

Nanomateriály z chitosanu s klostridiální kolagenázou pro regenerativní medicínu

Marcela Slováková¹, Veronika Kratochvilová¹, Jiří Palarčík², Radovan Metelka³, Petra Dvořáková¹,
Zuzana Bílková¹ a Marcela Munzarová⁴

¹Katedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice,
Studentská 573, 532 10 Pardubice

² Ústav environmentálního a chemického inženýrství, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita
Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice

³Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 573,
532 10 Pardubice

⁴Nanovia s.r.o., Podkrušnohorská 271, 436 03 Litvínov - Chudeřín

Abstract

The purpose of the paper is to describe the production and characterization of chitosan nanoparticles and electrospun chitosan nanofibers as carriers for microbial collagenase. These proteolytic highly active and stable carriers have potential of advanced bioactive wound dressings. The morphology and the microstructure of nanofibers and nanoparticles were examined using a scanning electron microscopy and dynamic light scattering. Low molecular weight chitosan/TPP nanoparticles prepared ratio 2:1 showed size range 130 – 142 nm. Specific collagenase activity 0.545×10^{-3} U/ mg for chitosan nanofibers and 0.684×10^{-3} U/mg of nanoparticles was quantified using the hydrolysis of a peptidic substrate (Pz-peptide) and is expressed per mass of chitosan biomaterial. Storage stability and reusability collagenase chitosan nanofibers and collagenase chitosan nanoparticles did not fall under 73% of original activity.

Souhrn

Účelem této práce je příprava a charakterizace nanočástic z chitosanu, které sloužily jako nosič mikrobiální kolagenázy (EC 3.4.24.3) a jejich srovnání s chitosanovými nanovláknými s kolagenázou. Proteolyticky vysoce aktivní a stabilní nosiče mají potenciál pro pokročilé kryty ran. Morfologie a mikrostruktura nanočástic a nanovláken byly sledovány pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu. Hydrodynamická velikost připravených nanočástic byla sledována měřením dynamického rozptylu světla s použitím nízkomolekulárního chitosanu a TPP v poměru 2: 1 byla v rozsahu 130 - 142 nm. Pro kvantifikaci specifické aktivity kolagenázy imobilizované na obou biomateriálech byla použita metoda hydrolyzy peptidového substrátu (Pz-peptidu) a hodnoty byly $0,545 \times 10^{-3}$ U/mg nanovláken a $0,684 \times 10^{-3}$ U/mg nanočástic. Stabilita při skladování a operační stabilita kolagenázy na chitosanových nanovláknkách a chitosan/TPP nanočásticích neklesla pod 73% původní aktivity.

1. Úvod

Chitosan (CS) je universální přírodní biomateriál odvozený od chitinu [poly(β -1, 4-N-acetyl-D-glukosa-2-amin)]. Jedná se o polymer s dlouhým řetězcem vznikající deacetylací chitinu, jež je jedním z nejhojnějších přírodních polysacharidů nacházející se v buněčné stěně mikroorganismů, jako jsou kvasinky či jiné houby, dále v exoskeletech korýšů a hmyzu, a v dalších několika specializovaných orgánech, jako jsou zobáky u hlavonožců. Může ovšem poskytovat polymery s odlišnými vlastnostmi, což je podstatné pro charakterizaci chitosanových vzorků (jde o molekulovou hmotnost a stupeň deacetylce) [1-6].

Nanočástice z CS jsou tvořeny procesem založeným na komplexaci opačně nabitě molekuly elektrostatickými interakcemi [7]. Nanočástice jsou snadno konstruovány s využitím ionotropního gelovatění chitosanu (polykationtu) s tripolyfosfátem (aniontem) [8, 9]. Nízkomolekulární chitosan je vhodný především díky své větší rozpustnosti v neutrálních vodných rozpouštědél s nízkou viskozitou a rychlé degradaci, než chitosan s vyšší molekulovou hmotností [2, 10].

Nanovláknenná forma CS přináší další užité vlastnosti, jako je obrovský měrný povrch a vysoká porozita, které vedou k dobré propustnosti pro kyslík a vodu [11, 12]. Tyto vlastnosti podporují buněčné dýchání, regeneraci pokožky, zadržování vlhkosti, odstranění výměšků a hemostázy [13].

Nanovláknenná vrstva je vyrobena např. pomocí elektrostatického zvlákňování (elektrospinningu). V tomto dobře zavedeném procesu vytváří vlákna s rozměry stovek nanometrů v průměru 3rozměrnou vrstvu [14]. Příkladem vhodného dávkovacího systému je kolagenáza uloženy uvnitř elektrostaticky poly (ethylenoxid) nanovláken uvolňuje aktivní molekuly během hydratace [15]. Kolagenázy se používají pro široké spektrum biotechnologických aplikací; jsou vhodné pro izolaci širokého spektra buněčných typů, zejména fibroblastů, lidské a hlodavců hepatocytů, žabích oocytů a epiteliálních buněk [16]. Klostridiální kolagenázy jsou schopné degradovat různé typy kolagenu a želatiny, což je podstatou enzymatického vyčištění rány, často používané technika pro odstranění nekrotické tkáně z rány. Mikrobiální kolagenáza je v současnosti používána jako účinná látka ve formě masti (Irujol® Mono mast), ve všech případech bezpečné a efektivní volby pro debridement kožních vředů a popálenin [17 - 19].

Tato práce popisuje výrobu a charakterizaci chitosanových nanovláken připravených elektrospinningem a nanočástic z chitosanu jako nosičů pro mikrobiální kolagenázu. Kovalentní vazba, použitá v této práci, slouží k účinné prevenci denaturace a uvolnění enzymu [20]. Imobilizace kovalentní vazbou zejména u proteáz navíc snižuje autokatalytický proces a kontroluje tak proteolýzu [21, 22]. Vazba kolagenázy z *Clostridium histolyticum* na nosiče byla provedena použitím karbodiimidové metody. U obou chitosanových nosičů byly sledovány aktivita, stabilita a opakované použití (operační stabilita) imobilizované kolagenázy. Aktivita imobilizované kolagenázy, jako základní parametr aktivní formy enzymu, byla kvantifikována hydrolýzou syntetického peptidového substrátu.

2. Experimentální část

2.1. Chemikálie a zařízení

Nanovláknna z chitosanu byly připraveny podle [23], chitosan (MW 47 kDa, deacetylace 80 %, Contipro, Dolní Dobrouč), chitosan II (MW 50-190 kDa, stupeň deacetylace >70%, Sigma Aldrich), collagenase NB 4G z *Clostridium histolyticum* (70 - 120 kDa, obsahuje class I and class II kolagenázu, PZ activity (Wünsch): ≥ 0.18 U/mg) a Pz-peptide (4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg, Mr = 776.9) (Serva Electrophoresis GmbH, Germany), tripolyfosfosfát sodný (TPP) and other pure chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.2. Příprava nanočástic z chitosanu

Roztok 2,28 mM TPP byl v malém množství přikapáván k 0,2 % roztoku chitosanu v poměrech podle tabulky 1. Směs byla následně míchána na magnetickém míchadle po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby byla provedena dialýza. 10 ml roztoku s připravenými nanočásticemi s poměry chitosanu I a TPP (1:1, 1:2, 1:3, 2:1, 2,5:1) a s poměrem chitosanu II a TPP (2:1 a 2,5:1) byly pipetovány do dialyzačních střívek. Dialýza vzorků probíhala do prostředí redestilované vody nebo do 0,1 M octanového pufru pH 5,5 16 hodin při laboratorní teplotě s mírným třepáním. Připravené

nanočástice byly skladovány při 4 °C a to v prostředí, ve kterém byly dialyzovány. Vzorky bez dialýzy byly skladovány v původních vodných roztocích po jejich smíchání.

Tab. 1. Přehled použitých poměrů reagensů k přípravě nanočástic z chitosanu.

Objemové poměry chitosan:TPP	0,2 % chitosan I nebo II [ml]	0,084 % TPP [ml]
1:1	15	15
1:2	15	30
1:3	15	45
2:1	30	15
2,5:1	37,5	15

2.3. Měření hydrodynamické velikosti částic

Vzorky v poměru chitosanu I a TPP (2:1; 1:3; 2,5:1) a dále vzorky s poměrem chitosanu II a TPP (2:1 a 2,5:1) byly odeslány ke změření hydrodynamických velikostí (DLS) připravených nanočástic. Do objemu 1,5 ml příslušného prostředí bylo do kyvety odebráno 250 µg nanočástic. Vzorky bez dialýzy byly doplněny do toho objemu 0,1 M octanovým pufrům pH 5,5. Distribuce velikosti částic byla měřena při laboratorní teplotě pomocí zeta potenciálu nanočástic a zkoumána s použitím zeta analyzátoru užívající Zetasizer (Ver. 7.03, Malvern Instruments Ltd., UK). Tato měření byla prováděna v 6ti popřípadě 12ti opakováních a s výstupem hodnot DLS byly udány směrodatné odchylky.

2.4. Lyofilizace a SEM analýza nanočástic

Vzorky nanočástic z chitosanu byly zmrazeny na - 80 °C. Lyofilizátor Scan Vac CoolSafe s komorou a vakuovou pumpou (software Scanlaf CTS006, Trigon Plus, s. r. o.) byl temperován nejméně 30 minut na - 90 °C. Vzorky byly poté vloženy do komory a vymrazovací proces za nízkého tlaku probíhal po dobu nejméně 5 hodin. Analýza skenovací elektronovou mikroskopií byla provedena s použitím zařízení TESCAN VEGA3 s detekcí primárních elektronů. Pro zvýšení jejich vodivosti byl vzorek částic potažen vrstvou zlata (0,2 nm) pomocí Balzerova prachového postřikovacího zařízení.

2.5. Imobilizace kolagenázy na biomateriály

Vzorky s nanočásticemi (1 či 2 mg nanočástic) byly centrifugovány po dobu 5 minut a 5 000 otáček za minutu. Po odstranění supernatantu byly nanočástice byly promyty 1 ml 0,01 M fosfátovým pufrům pH 7,3 a opět a poté bylo k nanočásticím v rychlém sledu přidáno 0,2 ml roztoku EDC, 0,2 ml roztoku sulfo-NHS a po rychlém promíchání 0,5 ml roztoku kolagenázy. Reakční směs byla doplněna 0,1 ml 0,01 M fosfátového pufru pH 7,3 a inkubována 16 hodin při 4 °C za mírného otáčení. Imobilizace byla provedena v dubletu vzorků. Nanočástice s imobilizovaným enzymem byly po inkubaci centrifugovány a promyty 3 x 1 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3, jednou 1 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3 s 1 M NaCl a 2 x 1 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,3.

Pro imobilizaci kolagenázy na nanovlákná byla použit postup viz výše. Zvážený vzorek nanovláken měl rozměry 1,5 x 1,5 cm.

2.6. Stanovení aktivity kolagenázy na biomateriálech

Nanovlákná či nanočástice s kolagenázou byly 3krát promyty 1 ml 30 mM Tris-HCl pH 7,0 s 0,2 M NaCl a 25 mM CaCl₂. U nanočástic byl před posledním promytím zařazeno ultrazvukování. Následně k nim bylo přidáno 1,8 ml stejného pufru a 0,2 ml zásobního roztoku Pz-peptidu III. Slepý vzorek byl tvořen 1,8 ml redestilované vody a 0,2 ml tohoto pufru. Reakční směsi byly následně inkubovány 25 minut za mírného kývání na třepačce (pro nanovlákná) anebo za mírného otáčení na rotátoru (pro

nanočástice) při teplotě 37 °C. Po inkubaci (u nanočástic následovala centrifugace vzorků) byl odtažen supernatant a k němu bylo přidáno pro zastavení reakce 0,25 ml 22 % kyseliny citronové. K této reakční směsi bylo pipetováno 2 ml ethylacetátu a intenzivně protřepáno po dobu 20 sekund. U organické fáze (1 ml) byla měřena absorbance při 320 nm v křemenné květuře na spektrofotometru Libra proti slepému vzorku.

3. Výsledky a diskuse

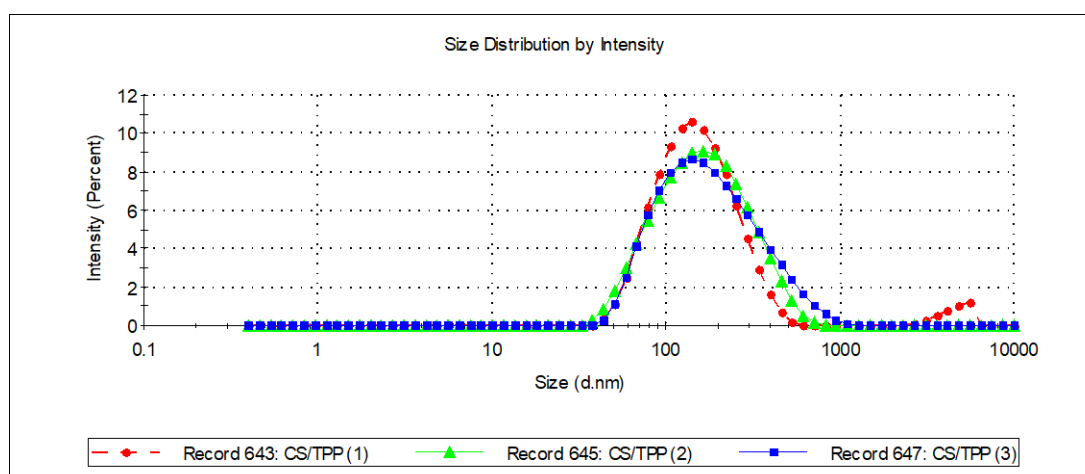
V této práci je představena strategie kovalentní biofunkcionalizace nanočástic (NP) a nanovláken z chitosanu (CS) kolagenázou z *Clostridium histolyticum*. Cílem bylo připravit vysoce aktivní a stabilní proteolyticky aktivní polymerní nanočástice s potenciálem využití jako pokročilých bioaktivních obvazových materiálů a porovnat je s bioaktivními nanovláknami.

Proces tvorby NP z chitosanu byl založen na spojení opačně nabitých molekul vlivem elektrostatických interakcí podle postupu práce [8]. Procesu ionotropního gelování se účastnil chitosan o MW 47 kDa (chitosan I) nebo 50-120 kDa (chitosan II) jako polykationt s anionty tripolyfosfátu (TPP) [2]. Pro dosažení velikostí NP okolo 100 nm, byly použity různé poměry CS k TPP. Pro zjištění velikostí připravených CS/TPP nanočástic bylo použito měření hydrodynamického rozptylu světla (DLS). Velikosti nanočástic byly porovnávány s ohledem na použitý dialyzační roztok s NP po přípravě (tab. 2, obr. 1). Největší shoda u NP čerstvě připravených (vzorek 1) a nanočástic dialyzovaných do 0,1 M acetátového pufru pH 5,5 (vzorek 2) byla u poměru CS:TPP 2:1. Pro další kroky této práce byl použit tento poměr pro přípravu NP.

Důležitým a sledovaným parametrem pro aktivní a stabilní biomateriál připravených NP byl vliv skladovacích podmínek. Případný efekt byl sledován pomocí měření DLS a velikost distribuce. NP byly skladovány v dialyzačním roztoku tj. v 0,1 M acetátovém pufru pH 5,5, při 4° C. Výsledky DLS velikosti (tab. 2) ukazují, že u vzorku 3 došlo pouze k malému zvětšení ve srovnání s NP po přípravě (vzorek 1) a po dialýze (vzorek 2). Stejný trend je možný pozorovat u distribuce velikosti (obr. 1).

Tab. 2. Výsledky měření DLS CS / TPP nanočástic s poměrem CS:TPP 2:1 (1 - 3). Podmínky - koncentrace vzorku částic 16,67%, vortexování před měřením, 25° C, 0,1 M acetátový pufr pH 5,5.

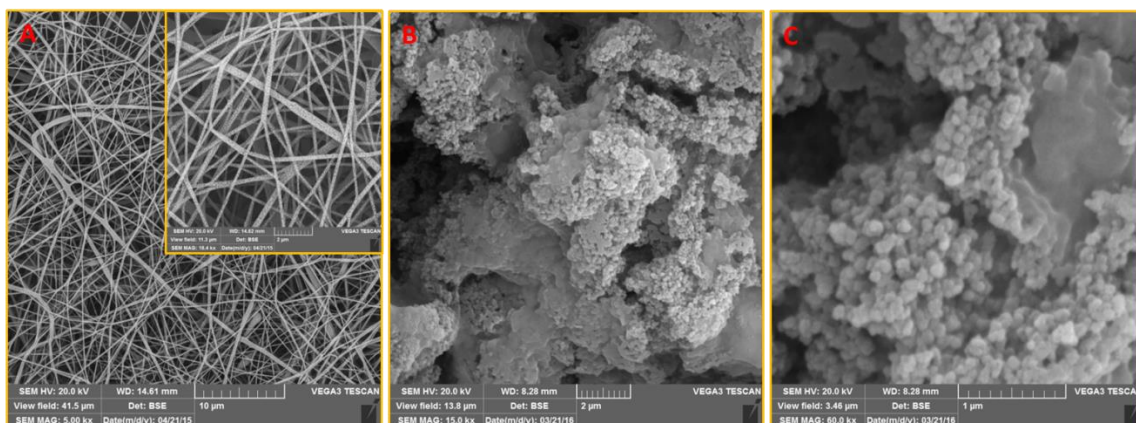
Vzorek částic	Střední velikost D_H (nm)	SD
(1) CS/TPP nanočástice, před dialýzou	132.4	1.57
(2) CS/TPP nanočástice, po dialýze	139.3	1.78
(3) CS/TPP nanočástice, po 7 týdnech skladování a dialýze	142.6	1.31



Obr. 1. Distribuce velikosti CS/TPP nanočástic (1-3). Symbol kolečko – nanočástice bez dialýzy (1), trojúhelník – nanočástice po dialýze (2), nanočástice po 7 týdnech skladování a dialýze (3)).

Nanočástice a nanovlákná byla studována morfologickou analýzou pomocí rastrovací mikroskopie na přístroji VEGA3 TESCAN instrument. Pro přípravu nanovláken byla využita beztrysková zvlákňovací technologie Nanospider™ [24], která umožňuje tvorbu vláken desítek nanometrů do desítek mikrometrů v průměru. Nanovláknenné membrány použité v této práci měly šířku nanovláken do 200 nm a hmotnost na jednotku plochy 20 g/m² (obr. 2).

Studii morfologie připravených CS/TPP nanočástic předem lyofilizovaných z destilované vody (viz obr. 2A a B), byl potvrzen částicový charakter. Nanesením lyofilizovaného vzorku na podložku a potažením tenkou vrstvou zlata bylo možné pozorovat výraznou tvorbu agregátů s porézní strukturou.



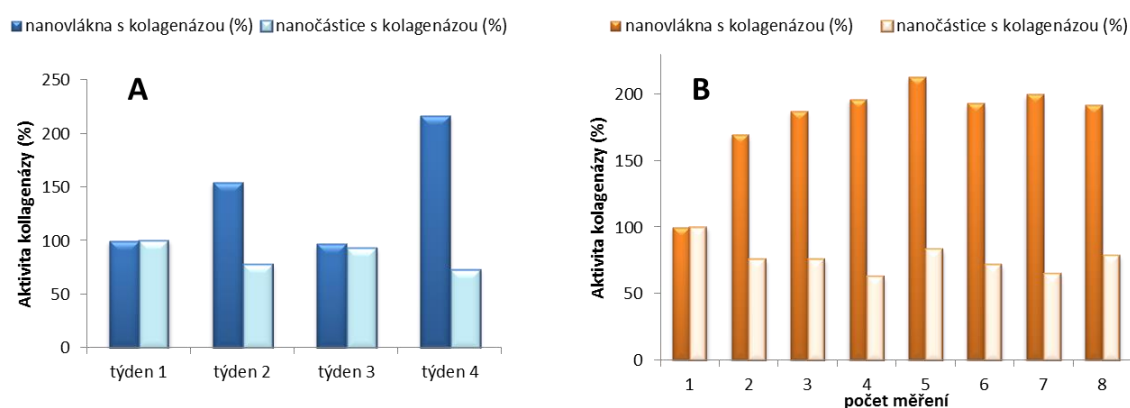
Obr. 2. Rastrovací elektronivá mikroskopie nanovláken a CS/TPP nanočástic z chitosanu. Zvětšení **A**) 5,000× a detail 18,000×, **B**) 15,000×, **C**) 60,000×. VEGA3 TESCAN instrument.

Imobilizace kolagenázy na nanočástice a nanovlákná byla provedena karbodiimidovou metodou podle [25], kdy se vytvořila amidová vazba mezi aminovou skupinou kolagenázy a karboxylovou skupinou chitosanu. Nejprve vznikal mezprodukt (O-acylisomočovina), který poté reagoval s aminovou skupinou, čímž byla vytvořena kovalentní amidová vazba. Reakce s použitím EDC/sulfo-NHS jsou obecně považovány za vysoce účinné [25]. CS nanovlákná byla nařezána na čtverce (1,5 × 1,5 cm). Před vlastní kovalentní vazbou byly odtrženy polypropylenové podložky a všechny čtverce byly zváženy. Dialyzované CS/TPP nanočástice (2 mg pevné látky) byly promyty, ultrazvukovány po dobu 10 minut a po odstranění supernatantu byla provedena imobilizace kolagenázy. Metoda stanovení aktivity kolagenázy byla upravena podle C. H. Evanse a E. Wünsche a H. G. Heidricha [26, 27]. Principem stanovení aktivity imobilizované kolagenázy bylo štěpení nízkomolekulárního substrátu Pz-peptidu (4-fenylazobenzoyloxycarbonyl-L-prolyl-L-leucyl-glycyl-L-prolyl-D-arginin) za vzniku žlutého produktu (4-fenylazobenzoyloxykarbonyl-L-prolyl-Leucin), který byl určen ke spektrofotometrickému měření po jeho extrakci do ethylacetátu. Specifická aktivita enzymu imobilizovaného na biomateriálech byla odečtena pomocí kalibrační závislosti, a je vyjádřena v jednotkách na hmotnost CS biomateriálu (Tab. 3). Výsledné hodnoty pro kolagenázu imobilizovanou na nanovláknách jsou nižší o 20,3% ve srovnání s kolagenázovou aktivitou na nanočásticích. Vysvětlením tohoto rozdílu je odlišná forma chitosanu, velikost specifického povrchu.

Tab. 3. Aktivita kolagenázy imobilizované na CS nanočástice a nanovlákná.

Vzorek	Specifická enzymová aktivita (U/mg vzorku)
--------	--

CS/TPP nanočástice s kolagenázou	0.684×10^{-3}
CS nanovlákná s kolagenázou	0.545×10^{-3}



Obr. 3. Stabilita nanočástic a nanovláken s kolagenázou. A. Skladovací stabilita. B. Opakované použití

Skladovací stabilita a opakované použití patří k výhodám imobilizovaných enzymů. Jejich hodnoty ukazují na kvalitu vybrané imobilizační metody, pevnosti vazby enzymu k nosiči a použitých podmínek. Pro sledování dlouhodobého skladování byly nanočástice a nanovlákná s kolagenázou po imobilizaci uskladněny při 4°C v optimálním vodném prostředí 30 mM Tris-HCl pufru pH 7.0 s 0.2 M NaCl a 5 mM CaCl₂ a byly sledovány vždy po týdnu po celkovou dobu 4 týdnů. Poté byla stanovena specifická enzymová aktivita u každého vzorku v dubletu a výsledky jsou uvedeny na obr. 3A. Výsledky specifické enzymové aktivity pro nanovlákná s kolagenázou neukázaly žádné snížení (stále na 100 %) po 4 týdnech, naopak u nanočástice s kolagenázou se aktivita snížila na 73 % původní hodnoty. Zvýšení kolagenázy CS nanovláken aktivity zaznamenané po 1 týdnu skladování je běžně pozorován jev způsobený obnovou funkční konformace enzymu [28]. Výsledky těchto experimentů opakovaně potvrdily vysokou proteolytickou aktivitu CS nanovláken a CS/TPP nanočástic s kolagenázou.

Opakované použití CS nanovláken a CS/TPP nanočástice s kolagenázou byly v průběhu jednoho dne měřeny 8 × za sebou. Specifická aktivita CS/TPP nanočástic s kolagenázou po posledním běhu neklesla pod 78% své původní hodnoty. Tyto výsledky ukazují na schopnost imobilizované kolagenázy opakovaně štěpit cílovou substrát bez podstatné ztráty aktivity. Z výsledků nanovláken s kolagenázou na obr. 3B jsou patrné vynikající výsledky aktivit, které neklesly pod 100%.

4. Závěr

V této práci byly biokompatibilní chitosan/TPP nanočástice a chitosanová nanovlákná kovalentně funkcionalizována kolagenázou z *Clostridium histolyticum*. Srovnáním byla zjištěna vyšší aktivita imobilizované kolagenázy na nově připravené nanočástice z chitosanu/TPP ($0,684 \times 10^{-3}$ U/mg) a nižší aktivita imobilizované kolagenázy u nanovláken ($0,545 \times 10^{-3}$ U/mg). Vynikající stabilita a možnost opětovného použití imobilizované kolagenázy na nosičích z chitosanu potvrzují vysoký potenciál použití enzymu v debridementu pro hojení povrchových ran.

Poděkování

Práce byla financována z prostředků SGS_2016_004.

Literatura

1. Krajewska B.: Enzyme Microb. Technol. 35, 126-139, 2004
2. Biswas S., Chattopadhyay M., et al.: Carbohydrate Polymers 121, 403 – 410, 2015
3. Xie, Z., Paras, C. B., et al.: Acta Biomaterialia 9(12), 9351 – 9359, 2013
4. Alessandro N., Noha M. Z., et al.: Pharmaceutical Research 26(8), 1918 – 1930, 2009
5. Shao T., Li X., et al.: Diagnostic Pathology 6(64), 1 – 5, 2011
6. Jain A., Jain S. K.: European Journal of Pharmaceutical Sciences 35(5), 404 – 416, 2008.
7. Csaba N, Koeping-Hoeggard M, Jose Alonso M.: Int J Pharm 382, 205-214, 2009
8. Calvo P, RemunanLopez C, VilaJato J, Alonso M.: Pharm Res 14, 1431-1436, 1997
9. Nasti A., Zaki N.M., de Leonardis P., et al.: Pharm Res 26, 1918-1930, 2009
10. Kumar, P. T. S., Raj, M., et al.: Tissue Engineering: Part A 19(3-4), 380 – 392, 2013
11. Ding H. Deng Y., Du X., Shi Q. Wang: Nanoscale. 6, 9477-9493, 2014
12. Kubinova S., Sykova E.: Minim. Invasive Ther. Allied Technol. 19, 144-156, 2010
13. Rieger KA, Birch NP, Schiffman JD.: Journal of Materials Chemistry B 1, 4531-4541., 2013
14. Qu F., Pintauro M.P., Haughan J.E., Henning E.A., et al.: Biomaterials 39, 85-94, 2015
15. Qu F., Lin J.G., Esterhai J.L., Fisher M.B., Mauck R.L.: Acta Biomaterialia 5(9), 6393-402, 2013
16. Eckhard U., Schoenauer E., Ducka P., Briza P., et al.: Biological Chemistry 390(1), 11-18, 2009
17. Payne W. G., Salas R. E., et al.: EPlasty 8, 151-156, 2008
18. Ramundo J., Gray M.: Journal of Wound, Ostomy & Continence Nursing 36(6S), S4–S11, 2009
19. Tallis, A., Motley, T. A., Wunderlich, R. P., Dickerson Jr., J. E., Waycaster, C., Slade, H. B., Collagenase Diabetic Foot Ulcer Study Group: Clinical Therapeutics 35(11), 1805-1820, 2013
20. Mozhaev, V. V.; Melik-Nubarov, N. S.; Sergeeva, M. V.; Šikšnis, V.; Martinek, K.: Biocatalysis and Biotransformation 3(3), 179–187, 1990
21. Mukhopadhyay A., Chakrabarti K.: RSC Advances 5, 89346-89362, 2015
22. Li D., Teoh W.Y., Gooding J.J., Selomulya C., Amal R.: Advanced Functional Materials 20, 1767-1777, 2010
23. Srbová J., Slováková M., Křípalová Z., Žárská M., Špačková M., Stránská D. a Bílková Z.: Reactive and Functional Polymers Accepted in Mai, 2016.
24. Jirsak O., Sanetnik F., Lukas L., Kotek K., Martinova L., Chaloupek J.: U.S. patent (2005) WO 205024101
25. Hermanson G.T.: Bioconjugate Techniques, third ed., Academic Press, Boston, 2013
26. Evans C. H. Interactions of tervalent lanthanide ions with bacterial collagenase (clostridiopeptidase A). *The Biochemical Society*. 1981, č. 195, s. 677 – 684.
27. Wünsch E. A., Heinrich H.G.: Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie. 333, 149-51, 1963
28. Ye P., Xu Z., Wu J., Innocent C., Seta P.: Macromolecules 39, 1041–1045, 2006