mr = 34,0147 g.mol ⁻¹

4.2 Příprava roztoků a vzorků gelu

4.2.1 Příprava zásobního roztoku fluorescenční sondy

Pro přípravu zásobního roztoku Amplexové červeni byla vialka obsahující přesné množství 5,0 mg Amplexové červeni zalita 500 μ l dimethylsulfoxidu (DMSO). Zásobní roztok byl dále umístěn na vortex do úplného rozpuštění Amplexové červeni. Tento zásobní roztok byl uchováván v lednici.

4.2.2 Příprava pufru

Pufir byl zvolen na základě návodu na detekci z komerčního kitu [53] o pH 7,4 a síle 0,05 M. Pufir byl připraven navážením 3,47 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu disodného a 0,44 g dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného do čisté kádinky. Do kádinky byl přidán objem 20 ml deionizované vody a za stálého míchání byly rozpuštěny všechny navážené komponenty pufru. Obsah kádinky byl poté převeden do odměrné baňky o objemu 250 ml, která byla doplněna po rysku deionizovanou vodou. Takto připravený pufir byl skladován v lednici.

4.2.3 Příprava zásobního roztoku glukózy

Na základě detekčních kitů [53,60] byl na všechna měření použit roztok 100 mM D-glukózy. Zásobní roztok o koncentraci 500 mM byl připraven tím způsobem, že bylo rozmícháno 1,351 g β -D-glukózy v 15 ml deionizované vody nebo pufru.

4.2.4 Příprava zásobních roztoků enzymů

Zásobní roztok glukóza oxidázy byl připraven navážením 0,02 g lyofilizované formy enzymu glukóza oxidázy na analytických vahách. Navážené množství bylo převedeno do kádinky, kde bylo zalito deionizovanou vodou nebo pufrem a roztok byl míchán do úplného rozpuštění enzymu. Poté byl obsah kádinky převeden do odměrné baňky o objemu 10 ml, která byla doplněna deionizovanou vodou nebo pufrem po rysku.

Zásobní roztok křenové peroxidázy byl připraven z naváženého množství 0,004 g lyofilizované formy enzymu křenové peroxidázy. Postup doplnění naváženého množství do 10 ml vody nebo pufru byl shodný jako u přípravy zásobního roztoku glukóza oxidázy.

4.2.5 Příprava roztoků peroxidu vodíku na měření kalibrační křivky

Zásobní roztok peroxidu vodíku byl připraven z peroxidu vodíku obsaženého v detekčním kitu [60]. Jedná se o stabilizovaný peroxid vodíku, jehož použití je vhodné na přípravu kalibrační křivky. Zásobní roztok o koncentraci 20 μ M byl připraven dle návodu z kitu, kdy z vialky obsahující 3% peroxid vodíku bylo odebráno 22,7 μ L peroxidu, který byl pipetován do čisté vialky. K tomuto objemu bylo přidáno 997 μ L pufru připraveného v kapitole 4.2.2. Směs byla promíchána a z finálního objemu bylo odebráno dalších 10 μ L směsi, ke které bylo přidáno

10 ml pufru. Na změření kalibrační křivky pro stanovení koncentrace peroxidu vodíku byly zvoleny koncentrační řady (viz Tab. 9 v přílohách) peroxidu vodíku z návodu detekčního kitu [60].

4.2.6 Příprava hydrogelu s inkorporovanou glukóza oxidázou

První verze hydrogelu s inkorporovanou GOx spočívala v přípravě 2 hm. % hydrogelu navážením potřebného množství agarózy. Použita byla upravená agaróza, která má nižší teplotu tání v porovnání s klasickou agarózou. Použitím upravené agarózy dojde k zabránění denaturace enzymu při inkorporaci do připravovaného hydrogelu. Do kádinky bylo převedeno potřebné množství agarózy, které bylo zalito 5,95 ml pufru. Do kádinky bylo vloženo míchátko a roztok byl za stálého míchání zahříván na teplotu 70 °C, dokud nebyla všechna agaróza rozpuštěna. Následně bylo přerušeno zahřívání roztoku a došlo k jeho ochlazení. Jakmile roztok dosáhl teploty 35 °C, byl za stálého míchání přidán roztok glukóza oxidázy, Amplexové červení a křenové peroxidázy. Takto připravený hydrogel byl nalit do Petriho misky. Po ztuhnutí byly z hydrogelu vyřezány kolečka o stejných průměrech. Dále bylo přichystáno 20 ml roztoku glukózy o koncentraci 100 mM, jehož příprava je popsána v kapitole 4.2.3. Vyřezané kolečko hydrogelu bylo vloženo do lékovky o objemu 50 ml a následně bylo zalito 20 ml glukózy. Vzorek byl inkubován 30 minut bez přístupu světla a poté byl odebrán roztok z okolí hydrogelu, ve kterém byl ponořen. Na doporučení detekčními kity [53,60] byly vzorky vždy před měřením chráněny před světlem.

Druhá verze hydrogelu byla připravena ve dvou koncentracích, a to z 1 a 2 hm. % agarózy. Postup přípravy hydrogelu byl stejný jako postup při první verzi s jediným rozdílem, že do hydrogelu byl po ochlazení na teplotu 35 °C přidán pouze roztok glukóza oxidázy. Po ztuhnutí hydrogelu v Petriho misce byla vyřezána kolečka o stejném průměru a byla vložena do objemu 20 ml roztoku glukózy. Po 30 minutách byl odebrán z okolí hydrogelu objem 2,85 ml roztoku, který byl převeden do prázdné vialky. K roztoku byly přidány odpovídající objemy Amplexové červení a křenové peroxidázy a celá směs byla inkubována 30 minut bez přístupu světla.

4.3 Měření a zpracování výsledků

4.3.1 Fluorescence

Emisní spektra byla měřena na spektrofluorimetru FS5 (Edinburgh Instrument s modulem SC 25). Emisní spektrum bylo měřeno v rozmezí vlnových délek 575-650 nm s krokem 1 nm, vlnová délka excitace byla nastavena na vlnovou délku 560 nm, emise na 590 nm. Nastavení přístroje pro konkrétní měření shrnuje Tab. 1 a Tab. 2. Hodnoty pH byly měřeny na pH metru Mettler Toledo SevenEasy.

Tab. 1: Přehled nastavení spektrofluorimetru FS5 – Emission Scan

Nastavení fluorescenčního spektrometru FS5							
Typ měření	Modul	Doba měření [min]	λ_{EX} [nm]	λ_{EM} [nm]	Dwell time [s]	Krok [nm]	Štěrbiny
Optimalizace	SC 25	0–90	560	590	0,2	1	3,5; 2,5; 1,5
Kalibrační křivka	SC 25	30	560	590	0,2	1	1,25
Hydrogely	SC 25	30	560	590	0,2	1	1,25

Tab. 2: Nastavení spektrofleurimeru FS5 pro měření kinetiky reakce – Multiple Emission Scan

Nastavení fluorescenčního spektrometru FS5							
Typ měření	Modul	Doba měření [min]	λ_{EX} [nm]	λ_{EM} [nm]	Dwell time [s]	Krok [nm]	Štěrbiny
Kinetika	SC 25	90	560	590	0,2	1	1,25

Vzorky s roztoky pro optimalizaci detekce peroxidu vodíku, kalibrační křivku i odebrané roztoky z měření hydrogelů (popsané v kapitole 4.2.6) byly měřeny v křemenných kyvetách. Do křemenné kyvety bylo napipetováno 4,5 ml reakční směsi v odpovídajících koncentracích uvedených v následujících kapitolách.

Koncentrace vznikajícího peroxidu vodíku byly vypočteny dosazením naměřených hodnot intenzity fluorescence do regresní přímky získané z kalibrační křivky.

Pro výpočet účinnosti inkorporované glukóza oxidázy do hydrogelu byly připraveny kontrolní vzorky se stejnými koncentracemi reakční směsi. V tomto případě nebyla GOx inkorporována do hydrogelu, ale byla přímo přimíchána do reakční směsi. Koncentrace glukóza oxidázy byla přepočtena dle poměru hmotnosti vyříznutého kolečka vztaženého na celkovou hmotnost hydrogelu vylitého do Petriho misky. Sledována byla tedy vytvořená koncentrace peroxidu vodíku v systému, kde glukóza oxidáza není inkorporována do gelu, ale volně reaguje v roztoku. Účinnost byla vypočtena jako poměr koncentrace peroxidu vodíku vytvořeného GOx inkorporovaného do hydrogelu a peroxidu vodíku vytvořeného volně v roztoku. Výpočet je vyjádřen pomocí rovnice (7).

$$x = \frac{C_{H_2O_2 \text{ v hydrogelu}}}{C_{H_2O_2 \text{ v roztoku}}} \quad (7)$$

Všechna naměřená data byla měřena minimálně se třemi opakováními a jako výsledné hodnoty byly použity zprůměrované hodnoty se směrodatnými odchylkami.

4.3.2 Reologické vlastnosti

Na základě výsledků v kapitole 5.3 byl zvolen jednoduchý amplitudový test (mód oscilační) na proměření hydrogelů s inkorporovanou GOx po 2 týdnech a ihned po přípravě hydrogelu. Hydrogely měřené ihned po namíchání byly označeny jako referenční. Reologické vlastnosti byly měřeny na reometru Discovery HR-2 s nastavením uvedeným v Tab. 3. Před samotným měřením byl zvolen tzv. relaxační krok, kdy docházelo k přípravě gelu (temperace a relaxace) na měření. Teplota temperace byla nastavena na 20 °C a s délkou relaxace 2 minut.

Tab. 3: Nastavení hodnot amplitudového testu

Nastavení reometru Discovery HR-2			
Frekvence oscilací [Hz]	Amplituda deformace [%]	Výška [mm]	Počet bodů na dekádu
1	0,01-1000	1	6

Pro vyhodnocení naměřených dat byl zvolen komplexní modul, který byl vypočten pomocí rovnice (8).

$$G^* = \sqrt{G'^2 + G''^2} \quad (8)$$

Dále byly vypočteny hodnoty rozsahu LVO, kdy byla u hydrogelů porovnávána poslední hodnota, která spadala do oblasti LVO. Jako mezní odchylka od lineární oblasti bylo bráno 5 %. Jako výsledná hodnota byla brána průměrná hodnota amplitudy deformace nad a pod 5 % odchylky od linearity.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

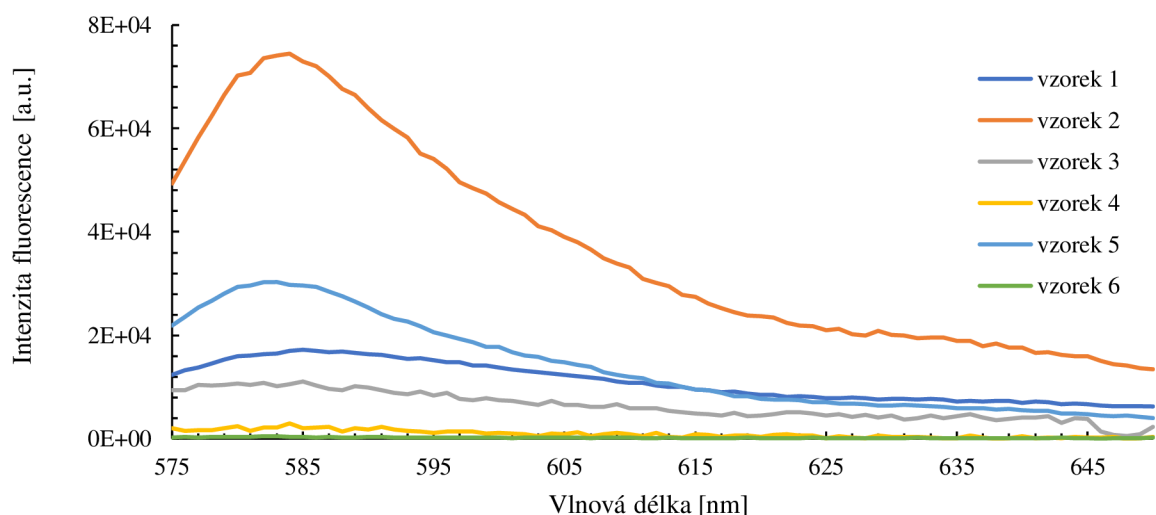
5.1 Optimalizace detekčního systému

Na začátku experimentu bylo nutné v první řadě optimalizovat detekční systém tvořeného peroxidu vodíku složený z Amplexové červeni a křenové peroxidázy. Koncentrace a způsob detekce byl založen na návodu z dvou detekčních kitů [53,60], ze kterých byly brány počáteční koncentrace všech reaktantů.

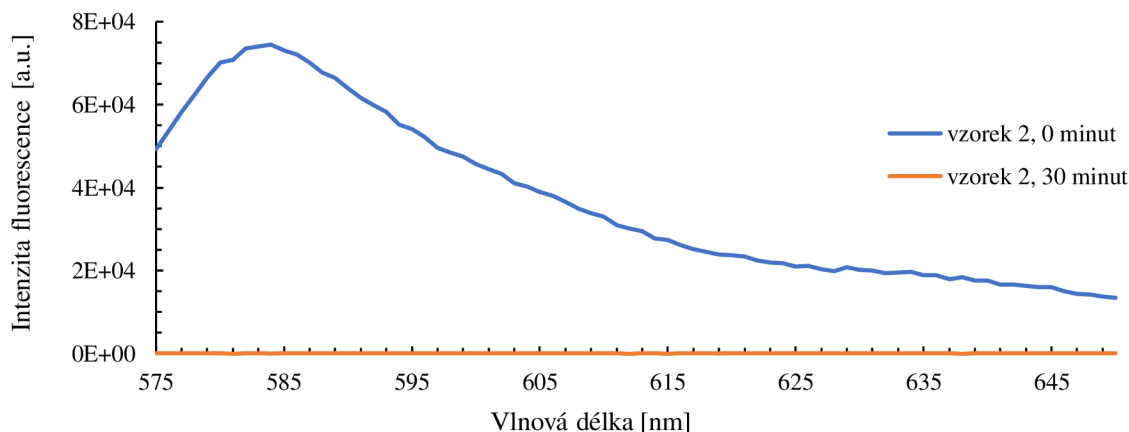
5.1.1 Hledání optimálního složení reakční směsi

První verze detekčního systému byla připravena ve vodném prostředí a měřena byla intenzita fluorescence ihned po přípravě a po 30 minutách. Zvolena byla koncentrační řada zobrazena v Tab. 10 (viz přílohy), kde bylo měřeno celkem 6 vzorků s koncentracemi křenové peroxidázy v rozmezí koncentrací 0,2-0,7 U/ml. Koncentrace Amplexové červeni byly pro všechny vzorky 0,1 mM, koncentrace β -D-glukózy 100 mM a glukóza oxidázy 0,2 g·L⁻¹.

Z Obr. 15 vyplývá, že nejvyšší intenzita fluorescence byla ihned po namíchání naměřena u vzorku číslo 2. Ve všech případech po 30 minutách došlo k vymizení fluorescence (příklad vzorku číslo 2 je vyobrazen na Obr. 16). Z prvního měření (Obr. 15) vyplývá, že nejvyšší intenzitu fluorescence poskytoval vzorek číslo 2, který měl poměr koncentrace křenové peroxidázy ku koncentraci glukóza oxidázy 3:2.



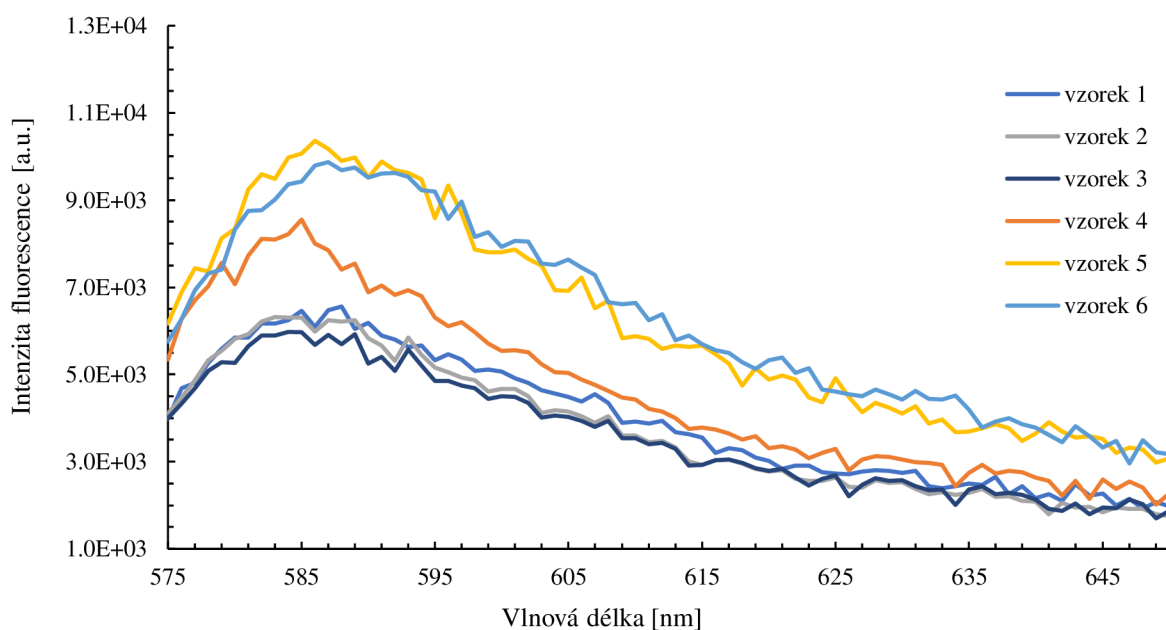
Obr. 15: Emisní spektra koncentrační řady křenové peroxidázy z Tab. 10 naměřeny ihned po namíchání roztoků. Vzorky 1-6 jsou vzaty z Tab. 10



Obr. 16: Emisní spektrum vzorku číslo 2 z Tab. 10 porovnávající intenzity fluorescence ihned po namíchání roztoků a po 30 minutách

Bylo předpokládáno, že vymizení intenzity fluorescence mohlo být způsobeno buďto nedostatečným množstvím glukóza oxidázy nebo použitým vodným prostředím. Vodné prostředí mohlo být nevhodné z toho důvodu, že vlivem vznikající kyseliny glukonové, jakožto jednoho z produktů enzymové reakce, došlo ke snížení pH na takovou hodnotu, kdy došlo k denuraci GOx a HRP. Pro další měření byla tedy nejprve zvýšena koncentrace glukóza oxidázy z $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ na $0,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ a všechny ostatní reakční komponenty byly ponechány o stejných koncentracích jako v prvním měření (koncentrace viz Tab. 11 v přílohách). Vzorky byly měřeny stejným postupem.

Výše zmiňovaný poměr koncentrací HRP ku GOx (3:2) byl také potvrzen jako poměr dávající nejvyšší intenzitu fluorescence při měření vzorků z Tab. 11 (Obr. 17). V tomto případě vyšel nejlépe vzorek číslo 5 (poměr 3:2) a hned za ním vzorek číslo 6 mající velice podobné hodnoty intenzity fluorescence.



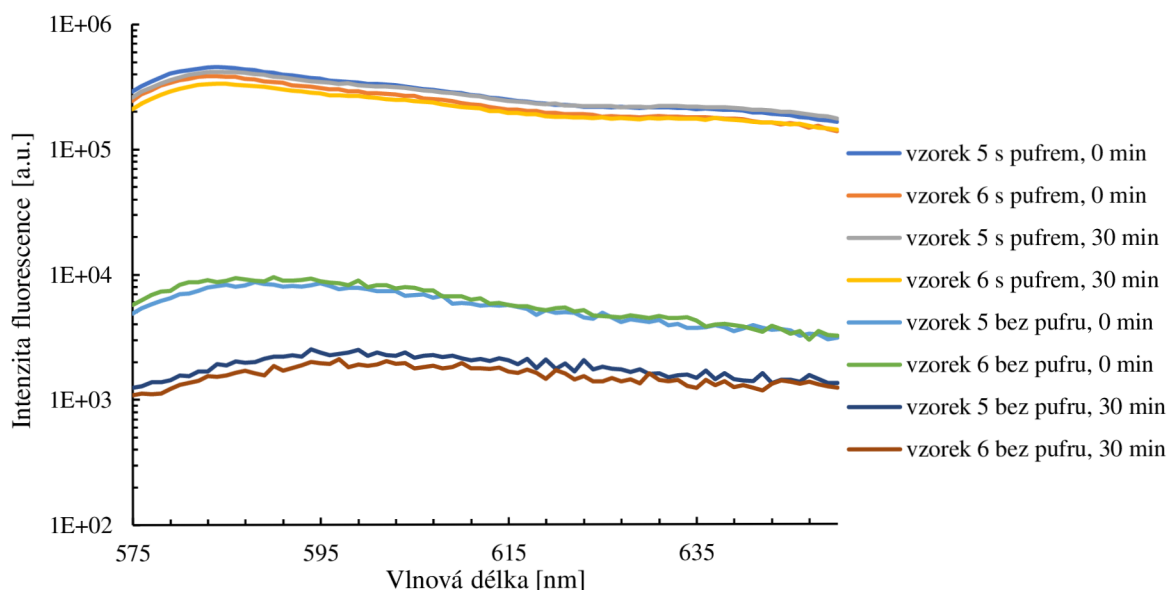
Obr. 17: Emisní spektra koncentrační řady křenové peroxidázy (vzorky 1-6) z Tab. 11 naměřeny ihned po namíchání roztoků

Při zvýšení koncentrace glukóza oxidázy nedošlo ke zvýšení intenzity fluorescence, v časovém průběhu byla intenzita fluorescence stále výrazně nízká. Z měření vzorků z Tab. 11 tedy vyplývá, že v dosavadní směsi koncentrací stále docházelo k ukončení reakce ještě před dosažením 30 minut po prvním měření a hodnoty intenzit fluorescence byly stále velmi nízké, tudíž zvýšení koncentrace GOx nevedlo k vyřešení problému.

Následně bylo proměřeno pH vzorků použitých na měření Obr. 17, kdy z měření bylo zjištěno, že pH vzorků se pohybovalo pH v hodnotách $3,6 \pm 0,2$ (před samotnou reakcí bylo pH $6,9 \pm 0,2$), přičemž detekční kit [53] doporučuje měřit vzorky při pH 7,4. Tento pokles pH nejspíše vedl k utlumení katalytické aktivity křenové peroxidázy a glukóza oxidázy, jejichž pH optima se pohybují okolo hodnot 6 pro křenovou peroxidázu a pH 5,5 pro glukóza oxidázu. Pro další měření byl proto připraven fosfátový pufr o pH 7,4 (viz kapitola 4.2.2), v němž byly znovu připraveny všechny použité zásobní roztoky (viz kapitola 4.2).

Pro srovnání vlivu pH na enzymatickou reakci byly proměřeny vzorky 5, 6 z Tab. 11, které vykazovaly nejvyšší intenzity fluorescence (viz Obr. 17). Vzorky byly připraveny bez pufru (pouze s deionizovanou vodou) a s pufrem. Výsledky z Obr. 18 ukazují, že při použití pufru byla zachována katalytická aktivita i po 30 minutách měření. Zároveň také došlo k vysokému nárůstu hodnot intenzity fluorescence. Došlo také k utvrzení, že vzorek

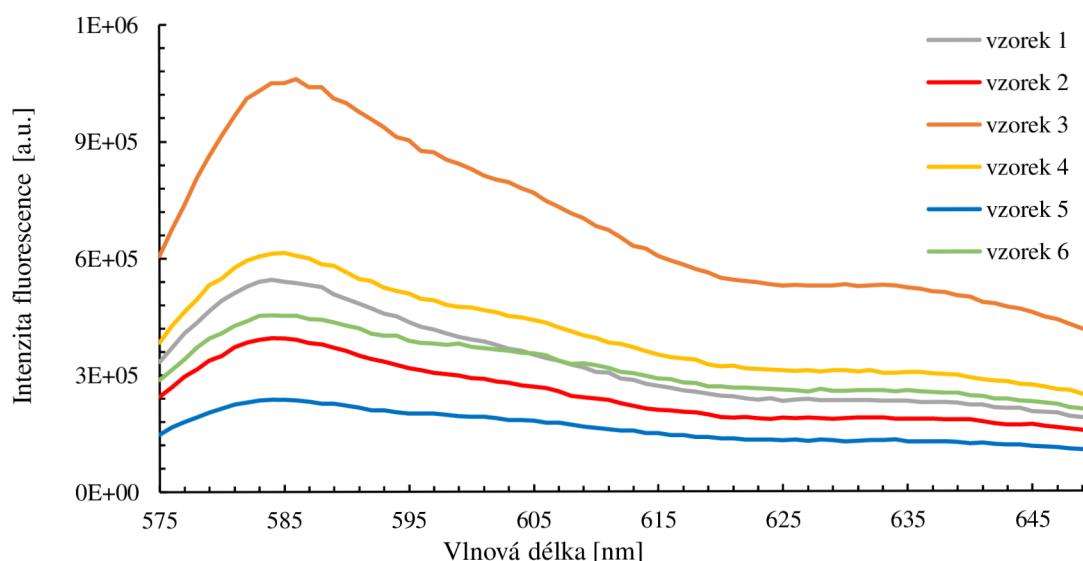
číslo 5 (Tab. 11) dosahoval nejvyšší intenzity fluorescence ihned po namíchání, tak i po 30 minutách, přičemž pokles intenzity nebyl tolik významný jako v měření vzorků v deionizované vodě.



Obr. 18: Srovnání emisních spekter vzorků 5,6 z Tab. 11 v pufru a deionizované vodě

V neposlední řadě byla proměřena koncentrační řada vytvořená na základě vzorku číslo 5, který byl zvolen jakožto neoptimálnější pro budoucí měření v gelech. V Tab. 12 (viz přílohy) jsou uvedeny příslušné koncentrace, přičemž byl vždy zachován poměr mezi HRP/GOx z původního vzorku č.5 (3:2), šlo tedy o ředění či koncentrování vzorku, aby byla vyhodnocena co neoptimálnější koncentrace reakční směsi.

Vzorky byly proměřeny stále stejným postupem s tím rozdílem, že vzorky byly měřeny pouze 30 minut od namíchání vzorku, jak to přesně doporučuje detekční kit [60] i výsledky uvedené v následující kapitole 5.1.2. Výsledky (viz Obr. 19) ukazují, že za neoptimálnější koncentraci byl zvolen vzorek číslo 3, který dosahoval nejvyšší intenzity v porovnání s ostatními vzorky. Koncentrace vzorku číslo 3 (HRP o koncentraci $0,45 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$, Amplexová červeně o koncentraci $0,1 \text{ mM}$, glukóza 100 mM a GOx $0,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) byly dále použity při měření vzorků gelů.

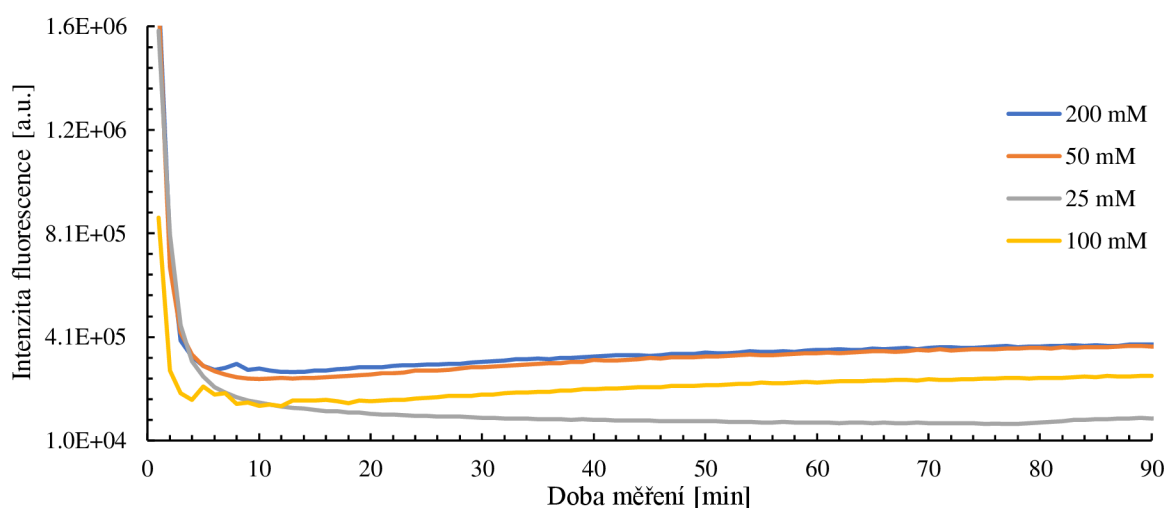


Obr. 19: Emisní spektra vzorků (1-6) z Tab. 12

5.1.2 Měření kinetiky enzymové reakce

Detekční kity [53,60] doporučují měřit vzorky po 30 minutách po namíchání vzorku. Pro potvrzení uvedeného času byla proměřena závislost intenzity fluorescence na čase. Předpokládalo se, že v čase 30 minut by měla být konstantní hodnota intenzity fluorescence a samotné měření by nemělo být negativně ovlivněno při měření více vzorků zároveň, kdy je možné, že by došlo k prodlevě mezi měřeními vzorků. Časový průběh reakce byl měřen po dobu 90 minut pomocí nastavení spektrofluorimetru popsaného v kapitole 4.3.

Pro samotné měření byl zvolen vzorek číslo 3 z Tab. 12 (viz přílohy), který se jevil jako nejvíce optimální pro získání co nejpřesnějších výsledků detekce. Z výsledků měření shrnutých do Obr. 20 bylo zjištěno, že ihned po začátku měření došlo k velkému poklesu intenzity fluorescence a poté k postupnému narůstání. Na tuto problematiku odkazuje kapitola 3.3 v současném stavu řešené problematiky, kdy podle článku [57] by měla záviset doba nárůstu intenzity fluorescence na koncentraci glukózy. Proto byl vzorek proměřen s koncentracemi glukózy 25, 50, 100 a 200 mM. Na Obr. 20 je možné vidět, že zmíněný nárůst intenzity fluorescence v tomto případě výrazně nezávisí na koncentraci glukózy, dochází pouze k mírným změnám intenzity.



Obr. 20: Měření časového průběhu reakce vzorku číslo 3 z Tab. 12 pro různé koncentrace glukózy

Na základě článku [57] popsaného v kapitole 3.3. může být pokles intenzity na začátku měření vysvětlen tak, že komplex GOx[FADH₂] vzniklý po reakci GOx s glukózou nejprve redukuje resorufin, čímž okamžitě poskytuje Amplexovou červen, a poté reaguje s atmosférickým kyslíkem za vzniku H₂O₂, který v přítomnosti HRP iniciuje reoxidaci Amplexové červeně.

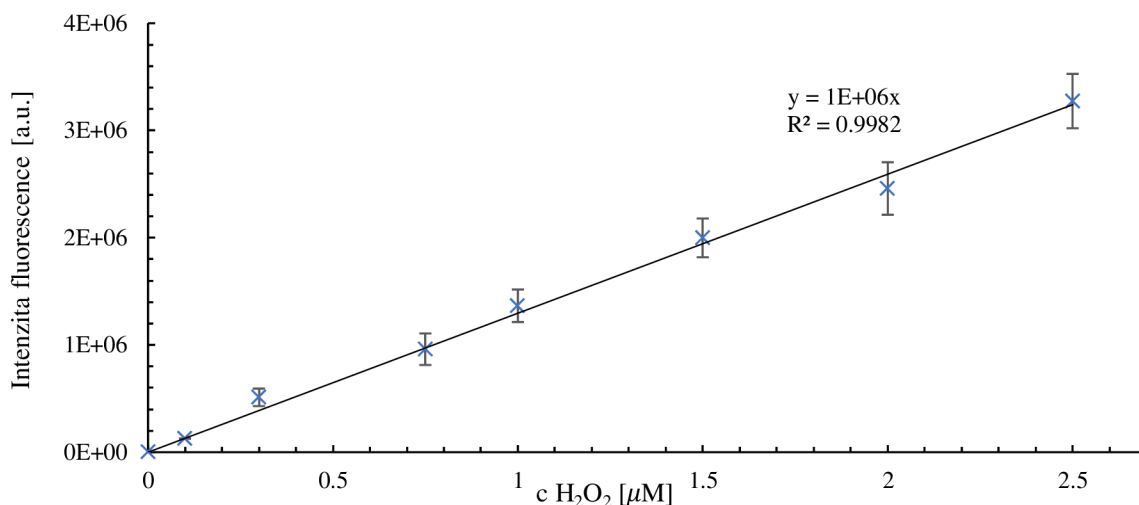
Pro stanovení kalibrační křivky a měření vzorků gelů bylo proto vyhodnoceno, že doba inkubace bude ponechána na původních 30 minut (doporučeno detekčním kitem [53]), jelikož z Obr. 20 vyplývá, že v oblasti kolem 30. minuty nedochází k výrazným změnám intenzity a nebude tak příliš narušena přesnost stanovení.

5.2 Měření kalibrační křivky

Koncentrace detekčního systému byly zvoleny na základě vzorku číslo 3 z Tab. 12 (viz přílohy) a koncentrace peroxidu vodíku byly zvoleny v rozmezí 0-2,5 μ M. Kalibrační řada je uvedena v Tab. 9 (viz přílohy).

Na základě rešerše dané problematiky a výsledků z měření časového průběhu reakce byly vzorky inkubovány po dobu 30 minut bez přístupu světla, aby bylo zamezeno nežádoucí fotooxidaci popsané v kapitole 3.3. Pro měření intenzity fluorescence byl použit modul

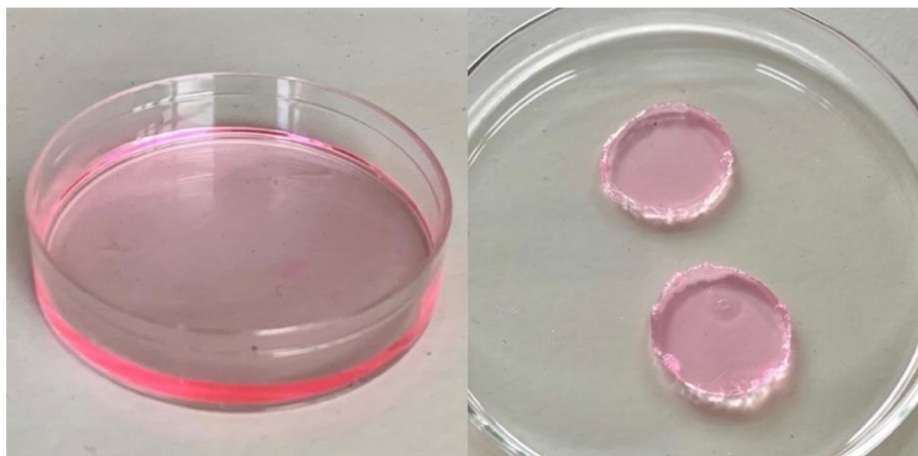
SC 25 s nastavením teploty na 20 °C a obsah křemenných kyvet byl míchán pro zajištění homogenity vzorku. Výsledkem byla naměřená kalibrační křivka pro různé koncentrace peroxidu vodíku (viz Obr. 21).



Obr. 21: Kalibrační křivka peroxidu vodíku stanoveného reakcí Amplexové červeni

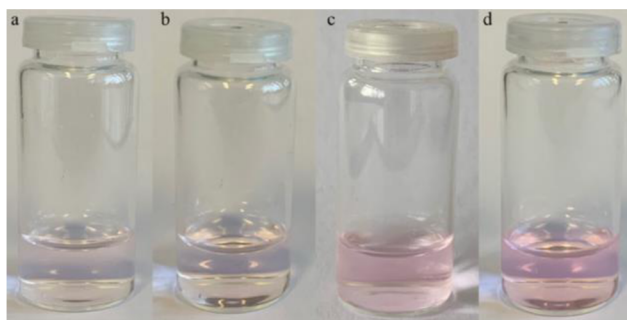
5.3 Měření hydrogelu s inkorporovanou glukóza oxidázou

První měření proběhlo s první verzí hydrogelu připraveného z 2 hm. % agarózy (příprava popsána v kapitole 4.2.6), do kterého byla inkorporována glukóza oxidáza, křenová peroxidáza a Amplexová červeň o koncentracích podle vzorku číslo 3 (popsáno v kapitole 5.1). Připravený hydrogel byl ještě před ponořením do roztoku glukózy růžově zbarven, jak ukazuje Obr. 22. Výrazné růžové zbarvení nám indikuje, že došlo k naoxidování Amplexové červeni ještě před přidáním roztoku β -D-glukózy. Lze předpokládat, že glukóza oxidáza inkorporována do agarózového hydrogelu využila řetězce agarózy nebo její části jako substrát místo β -D-glukózy a došlo tak ke tvorbě peroxidu vodíku a tím pádem k naoxidování Amplexové červeni.



Obr. 22: Hydrogel s inkorporovanou glukóza oxidázou, křenovou peroxidázou a Amplexovou červeni před vložení hydrogelu do roztoku glukózy

Další měření proběhlo s druhou verzí hydrogelu z 1 a 2 hm. % agarózy, jehož příprava je blíže popsána v kapitole 4.2.6. Do hydrogelu byla inkorporována v průběhu jeho přípravy pouze glukóza oxidáza a samotný detekční systém byl oddělen. Jelikož bylo při měření první verze hydrogelu zjištěno, že glukóza oxidáza reaguje s agarózou, byly pro každé měření změřeny hydrogely ponořené pouze do pufru (vzorek označen jako blank).



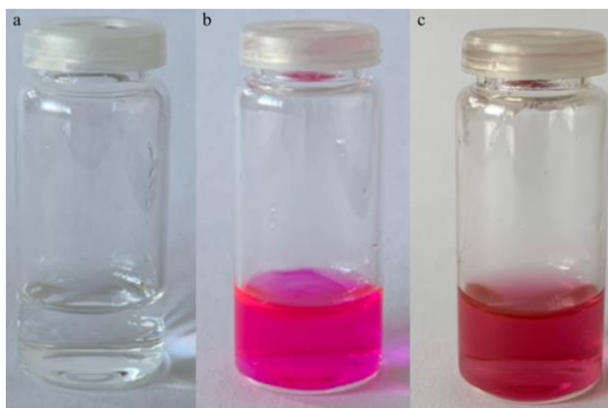
Obr. 23: Vialky obsahující detekční systém a roztok peroxidu vodíku získaný z okolí hydrogelu s inkorporovanou GOx bez glukózy (blank), kde a – roztok ihned po přidání AR (1 hm. % agaróza), b – roztok ihned po přidání AR (2 hm. % agaróza), c – roztok po 30 minutách po přidání AR (1 hm. % agaróza), d – roztok po 30 minutách po přidání AR (2 hm. % agaróza)

Z Obr. 23 je patrné, že ihned po přidání Amplexové červení došlo ke slabému zbarvení roztoku, přičemž nebyl viditelný rozdíl mezi hydrogely z 1 a 2 hm. % agarózy. Po 30 minutách došlo k zesílení růžového zbarvení roztoku, přičemž u 2 hm. % agarózy je toto zbarvení mírně výraznější. Po změření intenzity fluorescence obou roztoků (Tab. 4) bylo zjištěno, že intenzita fluorescence byla vyšší u 2 hm. % hydrogelu. Měření bylo tak potvrzeno, že peroxid vodíku vzniká i při reakci glukóza oxidázy s agarózou.

Tab. 4: Souhrn naměřených intenzit fluorescence u 1 a 2 hm. % hydrogelu s inkorporovanou GOx

Koncentrace agarózového hydrogelu [hm. %]	Intenzita fluorescence blanku [a.u.]
1	$(3,0 \pm 0,3) \cdot 10^5$
2	$(5,5 \pm 0,4) \cdot 10^5$

Následovalo měření hydrogelů s inkorporovanou GOx, které byly ponořeny do roztoku glukózy. Obr. 24 nám ukazuje barevné rozdíly po přidání Amplexové červení k reakční směsi. Z Obr. 24 je patrné, že ihned po přidání Amplexové červení do reakční směsi došlo k výraznému růžovo-fialovému zbarvení, které znamená, že došlo k reakci peroxidu vodíku s Amplexovou červení, která se naoxidovala na fluorescenční resorufin. Po 30 minutách došlo ke změně zbarvení, kdy se z výrazné růžovo-fialové barvy stala růžovo-červená. Stejného zbarvení bylo dosaženo při obou koncentracích hydrogelu. Tab. 5 shrnuje výsledné naměřené hodnoty intenzity a vypočtené koncentrace peroxidu vodíku. Koncentrace byly vypočteny pomocí regresní přímky z kalibrační křivky viz Obr. 21. Z naměřených dat vyplývá, že při reakci hydrogelu s inkorporovanou GOx došlo ke zvýšení intenzity fluorescence oproti blanku.



Obr. 24: Vialky obsahující detekční systém a odebraný vzorek obsahující peroxid vodíku z okolí 1 hm. % agarózového hydrogelu s inkorporovanou GOx, kde a – reakční směs bez přidání Amplexové červení, b – reakční směs ihned po přidání Amplexové červení, c – reakční směs po 30 minutách po přidání Amplexové červení

Tab. 5: Výsledné hodnoty koncentrací vygenerovaného peroxidu vodíku z 1 hm. % agarózového hydrogelu s inkorporovanou glukóza oxidázou

1 hm. % hydrogel s inkorporovanou GOx			
Intenzita fluorescence vzorku hydrogelu [a.u.]	Intenzita fluorescence blanku [a.u.]	c _{H₂O₂} ve vzorku hydrogelu [μM]	c _{H₂O₂} po odečtení blanku [μM]
$(9,7 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(3,0 \pm 0,3) \cdot 10^5$	$0,98 \pm 0,04$	$0,67 \pm 0,05$

Dále bylo zopakováno stejným postupem i měření s 2 hm. % agarózovým hydrogelem s inkorporovanou GOx a výsledky byly opět shrnuty do Tab. 6. Při porovnání koncentrací peroxidu vodíku z obou koncentrací hydrogelu je zřejmé, že nejvíce peroxidu vodíku bylo vytvořeno v 1 hm. % hydrogelu. Lze předpokládat, že v 1 hm. % hydrogelu se nacházely větší póry a glukóza oxidáza tak mohla snadněji pronikat skrz ně a reagovat β-D-glukózou, čímž docházelo ke vzniku více peroxidu vodíku.

Tab. 6: Výsledné hodnoty koncentrací vygenerovaného peroxidu vodíku z 2 hm. % agarózového hydrogelu s inkorporovanou glukóza oxidázou

2 hm. % hydrogel s inkorporovanou GOx			
Intenzita fluorescence vzorku hydrogelu [a.u.]	Intenzita fluorescence blanku [a.u.]	c _{H₂O₂} ve vzorku hydrogelu [μM]	c _{H₂O₂} po odečtení blanku [μM]
$(1,1 \pm 0,2) \cdot 10^5$	$(5,5 \pm 0,4) \cdot 10^5$	$1,08 \pm 0,02$	$0,52 \pm 0,08$

5.4 Účinnost inkorporace glukóza oxidázy do hydrogelu

V neposlední řadě bylo nutné zhodnotit účinnost inkorporace GOx do hydrogelu. Zajímalo nás, jak moc funkční bude GOx v porovnání s reakcí GOx pouze v pufru, kde její difúze nebyla ovlivněna strukturou hydrogelu. Pro určení účinnosti (funkčnosti) glukóza oxidázy inkorporované do hydrogelu byla zvolena metoda popsána v kapitole 4.3. Vypočtené účinnosti shrnuje Tab. 7, kde lze vidět, že vyšší účinnosti dosáhl 1 hm. % hydrogel s inkorporovanou GOx, což nás opět více přiklání k hypotéze, že v méně koncentrovaném hydrogelu dojde k lepšímu prostoupení GOx do okolí hydrogelu a dojde tak k vytvoření vyšší koncentrace peroxidu vodíku.

Tab. 7: Srovnání účinnosti inkorporace v různých koncentracích agarózového hydrogelu

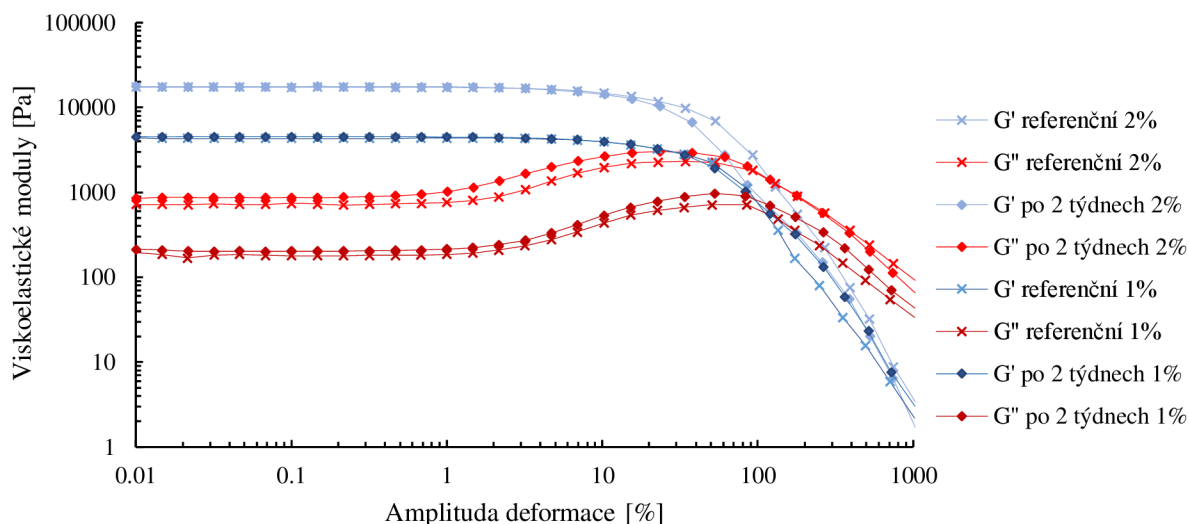
Koncentrace agarózového hydrogelu [hm %]	Účinnost [%]
1	$68,6 \pm 1,3$
2	$53,6 \pm 1,7$

5.5 Reologické vlastnosti hydrogelů s inkorporovanou GOx

Jelikož bylo zjištěno, že glukóza oxidáza reagovala i s agarózou, jak bylo naměřeno v kapitole 5.3, bylo navrženo měření reologických vlastností porovnávající nově připravený a 2 týdny starý hydrogel s inkorporovanou GOx. Předpoklad byl takový, že pokud dochází ke spotřebě agarózy glukózou oxidázou, mohla by být narušena struktura hydrogelu a tím jeho celá integrita, což by se projevilo na změně mechanických vlastností (konkrétně viskoelastických modulů) při amplitudové testu anebo změně rozsahu LVO. Proveden byl oscilační, konkrétně amplitudový test, jehož postup měření a nastavení je popsáno v kapitole 4.3.

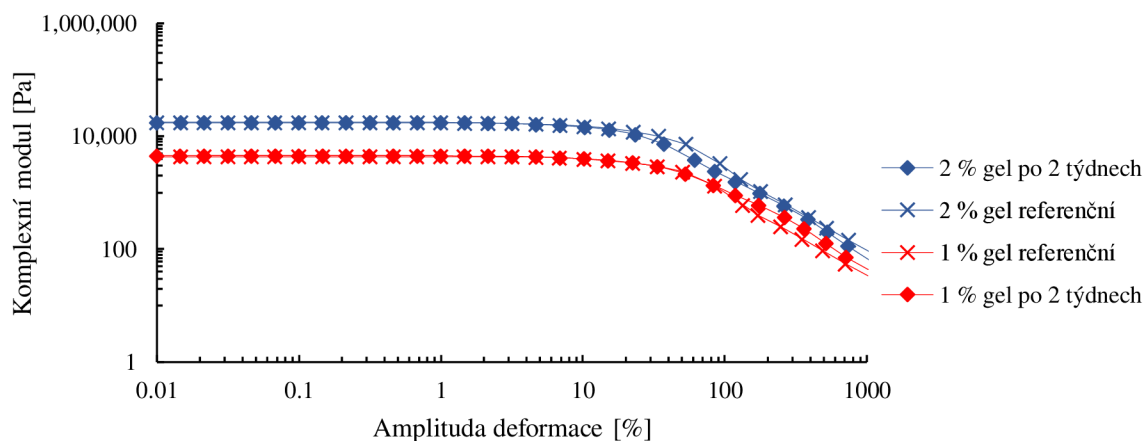
Z naměřených viskoelastických modulů v závislosti na amplitudě deformace shrnutých v Obr. 25 je z viskoelastických modulů pro 1 hm. % agarózu zřejmé, že na počátku amplitudy

má G'' vyšší hodnoty než G' , což nám dává údaj o tom, že se na začátku měření nacházela viskoelastická látka s převahou elastického modulu. Se zvyšující se amplitudou se dostáváme až do bodu, kde se křivky modulu G' a G'' protínají. Za touto hranicí se náš vzorek dostával do oblasti kapalné látky. Ze srovnání referenčních a 2 týdnů starých gelů lze říct, že mezi hodnotami modulů G' a G'' jsou pouze velmi malé rozdíly, které lze spíše připsat chybě měření než samotným rozdílům v integritě hydrogelů. Situace byla stejná i u naměřených dat 2 hm. % hydrogelu (viz Obr. 25), kde také nedocházelo k výrazným změnám v hodnotách viskoelastických modulů u referenčních a 2 týdnů starých hydrogelů s inkorporovanou GOx. Jednotlivá měření závislosti viskoelastických modulů na amplitudě deformace jsou pro každou koncentraci hydrogelu zvlášť v jednotlivých grafech v přílohách (Obr. 27, Obr. 28).



Obr. 25: Graf shrnující závislosti viskoelastických modulů na amplitudě deformace pro oba typy gelů

Z Obr. 25 je dále patrné, že 2 hm. % hydrogel dosahoval vyšších hodnot viskoelastických modulů, než 1 hm. % hydrogel. To lze vysvětlit tak, že ve 2 hm. % gelu se bude vyskytovat více uzlů ve struktuře agarózy, která tvoří trojrozměrnou síť gelu. Zároveň je z grafu na první pohled zřejmé, že oba typy hydrogelu vykazují velice podobné délky oblastí LVO, což znamená, že integrita obou gelů by měla být i po 2 týdnech stáří gelu zachována. Drobné odchylky naměřených hodnot mohou být spíše připsávány chybě měření než rozdílům ve stabilitě gelu. Dále byl proveden výpočet komplexního modulu a výsledky komplexních modulů byly shrnuty do Obr. 26. Z výsledků je patrné, že křivka komplexního modulu má stejný průběh u obou typů gelů, jediný rozdíl je v hodnotách, kdy pro 2 hm. % hydrogel vychází hodnoty komplexního modulu vyšší. Také opět nedochází k výrazným rozdílům mezi 2 týdny starými gely a referenčními.



Obr. 26: Graf shrnující komplexní moduly v závislosti na amplitudě deformace pro oba typy hydrogelu

Následně byly vypočteny hodnoty LVO (Tab. 8) podle postupu popsaného v kapitole 4.3. U 1 hm. % hydrogelu je vidět rozdíl v hodnotách LVO na rozdíl od 2 hm. % hydrogelu. Referenční 1 hm. % hydrogel vykazuje vyšší hodnoty LVO než vzorek starý 2 týdny. Znamená to tedy, že referenční vzorek vykazoval viskoelastické chování s převahou elastického modulu a co víc, pevnost uzlů charakterizovaná hodnotou konce LVO je vyšší v porovnání (8,5 %) se 2 týdny starým vzorkem (5,8 %). Tento pokles v hodnotách pevnosti uzlů může být pravděpodobně zapříčiněn inkorporací glukóza oxidázy do hydrogelu, která spotřebovávala části řetězců agarózy. Výše uvedená hypotéza byla testována i u 2 hm. % hydrogelu, kde jsou hodnoty LVO téměř stejné a lze říct, že nedochází k žádným změnám. Výsledky měření lze zdůvodnit tak, že v 2 hm. % hydrogelu se nachází více uzlů, tudíž jejich úbytek způsobený glukóza oxidázou nebude tolik znatelný jako u 1 hm. % hydrogelu, kde se bude nacházet méně uzlů.

Tab. 8: Tabulka shrnující hodnoty LVO pro oba typy hydrogelů s inkorporovanou GOx

	Hydrogel [hm. %]	Referenční	Po 2 týdnech
LVO [%]	1	8,5	5,8
	2	3,9	4,0

6 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo nalézt vhodné hydrogely a detekční systém pro inkorporaci enzymu glukóza oxidázy do hydrogelových struktur. Takto inkorporovaný enzym by měl vykazovat aktivitu a zároveň by neměl ovlivňovat strukturální vlastnosti hydrogelu. Na základě literární rešerše byl jako vhodný hydrogel pro inkorporaci vybrán agarózový hydrogel a aktivita enzymu byla měřena pomocí fluorescenční spektroskopie za použití fluorescenční sondy Amplexové červeni, pomocí které bylo možné stanovit koncentrace vznikajícího peroxidu vodíku.

Nutnou součástí tohoto experimentu bylo v první řadě optimalizovat detekční systém, který vzhledem k jeho komplexnosti bylo nutné upravit pro co nejpřesnější výsledky. První zkoušky detekčního systému probíhaly ve vodném prostředí, kdy se hodnoty intenzity fluorescence pohybovaly v nízkých hodnotách a po 30 minutách již nebyla naměřena žádná intenzita fluorescence. Zmíněný pokles intenzity byl poté přisouzen poklesu pH, které se měnilo v průběhu reakce. Proto bylo rozhodnuto, že další příprava vzorků bude probíhat v pufru, protože bylo usuzováno, že vlivem vznikající kyseliny glukonové, jakožto jednoho z produktů enzymové reakce, došlo ke snížení pH na takovou hodnotu, kdy došlo k denaturaci použitých enzymů. Tuto hypotézu potvrdily další měření, kdy v pufru došlo k výraznému nárůstu intenzity fluorescence a také došlo k udržení těchto hodnot i po 30 minutách. Dále bylo pomocí různých koncentračních řad dosaženo co nejvyšších hodnot intenzity fluorescence, aby bylo možné tyto koncentrace aplikovat na měření produktů enzymové reakce v hydrogelech.

Po optimalizaci reakční směsi následovalo ověření doporučené doby inkubace vzorků pomocí kinetiky enzymatické reakce. Z měření závislosti intenzity fluorescence na čase bylo zjištěno, že hned po začátku měření došlo k velkému poklesu intenzity fluorescence a poté k postupnému narůstání. Tento pokles intenzity na začátku měření může být vysvětlen tím, že komplex $\text{GOx}[\text{FADH}_2]$ vzniklý po reakci GOx s glukózou nejprve redukuje resorufin, čímž okamžitě poskytuje Amplexovou červeně a až poté reaguje s atmosférickým kyslíkem za vzniku peroxidu vodíku, který v přítomnosti křemíkové peroxidázy iniciuje reoxidaci Amplexové červeně. Poté byla kinetika enzymatické reakce měřena pro různé koncentrace β -D-glukózy, přičemž bylo zjištěno, že různé koncentrace nemají významný vliv na kinetiku reakce. Dále bylo potvrzeno, že v době okolo 30. minuty po namíchání došlo k ustálení hodnot intenzity fluorescence a tato doba inkubace byla tedy vhodná pro měření kalibrační křivky a následně hydrogelů s inkorporovanou GOx .

Dalším krokem byla inkorporace glukóza oxidázy, která byla provedena inkorporací roztoku GOx do rozpuštěného roztoku nízkoteplotní agarózy. Při zkoušce inkorporace enzymu do hydrogelu byl s enzymem inkorporován i celý detekční systém a po namíchání hydrogelu si nešlo nevšimnout růžového zbarvení celého roztoku, který vznikl vlivem naoxidování fluorescenční sondy. Po změření vzorku bylo zjištěno, že v hydrogelu docházelo ke tvorbě peroxidu vodíku ještě před přidáním substrátu enzymu. To může znamenat, že glukóza oxidáza použila jako substrát i agarózu. Pro další měření byl oddělen detekční systém od hydrogelu a pro výsledné hodnoty byl naměřen blank, aby bylo možné naměřené hodnoty přepočítat na množství peroxidu vodíku, které vzniklo přidávkem β -D-glukózy do reakční směsi. Pro porovnání různých typů hydrogelových struktur byl enzym inkorporován do dvou různých koncentrací agarózového hydrogelu (1 a 2 hm. %). Bylo zjištěno, že k nejvyšší tvorbě peroxidu vodíku docházelo v 1 hm. % hydrogelu, kdy naměřená koncentrace peroxidu vodíku činila $(0,67 \pm 0,05) \mu\text{M}$ (oproti 2 hm. % hydrogelu s $(0,52 \pm 0,08) \mu\text{M}$ peroxidu vodíku). Lze předpokládat, že v 1 hm. % hydrogelu se nachází větší póry a glukóza oxidáza tak může snadněji pronikat skrz ně a reagovat s molekulami β -D-glukózy.

V neposlední řadě byla změřena účinnost inkorporace glukóza oxidázy, tj. schopnost GOx vytvářet produkty v prostředí hydrogelu v porovnání s GOx pouze v pufru. Výsledky ukazují jako nejvíce účinnou inkorporaci do 1 hm. % hydrogelu, kdy účinnost byla vypočtena

na $(68,6 \pm 1,3) \%$ oproti 2 hm. % hydrogelu s účinností $(53,6 \pm 1,7) \%$. To opět přispívá k hypotéze, že v 1 hm. % se může GOx lépe pohybovat a tím dochází k tvorbě většího množství peroxidu vodíku.

Jako poslední bod experimentu nás zajímaly reologické vlastnosti takto připraveného hydrogelu. Vzhledem k tomu, že glukóza oxidáza mohla reagovat s agarózou, byl proveden oscilační test čerstvého a 2 týdny starého hydrogelu s GOx, jehož struktura mohla být narušena vlivem spotřeby agarózy enzymem. Hydrogely byly porovnány pomocí viskoelastických modulů, kde z výsledků měření nevyplývá, že by inkorporace GOx měla významný vliv na strukturu hydrogelu. Pro poslední porovnání byly vypočteny konce hodnoty délky viskoelastické oblasti (LVO), kdy u 1 hm. % hydrogelu došlo po 2 týdnech k poklesu z původní délky LVO 8,5 % na 5,8 %, zatímco u 2 hm. % hydrogelu se hodnoty držely po 2 týdnech na hodnotách 4,0 % z původních 3,9 %. Hypotézou může být, že v 2 hm. % hydrogelu se vyskytuje více uzlů v jeho struktuře a pokud dojde ke spotřebě částí těchto uzlů enzymem, nebude to mít ve výsledku tak významný vliv na integritu gelu, jako v 1 hm. % hydrogelu, kde se bude vyskytovat méně uzlů.

Závěrem mohu konstatovat, že byly splněny všechny cíle bakalářské práce a pro další práci na tomto tématu bych navrhla provedení více reologických měření pro získání více dat o integritě hydrogelu s inkorporovanou GOx. Dále bych navrhla experimenty v dalších koncentracích agarózy a dále určení kinetiky enzymové reakce v hydrogelech.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] BUCEKOVA, Marcela, Ivana VALACHOVA, Lenka KOHUTOVA, Emanuel PROCHAZKA, Jaroslav KLAUDINY a Juraj MAJTAN. Honeybee glucose oxidase—its expression in honeybee workers and comparative analyses of its content and H₂O₂-mediated antibacterial activity in natural honeys. *Naturwissenschaften* [online]. 2014, 101(8), 661-670 [cit. 2022-05-12]. ISSN 0028-1042. DOI:10.1007/s00114-014-1205-z
- [2] BLANCO, Antonio a Gustavo BLANCO. Enzymes. *Medical Biochemistry* [online]. Elsevier, 2017, s. 153-175 [cit. 2021-12-26]. ISBN 9780128035504. DOI: 10.1016/B978-0-12-803550-4.00008-2
- [3] VODRÁŽKA, Zdeněk, Pavel RAUCH a Jan KÁŠ. Enzymologie. 2., přepracované vyd. Praha: VŠCHT, 1991. ISBN 80-708-0124-7.
- [4] KODÍČEK, Milan. Studijní materiály z enzymologie. Praha: Vysoká škola chemickotechnologická v Praze, 2003. ISBN 80-708-0523-4.
- [5] ROBERTS, Stanley a Alasdair GIBB. Introduction to enzymes, receptors and the action of small molecule drugs. *Introduction to Biological and Small Molecule Drug Research and Development* [online]. Elsevier, 2013, s. 1-55 [cit. 2021-12-26]. ISBN 9780123971760. DOI: 10.1016/B978-0-12-397176-0.00001-7
- [6] DORAN, Pauline M. Homogeneous Reactions. *Bioprocess Engineering Principles*. Elsevier, 2013, 2013, 599-703. ISBN 9780122208515. DOI: 10.1016/B978-0-12-220851-5.00012-5
- [7] DOSTÁL, Jiří. Biochemie: pro posluchače bakalářských oborů. Brno: Masarykova univerzita, 2009. ISBN 978-80-210-5020-4.
- [8] HECHT, H.J., H.M. KALISZ, J. HENDLE, R.D. SCHMID a D. SCHOMBURG. Crystal Structure of Glucose Oxidase from *Aspergillus niger* Refined at 2.3 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*. 1993, 229(1), 153-172. ISSN 00222836. DOI: 10.1006/jmbi.1993.1015
- [9] BANKAR, Sandip, Mahesh BULE, Rekha SINGHAL a Laxmi ANANTHANARAYAN. Glucose oxidase — An overview. *Biotechnology Advances* [online]. 2009, 27(4), 489-501 [cit. 2021-12-25]. ISSN 07349750. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2009.04.003
- [10] WITT, Susanne, Gerd WOHLFAHRT, Dietmar SCHOMBURG, Hans-Jürgen HECHT a Henryk KALISZ. Conserved arginine-516 of *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase is essential for the efficient binding of β-D-glucose. In: *Biochemical Journal* [online]. [cit. 2021-12-25]. ISSN 02646021. DOI: 10.1042/0264-6021:3470553
- [11] WILSON, R. a A.P.F. TURNER. Glucose oxidase: an ideal enzyme. *Biosensors and bioelectronics* [online]. 1992, 7(3), 165-185 [cit. 2021-04-28]. ISSN 0956-5663. DOI: 10.1016/0956-5663(92)87013-F
- [12] NOVÁK, Josef. Fyzikální chemie: bakalářský a magisterský kurz. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-675-3.
- [13] PAZUR, John H. [18] Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Carbohydrate Metabolism* [online]. Elsevier, 1966, s. 82-87 [cit. 2022-03-04]. *Methods in Enzymology*. ISBN 9780121818098. DOI: 10.1016/0076-6879(66)09022-0

- [14] Glucose oxidase with FAD in red. In: PDB-101 [foto]. [cit. 2021-04-30]. Dostupné z: <https://pdb101.rcsb.org/motm/77>
- [15] CRUEGER, Anneliese a Wulf CRUEGER. Glucose Transforming Enzymes. FOGARTY, William M. a Catherine T. KELLY, ed., William FOGARTY, Catherine KELLY. Microbial Enzymes and Biotechnology [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 1990, s. 177-226 [cit. 2022-03-12]. ISBN 978-94-010-6830-7. DOI: 10.1007/978-94-009-0765-2_5
- [16] DUNNILL, C., T. PATTON, J. BRENNAN, J. BARRETT, M. DRYDEN, J. COOKE, D. LEAPER a N.T. GEORGOPOULOS. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. International Wound Journal [online]. 2017, 14(1), 89-96 [cit. 2021-04-28]. ISSN 17424801. DOI: 10.1111/iwj.12557
- [17] TUR, E., L. BOLTON a B.E. CONSTANTINE. Topical hydrogen peroxide treatment of ischemic ulcers in the guinea pig: Blood recruitment in multiple skin sites. Journal of the American Academy of Dermatology [online]. 1995, 33(2), 217-221 [cit. 2021-04-28]. ISSN 01909622. DOI: 10.1016/0190-9622(95)90238-4
- [18] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav. Vyd. 4. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2002. ISBN 80-708-0475-0.
- [19] POUCHLÝ, Julius. Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [20] AHMED, Enas M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications. Journal of Advanced Research [online]. 2015, 6(2), 105-121 [cit. 2021-12-23]. ISSN 20901232. DOI: 10.1016/j.jare.2013.07.006
- [21] ZARRINTAJ, Payam, Saeed MANOUCHEHRI, Zahed AHMADI, Mohammad SAEB, Aleksandra URBANSKA, David KAPLAN a Masoud MOZAFARI. Agarose-based biomaterials for tissue engineering. Carbohydrate Polymers [online]. 2018, 187, 66-84 [cit. 2021-12-23]. ISSN 01448617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.01.060
- [22] ZARRINTAJ, Payam, Behnaz BAKHSHANDEH, Iraj REZAEIAN, Behnam HESHMATIAN a Mohammad GANJALI. A Novel Electroactive Agarose-Aniline Pentamer Platform as a Potential Candidate for Neural Tissue Engineering. Scientific Reports [online]. 2017, 7(1) [cit. 2021-12-23]. ISSN 2045-2322. DOI: 10.1038/s41598-017-17486-9
- [23] MAYER, Helmut a Gregor FIECHTER. Electrophoretic Techniques. Food Protected Designation of Origin - Methodologies and Applications [online]. Elsevier, 2013, s. 251-278 [cit. 2021-12-23]. Comprehensive Analytical Chemistry. ISBN 9780444595621. DOI: 10.1016/B978-0-444-59562-1.00010-4
- [24] PROSSER, Václav. Experimentální metody biofyziky. Praha: Academia, 1989. ISBN 80-200-0059-3.
- [25] ARDUI, Simon, Adam AMEUR, Joris VERMEESCH a Matthew HESTAND. Single molecule real-time (SMRT) sequencing comes of age: applications and utilities for medical diagnostics. Nucleic Acids Research [online]. 2018, 46(5), 2159-2168 [cit. 2021-12-24]. ISSN 0305-1048. DOI: 10.1093/nar/gky066

- [26] KOHLI, R. Methods for Assessing Surface Cleanliness. Developments in Surface Contamination and Cleaning, Volume 12 [online]. Elsevier, 2019, s. 23-105 [cit. 2021-12-24]. ISBN 9780128160817. DOI: 10.1016/B978-0-12-816081-7.00003-6
- [27] VALEUR, Bernard a Mário Nuno BERBERAN-SANTOS. *Molecular fluorescence: principles and applications*. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2013. ISBN 978-352-7650-002.
- [28] ALIMOVA, Alexandra, A. KATZ, Rakhi PODDER, Glenn MINKO, Hui WEI, R. ALFANO a Paul GOTTLIEB. Virus Particles Monitored by Fluorescence Spectroscopy: A Potential Detection Assay for Macromolecular Assembly. *Photochemistry and Photobiology* [online]. 2004, 80(1), 2004-02-11--080 [cit. 2022-03-13]. ISSN 0031-8655. DOI: 10.1562/2004-02-11-RA-080.1
- [29] ZÁRUBA, Kamil. *Analytická chemie*. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016. ISBN 978-80-7080-951-8.
- [30] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, 2006. ISBN 03-873-1278-1.
- [31] CHRISTOPOULOS, THEODORE a ELEFTHERIOS DIAMANDIS. FLUORESCENCE IMMUNOASSAYS. *Immunoassay* [online]. Elsevier, 1996, s. 309-335 [cit. 2022-03-14]. ISBN 9780122147302. DOI: 10.1016/B978-012214730-2/50015-7
- [32] LAMBERT, G.W., G. EISENHOFER, G.L. JENNINGS a M.D. ESLER. Regional homovanillic acid production in humans. *Life Sciences* [online]. 1993, 53(1), 63-75 [cit. 2022-03-13]. ISSN 00243205. DOI: 10.1016/0024-3205(93)90612-7
- [33] STANIEK, Katrin a Hans NOHL. H₂O₂ detection from intact mitochondria as a measure for one-electron reduction of dioxygen requires a non-invasive assay system. Dedicated to Prof. E. Elstner, on the occasion of his 60th anniversary. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1999, 1413(2), 70-80. ISSN 00052728. DOI: 10.1016/S0005-2728(99)00083-3
- [34] PAITAL, Biswaranjan. A Modified Fluorimetric Method for Determination of Hydrogen Peroxide Using Homovanillic Acid Oxidation Principle. *BioMed Research International* [online]. 2014, 2014, 1-8 [cit. 2022-03-13]. ISSN 2314-6133. DOI: 10.1155/2014/342958
- [35] ZHAO, Baozhong, Kalina RANGUELOVA, JinJie JIANG a Ronald MASON. Studies on the photosensitized reduction of resorufin and implications for the detection of oxidative stress with Amplex Red. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2011, 51(1), 153-159 [cit. 2021-05-01]. ISSN 08915849. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.03.016
- [36] TIAN, Lu, Huan FENG, Zhichao DAI a Run ZHANG. Resorufin-based responsive probes for fluorescence and colorimetric analysis. *Journal of Materials Chemistry B* [online]. 2021, 9(1), 53-79 [cit. 2021-04-30]. ISSN 2050-750X. DOI: 10.1021/jp505739p
- [37] SONG, Ping, Mingbo RUAN, Xiujuan SUN, Yuwei ZHANG a Weilin XU. Theoretical Study of Resorufin Reduction Mechanism by NaBH₄. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2014, 118(34), 10224-10231 [cit. 2021-04-30]. ISSN 1520-6106. DOI: 10.1021/jp505739p
- [38] MIWA, Satomi, Achim TREUMANN, Amy BELL, Giulio VISTOLI, Glyn NELSON, Sam HAY a Thomas VON ZGLINICKI. Carboxylesterase converts Amplex red to

- resorufin: Implications for mitochondrial H₂O₂ release assays. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2016, 90, 173-183 [cit. 2022-03-13]. ISSN 08915849. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.11.011
- [39] Scheme of oxidative transformation of Amplex® Red to resorufin. In: *Sciencedirect* [online]. 2016, , s. 323-332 [cit. 2021-04-30]. ISSN 08915849. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.027
- [40] VEITCH, Nigel C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*. 2004, 65(3), 249-259. ISSN 00319422. DOI: 10.1016/j.phytochem.2003.10.022
- [41] Three-dimensional representation of the X-ray crystal structure of horseradish peroxidase isoenzyme C. In: *Phytochemistry* [online]. 2004, , s. 249-259 [cit. 2021-04-30]. ISSN 00319422. DOI: 10.1016/j.phytochem.2003.10.022
- [42] BEHROUZIFAR, Fatemeh, Seyed-Ahmad SHAHIDI, Fereshteh CHEKIN, Shabnam HOSSEINI a Azade GHORBANI-HASANSARAEI. Colorimetric assay based on horseradish peroxidase/reduced graphene oxide hybrid for sensitive detection of hydrogen peroxide in beverages. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* [online]. 2021, 257 [cit. 2022-03-13]. ISSN 13861425. DOI: 10.1016/j.saa.2021.119761
- [43] A Basics Introduction to Rheology. Grovewood Road, Malvern, Worcestershire, UK. WR141XZ, 2016. Dostupné z: <https://cdn.technologynetworks.com/TN/Resources/PDF/WP160620BasicIntroRheology.pdf>
- [44] HILL, A. Rheology school: Introducing Rotational Rheology & Kinexus [online]. UK: Malvern Instruments Limited, 2016, 89 s. [cit. 2022-21-04]. Dostupné z: <https://docplayer.net/61035797-Rheology-s-c-h-o-o-l-introducing-rotational-rheology-kinexus.html>
- [45] RAMACHADRAN, V.S a James J. BEAUDOIN. *Handbook of analytical techniques in concrete science and technology: principles, techniques and applications*. Park Ridge, NJ: Noyes Publications, 2001. ISBN 978-0-8155-1437-4.
- [46] ROBERTS, Jason, Dustin RITTER a Michael MCSHANE. A design full of holes: functional nanofilm-coated microdomains in alginate hydrogels. *Journal of Materials Chemistry B* [online]. 2013, 1(25) [cit. 2021-05-05]. ISSN 2050-750X. DOI: 10.1039/c3tb20477d
- [47] LI, Xue, Mian FU, Jun WU et al. PH-sensitive peptide hydrogel for glucose-responsive insulin delivery. *Acta Biomaterialia* [online]. 2017, 51, 294-303 [cit. 2021-05-05]. ISSN 17427061. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.01.016
- [48] BRAUN, Gabriel, Beatrice ARY, Alexander DEAR et al. On the Mechanism of Self-Assembly by a Hydrogel-Forming Peptide. *Biomacromolecules* [online]. 2020, 21(12), 4781-4794 [cit. 2021-05-07]. ISSN 1525-7797. DOI: 10.1021/acs.biomac.0c00989
- [49] ZAMBONIN, Carlo a Ilario LOSITO. Kinetic Investigation of the Reactions Connected to the System Ascorbate O₂ by Amperometric Detection of H₂O₂ at a Modified Platinum Electrode. *Analytical Chemistry*. 1997, 69(20), 4113-4119. ISSN 0003-2700. DOI: 10.1021/ac970347t

- [50] Schematic of spontaneous gel formation. In: On the Mechanism of Self-Assembly by a Hydrogel-Forming Peptide [foto]. 2020 [cit. 2021-05-07]. DOI: 10.1021/acs.biomac.0c00989
- [51] CHEN, Yansong, Ying LI, Xuexia YANG, Zhangjun CAO, Huali NIE, Yonggang BIAN a Guang YANG. Glucose-triggered in situ forming keratin hydrogel for the treatment of diabetic wounds. *Acta Biomaterialia* [online]. 2021, 125, 208-218 [cit. 2021-12-26]. ISSN 17427061. DOI: 10.1016/j.actbio.2021.02.035
- [52] WANG, Nannan, Christopher MILLER, Peng WANG a T. WAITE. Quantitative determination of trace hydrogen peroxide in the presence of sulfide using the Amplex Red/horseradish peroxidase assay. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2017, 963, 61-67 [cit. 2021-04-28]. ISSN 00032670. DOI: 10.1016/j.aca.2017.02.033
- [53] Amplex™ Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit. ThermoFisher [online]. [cit. 2022-03-13]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A22188>
- [54] MILLERO, Frank, Arthur LEFERRIERE, Marino FERNANDEZ, Scott HUBINGER a J. HERSHEY. Oxidation of hydrogen sulfide with hydrogen peroxide in natural waters. *Environmental Science & Technology* [online]. 1989, 23(2), 209-213 [cit. 2022-03-13]. ISSN 0013-936X. DOI: 10.1021/es00179a012
- [55] ZHAO, Baozhong, Fiona SUMMERS a Ronald MASON. Photooxidation of Amplex red to resorufin: Implications of exposing the Amplex red assay to light. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2012, 53(5), 1080-1087 [cit. 2022-02-24]. ISSN 08915849. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.034
- [56] RHEE, Sue, Tong-Shin CHANG, Woojin JEONG a Dongmin KANG. Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells. *Molecules and Cells* [online]. 2010, 29(6), 539-549 [cit. 2022-03-14]. ISSN 1016-8478. DOI: 10.1007/s10059-010-0082-3
- [57] JAIN, Mehak a Bart RAVOO. Fuel-Driven and Enzyme-Regulated Redox-Responsive Supramolecular Hydrogels. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 2021, 60(38), 21062-21068 [cit. 2022-02-24]. ISSN 1433-7851. DOI: 10.1002/anie.202107917
- [58] ARUL, V., J. MASILAMONI, E. JESUDASON, P. JAJI, M. INAYATHULLAH, D. DICKY JOHN, S. VIGNESH a R. JAYAKUMAR. Glucose Oxidase Incorporated Collagen Matrices for Dermal Wound Repair in Diabetic Rat Models: A Biochemical Study. *Journal of Biomaterials Applications* [online]. 2011, 26(8), 917-938 [cit. 2021-04-28]. ISSN 0885-3282. DOI: 10.1177/0885328210390402
- [59] ZHOU, Mingjie, Zhenjun DIWU, Nataliya PANCHUK-VOLOSHINA a Richard P. HAUGLAND. A Stable Nonfluorescent Derivative of Resorufin for the Fluorometric Determination of Trace Hydrogen Peroxide: Applications in Detecting the Activity of Phagocyte NADPH Oxidase and Other Oxidases. *Analytical Biochemistry*. 1997, 253(2), 162-168. ISSN 00032697. DOI: 10.1006/abio.1997.2391
- [60] Fluorimetric Hydrogen Peroxide Assay Kit. Sigma Aldrich [online]. [cit. 2022-03-26]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/sigma/mak165>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

8.1 Seznam použitých zkratek

ABTS	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)
AR	Amplex Red, amplexová červen
DMSO	dimethylsulfoxid
FAD	flavinadenindinukleotid
Fc	ferrocen kyseliny octové
GOx	glukóza oxidáza
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
HRP	křenová peroxidáza
HVA	kyselina homovanilová
LVO	lineární viskoelastická oblast
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
S ₀	základní energetická hladina
S ₁	singletový stav
T ₁	tripletový stav

8.2 Seznam použitých symbolů

c	molární koncentrace
G*	komplexní modul
G'	paměťový modul
G''	ztrátový modul
h	výška měřeného vzorku
K _M	Michaelisova konstanta
Mr	molekulová hmotnost
S	koncentrace substrátu
s	odchylka od původní polohy
V _{max}	rychlost reakce
x	účinnost inkorporace
γ	míra deformace
λ	vlnová délka
τ	tečné napětí

9 PŘÍLOHY

Tab. 9: Koncentrační řada pro stanovení kalibrační křivky peroxidu vodíku

Koncentrační řada – kalibrační křivka			
vzorek č.	H ₂ O ₂ [μM]	HRP [U/ml]	AR [mM]
1	2,5	0,45	0,1
2	2	0,45	0,1
3	1,5	0,45	0,1
4	1	0,45	0,1
5	0,75	0,45	0,1
6	0,3	0,45	0,1
7	0	0,45	0,1

Tab. 10: Koncentrační řada křenové peroxidázy pro optimalizaci detekčního systému s Amplexovou červení

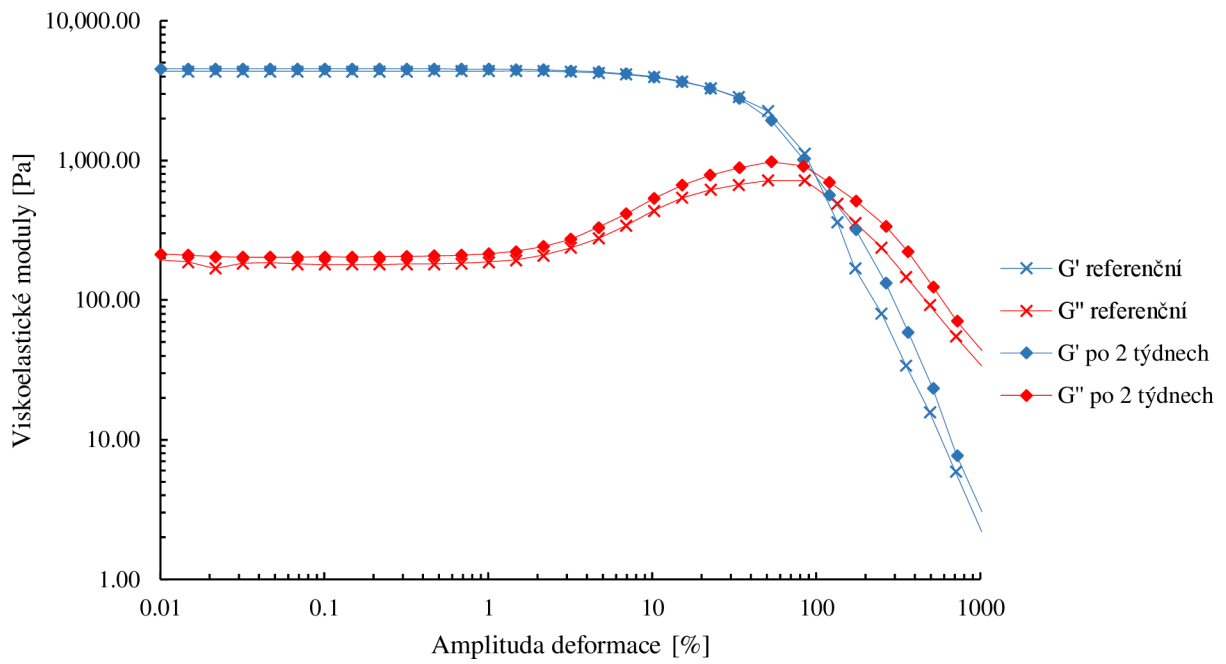
Koncentrační řada křenové peroxidázy				
Vzorek č.	HRP [U/ml]	AR [mM]	β-D-glukóza [mM]	GOx [g·L ⁻¹]
1	0,2	0,1	100	0,2
2	0,3	0,1	100	0,2
3	0,4	0,1	100	0,2
4	0,5	0,1	100	0,2
5	0,6	0,1	100	0,2
6	0,7	0,1	100	0,2

Tab. 11: Koncentrační řada pro křenovou peroxidázu se zvýšenou koncentrací glukóza oxidázy

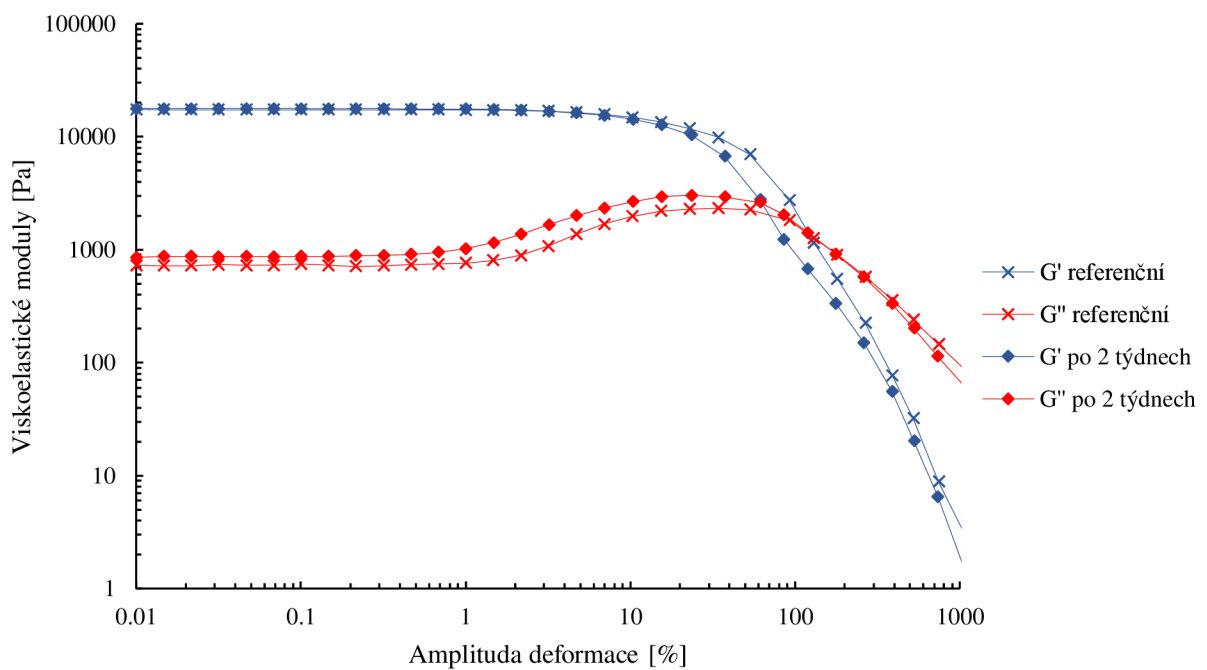
Koncentrační řada HRP se zvýšenou koncentrací GOx				
Vzorek č.	HRP [U/ml]	AR [mM]	Glukóza [mM]	GOx [g·L ⁻¹]
1	0,2	0,1	100	0,4
2	0,3	0,1	100	0,4
3	0,4	0,1	100	0,4
4	0,5	0,1	100	0,4
5	0,6	0,1	100	0,4
6	0,7	0,1	100	0,4

Tab. 12: Koncentrační řada křenové peroxidázy a glukóza oxidázy pro stanovení optimální koncentrace reakční směsi

Koncentrační řada pro vzorek číslo 5 z Tabulky					
Vzorek č.	HRP/GOx	HRP [U/ml]	AR [mM]	Glukóza [mM]	GOx [g·L ⁻¹]
1	1,5	0,15	0,1	100	0,1
2	1,5	0,3	0,1	100	0,2
3	1,5	0,45	0,1	100	0,3
4	1,5	0,6	0,1	100	0,4
5	1,5	0,9	0,1	100	0,6
6	1,5	1,2	0,1	100	0,8



Obr. 27: Graf shrnující závislosti viskoelastických modulů na amplitudě deformace pro 1 hm. % hydrogel



Obr. 28: Graf shrnující závislosti viskoelastických modulů na amplitudě deformace pro 2 hm. % hydrogel