



**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

**PROGRAMOVĚ ŘÍZENÁ LYOFILIZACE K PŘÍPRAVĚ  
NOSIČOVÉHO SYSTÉMU NATIVNÍHO HYALURONANU  
A HYDROFOBNÍCH MOLEKUL**

PROGRAM-CONTROLLED FREEZE DRYING FOR THE PREPARATION OF THE DELIVERY SYSTEM  
OF NATIVE HYALURONAN AND HYDROPHOBIC MOLECULES

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

Bc. Kristína Waczulíková

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.

BRNO 2022

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1668/2021 Akademický rok: 2021/22  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Bc. Kristína Waczulíková**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Programově řízená lyofilizace k přípravě nosičového systému nativního hyaluronanu a hydrofobních molekul

### Zadání diplomové práce:

Cílem této diplomové práce je připravit systém na bázi nativního hyaluronanu, jako vhodného nosiče pro léčiva využívající hydrofobních interakcí mezi tímto biopolymerem a modelové sloučeniny (fluorescenční sondy).

Nejprve bude studentkou provedena podrobná a aktuální literární rešerše na zadané téma. Následně pro přesné nastavení podmínek lyofilizace bude zhotoven fázový diagram systému hyaluronan–terc. butyl alkohol.

Dále budou připraveny vzorky s obsahem vybraných fluorescenčních sond, které budou podrobeny sušení mrazem.

Interakce sondy s polysacharidem budou studovány pomocí fluorescenční spektrometrie.

### Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

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

-----  
Bc. Kristína Waczulíková  
Studentka

-----  
Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
Vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

-----  
prof. Ing. Michal Veselý, CSc.  
Děkan

## **ABSTRAKT**

Amfifilný charakter biopolyméru hyalurónanu napomáha interakciám medzi jeho hydrofóbnymi časťami reťazca a hydrofóbnymi ligandmi, čo ho radí medzi zlúčeniny vhodné ako nosiče pre dopravu liečiv. Cieľom tejto diplomovej práce bolo preto pripraviť pomocou programovo riadeného sušenia mrazom systém na báze natívneho hyalurónanu, ktorý by bol schopný transportovať hydrofóbné liečivá. Pre simuláciu hydrofóbných interakcií medzi liečivom a hyalurónanom boli ako modelové zlúčeniny použité fluorescenčné sondy perylén, pyrén, prodan a 1,6-difenyyl-1,3,5-hexatrién. Účinnosť sušenia mrazom bola študovaná pomocou infračervenej spektrometrie a skenovacieho elektrónového mikroskopu. ATR-FTIR spektrometria potvrdila pre modelové zlúčeniny (okrem pyrénu) hydrofóbné interakcie medzi molekulami sondy a hyalurónanu na základe prítomnosti absorpčného pásu valenčnej vibrácie C=C väzby v aromatických kruhoch sond. Z IČ spektier nebolo možné s určitosťou potvrdiť prítomnosť zvyškového terc-butylalkoholu vo vzorkách. SEM fotografie odhalili, že zvyšovanie tlaku v procese sušenia v druhej sérii vzoriek malo pozitívny vplyv na kvalitu lyofilizovanej vzorky. Interakcie jednotlivých fluorescenčných sond s hyalurónanom boli študované pomocou ustálenej a časovo rozlíšenej fluorescenčnej spektrometrie. Týmito metódami boli získané pozitívne výsledky, ktoré svedčia o prítomnosti interakcie fluorescenčných sond s hydrofóbnymi oblasťami reťazcov hyalurónanu. Výsledky tejto práce môžu prispieť k vývoju nosičových systémov v oblasti cieľenej distribúcie liečiv.

## **ABSTARCT**

The amphiphilic nature of the hyaluronan biopolymer facilitates interactions between its hydrophobic portions of the chain and the hydrophobic ligands, making it one of the promising compounds that can be used as a suitable carrier for drug delivery. Therefore, the aim of this diploma work was by means of a program-controlled freeze-drying to prepare a system based on native hyaluronan, which would be capable of transporting hydrophobic drugs. Perylene, pyrene, prodan and 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene fluorescence probes were used as model compounds to simulate hydrophobic drug-hyaluronan interactions. Freeze-drying efficiency was studied using infrared spectrometry and scanning electron microscopy. ATR-FTIR spectrometry confirmed for all probes but pyrene the hydrophobic interactions between the hyaluronan and probe molecules based on the presence of the C=C bond valence vibration absorption band in the aromatic probe rings. From the IR spectra, it was not possible to confirm with certainty the presence of residual tert-butyl alcohol in the samples. SEM photographs revealed that increasing the pressure during drying process had a positive effect on the quality of the lyophilized sample in the second series of samples. Interactions of individual fluorescent probes with hyaluronan were studied using steady-state and time-resolved fluorescence spectrometry. Positive results have been obtained, indicating the presence of fluorescent probes interacting with the hydrophobic regions of the hyaluronan chains. The results of this work can contribute to the development of carrier systems in the field of targeted drug distribution.

## **KLÚČOVÉ SLOVÁ**

natívny hyalurónan, nosičový systém, fluorescenčná sonda, terc-butylalkohol, sušenie mrazom

## **KEYWORDS**

native hyaluronan, carrier system, fluorescence probe, tert-butyl alcohol, freeze-drying

WACZULÍKOVÁ, Kristína *Programově řízená lyofilizace k přípravě nosičového systému nativního hyaluronanu a hydrofobních molekul* [online]. Brno, 2022, 81 s. [cit. 2022-05-11]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/139184>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.

## PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že som všetky použité literárne zdroje správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....  
Kristína Waczulíková

*Veľmi rada by som na tomto mieste poďakovala vedúcemu mojej diplomovej práce Ing. Vojtěchovi Enevovi, Ph.D. za jeho čas, pomoc, trpezlivosť a poskytnutie cenných rád a pripomienok počas celého procesu. Ďalej by som chcela poďakovať Ing. Tereze Venerovej, Ph.D. a pani laborantke Leone Kubíkovej za pomoc pri meraní a spracovávaní nameraných dát. V neposlednom rade by som rada poďakovala svojim rodičom a môjmu priateľovi za usmernenie, cenné diskusie a za celkovú podporu počas celého štúdia.*

## Obsah

1	ÚVOD .....	8
2	TEORETICKÁ ČASŤ .....	10
2.1	Chemické, fyzikálne a biologické vlastnosti hyalurónanu .....	10
2.2	Interakcie z hľadiska hydrofóbnych domén na reťazci hyalurónanu .....	14
2.3	Výskyt a izolácia hyalurónanu.....	15
2.3.1	Izolácia hyalurónanu zo živočíšnych zdrojov.....	16
2.3.2	Bakteriálna produkcia hyalurónanu .....	17
2.4	Biotechnologické metódy výroby hyalurónanu.....	18
2.5	Hyalurónan a bunka.....	19
2.5.1	Receptor CD44.....	19
2.5.2	RHAMM receptor.....	20
2.5.3	LYVE-1 receptor .....	20
2.5.4	TLR-4 a TSG-6 receptory .....	21
2.6	Metabolizmus hyalurónanu v ľudskom tele .....	21
2.6.1	Syntéza hyalurónanu .....	21
2.6.2	Degradácia hyalurónanu .....	23
2.7	Mechanizmus účinku hyalurónanu v ľudskom tele.....	24
2.8	Molekulové hmotnosti hyalurónanu a ich úlohy v ľudskom tele .....	25
2.9	Využitie hyalurónanu v medicíne.....	27
2.9.1	Tkaninové inžinierstvo.....	27
2.9.2	Dermálna výplň.....	28
2.9.3	Liečba osteoartrózy .....	29
2.9.4	Hojenie rán.....	30
2.9.5	Oftalmológia .....	31
2.9.6	Nosičový systém .....	32
	<i>Dermálne podávanie liečiv .....</i>	<i>32</i>
	<i>Nazálne podávanie liečiv .....</i>	<i>32</i>
	<i>Parenterálne podávanie liečiv .....</i>	<i>33</i>
	<i>Lipozomálne podávanie liečiv.....</i>	<i>33</i>
2.10	Súčasný stav riešenej problematiky.....	33
3	CIEĽ PRÁCE.....	37
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....	38

4.1	Použité chemikálie.....	38
4.2	Použité prístroje, programy a pomôcky.....	39
4.3	Postup prípravy vzoriek.....	39
4.3.1	Príprava vzoriek pre diferenčnú skenovacíu kalorimetriu.....	39
4.3.2	Príprava vzoriek pre proces sušenia mrazom.....	40
	<i>Prvá séria vzoriek</i> .....	41
	<i>Druhá séria vzoriek</i> .....	41
4.3.3	Príprava vzoriek na analýzu lyofilizačného koláča .....	42
4.3.4	Príprava vzoriek pre fluorescenčný spektrometer.....	42
	<i>Úprava vzoriek prvej série</i> .....	42
	<i>Úprava vzoriek druhej série</i> .....	42
4.3.5	Príprava vzoriek na časovo rozlíšený fluorescenčný spektrometer .....	43
4.4	Postup merania.....	43
4.4.1	Proces merania na diferenčnom skenovacom kalorimetri .....	43
4.4.2	Proces sušenia mrazom .....	44
	<i>Proces sušenia mrazom pre vzorky prvej série</i> .....	44
	<i>Proces sušenia mrazom pre vzorky druhej série</i> .....	45
4.4.3	Meranie vzoriek na ATR-FTIR spektrometri .....	45
4.4.4	Meranie vzoriek na skenovacom elektrónovom mikroskope .....	46
4.4.5	Meranie vzoriek na fluorescenčnom spektrometri v ustálenom stave.....	47
	<i>Meranie prvej série vzoriek</i> .....	47
	<i>Meranie druhej série vzoriek</i> .....	48
4.4.6	Meranie vzoriek na časovo rozlíšenom fluorescenčnom spektrometri.....	48
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	51
5.1	Výsledky terc-butylalkoholu z diferenčnej skenovacej kalorimetrie .....	51
5.2	Proces sušenia mrazom.....	52
5.2.1	Výsledky procesu sušenia mrazom prvej série vzoriek .....	52
5.2.2	Výsledky procesu sušenia mrazom druhej série vzoriek .....	53
5.3	Analýza lyofilizačných koláčov .....	54
5.3.1	ATR-FTIR spektrometria.....	54
5.3.2	Skenovací elektrónový mikroskop.....	59
5.4	Ustálená fluorescenčná spektrometria .....	60
5.4.1	Vzorky s fluorescenčnou sondou pyrén.....	61

5.4.2	Vzorky s fluorescenčnou sondou prodan.....	62
5.4.3	Vzorky s fluorescenčnou sondou DPH.....	63
5.4.4	Vzorky s fluorescenčnou sondou perylén.....	64
5.5	Časovo rozlíšená fluorescenčná spektrometria.....	65
5.5.1	Doby života sondy pyrén vo vzorkách.....	65
5.5.2	Doby života sondy perylénu vo vzorkách.....	66
5.5.3	Doby života sondy prodanu vo vzorkách.....	68
5.5.4	Doby života sondy DPH vo vzorkách.....	69
6	ZÁVER.....	70
7	ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV.....	72
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV.....	79
8.1	Zoznam skratiek.....	79
8.2	Zoznam symbolov.....	80
9	PRÍLOHY.....	81

# 1 ÚVOD

V roku 1934 bola nemeckým biochemikom Karlom Meyerom a jeho kolegom Johnom Palmerom objavená nová chemická látka, hyalurónan, ktorá bola a stále je v mnohých smeroch predmetom dôkladného skúmania a možnej aplikácie v medicíne a vo farmácii. Prekvapovala svojimi fyzikálnymi a chemickými vlastnosťami, rozsiahlym výskytom a neuveriteľným významom v ľudskom tele. Meyer a Palmer opísali postup izolácie nového glykozaminoglykánu zo sklovca očí hovädzieho dobytká. Extrahovali hyalurónan z očného sklovca tura za pomoci vody a acetónu. Zistili, že táto neznáma látka obsahuje kyselinu urónovú a aminocukor. Pri rozhodovaní, ako pomenujú túto novo objavenú zlúčeninu, jednoducho spojili názvy hyaloid (kanál sklovca) a kyselinu urónovú a vznikol svetovo známy pojem, kyselina hyalurónová, alebo hyalurónan, čo odráža skutočnosť, že táto látka existuje v *in vivo* ako polyanión a nie vo forme protónovej kyseliny. Táto udalosť znamenala objav jedného z najuniverzálnejších a najfascinujúcejších polysacharidov v prírode [1]–[4].

O izoláciu hyalurónanu z rôznych zdrojov sa snažili aj ďalší vedci. Ešte v tom istom roku (1934) sa podarilo izolovať hyalurónan z pupočnej šnúry novorodencov pomocou extrakcie vodou a chloroformom. V roku 1936 ho izolovali z očného sklovca ošipaných a z hovädzej krvi. Vedec Kendall v roku 1937 uskutočnil prvú extrakciu hyalurónanu z hemolytických streptokokov skupiny A a B. Až v roku 1949 sa podarilo vedcovi Boasovi izolovať hyalurónan z kohútích hrebienkov, ktoré patria medzi najväčšie živočíšne zdroje hyalurónanu. Do dnešnej doby boli popísané rôzne metódy izolácie hyalurónanu využívajúce rôzne druhy extrakcie, enzymatickej hydrolýzy, frakcií, a pod. [2], [4], [5].

Trvalo skoro ďalších 20 rokov, kým Meyerovo laboratórium konečne dokončilo prácu, ktorá určila a popísala presnú chemickú štruktúru základných opakujúcich sa disacharidových jednotiek, ktoré tvoria hyalurónan. Dokázali, že kyselina urónová a aminocukor v disacharide sú kyselina D-glukurónová a N-acetyl-D-glukozamín, ktoré sú navzájom pospájané  $\beta$ -1,3 glykozidovými väzbami a tieto disacharidové jednotky sú navzájom spojené striedajúcimi sa  $\beta$ -1,4 glykozidovými väzbami [2], [6], [7].

V súčasnosti je kyselina hyalurónová dobre známa a dostupná látka. Nachádza sa napríklad vo forme sodnej soli, v niektorých nosných sprejoch ako zvlhčujúca látka a v intraartikulárnych injekciách na artrózu, kde ako liečivá látka, zlepšuje vlastnosti kĺbovej tekutiny, aktivuje obnovu kĺbovej chrupavky a má protizápalové a analgetické účinky. V kozmetickom priemysle sa kyselina hyalurónová používa ako hydratačná látka na vyhladenie vrások [8].

Hyalurónan sa široko používa aj v aplikovanej biochémií a enzymológii ako substrát na kvantitatívne stanovenie enzýmu hyaluronidázy [9].

Z biologického hľadiska tvorí hyalurónan jednu z hlavných zložiek medzibunkovej hmoty stavovcov. Je súčasťou extracelulárneho matrixu v spojivových, epitelových, nervových a v ďalších tkanivách. Vo veľkom množstve sa nachádza aj v očnom sklovci, synoviálnej tekutine, pupočnej šnúre a v koži. Produkujú ho tiež niektoré druhy baktérií, vírusov a húb [4].

Okrem mechanických funkcií plní táto látka významné funkcie v mnohých biologických procesoch a jej hladina je významne zvýšená počas embryogenézy, migrácie buniek, hojenia rán, malígnej transformácie a výmeny tkanív [1], [3], [10].

Na druhej strane sa môže zúčastňovať aj na patologických procesoch, napr. pri proliferácii nádorových buniek. Táto oblasť výskumu rakoviny skúmajúca úlohu hyalurónanu je



momentálne predmetom mnohých štúdií. Bolo dokázané, že rakovinové tkanivá sú bohaté na receptory CD44 a RHAMM, ktoré sú špecifické pre hyalurónan. Následkom vzájomnej interakcie dochádza k „obaleniu“ nádorového tkaniva týmto biopolymérom, čím sa nádor stáva pre imunitný systém „neviditeľný“ – imunitný systém, v takom prípade, nedokáže rozpoznať cudzorodé tkanivo a nepovažuje nádor za hrozbu, proti ktorej sa treba brániť [11]–[14].

Cytostatiká sú lieky proti nádorovým ochoreniam, ktoré majú ničiť nádorové tkanivo v organizme, alebo zastaviť jeho rast. Problémom cytostatík je, že pôsobia nielen na nádorové bunky, ale aj keď s menšou afinitou, aj na zdravé bunky. Kvôli tomuto problému sa výskum v súčasnosti zaoberá stratégiami liečby rakoviny pomocou cielenej distribúcie liečiv prostredníctvom vhodných nosičových systémov a práve hyalurónan sa ukazuje ako vhodný nosič cytotoxických látok. Pri využití nosiča sú liečivé látky dopravené k miestu pôsobenia (v tomto prípade k nádoru) bez toho, aby cestou zasiahli zdravé bunky, čo minimalizuje vedľajšie účinky. Nádorové bunky interagujú s hyalurónanom z okolitého bunkového prostredia, čím sa uvoľňujú liečivé látky, ktoré následne indukujú smrť bunky [15]–[19].

Väčšina liečiv má hydrofóbny charakter. Hyalurónan je naopak silno hydrofilný biopolymér. Aby bolo možné naviazať liečivé látky na hyalurónan, je potrebné buď vytvoriť konjugát hyalurónan-liečivo, alebo hydrofobizovať hyalurónan pomocnou zložkou, ako napríklad nanočasticami, lipozómami, hydrogélmi a pod. Hydrofóbne modifikovaný hyalurónan potom môže vytvárať polymérne micely vo vodnom prostredí, ktoré sú schopné solubilizovať hydrofóbne látky. Oba prístupy sú založené na chemických reakciách hyalurónanu v organickom rozpúšťadle [20]–[23].

Tento poznatok bol inšpiráciou pre zadanie tejto diplomovej práce. Hyalurónan má vďaka svojim fyzikálnym a chemickým vlastnostiam významný potenciál prispieť k vývoju hyalurónových cieľových nosičových systémov bez nutnosti ich chemických modifikácií, či prídavku pomocných látok, čo znižuje pravdepodobnosť nežiaducich účinkov onkologickej liečby.

Doposiaľ sú využívané k cieľovej distribúcií liečivých látok viaceré typy nosičových systémov, ako sú napríklad lipozómy, lipidové nanočastice, konjugáty, polymérne micely alebo hydrogély. Táto práca mala za cieľ overiť, či hyalurónan, ako hydrofilná látka, dokáže vytvoriť hydrofóbne interakcie s hydrofóbnymi ligandmi a stať sa tak vhodným nosičovým systémom na ich distribúciu. Fyzikálno-chemické vlastnosti týchto systémov sú skúmané pomocou metód fluorescenčnej spektroskopie, infračervenej spektroskopie a elektrónovej mikroskopie. V našej práci sme pre modelovanie hydrofóbných interakcií farmakologicky liečivých látok s hyalurónanom použili fluorescenčné sondy perylén, pyrén, 1,6-difeny-1,3,5-hexatrién (DPH) a N,N-dimetyl-6-propionyl-2-naftylamín (prodan), ktoré sú, vďaka svojej štruktúre, schopné v rámci tohto systému uprednostňovať vznik hydrofóbných interakcií medzi vybranými hydrofóbnymi zlúčeninami a celkovo hydrofilným biopolymérom hyalurónanu.

Širším cieľom tejto práce je prispieť k vývoju biokompatibilných a biologicky odbúrateľných nosičových systémov pre hydrofóbne lieky s cieleňou distribúciou aktívnej látky na báze natívneho, chemicky nemodifikovaného hyalurónanu v medicíne.

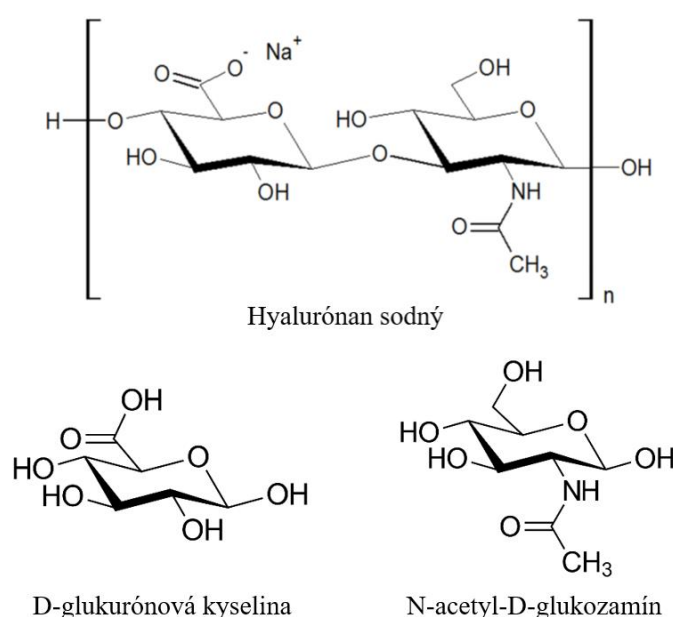
## 2 TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1 Chemické, fyzikálne a biologické vlastnosti hyalurónanu

V živých organizmoch (okrem rastlín) sa kyselina hyalurónová vyskytuje prevažne vo forme sodnej alebo draselnej soli a práve preto sa častejšie používa názov hyalurónan [24].

Hyalurónan (HYA) [sumárny vzorec  $(C_{14}H_{21}NO_{11})_n$ ] je biopolymér patriaci medzi látky, ktoré sa prirodzene vyskytujú u rôznych druhov organizmov, od mikroorganizmov až po stavovce [10], [25], [26].

Hyalurónan je vysokomolekulárny lineárny biopolysacharid patriaci do skupiny glykozaminoglykánov, tvorený opakujúcimi sa disacharidovými jednotkami D-glukurónovou kyselinou a N-acetyl-D-glukozamínom (Obr. 1). Tieto disacharidové jednotky sú navzájom striedavo pospájané  $\beta$ -1,3 a  $\beta$ -1,4 glykozidovými väzbami [25].



Obr. 1: Chemická štruktúra hyalurónanu sodného, D-glukurónovej kyseliny a N-acetyl-D-glukozamínu [27]

Hyalurónan je látka rozpustná vo vode, ale nie je rozpustná v organických rozpúšťadlách. Rozpustnosť hyalurónanu vo vode pri 25 °C je  $5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Monoizotopická molekulová hmotnosť hyalurónanu je 776,2 Da a jeho hustota sa pohybuje okolo  $1,8 \pm 0,1 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ . Jeho teplota varu za atmosférického tlaku sa rovná  $1\,274,4 \pm 65,0 \text{ °C}$  a jeho teplota vzplanutia je  $724,5 \pm 34,3 \text{ °C}$ . Index lomu hyalurónanu sa rovná 1,666 [27], [28].

Enzymy hyalurónan syntázy syntetizujú veľké a dlhé lineárne polyméry opakujúcej sa disacharidovej štruktúry hyalurónanu striedavým pridávaním kyseliny glukurónovej a N-acetyl-D-glukozamínu do rastúceho reťazca pomocou svojich aktivovaných nukleotidových sacharidov (UDP-GlcUA – uridíndifosfát-glukurónová kyselina a UDP-GlcNAc – uridíndifosfát-N-acetyl-glukozamín) ako substrátov. Počet opakujúcich sa disacharidov (n) vo finálnej molekule hyalurónanu môže dosiahnuť 10 000 a viac monomérov [2], [10], [25], [29].

Biologické účinky hyalurónanu závisia vo veľkej miere od molekulovej hmotnosti hyalurónanu. Rôzne formy vykazujú rôzne biologické aktivity, od protizápalových, imunogénnych a antioxidantných účinkov, až po regulácie procesov v bunkách po ich interakcii

s bunkovými receptormi. Hyalurónan má aj hygroskopické vlastnosti a funguje ako výborný humektant a lubrikant [2], [10], [25], [26], [29].

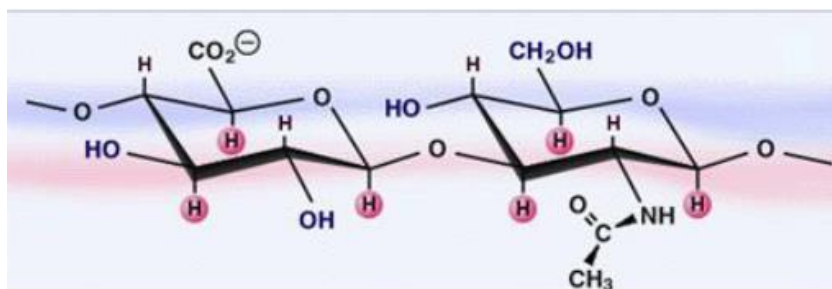
Molekulová hmotnosť hyalurónanu sa môže líšiť a je závislá na počte opakujúcich sa monomérov a na druhu organizmu. Všeobecne sa jeho molekulová hmotnosť pohybuje od menej ako 1 MDa až po viac ako 5 MDa. Napríklad, natiahnutý reťazec hyalurónanu s molekulovou hmotnosťou 6 MDa má približnú dĺžku 15  $\mu\text{m}$  a priemer okolo 0,5 nm [2], [10], [25], [29].

Je tým pádom zrejmé, že štrukturálne, fyzikálne, chemické a odbúrateľné vlastnosti hyalurónanu závisia tiež aj od jeho molekulovej hmotnosti. Napríklad, zvýšenie molekulovej hmotnosti a koncentrácie hyalurónanu v polymérnych roztokoch vedie k posilneniu tvorby 3D siete polyméru. V dôsledku toho vedie k zvýšeniu viskozity a elasticity roztoku hyalurónanu. V niektorých prípadoch, napríklad v procese elektrostatického zvlákňovania, koncentrácia a viskozita hyalurónanu sú kľúčovými parametrami zabezpečujúcimi získanie nanovlákien hyalurónanu [29].

Hyalurónan má unikátne reologické, viskoelastické vlastnosti. Roztoky soli kyseliny hyalurónovej majú veľkú viskozitu aj pri nízkych koncentráciách polyméru. Vysokomolekulárny hyalurónan vytvára veľmi viskózne gély. Viskozita roztoku hyalurónanu je dôležitá vlastnosť a zachováva si svoju relevantnosť a význam vo fyziologických a biochemických procesoch, ako aj pri vývoji terapeutických, lekárskech, bioinžinierskych, kozmetických a potravinárskych aplikácií hyalurónanu. Reologické vlastnosti roztoku hyalurónanu závisia od štruktúry biopolyméru a jeho polyelektrolytového charakteru. Roztoky hyalurónanu patria medzi tzv. neneutronovské kvapaliny s nelineárnym viskoeleastickým správaním [29], [32].

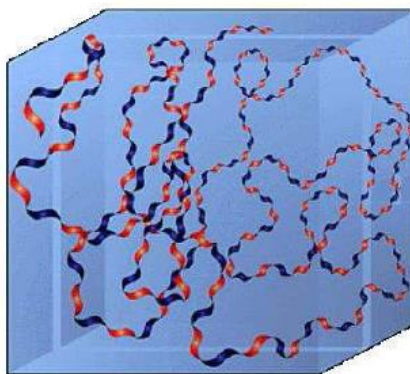
Hyalurónan je silno hygroskopická a hydrofilná látka obsahujúca veľa hydroxylových skupín, ktorá je schopná viazať veľké množstvo molekúl vody. Vo fyziologických roztokoch sa chová ako polyanión a vytvára rozšírenú 3D štruktúru náhodných závitov. Vlastnosti prostredia, kde sa hyalurónan nachádza, majú dopad na samotné chovanie a veľkosť hyalurónanu. V kyslom prostredí sa reťazce hyalurónanu s vyššou iónovou silou viacej zmršťujú ako v alkalickom prostredí, kde sú reťazce rozťahovanejšie a flexibilnejšie kvôli postupnej destabilizácii vodíkových mostíkov. Pri poklese pH prostredia pod hodnotu 4, alebo v silne alkalickom prostredí s pH viac ako 11, dochádza k hydrolytickej depolymerizácii hyalurónanu. Soli kyseliny hyalurónovej sú veľmi dobre rozpustné vo vodných roztokoch [29].

Vo fyziologickom roztoku je kostra molekuly hyalurónanu stabilizovaná vnútornými vodíkovými väzbami a vďaka slabým interakciám je hydratovaná molekulami rozpúšťadla. Existencia polárnych a nepolárnych častí v polymérnej štruktúre poskytuje hyalurónanu schopnosť chemicky interagovať s rôznymi chemickými látkami. Polárne hydrofilné časti na reťazci vznikajú zo sterických dôvodov a pomocou  $\beta$  konfigurácii glykozidovej väzby, prechodom objemových skupín do ekvatoriálnej polohy. Malé atómy vodíka v axiálnej polohe vytvárajú nepolárnu hydrofóbnu časť, zatiaľ čo atómy v ekvatoriálnej polohe vytvárajú polárnejšiu časť a celkovo je táto štruktúra s minimom voľnej energie, t.j. stabilná (Obr. 2). Pretože hyalurónan obsahuje hydrofilné aj hydrofóbne časti, má amfifilný charakter [2].



Obr. 2: Polárne (modré) a nepolárne (rúžové) časti na molekule hyalurónanu [2]

Hydrofóbne časti hyalurónanu sa vo vodnom prostredí zhlukujú, aby čo najviac zmenšili kontakt s polárnym rozpúšťadlom. Následkom hydrofóbnych interakcií, hyalurónan tvorí doménové štruktúry, do ktorých môžu prenikať molekuly iných látok (Obr. 3). Táto štruktúrna doména sa neustále pohybuje, mení svoj tvar a veľkosť priestoru potenciálneho prieniku, čím je možný prienik pre rôzne veľké molekuly. Malé molekuly (napríklad voda a elektrolyty) voľne difundujú doménou, ale veľké molekuly, ako napríklad proteíny, do doménovej štruktúry neprejdú [2].



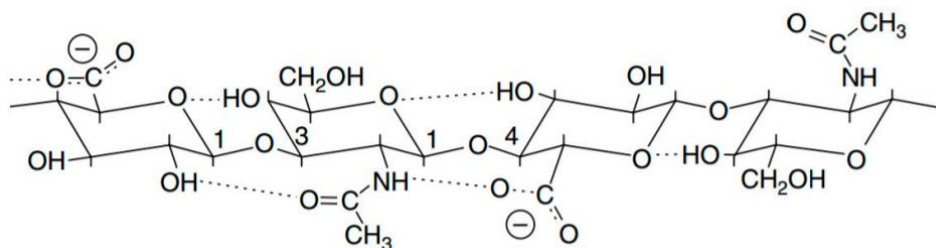
Obr. 3: Model sekundárnej štruktúry hyalurónanu v 3D doméne. Modrý box reprezentuje 3D doménu. Červené časti na závitnici predstavujú hydrofóbne oblasti a modré časti hydrofilné oblasti [2]

Hyalurónanový reťazec je stabilizovaný dvoma základnými druhmi väzieb. Sacharidové kruhy sú vytvorené kovalentnými väzbami, preto sú tvarovo pomerne fixované a stabilné. Glykozidová väzba, ktorá vzniká medzi sacharidovými jednotkami cez atóm kyslíka, je stabilizovaná vodíkovými mostíkmi. Substituenty viazané z oboch strán atómu kyslíka rotujú o 360°. Zatočená štruktúra hyalurónanu sa vzhľadom k množstvu vodíkových mostíkov môže javiť ako náhodná, ale v skutočnosti je diktovaná fyzikálno-chemickými vlastnosťami [30].

Experimenty používajúce nukleárnu magnetickú rezonanciu odhalili možnosť rotácie disacharidovej jednotky v molekule hyalurónanu o 180° vzhľadom k predchádzajúcej a nasledujúcej disacharidovej jednotke. Dve pootočená o 180°, čiže celkovo o 360°, vracajú monomér do pôvodnej polohy. Táto štruktúra sa označuje ako dvakrát zatočená závitnica (na rozdiel od dvojjávitnice, kde by boli zapojené dva molekulárne reťazce) [30].

Hyalurónan vytvára vodíkové väzby, ktoré na jednej strane stabilizujú molekuly v roztoku, aby neagregovali, a na druhej strane znižujú entropický príspevok solvatacie, čím zvyšujú rigiditu v polymérnom systéme, čo vo výsledku špecifikuje vlastnosti roztoku hyalurónanu. Na Obr. 4 sú zobrazené potenciálne vodíkové väzby, ktoré sa môžu tvoriť ako v rámci jednej makromolekuly (intramolekulárne interakcie), tak aj medzi susednými molekulami (intermolekulárne interakcie). Môžeme vidieť, že vodíkové mostíky fungujú ako prepojenia

medzi dvoma funkčnými skupinami. Vo všeobecnosti vodíkové väzby pomáhajú „zbaľovať“ primárnu štruktúru do sekundárnej a terciárnej štruktúry [29].

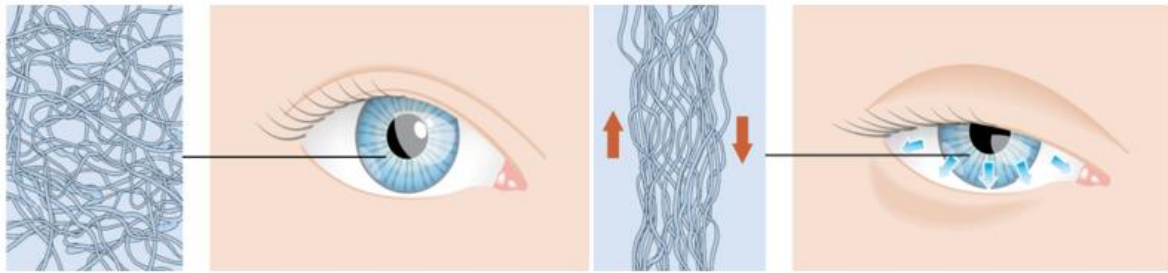


Obr. 4: Schematické znázornenie formácie vodíkových mostíkov v molekule hyalurónanu [31]

Ako už bolo zmienené, hyalurónan vytvára vo vode viskoelastický roztok. Hyalurónan s vysokou molekulovou hmotnosťou je prevažne elastický pri nízkych šmykových rýchlostiach, zatiaľ čo hyalurónan s nízkou molekulovou hmotnosťou sa správa prevažne viskóznym spôsobom. Viskozita roztoku hyalurónanu závisí od šmykovej rýchlosti a klesá so zvyšovaním šmykovej sily. Tento jav sa nazýva pseudoplasticitá. Vysoká pseudoplasticitá znamená, že viskozita rýchlo klesá so zvyšujúcou sa šmykovou rýchlosťou. Pri nízkej pseudoplasticité dôjde k pomalému poklesu viskozity so zvyšujúcou sa šmykovou rýchlosťou. Hyalurónanové roztoky patria medzi viskoelastické roztoky s najvyšším stupňom pseudoplasticity [29], [32].

Kohézne vlastnosti polyméru priamo závisia od jeho rozpustnosti v kvapalinách (organických a neorganických). Kohézne vlastnosti komplexov polyméru a ligandov na ňom naviazaných kvantitatívne súvisia s kohéznu energiou (sily pôsobiace medzi časticami tej istej látky). Štúdie zistili, že hyalurónan s vyššou molekulovou hmotnosťou má väčšie kohézne vlastnosti ako hyalurónan s nízkou molekulovou hmotnosťou. Táto závislosť je spojená so štruktúrou hyalurónanu. Stručne povedané, polymérové reťazce hyalurónanu s vysokou molekulovou hmotnosťou sa začnú navzájom zmotávať, čo vedie k vytvoreniu súdržnej trojrozmernej štruktúry. Na druhej strane, roztoky hyalurónanu s nižšou molekulovou hmotnosťou nevykazujú dobré kohézne vlastnosti [29], [32].

Vďaka výhodným fyzikálnym vlastnostiam hyalurónanu a výbornej znášanlivosti je možné roztok hyalurónanu aplikovať ako očné instiláciu pri liečbe syndrómu suchého oka (Obr. 5). Pseudoplasticitá roztoku hyalurónanu má v liečbe oka veľký význam. Za prvé, má podobné vlastnosti ako mucínová vrstva slzného filmu a za druhé, pokles viskozity roztoku hyalurónanu zabraňuje odstráneniu vrstvy hyalurónanu z povrchu oka počas procesu žmurkania. Naopak, elasticita hyalurónanu napomáha rozšírenie aplikovaného roztoku po povrchu oka počas žmurkania. Ďalej, hyalurónan vďaka hygroskopickým vlastnostiam funguje ako „špongia“ a uvoľňuje vodu do okolitého prostredia. Po odstránení tlakovej sily pomocou osmotického tlaku sa nasáva voda späť do štruktúry hyalurónanu. Tieto vlastnosti znamenajú, že odparovanie vody z roztokov hyalurónanu je pomalý proces. Roztok hyalurónanu sa dokáže dobre adherovať k mucínovej vrstve predkorneálneho slzného filmu. Výsledkom je, že hyalurónan kryje rohovku a vytvára efektívny dlhotrvajúci ochranný povlak oka, ktorý sa pomaly odparuje. Ochranná schopnosť hyalurónanu je závislá na rovnováhe medzi molekulovou hmotnosťou a koncentráciou hyalurónanu v roztoku [29], [32], [33].



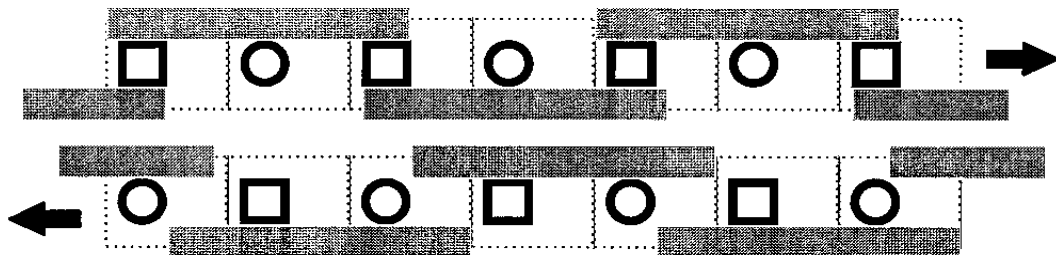
Obr. 5: Usporiadanie štruktúrnych reťazcov HYA počas procesu žmurkania. Ľavý obrázok predstavuje relaxačnú polohu oka (nežmurkanie), kde reťazce HYA vytvárajú náhodnú závitnicovú štruktúru a majú elastické vlastnosti. Pravý obrázok predstavuje oko v pohybe žmurkania, kde šmyková rýchlosť rastie, reťazce HYA vytvárajú usporiadanejšiu štruktúru a viskozita HYA klesá, čo umožňuje ľahší pohyb viečok po oku [33]

## 2.2 Interakcie z hľadiska hydrofóbných domén na reťazci hyalurónanu

Ako už bolo spomenuté, monoméry hyalurónanu sú spojené striedajúcimi sa väzbami  $\beta$ -1,4 a  $\beta$ -1,3, pričom každý monomér predstavuje striedajúce sa hydrofóbne a hydrofilné plochy s ďalším monomérom v reťazci. Sekundárna štruktúra hyalurónanu je podmienená jeho primárnou štruktúrou a vytvára dvakrát stočenú závitnicu [10].

Hydrofóbne oblasti hyalurónanu sú tvorené približne ôsmimi CH- skupinami. Bolo zistené, že reťazec hyalurónanu v roztoku vytvára dvojnásobné zložené helixy, ktoré sú následne vďaka interakciám medzi hydrofóbnymi oblasťami, tzv. „patches“, schopné tvoriť duplexy (Obr. 6). Takéto hydrofóbne interakcie sa môžu realizovať len vtedy, keď sa v sekundárnej štruktúre hyalurónanu nenachádzajú H-mostíkové interakcie. V tomto prípade ide skôr o interakcie, než o samotnú tvorbu chemických väzieb [10].

Hydrofóbne oblasti majú veľký dopad na chovanie molekuly v polárnom prostredí. Hydrofóbne molekuly sa vo vodnom prostredí orientujú k sebe, čím sa znižuje ich kontakt s rozpúšťadlom. Takéto interakcie prispievajú k stabilite molekuly a okrem toho sa uplatňujú pri agregáčnych a sieťovacích procesoch hyalurónanu. Interakcie tohto typu sa môžu uplatňovať aj pri interakciách hyalurónanu s hydrofóbnou látkou alebo lipidmi, alebo proteínmi. K rozpusteniu a sieťovaniu hyalurónanu dochádza za daných fyziologických podmienok, správnej pH a iónovej sily [10], [30]. Sieťovanie môže prebiehať aj pri nízkych koncentráciách hyalurónanu. Vysokomolekulárny hyalurónan sa dokáže v roztoku celý zosieťovať pospájaním všetkých molekúl medzi sebou a vytvoriť tak teoreticky nekonečnú sieť. Na druhej strane, nízkomolekulárny hyalurónan vytvára prerušované, od seba oddelené siete [30].



Obr. 6: Schéma možnej tvorby duplexu medzi dvoma reťazcami hyalurónanu. Dva zúčastnené hyalurónové helixy sú navzájom antiparalelné. Bodkované čiary predstavujú každú sacharidovú jednotku, kruhy predstavujú acetamidové skupiny a štvorce predstavujú karboxylové skupiny. Sivé vzorované pruhy sú hydrofóbne oblasti, ktoré sa striedavo tiahnu pozdĺž troch sacharidových jednotiek polymérnych reťazcov [10]



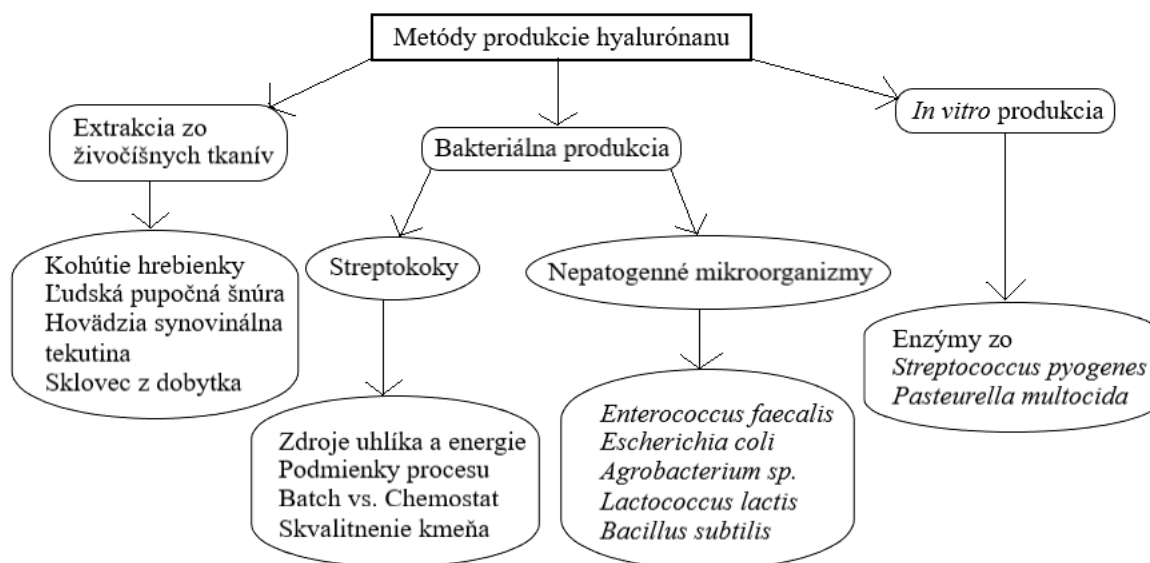
## 2.3 Výskyt a izolácia hyalurónanu

Hyalurónan sa vyskytuje prakticky vo všetkých tkanivách stavovcov. Taktiež je prítomný v kapsulách niektorých kmeňov baktérií (*Streptococcus* a *Pasteurella*), ktoré sú z veľkej časti zložené z hyalurónanu a ten plní v baktériách ochrannú funkciu. V rastlinách sa hyalurónan nevyskytuje [25].

V tkanivách stavovcov je hyalurónan hlavnou zložkou extracelulárnych matric, v ktorých sa väčšina tkanív štruktúrne odlišuje. Pomerne nedávno sa ukázalo, že hyalurónan je prítomný aj intracelulárne [25]. Najväčšie množstvo hyalurónanu v ľudskom tele (7–8 g na priemerného dospelého človeka, ~50 % z celkového množstva hyalurónanu v tele) je v kožnom tkanive, kde dermis obsahuje ~0,5 mg·g<sup>-1</sup> vlhkého tkaniva a epidermise ~0,1 mg·g<sup>-1</sup> vlhkého tkaniva. Jeden z najvyšších obsahov hyalurónanu má synoviálna kĺbová tekutina (3–4 mg·ml<sup>-1</sup>), nižší obsah majú: sklovec oka (0,1–0,4 mg·ml<sup>-1</sup> vlhkej hmotnosti), pupočná šnúra (4,1 mg·ml<sup>-1</sup>), alebo extracelulárny matrix *zona pellucida* (~0,5 mg·ml<sup>-1</sup>), čo je glykoproteínový obal vajíčka cicavcov produkovaný folikulárnymi bunkami v priebehu oogenézy, ktorý slúži k selekcii spermíí. Je zaujímavé, že kohútí hrebienok, špecializovaný kúsok kože, má najvyššie množstvo hyalurónanu (až 7,5 mg·ml<sup>-1</sup>) medzi živými organizmami [2], [25].

V iných prípadoch, hyalurónan predstavuje menšiu časť hmoty tkaniva a slúži ako základná štruktúrna zložka v matrixe. Napríklad, hyalurónan je prítomný v množstve ~1 mg·g<sup>-1</sup> vlhkej hmotnosti v hyalínových chrupavkách. Proteín agrekán (proteoglykán chondroitín sulfátu 1 v chrupavkách) je prítomný v oveľa vyššej koncentrácii 25–50 mg·g<sup>-1</sup> vlhkej hmotnosti. Hyalurónan je menej koncentrovaný v matrixe iných spojivových tkanív, ako sú napríklad tie, ktoré obklopujú bunky hladkého svalstva v aorte a fibroblasty v zamši kože. Tab. 1 zhŕňa výskyt a koncentráciu hyalurónanu v rôznych druhoch tkanív [2], [25].

Hyalurónan je produkovaný niekoľkými cestami a môže byť izolovaný z rôznych zdrojov, zhrnutie Obr. 7. Či už je to extrakciou zo živočíšnych tkanív, alebo bakteriálna produkcia, každý spôsob výroby hyalurónanu má svoje výhody aj nevýhody, ale v najväčšej miere sa využíva bakteriálna produkcia, ktorá pri použití geneticky modifikovaných organizmov poskytuje vysoký výtťažok vysokomolekulárneho hyalurónanu [34].



Obr. 7: Produkčné metódy hyalurónanu z rôznych zdrojov [34]

Tab. 1: Výskyt a koncentrácia HYA v niektorých druhoch živočíšnych tkanív a v telových tekutinách [25]

Druh tkaniva alebo telnej tekutiny	c HYA [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	Poznámka
kohútí hrebienok	7 500	živočíšne tkanivo s najvyšším obsahom HYA,
ľudská pupočná šnúra	4 100	HYA s vysokou molekulovou hmotnosťou,
ľudská synoviálna tekutina	1 400–3 600	pokles koncentrácie HYA počas zápalu a objem synoviálnej tekutiny rastie,
hovädzia nosná chrupavka	1 200	využitie modelu chrupavky v experimentálnych štúdiách,
ľudský dermis	200–500	„omladzujúca“ látka v kozmetike,
ľudský sklovce	140–340	zvyšovanie koncentrácie HYA počas rastu tkaniva sklovca,
ľudský epidermis	100	vyššia koncentrácia HYA okolo buniek, ktoré HYA syntetizujú,
zajačí mozog	65	HYA znižuje pravdepodobnosť výskytu nádoru v mozgu,
zajačie srdce	27	HYA je hlavnou zložkou patologického matrixu, ktorý sa nachádza v artérii pri koronárnej restenóze,
ľudská miazga	0,2–50	nízka molekulová hmotnosť HYA vysvetlená preferenčným príjmom väčších molekúl pečevnými endotelovými bunkami,
ľudský moč	0,1–0,3	obsahuje enzým hyaluronidázu, ktorý katalyzuje degradáciu HYA,
ľudské krvné sérum	0,01–0,1	koncentrácia HYA sa zvyšuje v sére u starších ľudí a u pacientov s reumatoidnou artritídou a cirhózou pečene.

### 2.3.1 Izolácia hyalurónanu zo živočíšnych zdrojov

Izolácia hyalurónanu zo živočíšnych zdrojov sa pôvodne používala na laboratórne výskumy s cieľom študovať tento polymér, identifikovať, charakterizovať a objasniť jeho biologický potenciál a biomedicínske využitie. Dnes sú k dispozícii dostatočné informácie o hyaluróne izolovanom z takmer všetkých tkanív stavovcov, vrátane synoviálnej tekutiny, sklovca oka, pupočnej šnúry, prasacej kože, chrupavky žralokov a perikardiálnej tekutiny králika. Najbohatšími zdrojmi hyalurónanu s vysokou molekulovou hmotnosťou sú kohútie hrebienky ( $1,2\cdot 10^6$  Da), ľudské pupočné šnúry ( $3,4\cdot 10^6$  Da), sklovce oka dobytka ( $7,7\cdot 10^4$ – $1,7\cdot 10^6$  Da) a hovädzia synoviálna tekutina ( $14\cdot 10^6$  Da) [34].

Je zrejmé, že používanie živočíšnych zdrojov na izoláciu hyalurónanu môže vyvolávať kontroverzné reakcie kvôli ochrane zvierat. Sú však aj technické limitácie. Izolácia hyalurónanu zo živočíšnych zdrojov sa potýka s problémom nedostatočnej čistoty finálnej vzorky hyalurónanu. Hlavné nečistoty, v závislosti na zdroji a purifikačných metódach, sú proteíny, nukleové kyseliny, chlorid sodný, ťažké kovy, chondroitín sulfát a bakteriálne endotoxíny [34].



Extrakcia čistého hyalurónanu s vysokou molekulovou hmotnosťou zo živočíšnych tkanív je náročná, pretože v biologických materiáloch je hyalurónan obvykle prítomný v komplexe s inými biopolymérmi, ako napríklad s proteoglykánmi. Obecný výrobný proces hyalurónanu zo živočíšnych zdrojov zahŕňa: rozrušenie štruktúr na úrovni tkaniva, rozrušenie bunkových štruktúr za použitia enzýmov a organických rozpúšťadiel, a uvoľnenie hyalurónanu z komplexu s ostatnými biopolymérmi za použitia enzýmov, detergentov a organických rozpúšťadiel [34].

Prvým krokom metódy separácie proteínov je extrakcia hyalurónanu z materiálu pomocou chloroformu, amylalkoholu, 90% fenolu a acetátu sodného. Spôsoby uvoľňovania hyalurónanu z komplexov s proteoglykánmi zahŕňajú použitie proteolytických enzýmov (t.j. papaín, pepsín, pronáza a trypsín), zrážanie iónovými párami hyalurónanu (napr. cetylpyridíniumchloridom), zrážanie organickými rozpúšťadlami, zrážanie bez rozpúšťadiel, detergenty, adsorpcia na aktívnom uhlí atď. Ultrafiltrácia a elektrodiálýza sa používajú na odstránenie degradačných produktov a iných kontaminantov. Sterilná filtrácia sa používa na odstránenie všetkých mikrobiálnych buniek pred úpravou konečného produktu. K dosiahnutiu čo najčistejšieho výťažku hyalurónanu je potrebné rozložiť komplexy proteoglykánov [34].

Ako už bolo spomenuté, napriek rozsiahlemu čisteniu môže byť zvierací hyalurónan kontaminovaný rôznymi nečistotami. Množstvo a povaha nečistôt závisí od zdroja hyalurónanu a od procesu purifikácie. Autori Shiedlin a kol. [35] v článku z roku 2004 opísali túto závislosť a ukázali, že izolanty hyalurónanu z ľudskej pupočnej šnúry a hovädzieho sklovca oka obsahovali vyššie hladiny nečistôt, ako napríklad proteíny a nukleové kyseliny, v porovnaní s izolantmi hyalurónanu z kohútieho hrebienka a s izolantmi bakteriálnych kapsúl.

Medzi nevýhody extrakcie hyalurónanu zo živočíšnych zdrojov patria okrem potreby rozsiahleho čistenia, aj rozdiely v kvalite produktu, nízky výťažok, riziko rýchlej degradácie polyméru a riziko kontaminácie proteínmi, nukleovými kyselinami a vírusmi [34].

Procesy extrakcie a čistenia sa neustále vylepšujú, aby spĺňali vysoké štandardy kvality pre biomedicínske aplikácie. Doposiaľ je živočíšny odpad stále jeden z najdôležitejších zdrojov pre priemyselnú výrobu hyalurónanu. Okrem nevýhod majú totiž metódy extrakcie hyalurónanu zo živočíšnych zdrojov aj výhody ako zabehnutosť technologického procesu, a dlhoročné skúsenosti z praxe, dostupnosť zdrojov za nízke náklady a produkcia vysokomolekulárneho a prírodného hyalurónanu [34].

Komerčne dostupné hyalurónanové prípravky zo živočíšnych zdrojov majú molekulovú hmotnosť v rozmedzí od niekoľkých stoviek tisíc až do  $2,5 \cdot 10^6$  Da [25], [34].

### 2.3.2 Bakteriálna produkcia hyalurónanu

Hyalurónan je prítomný a syntetizovaný ako extracelulárna kapsula v niektorých mikrobiálnych patogénoch, ako sú baktérie *Pasteurella multocida*, *Bacillus subtilis* a streptokoky skupiny A a C, medzi ktoré patrí *Streptococcus pyogenes* (ľudský patogén) a živočíšne patogény *Streptococcus equi* a *Streptococcus uberis*. Tieto mikroorganizmy používajú hyalurónan na zapuzdrenie svojich buniek, čím sa bránia pred rozpoznaním imunitným systémom. Hyalurónan tiež chráni baktérie pred reaktívnymi formami kyslíka uvoľnenými niektorými druhmi leukocytov, napomáha migráciu cez epitelové vrstvy a uľahčuje adhéziu a kolonizáciu bakteriálnych buniek [34].

Hyalurónan produkovaný zvieratami a baktériami je identický, ale bakteriálny hyalurónan nie je imunogénny a je tým pádom vynikajúcim zdrojom hyalurónanu vysokej kvality.

Extrakcia hyalurónanu z mikrobiálnej fermentačnej pôdy je relatívne jednoduchý proces a dosahuje vysoký výťažok. Ďalšou a dôležitou výhodou mikrobiálnej produkcie hyalurónanu oproti produkcii zo živočíšnych zdrojov je možnosť fyziologického a metabolického prispôsobenia a menenia baktérií tak, aby sa dosiahol veľký výťažok vysokomolekulárneho hyalurónanu. Preto je v súčasnosti stále viac preferovaná bakteriálna/mikrobiálna izolácia hyalurónanu s použitím patogénnych streptokokov a bezpečných rekombinantných hostiteľov obsahujúcich potrebnú hyalurónan syntázu [34].

Prvá publikovaná izolácia kyseliny hyalurónovej z hemolytických streptokokov skupiny A pri vsádzkovej fermentácii realizovaná v roku 1963 viedla k výťažku  $60\text{--}140\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-1}$  hyalurónanu, čo sa časom znásobilo na  $6\text{--}7\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-1}$ . Aby sa zvýšila produkcia hyalurónanu, sú používané techniky ako optimalizácia extrakčného procesu, správne zloženie a prispôsobenie kultivačného média, správne nastavené pH a teplota, zabezpečenie aeróbnych podmienok a výber kmeňov s vysokou produktivitou hyalurónanu. Najpoužívanejšie kmene sú *Streptococcus equi* a *Streptococcus equi zooepidemicus* zbavené patogénov a schopnosti hemolýzy. Z mliečnych potravinárskych produktov boli izolované kmene *S. thermophilus* s vysokou produktivitou exopolysacharidov vrátane hyalurónanu [34].

Ďalšie zlepšenie podmienok na produkciu hyalurónanu mikrobiálnymi kmeňmi umožňuje genetické inžinierstvo. V kmeňoch *Streptococcus zooepidemicus* a v rekombinantných hostiteľoch sa ukázalo, že pomer medzi kofaktormi UDP-GlcNAc a UDP-GlcUA a pomer medzi hyalurónan syntázou a substrátmi sú najdôležitejšie faktory ovplyvňujúce molekulovú hmotnosť hyalurónanu. Okrem pomeru medzi dvoma prekursorami ovplyvňuje molekulovú hmotnosť hyalurónanu aj pomer medzi UDP-GlcUA a hyalurónan syntázou. Štúdie na baktérii *Lactococcus lactis* preukázali, že vyššia dostupnosť UDP-GlcUA na hyalurónan syntázu zvyšuje molekulovú hmotnosť hyalurónanu [34].

Aby sa predišlo riziku vylučovania toxínov z mikroorganizmov a kontaminácie hyalurónanových produktov metabolitmi z patogénnych streptokokových kmeňov, čo je vlastne hlavná nevýhoda bakteriálnej produkcie hyalurónanu, boli do „producentov“ hyalurónanu geneticky zavedené enzýmy hyalurónan. Používaním tohto prístupu sú využívané produkujúce kmene *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Agrobacterium sp.* a *Lactococcus lactis*. Výťažok hyalurónanu môže dosahovať okolo  $4\text{ g}\cdot\text{dm}^{-1}$ , keď je kultivačné médium doplnené dostatočným množstvom glukozamínu [34].

Ako alternatíva k prokaryotickej produkcii hyalurónanu môžu byť vírusom infikované bunky zelených rias rodu *Chlorella*, hoci výťažky sú nízke ( $0,5\text{--}1\text{ g}\cdot\text{dm}^{-1}$ ), a tým pádom nepoužiteľné v medicínskych, či v kozmetických aplikáciách [34].

Izolácia hyalurónanu fermentáciou streptokokových kmeňov je zabehnutou a vyspelou technológiou, ktorá poskytuje vysokomolekulárne, vysoko čisté polyméry hyalurónanu, vhodné pre rôzne technické, medicínske, farmaceutické a kozmetické aplikácie. V súčasnosti sa vyrába niekoľko ton bakteriálneho hyalurónanu ročne na lekárske a kozmetické účely [34].

## 2.4 Biotechnologické metódy výroby hyalurónanu

*Streptococcus zooepidemicus* je bežne používaným bakteriálnym kmeňom produkujúcim pri jednorazovej kultivácii okolo  $6\text{--}7\text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  hyalurónanu [36].

Ako už bolo zmienené, medzi baktérie schopné syntézy hyalurónanu patria grampozitívne baktérie *Streptococcus equi*, *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis* a gramnegatívne baktérie kmeňu *Pasteurella multocida* produkujú hyalurónan [36].

Predpokladá sa, že syntéza hyalurónanu pri bakteriálnej fermentácii predstavuje približne 5 až 10 % metabolizovaného uhlíka. Dráha tvorby hyalurónanu úzko súvisí s inými bunkovými dráhami, ako je glykolýza a rastom buniek. Na syntézu jedného mólu hyalurónanu sa spotrebuje päť mólov nukleozidtrifosfátov [3 ATP (adenozíntrifosfát) a 2 UTP (uridíntrifosfát)], dva móly glukózy, jeden mól acetylkoenzýmu A (acetyl-CoA) a vytvára dva móly redukčných kofaktorov NADH (nikotínamidadenínindinukleotid + vodík). Hladiny ATP a NADH hrajú kľúčovú úlohu v biosyntéze, pretože tieto látky sa spotrebúvajú na produkciu hyalurónanu [36].

## 2.5 Hyalurónan a bunka

Bolo objavených veľa sekrečných proteínov a receptorov bunkového povrchu, ktoré tvoria extracelulárny matrix, a ktoré viažu a stabilizujú hyalurónan. Bunkový povrchový glykoproteín CD44 (*Cluster of differentiation 44 receptor*) a RHAMM (*Receptor for hyaluronic acid mediated motility*) patria medzi najznámejšie receptory pre hyalurónan a sú obsiahnuté v takmer každej ľudskej bunke a v iných druhov cicavcov, napr. v myšiach. Medzi ostatné receptory patria TLR-4 (*Toll-Like receptor-4*), TSG-6 (*The product of tumor necrosis factor stimulated gene-6*) a LYVE-1 (*Lymph vessel endothelial hyaluronan receptor-1*) [37].

### 2.5.1 Receptor CD44

Receptor CD44, tiež známy ako P-glykoproteín 1, je transmembránový proteín typu I kódovaný iba jedným génom a je považovaný za primárny receptor pre hyalurónan. CD44 je široko distribuovaný glykoproteín, nachádzajúci sa na hematopoetických bunkách, fibroblastoch a taktiež na nádorových bunkách. V dôsledku striedavého spájania a posttranslačných modifikácií, ako je N- a O-glykozylácia a spájanie k glykozaminoglykánu, receptor existuje v rôznych izoformách. Je pre hyalurónan nešpecifický a preto nie všetky izoformy reagujú výlučne s hyalurónanom – na receptor sa môžu viazať aj iné ligandy. Tento receptor má štyri domény. Ako vidno na Obr. 8, prvou je distálna extracelulárna doména, ktorá je zodpovedná za samotnú väzbu hyalurónanu. Druhou doménou je proximálna extracelulárna doména, ktorej štruktúra definuje izoformy hyalurónanu a je zodpovedná za naviazanie glykozaminoglykánov. Tretou doménou je jednopriechodový, transmembránový proteín a poslednou doménou je cytoplazmatická doména vnútri bunky [37], [38].

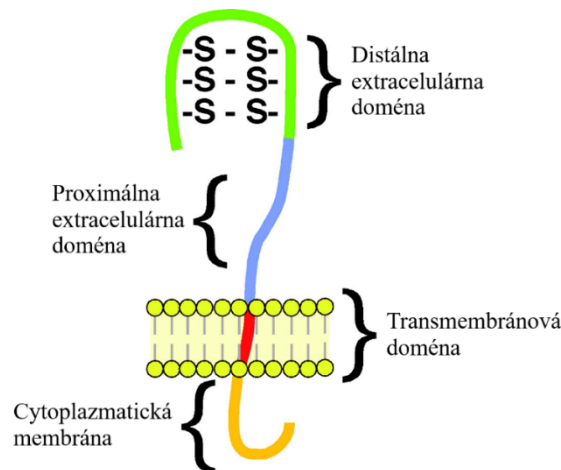
Z funkčného hľadiska existujú tri možnosti, ako môže CD44 interagovať s hyalurónanom, a to úplne nenaviazane, alebo nenaviazane, ale receptor je aktivovaný pri konštitatívnej väzbe. Predtým než je hyalurónan naviazaný na receptor, je potrebné aktivovať samotný receptor [37].

CD44 je multifunkčný receptor, ktorý má rôzne úlohy v interakciách bunka-bunka a bunka-matrix, ako je bunkový prenos, návrat do lymfatických uzlín a do protymocytov, aktivácia lymfocytov, agregácia buniek, uvoľňovanie chemokínov a rastových faktorov. Rovnako je zodpovedný aj za degradáciu hyalurónanu a angiogénu [37].

Po naviazaní hyalurónanu na CD44 sa spustí celý rad signálnych dráh, ktoré vedú k bunkovej odpovedi. Po väzbe receptoru s vysokomolekulárnym hyalurónanom môže dochádzať k protizápalovým a antiangiogénnym účinkom, k potláčaniu migrácie buniek a k proliferácii.

Na druhej strane, oligosacharidy hyalurónanu vykazujú proangiogénne a prozápalové účinky, stimulujú bunkovú mobilitu a proliferáciu [37].

Interakcia receptora CD44 s hyalurónanom hrá dôležitú úlohu v rôznych bunkových funkciách, ako je migrácia buniek, zápal, rast nádorov a metastázy [37].



Obr. 8: Štruktúra CD44 receptoru [14]

### 2.5.2 RHAMM receptor

Ďalším významným receptorom pre hyalurónan je RHAMM. Bol prvýkrát identifikovaný ako súčasť komplexu hyalurónan-receptor v médiu myších fibroblastov. Nachádza sa intracelulárne v cytoplazme, v jadre a na povrchu bunky. RHAMM receptor nemá transmembránovú doménu, ale je ukotvený na bunkovej membráne, kde môže interagovať s receptorom CD44 a podieľať sa na mnohých bunkových reakciách, vrátane bunkovej motility a hojenia rán. Prekvapivo RHAMM neobsahuje žiadny signálny peptid a predpokladá sa, že je transportovaný na bunkový povrch prostredníctvom transportných mechanizmov, kde sa spája s povrchom bunky pomocou naviazania s hyalurónan syntázou. Podobne ako CD44 receptor, prenáša signály, ktoré ovplyvňujú motilitu a migráciu buniek [37].

Intracelulárny RHAMM kóduje a rozpoznáva viaceré extracelulárne signálom regulované kinázy (ERK). Intracelulárne RHAMM receptory sprostredkujú bunkový pohyb tým, že po naviazaní vysokomolekulárneho hyalurónanu pôsobia na mitotické vretienko mikrotubuly a ďalšie proteíny cytoskeletu. Okrem toho sa intracelulárny RHAMM viaže aj na množstvo proteínov, ktoré môžu regulovať dynamiku mikrotubulov, štruktúru a funkciu centrozómu prostredníctvom aktivácie kinázy ERK1/2/MAP (mitogénom aktivovaná proteínkináza), ktorá prispieva k bunkovej polarite a migrácii buniek umožnenej mikrotubulami [37].

Extracelulárny RHAMM môže v závislosti od hyalurónanu, regulovať bunkovú transformáciu a migráciu. Môže sa viazať na receptory CD44 nachádzajúce sa na mezenchymálnych bunkách v ranách, čo je nevyhnutné pre trvalú aktiváciu a jadrovú translokáciu aktivovaného ERK1,2 a pre migráciu buniek so zvýšenou mezenchymálnou diferenciáciou v miestach poranenia [37].

### 2.5.3 LYVE-1 receptor

LYVE-1 receptor bol identifikovaný a klonovaný ako lymfatický receptor hyalurónanu špecifický pre endotelové bunky lymfatických ciev u ľudí a myší. Je tiež exprimovaný určitou časťou aktivovaných tkanivových makrofágov a v endoteli pečene a sleziny. Je to integrálny

membránový glykoproteín typu I a je špecifický pre hyalurónan. Štruktúrou sa podobá receptoru CD44, pretože má jednu transmembránovú doménu a jeden N-koncový väzbový modul pre hyalurónan, ktorý viaže imobilizované a rozpustné hyalurónany. Zachytáva vysokomolekulárny hyalurónan a zúčastňuje sa na jeho degradácii. Väzba hyalurónanu na receptor LYVE-1 je slabá v endotelových lymfatických cievach. LYVE-1 sa podieľa na transporte hyalurónanu z tkanív do lymfy cez lymfatické endotelové bunky [37].

#### **2.5.4 TLR-4 a TSG-6 receptory**

TLR-4 receptory sú transmembránové receptory zohrávajúce kľúčovú úlohu v prirodzenej imunitnej odpovedi a slúžia k rozpoznávaniu produktov mikroorganizmov. Primárne sa vyskytuje na bunkách imunitného systému ako sú B-lymfocyty, makrofágy, neutrofily, žirne bunky a dendritové bunky, ale dajú sa nájsť aj na neimunitných bunkách ako sú bunky epitelu, alebo fibroblasty. Je široko rozšírený v tkanivách a vyskytuje sa napríklad v srdci, pečeni, obličkách, či v mozgu. Tieto receptory sú exprimované aj keratinocytmi. TLR-4 receptor sa viaže s hyalurónanom, čo spúšťa zápalové reakcie [37].

TSG-6 receptor je multifunkčný proteín, ktorý obsahuje hyalurónan-viažucu doménu a patrí do takzvanej skupiny hyaladherínov. Hrá podstatnú úlohu pri zápalových procesoch a onemocneniach kĺbov a pri remodelácii. TSG-6 reaguje s celým radom glykozaminoglykánov a umožňuje sieťovanie hyalurónanu po jeho naviazaní, čo podporuje adhéziu lymfocytov pri zápalových procesoch. Napriek tomu je väzba závislá na konkrétnom tkanive a na pH. Dokáže spomaľovať tvorbu komplexu hyalurónan-proteín v chrupavkách, alebo urýchľovať jeho disociáciu. Tiež moduluje funkciu CD44 receptoru [37].

## **2.6 Metabolizmus hyalurónanu v ľudskom tele**

### **2.6.1 Syntéza hyalurónanu**

Bunková syntéza a degradácia hyalurónanu je jedinečný, dynamický a vysoko kontrolovaný proces. Väčšina glykozaminoglykánov sa tvorí v Golgiho aparáte bunky, ale pre hyalurónan to neplatí. Je syntetizovaný v plazmatickej membráne bunky za prítomnosti  $Mg^{2+}$  iónov. Enzýmy zodpovedné za prirodzenú syntézu hyalurónanu sa nazývajú hyalurónan syntázy (HAS) a sú to integrálne membránové proteíny. HAS gény kódujú tri izoformy hyalurónan syntáz u cicavcov: HAS1, HAS2 a HAS3 [37].

Tieto enzýmy syntetizujú lineárne polyméry opakujúcich sa disacharidových jednotiek hyalurónanu pridaním N-acetyl-glukozamínu (GlcNAc) a glukurónovej kyseliny (GlcUA) do reťazca pomocou ich aktivovaných nukleotidových cukrov UDP-GlcNAc a UDP-GlcUA ako substráty [4]. Reťazec sa postupne predlžuje a je vytlačovaný z plazmatickej membrány do extracelulárneho matrixu. Ako je znázornené na Obr. 9, UDP sacharidy pochádzajú z bunkových metabolických procesov [37].

Oblasť (A) na Obr. 9 predstavuje mechanizmus syntézy hyalurónanu pomocou enzýmov HAS a biosyntézu spolu s jeho reguláciou jednotlivých nukleotidov (UDP-GlcUA a UDP-GlcNAc). Endoplazmatické retikulum (ER)/Golgiho aparát je miestom syntézy glykoproteínov, proteoglykánov a glykokonjugátov. Hyalurónan sa syntetizuje na vnútornej cytoplazmatickej membráne a priamo sa transportuje cez špecifické transmembránové domény HAS. 4-MU (4-metylmethylferón) dokáže konjugovať s UDP-GlcUA a ovplyvniť syntézu hyalurónanu [37].

Oblasť (B) znázorňuje endolytický mechanizmus degradácie hyalurónanu ( $M_w$   $10^6$ – $10^7$  Da) hyaluronidázami (HYAL). Fragmenty ( $M_w$   $2 \cdot 10^4$  Da) vytvorené HYAL-2 sú uzavreté v endozómoch a potom v lyzozómoch. Aktivita HYAL-1,  $\beta$ -glukuronidázy a  $\beta$ -N-acetylglukozaminidázy v lyzozómoch indukuje degradáciu hyalurónanu na tetrasacharidy ( $M_w$  800 Da). Jednotlivé cukry ( $M_w$  200 Da) sú tvorené lyzozomálnou  $\beta$ -N-acetylglukozaminidázou,  $\beta$ -exoglykozidázami a  $\beta$ -glukuronidázou. Tieto voľné sacharidy sú vytlačené do cytoplazmy vstupujúce do rôznych bunkových reakcií. Reakčný mechanizmus (schéma Obr. 9):

1. Hexokináza/glukokináza, G6P: glukóza-6-fosfát,
2. Fosfoglukomutáza, G1P: glukóza-1-fosfát,
3. UDP-glukóza pyrofosforyláza, UDP-G: UDP-glukóza,
4. UDP-glukóza dehydrogenáza; UDP-GlcUA,
5. Fosfoglukóza izomeráza, F6P: fruktóza 6-fosfá,
6. Glutamín-fruktóza-6-fosfát transamináza, GlcN6P: glukozamín-6-fosfát,
7. Glukozamín-fosfát N-acetyltransferáza, GlcNAc6P: N-acetylglukozamín-6-fosfát,
8. Fosfoacetylglukozamínmutáza, UDP-GlcNAc,
10. O-GlcNAc transferáza,
11. Glukoronyltransferáza, GLN: glutamín, GLU: glutamát, Ac-coA: acetylkoenzým A, PP: pyrofosfát, ADP: adenzindifosfát, NAD: nikotínamidadeníninukleotid, ATP, UTP, 4-MU [37].

HAS majú dvojitú katalytickú aktivitu na prenos sacharidových nukleotidov, t.j.  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) glykozylntransferáza na pridanie GlcNAc a  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) glykozylntransferáza na pridanie GlcUA. HAS využívajú štyri substráty na polymerizačnú reakciu, a to dva cukornaté nukleotidy a dva hyalurónan-UDP reťazce s GlcUA alebo GlcNAc na redukujúcom konci reťazca [37].

Väčšina glykozylntransferáz má jediné väzbové miesto, zatiaľ čo HAS majú dve odlišné väzbové miesta pre UDP cukry. Polymerizácia hyalurónanu prebieha na vnútornej strane plazmatickej membrány s tvorbou HAS proteínových komplexov do extracelulárneho priestoru. Reťazec hyalurónanu narastá a je postupne vytláčaný z plazmatickej membrány do extracelulárneho matrixu [37].

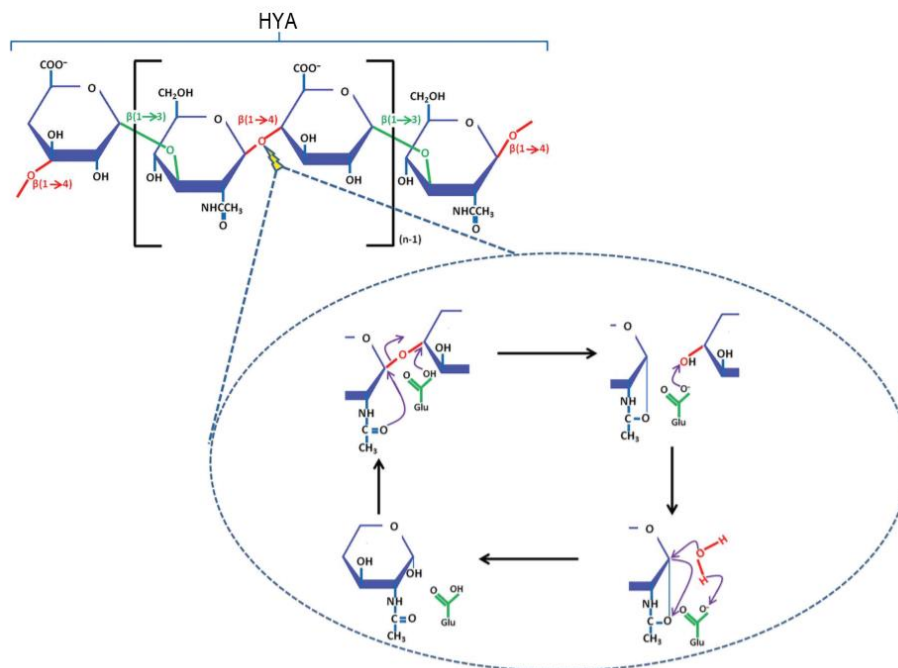
Všetky tri proteíny HAS syntetizujú hyalurónan s vysokou molekulovou hmotnosťou ( $\geq 4 \cdot 10^6$  Da). Avšak, v podmienkach *in vitro* je vysokomolekulárny hyalurónan ( $\geq 4 \cdot 10^6$  Da) syntetizovaný iba enzýmom HAS2, zatiaľ čo HAS1 a HAS3 syntetizujú menšie polydisperzné reťazce s priemernou molekulovou hmotnosťou okolo 100 až 800 kDa [37].

Predpokladá sa, že rozdiel molekulových hmotností hyalurónanu syntetizovaného enzýmami HAS môže byť spôsobený vnútornou enzymatickou vlastnosťou a intracelulárnym prostredím. HAS3 je spomedzi ostatných HAS najviac katalyticky aktívny enzým v *in situ*. Bolo zistené, že rekombinantný enzým HAS1 má vyššiu hodnotu  $K_M$  (konštanty Michaelis-Mentenovej) oproti HAS2 a HAS3 a zároveň, HAS majú nižšiu hodnotu  $K_M$  pre UDP-GlcUA a vyššiu pre UDP-GlcNAc [37].





nosičový systém na doručenie liečiv do špecifického miesta, a tým sa môže liečba urýchliť a/alebo zefektívniť [4].



Obr. 10: Štiepenie hyaluronánu: Mechanizmus reakcie vytesnenia enzýmami Hyal u ľudí. Katalytický mechanizmus iniciovaný nukleofilným atakom Glu149 z Hyal na karbonylový kyslík N-acetylovej skupiny v polohe C1 GlcNAc za vzniku oxokarbóniového medziproduktu → štiepenie  $\beta(1\rightarrow4)$  glykozidovej väzby. Následná hydrolyza oxokarbóniového medziproduktu v polohe C1 vedie k regenerácii Glu149 pre ďalšiu reakciu. Fragmenty HYA sa uvoľňujú z aktívneho miesta neredukujúcich koncoch [37]

## 2.7 Mechanizmus účinku hyaluronánu v ľudskom tele

Hyalurónan hrá v ľudskom tele mnoho dôležitých a pozitívnych úloh, ako je napríklad hydratácia a elasticita pokožky, obnova kĺbov, alebo dobrá priehľadnosť očného sklovca. Hoci hlavný mechanizmus hyaluronánu nie je úplne známy, experimenty *in vivo*, *in vitro* a klinické štúdie podrobne opisujú rôzne fyzikálno-chemické a fyziologické účinky exogénneho hyaluronánu [4].

Hyalurónan má množstvo fyzikálno-chemických funkcionalít, ktoré môžu vykazovať chondroprotektívne účinky *in vivo*, a tým pádom ochranné účinky na kĺbovú chrupavku. Hyalurónan môže znížiť nervové impulzy a nervovú citlivosť spojenú s bolesťou. Exogénny hyalurónan podporuje aj syntézu endogénneho hyaluronánu chondrocytmi a syntézu proteoglykánov. Zároveň znižuje tvorbu a aktivitu prozápalových mediátorov a mení správanie imunitných buniek. Ďalšie funkcie sa uplatňujú v zachytávaní reaktívnych voľných radikálov kyslíka, inhibícii migrácie a agregácie leukocytov, makrofágov a v regulácii proliferácie fibroblastov. Mnohé z fyziologických účinkov exogénneho hyaluronánu sa viažu na molekulovú hmotnosť jeho fragmentov [4].

Ako už bolo spomenuté, hyalurónan je vysoko hygroskopický a táto vlastnosť sa považuje za dôležitú pre hydratáciu tkanív a udržovanie osmotickej rovnováhy. Hyalurónan pôsobí aj ako signálna molekula pri interakcii s povrchovými receptormi a pri regulácii bunkovej proliferácie, migrácie, diferenciácie a génovej expresie. Rovnako je nevyhnutný pre embryogenézu [4].



## 2.8 Molekulové hmotnosti hyalurónanu a ich úlohy v ľudskom tele

Ako už bolo spomenuté v kapitole 2.1, biologické účinky hyalurónanu závisia do veľkej miery od jeho dĺžky reťazca, čiže od jeho molekulovej hmotnosti. Na základe molekulovej hmotnosti sa hyalurónan podieľa na veľa fyziologických procesoch, ako pri zápaloch, angiogenéze, proliferácii, vývoji embrya, pri migrácii, adhézii, apoptóze buniek, diferenciácii buniek a pri mnoho ďalších procesoch. Pri týchto procesoch sa zúčastňujú receptory, ktoré reagujú s hyalurónanom s rôznou dĺžkou reťazca a spúšťajú rozličné signálne dráhy, pričom vysoko a nízkomolekulárny hyalurónan môžu spúšťať opačné odozvy [39].

Molekulová hmotnosť hyalurónanu závisí od pôvodu biologického zdroja a metódy izolácie [34]. V závislosti od jeho molekulovej veľkosti možno hyalurónan rozdeliť do niekoľkých kategórií. Molekulová hmotnosť oligosacharidov hyalurónanu (o-HYA) je menej ako 10 kDa. Ako nízkomolekulárny (LMW) hyalurónan sa považuje reťazec s molekulovou hmotnosťou medzi 10 až 250 kDa a ako hyalurónan so strednou molekulovou hmotnosťou (MMW) medzi 250–1 000 kDa. Za vysokomolekulárny hyalurónan (HMW) sa považuje reťazec s hmotnosťou nad 1 000 kDa, pričom hyalurónan s veľmi vysokou molekulovou hmotnosťou (vHMW, >6 000 kDa) sa nachádza u rypoša lysého (*Heterocephalus glaber*), čo vysvetľuje jeho odolnosť proti rakovine a dlhovekosť [26].

Biopolymér hyalurónanu má za fyziologických podmienok molekulovú hmotnosť viac ako  $10^6$  Da a poskytuje bunkám štruktúrnú kostru. Tento vysokomolekulárny hyalurónan sa podieľa na prenášaní signálov regulujúcich rôzne bunkové správanie, ako je adhézia, mobilita, motilita, rast atď. [38]. Extracelulárne reťazce hyalurónanu s vysokou molekulovou hmotnosťou ( $\sim 10^7$  Da) sú podstatné pre hydratáciu tkaniva, inhibujú angiogénu a taktiež pôsobia protizápalovo a imunosupresívne. Nízkomolekulárny hyalurónan interaguje s odlišnými receptormi, ktoré spúšťajú signálne kaskády a reakcie v správaní samotných buniek [40].

Hyalurónan s molekulovou hmotnosťou 20–200 kDa plní úlohu pri ovulácii, embryogenéze, hojení rán (viaže fibrinogén) a pri regenerácii tkaniva [29]. V niektorých prípadoch, hyalurónan s touto veľkosťou môže signalizovať endogénne nebezpečenstvo. Hladiny hyalurónanu sa môžu zvýšiť v okolí nádorových buniek, pričom sa udržiavajú normálne funkcie buniek [26].

HMW hyalurónan indukuje aktiváciu tyrozínkináz v endotelových bunkách [38]. HMW hyalurónan má antiangiogénne účinky a inhibuje proliferáciu buniek hladkého svalstva ciev blokovaním a udržiavaním buniek vo fáze G1, zatiaľ čo LMW hyalurónan podporuje bunkový cyklus vo fáze G1 a bunkovú proliferáciu [26]. Pomerne nedávne štúdie ukázali, že zníženie hladín hyalurónanu syntáz a extrémne vysoké hladiny hyalurónanu potláčajú rast nádoru, čo je pravdepodobne spôsobené inhibíciou interakcií bunka-bunka alebo prístupom ligandu k receptorom na povrchu bunky [38].

Hyalurónan o hmotnosti menej ako 500 kDa sa dokáže zhromažďovať okolo poranených tkanív a podporuje produkciu cytokínov a chemokínov, ktoré sú rozhodujúce pre aktiváciu makrofágov [26]. Ďalej, tento hyalurónan o hmotnosti menej ako 500 kDa vzbudzuje zápalové gény, bunky karcinómu T-24 a eozinofilné granulocyty [41].

Zhao a kol. [42] zistili, že nízkomolekulárny hyalurónan o veľkosti 117 kDa inhibuje migráciu a šírenie buniek rakoviny prsníka prostredníctvom receptora CD44. Zvyšuje tiež hladiny expresie E-kadherínu a potláča expresiu vimentínu. Na druhej strane, o niečo menší

hyalurónan (35 kDa) má opačné účinky a napomáha bunkovej migráciu a šíreniu, zvyšuje expresiu vimentínu a zároveň redukuje expresiu E-kadherínu.

Nízkomolekulárny hyalurónan o molekulovej hmotnosti 0,4–4,0 kDa pôsobí ako aktivátor proteínov teplotného šoku a dokáže zabráňovať apoptóze buniek. O niečo väčší nízkomolekulárny hyalurónan (6–20 kDa) sa podieľa na regulácii expresie prozápalových génov v dendritových bunkách, imunostimulačnú a angiogénnu aktivitu [26], [38]. LMW polymér hyalurónanu o veľkosti 40–400 kDa aktivuje pomocou receptorov transkripčný faktor NF- $\kappa$ B (nukleárny faktor kappa B) ovplyvňujúci génovú expresiu pre endocytózu, bunkový rast a smrť, imunitu, pre embryonálny vývoj atď. [38].

Na rozdiel od HMW hyalurónanu, ktorý vykazuje antiangiogénne vlastnosti, fragmenty hyalurónanu o 3–10 disacharidov stimulujú proliferáciu a migráciu endotelových buniek iniciujúcich angiogénu [26].

Biologická funkcie rôznych veľkostí HA sú zhrnuté v Tab. 2.

Tab. 2: Rôzne molekulové hmotnosti HYA a ich funkcie v tele cicavcov [26], [38]

M <sub>w</sub> HYA [kDa]	Funkcia hyalurónanu
vHMW	odolnosť proti rakovine a dlhovekosť ryposa lysého ( <i>Heterocephalus glaber</i> ),
nadmerná produkcia HMW HYA	inhibuje rast nádoru pravdepodobne potlačením interakcií bunka-bunka alebo prístupu ligandu k receptorom bunkového povrchu,
>10 <sup>3</sup> (HMW HYA)	vypĺňa priestor bunky, funguje ako extracelulárna molekula prenášajúca signály a reguluje rôzne bunkové funkcie (bunková adhézia, motilita, rast). Prestavba matrice počas embryonálnej morfogénzy. Aktivácia tyrozínkinázy v endotelových bunkách. Znižuje zápalové reakcie v bunkách nosového epitelu. Inhibuje proliferáciu vaskulárnych svalových buniek a fibroblastov,
LMW (LMW HYA)	stimuluje expresiu ľudského $\beta$ -defenzínu 2 vo vaginálnom epiteli → vaginálna regenerácia po poranení. Proliferácia vaskulárnych svalových buniek a fibroblastov,
<500	produkcia cytokínov a chemokínov na diferenciáciu a aktiváciu makrofágov,
~500	antiangiogénna aktivita, výplň priestoru, imunologický depresant,
250	iniciuje zápalové gény v renálnych tubulárnych epiteliálnych bunkách, T-24 karcinómové bunky a eozinofily,
~200	ovulácia, embryogénza, hojenie rán, regenerácia tkaniva. Znižuje proliferáciu, migráciu a inváziu buniek,
40–400	aktivácia transkripčného faktoru NF- $\kappa$ B ovplyvňujúci génovú expresiu pre endocytózu,
~6–20	imunostimulačná a angiogénna aktivita. Expresia zápalových génov v dendritových bunkách,
3–10 disacharidov	inhibícia rastu buniek malígneho gliómu, nádorov <i>in vivo</i> , rakoviny prsníka a hrubého čreva. Stimuluje proliferáciu, migráciu endotelových buniek iniciujúcich angiogénu.

## 2.9 Využitie hyalurónanu v medicíne

Hyalurónan predstavuje moderný biomateriál pre široké využitie v rôznych oboroch. Vďaka jeho unikátnym štruktúrnym a funkčným vlastnostiam má uplatnenie v odboroch medicíny, napr. v oftalmológii, ortopédii, regeneračnej medicíne a i. Ďalšie uplatnenie nachádza v odboroch dermatokozmetiky, farmácie, bioinžinierstva, či v oblasti biomedicínskych aplikácií a základného medicínskeho výskumu. Samotný hyalurónan sa rôznymi procesmi upravuje, aby bol viacej použiteľnejší pre viaceré aplikácie. Chemicky zosieťovaný hyalurónan sa používa v oboroch ako je ortopédia, kardiovaskulárna medicína a dermatológia [43], [44].

Hyalurónan sa vo veľkej miere využíva na výrobu liečiv, zdravotníckych pomôcok a kozmetických prípravkov, kde sa uplatňujú jeho vlastnosti biodegradovateľnosť a biokompatibilita. Klinicky sa hyalurónan používa ako diagnostický marker pre rakovinu, reumatoidnú artritídu, pečeňové choroby a i. Pre výborné viskoelastické vlastnosti sa hyalurónan využíva v očnej a plastickej chirurgii, pri artroskopických operáciách, pri terapii osteoartrózy, močovej inkontinencie, pri endoskopických operáciách a pod. [44].

Schválenie použitia hyalurónanu v humánnej medicíne medicínskymi autoritami ako EMA (*the European Medicines Agency*), či FDA (*Food and Drug Administration*), vyžaduje splnenie prísnych kritérií [45]. Vývoj potenciálneho liečiva alebo systému využiteľného v ľudskom tele musí byť preto najprv testovaný na vhodných zvieracích modeloch a až následne prebiehajú klinické skúšky u pacientov s rôznymi chorobami alebo s rakovinou [46], [47].

### 2.9.1 Tkaninové inžinierstvo

Tým, že hyalurónan je jednou z hlavných zložiek tkaniva, má potenciálnu aplikáciu v tkanivovom inžinierstve. Hyalurónan je rozpustný pri izbovej teplote, silno viaže vodu a degraduje veľmi rýchlo. Tieto vlastnosti môžu zabraňovať tvorbe podporného hyalurónového lešenia pri hojení poranených tkanív. Na prekonanie týchto vlastností bola navrhnutá špeciálna príprava zosieťovaného hyalurónanu, kde by sa chemicky modifikovali funkčné skupiny hyalurónanu, karboxylová, hydroxylová a N-acetylová skupina [43].

Takýto chemicky zosieťovaný hyalurónan má postačujúce vlastnosti aj pre chrupavkové, či kožné inžinierstvo. Samotné zosieťovanie robí hyalurónan viacej stabilným a spomaľuje proces jeho degradácie *in vivo* [43].

Karboxylové funkčné skupiny na reťazci hyalurónanu sa často používajú na zavádzanie metylakrylátov počas radikálovej polymerizácii. Reakcia glycidyl metakrylátu s hyalurónom vytvára konjugát a tiež napomáha fotochemické siet'ovanie hyalurónanu. Práve tieto fotozosieťované hydrogély hyalurónanu sa používajú v rôznych aplikáciách, ako je tkaninové, chrupavkové či chlopňové inžinierstvo. Štúdie ukázali možnosť rastu začlenených buniek do chondrocytov na fotochemicky siet'ovanom hyalurónane, a tým pádom možnosť chondrocytov vytvárať či obnovovať chrupavku v poréznej sieti. Na podporu rastu buniek sa používajú kopolyméry hyalurónanu s polypyrolom kvôli jeho vodivostným vlastnostiam [43].

Tým, že hyalurónan je biokompatibilný prírodný polymér, hyalurónové lešenia reagujú priaznivo s prekrvenými tkanivami, či s inými povrchmi. Napríklad, hyalurónan zosieťovaný s divinylsulfónom (DVS) v prítomnosti buniek hladkého svalstva, v porovnaní s bunkami kultivovanými na plastových kultivačných platniach, zvýšil syntézu elastínu, kolagénu a tkaniva aortálnej chlopne [43].

Vnútromolekulovo a medzimolekulovo sieťované hyalurónové hydrogély sa rovnako používajú v tkanivovom inžinierstve. V praxi sa používajú laparoskopické a parenterálne metódy. Výhodou týchto metód je presná aplikácia hyalurónanu do postihnutého miesta, následne môže prebiehať zosieťovanie *in situ*. Zosieťovaný hyalurónan sa dokáže naviazať na tkanivo pomocou mechanických, alebo chemických metód a vytvorí sa kohézne rozhranie medzi tkanivom a lešením [43].

Štúdie poukázali na zosieťovaný hyalurónan s nanočasticami poly(kyseliny mliečno-koglykolovej) *in situ*, ktorý má aj potenciál sa stať nosičovým systémom liečivých látok [43].

Hoci sa ukázalo, že chemické zosieťovanie a zosieťovanie *in situ* je spoľahlivou technikou, potenciálna cytotoxicita použitých činidiel a reakcií pri procese je stále otvorenou témou, ktorú treba dôkladne študovať [43].

### 2.9.2 Dermálna výplň

Vekom a kombináciou vnútorných (napr. genetika) a vonkajších environmentálnych faktorov (slnečné žiarenie a i.), ako aj nepriaznivými faktormi životného štýlu (fajčenie, stres a i.), dochádza k postupnému starnutiu pokožky a k tvorbe vrások. Starnutie pokožky zapríčiňuje zmeny na koži, v mäkkom tkanive a mnoho ďalších zmien, čo časom spôsobí rozklad tkaniva, ryhy a defekty na tvári. Starnutie pokožky sa dá rozdeliť na vonkajšie a vnútorné [43].

Vnútorné starnutie zapríčiňuje zmeny vo vrstvách kože, ako je napríklad zníženie počtu a aktivity melanocytov, dermálnych papíl, fibroblastov, krvných ciev, žírnych a Langerhansových buniek v epiderme, ďalej dermálna atrofia, strata elastickej kože a zníženie produkcie kolagénu typu I a III [43].

Slnečné a UV žiarenie spôsobuje vonkajšie starnutie kože. Poškodzuje sa primárne elastickej kože a znižuje sa bunkovosť. Opakované vystavenie pokožky nadmernému žiareniu, dôjde k degeneratívnemu poškodeniu elastickej tkaniva, k abnormálnemu rastu elastickej vlákien a k zvýšenej produkcii histiocytov, fibroblastov a mastocytov. Pri oboch súboroch faktorov starnutia dochádza k poklesu tvorby kolagénu a melanocytov a môže dochádzať k pomalšiemu a horšiemu hojeniu rán [43].

Počas starnutia dochádza k poklesu množstva hyalurónanu v epidermise. Nižšia koncentrácia hyalurónanu vo vonkajšej vrstve kože vedie k strate hydratácie a pružnosti kože a k rozvoju vrások. Obnovenie elasticity a zjemnenie textúry kože môže byť kompenzované subkutánnou aplikáciou alebo pridaním hyalurónanu do kozmetických prostriedkov. Hyalurónan môže byť obsiahnutý v rôznych formách kozmetických prípravkoch, ako sú krémy, pleťové vody, šampóny, kondicionéry, kúpeľové oleje, rúže, či balzamy na pery [44].

Dermálna výplň by mala spĺňať niekoľko kritérií. Výplň by mala byť dočasná, ale s dostatočne dlho trvajúcim efektom a s minimálnymi vedľajšími účinkami, bez alergickej reakcie. Mala by byť ľahko aplikovateľná a s čo najnižšou bolesťou [43].

Hyalurónan patrí v súčasnosti medzi najviac používané dermálne výplne. Vďaka možnosti chemického zosieťovania hyalurónanu sa jeho polčas rozpadu predlžuje. Treba však objasniť, že hyalurónan nijak nereaguje a nie je súčasťou kolagénu a nepodporuje svoju vlastnú tvorbu v tele, ale iba jednoducho vyplňa vrstvu kože a redukuje, prípadne aj vyhladzuje vrásky [43].

Aby bol hyalurónan použiteľný ako dermálna výplň, je predtým potrebné ho upraviť pomocou chemických reakcií. Viskózný roztok hyalurónanu, sa chemicky zosieťuje, čím sa roztok premení na slabý gél. Medzi bežne používané sieťovacie činidlá v dermálnych výplniach

patria 1,4-butándioldiglycidyléter (BDDE) a divinylsulfón (DVS). Obidve činidlá reagujú s hydroxylovými funkčnými skupinami v hyalurónovom reťazci a poskytujú porovnateľné výsledky. Tento hyalurónový gél vytvára fyzikálnu a chemickú bariéru, ktorá zabraňuje odvodňovaniu a predlžuje proces degradácie hyalurónanu v pokožke [43].

Medzi registrované hyalurónové výplne patria Restylane<sup>®</sup>, Perlane<sup>®</sup>, Hylaform<sup>®</sup>, Captique<sup>™</sup>, Juvéderm<sup>™</sup> a mnoho ďalších. Hlavnými rozdielmi medzi týmito dermálnymi výplňami sú: primárny zdroj hyalurónanu, jeho koncentrácia, veľkosť častíc a stupeň zosieťovania. Obvyklým zdrojom hyalurónanu sú buď kohútie hrebienky, alebo baktérie. Koncentrácia hyalurónanu tiež hrá rolu v prípravku, lebo vysoko koncentrovaný hyalurónan má zvyčajne dlhšie trvajúce účinky, ale jeho vysoká viskozita môže spôsobovať problémy pri subkutánnom podaní tenkými ihlami [43].

Hylaform<sup>®</sup> je sterilný, bezfarebný gélový materiál, zosieťovaný pomocou činidla DVS s veľkosťou častíc okolo 500 µm. Pôvodným zdrojom hyalurónanu sú kohútie hrebienky [43].

Na rozdiel od Hylaform<sup>®</sup>, Captique<sup>™</sup> obsahuje hyalurónan získaný technologickými metódami a nie zo živočíšnych zdrojov. Tým sa dá predísť imunologickým reakciám [43].

Restylane<sup>®</sup> obsahuje neživočíšny derivát hyalurónanu, ktorý sa vyrába mikrobiálnou fermentáciou streptokokov a je len mierne zosieťovaný BDDE činidlom s veľkosťou častíc okolo 400 µm. Tento prípravok má nižší stupeň zosieťovania, ale vyššiu koncentráciu hyalurónanu v porovnaní s predchádzajúcimi produktmi. Restylane<sup>®</sup> sa primárne používa na korekciu vrások, nosovo-ústnych záhybov, rýh medzi obočím a na zväčšenie pier [43].

Juvéderm<sup>™</sup> je tiež obľúbenou dermálnou výplňou na trhu. Obsahuje vysoko zosieťovaný hyalurónan získaný mikrobiálnou výrobou pomocou baktérií *Streptococcus equi*. Hyalurónan je sieťovaný činidlom BDDE v prostredí fosfátového tlmivého roztoku. Koncentrácia hyalurónanu v prípravkoch môže byť v rozmedzí od 18 mg·g<sup>-1</sup> do 30 mg·g<sup>-1</sup> [43].

Súčasnú používanú dermálnu výplne na báze hyalurónanu majú trvanie liečby od 3 až do 12 mesiacov. Na zníženie procesu degradácie a na predĺženie účinku liečby sa používa vysokomolekulárny alebo viacej zosieťovaný hyalurónan. Výskum a vývoj dermálnych výplňových produktov sa v súčasnosti sústreďuje na prípravky s jednoduchším podaním a predĺženým účinkom liečby [43].

### 2.9.3 Liečba osteoartrózy

Osteoartróza je heterogénne ochorenie, pri ktorom dochádza k opotrebovaniu a k degradácii kĺbovej chrupavky. Najčastejšie je postihnutá staršia generácia ľudí (>65 rokov). Toto ochorenie spôsobuje veľké bolesti synoviálnej blany, okostice, šliach a svalov v okolí kĺbu. Zhoršujúci sa priebeh ochorenia môže dospieť až do imobility. Koncentrácia a molekulová hmotnosť hyalurónanu u ľudí s osteoartrózou klesá [43], [48], [49].

Súčasnú farmakologické a medicínske liečebné prístupy sa zameriavajú na zmiernenie bolesti pomocou jednoduchých analgetík alebo nesteroidných protizápalových liekov. V liečbe sa využívajú inhibítory cyklooxygenázy 2, prípadne sa indikuje intraartikulárna liečba glukokortikoidmi a derivátmi kyseliny hyalurónovej. Ak nepomáha konzervatívny spôsob liečby, spraví sa chirurgický zákrok a nahradí sa pôvodný kĺb umelým [49], [50].

Osteoartróza spôsobuje zmeny vo fyzikálnych a chemických vlastnostiach hyalurónanu, a tým pádom stratu fyziologických viskoelastických vlastností synoviálnej tekutiny. Synoviálna tekutina obsahuje vysokú časť hyalurónanu a zbytok je chondroitín-4-sulfát

(z glykozaminoglykánu), elektrolyty a malé organické molekuly. Synoviálna tekutina má vďaka viskoelastickým vlastnostiam významnú mechanickú funkciu. Viskoelasticita závisí od koncentrácie a molekulovej hmotnosti hyalurónanu, od počtu kovalentných väzieb a slabých Van der Waalsových interakcií v rámci molekuly a medzi molekulami. Tieto interakcie sú závislé od molekulovej hmotnosti a koncentrácie hyalurónanu a podieľajú sa na jeho tvorbe sieťovej štruktúry, ktorá podmieňuje viskoelasticitu synoviálnej tekutiny [43].

Vnútroklbna terapia zahŕňa liečbu s produktami obsahujúcich hyalurónan, ako Hyalgan<sup>®</sup>, Orthovisc<sup>®</sup>, Synvisc<sup>®</sup>, Supartz<sup>®</sup> a Euflexxa<sup>®</sup>. Rovnako ako pri dermálno-výplňových výrobkoch, môže zvýšená koncentrácia a stupeň zosieťovania hyalurónanu zintenzívniť účinnosť liečby [43].

Niekoľko klinických štúdií ukázalo, že po treťom podaní liečivého prípravku Synvisc<sup>®</sup> (zosieťovaný hyalurónan) dôjde k úľave od bolesti až počas obdobia šiestich mesiacov, pričom prípravok Hyalgan<sup>®</sup> (roztok hyalurónanu sodného) dosahuje rovnakého výsledku až po šiestich podaniach. Liečivý prípravok Orthovisc<sup>®</sup> obsahuje vysokú koncentráciu hyalurónanu, ale má nižšiu viskozitu a porovnateľný účinok ako prípravok Synvisc<sup>®</sup> [43].

#### 2.9.4 Hojenie rán

Hyalurónan hrá veľkú úlohu aj pri liečbe traumatických poranení. Pôsobením špecifických signálov sa jeho prítomnosť v mieste rany zvyšuje a vďaka jeho vysokej molekulovej hmotnosti, slúži ako dočasná ochrana rany. Jeho štruktúra a vlastnosti napomáhajú difúziu látok, živín a odpadných produktov z miesta poranenia. Jeden z najdôležitejších procesov pri hojení je interakcia hyalurónanu s keratinocytmi, ktoré sa nachádzajú v epiderme kože a produkujú keratín a pevné vlákna, pričom hyalurónan priamo ovplyvňuje proliferáciu a migráciu týchto buniek [51].

Receptor CD44 a RHAMM vykonávajú niekoľko dôležitých funkcií spojených s hyalurónanom počas hojenia. V prostredí rany je receptor CD44 zodpovedný za degradáciu hyalurónanu a za prítomnosť fibroblastov, pričom receptor následne spúšťa kaskádu signálov, ktoré napomáhajú proces bunkového rastu a motility. RHAMM spolu s cytoskeletálnymi proteínmi aktivuje proteínkinázy, ktoré stimulujú bunkový pohyb, a tým pádom stimulujú reparáciu tkaniva v mieste poranenia. Ukázalo sa, že RHAMM, rovnako ako receptor CD44, stimuluje proliferáciu fibroblastov *in vivo* [51].

Hyalurónan plní určitú úlohu prakticky v každom kroku procesu hojenia rán a jeho účinok sa dá určiť na základe jeho molekulovej hmotnosti. Vysokomolekulárny hyalurónan stimuluje protizápalové reakcie, zatiaľ čo nízkomolekulárny hyalurónan má väčšiu afinitu k receptoru CD44 a indukuje zápalové procesy [51].

Bolo pozorované, že hyalurónan interagujúci s receptorom CD44 spomaľuje pohyb, čo ovplyvňuje adhéziu neutrofilov k poškodeným krvným cievam v rane. CD44 sa nachádza na povrchu leukocytov a aj na endotelovej výstelke krvných ciev. Leukocyty putujú na miesto poranenia a vylučujú proteázy na degradáciu tkaniva. Nadbytok hyalurónanu v krvi spôsobí jeho naviazanie na receptor CD44, nachádzajúci sa na povrchu leukocytov a endotelu. Receptor je zablokovaný a je obmedzená, avšak nie zablokovaná, migrácia leukocytov do miesta poranenia, čo spôsobí zmenšenie opuchu [51].

Existuje veľa prípravkov obsahujúcich hyalurónan na hojenie rán na tele. Farmaceutická spoločnosť Contipro vyrába prípravky Hyiodine<sup>®</sup> a Sorelex<sup>®</sup> použiteľné na ľudskú pokožku.

Hyodine<sup>®</sup> je antimikrobiálny, antiadhezívny gél obsahujúci kyselinu hyalurónovú, ktorý pomáha pri hojení pooperačných rán, rán po úraze a skôr hlbokých ako plytkých diabetických vredov [52], [53]. Jeho lubrikačné vlastnosti zabraňujú adhézii obväzu k rane. Obsah jódového komplexu v produkte chráni hyalurónan pred degradáciou bakteriálnymi enzýmami a súčasne poskytuje antimikrobiálnu ochranu rany [44]. Sorelex<sup>®</sup> je antimikrobiálne krytie obsahujúcej hyalurónan sodný, ktorý sa využíva primárne na preležaniny, transplantovanú kožu, diabetické vredy a vredy predkolenia [54].

Prípravok Ialugen<sup>®</sup> Plus (firma IBSA) obsahujúci hyalurónan a strieborné soli sulfadiazínu s antibakteriálnymi účinkami je dostupný v liekovej forme krému, alebo impregnovaného obväzu a je určený na profylaxiu a liečbu infikovaných kožných lézií, ako sú rany, odreniny a popáleniny [44].

### 2.9.5 Oftalmológia

Vysokomolekulárny hyalurónan je štrukturálnou súčasťou predného, vnútorného a zadného segmentu oka. Nachádza sa v očnom sklovci, spojovke, rohovke, slznej žľaze a v tekutine a vo vodnatom tkanive. Spolu s kolagénom vytvárajú vystužené vlákna v sklovci, ktoré dodávajú oku jeho pevný tvar, mechanickú stabilitu, a tým pádom je umožnená difúzia látok a živín medzi okom a okolím. Najviac hyalurónanu v ľudskom oku sa nachádza v membráne sklovca ( $1\ 200\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), potom v centrálnom sklovci ( $530\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) a najmenej v bazálnom sklovci ( $250\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) [55].

Hyalurónan napomáha liečbu suchého oka a pri šedom zákale. Koncentrácia hyalurónanu v slzách sa môže pohybovať od 12 až do  $1\ 900\ \text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ . U ľudí s chorobou suchého oka a šedého zákalu sa koncentrácia hyalurónanu môže a nemusí rapídne meniť. Pri ochorení suchého oka dochádza k zvýšenému odparovaniu slz kvôli zníženej frekvencii žmurkania a dysfunkcia slzných žliaz spôsobuje zníženie sekrécie slz [55].

Hyalurónan sa vďaka jeho neobyčajným vlastnostiam osvedčil pri liečbe suchého oka. Hyalurónan zvlhčuje rohovku a spojovku a používa sa do očných kvapiek ako lubrikant. Tieto očné kvapky vytvárajú na povrchu oka slzný, ochranný film, ktorý napomáha hydratáciu, zníženiu zápalu oka a zníženiu trenia medzi viečkom a rohovkou [56]. Koncentrácia hyalurónanu v očných kvapkách sa pohybuje medzi 0,1–0,4 %. Produkt HYLO COMOD<sup>®</sup> (Ursapharm) obsahuje 0,1 % hyalurónanu a používa sa pri miernych až stredne silných problémoch suchých očí, zatiaľ čo produkt HYLO<sup>®</sup> GEL (Candor Vision) obsahuje 0,2 % hyalurónanu a je určený na závažnejší priebeh ochorenia suchého oka [55].

Ďalším relatívne častým ochorením oka je zelený zákal. Toto ochorenie je spojené so zvýšeným vnútroočným tlakom, znížením koncentrácie hyalurónanu a s poškodením sietnice a zrkovitého nervu. Bolo pozorované, že koncentrácia hyalurónanu u zdravých pacientov činí okolo  $545\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , pričom u pacientov so zeleným zákalom je koncentrácia hyalurónanu len polovičná – konkrétne táto štúdia uvádza priemernú hodnotu  $298,4\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  [55]. Liečba zeleného a rovnako aj šedého zákalu zahŕňa rôzne chirurgické a laserové zákroky. Tieto techniky zlepšujú drenáž tekutiny v oku, čím sa zníži tlak. Očné prípravky v gélovej podobe obsahujúcich hyalurónan, sa používajú pri operáciách šedého zákalu na ochranu endotelu rohovky. Existuje niekoľko prípravkov na liečbu, a to Healon<sup>®</sup> vyrobený z HMW hyalurónanu ( $3,2\text{--}5,0\cdot 10^6\ \text{Da}$ ), Pe-Ha-Luron<sup>®</sup> a Pe-Ha-Blue<sup>®</sup> PLUS obsahujúci hyalurónan s molekulovou

hmotnosťou  $1,2\text{--}2\cdot 10^6$  Da. Avšak tieto prípravky na báze hyalurónanu sa pomerne rýchlo absorbujú slzami/tekutinou sietnice (6 dní) a táto liečba sa dá považovať za krátkodobú [55].

Hyalurónan sa používa v oblasti kontaktných šošoviek už veľa rokov. Jeho úlohou je udržiavanie vlhkosti na kontaktných šošovkách a zníženie drsnosti povrchu šošovky. Kontaktné šošovky obsahujúce hyalurónan vykazujú zvýšenú retenciu povrchovej vody, znižujú adsorpciu proteínov a spomaľujú vyparovanie slz. Hyalurónan naviazaný na kontaktných šošovkách sa zvyčajne uvoľňuje počas prvých 2–3 hodín od zavedenia [57].

### **2.9.6 Nosičový systém**

V poslednej dobe sa podrobne študovala aplikácia hyalurónanu pri cieleňom dodávaní liečiv, vrátane protirakovinových liečivých látok. Vzhľadom na špecifickú väzbu hyalurónu na receptory nachádzajúce sa na rakovinových bunkách, ako aj vzhľadom na jeho biokompatibilitu, viskoelasticitu, neimunogenicitu a biodegradabilitu, sa stáva hyalurónan vhodným nosičovým systémom. Spolu s liečivou látkou vytvárajú konjugáty (komplexy), ktoré majú riadené uvoľňovanie a cieleňý účinok *in situ*. Tieto konjugáty môžu byť navrhnuté tak, aby dodali viacero liečiv do rôznych miest v organizme v požadovanej postupnosti a s vhodne načasovaným uvoľňovaním. Aby sa zabránilo rýchlemu odbúraniu hyalurónanu v ľudskom tele, pridávajú sa látky, ako napríklad nitroxidy, alebo inhibítory hyaluronidáz, ktoré zabránia degradácii hyalurónanu inhibíciou aktivity hyaluronidázy [58].

#### ***Dermálne podávanie liečiv***

Fyziologická funkcia časti epidermy, *stratum corneum*, pôsobí ako ochranná bariéra a zabraňuje prenikaniu molekúl liečiva do kože pri dermálnom (lokálnom) a transdermálnom (systémovom) podávaní. Vývoj hyalurónových nosičových systémov dodávajúcich liečivé látky zacielené na kožu sa začína viac rozvíjať len v poslednom období [59].

Brown a kol. [59]–[61] ukázali vo svojich *in vitro* štúdiách, že hyalurónan zvyšuje distribúciu diklofenaku (nesteroidné antiflogistikum) v ľudskej koži a umožňuje jeho špecifické umiestnenie a udržanie v epiderme. Iné štúdie rovnako potvrdili tieto výsledky, že hyalurónan znižuje perkutánnu (cez kožnú) absorpciu diklofenaku, čo naznačuje ukladanie liečivej látky v epiderme. Výsledky týchto štúdií boli podporené predklinickými testami, v ktorých bolo pomocou rádioaktívne značeného hyalurónanu zistené, že hyalurónan preniká ľudskou kožou a napomáha transport diklofenaku do epidermy. Podobné výsledky sa dajú predpokladať aj s ibuprofénom, klindamycínom a cyklosporínom [59].

#### ***Nazálne podávanie liečiv***

Hyalurónan sa pri nazálnom podávaní liečivých látok používa ako zložka vehikula a peptidov na zlepšenie bioadhézie a penetrácie s cieľom zvýšiť biologickú dostupnosť [59].

Castellano a Mautone (2002) [62] vo svojej štúdií zistili, že hyalurónan dokáže viazať látku xylometazolín, ktorá poskytuje úľavu od upchatého nosa. Pri tejto liečbe je podstatné, aký molekulárny hyalurónan sa používal na vytvorenie konjugátov s liečivom, pretože pozitívny účinok majú len vysokomolekulárne hyaluróny (>300 kDa). Nízkomolekulárny hyalurónan nevykazuje žiadny účinok [59].



Začlenenie hyalurónanu do mikročasticových aplikačných systémov dodáva mukoadhezívne vlastnosti, pričom mikročastice na báze chitosanu skôr penetračné vlastnosti. Systémy hyalurónanu a chitosanu vytvárajú pozitívny účinok na absorpciu liečiva [59].

### ***Parenterálne podávanie liečiv***

Neimunogénny hyalurónan sa osvedčil ako nosičový systém liečiv na parenterálne podávanie. Hydrofóbná liečivá látka sa dokáže naviazať do matrice hyalurónanu, alebo s ním vytvoriť konjugát. Táto metóda dodávania liečiv sa používa na zacielenie liečiva na špecifické miesto, dosiahnutie trvalého uvoľňovania a na predĺženie retencie liečiva v organizme. Príkladom takéhoto konjugátu je protirakovinová liečivá látka taxol s hyalurónanom, ktorej účinok sa *in vitro* študuje na bunkových líniiach rakoviny prsníka, hrubého čreva a vaječníkov. Akonáhle dôjde k bunkovej absorpcii sprostredkovanvej špecifickým receptorom, liečivo sa uvoľní z konjugátu, aby sa dosiahla efektívna koncentrácia, ktorá vedie k optimálnemu cytotoxickému účinku v rakovinových bunkách [59].

Ďalšie štúdie ukázali, že hyalurónan dokáže konjugovať s rekombinantným inzulínom, čo môže napomôcť optimalizovať liečbu *diabetes mellitus* (cukrovky) a priblížiť ju k fyziologickému profilu vylučovania tohto hormónu v tele [59].

### ***Lipozomálne podávanie liečiv***

Niekoľko prác ukázalo, že lipozomálne podávanie liečivých látok zvyšuje ich rozpustnosť a predlžuje ich polčas rozpadu v tele. Lipozomálny obal súčasne poskytuje ochrannú bariéru a bráni nešpecifickým interakciám liečiva a tiež predčasnej degradácii, alebo eliminácii liečiva z obehu. Výsledné lipozómy obsahujúce hyalurónan majú vyššiu stabilitu, funkciu a pôsobia ako vhodné nosičové systémy s predĺženým uvoľňovaním [59].

Peer a Margalit (2000) [63] zistili, že lipozomálne prípravky modifikované hyalurónom poskytujú porovnateľnú, až lepšiu účinnosť enkapsulácie liečiv. V prípade lyofilizovaných lipozómov, hyalurónan zabezpečuje kryoprotekciu a zlepšuje stabilitu prípravku v porovnaní s nemodifikovaným lipozómom. Vlastnosť kryoprotekcie sa pripisuje schopnosti hyalurónanu nahradiť vodíkové mostíky, ktoré stabilizujú štruktúru lipozómov počas sušenia mrazom (lyofilizácie) [59].

Modifikovaný hyalurónan bol uplatnený aj pri naviazaní protirakovinového liečiva doxorubicín, ktorý špecificky cieľi na rakovinové bunky, ktoré exprimujú receptor CD44 [59].

## **2.10 Súčasný stav riešenej problematiky**

Existuje veľa publikácií a štúdií zaoberajúcich sa využitím natívneho hyalurónanu ako potenciálneho nosičového systému s cieleňou distribúciou liečivých látok. Vďaka výborným fyzikálnym a chemickým vlastnostiam kyseliny hyalurónovej sa tento polymér dostáva do popredia na klinické štúdie ako nosičový systém napr. protirakovinových liečiv, či iných.

Článok autorov Michalicová a kol. [64] sa stal podkladom pre túto diplomovú prácu. Vo svojej publikácii popisujú spôsob sušenia mrazom umožňujúci solubilizáciu hydrofóbných molekúl vo vodnom roztoku natívneho hyalurónanu. Metóda práce bola zvolená v závislosti na možnosti prístupu k hydrofóbnym oblastiam na hyalurónanu narušením jeho hydratačného obalu. Ako hydrofóbné látky, alebo tzv. indikátory interakcií s hydrofóbnymi oblasťami sa použili fluorescenčné sondy pyrén a prodan s koncentráciou  $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a perylén

s koncentráciou  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Zásobné roztoky hyalurónanu s rôznou molekulovou hmotnosťou (106 kDa, 420 kDa a 1,46 MDa) boli pripravené v demineralizovanej vode s koncentráciou  $0,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Pre každú fluorescenčnú sondu boli nastavené špecifické fluorescenčné parametre. Výsledkom bolo potvrdenie účinnosti metódy sušenia mrazom zakomponovaním hydrofóbnej fluorescenčnej sondy do štruktúry hyalurónanu. Táto práca sa stala podkladom pre vývoj biokompatibilných a biodegradovateľných nosičových systémov pre hydrofóbne liečivá s cieľenou distribúciou aktívnej liečivej látky z natívneho, chemicky nemodifikovaného hyalurónanu. Potvrdenie tohto výsledku by sme radi docielili v tejto diplomovej práci, prípadne by sme sa chceli pokúsiť zlepšiť metódu prípravy vzoriek a zvýšiť stupeň zlyofilizovania vzoriek.

V ďalšom článku autori Csapó a kol. [65] popisujú prípravu, štrukturálnu charakterizáciu a kinetiku uvoľňovania liečivej látky z koloidných nosičových systémov na báze hyalurónanu, ktoré majú v sebe naviazané hydrofóbne liečivo ketoprofén. Bol vybraný hyalurónan s hmotnosťou 200–500 kDa a bol zosieťovaný s rôznym pomerom zosieťovania. Hydrofobizovaný hyalurónan bol vyrobený modifikáciou polymérnych reťazcov cetyltrimetylamóniumbromidom (CTAB) pri rôznych pomeroch hyalurónanu a CTAB. Reologické testy boli urobené na nekoherentných koloidných systémoch hyalurónanu a ketoprofenu. Výsledkom bolo, že 70 % zapuzdreného ketoprofenu sa rozpustilo z zosieťovaného hyaluronového nosiča pri hmotnostnom pomere monoméru hyalurónanu a CTAB 1:0,8. Touto štúdiou autori poukázali na možnosť modifikovaného hyalurónanu byť potenciálnym kandidátom na kontrolované uvoľňovanie liečivých látok z hydrofóbnych molekúl liečivého prípravku.

Autori Bukhari a kol. [66] v článku zhodnocujú najnovší vývoj, účinnosť a klinické výskumy hyalurónanu v kozmetickom priemysle na omladenie pokožky. Zistili, že prípravky na báze hyalurónanu (gély, výplne, krémy, pleťové vody, séra, implantáty, a pod.) vykazujú pozitívne účinky proti vráskam, sú vhodné ako výplne kože a na všeobecné omladenie pokožky tváre. Pred aplikáciou kyseliny hyalurónovej odporúčajú lokálne aplikovať lidokaín, ktorý zvyšuje *compliance* pacienta. Čistý hyalurónan, alebo v kombinácii s inými ko-činidlami, dosiahol vysokú účinnosť aj pri napínaní a elasticite pokožky a pri redukcii jaziev. Autori to zhodnotili tak, že aplikácia hyalurónanu vykazuje vynikajúcu nutrikozmetickú účinnosť a je vhodnou prísadou do kozmetických produktov.

Autori Yoon a kol. [67] vo svojej štúdií sa zamerali na využitie hyalurónových nanočastíc (HANP), ako nosičových systémov chlóru e6 (Ce6), zameraných na fotodynamické zobrazovanie a na terapiu nádorov. V jednom prípade boli HANP syntetizované chemickou konjugáciou amínovanej kyseliny 5 $\beta$ -cholánovej, polyetylenglykolu (PEG) a zhášača čiernych dier 3 (BHQ3) k polymérom hyalurónanu. V druhom pokuse vložili Ce6 do HANP dialyzačnou metódou a vytvorili konjugát Ce6-HANP. Účinnosť naplnenia dosahovala hodnoty vyššie ako 80 %. Výsledné Ce6-HANP vykazovali stabilnú nanoštruktúru vo vodnom prostredí a rýchly a cieľený prienik do nádorových buniek. S použitím enzýmu hyaluronidázy bolo možné degradovať Ce6-HANP a uvoľniť Ce6 do cytoplazmy nádorových buniek. Po intravenóznom podaní látky myšiam s nádorovým ochorením, testovaná látka Ce6-HANP efektívne dosiahla nádorové tkanivo prostredníctvom mechanizmu pasívneho zacielenia a špecificky prenikla do nádorových buniek prostredníctvom receptora CD44 a hyalurónového receptora na povrchu

nádorových buniek. Po laserovom ožiarení, Ce6 fluoreskoval a generoval singletový kyslík vo vnútri nádorových buniek, čo viedlo k deštruktívnym procesom a účinnému zníženiu rastu nádoru. Celkovo autori zistili, že liečivo Ce6-HANP je aplikovateľné na *in vivo* fotodynamické zobrazovanie a súčasne na terapiu nádorov – je teda vysokoúčinným fotosenzitizérom pre *bioimaging* a teranostické aplikácie.

Autori Vessot a Andrieu [68] sa vo svojej publikácii zaoberajú potenciálnym využitím vybraných pomocných organických rozpúšťadiel (*co-solvent*) na výrobu prášku farmaceutických látok pomocou sušenia mrazom. Študovaným pomocným rozpúšťadlom bol terc-butylalkohol (TBA) vo vode. Tieto pomocné rozpúšťadlá majú výhody, ako napríklad veľmi krátky čas sublimácie, nízka sublimačná entalpia, vysoký tlak nasýtenej pary, bod topenia pri laboratórnej teplote, väčšia viskozita a pomerne nízka toxicita. Kryštalická morfológia zmrazených systémov pripravených s TBA, že optimálne cykly sušenia mrazom sú stanovené za súčasného zohľadňovania vplyvu zloženia (obsah TBA), procesu mrazenia (teplota nukleácie, rýchlosť mrazenia) a kroku sublimácie (teplota police, celkový tlak v prístroji), aby sa maximalizovali rýchlosti sušenia a minimalizovali zvyškové množstvá rozpúšťadiel pri zachovaní kvality lyofilizačného koláča.

V podobnom článku, autori Wittaya-Areekul a Nail [69] identifikovali významné premenné ovplyvňujúce hladiny TBA a izopropylalkoholu (IPA) v lyofilizačných koláčoch pripravených s vodou. Skúmanými parametrami boli fyzikálny stav sacharózy a glycinu (kryštalický vs. amorfný), počiatková koncentrácia TBA, rýchlosť mrazenia, hrúbka lyofilizačného koláča, teplota a trvanie sekundárneho sušenia. Fázový diagram rozpúšťadla TBA bol zostrojený pomocou dát získaných z diferenciálnej skenovacej kalorimetrie. Najdôležitejším ukazovateľom zvyškovej hladiny TBA bol fyzikálny stav rozpustenej látky. Lyofilizačný koláč obsahujúci glycin obsahoval veľmi nízke hladiny zvyškového TBA (0,01–0,03 %) bez ohľadu na rýchlosť zmrazovania, alebo na počiatkovú koncentráciu TBA. V prípade lyofilizačného koláča so sacharózou boli zvyškové hladiny TBA približne o dva rády vyššie a boli významne ovplyvnené počiatkovou koncentráciou TBA a rýchlosťou mrazenia. Systémy sacharóza/TBA/voda, ktoré boli rýchlo zmrazené, obsahovali viacej zvyškového TBA, ako keď procesy mrazenia a sušenia neboli urýchlené. Ďalej u tohto systému mala teplota a čas sekundárneho sušenia len minimálny vplyv na zvyškové hodnoty TBA v lyofilizačnom koláči. Bolo pozorované, že zvyškový TBA pri nízkej počiatkovej koncentrácii TBA (cca 2 %) sa zvyšuje so zväčšujúcou sa hrúbkou lyofilizačného koláča. Autori predpokladajú, že je to spôsobené vplyvom množstva naplnenia na efektivitu rýchlosti mrazenia.

Autori Gogineni a kol. [70] sa zaoberali stanovovaním zvyškového TBA v lyofilizovaných lipozómoch. Lipozomálne systémy sa s obľubou využívajú vo farmaceutickom výskume. Metóda sušenia mrazom patrí medzi najúčinnšie prostriedky na zlepšenie fyzikálno-chemických vlastností a stability lipozómov. Na stanovenie zvyškového pomocného rozpúšťadla TBA bola v tejto práci použitá plynová chromatografia. Autori zistili, že plynová chromatografia je jednoduchou, vhodnou, dostatočne citlivou, reprodukovateľnou a efektívnou metódou s dobrou presnosťou od 1 ppm na analýzu zvyškového TBA v lipozomálnych lyofilizačných vzorkách.

Autori Kasraian a DeLuca v roku 1995 [71] publikovali článok, v ktorom opisujú použitie diferenciálnej skenovacej kalorimetrie (DSC) na vytvorenie fázového diagramu systému TBA

a voda. Vyskytli sa dve eutektické body, a to pri 20% (eutektické zloženie A) a 90% TBA (eutektické zloženie B). Počas procesu sušenie mrazom, TBA zmenil kryštalovú podobu ľadu. Na vznik veľkých ihličkovitých kryštálov ľadu bola potrebná počiatočná koncentrácia 3% TBA. Pridanie 10% TBA do systému viedlo k ešte jemnejším ihličkovitým ľadovým kryštálom. Pri eutektických hodnotách (20 % a 90 % TBA) nebolo možné zmrazenú eutektickú zmes rozlíšiť mikroskopom, pretože eutektické kryštály boli veľmi malé. 70% roztok TBA, ktorý zodpovedá bodu topenia čistého hydrátu TBA, vytvoril veľké kryštály hydrátu. Vedci zistili, že rýchlosť sublimácie molekúl TBA a vody je závislá od koncentrácie TBA. Pri koncentráciách pod 20 % TBA, molekuly vody sublimovali pomalšie, zatiaľ čo pri koncentráciách nad 20 % TBA, molekuly TBA sublimovali rýchlejšie. Pri eutektickom zložení A sublimovali molekuly TBA a vody rovnakou rýchlosťou. Diskutovali, že to môže byť spôsobené silnýmospájáním molekúl TBA vo forme klatrátu.

Autor Franks [72] opisuje vo svojej publikácii z roku 1998 parametre produktu a procesu pre úspešné sušenie mrazom a skúma ich vzájomné vzťahy. Poukazuje na termochemické a termomechanické vlastnosti vo vode rozpustných amorfných materiálov tvoriacich základ efektívneho návrhu a vývoja pre tvorbu vzoriek na sušenie mrazom a zároveň s optimálnymi výsledkami a s minimom pokusov a omylov.

Autori Tsinontides a kol. [73] vo svojom článku z roku 2004 sa venujú celkovému procesu sušenia mrazom a k jeho vhodnému nastaveniu, aby sa zachovali kvalitatívne vlastnosti produktu. Na základe pilotných dát bol proces sušenia mrazom nastavený pre meranie vo väčšom výrobnom meradle, aby sa identifikovali nastavené a testovacie hodnoty parametrov procesu. Nastavenia boli použité v matematickom modeli na určenie koeficientov prenosu tepla lyofilizátora a následné vyhodnotenie odolnosti cyklu pri väčších prevádzkových podmienkach. Cyklus sušenia mrazom sa potom úspešne demonštroval pri nastavených hodnotách cieľových parametrov.

### 3 CIEĽ PRÁCE

Cieľom tejto diplomovej práce bolo pripraviť systém na báze natívneho hyalurónanu, ako vhodného nosiča pre liečivé látky využívajúce hydrofóbne interakcie medzi týmto biopolymérom a modelovými zlúčeninami (v tomto prípade fluorescenčnými sondami pyrén, perylén, prodan a DPH). Špecifické ciele práce boli nasledovné:

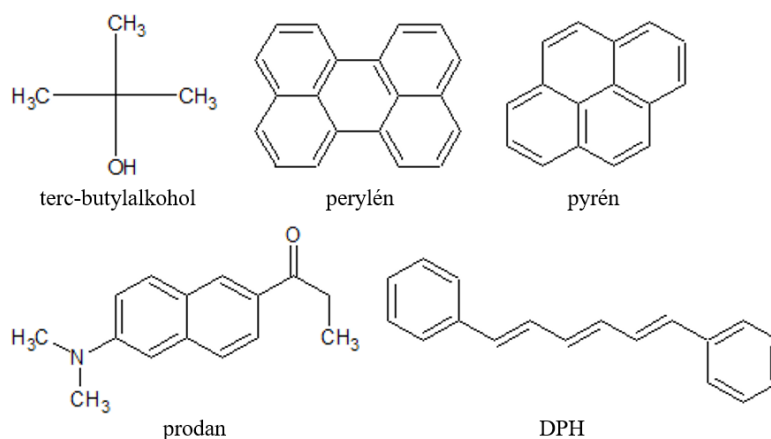
- vykonanie literárnej rešerše na zadanú tému
- nastavenie podmienok sušenia mrazom pomocou stanovenia najnižšej možnej teploty terc-butylalkoholu pre optimalizáciu sušenia mrazom – z hľadiska napr. degradácie vzorky, a) buď blízko  $T_g$ , b) alebo okolo eutektického bodu.
- príprava vzoriek s obsahom hyalurónanu a vybraných fluorescenčných sond, ktoré budú podrobené sušeniu mrazom
- vyhodnotenie účinnosti sušenia mrazom použitím metód infračervenej spektrometrie a skenovacieho elektrónového mikroskopu
- verifikácia interakcií modelových zlúčenín s polysacharidom (hyalurónanom) pomocou ustálenej a časovo rozlíšenej fluorescenčnej spektrometrie.

## 4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

Pre experimentálnu časť práce bol vybraný jeden nízkomolekulárny hyalurónan so strednou molekulovou hmotnosťou 13 kDa a vlhkosťou 9,6 hm. % a jeden vysokomolekulárny hyalurónan so strednou molekulovou hmotnosťou 1 910 kDa a vlhkosťou 13,27 hm. %. V základných biomedicínskych výskumoch a v predklinických testoch sa pripravujú a využívajú hyalurónové nosičové systémy s liečivými látkami, ako hydrofóbne molekuly. V tejto práci boli naopak použité, ako hydrofóbne látky, fluorescenčné sondy pyrén, perylén, N,N-Dimetyl-6-propionyl-2-naftylamín (prodan) a 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrién (DPH). Najdôležitejšími krokmi v príprave vzoriek bolo stanoviť najnižšiu možnú teplotu (blízko  $T_g$ , alebo okolo eutektického bodu) terc-butylalkoholu pre úspešné sušenie mrazom a vhodné nastavenie koncentrácií hyalurónanu a fluorescenčných sond v roztoku vzorky. Správne nastavenie parametrov lyofilizačného prístroja, aby bola lyofilizácia vzoriek čo najúčinnnejšia, bolo rovnako dôležité ako príprava vzoriek.

### 4.1 Použité chemikálie

- Natívny hyalurónan, stredná molekulová hmotnosť 13 kDa, výrobca Contipro (ČR);
- Natívny hyalurónan, stredná molekulová hmotnosť 1 910 kDa, č. šarže: 200117-3, výrobca Contipro (ČR);
- Demineralizovaná voda, výrobca ELGA LabWater (UK);
- Acetón (obsah 99,98 %), CAS: 67-64-1, č. šarže: PP/2020/07097, výrobca Lach-Ner s.r.o. (ČR);
- Terc-butylalkohol (Obr. 11) (bezvodý  $\geq 99,5$  %), CAS: 75-65-0, výrobca Penta (ČR);
- Pyrén (Obr. 11), CAS: 129-00-0, č. šarže: 430166/1, výrobca Fluka Chemie GmbH (Nemecko);
- Perylén (Obr. 11), CAS: 198-55-0, č. šarže: 384079/1, výrobca Fluka Chemie GmbH (USA);
- N,N-Dimetyl-6-propionyl-2-naftylamín (prodan) (Obr. 11), CAS: 70504-01-7, č. šarže: BCBD8898V, výrobca Sigma Aldrich (ČR);
- 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrién (DPH) (Obr. 11), CAS: 1720-32-7, č. šarže: MKCH8643, výrobca Sigma Aldrich (USA);
- Koloidná suspenzia oxidu kremičitého vo vode Ludox® HS-40, CAS: 7631-86-9, č. šarže: 102382114, výrobca Sigma Aldrich (Nemecko).



Obr. 11: Chemické štruktúry terc-butylalkoholu a fluorescenčných sond pyrén, perylén, prodan a 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrién (DPH) [74]–[78]

## 4.2 Použité prístroje, programy a pomôcky

- Parafilm<sup>®</sup> M, výrobca Bemis<sup>®</sup> (USA);
- Striekačkové filtre Whatman Puradisc 25, 25 mm, 1,0 µm Nylon, nesterilné, výrobca Cytiva (UK);
- PureLab<sup>®</sup> Classic, demineralizovaná voda, výrobca ELGA LabWater (UK);
- Analytická váha KERN, dielik 0,1 mg, výrobca KERN (Nemecko);
- Diferenčná skenovacia kalorimetria DSC Q2000 V24.11 Build 124, výrobca Thermal Analysis (UK);
- Softvér TA Universal Analysis, vyhodnocovanie dát z DSC;
- Laboratórna sušiareň s prirodzenou cirkuláciou vzduchu Ecocell<sup>®</sup>, výrobca BMT Medical Technology s.r.o. (ČR);
- SP VirTis AdVantage Pro Lyofilizátor s Intellitronics<sup>™</sup> kontrolórom, výrobca SP Scientific (USA);
- Thermo Scientific<sup>™</sup> Nicolet<sup>™</sup> iS<sup>™</sup> 50 FTIR Spektrometer, výrobca ThermoFisher Scientific (USA);
- Program OMNIC 9, vyhodnocovanie spektier z FTIR spektrometru;
- Quorum/Polaron SC7640 Auto/Manual High Resolution Sputter Coater, výrobca Quorum Technologies (UK);
- Skenovací elektrónový mikroskop SEM ZEISS EVO<sup>®</sup> LS10, výrobca CARL ZEISS AG (Nemecko);
- Zobrazovanie SEM: Softvér ZEISS SmartSem, program SmartSEM User Interface;
- Prvková analýza: Program AZtec, Oxford Instruments;
- FS5 Fluorescenčný spektrometer; výrobca Edinburgh Instruments (UK);
- Softvér Fluoracle<sup>®</sup>, vyhodnocovanie meraní z fluorescenčného spektrometra;
- Horiba Jobin Yvon Fluorocube fluorescenčný spektrometer pre meranie časovo rozlíšenej (*time-resolved*) fluorescencie; výrobca HORIBA (Japonsko);
- Softvér Data Station v2.6, meranie časovo rozlíšenej fluorescencie;
- Softvér Decay Analysis v6.6, vyhodnocovanie a spracovanie dát z časovo rozlíšeného fluorescenčného spektrometru;
- Softvér Microsoft Office Excel 2016, spracovanie dát.

## 4.3 Postup prípravy vzoriek

Nezávisle boli pripravené vzorky pre diferenčnú skenovaciu kalorimetriu a vzorky prvej a druhej série pre proces sušenia mrazom (lyofilizácie). Zlyofilizované vzorky boli spracované pre analýzu lyofilizačného koláča. Následne boli zlyofilizované vzorky upravené pre meranie ustálenej a časovo rozlíšenej fluorescencie.

### 4.3.1 Príprava vzoriek pre diferenčnú skenovaciu kalorimetriu

Príprava vzoriek prebiehala pri laboratórnej teplote. Pripravovali sa vzorky s rôznou hmotnostnou koncentračnou radou TBA a deionizovanej vody do 12 cm<sup>3</sup> vialiek. Koncentračná rada TBA bola urobená od 0–100 hm. % s krokom 10 %. Finálny objem (10 cm<sup>3</sup>) vzorky v jednej vialke bol zvolený tak, aby koncentrácia hyalurónanu v roztoku činila 0,5 g·dm<sup>-3</sup>. Finálny objem TBA vo vzorke bol získaný prepočítaním podľa jeho hustoty na objem. Vždy jedna vzorka o danej koncentračnej rade TBA obsahovala jeden druh hyalurónanu.

Pred začiatkom prípravy vzoriek sa sklená fľaša TBA ponorila do plastovej nádoby s teplou vodou, kvôli jeho vlastnosti kryštalizovať pod teplotou 25,5 °C. Použili sa práškové vzorky hyalurónanov o dvoch molekulových hmotnostiach a o už zmeraných hodnotách vlhkosti. Následne bola navážka hyalurónanu prepočítaná na jeho vlhkosť. Na analytickej váhe s presnosťou na 0,000 1 g bol navážený vždy jeden druh hyalurónanu (Tab 3). Do vialiek s hyalurónanom bol podľa Tab 3 napipetovaný objem deionizovanej vody a vzorka sa nechala premiešavať na magnetickom miešadle pokiaľ sa hyalurónan úplne nerozpustil. Doba miešania u LMW hyalurónanu (13 kDa) trvala 15 min a u HMW hyalurónanu (1 910 kDa) okolo 45 min.

Akonáhle bol hyalurónan rozpustený, napipetoval sa na základe Tab 3. daný objem TBA a nechala sa celá vzorka miešať približne 30 min pokiaľ sa roztok úplne nezhomogenizoval. Celkový počet vzoriek bol 22. Takto pripravené vzorky sa udržiavali v chladničke do merania.

Tab 3: Vypočítané navážky 13 kDa a 1 910 kDa hyalurónanu (HYA) a objemy s rôznou hmotnostnou koncentračnou radou TBA a deionizovanej vody vo vzorke

$c$ TBA [hm. %]	$V_{TBA}$ [cm <sup>3</sup> ]	$V_{H_2O}$ [cm <sup>3</sup> ]	$m$ HYA 13 kDa [mg]	$m$ HYA 1 910 kDa [mg]
0	0	10,00	5,5	–
			–	5,8
10	1,25	8,75	5,5	–
			–	5,8
20	2,43	7,57	5,5	–
			–	5,8
30	3,55	6,45	5,5	–
			–	5,8
40	4,61	5,39	5,5	–
			–	5,8
50	5,62	4,38	5,5	–
			–	5,8
60	6,58	3,42	5,5	–
			–	5,8
70	7,50	2,50	5,5	–
			–	5,8
80	8,37	1,63	5,5	–
			–	5,8
90	9,20	0,80	5,5	–
			–	5,8
100	10,00	0	5,5	–
			–	5,8

#### 4.3.2 Príprava vzoriek pre proces sušenia mrazom

Vzorky pre proces sušenia mrazom obsahovali mimo TBA, deionizovanej vody a hyalurónanu, aj fluorescenčné sondy. Príprava vzoriek prebiehala pri laboratórnej teplote v dvoch sériách líšiacich sa koncentraciami hyalurónanu a fluorescenčných sond.



### ***Prvá séria vzoriek***

Na prípravu vzoriek prvej série sme sa odkazovali na postup pilotnej práce Michalicová a kol. z roku 2017 [64].

Pre túto sériu vzoriek sa použili fluorescenčné sondy perylén a DPH v kryštalickej forme. Ich finálna koncentrácia v roztoku činila  $10^{-4}$  mol·dm<sup>-3</sup>. Ďalej bol použitý LMW (13 kDa) a HMW (1 910 kDa) hyalurónan o finálnej koncentrácii v roztoku 0,5 g·dm<sup>-3</sup>. Jedna vzorka obsahovala vždy iba jednu sondu s jedným druhom hyalurónanu. Celkový objem jednej vzorky bol 50 cm<sup>3</sup>. Dohromady bolo pripravených 14 vzoriek (dva hyalurónany × dve fluorescenčné sondy × tri opakovania + dve slepé vzorky bez fluorescenčných sond).

Najprv bola opäť navážka hyalurónanov prepočítaná na ich zmeranú vlhkosť a následne boli pripravené 300 cm<sup>3</sup> zásobné roztoky LMW a HMW hyalurónanu. Na analytickej váhe bolo navážených do dvoch 600 cm<sup>3</sup> kadičiek 0,165 9 g 13 kDa hyalurónanu a 0,173 0 g 1 910 kDa hyalurónanu. Do kadičiek bolo naliatych 300 cm<sup>3</sup> deionizovanej vody. Všetko sa nechalo miešať na magnetickej miešačke pokiaľ sa hyalurónany nerozpustili. Doba miešania u 13 kDa hyalurónanu bola približne 30 min a u 1 910 kDa cca 60 min. Počas miešania zásobných roztokov hyalurónanu boli pripravené roztoky s fluorescenčnými sondami.

Do šiestich 250 cm<sup>3</sup> kadičiek bolo na analytickej váhe navážených 1,2 mg DPH a do ďalších šiestich 250 cm<sup>3</sup> kadičiek bolo navážených 1,3 mg perylénu. Tieto sondy boli následne rozpustené v 10 cm<sup>3</sup> acetónu. Po rozpustení sa dali vzorky so sondami a acetónom do laboratórnej sušiarne na 56 °C (bod varu acetónu) a acetón sa nechal odpariť.

Po odparení acetónu sa do kadičky so sondou nalialo 10 cm<sup>3</sup> TBA v kvapalnej forme a nechal sa miešať pokiaľ sa všetka sonda nerozpustila. Potom sa nalial do vzoriek 40 cm<sup>3</sup> 13 kDa alebo 1 910 kDa zásobného roztoku hyalurónanu. Kadičky so vzorkami sa prekryli parafilmom. Takto finálny 50 cm<sup>3</sup> roztok sa nechal miešať jeden.

### ***Druhá séria vzoriek***

V tejto sérii vzoriek sa použili rovnaké fluorescenčné sondy ako v prvej sérii (perylén a DPH v kryštalickej forme) a k nim sa pridali fluorescenčné sondy pyrén a prodan. Ich finálna koncentrácia v roztoku bola  $2 \cdot 10^{-6}$  mol·dm<sup>-3</sup>. Ďalej bol rovnako použitý LMW (13 kDa) a HMW (1 910 kDa) hyalurónan o finálnej koncentrácii v roztoku 0,4 g·dm<sup>-3</sup>. Jedna vzorka obsahovala vždy iba jednu sondu s jedným druhom hyalurónanu. Celkový objem jednej vzorky bol 50 cm<sup>3</sup>. Dohromady bolo pripravených 10 vzoriek (dva hyalurónany × štyri fluorescenčné sondy × jedno opakovanie + dve slepé vzorky bez fluorescenčných sond).

Najprv bola opäť navážka hyalurónanov prepočítaná na ich vlhkosť a následne boli pripravené 300 cm<sup>3</sup> zásobné roztoky LMW a HMW hyalurónanu. Na analytickej váhe bolo navážených do dvoch rôznych 600 cm<sup>3</sup> kadičiek 0,132 5 g 13 kDa hyalurónanu a 0,138 3 g 1 910 kDa hyalurónanu. Do kadičiek bolo naliatych 300 cm<sup>3</sup> deionizovanej vody. Všetko sa nechalo miešať na magnetickej miešačke pokiaľ sa hyalurónany nerozpustili. Doba miešania u 13 kDa hyalurónanu bola približne 20 min a u 1 910 kDa cca 50 min. Počas miešania zásobných roztokov hyalurónanu boli pripravené roztoky s fluorescenčnými sondami.

Koncentrácia fluorescenčných sond v zásobnom roztoku bola zvolená na  $5 \cdot 10^{-4}$  mol·dm<sup>-3</sup>. Množstvo acetónu potrebného na rozpustenie sondy bola získaná tak, aby koncentrácia sondy vo finálnom 50 cm<sup>3</sup> roztoku činila  $2 \cdot 10^{-6}$  mol·dm<sup>-3</sup>. Do dvoch 250 cm<sup>3</sup> kadičiek bolo na analytickej váhe navážených 5,8 mg DPH, do ďalších dvoch 6,3 mg perylénu, do ďalších dvoch

5,1 mg pyrénu a do posledných dvoch bolo navážených 5,7 mg produktu. Tieto sondy boli následne rozpustené v 20 cm<sup>3</sup> acetónu. Po rozpustení sa dali vzorky so sondami a acetónom do laboratórnej sušiarne na 56 °C a acetón sa nechal odpariť.

Po odparení acetónu sa do kadičky so sondou nalialo 10 cm<sup>3</sup> kvapalného TBA a nechal sa miešať pokiaľ sa všetka sonda nerozpustila. Potom sa nalialo do vzoriek 40 cm<sup>3</sup> 13 kDa, alebo 1 910 kDa hyalurónanu zo zásobných roztokov. Kadičky so vzorkami sa prekryli parafilmom. Takto finálny 50 cm<sup>3</sup> roztok sa nechal miešať jeden deň.

#### **4.3.3 Príprava vzoriek na analýzu lyofilizačného koláča**

Kadičky so zlyofilizovanými vzorkami boli prekryté novým parafilmom, aby lyofilizačné koláče neabsorbovali vzdušnú vlhkosť. Koláče neboli nijak upravované pre meranie na ATR-FTIR spektrometri a skenovacím elektrónovým mikroskopom. Vzorky boli skladované pri laboratórnej teplote pokiaľ neboli postupne premerané.

#### **4.3.4 Príprava vzoriek pre fluorescenčný spektrometer**

Lyofilizačné koláče boli po sušení mrazom upravené pre meranie na fluorescenčnom spektrometri. Úprava lyofilizačných koláčov pre prvú a druhú sériu vzoriek sa líšila.

##### *Úprava vzoriek prvej série*

Príprava vzoriek na meranie na fluorescenčnom spektrometri prebiehala podľa postupu práce Michalicová a kol. (2017) [64]. Finálna koncentrácia fluorescenčnej sondy v roztoku (vrátane slepých vzoriek) bola 5·10<sup>-6</sup> mol·dm<sup>-3</sup> a koncentrácia hyalurónanu činila 0,025 g·dm<sup>-3</sup>.

Do vzoriek s lyofilizačnými koláčmi bolo naliatych 50 cm<sup>3</sup> deionizovanej vody. Vzorky prekryté parafilmom sa nechali miešať 60 min pokiaľ sa lyofilizačné koláče úplne nerozpustili.

Koncentrácia fluorescenčných sond v zásobnom roztoku bola zvolená na 10<sup>-4</sup> mol·dm<sup>-3</sup>. Do jednej 250 cm<sup>3</sup> kadičky bolo navážených 1,3 mg perylénu a do druhej 1,2 mg DPH. Tieto sondy boli následne rozpustené v 10 cm<sup>3</sup> acetónu. Po rozpustení sa dali vzorky so sondami a acetónom do laboratórnej sušiarne na 56 °C a acetón sa nechal odpariť.

Po odparení acetónu sa do kadičky so sondou preliala vzorka (slepá vzorka) rozpusteného lyofilizačného koláča v 50 cm<sup>3</sup> deionizovanej vody. Vzorka sa nechala miešať aspoň 60 min.

Pripravilo sa 14 50 cm<sup>3</sup> odmerných baniek. Z každého roztoku vzoriek sa odpipetovalo 2,5 cm<sup>3</sup> a tých bolo napipetovaných do 50 cm<sup>3</sup> odmernej banky. Následne boli banky so vzorkou doplnené po risku deionizovanou vodou a poriadne premiešané. Takto pripravené odmerné banky so vzorkou sa uschovávali pri laboratórnej teplote, pokiaľ sa vzorky nepremerali na fluorescenčnej spektrometrii.

##### *Úprava vzoriek druhej série*

Lyofilizačné koláče po sušení mrazom obsahovali 0,4 g·dm<sup>-3</sup> hyalurónanu a 2·10<sup>-6</sup> mol·dm<sup>-3</sup> fluorescenčnej sondy. Aby boli vzorky vhodné na meranie na ustálenom fluorescenčnom a časovo rozlíšenom fluorescenčnom spektrometri, tak sa do každej slepej vzorky pridal jeden druh fluorescenčnej sondy s koncentráciou rádovo 10<sup>-6</sup> mol·dm<sup>-3</sup> a koncentrácia hyalurónanu v roztoku bola určená na 1,0 g·dm<sup>-3</sup>. V tejto práci bola zvolená finálna koncentrácia sond v roztoku 5·10<sup>-6</sup> mol·dm<sup>-3</sup>.

Do všetkých vzoriek s lyofilizačnými koláčmi bolo naliatych 20 cm<sup>3</sup> deionizovanej vody. Vzorky prekryté parafilmom sa nechali miešať po dobu 60 min, pokiaľ sa lyofilizačné koláče úplne nerozpustili.

Koncentrácia fluorescenčných sond v zásobnom roztoku bola zvolená na 5·10<sup>-4</sup> mol·dm<sup>-3</sup>. Množstvo acetónu potrebného na rozpustenie sondy bola získaná tak, aby koncentrácia sondy vo finálnom 20 cm<sup>3</sup> roztoku slepej vzorky činila 2·10<sup>-6</sup> mol·dm<sup>-3</sup>.

Do dvoch 250 cm<sup>3</sup> kadičiek bolo navážených 2,3 mg prodanu. Táto sonda bola následne rozpustená v 8 cm<sup>3</sup> acetónu. Po rozpustení sa dali vzorky so sondou a acetónom do laboratórnej sušiarne na 56 °C a acetón sa nechal odpariť.

Po odparení acetónu sa do kadičiek s prodanom preliali vzorky (slepé vzorky s 13 kDa a 1 910 Da hyalurónanom) rozpusteného koláča v 20 cm<sup>3</sup> deionizovanej vode. Slepá vzorka so sondou sa nechala miešať 60 min. V prípade zakalenia roztoku boli vzorky prefiltrované cez mikrofilter s nylonovou membránou o veľkosti pórov 1,0 μm do 22 cm<sup>3</sup> vialiek.

Bola pripravená ďalšia perylénová slepá vzorka obsahujúca perylén s deionizovanou vodou. Malé množstvo perylénu sa nasypalo do 100 cm<sup>3</sup> kadičky a zalialo sa cca 10 cm<sup>3</sup> acetónu. Sonda sa nechala rozpustiť v acetóne. Po rozpustení sa dala kadička so vzorkou do laboratórnej sušiarne na 56 °C a acetón sa nechal odpariť. Po odparení acetónu sa do kadičky s perylénom nalialo 20 cm<sup>3</sup> deionizovanej vody. Slepá vzorka s perylénom sa nechala miešať po dobu 30 min. V prípade zakalenia roztoku boli vzorky prefiltrované cez mikrofilter s nylonovou membránou o veľkosti pórov 1,0 μm do 22 cm<sup>3</sup> vialiek.

Zásobný roztok (slepá vzorka) pyrénu v deionizovanej vode s koncentráciou približne 10<sup>-7</sup> mol·dm<sup>-3</sup> bol už pripravený v laboratóriu.

Takto pripravené vzorky sa uschovávali prekryté parafilmom pri laboratórnej teplote, pokiaľ sa vzorky nepremerali na fluorescenčnom spektrometri.

#### **4.3.5 Príprava vzoriek na časovo rozlíšený fluorescenčný spektrometer**

Na meranie na časovo rozlíšenom fluorescenčnom spektrometri sa použili vzorky prvej a druhej série, ktoré boli už pripravené pre ustálenú fluorescenčnú spektrometriu. Vzorky sa už ďalšie neupravovali.

#### **4.4 Postup merania**

Aby sa mohli nastaviť správne parametre sušenia mrazom, bolo najprv podstatné stanoviť najnižšiu možnú teplotu TBA – z hľadiska napr. degradácie vzorky, a) buď blízko T<sub>g</sub>, b) alebo okolo eutektického bodu.

Pripravené vzorky sa najprv zlyofilizovali a na lyofilizačných koláčoch boli vykonávané ďalšie merania. Na vyhodnotenie účinnosti procesu sušenia mrazom boli vykonané nasledujúce metódy merania: ATR-FTIR spektrometria, skenovací elektrónový mikroskop, ustálená a časovo rozlíšená fluorescenčná spektrometria.

##### **4.4.1 Proces merania na diferenčnom skenovanom kalorimetri**

Diferenčná skenovacia kalorimetria (DSC) je termická technika, pri ktorej sa meria rozdiel množstva tepla potrebného na zvýšenie teploty meranej vzorky a referenčnej vzorky ako funkcie teploty. Teplotný program pre DSC analýzu spočíva v udržiavaní a v lineárnom zvyšovaní teploty vzorky ako funkcie času. Meracia vzorka a referenčná vzorka sa počas

experimentu udržiavajú na takmer rovnakej teplote. DSC sa využíva v štúdiu fázových prechodov ako je topenie, teploty sklenených prechodov, alebo exotermické rozklady. Počas týchto prechodov dochádza k zmene energie, alebo tepelnej kapacity [79].

Vzorky s rôznou koncentračnou radou hm. % TBA s hyalurónanom boli premerané na diferenčnom skenovacom kalorimetri DSC Q2000 V24.11 Build 124. Namerané dáta boli analyzované v programe TA Universal Analysis. Integrál tepelného toku poskytol kvantitatívnu informáciu o zmene entalpie pri fázovom prechode v jednotkách  $J \cdot g^{-1}$ .

#### 4.4.2 Proces sušenia mrazom

Princípom sušenia mrazom je difúzna operácia využívajúca princípu vákuového sublimačného sušenia, čiže proces prebiehajúci na rozhraní pevnej a plynnej fáze. Voda sublimuje z pevnej látky (ľad) na plyn (paru), keď majú molekuly dostatok energie k narušeniu štruktúry. Dej prebieha pri hodnotách teploty a atmosférického tlaku pod trojným bodom rozpúšťadla. Aby látka mohla nadobudnúť akúkoľvek konkrétnu fázu, teplota a tlak musia byť v rámci určitého rozsahu. V póroch pevného materiálu dochádza ku zdieľaniu hmoty a tepla [80].

Metóda sušenia mrazom sa skladá z troch procesov, a to z mrazenia, primárneho a sekundárneho sušenia. Nastavenia parametrov týchto procesov patrí k najdôležitejším krokom k správne a úspešnému sušeniu vzoriek mrazom. V procese mrazenia sa materiál mrazí pod jeho eutektický bod. Fáza mrazenia je najpodstatnejším krokom v procese sušenia mrazom, pretože materiál sa môže ľahko zničiť, ak je zlé nastavenie [80].

Počas fázy primárneho sušenia sa tlak v lyofilizátore zníži a dodáva sa dostatok tepla na to, aby voda z materiálu dokázala sublimovať. V tejto fáze sušenia je cca 95 hm. % vody z materiálu sublimovaných. Tento dej prebieha vo vákuu, ktorý urýchľuje proces sušenia [80].

Cieľom sekundárneho sušenia je odstránenie nezamrznutých molekúl vody na povrchu materiálu, ktoré neboli odstránené v primárnom sušení. V tejto fáze sa narušujú väzby medzi absorbovanou vodou a povrchom matrice. Na konci celého procesu sušenia mrazom je konečný obsah zvyškovej vody v produkte okolo 1 až 4 hm. % [80].

Proces a podmienky sušenia mrazom pre vzorky prvej a druhej série sa líšili.

#### *Proces sušenia mrazom pre vzorky prvej série*

Na proces sušenia mrazom bol použitý prístroj SP VirTis AdVantage Pro Lyofilizátor s Intellitronics™ kontrolórom. Pripravené vzorky na proces sušenia mrazom boli prekryté parafilmom, ktorý bol dostatočne prepichaný kvôli zvýšeniu účinnosti procesu sušenia mrazom. Kadičky so vzorkami sa naskladali do lyofilizátora, ktorý sa uzatvoril a boli nastavené nasledujúce parametre (Tab. 4 a Tab. 5):

*Tab. 4: Nastavenia parametrov procesu mrazenia lyofilizátora pre vzorky prvej série. T predstavuje teplotu vnútri lyofilizátora. Rampa predstavuje množstvo času, potrebné k dosiahnutiu danej hodnoty teploty kroku. Držať predstavuje dobu, počas ktorej sa udržiava teplota kroku*

Krok	T [°C]	Rampa [min]	Držať [min]	Krok	T [°C]	Rampa [min]	Držať [min]
1	25	60	30	6	-13	45	60
2	2	45	10	7	-15	45	60
3	0	60	15	8	-	-	-
4	-5	30	15	9	-	-	-
5	-10	30	30	10	-	-	-

Tab. 5: Nastavenia parametrov procesu sušenia lyofilizátora pre vzorky prvej série. T predstavuje teplotu vnútri lyofilizátora. Rampa predstavuje množstvo času, potrebné k dosiahnutiu danej hodnoty teploty kroku. Držať predstavuje dobu, počas ktorej sa udržiava teplota kroku. Vákuum predstavuje momentálny tlak v lyofilizátore počas daného kroku

Krok	T [°C]	Rampa [min]	Držať [min]	Vákuum [mTorr]	Krok	T [°C]	Rampa [min]	Držať [min]	Vákuum [mTorr]
1	-15	15	60	200	7	-5	30	600	100
2	-15	15	240	180	8	-3	30	600	80
3	-14	15	300	160	9	-1	30	700	60
4	-13	10	300	140	10	0	30	600	40
5	-12	10	600	120	11	5	60	600	20
6	-10	10	600	100	12	20	120	800	20

#### Proces sušenia mrazom pre vzorky druhej série

Na proces sušenia mrazom bol použitý rovnaký lyofilizátor ako v prvej sérii. Pripravené vzorky na sušenie mrazom boli prekryté parafilmom, ktorý bol dostatočne prepichaný kvôli zvýšeniu účinnosti procesu sušenia mrazom. Kadičky so vzorkami sa umiestnili do lyofilizátora, ktorý sa uzatvoril a boli nastavené nasledujúce parametre (Tab. 6 a Tab. 7):

Tab. 6: Nastavenia parametrov procesu mrazenia lyofilizátora pre vzorky druhej série. T predstavuje teplotu vnútri lyofilizátora. Rampa predstavuje množstvo času, potrebné k dosiahnutiu danej hodnoty teploty kroku. Držať predstavuje dobu, počas ktorej sa udržiava teplota kroku

Krok	T [°C]	Rampa [min]	Držať [min]	Krok	T [°C]	Rampa [min]	Držať [min]
1	2	60	30	6	-15	30	180
2	0	15	30	7	-	-	-
3	-5	30	15	8	-	-	-
4	-10	30	30	9	-	-	-
5	-12	30	60	10	-	-	-

Tab. 7: Nastavenia parametrov procesu sušenia lyofilizátora pre vzorky druhej série. T predstavuje teplotu vnútri lyofilizátora. Rampa predstavuje množstvo času, potrebné k dosiahnutiu danej hodnoty teploty kroku. Držať predstavuje dobu, počas ktorej sa udržiava teplota kroku. Vákuum predstavuje momentálny tlak v lyofilizátore počas daného kroku.

Krok	T [°C]	Rampa [min]	Držať [min]	Vákuum [mTorr]	Krok	T [°C]	Rampa [min]	Držať [min]	Vákuum [mTorr]
1	-15	10	300	100	7	-9	30	600	200
2	-14	10	300	120	8	-5	30	600	250
3	-13	10	300	140	9	0	30	600	350
4	-12	10	300	160	10	1	30	300	400
5	-11	10	300	180	11	5	60	300	450
6	-10	10	300	200	12	20	120	300	500

#### 4.4.3 Meranie vzoriek na ATR-FTIR spektrometri

Infračervená spektroskopia patrí do skupiny nedeštruktívnych analytických metód. Metóda je založená na princípe interakcie infračerveného žiarenia (IR) s danou vzorkou. Základom IČ spektroskopie sú atómové vibrácie molekuly. Každá molekula absorbuje špecifickú frekvenciu a energiu IČ žiarenia a dochádza ku zmene rotačno-vibračných energetických stavov molekuly

v závislosti na zmenách dipólového momentu molekuly. Pri infračervenej spektroskopii s Fourierovou transformáciou (FTIR) sa interferometrický signál z detektoru matematicky prevedie na IČ spektrum. Namerané spektrá sú pásové, lebo zmena vibračného stavu je sprevádzaná zmenou stavu rotačného. Technika zoslabeného úplného odrazu (ATR – *Attenuated Total Reflection*) funguje na princípe úplného odrazu žiarenia na fázovom rozhraní vzorky a merajúceho ATR kryštálu s vysokým indexom lomu [81].

IČ oblasť elektromagnetického spektra sa pohybuje vo vlnovej dĺžke od 2 do 15  $\mu\text{m}$ , pričom sa rozdeľuje do troch oblastí: do blízkej IČ (NIR) oblasti ( $12\,800\text{--}4\,000\text{ cm}^{-1}$ ), strednej IČ (MIR) oblasti ( $4\,000\text{--}200\text{ cm}^{-1}$ ) a ďalej IČ (FIR) oblasti ( $200\text{--}10\text{ cm}^{-1}$ ). Najviac používaná MIR oblasť poskytuje kvantitatívnu analýzu, identifikáciu a charakterizáciu látok [82].

Inštrumentácia a podmienky merania IČ spektra na FTIR spektrometri značky Nicolet™ iS™ 50 FTIR Spektrometer boli pre vzorky prvej a druhej série a pre čistý TBA rovnaké. Meranie prebehlo pri laboratórnej teplote. V programe OMNIC boli nastavené parametre merania: vlnočet  $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$  s rozlíšením  $8\text{ cm}^{-1}$  a s celkovým počtom akumulovaných skenov 32. ATR kryštál bol pomocou buničiny očistený destilovanou vodou a etanolom. Ako pozadie bol zaznamenaný atmosférický vzduch v laboratóriu. Po skontrolovaní nastavenia a po zaznamenaní pozadia prebehlo samotné meranie vzoriek.

Na vyčistený ATR kryštál bolo pomocou pinzety a špachtle rovnomerne nanosené také množstvo lyofilizačného koláča, aby pokrýval celú plochu ATR kryštála. Skontrolovalo sa priľnutie vymeniteľnej hlavy prítlačného zariadenia na vzorku ležiacu na ATR kryštáli a prebehlo meranie. Po skončení merania sa ATR kryštál očistil od vzorky destilovanou vodou a etanolom. Tento postup sa celkovo opakoval 24-krát.

Na vyčistený ATR kryštál bola pomocou plastovej pipety kvapnutá jedna kvapka TBA v kvapalnej forme a prebehlo meranie.

Namerané dáta v programe OMNIC boli uložené a exportované do softvéru MS Excel. Namerané spektrá boli upravené do grafu so závislosťou absorpcie (–) od vlnočtu ( $\text{cm}^{-1}$ ).

#### **4.4.4 Meranie vzoriek na skenovacom elektrónovom mikroskope**

Elektrónový mikroskop využíva miesto viditeľného svetla urýchlený zväzok elektrónov a sústavu elektromagnetických šošoviek. Vlnová dĺžka urýchlených elektrónov môže dosahovať až 6 pm, čo je o tri rády menšie ako u viditeľného svetla, a to umožňuje o veľa väčšie zväčšenie obrazu. Využíva sa zväčšenie  $3\,000\text{--}300\,000\times$ . Skenovací elektrónový mikroskop (SEM) skúma, analyzuje a charakterizuje zloženie a morfológiu štruktúr s vysokou rozlišovacou schopnosťou. Tvorba obrazu v SEM vzniká elasticou, alebo neelastickou interakciou elektrónových lúčov so vzorkou.

Najpoužívanejší typom detektoru je detektor sekundárnych elektrónov. Sekundárne elektróny sa používajú hlavne na topografickú analýzu materiálu ako je vizualizácia povrchu vzorky. Topografický obraz závisí od toho, koľko sekundárnych elektrónov detektor zaznamená a je ovplyvnený zónou emisie sekundárnych elektrónov. Sekundárne elektróny, ktoré nezaznamená detektor, budú vytvárať tmavšie oblasti v kontraste ako tie oblasti, ktorých elektróny zachytí detektor [83]

V tejto práci boli pri meraní vzoriek na SEM zaznamenávané sekundárne a späťne odrazené elektróny. Merané boli lyofilizačné koláče vzoriek. Pomocou pinzety a špachtle sa naniesla malá časť vzorky na kovový stojan. Stojany so vzorkami sa vložili do naprašovačky značky

Quorum/Polaron SC7640 a prístroj sa spustil. Naprašovanie pre SEM je proces nanášania ultratenkej vrstvy elektricky vodivého kovu, v tomto prípade zlata, na nevodivú, alebo slabo vodivú vzorku. Po pokovovaní boli stojany so vzorkami vložené do elektrónového mikroskopu značky SEM ZEISS EVO® LS10. Snímky boli zaznamenané pri zväčšení 1 000× a 5 000×. SEM obrazy boli spracované v programe SmartSEM User Interface. Prvková analýza vzorky bola vykonaná u dvoch náhodných vzoriek z prvej a druhej série. Na vyhodnotenie prvkovej analýzy sa použil program AZtec, Oxford Instruments.

#### **4.4.5 Meranie vzoriek na fluorescenčnom spektrometri v ustálenom stave**

Fluorescencia je typ luminiscencie, ktorá je spôsobená absorpciou fotónov systémom v základnom stave, ktorý následne prejde do excitovaného stavu. Pri deexcitácii sú systémom emitované fotóny o dlhšej vlnovej dĺžke, ale o menšej energii, než absorbované žiarenie [84].

Fluorescenčný spektrometer je zariadenie merajúce parametre viditeľného a UV spektra fluorescencie. Typ svetelného zdroja často závisí od typu testovanej vzorky. Medzi najviac používané svetelné zdroje patria ortuťové a xenónové výbojky [84].

Vnútri prístroja prechádza polychromatický lúč cez excitačný monochromátor skladajúci sa zo vstupnej a výstupnej štrbiny a zo zrkadiel. Podľa polohy zrkadiel sa filtruje konkrétna vlnová dĺžka. Štrbinami sa nastavuje intenzita lúča vychádzajúceho z monochromátora [84].

Pri meraní fluorescencie sa používajú kremenné kyvety. Na kyvetu dopadá monochromatické žiarenie, čo spôsobí excitáciu molekúl vo vzorke. Žiarenie emitované vzorkou prechádza cez emisný monochromátor, ktorý je umiestnený v 90°uhle od vzorky vzhľadom k excitačnému monochromátoru. Vlnové dĺžky dopadajúceho žiarenia sú filtrované, a len vybrané vlnové dĺžky sú prepustené a zaznamenané detektorom. Ako detektor sa používa fotonásobič fungujúci na princípe fotoelektrického javu. Signál je následne prevedený na elektrickú informáciu. Výstupom merania je fluorescenčné spektrum [84].

Na meranie ustálenej fluorescencie sa použil prístroj FS5 Edinburgh fluorescenčný spektrometer a dve kremenné kyvety, jedna pre perylén kvôli jeho vlastnosti sa viacej udržiavať na povrchu a tým pádom kvôli možnosti kontaminácie ďalších vzoriek, a druhá pre ostatné fluorescenčné sondy. Meranie prebehlo pri laboratórnej teplote. Priebeh merania u prvej a druhej série vzoriek sa trochu líšil.

#### ***Meranie prvej série vzoriek***

Nastavenia parametrov merania záležali na použitej fluorescenčnej sonde vo vzorke. Pre vzorky obsahujúcich perylén bol nastavený emisný sken v rozmedzí 430–650 nm s krokom 1 nm a excitovali sa pri vlnovej dĺžke 410 nm.

U vzoriek obsahujúcich fluorescenčnú sondu DPH bol nastavený emisný sken v rozmedzí 400–550 nm, pričom excitačný monochromátor bol nastavený na vlnovú dĺžku 350 nm.

Pred meraním sa kremenná kyveta vyčistila destilovanou vodou a etanolom. Kyveta sa vypláchla troškou vzorky. Následne sa celá kyveta naplnila vzorkou, utreli sa strany kyvety buničinou, kyveta bola vložená do kyvetového priestoru prístroja a prebehlo meranie. Po skončení merania sa kyveta so vzorkou vyliala, umyla etanolom a destilovanou vodou, vypláchla a naplnila sa druhou vzorkou a prebehlo ďalšie meranie. Výsledky boli exportované do MS Excelu. Tento postup sa opakoval u všetkých vzoriek.

### ***Meranie druhej série vzoriek***

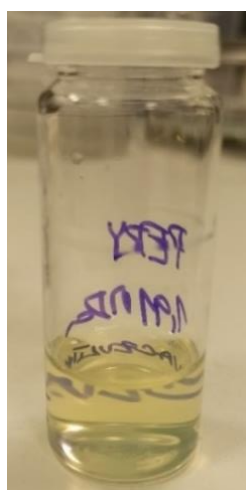
Nastavenia parametrov merania záležali na použitej fluorescenčnej sonde vo vzorke. Pre všetky vzorky obsahujúcich perylén bol nastavený emisný sken v rozmedzí 430–700 nm s krokom 1 nm a excitovali sa pri vlnovej dĺžke 410 nm. Excitačný sken bol nastavený na rozsah 310–360 nm s krokom 1 nm a emisný monochromátor na vlnovú dĺžku 392 nm.

U všetkých vzoriek obsahujúcich sondu pyrén bolo emisné spektrum merané v rozsahu 360–530 nm a excitovali sa pri vlnovej dĺžke 335 nm. V tomto spektre boli sledované intenzity prvého (373 nm) a tretieho (383 nm) maxima. Excitačný sken bol meraný pri rozsahu vlnových dĺžok 310–360 nm a emisný monochromátor bol nastavený na vlnovú dĺžku 392 nm.

Pre všetky vzorky so sondou prodan bol emisný sken meraný v rozsahu 380–650 nm s krokom 1 nm a excitačný sken v rozsahu 310–360 nm. Excitačný monochromátor bol nastavený na vlnovú dĺžku 360 nm a emisný na 392 nm.

Meranie vzoriek obsahujúcich sondu DPH mali nasledujúce nastavenia: emisný sken bol nastavený v rozsahu 400–600 nm a excitačný sken v rozsahu 310–360 nm, excitačný monochromátor bol nastavený na vlnovú dĺžku 385 nm a emisný monochromátor na 392 nm.

Pred meraním sa kremenná kyveta vyčistila destilovanou vodou a etanolom. Kyveta sa vypláchla troškou vzorky. Následne sa celá kyveta naplnila vzorkou, utreli sa strany kyvety buničinou, kyveta bola vložená do kyvetového priestoru prístroja a prebehlo meranie. Po skončení merania sa kyveta so vzorkou vyliala, umyla, vypláchla a naplnila sa druhou vzorkou a prebehlo ďalšie meranie. Výsledky boli exportované do MS Excelu. Tento postup sa opakoval u všetkých vzoriek.



*Obr. 12: Vzorka druhej série obsahujúca rozpustený lyofilizačný koláč s perylénom a 1 910 kDa hyalurónanom v deionizovanej vode*

#### **4.4.6 Meranie vzoriek na časovo rozlíšenom fluorescenčnom spektrometri**

Časovo rozlíšená fluorescenčná (TRF) spektrometria dopĺňa informácie o fotofyzikálnych, fotochemických a fotobiologických vlastnostiach vzorky, ktoré sa metódou ustálenej fluorescenčnej spektrometrie nedajú získať. Pomocou tejto metódy je možné skúmať dynamické procesy študovaného materiálu a merať doby života excitovaných stavov fluoroforov vzorky, určiť vplyv prostredia na registrovaný signál a študovať interakcie v roztoku [84].

Existujú dve fundamentálne časovo rozlíšené techniky, a to pulzná metóda a metóda fázovo modulovaného budiaceho žiarenia. Princípom pulznej fluorescenčnej spektrometrie je excitácia



vzorky úzkym, krátkym pulzom svetla a zaznamenanie exponenciálnej krivky odpovedajúcej závislosti intenzity emisie od času [85].

Fázovo modulovaná fluorescenčná spektrometria používa sínusovo modulované žiarenie pri rôznych frekvenciách a vytvára tzv. harmonickú odozvu vzorky, ktorá vzniká Fourierovou transformáciou odozvy pulzu. Všeobecne platí, že fázovo modulovaná fluorescenčná spektrometria funguje vo frekvenčnej doméne a pulzná fotometria v časovej doméne [84], [86].

Časovo rozlíšené fluorescenčné záznamy boli merané na fluorescenčnom spektrometri Horiba Jobin Yvon Fluorocube a meranie prebiehalo pri laboratórnej teplote. Bol použitý softvér Data Station v2.6 na meranie časovej fluorescencie. Nastavenia parametrov pri meraní vzoriek prvej a druhej série sa trochu líšili.

Pred meraním bolo podstatné vybrať a pripojiť k prístroju správnu diódu, ktorá má podobnú excitačnú vlnovú dĺžku ako použité fluorescenčné sondy. Emisný monochromátor sa nastavoval podľa použitej fluorescenčnej sondy a na meranie signálu lampy (promptu) sa používala vlnová dĺžka použitej diódy. Prompt je krivka zodpovedajúca najkratšiemu možnému času dohasínania, ktorý je možné na danom prístroji merať. Ako prompt k meraniu signálu diódy bola použitá koloidná suspenzia oxidu kremičitého vo vode (Ludox®). Hodnota TAC (*Time-to-amplitude convertor*) sa zadáva zvyčajne ako 20-násobok odhadovanej dĺžky života excitovaného stavu. Filtre sa používali v tom prípade, keď hodnota softvérového ukazovateľa percentuálneho zaťaženia detektoru ( $\alpha$ ) presahovala 2 %, čo by mohlo veľkým množstvom dopadajúcich fotónov poškodiť detektor. Maximálna hodnota počtu fotónov (*counts*) záležala na rýchlosti merania, ale zvyčajne dosahovala hodnoty počtu 1 000 a 5 000 fotónov. Na meranie sa použila jedna kremenná kyveta pre perylén a druhá kyveta pre ostatné sondy.

U vzoriek s DPH bola použitá dióda s vlnovou dĺžkou 361 nm, ale vzorky sa nedali zmerať – signál pri rôznych obmenách nastavenia parametrov sa stále rovnal nule (viď kapitola 5.5.4 v časti Výsledky a diskusia).

U vzoriek s prodanom bola použitá dióda s vlnovou dĺžkou 361 nm. Tab. 8 obsahuje nastavené parametre pre rôzne vzorky s prodanom (štrbina, emisný monochromátor, oneskorenie (*delay*), frekvencia  $f$ , TAC, počet fotónov).

Tab. 8: Nastavenia parametrov pre vzorky obsahujúcich fluorescenčnú sondu prodan na časovo rozlíšenej fluorescenčnej spektrometrii. Meranie predstavuje druh meranej vzorky (meranie normálnej vzorky a slepej vzorky/blanku)

$M_w$ HYA [kDa]	$c$ HYA [g·dm <sup>-3</sup> ]	Merané vzorky normal/ blank	Štrbina	Emisia [nm]	<i>Delay</i> [ns]	$f$ [MHz]	TAC [ns]	Počet fotónov
13	0,4	Normal	16	530	70	1	50	5 000
1 910	0,4	Normal	16	530	70	1	50	5 000
13	0,4	Blank Blank	32	530 555	70	1	50	5 000 1 000
1 910	0,4	Blank	32	530	70	1	50	1 000

U všetkých vzoriek s perylénom bola použitá dióda s vlnovou dĺžkou 389 nm. Boli nastavené nasledujúce parametre (zhrnutie, Tab. 9):

Tab. 9: Nastavenia parametrov pre vzorky obsahujúcich fluorescenčnú sondu perylén na časovo rozlíšenej fluorescenčnej spektrometrii. Meranie predstavuje druh meranej vzorky (meranie exciméru, normálnej vzorky a slepej vzorky/blanku)

$M_w$ HYA [kDa]	$c$ HYA [g·dm <sup>-3</sup> ]	Merané vzorky excimér/ normal/ blank	Štrbina	Emisia [nm]	Delay [ns]	$f$ [MHz]	TAC [ns]	Počet fotónov
1 910	0,4	Normal	8	440	65	1	100	5 000
		Excimér	12	580				
13	0,4	Normal	8	440	65	1	100	5 000
		Excimér	16	580				
1 910	0,5	Blank	16	440	65	1	100	5 000
		Excimér blanku	32	580				
13	0,5	Normal, 3 opakovania	16	440	65	1	100	5 000
		Excimér		580				1 000
1 910	0,5	Normal, 3 opakovania	16	440	65	1	100	5 000
		Excimér		580				1 000
–	–	Blank	32	440	65	1	100	5 000
		Excimér blanku		580				

Neboli získané vhodné výsledky vzoriek obsahujúcich sondu pyrén z časovo rozlíšeného fluorescenčného spektrometru (viď kapitola 5.5.1 v časti Výsledky a diskusia).

Postup merania spočíval v tom, že kremenná kyveta sa vyčistila destilovanou vodou a etanolom. Kyveta sa vypláchla troškou vzorky. Následne sa celá kyveta naplnila vzorkou, utreli sa strany kyvety buničinou, kyveta sa vložila do kyvetového priestoru prístroja a prebehlo meranie. Po skončení merania sa kyveta so vzorkou vyliala, umyla etanolom a destilovanou vodou, vypláchla a naplnila sa druhou vzorkou. Následne prebehlo ďalšie meranie. Tento postup sa opakoval u všetkých vzoriek. Vzorky s perylénom mali vlastnú kremennú kyvetu.

Na vyhodnocovanie a spracovanie dát z TRF spektrometru sa použil softvér Decay Analysis v6.6. Samotné vyhodnotenie TRF sa riadi matematickými kritériami, hodnotou chí-kvadrát testu, analýzou reziduí, a aj predpokladaným správaním sa vzorky v situačnom kontexte. Chí-kvadrát ( $\chi^2$ ) test dobrej zhody je štatistický test používaný na skúmanie štruktúry dát a posúdenie, či získané dáta z náhodnej vzorky (pozorované početnosti) pochádzajú z konkrétneho pravdepodobnostného rozdelenia (očakávané početnosti).

Analýza reziduí je súčasť diagnostiky modelu v regresnej analýze, ktorá pre odhad parametrov modelu využíva metódu najmenších štvorcov. Reziduá sú rozdiely medzi predpovedanými a pozorovanými hodnotami. Reziduá teda predstavujú tú časť validačných údajov, ktorú model nevysvetlil. Body analýzy reziduí sú okolo modelu rozmiestnené náhodne a približne rovnomerne. Na tomto princípe sme robili analýzu reziduí (fitovali) v tejto práci.

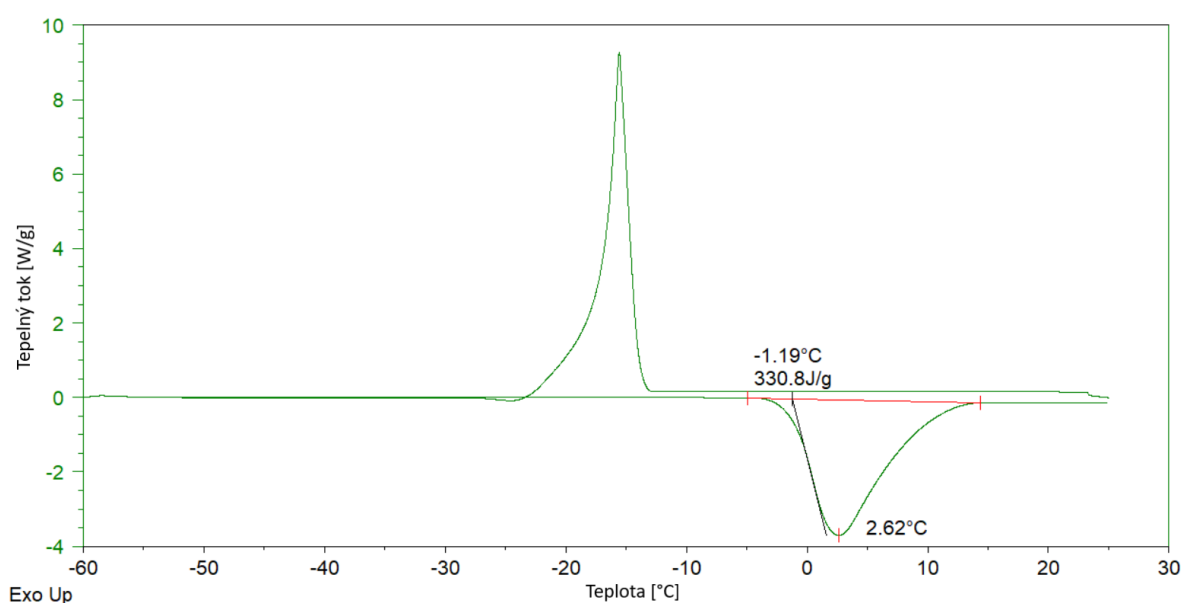
## 5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

### 5.1 Výsledky terc-butylalkoholu z diferencnej skenovacej kalorimetrie

Existujú dve normy zobrazenia smeru zmien tepelného toku a práve preto sa do DSC záznamu vždy uvádza orientácia zmien. V tomto prípade sa meranie riadilo normou *International Confederation for Thermal Analysis (ICTA)*, podľa ktorej sú endotermické zmeny znázornené dole a exotermické smerom hore.

Z DSC záznamov vzoriek sa bral do úvahy pík predstavujúci endotermické zmeny. Integrál tepelného toku poskytoval kvantitatívnu informáciu, t.j. zmenu entalpie pri fázovom prechode v jednotkách  $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ . Zaznamenávala sa teplota a entalpia topenia (endotermická zmena).

Na Obr. 13 je znázornený DSC záznam vzorky s 13 kDa hyalurónanom a 0 hm. % TBA. Z grafu sa dá pozorovať počiatok topenia zmesi pri teplote  $-1,19\text{ }^\circ\text{C}$  s maximálnou teplotou píku  $2,62\text{ }^\circ\text{C}$  a s entalpiou topenia  $330,8\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ . V prípade tejto vzorky, teplota píku  $2,62\text{ }^\circ\text{C}$  bola tou najvyššou zo všetkých vzoriek s rôznymi hm. % TBA.

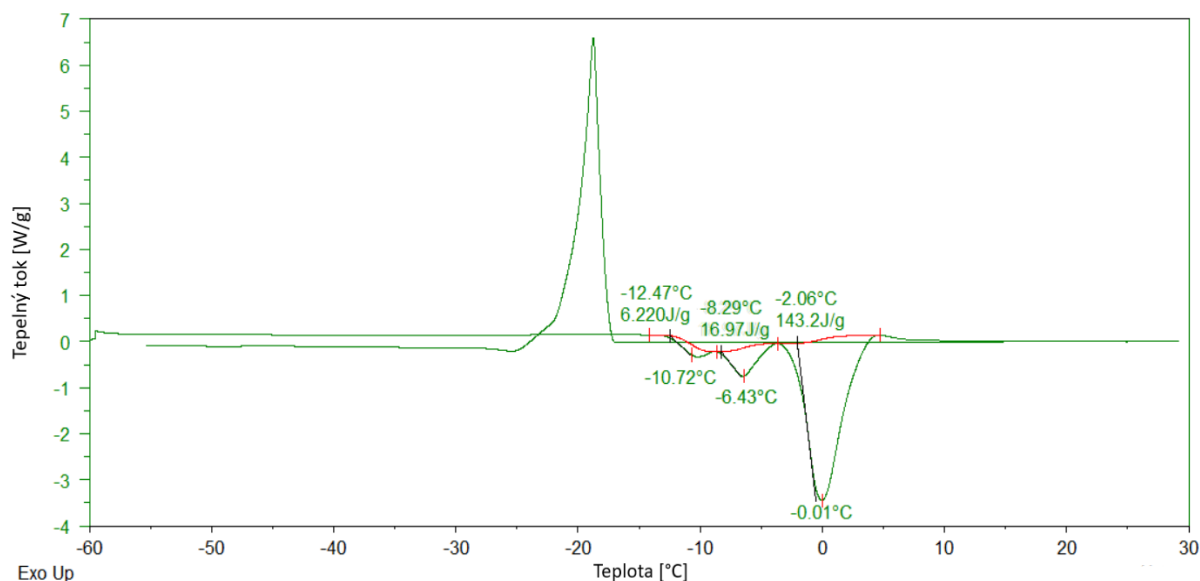


Obr. 13: DSC záznam vzorky s 13 kDa hyalurónanom a 0 hm. % TBA. Závislosť tepelného toku od teploty procesu. Exotermické zmeny sú zobrazené píkom smerom hore a endotermické píkom dole

Na Obr. 14 je uvedený DSC záznam vzorky s 13 kDa hyalurónanom a 60 hm. % TBA. Tento graf bol kľúčový k stanoveniu najnižšej možnej teploty (blízko  $T_g$ , alebo okolo eutektického bodu) TBA pre úspešné sušenie mrazom. Z grafu sa dá pozorovať počiatok topenia zmesi pri teplote  $-12,47\text{ }^\circ\text{C}$  s maximálnou teplotou píku  $-0,01\text{ }^\circ\text{C}$  a s celkovou entalpiou topenia  $166,39\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ . Dva menšie píky pri teplote píku  $-10,72\text{ }^\circ\text{C}$  a  $-6,43\text{ }^\circ\text{C}$  súvisia s jednotlivými typmi subpopulácií vody, tzn. *water subpopulations (quasi-crystalline and solid-like)* [87]. V prípade tejto vzorky, teplota počiatku topenia  $-12,47\text{ }^\circ\text{C}$  bola tou najnižšou zo všetkých vzoriek s rôznymi hm. % TBA, čo bolo podstatnou teplotou pri nastavovaní parametrov procesu sušenia mrazom. K ďalším meraniam sa používala zaokrúhlená maximálna teplota  $-15\text{ }^\circ\text{C}$  (z teploty  $-12,47\text{ }^\circ\text{C}$ ).

Zhrňujúca tabuľka výsledkov merania teploty a entalpie topenia zmesi TBA s rôznou hmotnostnou koncentráciou a hyalurónanu vo vode v procese endotermickej zmeny z DSC je

uvedená v kapitole 9, Príloha 1. Pri meraní vzorky so 70 hm. % TBA došlo k chybe merania, ale neovplyvnilo to výsledky.



Obr. 14: DSC záznam vzorky s 13 kDa hyalurónanom a 60 hm. % TBA. Závislosť tepelného toku od teploty procesu. Exotermické zmeny sú zobrazené píkom smerom hore a endotermické smerom dole

## 5.2 Proces sušenia mrazom

Príprava vzoriek na sušenie mrazom sa konala v dvoch sériách s rôznou koncentráciou hyalurónanu a fluorescenčnej sondy. Rovnako sa série vzoriek mierne líšili v nastaveniach procesu sušenia mrazom. Vzorky boli nami pozorované počas všetkých krokov sušenia mrazom a dohliadali sme na správny spôsob procesu. Boli pozorované jemné zmeny tvorby lyofilizačných koláčov v procese sušenia mrazom u prvej a druhej série vzoriek.

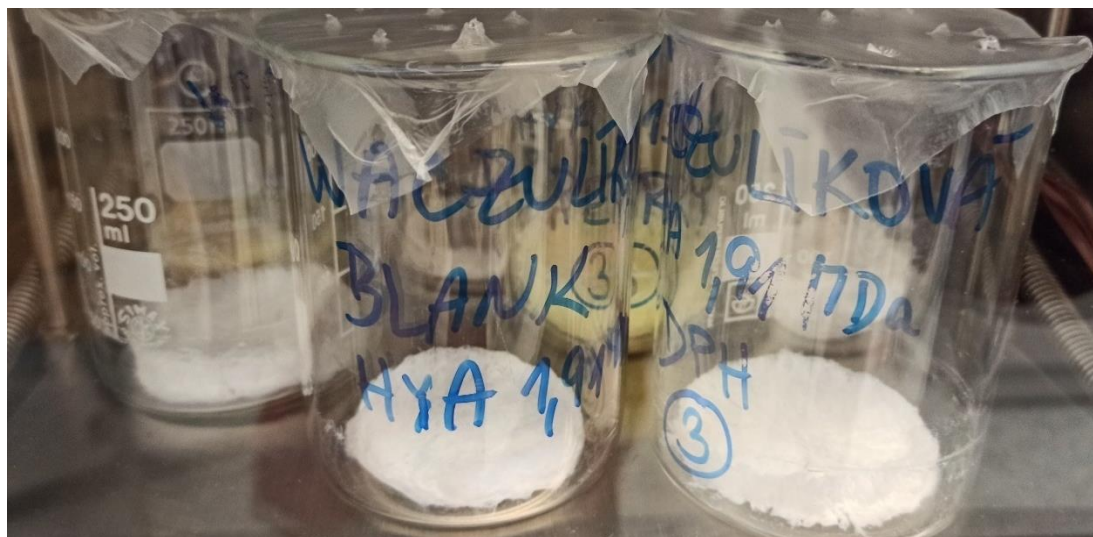
### 5.2.1 Výsledky procesu sušenia mrazom prvej série vzoriek

Prvá séria vzoriek obsahovala  $0,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  hyalurónanu a  $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  fluorescenčnej sondy. Prvá séria vzoriek sa tiež líšila od druhej série nastavením procesných krokov a tlakov lyofilizátora.

Proces mrazenia prvej série vzoriek sa skladal zo siedmych krokov a začínal na  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  a končil pri  $-15 \text{ }^\circ\text{C}$ . Tento proces dohromady trval 535 min (podrobnosti nastavenia, Tab. 4). Na rozdiel od druhej série, vzorky prvej série sa najprv oteplili v prvom kroku mrazenia na bod topenia TBA  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , kvôli prípadnému tuhnutiu TBA pod teplotu  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , a následne sa začali vzorky mraziť až na hodnotu  $-15 \text{ }^\circ\text{C}$  v šiestich krokoch. Maximálna teplota mrazenia  $-15 \text{ }^\circ\text{C}$  bola stanovená na základe výsledkov TBA zmeraného na DSC.

Proces sušenia vzoriek prvej série bol rozdelený do 12 krokov. Prvý krok sušenia bol nastavený na teplotu, pri ktorej skončil proces mrazenia, čiže na  $-15 \text{ }^\circ\text{C}$ . Dvanásť, finálny krok sušenia mrazom bol nastavený na  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Stúpanie teploty pri sušení nemá takú intervalovú pravidelnosť ako má proces sušenia vzoriek druhej série. Celý proces sušenia trval 6 375 min, čo je takmer štyri a pol dňa. Na rozdiel od druhej série vzoriek sa tlak v lyofilizátore počas celého procesu sušenia znižoval. Začínal na 200 mTorr a skončil na 20 mTorr (podrobnosti krokov sú v Tab. 5).

Pri vizuálnom posúdení mali lyofilizačné koláče po sušení mrazom páperovitý vzhľad s vláknitou štruktúrou, avšak obsahovali aj frakcie vzájomne prepletených vlákien a kompaktnjšie časti, čo naznačuje, že koláče mohli obsahovať zvyšok rozpúšťadla. Tým, že sme v procese primárneho sušenia znižovali tlak, mohlo vplyvom zmeny podmienok dôjsť k degradácii vzoriek. Koláče obsahujúce fluorescenčnú sondu perylén boli zafarbené do žltá. Lyofilizačné koláče prvej série vzoriek sú pozorovateľné na Obr. 15.



Obr. 15: Lyofilizačné koláče prvej série vzoriek po skončení sušenia mrazom

### 5.2.2 Výsledky procesu sušenia mrazom druhej série vzoriek

Druhá séria vzoriek obsahovala menej hyalurónanu ako prvá séria, konkrétne  $0,4 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ , a tiež nižšiu koncentráciu fluorescenčnej sondy ( $2\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). Druhá séria vzoriek sa od prvej série líšila aj nastavením krokov mrazenia a sušenia.

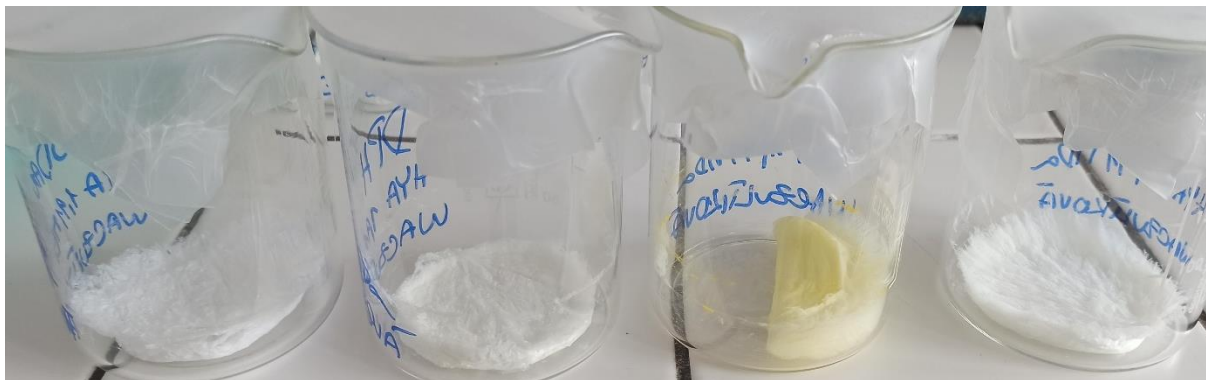
Proces mrazenia druhej série vzoriek sa skladal zo šiestich krokov. Proces začína pri  $2 \text{ }^\circ\text{C}$  a končí pri  $-15 \text{ }^\circ\text{C}$ . Tento šesťkrokový proces trval 540 min (podrobnosti sú uvedené v Tab. 6). Na rozdiel od prvej série vzoriek, kde sa vzorky najprv ohriali na hodnotu bodu topenia TBA ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) v prvom kroku mrazenia, v druhej sérii vzoriek sa začalo hneď v prvom kroku znižovaním teploty na  $2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Z prípravy druhej série vzoriek vyplynulo, že vzorky nie je nutné v prvom kroku procesu mrazenia ohrievať na teplotu  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , ako bolo nastavené v prvej sérii vzoriek, keďže TBA v zmiešaní s vodou nekryštalizoval pri laboratórnej teplote ( $22 \text{ }^\circ\text{C}$ ) a v roztokoch vzoriek sme nepozorovali kryštáliky TBA. Maximálna teplota mrazenia  $-15 \text{ }^\circ\text{C}$  bola stanovená pomocou výsledkov TBA zmeraného na DSC.

Proces sušenia vzoriek druhej série bol rozdelený do 12 krokov. Prvý krok sušenia bol nastavený na teplotu, pri ktorej skončil proces mrazenia, čiže na  $-15 \text{ }^\circ\text{C}$ . Dvanásť, finálny krok sušenia mrazom bol nastavený na  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Proces sušenia pri druhej sérii vzoriek mal pravidelnejšie stúpanie teploty ako pri vzorkách prvej série. V druhej sérii stúpala teplota po jednostupňovom intervale do kroku 7 a následne teplota stúpala rýchlejšie na hodnotu  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  do kroku 12. Celý proces sušenia sa v porovnaní s prvou sériou skrátil na 4 860 min (približne tri a pol dňa). Na rozdiel od prvej série vzoriek sa tlak v lyofilizátore počas celého procesu sušenia zvyšoval, čo malo pozitívny dopad na tvorbu lyofilizačných koláčov. Tlak v prvom kroku bol



nastavený na 100 mTorr a finálny tlak v kroku 12 mal hodnotu tlaku 500 mTorr (podrobnosti krokov sú v Tab. 7).

Lyofilizačné koláče druhej série po sušení mrazom boli pri vizuálnom posúdení viacej páperovité, vláknité a menej kompaktné ako lyofilizačné koláče prvej série. Tým, že sa po procese mrazenia išlo s tlakom hneď dole a pomaly sa zvyšoval počas procesu sušenia, nedochádzalo k degradácii polysacharidu, čiže sa nenarušovali jeho intermolekulárne väzby. Na výsledných koláčoch sme vizuálne nepozorovali žiadne nehomogenity. Koláče obsahujúce fluorescenčnú sondu perylén boli zafarbené do žltá. Lyofilizačné koláče druhej série vzoriek sú zobrazené na Obr. 16.



Obr. 16: Lyofilizačné koláče druhej série vzoriek po skončení sušenia mrazom

### 5.3 Analýza lyofilizačných koláčov

Analýza lyofilizačných koláčov spočívala v odhalení zvyškového množstva pomocného rozpúšťadla TBA v koláčoch a hydrofóbnych interakcií medzi fluorescenčnou sondou a molekulami hyalurónanu. Predpokladalo sa, že ak bol proces sušenia mrazom úspešný, v koláčoch (okrem slepých vzoriek) došlo k hydrofóbnym interakciám medzi sondou a hyalurónanom, a súčasne by koláče nemali obsahovať žiadne zvyškové množstvo TBA. Prípadná prítomnosť TBA vo vzorkách by ovplyvňovala získané fluorescenčné spektrá a intenzita fluorescencie by sa zvýšila o príspevok fluorescenčnej sondy emitujúcej z prostredia TBA. Bolo preto nutné lyofilizačné koláče otestovať niekoľkými analytickými metódami.

Prvou metódou analýzy lyofilizačných koláčov bola ATR-FTIR spektrometria. Vyhodnotenie nameraných spektier spočívalo v porovnávaní nameraných IČ spektier vzoriek obsahujúcich fluorescenčnú sondu a hyalurónan so spektrom slepých vzoriek obsahujúcich iba hyalurónan bez sondy. Ďalej sa porovnávali spektrá vzoriek so spektrom čistého TBA. Pomocou knižnice spektier boli nájdené a charakterizované oblasti a absorpčné pásy funkčných skupín v nameraných spektrách.

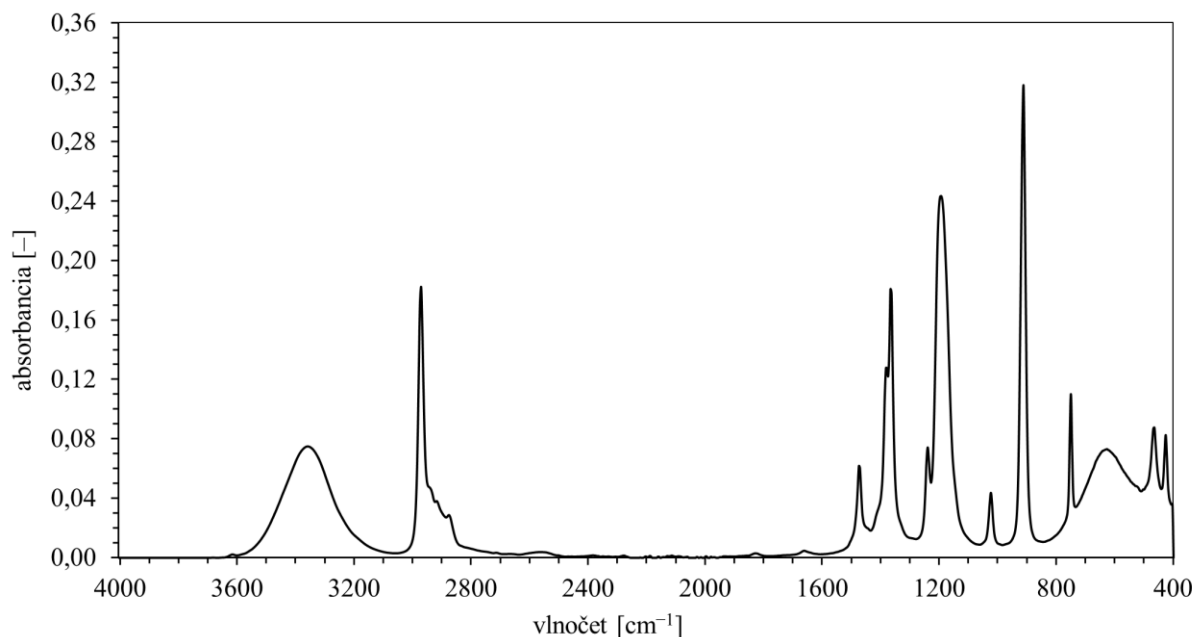
Druhou použitou analytickou metódou bol skenovací elektrónový mikroskop (SEM). Opisovali sa a porovnávali sa charaktery povrchu koláčov prvej a druhej série vzoriek pri zväčšení 1 000× a 5 000×. Súčasne bola u vybraných koláčov vykonaná aj prvková analýza, ktorá nás informovala o čistote lyofilizačných koláčov.

#### 5.3.1 ATR-FTIR spektrometria

Vyhodnotenie prebehlo u oboch sérií vzoriek rovnakým spôsobom. Porovnávali sa absorpčné pásy ATR-FTIR spektier vzoriek obsahujúcich hyalurónan a fluorescenčnú sondu so

spektrami čistého TBA a so spektrami slepých vzoriek obsahujúcich hyalurónan bez sondy. Cieľom tohto vyhodnocovania bolo overiť prítomnosť TBA v lyofilizačných koláčoch po celom procese sušenia mrazom. Prítomnosť TBA v koláčoch by znamenala zníženú kvalitu výsledného produktu sušenia mrazom. Ďalším dôvodom je fakt, že TBA je klasifikovaný ako nebezpečná látka. Preto, aj keď je TBA ako pomocné rozpúšťadlo vhodným médiom pre sušenie mrazom, treba jeho zostatkové množstvo v potenciálnom nosičovom systéme založenom na hyalurónane prísne monitorovať. Overenie biokompatibility a toxicity patrí preto k štandardným testom farmakologicky aktívnych látok a systémov s potenciálnym využitím v humánnej medicíne.

Na Obr. 17 je uvedené ATR-FTIR spektrum čistého TBA. Interpretácia absorpčných pásov bola vykonaná na základe odbornej literatúry [88]–[92]. V oblasti charakteristických (skupinových) vibrácií ( $4\,000\text{--}1\,500\text{ cm}^{-1}$ ) sa nachádza ostrý intenzívny absorpčný pás lokalizovaný pri  $2\,970\text{ cm}^{-1}$ , ktorý je pripisovaný valenčnej asymetrickej vibrácii C–H väzieb v metylových skupinách molekuly TBA. Táto funkčná skupina je rovnako potvrdená v oblasti tzv. odtlačku prsta t. j.  $1\,500\text{--}400\text{ cm}^{-1}$  prítomnosťou ostrého pásu pri  $1\,469\text{ cm}^{-1}$ , ktorý zodpovedá deformačnej vibrácii troch metylových skupín  $-\text{CH}_3$ . V spektre dominuje široký absorpčný pás pri  $3\,340\text{ cm}^{-1}$ , ktorý je pripisovaný valenčnej symetrickej vibrácii alkoholovej O–H väzby v molekule TBA. Absorpčný pás pri vlnócte  $1\,361\text{ cm}^{-1}$  patrí skeletálnej vibrácii C–C väzby  $\text{sp}^3$  hybridizácie. Ostrý absorpčný pás pri  $1\,377\text{ cm}^{-1}$  sa pripisuje dáždnikovej deformačnej vibrácii  $-\text{CH}_3$  skupín. Široký pás pri vlnócte  $609\text{ cm}^{-1}$  zodpovedá deformačnej mimorovinnej vibrácii O–H väzieb v terciárnom alkohole. Intenzívny absorpčný pás pri  $1\,188\text{ cm}^{-1}$  je jednoznačne pripisovaný valenčnej symetrickej vibrácii C–O väzieb u vyššie zmienených alkoholových jednotiek TBA. Najvyšší ostrý pík v IČ spektre pri vlnócte  $910\text{ cm}^{-1}$  patrí valenčnej symetrickej vibrácii C–C–O väzby.



Obr. 17: ATR-FTIR spektrum čistého terc-butylalkoholu

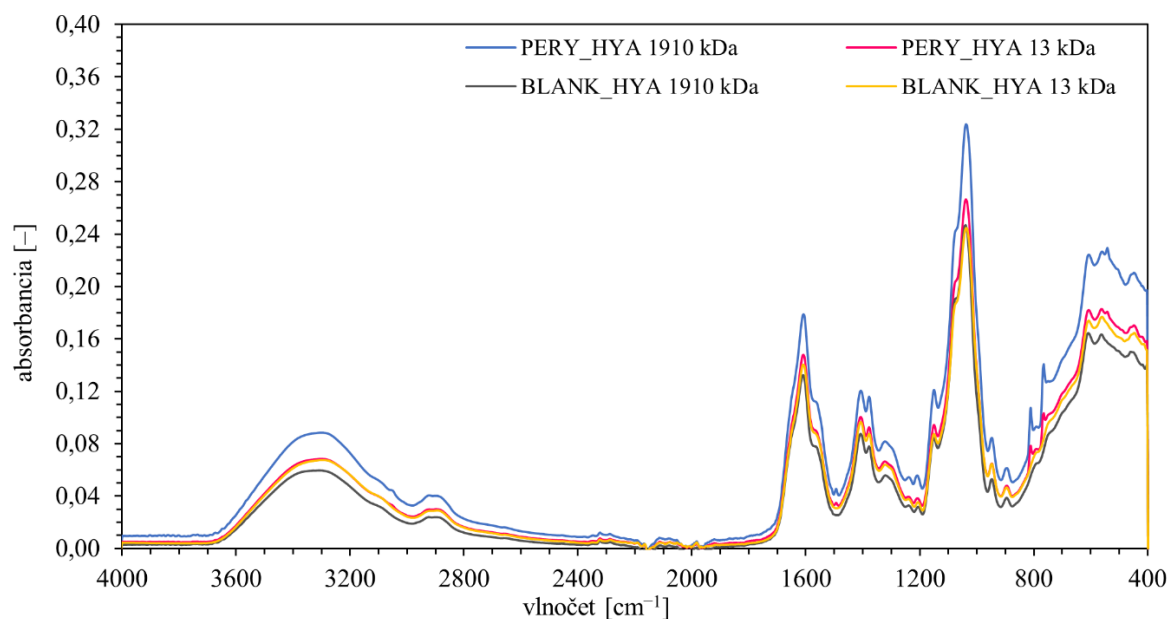
IČ spektrá lyofilizačných koláčov obsahujúcich hyalurónan a fluorescenčné sondy perylén, pyrén, prodan a DPH sú medzi sebou veľmi podobné a obsahujú rovnaké typy

charakteristických vibrácií. Na prvý pohľad je vidieť, že spektrá vzoriek koláčov (Obr. 18–Obr. 20) sa líšia od spektra TBA (Obr. 17). Spektrum vzorky je porovnávané so spektrom slepej vzorky obsahujúcej hyalurónan s rovnakou strednou molekulovou hmotnosťou ako majú vzorky bez sondy. Spektrá slepých vzoriek sa v niektorých častiach spektra líšia od študovaných vzoriek, pretože im chýbajú niektoré typy vibrácií, ktoré zodpovedajú signálu fluorescenčných sond.

Na Obr. 18 sú zobrazené spektrá fluorescenčnej sondy perylén s hyalurónanom so strednou molekulovou hmotnosťou 1 910 kDa a 13 kDa a spektrá slepých vzoriek obsahujúcich iba hyalurónan. Na spektrách je možné pozorovať široký absorpčný pás pri vlnócte  $3\,316\text{ cm}^{-1}$ , ktorý je pripisovaný valenčnej symetrickej vibrácii alkoholovej O–H väzby v molekule hyalurónanu, vyšším harmonickým vibráciám N–H väzby v sekundárnych amidoch a v tomto prípade aj vodíkovým mostíkom medzi –OH skupinami (zvýšková vlhkosť vzorky). Alkoholová skupina sa nachádza v TBA, a aj v molekule hyalurónanu, ale nepotvrďuje to jednoznačne prítomnosť TBA. Pri vlnócte  $3\,097\text{ cm}^{-1}$  sa nachádza veľmi slabo viditeľný absorpčný pás, ktorý zodpovedá valenčnej symetrickej vibrácii C–H väzby v aromatických jednotkách. Tento typ väzby sa nachádza práve v peryléne. Menej intenzívny pík lokalizovaný pri  $2\,892\text{ cm}^{-1}$  zodpovedá valenčnej asymetrickej vibrácii C–H väzby. Absorpčný pás identifikovaný pri  $1\,457\text{ cm}^{-1}$  je pripisovaný valenčnej vibrácii C=C väzby v aromatickej štruktúre perylénu. Tento pás nám potvrďuje prítomnosť hydrofóbných interakcií medzi sondou a molekulami hyalurónanu v lyofilizačných koláčoch. Keďže slepe vzorky sondy perylén neobsahovali a zároveň molekula hyalurónanu neobsahuje aromatický kruh, ani dvojné väzby medzi uhlíkmi, tak spektrá slepých vzoriek tento pás nezobrazovali. Prítomnosť sekundárnych amidov bola v FTIR spektre vzorky so sondou a hyalurónanom, okrem iného, potvrdená aj dvoma intenzívnymi a ostrými absorpčnými pásmi, ktorých špecifická absorpcia nastávala pri  $1\,631\text{ cm}^{-1}$  a  $1\,589\text{ cm}^{-1}$ . Prvý absorpčný pás, ktorý zodpovedá vibrácii karbonylu v sekundárnom amide, je na spektre vyobrazený len ako mierna deformácia a vytvára tzv. rameno na druhom intenzívnom páse. Tento druhý absorpčný pás je pripisovaný valenčnej symetrickej vibrácii C–N väzby a asymetrickej deformačnej vibrácii N–H väzby v –NH–CO–funkčných skupinách. Ďalší intenzívny absorpčný pás pri  $1\,600\text{ cm}^{-1}$  patrí symetrickej valenčnej C=O vibrácii karbonylu v karboxyláte. Absorpčný pás pri vlnócte  $1\,369\text{ cm}^{-1}$  taktiež potvrďuje prítomnosť valenčných vibrácií sekundárnych amidov v molekule hyalurónanu. Intenzívny absorpčný pás pri  $1\,373\text{ cm}^{-1}$  zodpovedá deformačnej vibrácii karboxylátu –CO<sup>–</sup> a dáždnikovej deformačnej vibrácii –CH<sub>3</sub> skupín. Menej intenzívny pás pri  $1\,207\text{ cm}^{-1}$  je pripisovaný valenčnej vibrácii C–O väzby v karboxylovej skupine na molekule hyalurónanu. Absorpčný pás pri  $1\,145\text{ cm}^{-1}$  určuje vibráciu C–O–C väzby v glykozidovej väzbe. Pásky pri  $1\,052\text{ cm}^{-1}$  a  $1\,029\text{ cm}^{-1}$  patria valenčnej symetrickej vibrácii C–O väzby v alkoholových skupinách. Intenzívny pás pri vlnócte  $1\,052\text{ cm}^{-1}$  je ale charakteristický aj pre vibráciu C–O–C éterovej väzby v sacharidovej jednotke. V oblasti tzv. odtlačku prsta môžeme nájsť deformačné, mimorovinné a tzv. „oop“ vibrácie C–H väzby v aromatickej jednotke a rovnako aj dublet intenzívnych absorpčných pásov pri  $806\text{ cm}^{-1}$  a  $760\text{ cm}^{-1}$ , ktoré sú pripisované výlučne deformačnej rovinnej vibrácii N–H väzby v sekundárnych amidoch. Tieto vibračné módy sú v odbornej literatúre označované ako *wagging*. Na spektrách slepých vzoriek je tento dublet absorpčných pásov vyobrazený veľmi slabými nábehmi pásov. V slepých vzorkách je



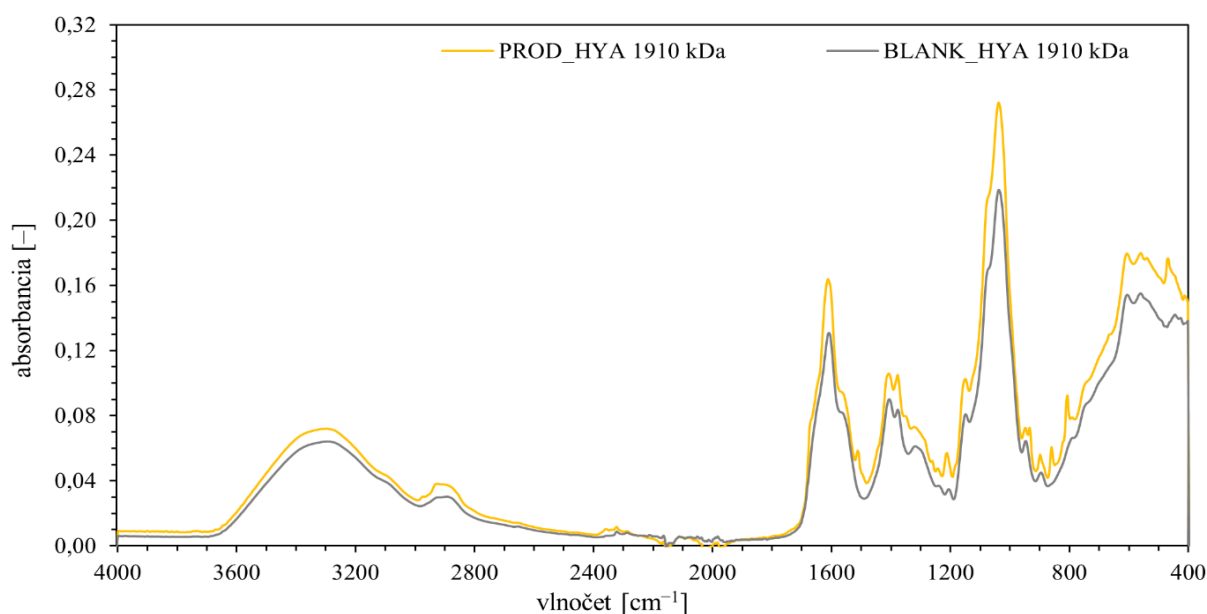
deformačná rovinná vibrácia N–H väzieb v sekundárnych amidoch veľmi málo intenzívna. Dané spektrum nepotvrďuje prítomnosť zvyškového TBA v lyofilizačnom koláči, avšak reziduálna prítomnosť TBA sa nedá na základe samotnej spektrálnej IČ analýzy vylúčiť.



Obr. 18: ATR-FTIR spektrá fluorescenčnej sondy perylénu s HYA so strednou molekulovou hmotnosťou 13 kDa (ružová krivka) a 1 910 kDa (modrá krivka) a ATR-FTIR spektrá slepých vzoriek bez sondy s 13 kDa HYA (žltá krivka) a 1 910 kDa (čierna krivka)

Na Obr. 19 sú vyobrazené spektrá fluorescenčnej sondy prodanu s 1 910 kDa hyalurónanom a slepej vzorky obsahujúcej tiež 1 910 kDa hyalurónan. Na prvý pohľad je vidno, že spektrá z Obr. 19 (sonda prodan) sú, až na pár posunutých polôh charakteristických vibrácií, identické so spektrami na Obr. 18 (sonda perylén). Opäť sa na spektre vzorky s prodanom a slepej vzorky bez prodanu nachádza široký absorpčný pás pri vlnočte  $3\,293\text{ cm}^{-1}$ , ktorý je pripisovaný valenčnej symetrickej vibrácii alkoholovej O–H väzby, vyšším harmonickým vibráciám N–H väzieb v sekundárnych amidoch na molekule hyalurónanu a vodíkovým mostíkom medzi –OH skupinami (zvyšková vlhkosť vzorky). N–H valenčná vibrácia terciárneho amínu v molekule prodanu je v tejto oblasti bez absorpčného pásu. Valenčné symetrické a asymetrické vibrácie C–H väzieb v aromatických jednotkách prodanu a alifatických uhl'ovodíkoch sú identifikované pri vlnočte  $2\,900\text{ cm}^{-1}$ . Prítomnosť C=C väzby v aromatickom kruhu prodanu je potvrdená ostrým píkcom pri vlnočte  $1\,531\text{ cm}^{-1}$ . Rovnako ako v prípade spektier vzoriek z Obr. 18 je táto C=C vibrácia dôkazom hydrofóbnej interakcie fluorescenčnej sondy s molekulami hyalurónanu. Spektrum slepej vzorky nezobrazuje žiadny absorpčný pás pri  $1\,527\text{ cm}^{-1}$ , čo potvrdzuje neprítomnosť molekúl sondy v lyofilizačnom koláči. Intenzívne absorpčné pásy pri  $1\,604\text{ cm}^{-1}$  a  $1\,566\text{ cm}^{-1}$  potvrdzujú prítomnosť sekundárnych amidov. Deformačná vibrácia karboxylátu  $\text{CO}^-$  a dáždniková deformačná vibrácia  $\text{CH}_3$  skupín je pozorovaná pri vlnočte  $1\,380\text{ cm}^{-1}$ . Naopak, valenčná vibrácia C–O väzby v karboxylovej skupine na molekule hyalurónanu je identifikovaná pri vlnočte  $1\,203\text{ cm}^{-1}$ . Rovnako, ako v prípade IČ spektra perylénu, absorpčný pás pri  $1\,145\text{ cm}^{-1}$  určuje vibráciu C–O–C väzby v glykozidovej väzbe. Absorpčné pásy pri  $1\,080\text{ cm}^{-1}$  a  $1\,033\text{ cm}^{-1}$  patria valenčnej symetrickej vibrácii C–O väzby v alkoholových skupinách. Zmieneny absorpčný pás pri  $1\,080\text{ cm}^{-1}$  môže byť pripísaný aj

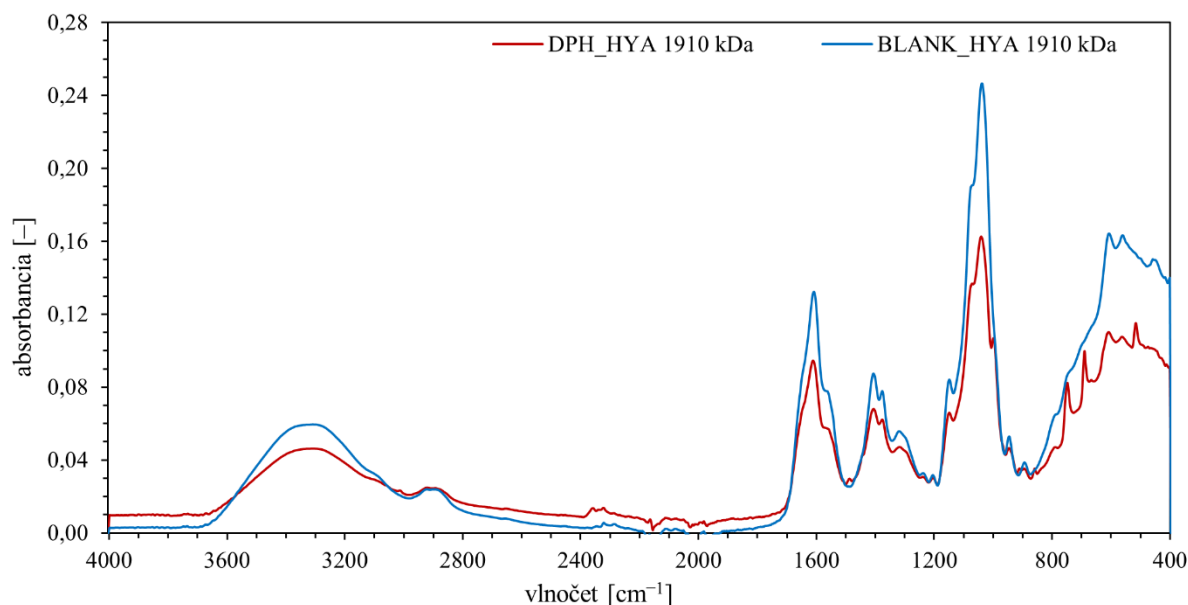
vibrácii C–O–C éterovej väzby v sacharidovej jednotke. V prípade absorpčného pásu ( $944\text{ cm}^{-1}$ ), ktorý sa nachádza bezprostredne vedľa píku  $948\text{ cm}^{-1}$ , prichádza do úvahy aj deformačná vibrácia O–H väzby v karboxylovej skupine. V oblasti tzv. odtlačku prsta môžeme taktiež nájsť deformačné vibrácie C–H väzby v aromatickej jednotke a dublet intenzívnych absorpčných pásov pri vlnočte  $863\text{ cm}^{-1}$  a  $810\text{ cm}^{-1}$ , ktoré sú pripisované deformačnej rovinatej vibrácii N–H väzby v sekundárnych amidoch. Spektrum slepej vzorky neobsahuje intenzívny absorpčný pás pri  $944\text{ cm}^{-1}$  zodpovedajúci deformačnej vibrácii O–H väzby v karboxylovej skupine a ani dublet pásov pri  $863\text{ cm}^{-1}$  a  $810\text{ cm}^{-1}$ . Môže to byť spôsobené slabou intenzitou, ktorá je úmerná nízkemu zastúpeniu daných skupín vo vzorke. Na základe zmeraného spektra nevieme s určitosťou potvrdiť, ani vylúčiť prítomnosť zvyškového TBA.



Obr. 19: ATR-FTIR spektrá fluorescenčnej sondy prodanu s HYA so strednou molekulovou hmotnosťou 1 910 kDa (žltá krivka) a slepej vzorky bez sondy s 1 910 kDa HYA (sivá krivka)

Na Obr. 20 sú uvedené spektrá vzorky obsahujúcej sondu DPH a hyalurónan so strednou molekulovou hmotnosťou 1 910 kDa a slepej vzorky s rovnako veľkým hyalurónanom. Dané spektrá sú takmer identické so spektrami na Obr. 18 a Obr. 19. Fluorescenčná sonda DPH okrem benzénového jadra obsahuje aj alkénový reťazec. Preto sa na spektre očakáva prítomnosť zreteľných absorpčných pásov vibrácií  $=\text{C–H}$  a  $\text{C=C}$  väzieb v aromatickom jadre a v alkénovom reťazci. Intenzívny absorpčný pás pri vlnočte  $3\,305\text{ cm}^{-1}$  je rovnako, ako na predošlých spektrách, pripisovaný valenčnej symetrickej vibrácii alkoholovej a karboxylovej O–H väzby, vyšším harmonickým vibráciám N–H väzieb v sekundárnych amidoch na molekule hyalurónanu, a vodíkovým mostíkom medzi –OH skupinami. V prípade absorpčného pásu pri  $3\,081\text{ cm}^{-1}$  prichádza do úvahy aj valenčná vibrácia  $=\text{C–H}$  väzby na alkénovom reťazci sondy DPH. S ohľadom na ciele práce je však v centre nášho záujmu absorpčný pás pozorovaný pri vlnočte  $1\,477\text{ cm}^{-1}$ , ktorý zodpovedá vibrácii  $\text{C=C}$  väzby v aromatickej jednotke DPH, čo dokazuje vzájomnú interakciu sondy a hyalurónanu. Spektrum slepej vzorky opäť tento typ  $\text{C=C}$  vibrácie neobsahuje kvôli neprítomnosti sondy v slepej vzorke. Ostatné absorpčné pásy spektier zodpovedajú interpretácii vyššie uvedených FTIR spektier (Obr. 18 a Obr. 19).

Samotné IČ spektrum je však pre monitorovanie prítomnosti zvyškového hydrofóbného rozpúšťadla TBA v lyofilizačných koláčoch nedostatočné.



Obr. 20: ATR-FTIR spektrá fluorescenčnej sondy DPH s HYA so strednou molekulovou hmotnosťou 1 910 kDa (červená krivka) a slepej vzorky bez sondy s 1 910 kDa HYA (modrá krivka)

ATR-FTIR spektrum vzorky s pyrénom nepotvrdilo hydrofóbne interakcie sondy pyrénu s hyalurónanom, keďže sme v spektre nezaznamenali absorpčný pás pri  $\sim 1\,500\text{ cm}^{-1}$  pripisovaný valenčnej vibrácii C=C väzby v aromatickej jednotke pyrénu (Príloha 2). Opäť konštatujeme, že prítomnosť zvyškového TBA v lyofilizačnom koláči na základe zmeraného spektra nemôže byť vyvrátená, ani potvrdená.

### 5.3.2 Skenovací elektrónový mikroskop

Druhou metódou, ktorou bol analyzovaný lyofilizačný koláč, bola skenovacia elektrónová mikroskopia. Najprv bolo spravených niekoľko fotografií povrchu koláča s  $1\,000\times$  a  $5\,000\times$  zväčšením a potom boli vybrané oblasti na snímke, ktoré boli následne posúdené z hľadiska prvkového zloženia. Tým, že boli vykonané dva rôzne spôsoby sušenia vzoriek mrazom, vzorky prvej a druhej série mohli byť na základe fotografií zo SEM vzájomne vizuálne porovnávané.

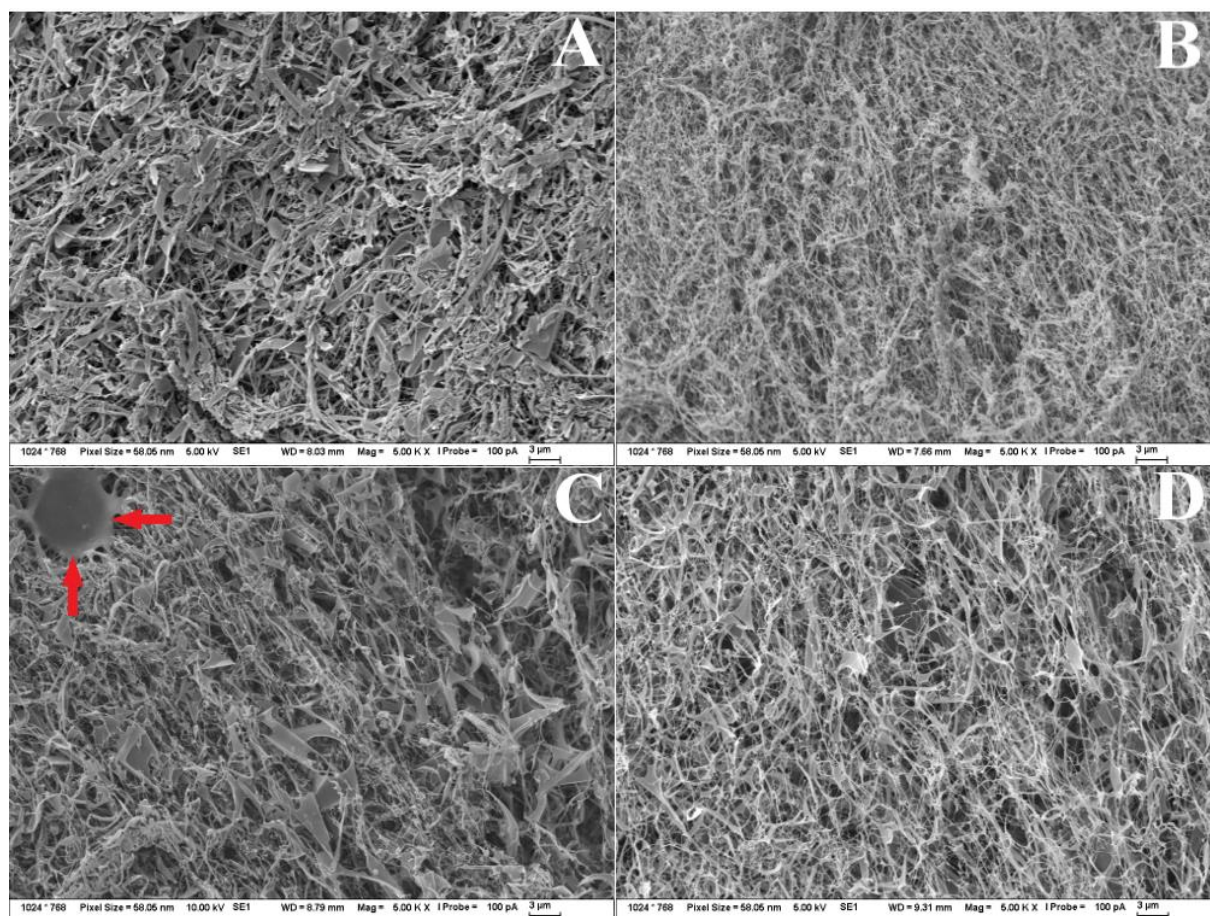
Na Obr. 21 sú vybrané reprezentatívne fotografie  $5\,000\times$  zväčšeného povrchu lyofilizačných koláčov zo SEM: (A) Slepá vzorka z prvej série s 13 kDa hyalurónanom a s koncentráciou  $0,5\text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . (B) Slepá vzorka z druhej série s 13 kDa hyalurónanom a s koncentráciou  $0,4\text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . (C) Vzorka prvej série, ktorá obsahovala sondu perylén a 1 910 kDa hyalurónan s koncentráciou  $0,5\text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . (D) Vzorka druhej série, ktorá obsahovala sondu perylén a 1 910 kDa hyalurónan s koncentráciou  $0,4\text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Boli porovnávané fotografie (A) s (B) a (C) s (D).

Z Obr. 21 je na prvý pohľad zrejmé, že fotografia (B) obsahuje hyalurónan, ktorý je viac rozvláknový a jeho vlákna sú jemnejšie a tenšie oproti vláknam hyalurónanu na fotografii (A), ktoré sú naopak kompaktnější a menej rozvetvené. Hyalurónan na fotografii (A) je amorfnejší a ten na fotografii (B) má výraznejšiu kryštalickú štruktúru, čo svedčí o úspešnom procese sušenia mrazom. Rovnaká situácia sa objavuje aj u fotografií (C) a (D). Fotografia (C) obsahuje hyalurónan, ktorý je o niečo viac rozvláknový, ako v prípade fotografie (A), avšak stále sa tam



nachádzajú väčšie zhluky hyalurónanu. Čierny kruh vľavo hore na fotografii (C; červené šípky) predstavuje amorfnú časť degradovanej štruktúry hyalurónanu. Povrch vzorky na fotografii (D) obsahoval jemné vlákna kryštalického hyalurónanu bez viditeľných amorfných štruktúr. Na základe porovnávania fotografií z Obr. 21 vieme vyvodit' záver, že zvyšovanie tlaku v procese sušenia v druhej sérii vzoriek ( $c_{\text{HYA}} = 0,4 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) malo pozitívny vplyv na kvalitu lyofilizovanej vzorky. Všetky vzorky druhej série vykazovali viacej rozvláknený hyalurónan na rozdiel od vzoriek prvej série. SEM fotografie lyofilizačných koláčov nám potvrdili vizuálny odhad, ktorý sme mali počas a hneď po skončení procesu sušenia vzoriek mrazom.

Prvková analýza u dvoch náhodne zvolených vzoriek z prvej a druhej série nepreukázala žiadne nečistoty, t.j. žiadne chemické prvky, ktoré by kontaminovali vzorky.



Obr. 21: Fotografie  $5\,000\times$  zväčšeného povrchu vybraných lyofilizačných koláčov zo SEM. (A) Slepá vzorka z prvej série ( $M_w \text{ HYA} = 13 \text{ kDa}$ ,  $c_{\text{HYA}} = 0,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). (B) Slepá vzorka z druhej série ( $M_w \text{ HYA} = 13 \text{ kDa}$ ,  $c_{\text{HYA}} = 0,4 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). (C) Vzorka prvej série, ktorá obsahovala sondu perylén a HYA ( $M_w \text{ HYA} = 1\,910 \text{ kDa}$ ,  $c_{\text{HYA}} = 0,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ), červené šípky smerujú na amorfnú časť degradovanej štruktúry HYA. (D) Vzorka druhej série, ktorá obsahovala sondu perylén a HYA ( $M_w \text{ HYA} = 1\,910 \text{ kDa}$ ,  $c_{\text{HYA}} = 0,4 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ )

#### 5.4 Ustálená fluorescenčná spektrometria

Prvým krokom v hodnotení úspešnosti procesu sušenia mrazom prostredníctvom potvrdenia hydrofóbných interakcií sondy s molekulami hyalurónanu bolo meranie ustálenej fluorescence fluorescenčných sond (perylén, pyrén, prodan, DPH) v jednotlivých vzorkách. Fluorescenčné spektrá vzoriek prvej a druhej série boli opäť porovnávané so spektrami slepých vzoriek.

V prípade vzoriek s pyrénom boli vypočítané polaritné indexy a v prípade vzoriek s prodanom boli porovnávané emisné maximá vzoriek a slepých vzoriek.

#### 5.4.1 Vzorky s fluorescenčnou sondou pyrén

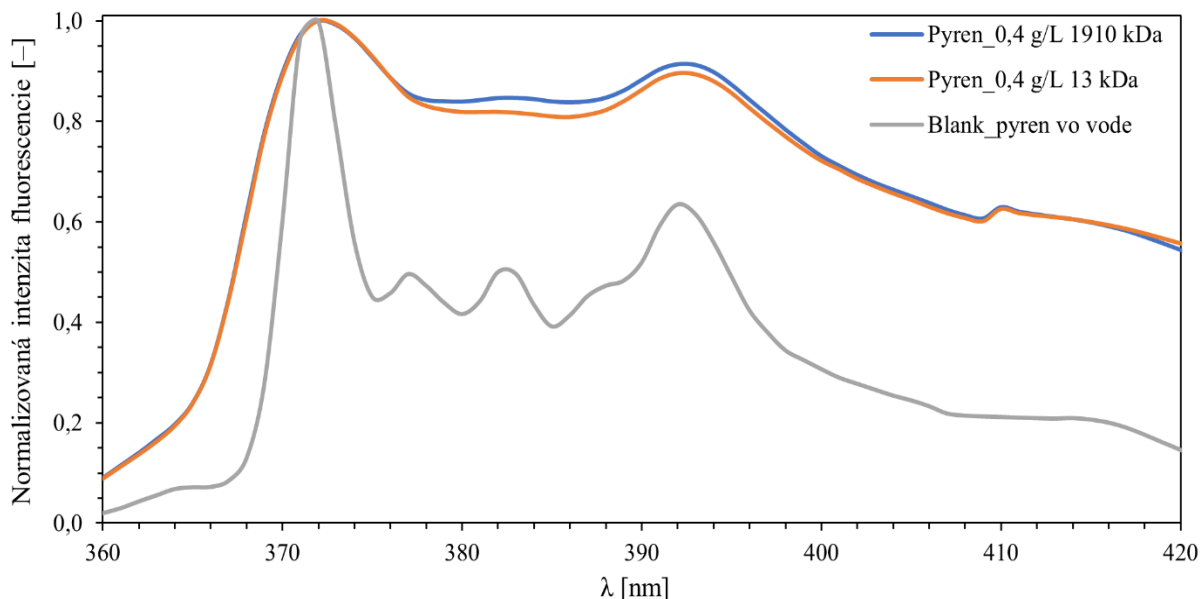
Na Obr. 22 sú znázornené normalizované emisné spektrá vzoriek druhej série obsahujúcich fluorescenčnú sondou pyrén s koncentráciou  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a hyalurónan so strednou molekulovou hmotnosťou 1 910 kDa (modrá krivka), 13 kDa (oranžová krivka) a východiskovou koncentráciou  $0,4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Spektrum slepej vzorky pyrénu vo vode je vykreslené sivou farbou.

Pyrén je polyaromatický uhl'ovodík s vysokou symetriou, vďaka ktorej vykazuje unikátnu reakciu na polaritu svojho okolia. Pyrén má z hľadiska symetrie zakázaný absorpčný prechod  $S_0 \rightarrow S_1$ . U pyrénu dochádza k prekryvaniu zakázaného prvého a povoleného druhého excitovaného stavu ( $S_0 \rightarrow S_2$ ), a to zapríčiňuje polarizačnú interakciu typu dipól-indukovaný dipól. Pravdepodobnosť vibračného prechodu 0–0 sa stane závislou na polarite rozpúšťadla. Pravdepodobnosť (fluorescenčného) prechodu 0–0 rastie s polaritou rozpúšťadla. Polaritný index v emisnom spektre pyrénu sa vypočíta ako pomer intenzít prvého vibračného maxima ( $373 \pm 1 \text{ nm}$ ), ktorý zodpovedá prechodu 0–0 a tretieho maxima (referenčný pás) pri vlnovej dĺžke  $383 \pm 1 \text{ nm}$ , ktorý zodpovedá prechodu 0–2 [93]. Na základe tohto poznatku boli v spektre sledované intenzity prvého ( $373 \text{ nm}$ ) a tretieho ( $383 \text{ nm}$ ) maxima slepej vzorky a zlyofilizovaných vzoriek. Veľký polaritný index 2,01 u slepej vzorky je ukazovateľom fluorescencie sondy z hydrofilného prostredia, čo vyplýva z toho, že slepá vzorka obsahuje pyrén rozpustený vo vode. Nižšia hodnota polaritného indexu vzoriek (1,17 a 1,21) od hodnoty indexu slepej vzorky indukuje fluorescenciu pyrénu z hydrofóbného prostredia, čo by mohlo byť vysvetlené vznikom hydrofóbných interakcií sondy pyrénu s hydrofóbnymi oblasťami hyalurónanu počas procesu sušenia mrazom. Výsledky emisného polaritného indexu (EmPI) vzoriek sú zhrnuté v Tab. 10.

Tab. 10: Emisné polaritné indexy pre slepú vzorku pyrénu vo vode a pre vzorky obsahujúcej sondou pyrén ( $c = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) a HYA so strednou molekulovou hmotnosťou 1 910 kDa a 13 kDa (východisková koncentrácia  $0,4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ )

$M_w$ HYA [kDa]	$c$ HYA [ $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ]	EmPI [–]
1 910	0,4	1,17
13	0,4	1,21
–	–	2,01

Intenzita fluorescencie je ďalším indikátorom prítomnosti interakcií medzi sondou a hydrofóbnymi časťami hyalurónanu. Pred znormalizovaním spektier na Obr. 22 bolo vidieť, že intenzita spektra slepej vzorky obsahujúcej čistý pyrén vo vode je oveľa nižšia, ako intenzita spektier vzoriek obsahujúcich pyrén a hyalurónan. Z grafu je možné vyvodit' záver, že došlo k interakciám medzi pyrénom a hydrofóbnymi časťami reťazca hyalurónanu. Môžeme uzavrieť, že meranie ustálenej fluorescencie zlyofilizovaných vzoriek môže poskytnúť informáciu o úspešnosti procesu sušenia mrazom za predpokladu, že interagujúce liečivo má fluorescenčné vlastnosti.



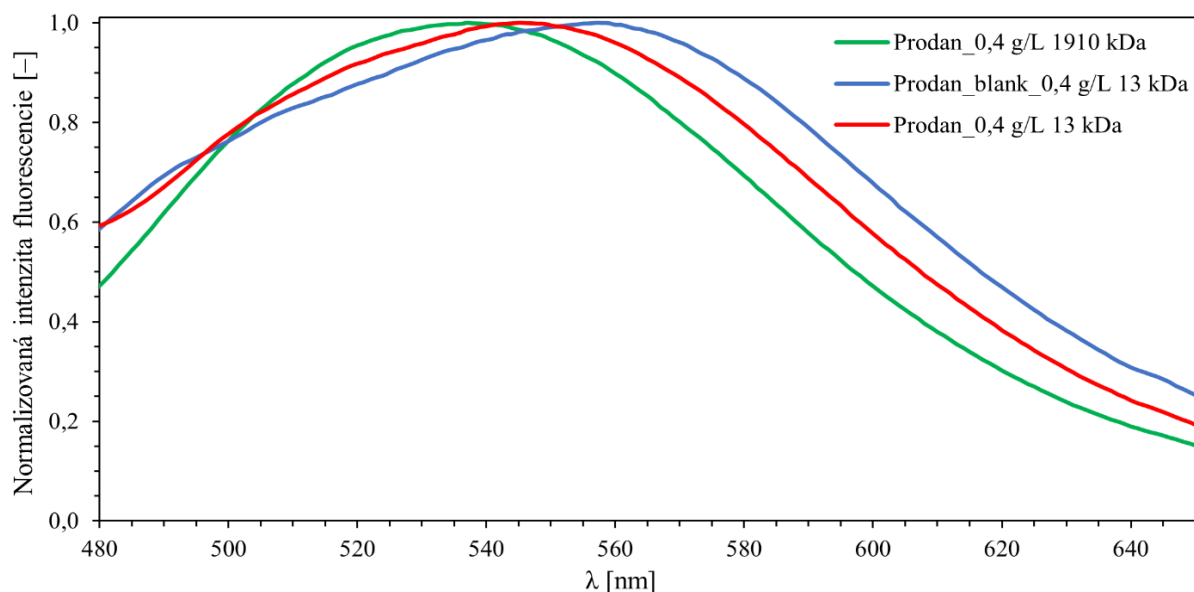
Obr. 22: Normalizované emisné spektrá vzoriek druhej série obsahujúcich sondy pyren ( $c = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) a HYA so strednou molekulovou hmotnosťou 1 910 kDa (modrá krivka), 13 kDa (oranžová krivka) a východiskovou koncentráciou  $0,4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Sivá krivka predstavuje slepú vzorku pyrenu vo vode

#### 5.4.2 Vzorky s fluorescenčnou sondou prodan

Ďalšou sondou, u ktorej prebehlo meranie fluorescencie, je prodan. Fluorescenčná sonda prodan patrí do skupiny fyzikálne viazaných sond reagujúcich na polaritu a s veľkým batochrómny posunom. Na polaritu systému reaguje vďaka fotoindukovanému prenosu náboja, tzv. relaxácia rozpúšťadla. Systém stráca absorbovanú energiu vibračnou relaxáciou a interakciou fluorescenčnej sondy s molekulami rozpúšťadla. V momente, keď dôjde k excitácii molekuly, vytvára sa indukovaný dipól, ktorý je schopný okolo seba orientovať molekuly rozpúšťadla. Strata energie spôsobená interakciou bude väčšia, čím bude väčší dipólový moment molekúl a polarita rozpúšťadla. Čím je prostredie polárnejšie, tým viac dochádza k posunu emisného maxima smerom k vyšším vlnovým dĺžkam. Maximum pre prodan sa pohybuje od 530 nm vo vodnom prostredí až po 405 nm v uhl'ovodíkoch [94], [95].

Na Obr. 23 sú znázornené normalizované emisné spektrá vzoriek druhej série, obsahujúcich sondy prodan ( $c = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) a 1 910 kDa a 13 kDa hyalurónan s východiskovou koncentráciou  $0,4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  a spektrum slepej vzorky obsahujúcej 13 kDa hyalurónan s východiskovou koncentráciou  $0,4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  a vmiešaný prodan ( $c = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) po sušení mrazom. Pred znormalizovaním spektier bol viditeľne zachovaný trend nárastu intenzity fluorescencie pre zlyofilizované vzorky so sondou oproti slepým vzorkám, kde sonda bola pridaná až pri rehydratácii vzoriek. U sondy prodanu sme sa sústredili na emisné maximá spektier. Maximum spektra slepej vzorky sa nachádza pri vlnovej dĺžke 557 nm, čo potvrdzuje fluorescenciu prodanu z polárneho prostredia. U zlyofilizovaných vzoriek s prodanom dochádza k malému posunu emisného maxima smerom k nižším vlnovým dĺžkam. Pre vzorku obsahujúcu prodan s 13 kDa hyalurónanom s východiskovou koncentráciou  $0,4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  je emisné maximum posunuté k vlnovej dĺžke 545 nm. U vzorky s prodanom a 1 910 kDa hyalurónanom s východiskovou koncentráciou  $0,4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  dochádza k miernemu posunu maxima smerom k nižším vlnovým dĺžkam, čiže k fluorescencii z menej polárneho prostredia,

a jej maximum sa nachádza pri vlnovej dĺžke 537 nm. Z Obr. 23 je možné konštatovať, že na základe posunu emisného maxima prodanu k nižším vlnovým dĺžkam dochádza k interakciám v systéme a malé množstvo prodanu fluoreskuje i zo špecifických miest hyalurónanu.



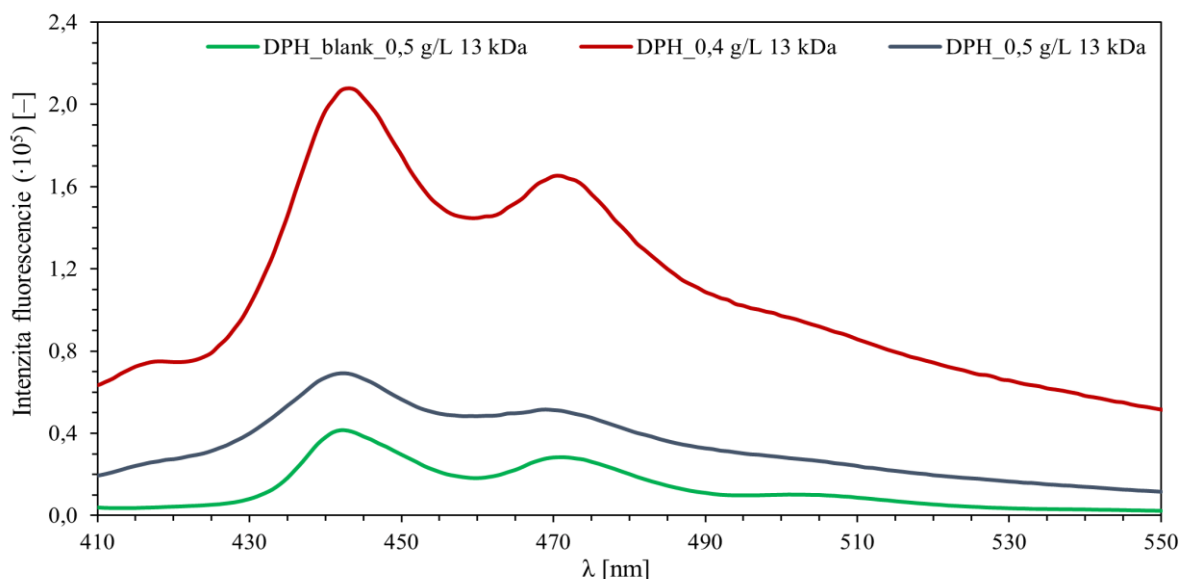
Obr. 23: Normalizované emisné spektrá vzoriek druhej série obsahujúcich sondy prodan ( $c = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), 1 910 kDa (zelená krivka) a 13 kDa (červená krivka) HYA s východiskovou koncentráciou  $0,4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Modrá krivka predstavuje spektrum slepej vzorky obsahujúcej 13 kDa HYA s východiskovou koncentráciou  $0,4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  a vmiešaný prodan po procese sušenia mrazom

### 5.4.3 Vzorky s fluorescenčnou sondou DPH

Tretou meranou sondou bola silne hydrofóbná sonda DPH, ktorá vo vodnom prostredí takmer vôbec nefluoreskuje. Intenzita fluorescencie je tým pádom dostatočujúcou informáciou na posúdenie, či došlo k interakciám medzi sondou a hyalurónanom počas sušenia mrazom.

Na Obr. 24 sú uvedené emisné spektrá vzorky prvej série, ktoré obsahovali sondy DPH ( $c = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) a hyalurónan so strednou molekulovou hmotnosťou 13 kDa a s východiskovou koncentráciou  $0,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  (modrá krivka), vzorky druhej série obsahujúcej DPH ( $c = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) a 13 kDa hyalurónan s východiskovou koncentráciou  $0,4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  (červená krivka) a emisné spektrum slepej vzorky (zelená krivka) obsahujúcej 13 kDa hyalurónan s východiskovou koncentráciou  $0,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  a vmiešaný DPH po sušení mrazom. Z grafu sa dá pozorovať, že spektrá zlyofilizovaných vzoriek vykazujú vyššiu intenzitu fluorescencie ako spektrum slepej vzorky, do ktorej bola rozpustená sonda DPH až pri rehydratácii (po procese sušenia mrazom). Vyššia intenzita vzoriek oproti slepej vzorke vypovedá o fluorescencii sondy z hydrofóbných miest, čiže o fluorescencii DPH z hydrofóbných reťazcov hyalurónanu. Vzorka DPH s 13 kDa hyalurónanom s východiskovou koncentráciou  $0,4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  obsahuje viac hydrofóbných interakcií medzi sondou a reťazcami hyalurónanu ako vzorka DPH s 13 kDa hyalurónanom s východiskovou koncentráciou  $0,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ , čo je potvrdené vyššou intenzitou fluorescencie prvej zmienenej vzorky. Konštatujeme, že vo vzorkách s DPH ako modelovou hydrofóbnou látkou sme tiež potvrdili interakcie medzi zložkami študovaného systému.





Obr. 24: Emisné spektrum vzorky prvej série obsahujúcej sondy DPH ( $c = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) a 13 kDa HYA s východiskovou koncentráciou  $0,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  (modrá krivka) a vzorky druhej série obsahujúcej DPH ( $c = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) a 13 kDa HYA s východiskovou koncentráciou  $0,4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  (červená krivka). Zelená krivka predstavuje spektrum slepej vzorky obsahujúcej 13 kDa HYA s východiskovou koncentráciou  $0,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  a vmiešaný DPH po procese sušenia mrazom

#### 5.4.4 Vzorky s fluorescenčnou sondou perylén

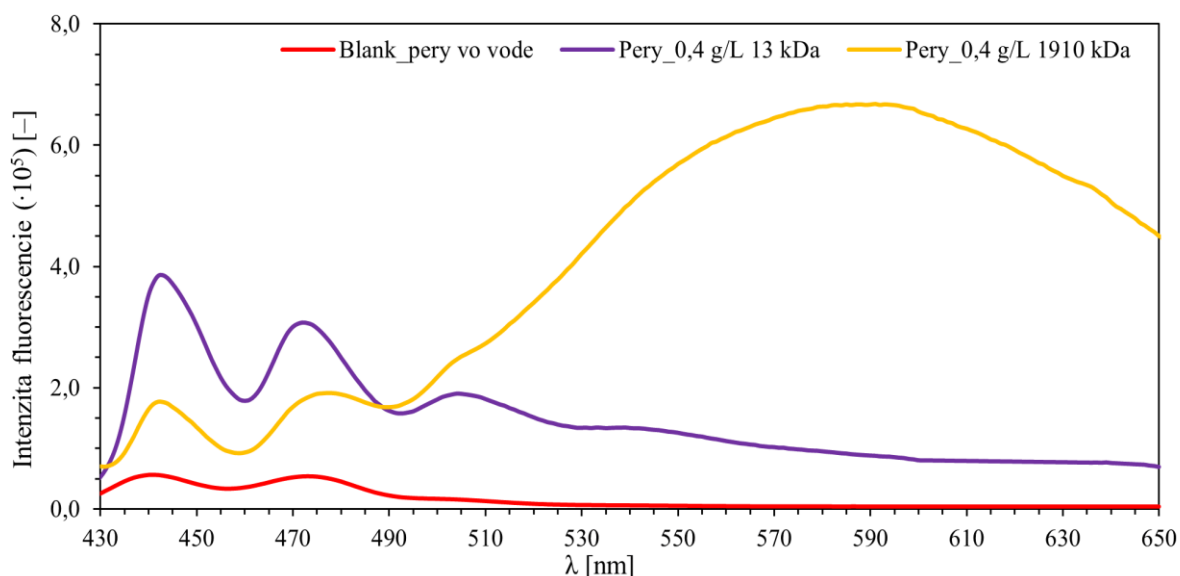
Poslednou meranou sondou bol perylén. Perylén je polycyklický aromatický uhl'ovodík, ktorý má vysoký fluorescenčný kvantový výťažok a fotochemickú stabilitu. Je to silno hydrofóbná sonda, ktorá takmer vôbec nefluoreskuje z vodného prostredia.

Obr. 25 zobrazuje emisné spektrá vzoriek druhej série obsahujúcich perylén ( $c = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) a 13 kDa (fialová krivka), 1 910 kDa (žltá krivka) hyalurónan s východiskovou koncentráciou  $0,4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  a spektrum slepej vzorky obsahujúcej perylén vo vode (červená krivka). V prípade perylénu je intenzita fluorescencie dostatočným ukazovateľom realizovaných hydrofóbných interakcií sondy s hydrofóbnymi oblasťami hyalurónanu v procese sušenia mrazom. Z grafu je zrejmé, že intenzita slepej vzorky perylénu vo vode má oveľa nižšiu intenzitu fluorescencie, ako vzorky s hyalurónanom a perylénom. Vzhľadom k tomu, že z vodného prostredia táto sonda skoro vôbec neemituje žiarenie, každé zvýšenie intenzity fluorescencie indikuje prítomnosť sondy v hydrofóbnom prostredí. Emisné spektrá vzoriek prvej série neboli uvedené v grafe, lebo ich intenzita fluorescencie dosahovala hodnoty porovnateľné s hodnotami intenzity slepej vzorky, čo hovorí o slabšej účinnosti sušenia mrazom, ako podporného procesu pre interakcie medzi zložkami systému.

Na Obr. 25 je pozorovateľný zriedkavý pík pri  $\lambda_{\text{max}} = 588 \text{ nm}$  u zlyofilizovanej vzorky s 1 910 kDa hyalurónanom a perylénom, ktorý sa u ostatným vzoriek nenachádza. Tento pík by mohol byť dôsledkom vzniku agregátov perylénu, na čo upozorňuje práca Maceda a kol. [96], kde sa uvádza, že nemodifikované monoméry perylénu majú silnú tendenciu vytvárať agregáty, ktoré rastú z oligomérov na kryštály do komínovej podoby. Pozorovaný pík pri  $\lambda_{\text{max}} = 588 \text{ nm}$  mohol byť generovaný fluorescenciou takýchto kryštalických oligomérov perylénu. Alternatívne vysvetlenie môže predstavovať vznik excimérov perylénu v systéme. Perylén je totiž schopný tvoriť excitovaný dimér, tzv. excimér, čo je komplex tvorený jednou excitovanou molekulou perylénu a druhou molekulou v základnom stave. Excitáciou molekuly perylénu



dôjde k zmene jej štruktúry a vďaka vzniku indukovaného dipólu je tak v tomto stave schopná interagovať s inou neexcitovanou molekulou perylénu. Touto interakciou a tvorbou „sandwichového“ komplexu stráca excitovaná molekula časť svojej energie a maximum fluorescence exciméru je potom posunuté smerom k vyšším vlnovým dĺžkam (~580 nm). Tým, že tvorba exciméru je difúzne riadený proces, je jeho intenzita funkciou koncentrácie perylénu, mikroviskozity okolia a tiež rozdelenia jednotlivých molekúl perylénu v hydrofóbných oblastiach. Nevieme s určitosťou povedať, ktoré vysvetlenie môže popisovať tvorbu píku pri  $\lambda_{\max} = 588 \text{ nm}$ , ale vznik exciméru perylénu nemôžeme vylúčiť.



Obr. 25: Emisné spektrá vzoriek druhej série obsahujúcich perylén ( $c = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) a 13 kDa (fialová krivka), 1 910 kDa (žltá krivka) HYA s východiskovou koncentráciou  $0,4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Červená krivka predstavuje spektrum slepej vzorky obsahujúcej perylén vo vode

## 5.5 Časovo rozlíšená fluorescenčná spektrometria

Posledná analytická metóda, ktorou bola meraná účinnosť procesu sušenia mrazom, bola časovo rozlíšená fluorescenčná spektrometria, ktorá nadväzuje na merania ustálenej fluorescence popísané v predchádzajúcej kapitole. Pomocou TRF je možné identifikovať subpopulácie excitovaných molekúl sondy, ktorých emisné charakteristiky (pomerné zastúpenie subpopulácií a doba života ich excitovaného stavu) zodpovedajú fyzikálnochemickým vlastnostiam prostredia, v ktorom sa molekuly sondy nachádzajú. Opäť boli premerané vzorky prvej a druhej série so sondami pyrén, prodán, perylén a DPH s koncentráciou  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-1}$ . Merané vzorky sa líšili nastavením parametrov prístroja (zhrnutie Tab. 8 a Tab. 9). Výsledky boli porovnávané so slepými vzorkami a s výsledkami z emisných spektier vzoriek z ustálenej fluorescenčnej spektrometrie.

### 5.5.1 Doby života sondy pyrén vo vzorkách

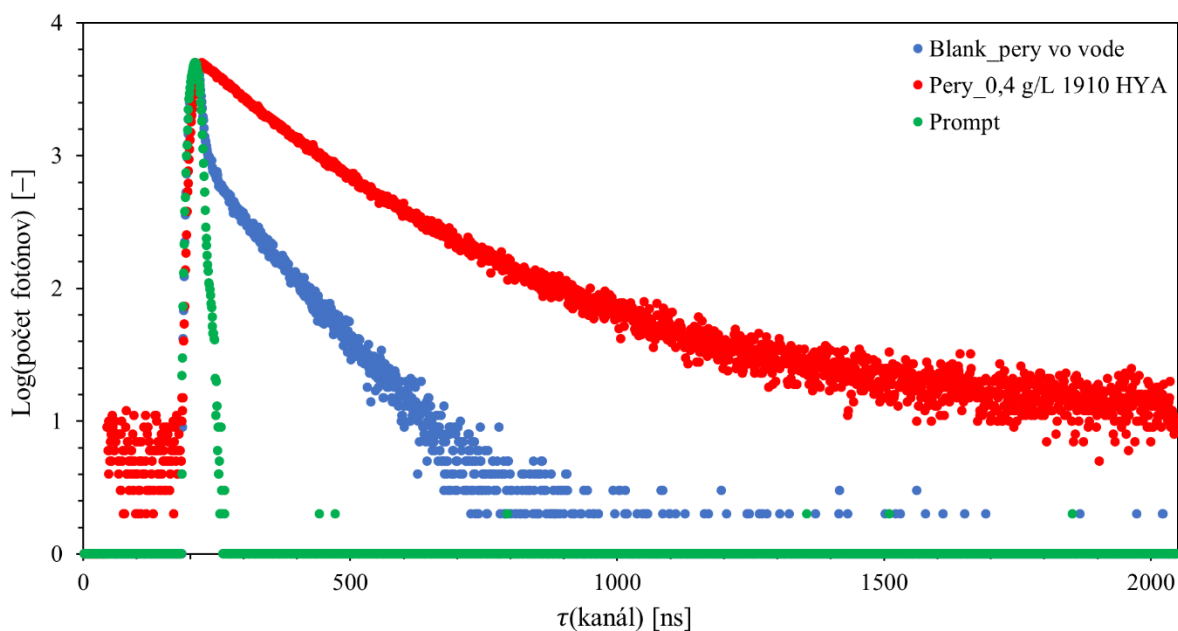
Prvou sondou, ktorá bola využitá na sledovanie správania sa systémov hyalurónan-sonda, bol pyrén. Vzorky pyrénu však nevykazovali vhodné výsledky z časovo rozlíšenej fluorescenčnej spektrometrie, kvôli možným nečistotám vo vzorkách. Na určenie úspešnosti procesu sušenia mrazom v prípade vzoriek s pyrénom boli preto brané do úvahy emisné spektrá a polaritné indexy pyrénu (výsledky ustálenej fluorescenčnej spektrometrie kapitola 5.4.1).

### 5.5.2 Doby života sondy perylénu vo vzorkách

Následne boli premerané vzorky obsahujúcej sondu perylén. Na základe neobvyklého maxima pri  $\lambda_{\max} = 588 \text{ nm}$  (Obr. 25) v emisnom spektre vzorky perylénu s 1 910 kDa hyalurónan a východiskovou koncentráciou  $0,4 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  z ustálenej fluorescenčnej spektrometrie, boli vzorky obsahujúcich perylén podrobené meraniam TRF spektrometrii, ktorá by mohla potvrdiť vznik tzv. exciméru perylénu. Na Obr. 26 je uvedený zmeraný priebeh časovo rozlíšenej fluorescence slepej vzorky perylénu vo vode (modré body), vzorky s perylénom (suspektným excimérom perylénu) a s 1 910 kDa hyalurónanom s východiskovou koncentráciou  $0,4 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  (červené body) a jej promptu (zelené body). Namerané body priebehu predstavujú vyhasínacie krivky perylénu u slepej vzorky a zlyofilizovanej vzorky. Z Obr. 26 si môžeme všimnúť, že vyhasínacia krivka, čiže doba dohasínania (života) perylénu u zlyofilizovanej vzorky je dlhšia ako doba dohasínania perylénu vo vode, čo svedčí o subpopuláciách excitovaných molekúl s rôznou dobou života a o väčších hodnotách časov perylénu, než u slepej vzorky.

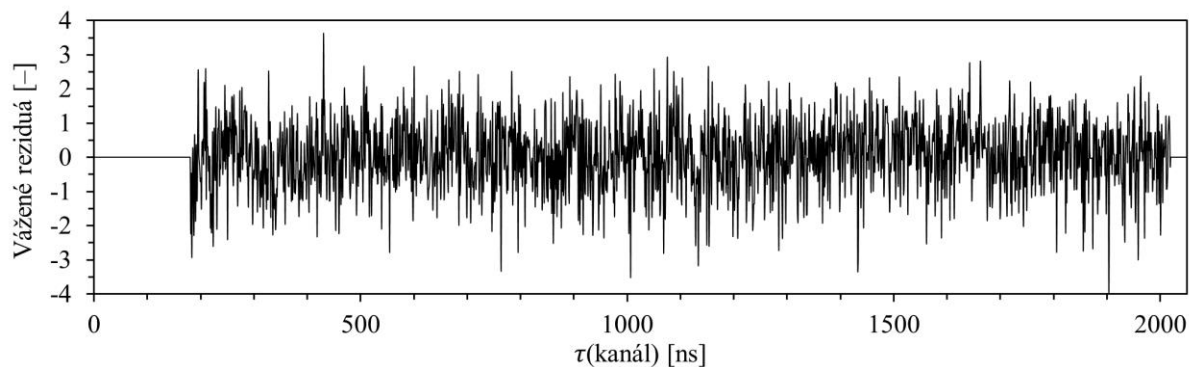
Na základe analýzy reziduí a hodnoty chí-kvadrát testu dobrej zhody boli individuálne experimentálne body záznamu slepej vzorky najtesnejšie preložené dvojfázovou exponenciálnou krivkou, čo indikuje dve subpopulácie s odlišnou dobou života. Pre experimentálne body záznamu zlyofilizovanej vzorky sa ako najvhodnejší fit javila trojfázová exponenciálna krivka (t.j. tri doby života). Meranie slepých vzoriek vykazovalo slabý signál a trvalo omnoho dlhšie oproti meraniu zlyofilizovaných vzoriek. Bolo to spôsobené tým, že pravdepodobnosť, kedy dochádza k excitácii elektrónu na vyššiu energetickú hladinu, bola v prípade slepých vzoriek oveľa nižšia, a teda aj žiarivý prechod, resp. emisia žiarenia, bola sprevádzaná nižšou frekvenciou deexcitácie (fotónov dopadajúcich na fotonásobič).

V prípade perylénu by z princípu u slepej vzorky nemala byť registrovaná žiadna fluorescence a ani doba života. Napriek tomu bol detegovaný veľmi slabý signál a boli získané výsledky dôb života perylénu vo vode. Možno konštatovať, že silno hydrofóbná sonda, ako je perylén, dokáže z veľmi malej časti fluoreskovať aj z vodného prostredia.



Obr. 26: Zmeraný priebeh časovo rozlíšenej fluorescence slepej vzorky perylénu vo vode (modré body) a vzorky s perylénom (suspektným excimérom perylénu,  $c = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) a s 1 910 kDa HYA s východiskovou koncentráciou  $0,4 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  (červené body). Prompt je vyobrazený zelenými bodmi

Na Obr. 27 je znázornená analýza reziduí (fitovanie) vzorky obsahujúcej perylén (suspektný perylén,  $c = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) a 1 910 kDa hyalurónanom s východiskovou koncentráciou  $0,4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Body analýzy reziduí sú okolo modelu rozmiestnené náhodne, s homogénnou variabilitou a nulovou strednou hodnotou náhodnej chyby, čo hovorí o vhodnom zvolení preloženia bodov zlyofilizovanej vzorky trojfázovou exponenciálou. O správnosti zvoleného modelu u záznamu zlyofilizovanej vzorky rovnako hovorí aj nízka hodnota chí-kvadrátu, ktorá dosahovala hodnoty 1,05.



Obr. 27: Analýza reziduí vzorky s perylénom (suspektným excimérom perylénu,  $c = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) a s 1 910 kDa HYA s východiskovou koncentráciou  $0,4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$

Tab. 11 sumarizuje namerané doby života perylénu a ich zastúpenie vo všetkých vzorkách obsahujúcich sondu perylén. Na základe výsledkov z fluorescencie v ustálenom stave, konkrétne zo spektra vzorky perylénu s 1 910 kDa hyalurónanom s východiskovou koncentráciou  $0,4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  (Obr. 25), boli v každej kategórii vzoriek merané tri doby života perylénu. Zámerom bolo preukázať vznik exciméru perylénu na reťazci hyalurónanu, ktorý by sa mohol prejavovať dlhou dobou dohasínania fluorescencie.

U slepej vzorky perylénu vo vode boli identifikované dve doby života perylénu. Proporcne najviac zastúpený čas (78 %;  $\tau = 0,03 \text{ ns}$ ) zodpovedá rozptylu a druhý čas ( $\tau = 4,77 \text{ ns}$ ), ktorého zastúpenie je iba 22 %, je prisudzovaný málo rozpustenému perylénu vo vode.

Priemerná doba života perylénu v lyofilizovaných vzorkách (druhý najdlhší čas) bola stanovená na  $4,73 \pm 0,75 \text{ ns}$ , pričom zastúpenie jednotlivých časov sa líši a pohybuje sa od 1 % až po 62 %. Nízke hodnoty zastúpenia doby zhášania môžu poukazovať na slabé hydrofóbne interakcie perylénu s reťazcom hyalurónanu, čiže na slabú fluorescenciu perylénu z hydrofóbneho prostredia.

TRF spektrometria sa často používa na potvrdenie vzniku exciméru, ktorý sa prejavuje dlhou dobou zhášania sondy. Tri doby života perylénu boli získané u vzoriek [okrem slepej vzorky perylén vo vode a slepej vzorky s 1 910 kDa hyalurónanom s východiskovou koncentráciou  $0,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  a rozpusteným perylénom ( $c = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) po sušení mrazom], kde sme chceli preukázať vznik exciméru perylénu. V prípade opakovaných vzoriek (13 a 1 910 kDa hyalurónan s východiskovou koncentráciou  $0,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), kde sa výsledky veľmi nelíšili, bola premeraná vždy tretia opakovacia vzorka za účelom odhalenia vzniku exciméru perylénu. Z Tab. 11 sa dá povšimnúť, že u týchto vzoriek boli úspešne získané dlhé doby vyhasínania perylénu a boli aj dostatočne zastúpené (31–61 %). Priemerná doba zhášania suspektného exciméru perylénu bola spočítaná na  $13,87 \pm 1,18 \text{ ns}$ . Tento dlhý čas potvrdzuje fluorescenciu perylénu z hydrofóbneho prostredia. Zároveň nevyvracia vznik exciméru perylénu na reťazci

hyalurónanu. Slepá vzorka obsahujúca nezlyofilizovaný perylén a 1 910 kDa hyalurónan s východiskovou koncentráciou  $0,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ , vďaka nízkym hodnotám dôb zhášania perylénu, nepotvrdovala vznik exciméru, ani fluorescenciu sondy z hydrofóbného prostredia.

Z výsledkov je možné usúdiť, že doby života perylénu (druhé najdlhšie časy) v študovaných vzorkách by mohli byť priradené fluorescencii perylénu z hydrofóbnejších miest, čo by dokazovalo prítomnosť hydrofóbných interakcií medzi sondou a molekulami hyalurónanu.

Tab. 11: Namerané hodnoty dôb života perylénu ( $c = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) v slepých vzorkách a vo vzorkách prvej a druhej série s 13 a 1 910 kDa HYA s východiskovou koncentráciou  $0,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  (prvá séria) a  $0,4 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  (druhá séria)

$M_w$ HYA [kDa]	$c$ HYA [ $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ]	Merané vzorky	$\chi^2$ [-]	$\tau$ [ns]	Zastúpenie [%]
–	–	Blank	0,81	0,03	78
				4,77	22
1910	0,4	Normal	0,85	0,03	94
				3,36	6
		Excimér	1,05	0,03	8
				14,53	31
			6,18	62	
13	0,4	Normal	1,08	0,03	65
				3,75	35
		Excimér	1,16	4,67	49
				0,49	11
			13,84	39	
1910	0,5	Blank	0,76	0,03	79
				4,98	21
		Normal 1	0,94	0,03	96
				4,14	4
		Normal 2	0,91	0,03	97
				4,78	3
		Normal 3	0,91	0,03	96
				4,65	4
		N3 Excimér	1,14	0,03	11
				4,71	28
12,23	61				
13	0,5	Normal 1	0,86	0,02	96
				4,79	4
		Normal 2	0,87	0,01	99
				4,57	1
		Normal 3	0,88	0,03	95
				4,71	5
		N3 Excimér	1,05	0,03	12
14,89	55				
			6,09	33	

### 5.5.3 Doby života sondy prodanu vo vzorkách

Ďalšou použitou sondou pre modelovanie hydrofóbných interakcií s hyalurónanom bol prodan. Vzorky s prodanom vykazovali slabší signál ako v prípade sondy perylénu. U prodanu

dochádza k posunu maxima v závislosti na prostredí z ktorého fluoreskuje, a tým pádom boli merané vzorky pri emisii 530 a 555 nm (nastavené parametre prístroja Tab. 8).

U všetkých zmeraných vzoriek s prodanom boli výsledné závislosti preložené dvojfázovou exponenciálnou krivkou, čo hovorí o prítomnosti dvoch subpopulácií prodanu s odlišnou dobou života. Tab. 12 sumarizuje namerané dáta vzoriek druhej série a slepých vzoriek obsahujúcich sondu prodan a hyalurónan so strednou molekulovou hmotnosťou 13 a 1 910 kDa a s východiskovou koncentráciou  $0,4 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Prvý čas vzorky vždy zodpovedá rozptylu svetla a druhý čas zodpovedá dobe života prodanu. Z Tab. 12 vidíme, že doby života prodanu medzi slepými vzorkami sú veľmi podobné a rovnako tak aj lyofilizované vzorky majú rádovo rovnaké doby života excitovaných stavov, aj ich zastúpenie. Kvalita fitu bola u vzorky blank em530 s 13 kDa hyalurónanom potvrdená nízkou hodnotou chí-kvadrát testu ( $\chi^2 = 0,96$ ) a rovnako aj u vzorky normal s 13 kDa hyalurónanom ( $\chi^2 = 1,03$ ). Priemerná doba života prodanu v slepých vzorkách bola stanovená na  $2,23 \pm 0,17 \text{ ns}$  a v ostatných vzorkách bola určená na  $1,76 \pm 0,57 \text{ ns}$ . Na rozdiel od výsledkov z emisných spektier s prodanom (kapitola 5.4.2), z výsledkov z časovo rozlíšenej fluorescenčnej spektrometrie nemôžeme s určitosťou povedať, či došlo k hydrofóbnym interakciám prodanu s reťazcami hyalurónanu. Nižšia hodnota dôb života zlyofilizovaných vzoriek oproti slepým vzorkám poukazuje na menej úspešné sušenie mrazom.

Tab. 12: Namerané hodnoty dôb života prodanu ( $c = 5 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) vo vzorkách druhej série a v slepej vzorke s 13 a 1 910 kDa HYA s východiskovou koncentráciou  $0,4 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$

$M_w$ HYA [kDa]	$c$ HYA [ $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ]	Merané vzorky	$\chi^2$ [-]	$\tau$ [ns]	Zastúpenie [%]
1910	0,4	Blank em530	0,78	0,75	56
				2,41	44
		Normal	0,86	0,72	54
				2,16	46
13	0,4	Blank em530	0,96	0,76	57
				2,19	43
		Blank em555	0,73	0,03	49
				2,08	51
		Normal	1,03	0,01	51
				1,36	49

#### 5.5.4 Doby života sondy DPH vo vzorkách

Poslednou použitou sondou bol DPH. Napriek rôznym obmenám nastavenia parametrov prístroja však nebolo možné zachytiť jeho signál na TRF spektrometri. Bolo to spôsobené tým, že DPH, ako silná hydrofóbná sonda, fluoreskuje primárne z hydrofóbných miest a v tomto prípade bola sonda príliš hydratovaná na to, aby emitované žiarenie bolo detegovateľné prístrojom. Emisné spektrá vzoriek s DPH z ustáleného fluorescenčného spektrometru (Obr. 24) sú dôkazom toho, že časť sondy fluoreskuje z hydrofóbného prostredia, ale množstvo hydrofóbných interakcií medzi sondou a hydrofóbnymi časťami hyalurónanu je natoľko nízke, že TRF spektrometria nie je schopná zachytiť signál a zároveň sa sonda nachádza v príliš polárnom prostredí, kde je kvantový výťažok fluorescence DPH nízky.

## 6 ZÁVER

Cieľom tejto diplomovej práce bolo pripraviť systém na báze natívneho hyalurónanu (13 kDa a 1 910 kDa), ako vhodného nosiča pre liečivé látky využívajúce hydrofóbne interakcie medzi týmto biopolymérom a modelovými zlúčeninami. Pre simuláciu hydrofóbnych interakcií medzi liečivom a biopolymérom boli ako modelové zlúčeniny použité fluorescenčné sondy perylén, pyrén, prodan a 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrién (DPH), ktoré sú schopné v rámci tohto systému uprednostňovať vznik hydrofóbnych interakcií medzi vybranými hydrofóbnymi zlúčeninami a celkovo hydrofilným biopolymérom hyalurónanu. Širším cieľom tejto práce bolo prispieť k vývoju biokompatibilných a biologicky odbúrateľných nosičových systémov pre hydrofóbne lieky v oblasti cieľenej distribúcie aktívnej látky na báze natívneho, chemicky nemodifikovaného hyalurónanu v medicíne.

Ako prvé bolo treba pomocou DSC stanoviť najnižšiu možnú teplotu terc-butylalkoholu pre úspešné sušenie mrazom – z hľadiska napr. degradácie vzorky, a) buď blízko  $T_g$ , b) alebo okolo eutektického bodu. Najnižšia hodnota teploty topenia terc-butylalkoholu bola stanovená vo vzorke s 13 kDa hyalurónanom a 60 hm. % TBA a dosahovala hodnoty  $-12,47\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Ďalej boli pripravené dve série vzoriek líšiacich sa koncentráciou hyalurónanu a vybraných fluorescenčných sond, ktoré boli podrobené sušeniu mrazom. Lyofilizačné koláče druhej série vzoriek pri vizuálnom posúdení boli viac páperovité, vláknité a menej kompaktné ako lyofilizačné koláče prvej série. Bolo to spôsobené tým, že sa po procese mrazenia tlak ihneď znížil a pomaly sa zvyšoval počas procesu sušenia, čiže nedochádzalo k degradácii hyalurónanu (nenarušovali sa jeho intermolekulárne väzby).

Účinnosť sušenia mrazom bola študovaná pomocou infračervenej spektrometrie a skenovacieho elektrónového mikroskopu. Na základe porovnávania nameraných IČ spektier zlyofilizovaných vzoriek (HYA so sondou) a slepých vzoriek (HYA bez sondy) vieme vyvodiť záver, že u zlyofilizovaných vzoriek, s výnimkou vzoriek s pyrénom, došlo k hydrofóbnym interakciám medzi sondou a špecifickými časťami hyalurónanu, ktoré boli potvrdené prítomnosťou absorpčného pásu valenčnej vibrácie C=C väzby v aromatických kruhoch sond. Spektrá slepých vzoriek neobsahovali tento typ vibrácie kvôli neprítomnosti sondy vo vzorke. Na základe zmeraných spektier, prítomnosť zvyškového terc-butylalkoholu v lyofilizačných koláčoch nemohla byť vyvrátená, ani potvrdená.

Porovnaním SEM fotografií lyofilizačných koláčov sa došlo k záveru, že zvyšovanie tlaku v procese sušenia v druhej sérii vzoriek malo pozitívny vplyv na kvalitu lyofilizovanej vzorky. Vzorky prvej série, kde sa tlak počas sušenia znižoval, totiž zobrazovali hyalurónové vlákna, ktoré boli viac kompaktné, menej rozvetvené a obsahovali amorfné časti degradovanej štruktúry hyalurónanu. Naproti tomu koláče druhej série vykazovali po sušení mrazom viac rozvláknený hyalurónan v kryštalickej podobe, bez amorfných častí.

Interakcie fluorescenčnej sondy s hyalurónanom boli študované aj pomocou ustálenej a časovo rozlíšenej fluorescenčnej spektrometrie. U vzoriek s pyrénom boli v emisnom spektre porovnávané intenzity prvého (373 nm) a tretieho (383 nm) maxima. Polaritný index 2,01 u slepej vzorky bol ukazovateľom fluorescencie pyrénu z hydrofilného prostredia a nižšia hodnota polaritného indexu vzoriek (1,17 a 1,21) indukovala fluorescenciu pyrénu z hydrofóbného prostredia. Hydrofóbne interakcie sondy s hyalurónanom boli potvrdené v emisných spektrách prodanu posunutím emisného maxima zlyofilizovaných vzoriek (HYA

s prodanom) k nižším vlnovým dĺžkam, čiže k fluorescencii z hydrofóbných miest hyalurónanu. Z emisných spektier DPH sa dá konštatovať, že vyššia intenzita vzoriek oproti slepej vzorke vypovedá o fluorescencii sondy z hydrofóbných miest, čiže o fluorescencii DPH z hydrofóbných reťazcov hyalurónanu. Vyššia intenzita zlyofilizovaných vzoriek s perylénom druhej série (na rozdiel od prvej série) v porovnaní so slepou vzorkou, potvrdzovali úspešné hydrofóbne interakcie sondy s hyalurónanom. Emisný pík pri  $\lambda_{\max} = 588$  nm u zlyofilizovanej vzorky s 1 910 kDa hyalurónanom a perylénom môžeme interpretovať ako fluorescenciu kryštalického oligoméru perylénu, alebo exciméru perylénu. Na základe tohto emisného spektra však nevieme s určitosťou rozhodnúť, ktoré vysvetlenie vzniku píku pri  $\lambda_{\max} = 588$  nm je pravdepodobnejšie.

Posledná metóda, ktorou bola meraná účinnosť procesu sušenia mrazom, bola časovo rozlíšená fluorescenčná spektrometria. Z výsledkov vzoriek s perylénom boli získané doby vyhasínania perylénu ( $4,73 \pm 0,75$  ns a  $13,87 \pm 1,18$  ns), ktoré potvrdzujú fluorescenciu perylénu z hydrofóbného prostredia. Zároveň najdlhší zmeraný čas poukazuje na potenciálny vznik exciméru perylénu na reťazci hyalurónanu. Z výsledkov vzoriek s prodanom z TRF spektrometrie nemôžeme s určitosťou povedať, či došlo k hydrofóbnym interakciám prodanu s hyalurónanom. Nižšia hodnota dôb života zlyofilizovaných vzoriek s prodanom oproti slepým vzorkám svedčí o menej efektívnom procese sušenia mrazom v tomto modeli. U vzoriek s DPH nebolo možné zachytiť signál na TRF spektrometri. Bolo to spôsobené vysokým stupňom hydratácie DPH, čo znížilo kvantový výtazok emisie. TRF experimenty vykonané na vzorkách s obsahom pyrénu neposkytovali vhodné výsledky kvôli možným nečistotám vo vzorkách. Na určenie úspešnosti vzniku interakcií medzi pyrénom a hyalurónanom boli preto uvažované emisné spektrá a polaritné indexy pyrénu získané metódou ustálenej fluorescencie.

Z analýzy výsledkov merania môžeme vyvodit' záver, že metóda sušenia mrazom sa z hľadiska podpory hydrofóbných interakcií medzi natívnym hyalurónanom a hydrofóbnymi látkami javí ako účinná a perspektívna. Táto práca môže svojimi výsledkami prispieť k rozšíreniu znalostní potrebných k vývoju nosičových systémov na báze natívneho, chemicky nemodifikovaného hyalurónanu pre distribúciu liečiv.

Nasledujúce práce budú smerovať k vývoju prípravy a postupu tvorby takýchto systémov a k optimalizácii nastavenia parametrov sušenia mrazom. Najmä bude potrebné bližšie skúmať potenciálnu prítomnosť terc-butylalkoholu v lyofilizačnom koláči pomocou ďalších analytických metód, ako je napríklad plynová chromatografia s plameňovo ionizačnou detekciou, alebo v kombinácii s hmotnostným spektrometrom. Ďalší výskum sa môže zamerať na prípravu systémov, kde budú modelové zlúčeniny nahradené farmakologicky aktívnymi látkami s fluorescenčnými vlastnosťami, ako sú napr. niektoré cytostatiká a vitamíny.

## 7 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] STEINBÜCHEL, A., E. J. VANDAMME a S. DE BAETS. *Biopolymers*. Weinheim: Wiley-VCH, 2002, 532 s. ISBN 3-527-30226-3
- [2] HASCALL, V., T. LAURENT. Hyaluronan: Structure and physical properties. *Glycoforum* [online]. 1997, **1**(2) [cit. 2021-05-01]. Dostupné z: <https://www.glycoforum.gr.jp/article/01A2.html>
- [3] GIRISH, K.S. a K. KEMPARAJU. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. *Life Sciences* [online]. 2007, **80**(21), 1921-1943 [cit. 2021-05-05]. ISSN 00243205. Dostupné z: doi:10.1016/j.lfs.2007.02.037
- [4] NECAS, J., L. BARTOSIKOVA, P. BRAUNER a J. KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinární Medicína* [online]. 2008, **53**(8), 397-411 [cit. 2021-05-05]. ISSN 03758427. Dostupné z: doi:10.17221/1930-VETMED
- [5] Sigma Aldrich [online]. What is hyaluronan? *Merck Sigma Aldrich* [cit. 2022-04-05]. © 2022 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/SK/en/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/3d-cell-culture/what-is-hyaluronan>
- [6] MEYER, K., J.W. PALMER. *The polysaccharide of the vitreous humor*. J. Biol. Chem. 1934, **107**, 629-634
- [7] WEISSMANN, Bernard a Karl MEYER. The Structure of Hyalobiuronic Acid and of Hyaluronic Acid from Umbilical Cord 1,2. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 1954, **76**(7), 1753-1757 [cit. 2021-05-15]. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja01636a010
- [8] BALAZS, Endre A. Analgesic Effect of Elastoviscous Hyaluronan Solutions and the Treatment of Arthritic Pain. *Cells Tissues Organs* [online]. 2003, **174**(1-2), 49-62 [cit. 2021-05-15]. ISSN 1422-6405. Dostupné z: doi:10.1159/000070574
- [9] SELYANIN, Mikhail A., Petr Ya. BOYKOV, Vladimir N. KHABAROV a Felix POLYAK. The History of Hyaluronic Acid Discovery, Foundational Research and Initial Use. *Hyaluronic Acid* [online]. Chichester, UK: John Wiley, 2015, s. 1-8 [cit. 2021-05-16]. ISBN 9781118695920. Dostupné z: doi:10.1002/9781118695920.ch1
- [10] LAPČÍK, Lubomír, Stefaan DE SMEDT, Joseph DEMEESTER a Peter CHABREČEK. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications. *Chemical Reviews* [online]. 1998, **98**(8), 2663-2684 [cit. 2021-05-16]. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr941199z
- [11] ISACKE, Clare M. a Helen YARWOOD. The hyaluronan receptor, CD44. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* [online]. 2002, **34**(7), 718-721 [cit. 2021-05-16]. ISSN 13572725. Dostupné z: doi:10.1016/S1357-2725(01)00166-2
- [12] KNUDSON, Warren, Geraldine CHOW a Cheryl B KNUDSON. CD44-mediated uptake and degradation of hyaluronan. *Matrix Biology* [online]. 2002, **21**(1), 15-23 [cit. 2021-05-16]. ISSN 0945053X. Dostupné z: doi:10.1016/S0945-053X(01)00186-X
- [13] SLEVIN, Mark, Jurek KRUPINSKI, John GAFFNEY, Sabine MATOU, David WEST, Horace DELISSER, Rashmin C. SAVANI a Shant KUMAR. Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: Uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways. *Matrix Biology* [online]. 2007, **26**(1), 58-68 [cit. 2021-05-16]. ISSN 0945053X. Dostupné z: doi:10.1016/j.matbio.2006.08.261
- [14] TOOLE, Bryan P. a Mark G. SLOMIANY. Hyaluronan, CD44 and Emmprin: Partners in cancer cell chemoresistance. *Drug Resistance Updates* [online]. 2008, **11**(3), 110-121 [cit. 2021-05-16]. ISSN 13687646. Dostupné z: doi:10.1016/j.drug.2008.04.002
- [15] BROWN, Tracey. The Development of Hyaluronan as a Drug Transporter and Excipient for Chemotherapeutic Drugs. *Current Pharmaceutical Biotechnology* [online]. 2008, **9**(4), 253-260 [cit. 2021-05-17]. ISSN 13892010. Dostupné z: doi:10.2174/138920108785161514



- [16] JIN, Yu-Jin, Termsarasab UBONVAN a Dae-Duk KIM. Hyaluronic Acid in Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical Investigation* [online]. 2010, **40**(spc), 33-43 [cit. 2021-05-17]. ISSN 2093-5552. Dostupné z: doi:10.4333/KPS.2010.40.S.033
- [17] LEE, Hyukjin, Kyuri LEE a Tae Gwan PARK. Hyaluronic Acid–Paclitaxel Conjugate Micelles: Synthesis, Characterization, and Antitumor Activity. *Bioconjugate Chemistry* [online]. 2008, **19**(6), 1319-1325 [cit. 2021-05-17]. ISSN 1043-1802. Dostupné z: doi:10.1021/bc8000485
- [18] PEER, Dan a Rimona MARGALIT. Tumor-Targeted Hyaluronan Nanoliposomes Increase the Antitumor Activity of Liposomal Doxorubicin in Syngeneic and Human Xenograft Mouse Tumor Models. *Neoplasia* [online]. 2004, **6**(4), 343-353 [cit. 2021-05-17]. ISSN 15228002. Dostupné z: doi:10.1593/neo.03460
- [19] PETRAK, Karel. Essential properties of drug-targeting delivery systems. *Drug Discovery Today* [online]. 2005, **10**(23-24), 1667-1673 [cit. 2021-05-17]. ISSN 13596446. Dostupné z: doi:10.1016/S1359-6446(05)03698-6
- [20] CREUZET, Caroline, Shirin KADI, Marguerite RINAUDO a Rachel AUZÉLY-VELTY. New associative systems based on alkylated hyaluronic acid. Synthesis and aqueous solution properties. *Polymer* [online]. 2006, **47**(8), 2706-2713 [cit. 2021-05-17]. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2006.02.052
- [21] CHYTIL, Martin a Miloslav PEKAŘ. Effect of new hydrophobic modification of hyaluronan on its solution properties: evaluation of self-aggregation. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2009, **76**(3), 443-448 [cit. 2021-05-17]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2008.11.003
- [22] MRAVEC, Filip, Miloslav PEKAŘ a Vladimír VELEBNÝ. Aggregation behavior of novel hyaluronan derivatives—a fluorescence probe study. *Colloid and Polymer Science* [online]. 2008, **286**(14-15), 1681-1685 [cit. 2021-05-17]. ISSN 0303-402X. Dostupné z: doi:10.1007/s00396-008-1941-8
- [23] OYARZUN-AMPUERO, Felipe A., Gustavo R. RIVERA-RODRÍGUEZ, María J. ALONSO a Dolores TORRES. Hyaluronan nanocapsules as a new vehicle for intracellular drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2013, **49**(4), 483-490 [cit. 2021-05-17]. ISSN 09280987. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejps.2013.05.008
- [24] NAZERI, Arezoo, Ali NIAZI, Alireza AFSHARIFAR, Seyed Mohsen TAGHAVI, Ali MOGHADAM a Farzaneh ARAM. Heterologous production of hyaluronic acid in *Nicotiana tabacum* hairy roots expressing a human hyaluronan synthase 2. *Scientific Reports* [online]. 2021, **11**(1) [cit. 2021-05-17]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-021-97139-0
- [25] KOGAN, Grigorij, Ladislav ŠOLTÉS, Robert STERN a Peter GEMEINER. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters* [online]. 2006, **29**(1), 17-25 [cit. 2021-05-19]. ISSN 0141-5492. Dostupné z: doi:10.1007/s10529-006-9219-z
- [26] TAVIANATOU, Anastasia G., Ilaria CAON, Marco FRANCHI, Zoi PIPERIGKOU, Devis GALESSO a Nikos K. KARAMANOS. Hyaluronan: molecular size-dependent signaling and biological functions in inflammation and cancer. *The FEBS Journal* [online]. 2019, **286**(15), 2883-2908 [cit. 2021-05-19]. ISSN 1742-464X. Dostupné z: doi:10.1111/febs.14777
- [27] PubChem [online]. Hyaluronic acid sodium salt. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 23663392, [cit. 2021-05-10]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hyaluronic-acid-sodium-salt>
- [28] ChemSpider [online]. Hyaluronic acid. Royal Society of Chemistry [cit. 2022-04-10]. © Royal Society of Chemistry 2022. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2341173.html>
- [29] SNETKOV, Petr, Kseniia ZAKHAROVA, Svetlana MOROZKINA, Roman OLEKHNOVICH a Mayya USPENSKAYA. Hyaluronic Acid: The Influence of Molecular Weight on Structural, Physical, Physico-

- Chemical, and Degradable Properties of Biopolymer. *Polymers* [online]. 2020, **12**(8) [cit. 2021-05-20]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym12081800
- [30] SCOTT, John E. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solutions. Some biological consequences. *Glycoforum* [online], 1998, **2**(1) [cit. 2021-05-20]. Dostupné z: <https://www.glycoforum.gr.jp/article/02A1.html>
- [31] SCOTT, John E. a Frank HEATLEY. Hyaluronan forms specific stable tertiary structures in aqueous solution: A <sup>13</sup>C NMR study. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1999, **96**(9), 4850-4855 [cit. 2021-05-20]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.96.9.4850
- [32] FALCONE, Samuel J., David M. PALMERI a Richard A. BERG. Rheological and cohesive properties of hyaluronic acid. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2006, **76A**(4), 721-728 [cit. 2021-05-20]. ISSN 1549-3296. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.30623
- [33] Vismed [online]. Properties of hyaluronan. *TRB Chemedica UK* [cit. 2021-05-20]. © TRB Chemedica International. Dostupné z: <https://vismed.trbchemedica.co.uk/business-professionals/role-and-purpose-of-hyaluronan/properties-of-hyaluronan>
- [34] BOERIU, Carmen G., Jan SPRINGER, Floor K. KOOY, Lambertus A. M. VAN DEN BROEK a Gerrit EGGINK. Production Methods for Hyaluronan. *International Journal of Carbohydrate Chemistry* [online]. 2013, **2013**, 1-14 [cit. 2021-05-21]. ISSN 1687-9341. Dostupné z: doi:10.1155/2013/624967
- [35] SHIEDLIN, Aviva, Russell BIGELOW, William CHRISTOPHER, et al. Evaluation of Hyaluronan from Different Sources: Streptococcus z oepidemicus , Rooster Comb, Bovine Vitreous, and Human Umbilical Cord. *Biomacromolecules* [online]. 2004, **5**(6), 2122-2127 [cit. 2021-05-21]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm0498427
- [36] SCHIRALDI, Chiara, Annalisa LA a Mario DE. Biotechnological Production and Application of Hyaluronan. ELNASHAR, Magdy, ed. *Biopolymers* [online]. Sciyo, 2010 [cit. 2021-05-20]. ISBN 978-953-307-109-1. Dostupné z: doi:10.5772/10271
- [37] JOY, Reenu Anne, Narendranath VIKKATH a Prasanth S. ARIYANNUR. Metabolism and mechanisms of action of hyaluronan in human biology. *Drug Metabolism and Personalized Therapy* [online]. 2018, **33**(1), 15-32 [cit. 2021-05-20]. ISSN 2363-8915. Dostupné z: doi:10.1515/dmpt-2017-0031
- [38] MISRA, Suniti, Vincent C. HASCALL, Roger R. MARKWALD a Shibnath GHATAK. Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer. *Frontiers in Immunology* [online]. 2015, **6** [cit. 2021-10-26]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2015.00201
- [39] ASARI, Akira. Novel functions of hyaluronan oligosaccharides. *Glycoforum* [online], 2005, **9**(1) [cit. 2021-10-15]. Dostupné z: <https://www.glycoforum.gr.jp/article/09A1.html>
- [40] STERN, Robert. Update on the mammalian hyaluronidases. *Glycoforum* [online], 2004, **8**(3) [cit. 2021-06-15]. Dostupné z: <https://www.glycoforum.gr.jp/article/08A3.html>
- [41] STERN, Robert, Akira A. ASARI a Kazuki N. SUGAHARA. Hyaluronan fragments: An information-rich system. *European Journal of Cell Biology* [online]. 2006, **85**(8), 699-715 [cit. 2021-10-15]. ISSN 01719335. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejcb.2006.05.009
- [42] ZHAO, Yu-fang, Shu-pei QIAO, Shu-liang SHI, et al. Modulating Three-Dimensional Microenvironment with Hyaluronan of Different Molecular Weights Alters Breast Cancer Cell Invasion Behavior. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online]. 2017, **9**(11), 9327-9338 [cit. 2021-10-27]. ISSN 1944-8244. Dostupné z: doi:10.1021/acsami.6b15187

- [43] FAKHARI, A. a C. BERKLAND. Applications and emerging trends of hyaluronic acid in tissue engineering, as a dermal filler and in osteoarthritis treatment. *Acta Biomaterialia* [online]. 2013, **9**(7), 7081-7092 [cit. 2021-10-27]. ISSN 17427061. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2013.03.005
- [44] PECHOVÁ V., GAJDZIOK J. Možnosti využití hyaluronátu sodného ve farmacii a medicíně. *Česká a slovenská farmácia* [online]. 2017, **66**(4), 154-159 [cit. 2022-04-23]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-slovenska-farmacie/2017-4/moznosti-vyuziti-hyaluronatu-sodneho-ve-farmacii-a-medicine-62679>
- [45] ICH [online]. ICH Guidelines. *ICH harmonisation for better health* [cit. 2022-04-23]. Dostupné z: <https://www.ich.org/page/ich-guidelines>
- [46] NA, Seong Ju, Su Young CHAE, Seulki LEE, et al. Stability and bioactivity of nanocomplex of TNF-related apoptosis-inducing ligand. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2008, **363**(1-2), 149-154 [cit. 2021-11-01]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2008.07.013
- [47] GAFFNEY, John, Sabine MATOU-NASRI, Marta GRAU-OLIVARES a Mark SLEVIN. Therapeutic applications of hyaluronan. *Mol. BioSyst* [online]. 2010, **6**(3), 437-443 [cit. 2021-11-01]. ISSN 1742-206X. Dostupné z: doi:10.1039/B910552M
- [48] HORČIČKA, Vlado. Osteoartróza [online]. *Interní medicína pro praxi*. 2004, **6**(5), 238–243 [cit. 2021-11-02]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2004/05/03.pdf>
- [49] ŠTEŇO, Boris a Juraj ŠELIGA. Farmakologická liečba osteoartrózy: Pharmacological treatment of osteoarthritis. *Ambulantná terapia*. Bratislava: SOLEN, 2008, **6**(3), 164 a 166-168. ISSN 1336-6750
- [50] ŠTEŇO, Boris, Emöke ŠTEŇOVÁ a Róbert BRNKA. Osteoartróza - komplexná konzervatívna liečba: Osteoarthritis - complex conservative treatment. *Ambulantná terapia*. Bratislava: SOLEN, 2008, **6**(2), 98 a 100 a 102. ISSN 1336-6750
- [51] DOVEDYTIS, Matthew, Zhuo Jie LIU a Samuel BARTLETT. Hyaluronic acid and its biomedical applications: A review. *Engineered Regeneration* [online]. 2020, **1**, 102-113 [cit. 2021-11-05]. ISSN 26661381. Dostupné z: doi:10.1016/j.engreg.2020.10.001
- [52] Aktivní hojení [online]. Hyiodine. *Aktivní hojení* [cit. 2022-01-20]. Dostupné z: <https://www.aktivnihojeni.cz/hyiodine>
- [53] Contipro [online]. Hojení ran. *Contipro* [cit. 2022-01-20]. © 2017 Contipro a.s. Dostupné z: <https://www.contipro.cz/portfolio/pripravky-na-hojeni-ran>
- [54] Aktivní hojení [online]. Sorelex. *Aktivní hojení* [cit. 2022-01-20]. Dostupné z: <https://www.aktivnihojeni.cz/sorelex>
- [55] HUERTA ÁNGELES, Gloria a Kristina NEŠPOROVÁ. Hyaluronan and its derivatives for ophthalmology: Recent advances and future perspectives. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2021, **259** [cit. 2022-01-22]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2021.117697
- [56] Hylo [online]. Oční kapky s kyselinou hyaluronovou. *Hylo Eye Care* ® [cit. 2022-01-22]. Dostupné z: <https://hylo.cz/lecba-suceho-oka/zvlhcujici-slozky/kyselina-hyaluronova/>
- [57] CHANG, Wan-Hsin, Pei-Yi LIU, Min-Hsuan LIN, Chien-Ju LU, Hsuan-Yi CHOU, Chih-Yu NIAN, Yuan-Ting JIANG a Yuan-Hao Howard HSU. Applications of Hyaluronic Acid in Ophthalmology and Contact Lenses. *Molecules* [online]. 2021, **26**(9) [cit. 2022-02-10]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules26092485
- [58] HUANG, Gangliang a Hualiang HUANG. Application of hyaluronic acid as carriers in drug delivery. *Drug Delivery* [online]. 2018, **25**(1), 766-772 [cit. 2022-02-12]. ISSN 1071-7544. Dostupné z: doi:10.1080/10717544.2018.1450910

- [59]LIAO, Yong-Hong, Stuart A. JONES, Ben FORBES, Gary P. MARTIN a Marc B. BROWN. Hyaluronan: Pharmaceutical Characterization and Drug Delivery. *Drug Delivery* [online]. 2008, **12**(6), 327-342 [cit. 2022-02-12]. ISSN 1071-7544. Dostupné z: doi:10.1080/10717540590952555
- [60]BROWN, Marc B., Ben FORBES, Manita HANPANITCHAROEN a Gary P. MARTIN. THE USE OF HYALURONAN IN TOPICAL DRUG DELIVERY. *Hyaluronan* [online]. Elsevier, 2002, 2002, s. 249-256 [cit. 2022-02-12]. ISBN 9781855735705. Dostupné z: doi:10.1533/9781845693121.247
- [61]BROWN, M.B., C. MARRIOTT, G.P. MARTIN. The effect of hyaluronan on the in vitro deposition of diclofenac within the skin. *International Journal of Tissue Reactions*. 1995; 17(4):133-140. PMID: 8867643
- [62]CASTELLANO, F., G. MAUTONE. Decongestant activity of a new formulation of xylometazoline nasal spray: a double-blind, randomized versus placebo and reference drugs controlled, dose-effect study. *Drugs Exp Clin Res*. 2002;28(1):27-35. PMID: 12073765
- [63]PEER, Dan a Rimona MARGALIT. Physicochemical Evaluation of a Stability-Driven Approach to Drug Entrapment in Regular and in Surface-Modified Liposomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. 2000, **383**(2), 185-190 [cit. 2022-02-20]. ISSN 00039861. Dostupné z: doi:10.1006/abbi.2000.2046
- [64]MICHALICOVÁ, Petra, Filip MRAVEC, Miloslav PEKAŘ a Bing XU. Fluorescence study of freeze-drying as a method for support the interactions between hyaluronan and hydrophobic species. *PLOS ONE* [online]. 2017, **12**(9) [cit. 2022-03-30]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0184558
- [65]CSAPÓ, Edit, Hajnalka SZOKOLAI, Ádám JUHÁSZ, Norbert VARGA, László JANOVÁK a Imre DÉKÁNY. Cross-linked and hydrophobized hyaluronic acid-based controlled drug release systems. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2018, **195**, 99-106 [cit. 2022-03-30]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2018.04.073
- [66]BUKHARI, Syed Nasir Abbas, Nur Liyana ROSWANDI, Muhammad WAQAS, et al. Hyaluronic acid, a promising skin rejuvenating biomedicine: A review of recent updates and pre-clinical and clinical investigations on cosmetic and nutricosmetic effects. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2018, **120**, 1682-1695 [cit. 2022-03-30]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.09.188
- [67]YOON, Hong Yeol, Heebeom KOO, Ki Young CHOI, et al. Tumor-targeting hyaluronic acid nanoparticles for photodynamic imaging and therapy. *Biomaterials* [online]. 2012, **33**(15), 3980-3989 [cit. 2022-03-30]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2012.02.016
- [68]VESSOT, Séverine a Julien ANDRIEU. A Review on Freeze Drying of Drugs with tert -Butanol (TBA) + Water Systems: Characteristics, Advantages, Drawbacks. *Drying Technology* [online]. 2012, **30**(4), 377-385 [cit. 2022-03-30]. ISSN 0737-3937. Dostupné z: doi:10.1080/07373937.2011.628133
- [69]WITTAYA-AREEKUL, Sakchai a Steven L. NAIL. Freeze-Drying of tert-Butyl Alcohol/Water Cosolvent Systems: Effects of Formulation and Process Variables on Residual Solvents. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 1998, **87**(4), 491-495 [cit. 2022-03-30]. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1021/js9702832
- [70]GOGINENI, Prasad V., Peter A. CROOKS a Ram B. MURTY. Gas chromatographic determination of residual levels of tert.-butanol from lyophilized liposomal formulations. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* [online]. 1993, **620**(1), 83-88 [cit. 2022-03-30]. ISSN 03784347. Dostupné z: doi:10.1016/0378-4347(93)80054-8

- [71] KASRAIAN, Kasra a Patrick P. DELUCA. Thermal Analysis of the Tertiary Butyl Alcohol-Water System and Its Implications on Freeze-Drying. *Pharmaceutical Research* [online]. **12**(4), 484-490 [cit. 2022-04-02]. ISSN 07248741. Dostupné z: doi:10.1023/A:1016233408831
- [72] FRANKS, Felix. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 1998, **45**(3), 221-229 [cit. 2022-04-05]. ISSN 09396411. Dostupné z: doi:10.1016/S0939-6411(98)00004-6
- [73] TSINONTIDES, S.C, P RAJNIK, D PHAM, W.A HUNKE, J PLACEK a S.D REYNOLDS. Freeze drying—principles and practice for successful scale-up to manufacturing. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2004, **280**(1-2), 1-16 [cit. 2022-04-05]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2004.04.018
- [74] PubChem [online]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 6386, tert-Butanol; [cit. 2022-04-24]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/tert-Butanol>
- [75] PubChem [online]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 31423, Pyrene; [cit. 2022-04-24]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pyrene>
- [76] PubChem [online]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 9142, Perylene; [cit. 2022-04-24]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Perylene>
- [77] PubChem [online]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 107729, Prodan; [cit. 2022-04-24]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Prodan>
- [78] PubChem [online]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 5376733, 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene; [cit. 2022-04-24]. Dostupné z: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1\\_6-Diphenyl-1\\_3\\_5-hexatriene](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1_6-Diphenyl-1_3_5-hexatriene)
- [79] Instrument specialists [online]. DSC – differential scanning calorimetry. *Instrument specialists incorporated* [cit. 2022-04-20]. © 1991–2016. Dostupné z: <http://instrument-specialists.com/thermal-analysis-applications/differential-scanning-calorimetry-dsc/>
- [80] SHUKLA, Soham. Freeze drying process: a review. *International journal of pharmaceutical sciences and research* [online]. India, 2011, **2**(12), 3061–3068 [cit. 2022-04-24]. ISSN: 0975-8232. Dostupné z: doi:10.13040/IJPSR.0975-8232.2(12).3061-68
- [81] GÜNZLER, Helmut a Alex WILLIAMS. *Handbook of analytical techniques*. Weinheim: Wiley-VCH, 2001. ISBN 3527301658
- [82] Chem.libretexts [online]. Infrared Spectroscopy. *Chemistry LibreTexts* [cit. 2022-04-24]. Last update: Apr 16, 2022. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\\_Textbook\\_Maps/Supplemental\\_Modules\\_\(Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\)/Spectroscopy/Vibrational\\_Spectroscopy/Infrared\\_Spectroscopy/Infrared\\_Spectroscopy](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Infrared_Spectroscopy/Infrared_Spectroscopy)
- [83] ZHOU, Weilie, Robert APKARIAN, Zhong Lin WANG a David JOY. Fundamentals of Scanning Electron Microscopy (SEM). ZHOU, Weilie a Zhong Lin WANG, ed. *Scanning Microscopy for Nanotechnology* [online]. New York, NY: Springer New York, 2006, 2006, s. 1-40 [cit. 2022-04-26]. ISBN 978-0-387-33325-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-0-387-39620-0\_1

- [84] LAKOWICZ, Joseph R., ed. Instrumentation for Fluorescence Spectroscopy. *Principles of Fluorescence Spectroscopy* [online]. Boston, MA: Springer US, 2006, 2006, s. 27-61 [cit. 2022-04-26]. ISBN 978-0-387-31278-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-0-387-46312-4\_2
- [85] VALEUR, Bernard a Mário Nuno BERBERAN-SANTOS. *Molecular Fluorescence* [online]. Wiley, 2012 [cit. 2022-04-26]. ISBN 9783527328376. Dostupné z: doi:10.1002/9783527650002
- [86] DAS, B B, Feng LIU a R R ALFANO. Time-resolved fluorescence and photon migration studies in biomedical and model random media. *Reports on Progress in Physics* [online]. 1997, **60**(2), 227-292 [cit. 2022-04-26]. ISSN 0034-4885. Dostupné z: doi:10.1088/0034-4885/60/2/002
- [87] ENEV, Vojtěch, Petr SEDLÁČEK, Sabína JARÁBKOVÁ, Tomáš VELCER a Miloslav PEKAŘ. ATR-FTIR spectroscopy and thermogravimetry characterization of water in polyelectrolyte-surfactant hydrogels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2019, **575**, 1-9 [cit. 2022-05-02]. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2019.04.089
- [88] STUART, B. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. 2004, 1 vydání, Wiley & Sons. ISBN: 0-470-85427-8
- [89] COATES, J. *Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach*. Encyclopaedia of Analytical Chemistry. MEYERS, R.A., 2000, 1 vydanie, John Wiley & Sons, pp. 10815–10837.
- [90] BARTH, Andreas. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* [online]. 2007, **1767**(9), 1073-1101 [cit. 2022-04-26]. ISSN 00052728. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbabi.2007.06.004
- [91] CHEN, Hongyue, Jing QIN a Yi HU. Efficient Degradation of High-Molecular-Weight Hyaluronic Acid by a Combination of Ultrasound, Hydrogen Peroxide, and Copper Ion. *Molecules* [online]. 2019, **24**(3) [cit. 2022-04-26]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24030617
- [92] SMITH, B. C. Alcohols—The rest of the story. *Spectroscopy* [online]. 2017, **32**(4), 19–23 [cit. 2022-04-24]. Dostupné z: [https://cdn.sanity.io/files/0vv8moc6/spectroscopy/23fa2af9f5a84aa81e0c3cb2f0712adadc9ae3d6.pdf/Spectroscopy\\_April2017.pdf](https://cdn.sanity.io/files/0vv8moc6/spectroscopy/23fa2af9f5a84aa81e0c3cb2f0712adadc9ae3d6.pdf/Spectroscopy_April2017.pdf)
- [93] MOHANAMBE, L. a S. VASUDEVAN. Aromatic Molecules in Restricted Geometries: Pyrene Excimer Formation in an Anchored Bilayer. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2006, **110**(29), 14345-14354 [cit. 2022-04-26]. ISSN 1520-6106. Dostupné z: doi:10.1021/jp061695e
- [94] ATKINS, Peter William a R.S FRIEDMAN. *Molecular Quantum Mechanics*. 3rd Ed. Oxford: Oxford University Press, 1997. ISBN 0-19-855947-x.
- [95] CONDON, Edward. A Theory of Intensity Distribution in Band Systems. *Physical Review* [online]. 1926, **28**(6), 1182-1201 [cit. 2022-04-26]. ISSN 0031-899X. Dostupné z: doi:10.1103/PhysRev.28.1182
- [96] MACEDO, Andreia Gerniski, Leticia Patricio CHRISTOPHOLI, Anderson E. X. GAVIM, Jeferson Ferreira DE DEUS, Mohd Asri Mat TERIDI, Abd. Rashid bin Mohd YUSOFF a Wilson José DA SILVA. Perylene derivatives for solar cells and energy harvesting: a review of materials, challenges and advances. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics* [online]. 2019, **30**(17), 15803-15824 [cit. 2022-04-29]. ISSN 0957-4522. Dostupné z: doi:10.1007/s10854-019-02019-z

## 8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

### 8.1 Zoznam skratiek

3D	Trojrozmerný
4-MU	4-metylumbeliferón
Ac-CoA	Acetyl-koenzým A
ATP	Adenozíntrifosfát
ATR-FTIR	Infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou, metóda zoslabeného úplného odrazu
BDDE	1,4-butándioldiglycidyléter
BHQ3	Zhášač čiernych dier 3
CD44	<i>Cluster of differentiation 44</i> receptor
Ce6	Chlór e6
CTAB	Cetyltrimetylamóniumbromid
DPH	1,6-difenyl-1,3,5-hexatrién
DSC	Diferenčná skenovacia kalorimetria
DVS	Divinylsulfón
EMA	<i>The European Medicines Agency</i>
EmPI	Emisný polaritní index
ER	Endoplazmatické retikulum
ERK	Extracelulárne signálom regulované kinázy
F6P	Fruktóza-6-fosfát
FIR	Ďaleká infračervená oblasť
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G1P	Glukóza-1-fosfát
G6P	Glukóza-6-fosfát
GlcN6P	Glukozamín-6-fosfát
GlcNAc	N-acetyl-glukozamín
GlcUA	Glukurónová kyselina
GlcNAc6P	N-acetyl-glukozamín-6-fosfát
GLN	Glutamín
GLU	Glutamát
HANP	Hyalurónové nanočastice
HAS	Hyalurónan syntáza
HMW	Vysokomolekulárny
HYA	Hyalurónan
HYAL	Hyaluronidáza
ICTA	<i>International Confederation for Thermal Analysis</i>
IČ	Infračervené
LMW	Nízkomolekulárny
LYVE	<i>Lymph vessel endothelial hyaluronan receptor</i>
MAP	Mitogénom aktivovaná proteínkináza
MIR	Stredná infračervená oblasť
NAD	Nikotínamidadenín-dinukleotid

NF- $\kappa$ B	Nukleárny faktor kappa B
NIR	Blízka infračervená oblasť
o-HYA	Oligosacharidy hyalurónanu
PEG	Polyetylénglykol
PI	Polaritný index
PP	Pyrofosfát
RHAMM	<i>Hyaluronan-mediated motility receptor</i>
RTG	Rentgenové žiarenie
SEM	Skenovací elektronový mikroskop
TAC	<i>Time-to-amplitude convertor</i>
TBA	Terc-butylalkohol
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TRF	<i>Time-resolved fluorescence</i> (časovo rozlíšená fluorescencia)
TSG-6	<i>The product of tumor necrosis factor stimulated gene-6</i>
UDP	Uridíndifosfát
UDP-G	Uridíndifosfát-glukóza
UDP-GlcUA	Uridíndifosfát-glukurónová kyselina
UDP-GlcNAc	Uridíndifosfát-N-acetyl-glukozamín
UTP	Uridíntrifosfát
UV	Ultrafialová oblasť spektra elektromagnetického žiarenia
vHMW	Veľmi vysokomolekulárny

## 8.2 Zoznam symbolov

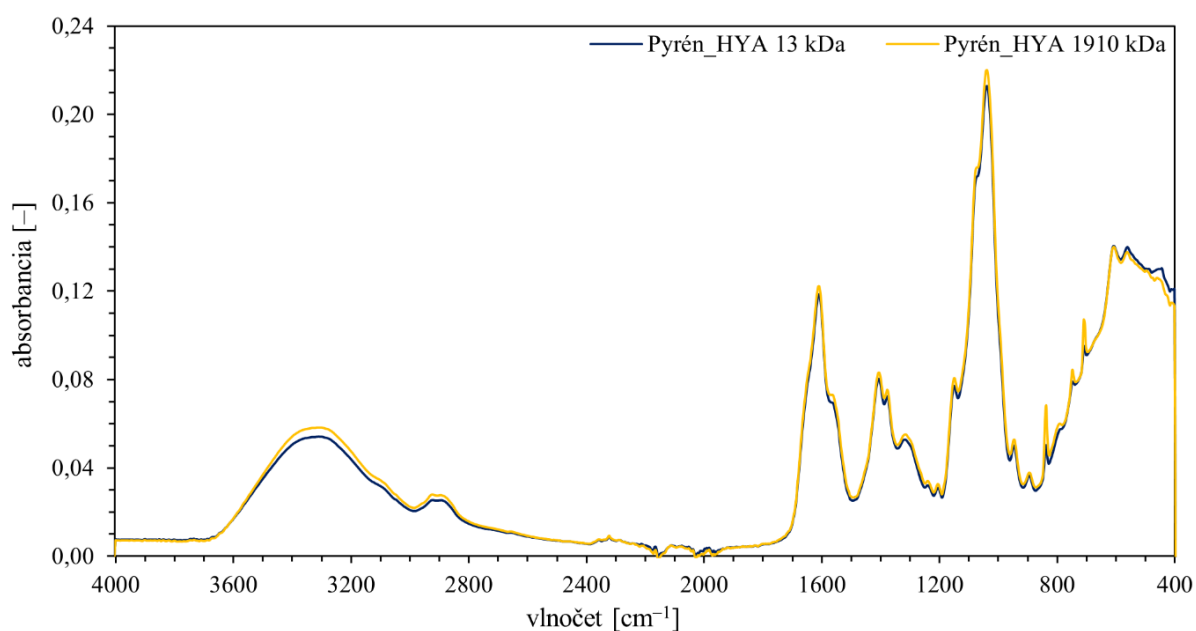
hm. %	Koncentrácia v hmotnostných percentách
$K_M$	Konštanta Michaelisa-Mentenovej
$\lambda$	Vlnová dĺžka elektromagnetického žiarenia
®	Registrovaná ochranná známka
TM	<i>Trade Mark</i> (ochranná známka)
$V$	Objem
$M_w$	Molekulová hmotnosť
$c$	Koncentrácia
$f$	Frekvencia
$\lambda_{\max}$	Vlnová dĺžka pri maximálnej intenzite fluorescencie
$\tau$	Doba života fluorescencie
$S_0$	Základný stav molekuly
$S_1$	Prvý excitovaný singletový stav molekuly
$S_2$	Druhý excitovaný singletový stav molekuly



## 9 PRÍLOHY

Príloha 1: Výsledky merania teploty a entalpie topenia zmesi TBA s rôznou hmotnostnou koncentračnou radou a HYA vo vode v procese endotermickej zmeny na DSC

$c$ TBA [hm. %]	$M_w$ HYA [kDa]	T topenia [°C]	$H$ topenia [ $J \cdot g^{-1}$ ]	T píku [°C]
0	13	-1,19	330,80	2,62
	1910	-1,55	346,50	1,95
10	13	-10,73	118,94	-2,76
	1910	-10,84	125,23	-2,96
20	13	-9,37	335,10	-8,41
	1910	-9,27	369,10	-8,21
30	13	-10,57	237,70	-8,36
	1910	-10,53	239,90	-8,95
40	13	-11,46	115,42	-1,02
	1910	-10,81	177,65	-1,28
50	13	-12,06	159,70	-0,54
	1910	-11,51	111,90	-0,59
60	13	-12,47	166,39	-0,01
	1910	-12,27	183,63	-0,20
70	13	-0,89	200,90	0,38
	1910	-1,09	183,50	0,32
80	13	-6,42	152,80	-4,08
	1910	-6,37	150,30	-4,32
90	13	-6,31	127,70	-4,25
	1910	-6,56	124,10	-4,29
100	13	-7,79	6,92	-5,06
	1910	-7,79	7,64	-5,30



Príloha 2: ATR-FTIR spektrá fluorescenčnej sondy pyrénu s HYA so strednou molekulovou hmotnosťou 1 910 kDa (žltá krivka) a 13 kDa (modrá krivka).