Středoškolská technika 2022

Setkání a prezentace prací středoškolských studentů na ČVUT

Charakteristika diabetických ran po aplikaci nanodiamantů s cílem změnit hladinu MMP-9

Tereza Hanáková

Gymnázium Františka Palackého Valašské Meziříčí
Husova 146/2, Valašské Meziříčí

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

Ve Valašském Meziříčí dne 25. 3. 2022
Tereza Hanáková

Poděkování

Chtěla bych touto cestou vyjádřit velké poděkování své vedoucí práce Ing. Evě Neuhöferové, která mi poskytla cenné rady a zkušenosti z laboratoře, ale taky za trpělivost a ochotu při vedení mé práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Veronice Benson, PhD. za poskytnutí příležitosti zpracovat svou SOČ na Mikrobiologickém ústavu AV ČR, v.v.i. v Praze.

Mé poděkování patří také řediteli Gymnázia Františka Palackého Valašském Meziříčí za umožnění individuálního studijního plánu a profesorům za jejich trpělivost při dohánění mých studijních povinností a omlouvání mé absence.

A v neposlední řadě také velmi děkuji své rodině za neustálou pomoc a podporu.

Anotace

Ve své práci SOČ jsem se zabývala genovou terapií, konkrétně RNA interferencí. Pomocí RNA interference jsme snížili hladinu matrix metaloproteináz v ráně diabetických myší. Toho jsme docílili díky nanodiamantovým nosičům dopravujícím siRNA, které byly zabalené v nanovláknech. Z ran diabetických myší byly izolovány proteiny pomocí trizolové separace. Izolované proteiny byly analyzovány metodou Western blot. Viděli jsme snížení hladiny metaloproteinázy ve vzorcích z myší, kterým byla aplikována nanovlákna s nanodiamanty nesoucími siRNA.

Klíčová slova

Genová terapie, nanodiamanty, hojení ran, siRNA, nanovlákna

Annotation

In this work, I focused on gene therapy, especially RNA interference. We used RNA interference to decrease the level of matrix metalloproteinases in the wounds of diabetic mice. We were able to do this thanks to nanodiamond carriers that delivered siRNAs and were spun into nanofibers. The proteins were isolated from the wounds of diabetic mice by phase separation. The isolated proteins were analyzed by Western blot. We found a decrease in metalloproteinase levels in samples from mice treated with nanofibers containing siRNA-bearing nanodiamonds.

Klíčová slova

Gene therap, nanodiamonds, wound healing. siRNA, nanofibers

OBSAH

1 Úvod 8
2 Teoretická část 9
2.1 Genová terapie 9
2.1.1 Historie a současná situace genové terapie 10
2.1.2 Typy genové terapie 11
2.1.3 Zinkové „prstové“ nukleázy 11
2.1.4 TALENy 12
2.1.5 CRISPR 13
2.1.6 RNA interference 14
2.1.7 Transfekce 15
2.1.8 Vektory 15
2.1.9 Virová metoda 15
2.1.10 Nevirová metoda 16
2.2 Nanomateriály 16
2.2.1 Nanočástice 17
2.2.2 Nanodiamanty 17
2.2.3 Nanovlákna 19
2.3 Hojení ran 21
2.3.1 Proces hojení ran u zdravých jedinců 21
2.3.2 Hojení ran diabetických pacientů 22
3 Materiály a metody 24
3.1 Izolace proteinu z myší tkáně 24
3.2 Měření koncentrace proteinu pomocí Bradford 25
3.3 Western blot 26
4 Výsledky a diskuze 28
4.1 Hladina glukózy diabetických modelů 28
4.2 Koncentrace proteinů z myších tkání 28
4.3 Analýza proteinů na membráně 30
5 Závěr 32
6 Použitá literatura a zdroje 33
6.1 Literatura a internetové zdroje 33
6.2 Zdroje obrázků 37

6.3 Zdroje tabulek 39
Seznam obrázků 40
Seznam tabulek 40

SEZNAM ZKRATEK

RNA – ribonukleová kyselina

DNA – deoxyribonukleová kyselina

RNAi – RNA interference

mRNA – mediátorová RNA

siRNA – malé interferující RNA

ND – nanodiamanty

CRISPR – Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

TALEN – Transcription activator-like effector nuclease

ZFN – Zinc fingers

RB – Running buffer

MMP-9 – matrixmetaloproteináza 9

BSA – bovine serum albumin

SDS-PAGE – sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

LDS pufr – LDS Sample Buffer

TB – Transfer buffer

TBST – Tris-Bufferred Saline a Tween 20

GuTHC – Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction

GAPDH – Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase human recombinant

1 ÚVOD

Genová terapie a nanotechnologie jsou v současné době velmi aktuální témata v oblasti moderní medicíny. Při genové terapii jde o zacílení na vybraný gen, který potřebujeme změnit či nahradit. S genovou terapií je nepodmíněně spojena řada etických problémů kvůli tomu, že zde dochází k manipulaci s DNA pacienta. Proto se tedy zatím jedná pouze o experimentální metodu. My jsme se rozhodli tuto metodu do výzkumu zapojit v souvislosti s hojením ran diabetických pacientů.

Právě proto jsme se zaměřili na rány myší, kterým byl uměle navozen diabetes. Do těchto ran jsme za pomoci nanodiamantových nosičů, které byly zapouzdřené v nanovláknech, transportovali siRNA. Díky této siRNA následně dochází k snižování matrix metaloproteináz v ráně.

Při práci jsme využívali metod izolace proteinu pomocí Trisolové separace. Dále jsme vyhodnocovali koncentraci daného proteinu a na závěr jsme protein podrobili metodě Western Blot, která nám pomohla zanalyzovat jeho přesný obsah. Od těchto metod se odvíjí i moje hlavní výsledky práce, které jsou podrobně popsány v kapitole 4.

Nejdříve byly ověřeny rozdíly glukózy, které se u diabetických zvířecích modelů oproti normálním pacientům výrazně liší. Dále jsme se zabývali koncentrací námi vybraných proteinů a v neposlední řadě vizualizaci proteinů na membráně za pomoci metody Western Blot.

Toto téma jsem si vybrala z důvodu, že lidí, kteří trpí diabetem, každoročně přibývá a ke komplikacím spojeným s procesem hojení ran pro ně zatím neexistuje žádná konkrétní léčba. Mimo jiné mě taky zaujalo využití nanodiamantů a nanovláken v této problematice.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Genová terapie

Genová terapie je v dnešní době velmi diskutované téma v oblasti moderní medicíny. Představuje možnou budoucnost pro posunutí oboru genetiky o krok dál. Pro pacienty, kteří trpí řadou onemocnění, na které není léčba, je genová terapie velkým příslibem. Jedná se o metodu, při níž dochází k úpravě genetické informace uložené v sekvenci DNA, a to buď mazáním, změnou nebo přidáním sekvence nukleotidů. Stále se jedná o experimentální terapii, protože může mít řadu vedlejších účinků a zároveň s ní jsou spojeny etické problémy.

V genové terapii jde o zacílení na vybraný gen, který chceme pozměnit, nebo se cílí na další molekuly v procesu tvorby proteinu, tedy mRNA (informační RNA molekuly nesoucí informaci o tom, jak má budoucí protein vypadat). Editovací materiál se vpraví do buněk pacienta za účelem odstranění, změny či přidání vybraného genu v buňce. Při metodě cílení vybraného genu je důležitý správný výběr restrikční endonukleázy, což je enzym umožňující štěpení DNA, a je tak základním nástrojem při jakékoliv manipulaci se sekvencí DNA. Oproti tomu při metodách, které cílí na molekuly mRNA, je důležitý výběr vhodné sekvence v této molekule, na kterou se cílí většinou pomocí synteticky vytvořené sekvence nukleotidů (Gene Therapy Basics, 2022).

Genovou terapii můžeme zkoumat *in vitro, ex vivo* a *in vivo*. *In vitro* výzkum probíhá na uměle udržovaných buňkách mimo živý organismus. *Ex vivo* výzkum využívá buňky izolované z živého organismu, tyto buňky se mimo organismus poupraví a následně jsou transplantovány zpět. Genová terapie *ex vivo* se využívá při léčbě poruch, jako je srpkovitá anémie, adrenoleukodystrofie, chronické granulomatózní onemocnění a jiné. *In vivo* výzkum probíhá na živých organismech přímo, při genové terapii se jedná zejména o laboratorní zvířata, jako jsou například myší modely. Při *in vivo* terapii se genetický materiál vpraví do těla buňky, buď pomocí nitrožilní infuze (dále jen IV infuze), nebo pomocí injekce do cílového orgánu, jako je např. oko. Tato terapie se používá např. k léčbě hemofilie a ornithin –transkarbamylázové deficience. Ať už probíhá výzkum genové terapie na jakékoliv z výše uvedených úrovní, zásadním bodem každého takového výzkumu je zvolení vhodného nosiče pro vpravení genové terapie. Jednotlivé nosiče využívané pro genovou terapii jsem podrobněji rozebrala v sekcích 3.1.8-3.1.10 a 3.2. (Genová terapie, 2014; After decades of evolution, gene therapy arrives, 2020).

Potenciálním cílem genové terapie je léčba geneticky dědičných chorob či rakoviny, zmírnění symptomů některých onemocnění jako například obtížné hojení ran diabetických pacientů. Některé genetické choroby (achondroplazie, Apertův syndrom, familiární hypercholesterolemie, Marfanův syndrom, hemofilie, cystická fibróza aj. jsou způsobeny mutací pouze v jediném genu, což znamená, že jsou ideálními kandidáty pro genovou terapii (Genetické choroby, 2022).

Než se genová terapie začne praktikovat ve všední medicíně, bude se muset vymezit hranice mezi tím, kdy se jedná o etickou genovou terapii, a kdy už ne. Velkým etickým tématem je například budoucí možnost výběru geneticky editovatelných vlastností potomků ještě před narozením (kromě prevence některých onemocnění například i barvu vlasů či očí, výšku a další) (Genová terapie, 2014).

2.1.1 Historie a současná situace genové terapie

Za jeden z milníků v historii genové terapie lze uvést vytvoření technologie syntézy rekombinantní DNA týmem vědců z roku 1972 (Jackson et al., 1972). Rekombinantní DNA je DNA uměle modifikovaná, jde buď o vložení celého genu, nebo jeho části do jiného organismu. Po příchodu technologií syntézy rekombinantní DNA byly klonované geny použity k prokázání, že cizí geny skutečně mohou opravit genetické vady (Friedmann, 1992).

První klinický pokus o genovou terapii u člověka byl proveden 14. 9. 1990 v National Institute od Health. Jednalo se o čtyřletou dívku s poškozenou adenozindeaminázou způsobující těžkou kombinovanou imunodeficienci. Dívce byly odebrány T-lymfocyty, které byly *ex vivo* vystaveny působení retrovirů s genem pro adenozindeaminázu. Po několikadenní kultivaci byly tyto buňky vráceny zpět do krevního řečiště. Aplikace T–lymfocytů s opravenou tvorbou adenozindeaminázy byla úspěšná, ale efekt byl pouze dočasný (nikdy nedošlo k úplnému potlačení onemocnění) (Blaese *et al*., 1995).

V uplynulých pěti letech se podařilo po dlouhém úsilí schválit první experimentální léčby pomocí genové terapie (např. Zolgensma a Luxturna). Tyto terapie se zabývají léčbou různých klinických indikací zahrnujících neuromuskulární onemocnění, dědičnou slepotu a rakovinu (Bulaklak et Gersbach, 2020).

V dnešní době je genová terapie stále využívána jen vzácně. Důvod pramení v přetrvávajících obavách o její bezpečnost, protože stále není dostatek dat, nebo výsledky dlouhodobého působení genové terapie. Jedná se o manipulaci s DNA, což může vést k etickým a morálním problémům. Každý návrh klinické studie musí být posouzen z hlediska platných zákonů a musí se shodovat s nejnovějšími poznatky vědy. Pacient musí být poučen jak o přínosech vzhledem k jeho zdravotnímu stavu, tak i o jeho rizikách. Dalším problémem je například Weismannovská bariéra, což je rozdělení buněk na zárodečné a somatické – efekt genové terapie nelze pomocí somatických buněk přenést i do buněk zárodečných, čímž je efekt genové terapie pouze dočasný (Závěry světové konference o editaci genů, 2022).

Genová terapie se dnes využívá spíše u velice závažných nemocí, které nejdou léčit jiným způsobem než příslušnou experimentální léčbou. Nevýhodou metody je její technická a finanční náročnost. V minulosti nastalo i několik případů, kdy u pacienta došlo k vážnému zdravotnímu postižení kvůli genové terapii. Evidováno bylo i několik úmrtí. Jednalo se pravděpodobně o silnou imunitní reakci organismu na aplikaci adenovirů, poxvirů či retrovirů (Snustad, 2017).

Jedním ze současných léků založených na genové terapii je Zolgensma. Léčivá látka obsažená v Zolgesmě má odborný název Onasemnogenum abeparvovecum (dále jen OA) a podává se skrz infuzi do těla pacienta tak, aby se dostala do všech buněk v těle. Zolgensma se podává pacientům se spinální muskulární atrofií a pacientům s bialetickou mutací genu a jedná se o jeden z nejdražších léků na světě. Jde o vektor na bázi nereplikujícího rekombinantního adeno-asociaovaného viru, který nese gen, díky kterému se v těle pacientů obnoví tvorba lidského proteinu Survial Motor Neuron (dále jen SMN). Díky obnovené tvorbě SMN se zachrání nervové buňky, což vede ke stabilizaci svalové síly. Opravný gen začne po přenesení do lidského organismu vytvářet SMN bílkovinu, která pacientovi chybí. OA je produkovaná v lidských embryonálních ledvinových buňkách pomocí rekombinantní DNA technologie (Zolgensma, 2021).

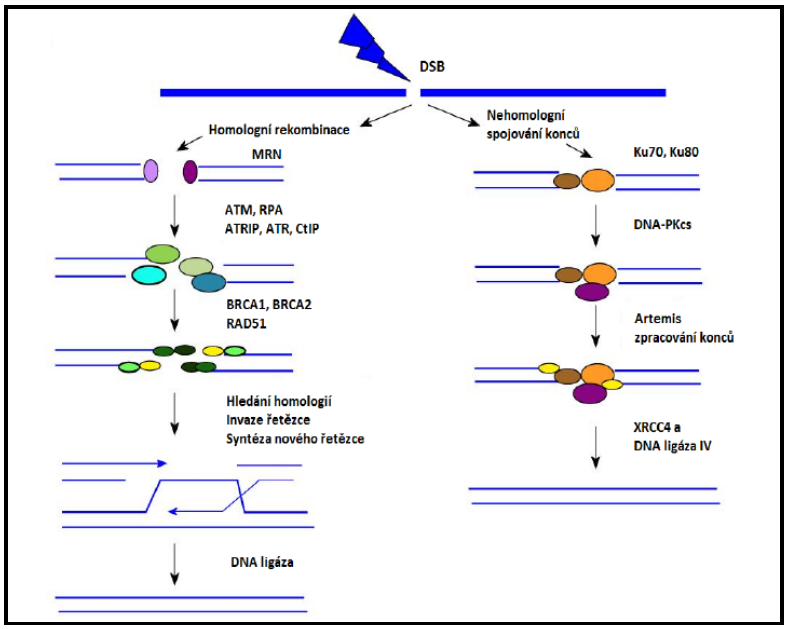
2.1.2 Typy genové terapie

Genová terapie může probíhat v zárodečných nebo somatických buňkách. Při genové terapii v somatických buňkách nedochází k přenosu oprav na další generace, zatímco v zárodečných buňkách se opravy přenáší na potomky. U somatické genové terapie se využívá způsobů *in situ, ex vivo* a *in vivo*. Metodou *in situ* se cílí na konkrétní lokaci, jako je např. rána na kůži nebo oko. Při *ex vivo* metodě se pacientovi odstraní poškozené buňky, dojde k jejich genetické modifikaci mimo tělo a poté jsou navráceny zpět na své místo. Poslední způsobem je *in vivo*, při kterém se genová terapie vpravuje do těla krevním řečištěm. Jedná se o experimentální postup, který byl zatím schválen pouze u několika léčiv z důvodu etických otázek, které již byly zmíněny v kapitole 3.1. (Ledley, 1996; Abinaya et Viswanathan, 2021).

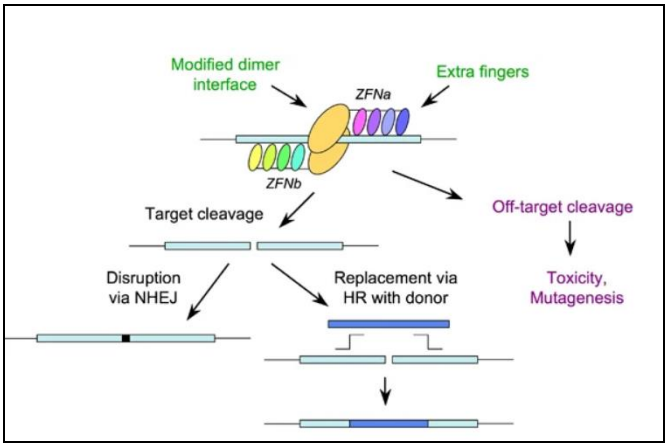
Genová terapie zárodečných buněk (spermie, vajíčko) způsobuje přenos změny v genetické informaci na další generace. Tato metoda zatím není povolena pro aplikaci na lidech, doposud je využívána pouze experimentálně na zvířecích modelech (What is gene therapy?, 2021).

2.1.3 Zinkové „prstové“ nukleázy

ZFN (zinc fingers) jsou zinkové „prstové“ nukleázy, které byly vyvinuty na konci 20. století. Jedná se o syntetické proteiny, které jsou schopné vytvářet dvouřetězcové zlomy v molekule DNA, a to díky vazebným doménám v jejich struktuře. Poté co dojde ke dvouřetězcovému zlomu, je DNA zacelena opravnými mechanismy buňky, kterými jsou nehomologní spojování konců a homologní rekombinace (obrázek 1). Na obrázku 2 je zobrazen princip fungování ZFN. Limitací metody ZFN je nespecifická vazba na místa DNA, která nebyla původním cílem, čímž může dojít k porušení genetické informace v jiném místě (Gupta, 2014; Pros and cons of ZNFs, TALENs and CRISPR, 2014; What is ZNF technology?, 2020).



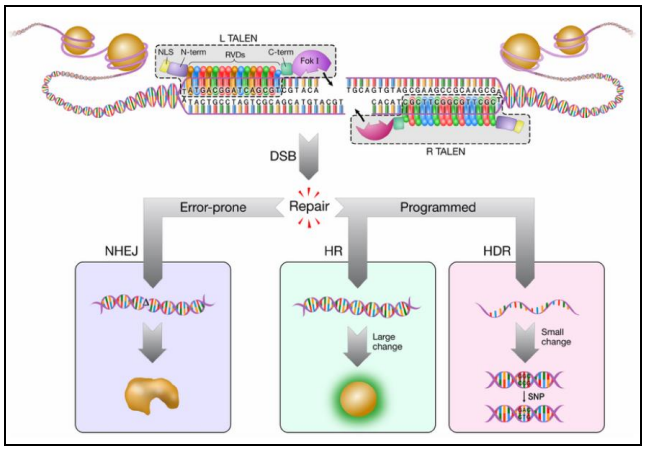
Obrázek 1: Obrázek zobrazuje dva typy spojování dvouřetězcových zlomů v DNA. Těmi jsou homologní rekombinace (vlevo) a nehomologní spojování konců (vpravo) (převzato z Dvořáková, 2017).



Obrázek 2: Schéma procesu působení ZFN (převzato z Carroll, 2008).

2.1.4 TALENy

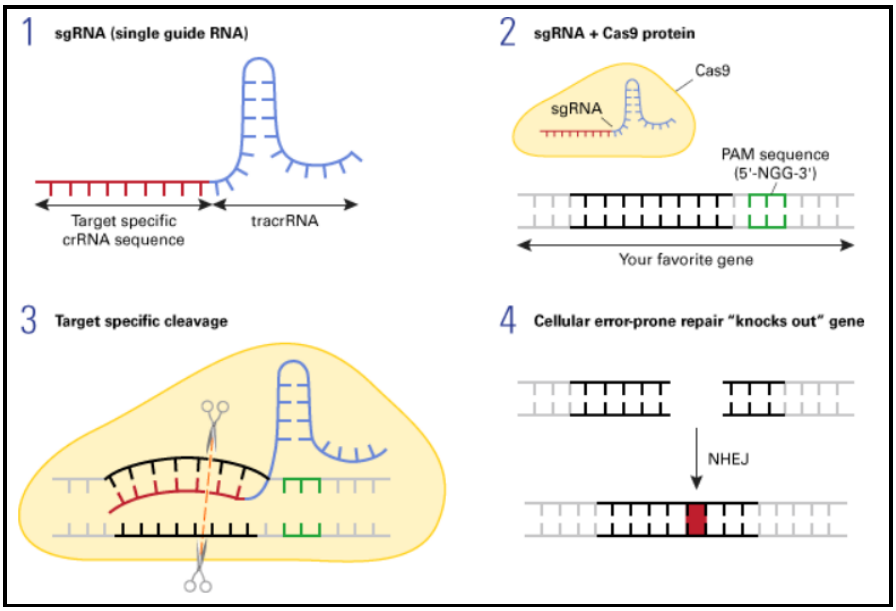
TALEN (transcription akcivator-like effector nuclease) je zkratka pro transkripčním aktivátorům podobné efektorové nukleázy. Jsou to syntetické nukleázy, které stály na počátku revoluce genové terapie kolem roku 2010. Vzhledem k jejich relativně jednoduchému způsobu použití se staly průlomovou technologií genové terapie. Přesto jsou v dnešní době TALENy využívány jen minimálně, byly zcela nahrazeny metodou CRISPR. Důvodem je náročnost výroby aminokyselinového řetězce, který musí specificky nasedat na zvolenou sekvenci DNA. Řetězec obsahuje 33-35 aminokyselin a je díky tomu velmi přesný, ale příprava je velmi náročná a finančně nákladná. Obrázek 3 zobrazuje metodu genové modifikace pomocí TALENů (Becker et Boch, 2021).



Obrázek 3: Schéma principu působení TALENů (převzato z Campbell, 2013).

2.1.5 CRISPR

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) je zkratkou pro nahromaděné pravidelně proložené krátké palindromické repetice, což jsou úseky prokaryotické DNA obsahující krátké repetice nukleotidů. Metoda CRISPR-Cas9 je založená na repeticích nukleotidů a enzymu Cas9, který umí štěpit vlákna DNA v konkrétním místě. Díky tomu je metoda CRISPR-Cas9 někdy označována jako molekulární nůžky. Následně dojde k aktivaci obranných mechanismů buňky, díky kterým vznikají mutace. Tyto mutace zpravidla vyřazují z funkce poškozený gen, utlumují jeho aktivitu nebo gen aktivují. Na obrázku 4 vidíme celý proces metody CRISPR (Sawyer, 2013; Revoluce v molekulární biologii. Nůžky jménem CRISPR, 2017).



Obrázek 4: Schéma metody CRISPR (převzato z Introduction to the CRISPR/Cas9 systém, 2022).

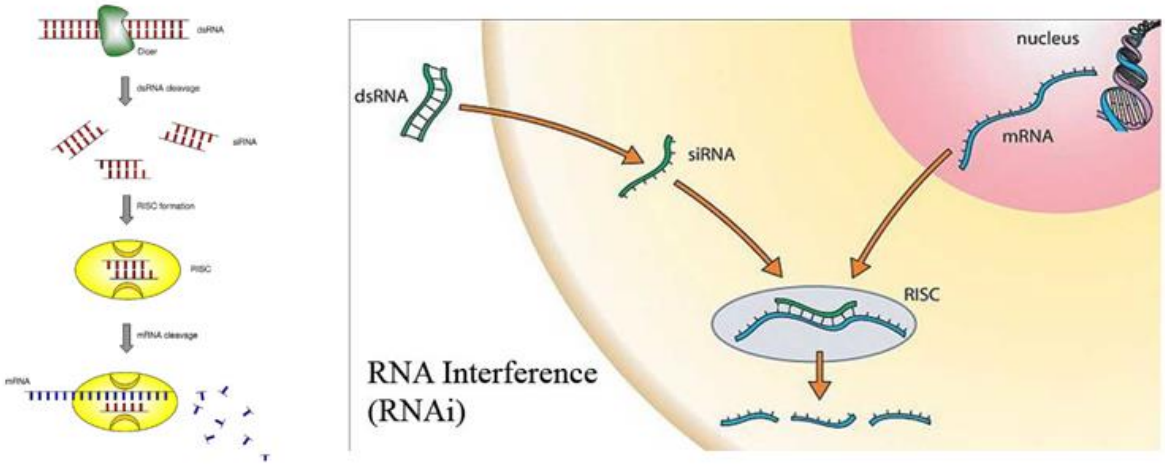
2.1.6 RNA interference

RNA interference (dále jen RNAi) je evolučně velmi konverzovaný způsob umlčení genové exprese. Je to proces, při kterém se párují nekódující molekuly RNA s cílovými úseky mRNA. Celý proces probíhá ve všech buňkách. Objev RNAi má své počátky v roce 1998, ale až v roce 2006 byla popsána na molekulární úrovni. U primitivních organismů RNAi chrání buňky před napadením virem a také reguluje genovou expresi během vývoje organismu. Jde o malé molekuly, které jsou velké cca 21 až 28 nukleotidů. RNAi se rozlišuje na dva typy, a to dle typu RNA molekuly, která hraje v procesu hlavní roli. Tyto hlavní dvě molekuly jsou siRNA a microRNA. Obě mají odlišný mechanismus působení.

RNAi probíhá v cytosolu v buňce mimo jádro. DNA se replikuje a poté dochází k transkripci (DNA se přepíše do RNA). Tato RNA nese stále stejnou informaci, kterou přijala od DNA. V cytosolu se dále RNA překládá do proteinu. Tento proces se dá i zastavit, aby nedocházelo k neustálé tvorbě proteinů, díky tomu se vytváří siRNA či microRNA. Interferující RNA se přemísťuje z jádra do okolí jádra. Dopravují se v jiné podobě (delší molekula, která je na koncích chráněna dalšími molekulami) a po cestě na místo určení postupně dozrává jejich podoba do funkční sekvence ribonukleotidů, které díky své komplementaritě nasednou na určenou sekvenci mRNA.

Tento proces má slibnou budoucnost, protože dokáže zajistit řízení genových informací uvnitř živých organismů beze změny genomu. Je napodoben účinek případné ztráty funkce genu, snížení jeho aktivity nebo naopak zvýšena produkce konkrétního proteinu – v závislosti na tom, jakou sekvenci do buněk vpravujeme. Můžeme totiž do buňky vpravit, buď celou sekvenci komplementární části sekvence mRNA, nebo sekvenci, která nasedá na maturovanou siRNA či microRNA, čímž snižuje jejich tlumící vlastnosti (Napoli et al., 1990; Snustad et al., 2017).

Charakteristická je metoda RNAi v tom, že je pro zajištění dlouhodobého efektu nutné RNA do buňky dopravovat opakovaně, protože se na rozdíl od změn v DNA neprojeví v budoucích generacích. To může být na jednu stranu nevýhodou, ale vzhledem k velkému etickému problému spojenému s nezvratnou změnou genomu při některých metodách genové terapie může být využití RNAi výhodnější. Na obrázku 5 vidíme fungování RNAi za působení siRNA.



Obrázek 5: Mechanismus fungování RNA interference, kdy základem je siRNA (převzato z Mocellin et al., 2004).

2.1.7 Transfekce

Transfekce je přenos genetické informace do buněk, v našem případě buněk živočišných. Úspěch transfekce závisí na různých faktorech, jako je typ a kvalita buněk, množství DNA, podmínky pro kultivaci a přítomnost antibiotik, které musí být optimalizovány. Transfekce se provádí *in vitro* a také *in vivo*. Transfekční činidla jsou látky určené k vpravování všech typů nukleových kyselin, včetně DNA, siRNA, mRNA, virové RNA a oligonukleotidů do buněk. Tato činidla mají vysokou účinnost transfekce a zároveň nízkou toxicitu, co umožňuje zisk fyziologicky relevantních dat (Transfekce, 2022; Transfekční činidla – Mirus Bio, 2022).

2.1.8 Vektory

Vektory jsou nosiče, které mají v rámci genové terapie schopnost dopravit DNA nebo RNA do cílových buněk. Vektory mohou být připraveny dvěma hlavními metodami. V jedné z metod se používají virové vektory, ve druhé se do buněk dopravují molekuly DNA či RNA nevirovými molekulami (Non-Viral Gene Therapies Get €51M Boost, Though Challenges Remain, 2021).

2.1.9 Virová metoda

Virovou metodou nazýváme tu, která využívá rekombinantní viry, někdy nazývané jako biologické nanočástice nebo virové vektory. Tato metoda využívá schopnosti všech virů, a to vázat se na hostitelskou buňku v první fázi svého cyklu. Viry buď vpraví svůj genom do cytoplazmy hostitele, ale do buněk nevstupují, nebo celé pronikají buněčnou membránou maskované molekulami bílkovin. Další výhodou virů je jednoduchá modifikovatelnost z hlediska nákladu, který dopravují. V metodách genové terapie viry nesou genetický materiál a dopravují ho na příslušné místo. Hostitelská buňka provede pokyny k úpravě DNA, které byly zakódované v genetické informaci vloženého genu.

Existují dva hlavní typy virové infekce, a to lytická a lysogenní. Zatímco u lytické infekce dochází po vložení virové DNA do cílové buňky k okamžité produkci dalších virů, což způsobí praskání buňky a šíření viru do okolních buněk, u lysogenní infekce dochází k integraci virové DNA do DNA hostitelské buňky. Právě lysogenní způsob infekce se využívá při genové terapii (Robbins et Ghivizzani, 1998; Fusek et al., 2012).

2.1.10 Nevirová metoda

Nevirové metody mají výhody oproti metodám virovým, hlavními z nich jsou produkce ve velkém měřítku a velmi nízká imunogenicita hostitele. Dříve byly nevirové metody nahrazovány virovými kvůli nízké hladině transfekce a exprese genu. Nedávný pokrok ve vektorové technologii však přinesl molekuly a techniky s transfekční účinností podobnou jako u virů. K dodání genů *in vivo* byly použity kationtové lipidy, což je alternativa k rekombinantním virům. Kationtové lipidy jsou transfekční činidla s nízkou schopností vyvolat imunitní odpověď, vzhledem k tomu, že se skládají z lipidů (Cotten et Wagner, 1993; Murakami et Sunada, 2011; Ramamoorth, 2015).

Elektroporace neboli genový elektropřenos závisí na použití elektrického pole, které je kapacitou větší než buněčné membrány. To způsobí, že se náboje s opačnou polaritou seřadí na obou stranách buněčné membrány, čímž se vytvoří potenciální rozdíl v bodě na povrchu článku. V důsledku následného rozpadu membrány se vytvoří pór, který umožní molekule DNA projít do buňky. Propustnost membrány pro přenos genu je řízena amplitudou a délkou pulzu. Elektroporace se potvrdila jako spolehlivá metoda pro přenos plazmidové DNA. Terapie může být prováděna intradermálně, intramuskulárně nebo intratumorálně (Li et al., 2006; Al-Dosari et Gao, 2009; Su et al., 2012; Ramamoorth, 2015).

Sonoporace se týká tvorby pórů v buněčné membráně, které umožní přenos materiálů nukleových kyselin. Celý děj je umožněn díky ultrazvuku. Efekty ultrazvuku se dělí na termální a netermální. Netermální efekt se skládá z mechanické poruchy, která se nachází v blízkosti bublin. Kavitační bubliny poté způsobí porozitu membrány. Tyto bubliny indukují buněčnou smrt či propustnost, aby umožnily vstup léčiva nebo genů do buněk. Hlavní výhodou sonoporace je její neinvazivnost a schopnost přenášet geny do vnitřních orgánů bez lékařského zákroku (Tachibana et al., 1991; Miller et al., 2002; Wang, 2013; Tomizawa, 2013).

2.2 Nanomateriály

Jsou to materiály, které mají alespoň jeden rozměr menší nebo rovný 100 nm. Mohou to tedy být jak malé částice s průměrnou velikostí kolem 100 nm, nebo menší vlákna, jejichž průměr je menší nebo rovný 100nm. Tyto nanomateriály jsou všude kolem nás. Mohou to být jak uměle vytvořené chemické látky, tak i látky, které se vyskytují volně v přírodě. Jde například o sopečný popel v mracích, částicích v mořském vánku nebo o kouř z ohně. Díky své velikosti mají nanomateriály specifické fyzikální i chemické vlastnosti. Svými vlastnostmi se podstatně liší od fyzikálních a chemických vlastností rozměrově větších látek. Nanomateriály mohou být různého tvaru, ale my se budeme zabývat pouze nanovlákny

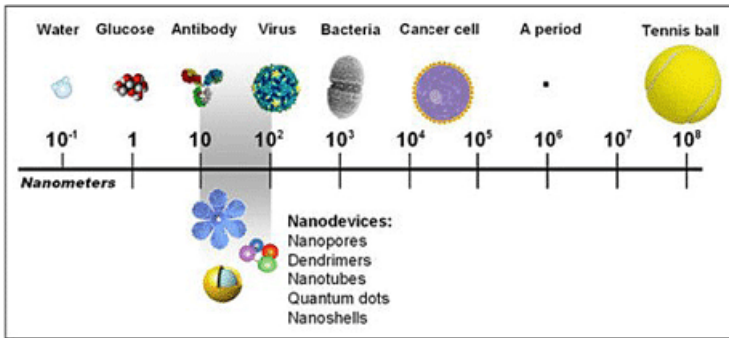
a nanočásticemi, protože tyto dva typy materiálů jsem při své práci využívala (Buzea et al., 2007; Co jsou to nanomateriály?, 2021).

2.2.1 Nanočástice

Nanočástice mají velikost řádu 10^{-9} m. Předpona nano– je spojena s objevy nových materiálů, jevů a procesů v neobvykle malých rozměrech. Jde o materiály, jejichž struktury se pohybují v rozměrech nanometrů – od 1 nm do 100 nm. To je přibližně jedna desetitisícina tloušťky lidského vlasu. Můžeme si to také představit na poměru velikostí kulové částice o průměru 100 nm a fotbalového míče, to je zhruba stejný poměr velikostí jako již zmíněný fotbalový míč ku zeměkouli. Obrázek 6 nám poskytuje informaci o poměru velikostí nanodiamantů k velikosti dalších biologických i nebiologických útvarů.

První zmínky o nanočásticích pocházejí ze čtvrtého století př. n. l. z Egypta a Číny. Tehdy bylo objeveno tzv. rozpustné zlato, které bylo používáno pro léčivé účinky. Nanočástice jsou stavební složkou pro všechny nanomateriály. Mají specifické vlastnosti jako je rozměr, atomová struktura, složení či tvar.

Jednou z výhod nanosvěta, je princip samoskládání. Objekty se začnou skládat samy od sebe. V této velikostní dimenzi můžeme překonat přírodní zákony a využít je ve svůj prospěch. Nanotechnologie se mimo lékařství využívá ve strojírenství, ve stavebnictví, v energetice, v chemickém průmyslu a v potravinářském průmyslu (Nanotechnologie v medicíně, 2002; Vert et al., 2012; Nanotechnology, 2020).



Obrázek 6: Porovnání nanodiamantů s biologickými a nebiologickými útvary (převzato z Využití nanotechnologií při přípravě nutraceutik a funkčních potravin, 2011).

2.2.2 Nanodiamanty

ND jsou velice atraktivním materiálem, který je vhodný pro mnoho odvětví v biomedicíně. Převážně díky své netoxické povaze, díky svému velkému aktivnímu povrchu, který je možno využít a také díky možnosti modifikovat krystalovou mřížku a vložit do ní defekty, které přidají například silnou a stabilní luminiscenci. (Resch-Genger et al., 2008).

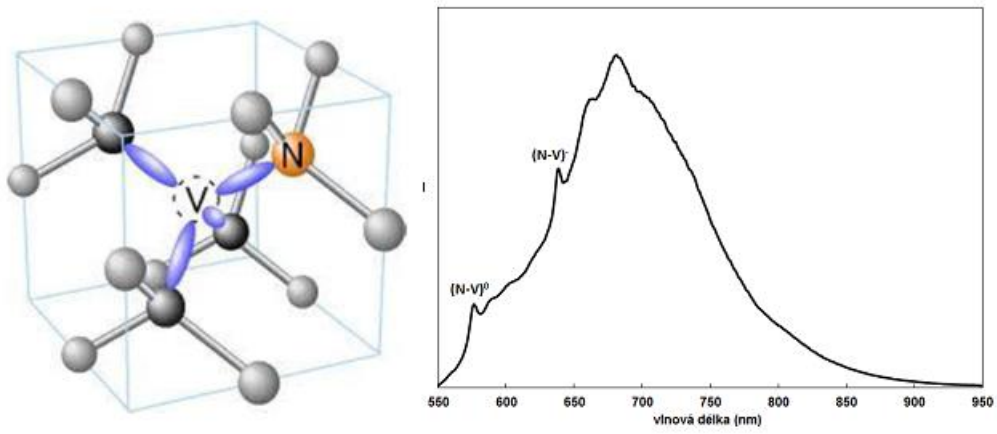
ND patří do skupiny karbonových materiálů, kde se nacházejí také např. grafit, fullereny, grafen atd. Typická nanodiamantová struktura má sp^3 hybridizaci. ND se dělí podle různých kritérií. Podle metod jejich syntézy je dělíme do tří skupin: vytvořené chemickou depozicí

z plynné fáze, generované za vysokého tlaku a teploty a detonační ND (Mochalin et al., 2012).

Povrch nanodiamantů lze upravit mnoha způsoby a na jeho povrchu mohou být navázány různé molekuly. Kvůli velkému povrchu mohou ND dopravit do těla velké množství funkčních molekul. Díky své velikosti se ND dostanou endocytózou do cytoplazmy, kde dojde k uvolnění nálože.

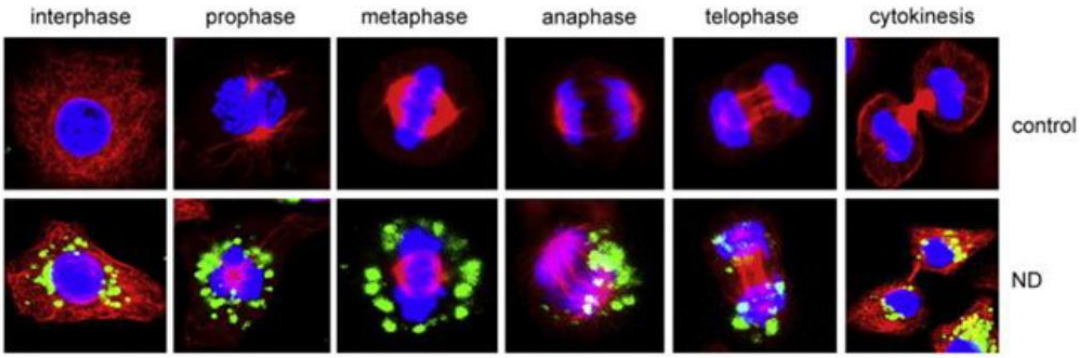
Nanodiamanty generované za vysokého tlaku a teploty mohou být připravovány z větších diamantových krystalů, které jsou získány z grafitu. Grafit se stlačuje na 5 GPa a současně se zahřívá na teploty vyšší než 1400 °C. Koncentrace dusíkových nečistot u tohoto typu ND je do 300 ppm. Tyto dusíkaté nečistoty jsou velkou výhodou, protože mohou vykazovat fluorescenci. Fluorescenční spektrum N-V centra je zobrazeno na obrázku 7 vpravo (Mochalin et al., 2012).

Fluorescence nanodiamantů pochází z různých typů poruch v krystalové mřížce. Z pohledu zobrazení je nejvýznamnější tzv. „centrum dusíkaté vakance“ (N-V, z anglického nitrogen–vacancy), které můžeme vidět na obrázku 7 vlevo. Existence je umožněna díky přítomnosti malého množství substitučních atomů dusíku v krystalové mřížce diamantu (Badea et Kaur,2013).



Obrázek 7: Obrázek vlevo zobrazuje chybu v krystalové mřížce nanodiamtů zobrazující tzv. N-V centrum, vpravo vidíme křivku fluorescenčního světla u nanodiamantů osvícených laserem o vlnové délce 559 nm (vlevo: převzato z Mizuochi,2012; vpravo: převzato z Šlegerová, 2014).

Fluorescenční barviva vykazují zvláštní chování např. v odražené a průchozí světlo má rozdílné barvy. Velkou nevýhodou je rychlá degenerace barviv působením intenzivního světla. Proto se zkoumají nové látky, které budou odolné vůči degradaci světla. Fluorescence přispívá k velkému pokroku při porozumění buněčným procesům. Na obrázku 8 vidíme využití fluorescence nanodiamantů pro vizualizaci dělící se buňky (Schrand et al., 2009; Havlik et al., 2013).



Obrázek 8: Zobrazení jednotlivých fází buněčného cyklu dělící se buňky s fluorescenčními nanodiamanty (zelené signály ve spodním řádku), vrchní řádek zobrazuje dělící se buňky bez aplikace nanodiamantů (převzato z Liu, 2009).

Když chceme materiál nanodiamanty využít v živém organismu (*in vivo*), musíme vždy prověřit jejich biokompatibilitu. ND jsou pokládány za vysoce biokompatibilní látky, které v sobě spojují uhlík a nanomateriál (Zhu et al., 2012) .

Studie, které se zabývají biokompatibilitou nanodiamantových nosičů nejsou zpravidla porovnatelné. Důvodem je, že jsou využívány různé metody vyhodnocení a hranice vymezující oblast biokompatibility není jednotně zavedena. Výsledky jsou velmi ovlivněné typem použitých nosičů. Způsob pohybu nanodiamantů v těle a místo, kde by se mohly hromadit, není zatím dobře prozkoumané (Zhu et al., 2012).

2.2.3 Nanovlákna

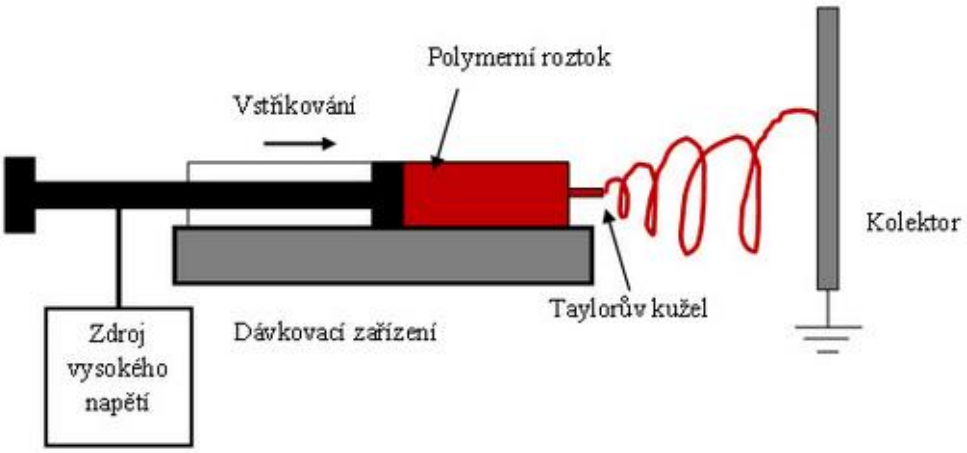
Nanovlákno je délkový útvar o charakteristických rozměrech a vlastnostech. Jeden rozměr (délka) významně přesahuje průměr vlákna. Charakteristické průměry nanovláken se pohybují mezi 100–800 nm. Může být vyrobeno z přírodních či syntetických materiálů. Lze je použít v kosmetických výrobcích, senzorech, filtrech nebo separátorech baterií.

Nanovlákenné materiály jsou výrobky s průměrem vláken menších než 1000 nm. V této době jsme schopni jako surovinu využít cca 50 syntetických a přírodních polymerů. Ve fázi výzkumu jsou pro tento typ materiálů i materiály z obnovitelných zdrojů (Rasouli et al., 2018).

Za kladné vlastnosti nanovláken můžeme považovat jejich velikost a hmotnost, dále také vysokou filtrační účinnost a nízký tlakový spád. Za nevýhodu můžeme zmínit nízkou mechanickou pevnost některých nanovlákenných materiálů.

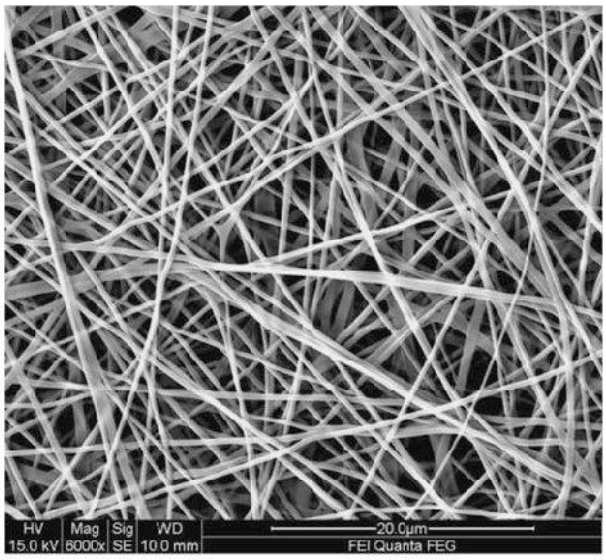
Certifikované nanovlákno musí splňovat řadu podmínek, aby mohlo být označeno certifikátem bezpečnosti. Což znamená, že vlákno je v nanorozměrech a že není škodlivé pro využití na živých organismech. Nanovlákna, která jsme použili, jsou ze dvou materiálů – polyvinylalkohol (PVA) a polykaprolakton (PCL), Tyto dva materiály jsou polymery, které již byly agenturou FDA (U. S. Food and Drug Administration) schváleny pro využití na lidském organismu.

Nanovlákna využívaná při naší práci se vyrábí metodou elektrostatického zvlákňování. Tato metoda je jednou z nejpoužívanějších pro výrobu nanovláken, díky své jednoduchosti. Při této metodě je roztok polymeru umístěn do dávkovacího zařízení a naproti němu se nachází tzv. kolektor. Proces probíhá pomocí vysokého napětí, které umožní, aby byl polymerní roztok vystřelen na kolektor. Polymer, který se přemisťuje z dávkovacího zařízení na kolektor, vytváří Taylorův kužel (obrázek 9) (Electrically driven jets, 1969; Rasouli et al., 2018).



Obrázek 9: Schéma principu elektrostatického zvlákňování využívaného pro výrobu nanovláken (převzato z Elektrostatické zvlákňování, 2015).

Nanovlákna tvořená kombinací polymerů PCL a PVA (obrázek 10) jsou výhodná pro využití jako krycí materiál při hojení ran, protože podporují proliferaci fibroblastů a keratinocytů (Buzgo, 2019).



Obrázek 10: Fotka PVA nanovláken pořízena skenovacím elektronovým mikroskopem (SEM) (převzato z Elektrostatické zvlákňování, 2015).

2.3 Hojení ran

2.3.1 Proces hojení ran u zdravých jedinců

Hojení ran je fyziologický proces, jehož výsledkem je opětovné vytvoření funkční tkáně. Při hojení ran dochází k přirozenému pohybu a dělení buněk. Obecně je hojení ran komplexní proces, který můžeme rozdělit na několik fází. Jsou to fáze hemostázy, inflamace, proliferace a remodelace (obrázek 11). Záleží, zda se jedná o ránu akutní, kde probíhají všechny čtyři fáze, nebo o ránu chronickou, kde je vynechána fáze hemostázy, protože chronická rána vzniká z rány akutní při komplikacích, jako je bakteriální infekce nebo patologie poraněné tkáně. Fáze hojení ran se v průběhu procesu hojení mohou překrývat nebo vzájemně prolínat. Doba hojení ran závisí na velikosti rány, ale řádově je v rozpětí od několika dnů po řadu týdnů (Pospíšilová, 2002; Deng et al., 2018; Němcová et al., 2019; Ošetřovatelský proces při hojení chronických ran, 2021).

Fáze hemostázy neboli proces srážení krve je časově dlouhý proces, při kterém dochází k zastavení krvácení a postupné tvorbě strupu. Cévy se samy od sebe začnou stahovat, aby snížily přísun vzdušného kyslíku. V této fázi se zároveň aktivují krevní destičky, krev se u místa poranění začne srážet, a tak začíná vznikat trombus. Trombus je krevní sraženina, která zabrání průtoku krve z cévy ven. V postiženém místě se dále začne tvořit strup. V tomto okamžiku je důležitá důkladná dezinfekce rány, aby nedošlo k infekci, protože krev je vystavená okolnímu prostředí, a tedy i bakteriím. Krevní destičky vytvoří povrch, na který se váže protein fibrin, který zafixuje polohu destiček a vytvoří tak na poraněném místě síť.

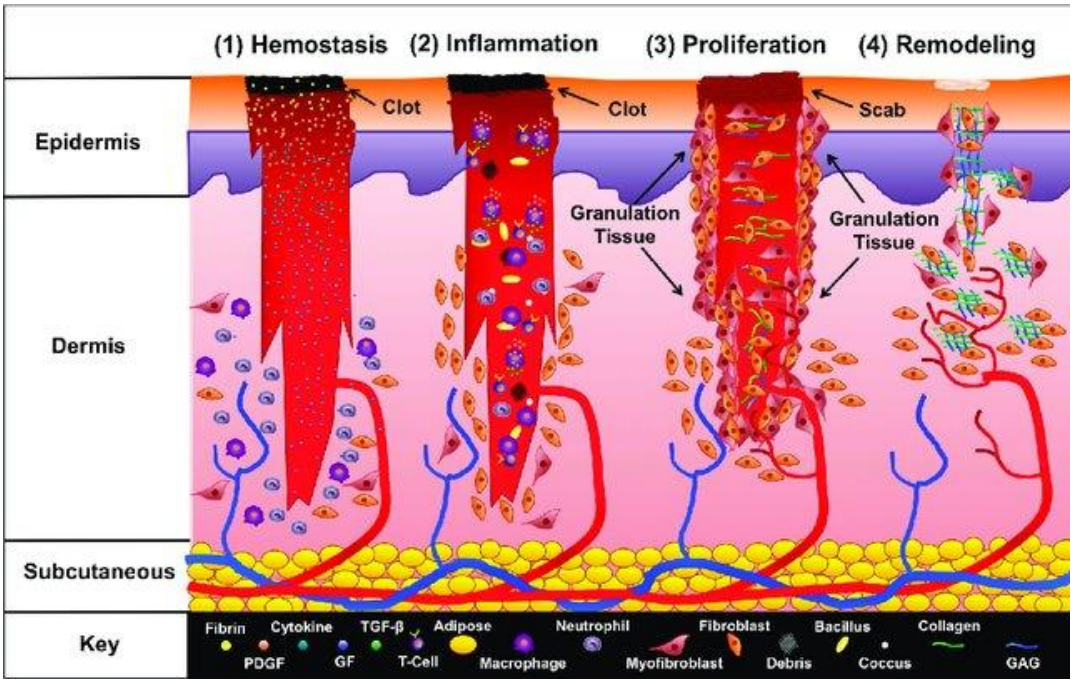
Na tuto fázi hemostatickou navazuje fáze zánětu, při které hrají hlavní roli neurofily a makrofágy. Ty mají za úkol odstranit poškozenou tkáň. Na poraněné místo se první dostávají neurofily, které očisťují ránu od odumřelých buněk a zabraňují bakteriální infekci. Poté se na místo dostanou makrofágy, které dělíme na dvě skupiny – M1 a M2. Makrofágy M1 fagocytují nahromaděné bakterie a poté se přemění na makrofágy M2, které produkují extracelulární matrix a protizánětlivé mediátory. Pro nás jsou důležité zejména matrix metaloproteinázy (MMP), což jsou enzymy, které mají velký podíl na komplikovaném hojení ran u diabetiků (více v kapitole 3.3.2.). V této práci se zaměříme především na matrix metaloproteinázu 9 (MMP9), která se u diabetických pacientů vyskytuje v dlouhodobě zvýšené hladině. V této komplexní fázi si tělo samo koordinuje množství přítoku okysličené krve k místu poranění, které je v případě poranění větší množství. Zánětlivá fáze končí apoptózou imunitních buněk (Pospíšilová,2002; Němcová et al., 2019).

Ve fázi granulační dochází k množení buněk, jako jsou fibroblasty, keratinocyty a endotelové buňky. V této fázi je potřeba v místě hojení rány dostatek kolagenu, elastinu a extracelulárního matrixu, který zajišťuje pevné spojení rány a umožní tak zrání tkáně. Poté se začne vytvářet granulační tkáň a dochází k tvorbě nových kapilár. V této fázi dokážeme lehce rozpoznat správný postup hojení. Ten je v případě, kdy se nově vzniklá tkáň zbarvuje do červena, poté z této tkáně vzniká jizva. Ovšem pokud se rána zbarvuje do šeda, dochází

nejspíše ke stagnaci hojícího procesu. Aby fáze probíhala úspěšně, je potřeba, aby v ráně byla správná teplota a vlhkost. (Pospíšilová,2002; Pokorná et Mrázová, 2012; Němcová et al., 2019).

Konečná fáze při procesu hojení ran je epitelizační (diferenciační). V závislosti na velikosti rány se povrch postupně pokryje nově vzniklou tkání, která se dále přemění na kůži. Původní pevnost kůže získá až po dvou letech a jen z 80 %. Pokud proces hojení neprobíhá patřičnými fázemi z patofyziologického hlediska nebo z časového hlediska, vzniká chronická rána, nedochází k úplnému zacelení tkáně a zhojení rány (Pospíšilová, 2001).

Hojení ran je komplexní biologický proces, při kterém dochází ke zvyšování i snižování hladiny různých regulačních látek, změnám v množství různých typů buněk a ke změnám ve struktuře tkáně. Tyto změny jsou v průběhu procesu naprogramovány tak, aby vedly k úplnému zahojení rány a k obnovení funkčnosti tkáně, pokud je to v daném místě možné. Při jakékoliv patologii v procesu hojení ran se můžeme zkusit zaměřit na její příčinu a odstranit ji. Je tomu tak například u chronických ran diabetiků, které budou popsány v následující kapitole (obrázek 12). Tyto rány jsou vhodným modelem pro studování obnovy procesu hojení ran po aplikaci genové terapie, cílené na snížení hladiny matrix metaloproteináz.



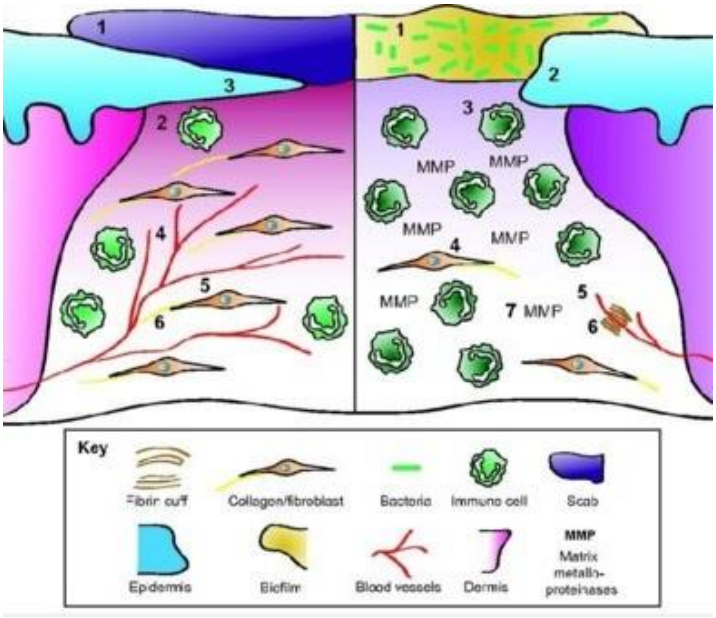
Obrázek 11: Zobrazení jednotlivých fází hojení ran u zdravého jedince (převzato z Mellot et al., 2016).

2.3.2 Hojení ran diabetických pacientů

Hojení ran u diabetických pacientů je ovlivněno řadou metabolických změn, které ovlivňují hojení ran na biochemické a celulární úrovni. K poruchám hojení ran u diabetických pacientů dochází především vlivem infekčního zanícení rány, která zůstává v zánětlivé fázi po delší dobu, než by tomu tak bylo při zdravém procesu hojení rány. U diabetických pacientů

se snažíme o zmírnění následků dlouhotrvajícího procesu hojení a snažíme se předejít větším komplikacím, i přesto však často dochází k amputacím dolních končetin při dlouhotrvajících a postupujících infekcích chronických ran. Nejčastější příčina hospitalizace diabetických pacientů je infekční komplikace, zejména při syndromu diabetické nohy. Infekční komplikace je také jednou z hlavních příčin amputace. Postihuje většinou 25–50 % diabetických pacientů (Criado et al., 1992; Boulton, 2000; Fejfarová, 2010).

U zdravých jedinců za normálních okolností dochází k hojení rány pomocí kontrakce a tvorby granulační tkáně. Urychlení hojení je umožněno díky odstraňování předešlé poškozené tkáně. U diabetických pacientů dochází k opakovanému odstraňování již nově vytvořené tkáně, a to zejména kvůli zvýšenému množství štěpících enzymů v místě rány (Albertson et al., 1993; King, 2001; Rai et al., 2005).



Obrázek 12: Zobrazení porovnání procesu hojení akutní (vlevo) a chronické rány (vpravo) (převzato z Macewan et al., 2017).

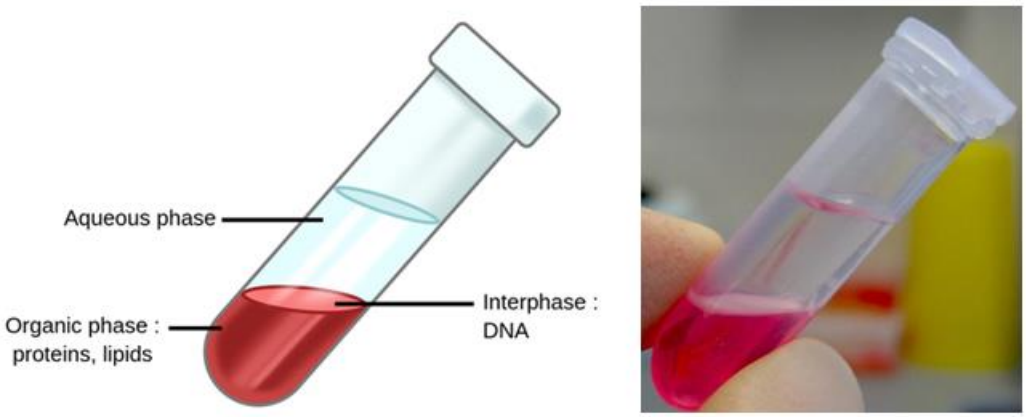
3 MATERIÁLY A METODY

V této části si představíme metody, které jsem při své práci v laboratoři využívala. Izolace proteinu z myších tkání probíhala pomocí TRIzolu. Tomuto kroku předcházela experimentální část s laboratorními zvířaty. Na *in vivo* experimenty byly používány laboratorní myši C57BL/6, které byly mužského pohlaví a byly staré 8-10 týdnů. Pro indukci diabetu byl myším do peritonea aplikován streptozotocin (STZ) v pěti po sobě jdoucích dávkách, kdy každá dávka obsahovala 1 mg STZ. Tyto dávky způsobily vyvinutí diabetického modelu zhruba 14 dní od poslední injekce STZ. Diabetes byl u zvířat ověřen pomocí měření glukózy v krvi z ocasní žíly, diabetické modely měly hladinu glukózy dlouhodobě přesahující 8.3 mmol/l po dvouhodinovém hladovění. Diabetickým modelům byla poté v anestezii vytvořena rána na zádech, a byla jim aplikována nanovlákna s siRNA nesoucími nanodiamanty nebo samotná nanovlákna pro kontrolu. Zároveň skupina laboratorních myší obsahovala i kontrolní zvíře bez diabetu a zvíře s diabetem bez jakékoliv aplikace na ránu. Po ukončení hojení byla myším odebrána tkáň po ráně a byla uložena do RNA later roztoku (QIAGEN) a byla skladována při teplotě -20 °C. Z roztoku RNA later jsem poté tkáně odebírala pro další izolaci proteinu, která je popsaná v následující podkapitole.

3.1 Izolace proteinu z myší tkáně

Izolace proteinu probíhala pomocí TRIzolu (ThermoFisher Scientific). V prvním kroku se odebraná tkáň přesunula sterilní pinzetou z RNA later (QIAGEN) roztoku, ve kterém byla uchovávaná po dobu skladování, do 1000 µl Trizolu. V roztoku Trizolu jsme nechali tkáň inkubovat za pokojové teploty po dobu 10 minut, na konci inkubační doby jsme tkáň opět vyjmuli sterilní pinzetou. Poté jsme přidali 200 µl chloroformu (Merck), vzorky jsme promíchali vortexem (Labnet) po dobu alespoň 15 sekund a nechali jsme je inkubovat v pokojové teplotě 5 minut. Dále jsme provedli centrifugaci při 12000 otáčkách za minutu, po dobu 10 minut a při teplotě 4 °C.

Po vyjmutí z centrifugy (Labnet) se nám vzorek rozdělil na 3 fáze. V dolní části eppendorfky byl požadovaný protein růžové barvy, uprostřed bílý proužek DNA a nahoře byla průhledná fáze s RNA. Vzniklý protein jsme si přepipetovali do nové zkumavky a přidali k němu 300 µl 96% etanolu (Merck). Vzorky jsme promíchali vortexem a nechali za pokojové teploty inkubovat 5 minut. Dále jsme ke vzorku přidali 700 µl isopropanolu (Merck), opět jsme promíchali vortexem a nechali inkubovat za pokojové teploty 10 minut. Poté jsme provedli centrifugaci na 12000 otáček za minutu, po dobu 10 minut a za teploty 4 °C. Vzorky jsme vyjmuli a nechali 5 minut.



Obrázek 13: Zobrazení separace fází (protein, DNA, RNA) pomocí TRIzolu
(převzato z Guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction,2020).

Po centrifugaci se nám na spodu vzorku vytvoří malá peleta. Ze zkumavky vylijeme všechen supernatant (celý objem zkumavky nad peletou), a poté do ní přidáme 1 ml GuTHC (Serva) o látkovém množství 0,3 M, který je rozpuštěný v ethanolu. Tento roztok obsahuje přesně 1,4844 g GuTHC a 42 ml ethanolu. Zkumavku s roztokem necháme na 15 minut inkubovat v pokojové teplotě. Poté zkumavku podrobíme centrifugaci při 7500 otáčkách za minutu, po dobu 5 minut, za teploty 4 °C. Po centrifugaci vylijeme všechen supernatant. Tento proces opakujeme 3x.

Po posledním vylití supernatantu přidáme ke vzorku 500 µl 1% SDS (Merck). Vzorek promícháme vortexem a necháme inkubovat po dobu 10 minut při 58 °C. Vzorek necháme přes noc chladit při 4 °C.

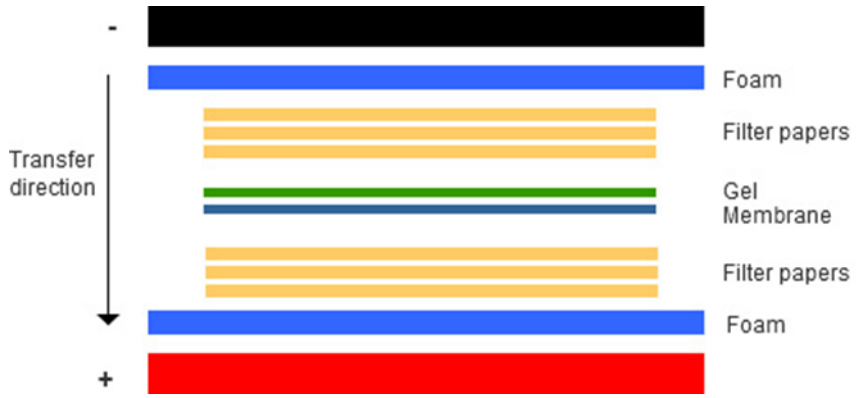
3.2 Měření koncentrace proteinu pomocí Bradford

Množství proteinu ve vzorcích jsme zjistili pomocí metody zvané Bradford assay založené na kolorimetrickém měření. Při této metodě je možné díky standardu o známé koncentraci dopočítat pomocí kalibrační křivky koncentraci vzorku. Tato kalorimetrická metoda je založena na absorbanci paprsku procházejícím vzorkem, tato absorbance se řídí Lambert–Beerovým zákonem. Do průhledné 96jamkové destičky (Greiner) s plochým dnem jsme přidali 100 µl roztoku Coomasie Plus – The Better Bradford Assay (ThermoFisher Scientific). Jako kalibrační vzorek jsme použili roztok BSA (bovine serum albumin, Sigma Aldrich) ve vodě. Kalibrační křivku jsme vytvořili pomocí 5 různých koncentrací BSA (viz. výsledky). Vzorky byly přidány k roztoku Bradford v 1 µl. Samotné měření probíhalo na spektrometru Infinitive M200 Pro (Tecan), u kterého jsme nastavili měření absorbance vzorku při nastavení vlnové délky 595 nm, což odpovídá zelenému paprsku, pomocí kterého přístroj změří, kolik světla bylo pohlceno naším vzorkem. Měřili jsme pro kontrolu i samotný Bradford roztok bez přidaného vzorku standardu.

3.3 Western blot

Po izolaci proteinu a zjištění jejich koncentrace jsme analyzovali konkrétní protein a jeho množství ve vzorku pomocí metody Western blot. Prvním krokem byla takzvaná SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis), kdy dojde k rozdělení proteinů ve vzorku na základě jejich velikosti. 6,75 µl LDS pufru (LDS Sample Buffer, ThermoFisher Scientific) jsme smíchali s 18,25 µl vzorku ředěného vodou dle jeho koncentrace. Tato směs byla inkubována 10-15 minut při 70 °C. Bis–Tris gel (ThermoFisher Scientific) byl 3x promyt RB (Running buffer, ThermoFisher Scientific) a byl instalován do elektroforézní vany (Invitrogen). Vana byla naplněna čerstvým RB a do každé jamky bylo napipetováno 25 µl vzorku. V první a poslední jamce bylo aplikováno 5 µl standardu Novex™ Sharp Pre-stained Protein Standard (ThermoFisher Scientific). Elektroforéza byla spuštěna při 150 mA, 100 V, 100 W a při konstantním proudu po dobu 45 minut.

Po skončení SDS-PAGE jsme gel odstranili z kazety a nechali jsme ho promývat po dobu 30 minut za stálého míchání v TB (Transfer buffer, FIRMA). Zároveň jsme připravili Watmannovy filtrační papíry (6 kusů) o velikosti gelu a nitrocelulózovou membránu o stejné velikosti, obojí jsme promývali v TB po dobu alespoň 5 minut. Poté proběhl transfer proteinů z gelu na membránu, a to pomocí takzvané sandwichové metody. Nákres způsobu vrstvení filtračních papírů, membrány a gelu mezi 2 elektrodami je zobrazen na schématu níže (obrázek 14). Elektroforéza probíhala po dobu 1,5 hodiny při 30 mA, 7 V a za konstantního proudu.



Obrázek 14: Schéma nastavení vrstev membrány, gelu a filtračního papíru při sandwichové metodě elektroforézy (převzato z Western Blot Wet Transfer, 2022).

Dalším krokem bude promývání membrány, na kterou byly předchozím procesem přeneseny proteiny z gelu. Promývání probíhá v roztoku 1% sušeného mléka (Promil) v TBS–T. Membránu si přendáme do Petriho misky, do ní přidáme připravený roztok, tak aby membrána byla celá pokrytá roztokem. Snažíme se roztok přidávat mimo membránu, aby nedošlo k narušení její struktury. Poté necháme membránu 15 minut na třepačce (Grant bio). Dále vylijeme supernatant a znovu opatrně přidáme k membráně požadovaný roztok. Dáme na třepačku na časový interval 5 minut. Poté zopakujeme tuto fázi ještě dvakrát opět s 5minutovými intervaly.

Po posledním vylití supernatantu bude následovat blokace proteinů na membráně. Ta bude probíhat pomocí roztoku 5% mléka, 5 g sušeného mléka smícháme se 100 ml TBS–T. Roztok přidáme k membráně a necháme ji promývat za pomoci třepačky na 1 hodinu.

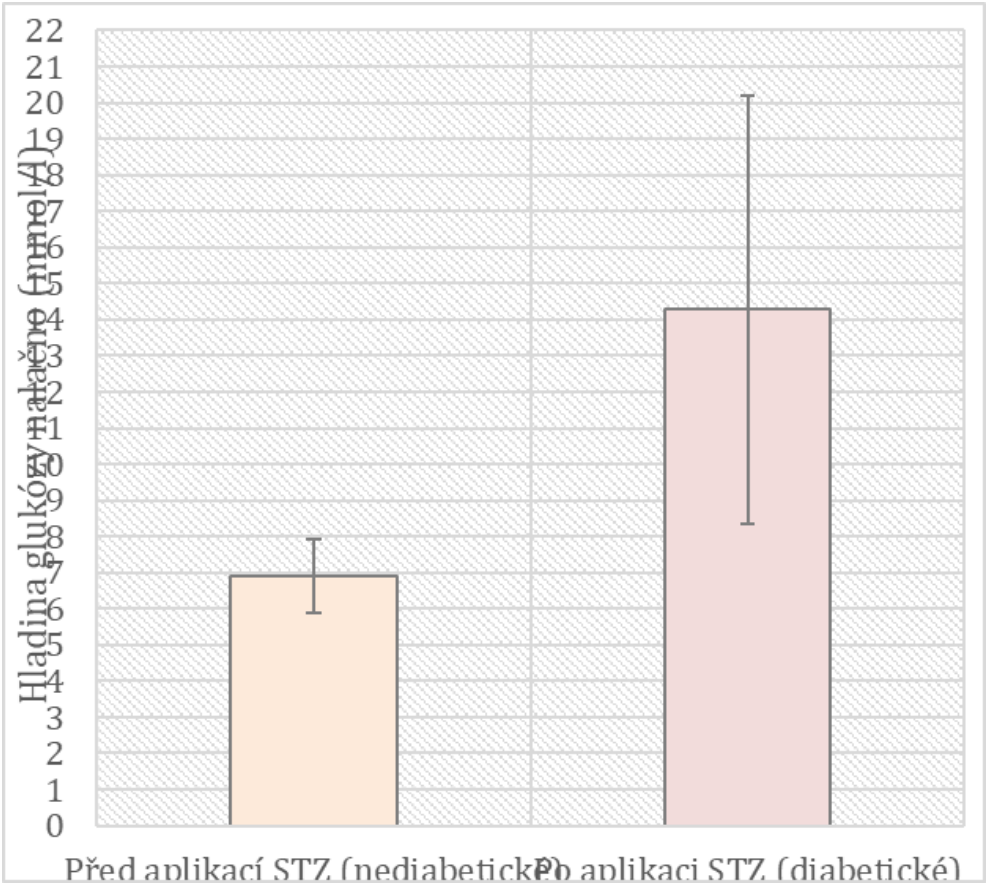
Po ukončení blokace proteinů na membráně následuje koncové promývání membrány, které bude stejné jako první promývání. Poté k membráně budeme přidávat primární protilátku. Přesně anti-mouse matrix metaloproteinázu 9 (dále jen MMP-9, Invitrogen) a GAPDH (Milipore). Tu musíme naředit na požadovanou koncentraci. V našem případě jsme k 2 µl MMP-9, nebo GAPDH přidali 1 ml TBS-T s 1% obsahem sušeného mléka, kterou jsme dále promíchali na vortexu. Zředěnou protilátku jsme nanesli na celý povrch membrány a dali jsme ji inkubovat do 4 °C přes noc.

Druhý den necháme membránu 15 minut na třepačku promývat v roztoku TBS-T. Dále vylijeme supernatant a znovu opatrně přidáme k membráně roztok TBS-T. Dáme membránu na třepačku na časový interval 5 minut. Poté zopakujeme tuto fázi ještě dvakrát opět s minutovými intervaly. Dále k membráně přidáme sekundární protilátku značenou fluorescenční značkou (Life Technologies). Po inkubaci membrány se sekundární protilátkou se membrána opět bude promývat pomocí roztoku TBS-T po dobu 15 minut a třikrát po dobu 5 minut. Proces probíhal za minimálního přístupu světla. Poté se membrána odnesla na vizualizaci do přístroje G:Box (Syngene).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Hladina glukózy diabetických modelů

Na grafu 1 můžeme vidět, jaké byly hodnoty glukózy v krvi v ocasní žíle diabetických modelů, které byly měřené u modelů s aplikovaným STZ. Tyto hodnoty byly měřeny před samotnými *in vivo* experimenty, při kterých byly aplikována na rány myší nanovlákna.

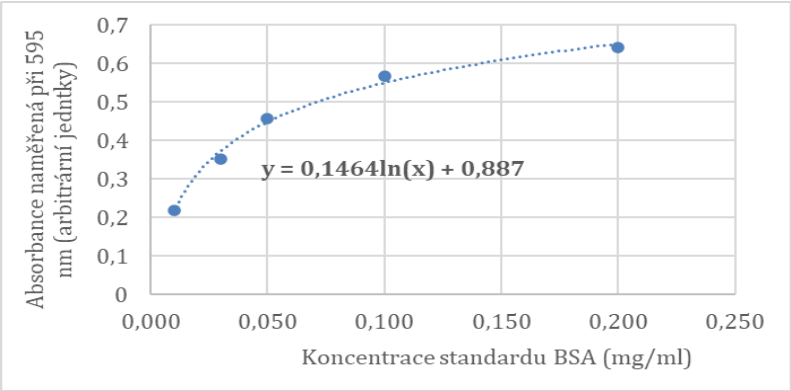


Obrázek 15: Hladiny glukózy v krvi diabetických myších modelů (autor) .

Na Grafu 1 můžeme vidět, že hladina glukózy v krvi myší výrazně stoupla, dá se tedy mluvit o diabetickém modelu myši.

4.2 Koncentrace proteinů z myších tkání

Nejprve bylo potřeba změřit kalibrační křivku za pomocí známé koncentrace BSA. Pomocí kalibrační křivky se dá následně zjistit koncentrace neznámých vzorků, které jsme izolovali. Na grafu 1 zobrazeném níže můžeme vidět kalibrační křivku, kterou jsme naměřili a pomocí funkce „spojnice trendu“ jsme v Excelu zjistili rovnici této křivky. Na ose x je zobrazena známá koncentrace standardu a na ose y je zobrazena absorbance, kterou změřil spektrofotometr při osvícení paprskem o vlnové délce 595 nm. Absorbance naměřená přístrojem je v takzvaných arbitrárních jednotkách (a. j.).



Obrázek 16: Kalibrační křivka známé koncentrace BSA naměřené na spektrofotometru (autor).

Na grafu 2 můžeme vidět kalibrační křivku, ze které jsme vycházeli při vypočítávání koncentrace neznámých vzorků. U této křivky je rovnice spojnice trendu vyobrazených naměřených bodů. Při dosazení naměřených absorbancí neznámých vzorků za y v logaritmické rovnici jsme vypočítali přibližnou koncentraci neznámých vzorků. V tabulce 1 můžeme vidět hodnoty, které byly pro vytvoření kalibrační křivky použity, v prvním řádku je hmotnost BSA použitá na každou z koncentrací, v druhém řádku je vypočítaná koncentrace (při započítání roztoku Bradford, který jsme doplnili do celkového objemu 100 µl) a ve třetím řádku je naměřená absorbance v arbitrárních jednotkách.

Tabulka 1: Hodnoty koncentrací BSA pro vytvoření kalibrační křivky.

Hmotnost BSA (µg)	0	1	3	5	10	20
Koncentrace BSA (µg/µl)	0,00	0,01	0,03	0,05	0,10	0,20
Absorbance při 595 nm (a. j.)	0,128	0,219	0,351	0,457	0,567	0,642

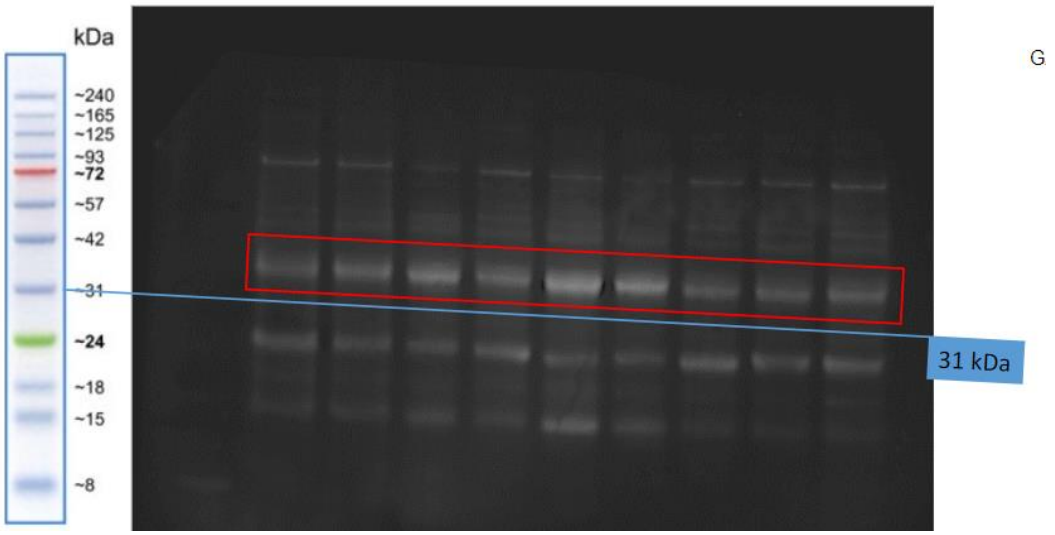
V tabulce 2 můžeme vidět výsledky koncentrací vzorků, které jsme chtěli zjistit a zároveň vypočítané objemy, které byly následně použity na elektroforézu v prvním kroku Western Blot analýzy.

Tabulka 2: Koncentrace proteinů a objem použitý v následné analýze.

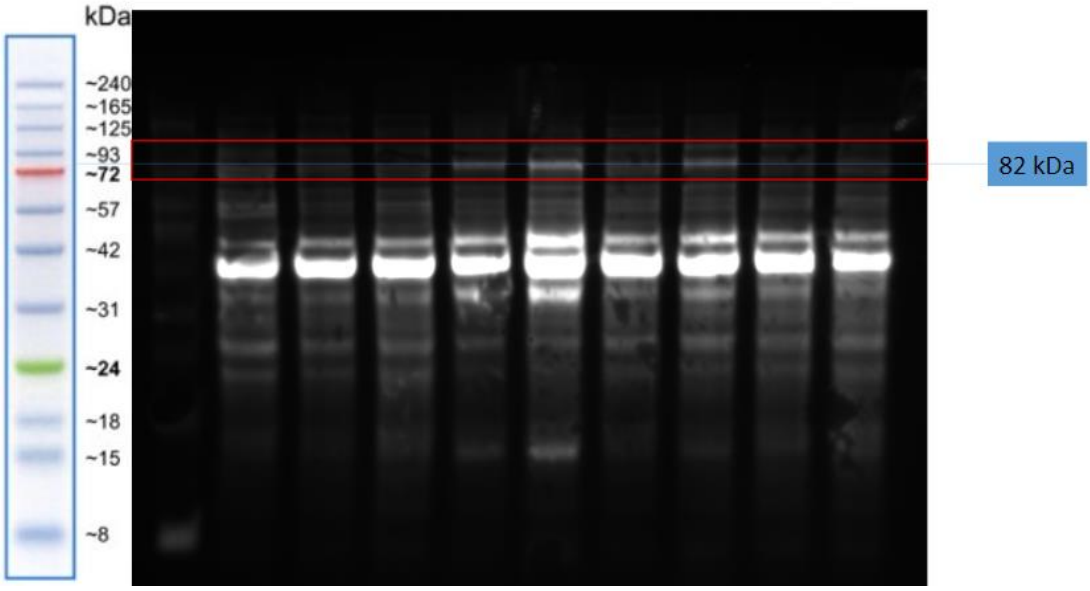
	Typ vzorku	Absorbance	Koncentrace (µg/µl)	Objem použitý na elektroforézu (µl)
vzorek 1	kontrolní myš bez diabetu	0,155	0,676	14,877
vzorek 2	kontrolní myš s diabetem	0,142	0,615	16,336
vzorek 3	kontrolní myš s diabetem	0,153	0,666	15,092
vzorek 4	siRNA	0,135	0,589	17,078
vzorek 5	siRNA	0,157	0,682	14,735
vzorek 6	kontrolní nanovlákna 1	0,158	0,690	14,575
vzorek 7	kontrolní nanovlákna 1	0,223	0,536	18,750
vzorek 8	kontrolní nanovlákna 2	0,224	0,539	18,661
vzorek 9	kontrolní nanovlákna 2	0,227	0,550	18,270

4.3 Analýza proteinů na membráně

Na obrázcích níže je zobrazen výsledek Western Blot analýzy, kde jsme zobrazovali na membráně kontrolní protein (GAPDH) a na té samé membráně následně sledovaný protein MMP-9. Vlevo můžeme vidět kontrolní žebříček, podle kterého se určovala hmotnost jednotlivých pruhů proteinů. Tento žebříček jsme použili při elektroforéze, za viditelného světla je na něm vidět barevné rozdělení jednotlivých velikostí proteinů v jednotkách kDA.



Obrázek 17: Kontrolní protein GAPDH zobrazený na membráně (autor).



Obrázek 18: Sledovaný protein MMP-9 zobrazený na membráně (autor).

Jednotlivé vzorky jsou na membráně seřazeny následovně:

Tabulka 3: Rozložení vzorků na membráně.

vzorek 1	kontrolní myš bez diabetu
vzorek 2	kontrolní myš s diabetem
vzorek 3	kontrolní myš s diabetem
vzorek 4	siRNA
vzorek 5	siRNA
vzorek 6	kontrolní nanovlákna 1
vzorek 7	kontrolní nanovlákna 1
vzorek 8	kontrolní nanovlákna 2
vzorek 9	kontrolní nanovlákna 2

Při analýze proteinů ze tkání myší jsme viděli pokles MMP-9 proteinu u vzorku s aplikovanou siRNA donesenou nanodiamanty uvolněnými z nanovláken. Tento pokles byl pravděpodobně opravdu způsobený siRNA, protože nebyl u vzorků myší s kontrolními nanovlákny patrný.

5 ZÁVĚR

Má práce se věnovala možnému využití genové terapie a nanotechnologií v procesu hojení ran diabetických pacientů. Cílem této práce bylo zajistit snížení matrix metaloproteináz v diabetické ráně. Toho jsme docílili díky molekule siRNA, která byla navázána na nanodiamantový nosič a byla aplikována diabetické myši po dobu hojení rány. Pro potvrzení snížení hladiny matrix metaloproteináz v ráně jsme využili metod izolace proteinů z myší tkáně, poté koncentrace proteinů a podrobnou analýzu vzorku, díky metodě Western Blot.

Ve výsledcích se nám úspěšně podařilo izolovat protein, který jsme podrobili metodě Western Blotu. Zde jsme z podrobné analýzy zjistili, že byla snížena hladina MMP-9 ve vzorcích myší tkáně s aplikovanou genovou terapií, v našem případě působením molekul siRNA v ráně.

Tyto výsledky nám přináší slibné vyhlídky do budoucna, kde by se tato metoda dala aplikovat na lidech. Nesmíme ale zapomínat na různá úskalí, která tato inovativní metoda přináší např. v podobě neprozkoumané bezpečnosti nanodiamantů v lidském organismu, nebo závažný etický problém spojený s genovou terapií.

6 POUŽITÁ LITERATURA A ZDROJE

6.1 Literatura a internetové zdroje

ABINAYA, Ravichandran Vijaya a Pragasam VISWANATHAN. Biotechnology-based therapeutics. *Translational Biotechnology* [online]. Elsevier, 2021, 2021, s. 27-52.

After decades of evolution, gene therapy arrives. *Boston Children's Hospital* [online]. 2020 [cit. 2022-03-21]. Dostupné z: https://answers.childrenshospital.org/gene-therapy-history/.

ALBERTSON, S., et al. PDGF and FGF reverse the healing impairment in protein-malnourished diabetic mice. *Surgery,* 1993, 114.2: 368-72; discussion 372.

AL-DOSARI, Mohammed S. a Xiang GAO. Nonviral Gene Delivery: Principle, Limitations, and Recent Progress. *The AAPS Journal* [online]. 2009, **11**(4).

BADEA, Ildiko a Randeep KAUR. Nanodiamonds as novel nanomaterials for biomedical applications: drug delivery and imaging systems. *International Journal of Nanomedicine* [online].

BECKER, Sebastian a Jens BOCH. TALE and TALEN genome editing technologies. *Gene and Genome Editing* [online]. 2021, **2.**

BLAESE, R. Michael, Kenneth W. CULVER, A. Dusty MILLER, et al. T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA – SCID: Initial Trial Results After 4 Years. *Science* [online]. 1995, **270**(5235), 475-480.

BOULTON, Andrew JM. The diabetic foot: a global view. *Diabetes/metabolism research and reviews.* 2000, **16**.S1: S2-S5.

BULAKLAK, Karen a Charles A. GERSBACH. The once and future gene therapy. *Nature Communications* [online]. 2020, **11**(1).

BUZEA, Cristina, Ivan I. PACHECO a Kevin ROBBIE. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases* [online]. 2007, **2**(4), MR17-MR71

BUZGO, Matej, Martin PLENCNER, Michala RAMPICHOVA, et al. Poly-ε-caprolactone and polyvinyl alcohol electrospun wound dressings: adhesion properties and wound management of skin defects in rabbits. *Regenerative Medicine* [online]. 2019, **14**(5), 423-445.

Co jsou to nanomateriály?. *Europen Chemicals Agency* [online]. [cit. 2022-03-21]. Dostupné z: https://chemicalsinourlife.echa.europa.eu/cs/why-are-nanomaterials-important.

COTTEN, Matt a Ernst WAGNER. Non-viral approaches to gene therapy. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 1993, **4**(6), 705-710.

CRIADO, E., et al. The course of severe foot infection in patients with diabetes. *Surgery, gynecology & obstetrics*, 1992, 175.2: 135-140.

DENG, Chengliang, Liangyue WANG, Jingwei FENG a Feng LU. Treatment of human chronic wounds with autologous extracellular matrix/stromal vascular fraction gel. *Medicine* [online]. 2018, **97**(32).

Electrically driven jets. *Proceedings of the Royal Society of London. A. Mathematical and Physical Sciences* [online]. 1969, **313**(1515), 453-475.

Fejfarová, V. Diabetes mellitus a hojení ran. *Interní medicína pro praxi. 2010.* ***12***(7-8), 350-354.

FUSEK, M., L. VÍTEK, J. BLAHOŠ JR., M. HAJDÚCH a T. RUML. Biologická léčiva. Praha: Grada Publishing, 2012. ISBN 978-80-247-3727-0.

FRIEDMANN, Theodore. A brief history of gene therapy. *Nature Genetics* [online]. 1992, **2**(2), 93-98.

Gene Therapy Basics. *American Society of Gene + Cell Therapy* [online]. 2022 [cit. 2022-03-21]. Dostupné z: https://patienteducation.asgct.org/gene-therapy-101/gene-therapy-basics.

Genetické choroby. *Doba genová* [online]. 2022 [cit. 2022-03-21]. Dostupné z: https://doba-genova.cz/geneticke-ochorenia/.

Genová terapie. *Genetika – Biologie* [online]. 2014 [cit. 2022-03-21]. Dostupné z: http://www.genetika-biologie.cz/genova-terapie.

GUPTA, Rajat M. a Kiran MUSUNURU. Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 2014, **124**(10), 4154-4161.

Havlik, Jan, et al. "Boosting nanodiamond fluorescence: towards development of brighter probes. Nanoscale. 2013, 5.8, 3208-3211.

JACKSON, David D. Interpretation of inaccurate, insufficient and inconsistent data. *Geophysical Journal International* [online]. 1972, **28**(2), 97-109.

KING, Laila. Impaired wound healing in patients with diabetes. *Nursing Standard* [online]. 2001, **15**(38), 39-45.

LI, S-D a L HUANG. Gene therapy progress and prospects: non-viral gene therapy by systemic delivery. *Gene Therapy* [online]. 2006, **13**(18), 1313-1319.

MILLER, Douglas L., Sorin V. PISLARU a James F. GREENLEAF. *Somatic Cell and Molecular Genetics* [online]. **27**(1/6), 115-134.

MURAKAMI, Tatsufumi a Yoshihide SUNADA. Plasmid DNA Gene Therapy by Electroporation: Principles and Recent Advances. *Current Gene Therapy* [online]. 2011, **11**(6), 447-456.

Nanomedicína. *Nanotechnologie v Medicíně* [online]. 2002 [cit. 2022-03-21]. Dostupné z: http://nanomedicina.sweb.cz/#Nanomedicina.

Nanotechnology. *Centers for Disease Control and Prevention* [online]. 2020 [cit. 2022-03-21]. Dostupné z: https://www.cdc.gov/niosh/topics/nanotech/default.html.

NAPOLI, C., C. LEMIEUX a R. JORGENSEN. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *The Plant Cell* [online]. 279-289.

Němcová J, Miertová M, Hlinková E, kolektiv. *Management chronických ran [Chronic Wound Management]*, 232 stran, ISBN 978-80-271-0620-2, Grada Publishing a.s.; 2019.

Non-Viral Gene Therapies Get €51M Boost, Though Challenges Remain. *LABIOTECH.eu* [online]. 2021 [cit. 2022-03-21]. Dostupné z: https://www.labiotech.eu/trends-news/anjarium-gene-therapy/.

MOCHALIN, Vadym N., Olga SHENDEROVA, Dean HO a Yury GOGOTSI. The properties and applications of nanodiamonds. *Nature Nanotechnology* [online]. 2012, **7**(1), 11-23.

Ošetřovatelský proces při hojení chronických ran. *Theses.cz* [online]. 2021 [cit. 2022-03-21]. Dostupné z: https://theses.cz/id/3he6n3/.

Pokorná A, Mrázová R. *Kompendium hojení ran pro sestry [Compendium of wound healing for nurses]*. 191 stran, ISBN 978-80-247-3371-5, Grada; 2012.

POSPÍŠILOVÁ, Alena a Sabina ŠVESTKOVÁ. *Léčba chronických ran.* Česká republika, Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, Brno, 2001. 72 s. Učebnice. ISBN 80-7013-348-1.

Pospíšilová, Alena. Nové přístupy k léčbě chronických ran-bércových vředů. *Praktická flebologie*. 2002.

Pros and cons of ZNFs, TALENs and CRISPR/Cas. *The Jackson Laboratory* [online]. 2014 [cit. 2022-03-21]. Dostupné z: https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2014/march/pros-and-cons-of-znfs-talens-and-crispr-cas.

RAI, Nirendra K., Kamlakar TRIPATHI, Deborshi SHARMA a Vijay K. SHUKLA. Apoptosis: A Basic Physiologic Process in Wound Healing. *The International Journal of Lower Extremity Wounds* [online]. 2005, **4**(3), 138-144.

RAMAMOORTH, Murali. Non Viral Vectors in Gene Therapy- An Overview. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH* [online]. 2015.

RASOULI, Rahimeh, Ahmed BARHOUM, Mikhael BECHELANY a Alain DUFRESNE. Nanofibers for Biomedical and Healthcare Applications. *Macromolecular Bioscience* [online]. 2018, **19**(2).

Revoluce v molekulární biologii. Nůžky jménem CRISPR. *MUNI* [online]. 2017 [cit. 2022-03-21]. Dostupné z: https://www.em.muni.cz/tema/9738-revoluce-v-molekularni-biologii-nuzky-jmenem-crispr.

RESCH-GENGER, Ute, Markus GRABOLLE, Sara CAVALIERE-JARICOT, Roland NITSCHKE a Thomas NANN. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nature Methods* [online]. 2008, **5**(9), 763-775.

ROBBINS, Paul D. a Steven C. GHIVIZZANI. Viral Vectors for Gene Therapy. Elsevier Science Inc. 1998, (1), 35-47. ISSN 0163-7258/98.

SAWYER, Eric. Editing Genomes with the Bacterial Immune System. *Nature Publishing Group*. 2013.

SCHRAND, Amanda M., Suzanne A. Ciftan HENS a Olga A. SHENDEROVA. Nanodiamond Particles: Properties and Perspectives for Bioapplications. *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences* [online]. 2009, **34**(1-2), 18-74.

SNUSTAD, D. Peter a Michael J. SIMMONS, RELICHOVÁ, Jiřina, ed. *Genetika*. Druhé, aktualizované vydání. Přeložil Jiří DOŠKAŘ, přeložil Jiří FAJKUS, přeložil Petr HOŘÍN, přeložil Aleš KNOLL, přeložil Petr KUGLÍK, přeložil Jan ŠMARDA, přeložil Jana ŠMARDOVÁ, přeložil Renata VESELSKÁ, přeložil Boris VYSKOT. Brno: Masarykova univerzita, 2017. ISBN 978-80-210-8613-5.

SU, Cheng-Huang, Yih-Jer WU, Hsueh-Hsiao WANG a Hung-I YEH. Nonviral gene therapy targeting cardiovascular system. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* [online]. 2012, **303**(6), H629-H638.

TACHIBANA, Katsuro a Shunro TACHIBANA. Transdermal delivery of insulin by ultrasonic vibration. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* [online]. 1991, **43**(4), 270-271.

TOMIZAWA, Minoru. Sonoporation: Gene transfer using ultrasound. *World Journal of Methodology* [online]. 2013, **3**(4).

Transfekce. *BIOGEN molekulární biologie a genetika* [online]. Praha: BIOGEN PRAHA, 2022 [cit. 2022-03-21]. Dostupné z: https://biogen.cz/transfekce.

Transfekční činidla – Mirus Bio. *GeneTiCA* [online]. 2022 [cit. 2022-03-21]. Dostupné z: https://www.genetica.cz/transkfekcni-cinidla.

VERT, Michel, Yoshiharu DOI, Karl-Heinz HELLWICH, Michael HESS, Philip HODGE, Przemyslaw KUBISA, Marguerite RINAUDO a François SCHUÉ. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry* [online]. 2012, **84**(2), 377-410.

What is gene therapy?. *Yourgenome* [online]. 2021 [cit. 2022-03-21]. Dostupné z: https://www.yourgenome.org/facts/what-is-gene-therapy.

What Is ZFN Technology?. *MERCK* [online]. [cit. 2022-03-21]. Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/technical-article/genomics/advanced-gene-editing/learning-centerwhat-is-zfn?gclid=CjwKCAiA9tyQBhAIEiwA6tdCrBk4f5QPGcFNdrXc1g6kK7c2KPmvc2ry4k3B1VL-30CqbsiJnqEOwhoCvYIQAvD_BwE.

WANG, Weiwei, et al. Non-viral gene delivery methods. Current pharmaceutical biotechnology, 2013, 14.1: 46-60.
Závěry světové konference o editaci genů. *BIOTRIN* [online]. 2022 [cit. 2022-03-21]. Dostupné z: https://www.biotrin.cz/zavery-svetove-konference-o-editaci-genu/.

ZHU, Ying, Jing LI, Wenxin LI, et al. The Biocompatibility of Nanodiamonds and Their Application in Drug Delivery Systems. *Theranostics* [online]. 2012, **2**(3), 302-312.
Zolgensma. *European Medicines Agency Science Medicines Health* [online]. 2020 [cit. 2022-03-21]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en.

6.2 Zdroje obrázků

Autor (vlastní fotografie).

CAMPBELL, Jarryd M., et al. New and TALENted genome engineering toolbox. *Circulation research*, 2013, 113.5: 571-587.

CARROLL, Dana. Progress and prospects: zinc-finger nucleases as gene therapy agents. *Gene therapy*, 2008, 15.22: 1463-1468.

DVOŘÁKOVÁ, Barbora. *Signalizace a oprava dvouřetězcových zlomů DNA v nádorových buňkách* [online]. Brno, 2017 [cit. 2022-03-24]. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/ekrh0/Barbora_Dvorakova_Bakalarska_prace.pdf.

Elektrostatické zvlákňování. *Nanopharma* [online]. 2015 [cit. 2022-03-24]. Dostupné z: https://www.nanopharma.cz/cs/produkty-a-technologie/technologie.

Guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Labster Theory* [online]. 2020 [cit. 2022-03-24]. Dostupné z: https://theory.labster.com/guanidium-thiocyanate-phenol-chloroform-extraction/.

Introduction to the CRISPR/Cas9 system. *TaKaRa* [online]. 2022 [cit. 2022-03-24]. Dostupné z: https://www.takarabio.com/learning-centers/gene-function/gene-editing/gene-editing-tools-and-information/introduction-to-the-crispr/cas9-system.

LIU, Kuang-Kai, et al. Endocytic carboxylated nanodiamond for the labeling and tracking of cell division and differentiation in cancer and stem cells. *Biomaterials*, 2009, 30.26: 4249-4259.

MACEWAN, Matthew R., et al. What makes the optimal wound healing material? A review of current science and introduction of a synthetic nanofabricated wound care scaffold. *Cureus*, 2017, 9.10.

MELLOTT, Adam J.; ZAMIEROWSKI, David S.; ANDREWS, Brian T. Negative pressure wound therapy in maxillofacial applications. *Dentistry journal*, 2016, 4.3: 30.

MIZUOCHI, N., T. MAKINO, H. KATO, et al. Electrically driven single-photon source at room temperature in diamond. Nature Photonics [online]. 2012, 6(5), 299-303 [cit. 2022-03-25]. ISSN 1749-4885. Dostupné z: doi:10.1038/nphoton.2012.75.

MOCELLIN, Simone; PROVENZANO, Maurizio. RNA interference: learning gene knock-down from cell physiology. *Journal of translational medicine*, 2004, 2.1: 1-6.

ŠLEGEROVÁ, Jitka a Petr CÍGLER. Nanodiamanty – fluorescenční a zobrazovací nanosondy. Chemické Listy. 2014, 2014(108), 387–393. ISSN 1213-7103.

Využití nanotechnologií při přípravě nutraceutik a funkčních potravin. *SlidePlayer* [online]. Praha, 2011 [cit. 2022-03-24]. Dostupné z: https://slideplayer.cz/slide/11137313/.

Western Blot Wet Transfer. *SinoBiological* [online]. 2022 [cit. 2022-03-24]. Dostupné z: https://cn.sinobiological.com/category/wb-wet-transfer.

6.3 Zdroje tabulek

Tabulka 1: autor (vlastní fotografie).

Tabulka 2: autor (vlastní fotografie).

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Obrázek zobrazuje dva typy spojování dvouřetězcových zlomů v DNA. Těmi jsou homologní rekombinace (vlevo) a nehomologní spojování konců (vpravo) (převzato z Dvořáková, 2017). 12
Obrázek 2: Schéma procesu působení ZFN (převzato z Carroll, 2008). 12
Obrázek 3: Schéma principu působení TALENů (převzato z Campbell, 2013). 13
Obrázek 4: Schéma metody CRISPR (převzato z Introduction to the CRISPR/Cas9 systém, 2022) 13
Obrázek 5: Mechanismus fungování RNA interference, kdy základem je siRNA (převzato z Mocellin et al., 2004) 15
Obrázek 6: Porovnání nanodiamantů s biologickými a nebiologickými útvary (převzato z Využití nanotechnologií při přípravě nutraceutik a funkčních potravin, 2011). 17
Obrázek 7: Obrázek vlevo zobrazuje chybu v krystalové mřížce nanodiamtů zobrazující tzv. N-V centrum, vpravo vidíme křivku fluorescenčního světla u nanodiamantů osvícených laserem o vlnové délce 559 nm (vlevo: převzato z Mizuochi,2012; vpravo: převzato z Šlegerová, 2014). 18
Obrázek 8: Zobrazení jednotlivých fází buněčného cyklu dělící se buňky s fluorescenčními nanodiamanty (zelené signály ve spodním řádku), vrchní řádek zobrazuje dělící se buňky bez aplikace nanodiamantů (převzato z Liu, 2009). 19
Obrázek 9: Schéma principu elektrostatického zvlákňování využívaného pro výrobu nanovláken (převzato z Elektrostatické zvlákňování, 2015). 20
Obrázek 10: Fotka PVA nanovláken pořízena skenovacím elektronovým mikroskopem (SEM) (převzato z Elektrostatické zvlákňování, 2015). 20
Obrázek 11: Zobrazení jednotlivých fází hojení ran u zdravého jedince (převzato z Mellot et al., 2016). 22
Obrázek 12: Zobrazení porovnání procesu hojení akutní (vlevo) a chronické rány (vpravo) (převzato z Macewan et al., 2017). 23
Obrázek 13: Zobrazení separace fází (protein, DNA, RNA) pomocí TRIzolu (převzato z Guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction,2020). 25
Obrázek 14: Schéma nastavení vrstev membrány, gelu a filtračního papíru při sandwichové metodě elektroforézy (převzato z Western Blot Wet Transfer, 2022). 26
Obrázek 15: Hladiny glukózy v krvi diabetických myších modelů (autor) 28
Obrázek 16: Kalibrační křivka známé koncentrace BSA naměřené na spektrofotometru (autor). 29
Obrázek 17: Kontrolní protein GAPDH zobrazený na membráně (autor). 30
Obrázek 18: Sledovaný protein MMP-9 zobrazený na membráně (autor). 30

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Hodnoty koncentrací BSA pro vytvoření kalibrační křivky. 29
Tabulka 2: Koncentrace proteinů a objem použitý v následné analýze. 29
Tabulka 3: Rozložení vzorků na membráně. 31