



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 PRO PŘÍPRAVU NOSIČOVÝCH SYSTÉMŮ NA BÁZI HYALURONANU A KONKRÉTNÍCH LÉČIV

PROGRAM-CONTROLLED FREEZE DRYING FOR THE PREPARATION OF THE DELIVERY SYSTEM BASED
ON HYALURONAN AND REAL DRUGS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Marek Řihák

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1852/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Bc. Marek Řihák**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Procesy a materiály medicínských aplikací
Vedoucí práce: **doc. Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Programově řízená lyofilizace pro přípravu nosičových systémů na bázi hyaluronanu a konkrétních léčiv

Zadání diplomové práce:

Cílem této diplomové práce je připravit systém na bázi nativního hyaluronanu, jako vhodného nosiče pro konkrétní léčiva využívající hydrofobních interakcí mezi tímto biopolymerem a léčivem. Nejprve bude studentem provedena podrobná a aktuální literární rešerše na zadané téma, které ve své podstatě odráží proces lyofilizace, subkapitoly koloidní chemie tzn. slabé vazebné interakce, chování biopolymerů v roztoku atd.

Jako vhodné ko-rozpouštědlo systému biopolymer–léčivo bude použit terc. butyl alkohol.

Dále budou připraveny vzorky s obsahem reálných léčiv, které budou podrobeny sušení mrazem.

Interakce léčiva s polysacharidem budou studovány pomocí fluorescenční spektrometrie.

Dále se student pokusí o stanovení obsahu zbytkového residua terc. butyl alkoholu v lyofilizovaných vzorcích.

Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

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

Bc. Marek Řihák
student

doc. Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Cílem této diplomové práce bylo připravit nosičové systémy na bázi nativního hyaluronan s využitím lyofilizace coby vhodné metody pro zajištění interakce mezi konkrétním léčivem a polymerní strukturou. K přípravě systémů byl využit *terc*-butylalkohol coby ko-rozpouštědlo podporující hydrofobní efekt mezi léčivem a hydrofobními doménami hyaluronanu. Vzhledem k tomu, že všechny polární skupiny zaujímají ekvatoriální polohu, připadají na axiální polohu pouze vodíky, čímž získává molekula amfifilní charakter. Předchozí studie potvrdily, že sušení mrazem je užitečnou metodou pro přípravu nosičových systémů. Nicméně, tato studie se zaměřuje na přípravu zmíněných systémů ze vzorků reálných léčiv, které dříve byly nahrazeny fluorescenčními sondami. Díky dobrým fluorescenčním vlastnostem všech vzorků byla coby hlavní metoda vyhodnocující úspěšnost přípravy zvolena fluorescenční spektrometrie. Dalšími metodami byly termogravimetrická analýza a infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací. Všechny tyto metody potvrdily, že lyofilizace je účinnou metodou pro přípravu nosičových systémů reálných léčiv. Výborných výsledků bylo dosaženo ve smyslu rozpustnosti lyofilizovaných systémů. Na závěr byla pomocí head-space mikroextraakce na pevné vrstvě stanovena koncentrace residuálního ko-rozpouštědla. Tato metoda taktéž přinesla cenné informace a potvrdila, že *terc*-butylalkohol se v lyofilizovaných systémech nachází pouze ve stopovém množství.

KLÍČOVÁ SLOVA

hyaluronan, lyofilizace, nosičový systém, *terc*-butylalkohol, hydrofobní efekt

ABSTRACT

The aim of this thesis was to prepare native hyaluronan-based carrier systems using the lyophilisation as a suitable method to ensure an interaction between certain drugs and the polymeric structure which would lead to an increased solubility of hydrophobic drugs. For the preparation of such a system the *tert*-butyl alcohol was used as a co-solvent with the ability to support hydrophobic effect between the drug and a hydrophobic domain of hyaluronan. Since all polar domains of hyaluronan are located in the equatorial position, the axial position is occupied by hydrogens and therefore the molecule gains the amphiphilic character. Previous studies have confirmed that freeze-drying is a useful method for a carrier system preparation. However, this study focuses on the preparation of such systems with samples of real drugs, which were previously replaced by fluorescence sondes. Since all drug samples have good fluorescence characteristics, the fluorescence spectroscopy was used as the main method to determine the success of the preparation. Other methods included a thermogravimetric analysis and the infrared spectroscopy with Fourier transformation. All the mentioned methods have confirmed that lyophilisation is a useful method for the preparation of the carrier systems with real drugs. Great results have been achieved in the terms of the solubility of freeze-dried systems. In the last step, the co-solvent residues were determined by head-space solid phase microextraction. This method also provided some valuable information and confirmed that *tert*-butyl alcohol could be found in the lyophilised systems only on very low levels.

KEY WORDS

hyaluronan, lyophilisation, carrier system, *tert*-butyl alcohol, hydrophobic effect

ŘIHÁK, Marek. Programově řízená lyofilizace pro přípravu nosičových systémů na bázi hyaluronanu a konkrétních léčiv [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-04-25]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/149051>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Vojtěch Enev.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato diplomová práce byla vypracována samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsou správně a úplně citovány. Tato práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické Vysokého učení technického v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
Marek Řihák

Na tomto místě bych rád poděkoval panu doc. Ing. Vojtěchu Enevovi, PhD. za profesionální vedení, cenné rady, přátelský přístup a nekončící trpělivost. Paní Ing. Tereze Venerové, PhD. za pomoc, čas a rady během měření „časovky“. Panu Ing. Michalovi Grossovi za pomoc a ochotu při analýze vzorků. Paní laborantce Leoně Kubíkové za pomoc s termogravimetrickou analýzou, věčný optimismus a psychickou podporu.

V neposlední řadě si poděkování nepochybně zaslouží má rodina a přátelé, díky kterým můžu mít to nejlepší z obou světů.

OBSAH

1	ÚVOD.....	10
2	TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1	Historie výzkumu hyaluronanu	11
2.2	Chemická struktura	12
2.3	Biochemie hyaluronanu.....	13
2.3.1	Biosyntéza.....	13
2.3.2	Degradace hyaluronanu.....	14
2.4	Získ hyaluronanu.....	15
2.5	Hyaluronan v medicíně	18
2.5.1	Role hyaluronanu v oblasti studie karcinogenních onemocnění.....	18
2.5.2	Léčba osteoartrózy	20
2.5.3	Umělé oplodnění pomocí PICSI metody	20
2.5.4	Tkáňové inženýrství	20
2.5.5	Estetická medicína a kosmetika	21
2.6	Biopolymery.....	21
2.6.1	Hyaluronan jako polyelektrolyt	23
2.7	Slabé vazebné interakce	23
2.7.1	Vodíkové můstky	23
2.7.2	Van der Waalsovy síly:	25
2.7.3	Hydrofobní efekt.....	26
2.8	Léčiva a léčivé látky.....	27
2.9	Receptory	28
2.9.1	Rozdělení signálních molekul dle drah v organismu	28
2.9.2	Iontové kanálky.....	29
2.9.3	Receptory vázané na G-proteiny.....	29
2.9.4	Tyrosin-kinázové receptory	30
2.9.5	Jaderné receptory	30
2.10	Nosičové systémy.....	30
2.10.1	Liposomy	31
2.10.2	Pevné lipidové nanočástice.....	32
2.10.3	Micely.....	32

2.10.4	Nosiče na bázi polymerních sloučenin	32
2.10.5	Anorganické nanomateriály	33
2.11	Lyofilizace	33
2.11.1	Metoda a princip přípravy systémů	34
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	36
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
4.1	Obecný úvod experimentální části	39
4.2	Použité chemikálie	39
4.3	Použité přístroje:	42
4.4	Použité programy	42
4.5	Zjištění rozpustnosti vzorků léčiv v <i>terc</i> -butylalkoholu	42
4.5.1	Vyhodnocení rozpustnosti léčiv v <i>terc</i> -butylalkoholu	42
4.6	Postup přípravy vzorků pro UV/Vis analýzu	43
4.7	Příprava vzorků pro zhotovení kalibračních křivek	43
4.8	Příprava vzorků pro získání excitačně-emisních spekter	43
4.9	Příprava vzorků pro lyofilizaci	44
4.10	Příprava vzorků pro fluorescenční spektrometrii	45
4.10.1	Rozpuštění lyofilizovaných systémů	45
4.10.2	Rozpuštění vzorků léčiv ve vodě	45
4.11	Příprava vzorků pro mikroextrakci na pevné fázi	45
4.12	Postup měření	45
4.12.1	UV/Vis analýza a nastavení pro zhotovení kalibračních křivek	45
4.12.2	Excitačně-emisní spektra	46
4.12.3	Lyofilizace	46
4.12.4	Nastavení přístroje pro zjištění teplotní stability vzorků	47
4.12.5	Nastavení přístroje pro steady-state fluorescenční spektrometrii	47
4.12.6	Nastavení přístroje pro časově rozlišenou fluorescenční spektrometrii	48
4.12.7	Nastavení FTIR-ATR	49
4.13	Nastavení přístrojů pro stanovení residuálního <i>terc</i> -butylalkoholu	50
4.13.1	Mikroextrakce	50
4.13.2	Plynová chromatografie	51
4.13.3	Hmotnostní spektrometrie	51

5	VYHODNOCENÍ A DISKUZE.....	52
5.1	Informace o léčivech	52
5.2	Steady-state infračervená spektroskopie vzorků léčiv	53
5.3	UV/Vis spektra vzorků léčiv	54
5.4	Excitačně-emisní spektra.....	56
5.5	Lyofilizace.....	57
5.6	Teplotní stabilita jednotlivých vzorků.....	58
5.7	Steady-state fluorescenční spektrometrie.....	59
5.8	Časově rozlišená fluorescenční spektrometrie	61
5.9	Steady-state infračervená spektrometrie lyofilizátů	68
5.10	Stanovení residuálního <i>tert</i> -butylalkoholu	71
6	ZÁVĚR	75
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	77
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	87
9	PŘÍLOHY	88

1 ÚVOD

Definovat, v jakém období člověk poprvé začal léčit své nemoci, je takřka nemožné. Z archeologických nálezů víme, že již v pravěku se lidé pokoušeli napravovat zlomeniny a další úrazy, přestože ne vždy došli k úspěšným výsledkům. Ze starověkého Egypta (2600 př. n. l.) pochází na papyru dochovaný seznam nemocí a návrhu jejich léčby sepsaný Imothepem, který byl později Egyptany prohlašován za svatého [1]. Otcem medicíny je nazýván Hippokrates, Řek žijící v 5. století př. n. l., o kterém se říká, že položil základy západní medicíny. Své žáky učil přistupovat k nemocným lidem individuálně, protože každý potřebuje lék dle svého komplexního profilu. Zároveň vedl žáky k předepisování léků v závislosti na předchozí zkušenosti [2].

Od Hippokratových dob uběhla již spousta let. Došlo k rozvoji věd, medicíny, technologií a kvalita života se tak nesrovnatelně zlepšila. Nemoci však trápí lidskou populaci neustále, proto lékaři dennodenně svými znalostmi a umem zachraňují lidské životy a stejně tak i vědci v laboratořích zkoumají a vylepšují látky, které by mohly pomoci v boji s těmito nemocemi. Jednou ze společností, která na trh dodává nové medikamenty, je společnost Boehringer-Ingelheim, která dala podnět pro vznik této práce. Prvním krokem je vymyslet a syntetizovat sloučeninu, která by byla účinná v boji s nemocí nebo organismus před nemocí chránila. Ve druhém kroku je potřeba přijít na to, jak zajistit, aby tato látka byla dopravena do organismu a mohla působit právě tam, kde je jí potřeba. Těto otázky byl věnován dále uvedený výzkum. Konkrétně bylo cílem vytvořit systémy, ve kterých by hydrofobní léčivo bylo poutáno na hydrofilním nosiči, který by pomohl zabezpečit jeho rozpustnost ve vodném prostředí. Za teoreticky vhodnou metodu byla vybrána příprava takovýchto systémů pomocí lyofilizace s využitím *tert*-butylalkoholu coby ko-rozpouštědla, kde by léčivo bylo v nosiči (hyaluronanu) poutáno pomocí hydrofobního efektu.

Na toto téma bylo provedeno již více výzkumů, jejichž přehled je uveden v oddíle Současný stav řešené problematiky. Jedná se však s největší pravděpodobností o první práci, která pro tuto metodu využívá skutečná léčiva na rozdíl od předchozího využití fluorescenčních sond, které léčivo pouze simulovaly. Jde tak o další krok navazující na práci řady vědců, který by mohl přinést užitečné informace pro budoucí výzkumy a v ideálním případě vedl k praktickému využití této metody při léčbě pacientů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Historie výzkumu hyaluronanu

Téměř každá odborná práce zabývající se hyaluronanem, jeho vlastnostmi, použitím či interakcemi ve svém úvodu zmiňuje, že hyaluronan je nejjednodušší glykosaminoglykan skládající se z alternujících se jednotek soli kyseliny D-glukoronové a *N*-acetyl-D-glukosaminu. Dále bývá uvedeno, že se jedná o lineární, anionickou, nesulfatovanou, polymerní sloučeninu vyskytující se v téměř všech savčích tkáních. Je součástí mezibuněčné hmoty a díky svým viskoelastickým vlastnostem slouží jako lubrikační činidlo v místech styku tkání. Je předmětem zkoumání pro svou biokompatibilitu, hydrofilitu, pro vlastnosti spojené s rolí signální molekuly v přítomnosti zánětu či karcinomu a nezanedbatelný je také jeho přínos v chemii nosičových systémů a farmaceutické medicíně. Ani tato práce tak není výjimkou a shrnuje výše zmíněné vlastnosti sloučeniny, která zajímá vědce už více než 90 let.

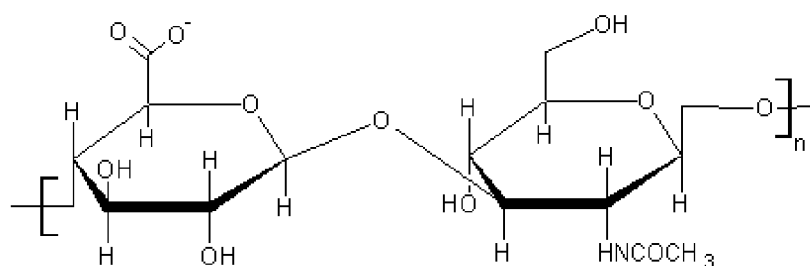
Historie zkoumání hyaluronanu sahá na konec 19. století. V roce 1880 byl ve francouzském časopise *Journal de l'anatomie et de la physiologie normales et pathologiques de l'homme et des animaux* publikován článek H. Beauregarda *Étude de corps vitré* (česky: Studie očního sklivce), v němž je zmíněn výzkum M. Portese, farmaceuta nemocnice de Lourcine. Portes se zabýval složením hovězího očního sklivce a došel k závěru, že 98,91 % tvoří voda, z 0,83 % jsou zastoupeny anorganické soli a 0,26 % tvoří organické látky, které dále rozdělil na albuminoidní látky a močovinu a další sloučeniny. Z albuminoidních látek analyzoval albumin, globulin a mucin, což je označení pro skupinu vysokomolekulárních glykoproteinů. Sloučenina nalezená ve sklivci však svými vlastnostmi neodpovídala mucinům dokonale, proto pro ni Portes navrhl nový název, a to hyalomucin (hyaloid = sklivec) [3].

Zásadním se stal rok 1934, ve kterém vyšel článek Karla Meyera a Johna Palmera popisující strukturu sacharidu nově nazvaného kyselina hyaluronová. Název vznikl spojením slov hyaloid a uronic acid (uronová kyselina), což jsou obecně kyseliny obsahující jak karboxylovou, tak aldehydickou skupinu [4]. Pozdější studie ukázaly, že je monomer hyaluronanu složen z D-glukoronové kyseliny a D-*N*-acetylglukosaminu. Meyer a Palme se v článku také zmiňují, že objevená vysokomolekulární sloučenina se v živých organismech vyskytuje pravděpodobně výhradně ve formě své soli, což bylo následně potvrzeno. Meyer věnoval velkou část svého života studiu této sloučeniny, a tak o 20 let později došel ke zjištění, že jsou sacharidové jednotky vázány alternující se β -1-3 a β -1-4 vazbou. Popsal tak primární strukturu látky, která je do dnešních dnů předmětem zájmu vědců po celém světě.

Sloučeninu se kromě očního sklivce podařilo také izolovat například z kohoutího hřebínku nebo pupeční šňůry. Otázkou však zůstávalo, zda se kyselina hyaluronová váže na proteiny a vyskytuje se tak výhradně v podobě glykoproteinu. Odpověď byla spojena se zjištěním mechanismu syntézy hyaluronanu, kdy se ukázalo, že jeho elongace probíhá na redukujícím konci bez potřeby proteinového primeru. Hyaluronan tak znovu potvrdil svou jedinečnost mezi ostatními jemu podobnými sloučeninami [5].

2.2 Chemická struktura

Jak již bylo dříve zmíněno, molekula hyaluronanu je sestavena z alternujících se jednotek soli D-glukoronové kyseliny a D-N-acetylglukosaminu, které jsou mezi sebou propojeny střídavě se opakující vazbou β -1-3 a β -1-4 (viz. Obr. 1) [6]. Struktura je energeticky vysoce stabilní, což je výsledkem beta konfigurace glukózových skeletů, díky níž se objemnější funkční skupiny nacházejí v energeticky výhodnější ekvatoriální pozici, zatímco axiální přísluší atomům vodíku. Oddělením jednotlivých skupin do dvou rovin tak sloučenina získává dva charaktery – v rovině axiální nabývá nepolárních, hydrofobních vlastností, zatímco v rovině ekvatoriální výrazně převládá hydrofilní chování. Vzhledem k množství a velikosti polárních skupin však vykazuje sloučenina jako taková v interakci s rozpouštědlem vysoce hydrofilní charakter [7].



Obr. 1: Vzorec aniontu kyseliny hyaluronové

Z pohledu polymeru bylo v průběhu 20. století předpokládáno, že hyaluronan vytváří dlouhé lineární řetězce, které jsou v přítomnosti polárního rozpouštědla v konformaci expandovaného náhodně stočeného klubka. John E. Scott, který se po celý život věnoval studiu proteoglykanů a hyaluronanu však v roce 2001 publikoval článek [8], ve kterém popírá náhodnost konformace řetězců hyaluronanu. Místo toho uvádí, že se ve vodném roztoku polymerní řetězec vyskytuje ve formě dvakrát stočené šroubovice, která agreguje do rozsáhlejší terciální struktury.

Obecně konformace hyaluronanu nachází svůj význam například v případě transportních jevů. Právě přítomnost hydrofilních a hydrofobních domén zapříčiňuje, že malé molekuly, jako je voda nebo elektrolyty mohou doménou díky své velikosti difundovat, zatímco velké molekuly, např. proteiny, jsou celou strukturou částečně zadržovány [9].

Výrazný je také vliv záporného náboje karboxylové skupiny. Díky elektrostatickým interakcím dochází ve vodě jako polárním rozpouštědle ke snaze zaujmout takovou konformaci, kdy budou jednotlivé náboje od sebe co nejvzdálenější. Tím dochází k expanzi klubka a jeho výraznému bobtnání. Právě výrazná solvatace řetězců hyaluronanu je pro tuto sloučeninu charakteristická. Polymerní řetězec je tak díky nekovalentním interakcím, které ovlivňují sekundární a vyšší konformace, schopen jímat až tisícinásobek rozpouštědla vztáženého ke hmotnosti daného biopolymeru [10].

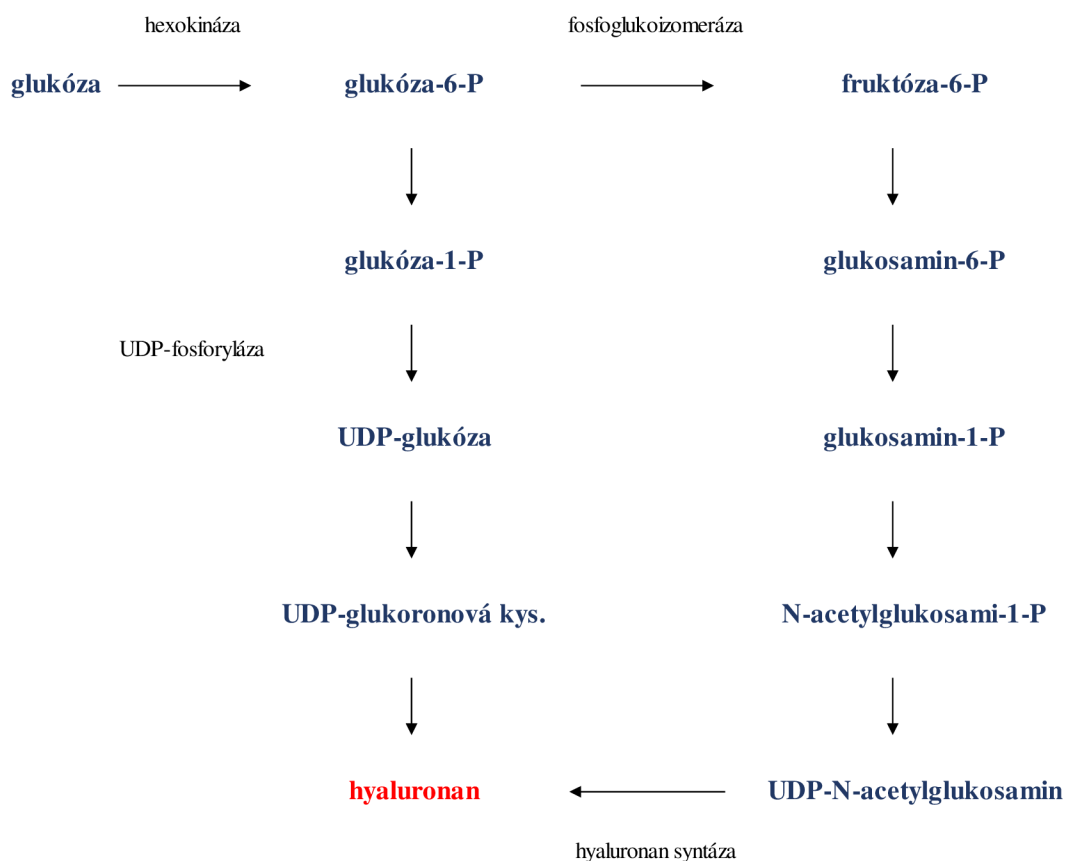
Vzhledem k pravidelně se opakujícím karboxylovým skupinám a schopnosti tvořit vodíkové můstky mezi jednotkami polymeru má hyaluronan jedinečné reologické vlastnosti a řadí se mezi pseudo-plastické látky [10]. Pseudoplastické látky jsou látky spadající mezi

neneutronovské kapaliny, u nichž zdánlivá viskozita klesá se zvyšujícím se rychlostním gradientem. Toto chování nejčastěji pozorujeme u koncentrovaných systémů, kdy zvýšením tečného napětí dojde k rozbití struktur stabilizovaných nekovalentními interakcemi. V případě roztoku hyaluronanu tento děj pozorujeme i při nízkých koncentracích okolo 1 hm. % [11].

2.3 Biochemie hyaluronanu

2.3.1 Biosyntéza

Hyaluronan je syntetizován jak u živočichů, tak u prokaryotických organismů, jejichž metabolická dráha byla podrobně studována. V prvním kroku dochází k fosforylaci glukózy za přítomnosti ATP a enzymu hexokinázy za zisku jednoho ze základních metabolitů velké části metabolických drah, glukózy-6-fosfátu. Tato sloučenina je následně upravována dvěma cestami; v první je glukóza-6-fosfát pomocí enzymu fosfoglukomutázy přeměněna na glukózu-1-fosfát, která je následně v přítomnosti UDP-glukóza pyrofosforylázy a UTP syntetizována na UDP-glukózu. V dalším kroku je UDP-glukóza oxidována pomocí dehydrogenázy za vzniku UDP-glukoronové kyseliny.



Obr. 2: Schéma syntézy hyaluronanu [20].

Druhá cesta přeměny glukózy vede stejně jako při glykolýze ke změně konformace sloučeniny působením fosfoglukoizomerázy na fruktózu-6-fosfát. Následně dochází k připojení aminoskupiny pomocí amidotransferázy za vzniku glukosamin-6-fosfátu, který je mutázou přeměněn na glukosamin-1-fosfát. Získaná sloučenina je v následných krocích acetylována a fosforylována za vzniku UDP-N-acetylglukosaminu.

V dalším kroku přistupuje na řadu hyaluronan syntáza, která propojuje získané substituované glykosidové jednotky [12]. Schematicky popisuje syntézu hyaluronanu Obr. 2.

2.3.2 Degradace hyaluronanu

Vzhledem k tomu, že se hyaluronan v organismech nachází v podobě rozsáhlých náhodně stočených klubek, před jeho degradací je potřeba, aby došlo k fragmentaci takového klubka. K získání kratších úseků se využívá několika metod – acidobazické (polymer je hydrolyzován kyselinou nebo zásadou), fyzikální (polymer je vystaven fyzikálnímu namáhání), enzymatické a využití volných radikálů. Přítomnost volných radikálů je důvodem odbourávání hyaluronanu při artritidě nebo ve staří. Výplň míst styku měkkých tkání je tak ochuzována o lubrikační činidlo, což vede k přímému kontaktu tkání a následným bolestem.

Biodegradace hyaluronanu je zajišťována intracelulárními hyaluronidázami, které hydrolyzují polymerní řetězec. Aby však lysozomální systém buněk fragmenty hyaluronanu přijal, je nutná jeho částečná degradace z původně rozsáhlé polymerní sítě. Následně je vstup do buňky zajištěn pomocí receptorů nebo endocytózou. Hyaluronidázy se následně nacházejí buď v lysozomech nebo ukotvené k plazmatické membráně. V genomu savců se nachází celkem pět genů a jeden pseudogen kódujících enzymy potřebné k degradaci hyaluronanu. Nejdůležitějšími hyaluronidázami jsou Hyal-1 a Hyal-2, které se na katabolismu podílejí v nejhojnější míře.

Hyal-1 byl prvním zkoumaným enzymem katabolické dráhy hyaluronanu. V organismu se vyskytuje ve dvou isoformách a je schopen štěpit jakkoliv dlouhé řetězce hyaluronanu na tetrasachridy. Hyal-2 je oproti tomu schopen štěpit vysokomolekulární hyaluronan pouze na řetězec odpovídající molekulové hmotnosti přibližně 20 kDa. Hyal-2 je zároveň společně s receptorem CD44 zodpovědný za transmembrální vstup hyaluronanu do buňky za účelem jeho následné lysozomální degradace. V lysozomech jsou kromě enzymu Hyal-1 aktivní také enzymy β -N-acetylglukosaminidáza a β -glukoronidáza, které řetězec rozštěpí na fragmenty o molekulové hmotnosti přibližně 200 Da, což odpovídá monosacharidům, které z lysozomů vstupují do cytoplasmy, kde jsou následně transformovány na finální produkty – glukosamin-6-fosfát a kyselinu glukoronovou [13].

2.4 Zisk hyaluronanu

Hyaluronan se běžně získává dvěma způsoby – jedním z nich je extrakce z živočišných tkání; v minulosti se nejčastěji přistupovalo k extrakci z kohoutích hřebínků. Vzhledem k tomu, že se hyaluronan nachází u obratlovců téměř ve všech typech tkání, je jeho extrakce možná také například z pupeční šňůry nebo ze sklivce, stejně jako to v prapůvodu výzkumu této sloučeniny udělali Meyer a Palmer.

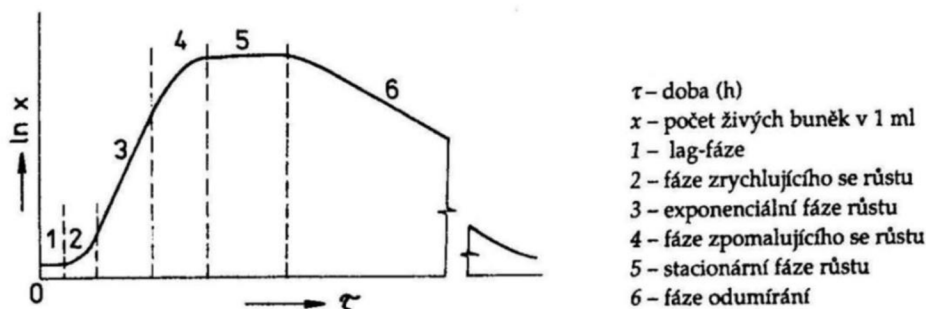
Vzhledem k tomu, že surový savčí hyaluronan i po purifikaci může obsahovat reziduální proteiny, přistupuje se k hojněji využívanému postupu zisku hyaluronanu bakteriální produkcí. Zástupci rodu *Streptococcus* jsou schopni vytvářet extracelulární kapsule obsahující značné množství požadované látky. Za syntézu je zodpovědný HAS protein (hyaluronan syntetáza), který byl již v roce 1993 identifikován a naklonován [14]. V buněčné membráně se nacházejí celkem tři HAS proteiny, které ke své funkci potřebují přítomnost hořečnatých nebo manganatých iontů společně s dříve zmíněnými sacharidovými prekurzory [15].

Ve velkovýrobě hyaluronanu se také používají geneticky modifikované organismy rodu *Lactococcus* a *Bacillus*. Jako substrát během fermentace jim slouží L-glukóza v přítomnosti sodných, draselných a hořečnatých solí. Ke genetické modifikaci organismů se přistupuje za účelem odstranění nebezpečných toxinů. Z etického hlediska však laboratoře stále zvažují vhodnost využití těchto typů organismů [16].

Hyaluronan se u mikroorganismů nachází ve velké míře v granulích, které organismům slouží jako zásobárna sacharidů. Vzhledem k tomu, že prekurzory pro syntézu hyaluronanu jsou stejné jako sloučeniny využívané pro nárůst biomasy, jedná se o souboj mezi těmito dvěma procesy [17]. Ve výrobě je tak nutno snížit produkci biomasy ve prospěch syntézy hyaluronanu, jinými slovy snížit specifickou růstovou rychlost, což je rychlost nárůstu biomasy buněčné populace na její koncentrační jednotku. Matematicky popisuje specifickou růstovou rychlost rovnice (1). Ovlivnit ji je možno vystavením mikroorganismu stresovým podmínkám. Při produkci hyaluronanu se volí změna pH, která vede ve prospěch syntézy požadované sloučeniny. Dalšími možnostmi je také změna teploty v reaktoru nebo přidání molekul (např. pyruvátu) inhibujících glykolýzu [16].

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_S + S} \quad (1)$$

Graficky rychlost růstu mikrobiálních kultur popisuje růstová křivka (viz Obr. 3), která se skládá ze šesti fází. V lag-fázi dochází ke konzumaci živin mikroorganismy. Následně dochází ke zrychlení růstu a množství biomasy se exponenciálně zvyšuje až postupně dojde do bodu, kdy jsou živiny organismy spotřebovány – hovoříme o stacionární fázi růstu, při které jsou uvolňovány sekundární metabolity. Ta je následována fází odumírání organismů.



Obr. 3: Růstová křivka coby závislost logaritmu počtu živých buněk v 1 ml kultivačního roztoku na čase [18].

Další metodou, která však zatím čeká na své větší rozšíření, je enzymatická produkce hyaluronanu in vitro. Coby nejvhodnější enzym vyhovující požadavkům tohoto procesu se jeví hyaluronan syntáza bakterií *Pasteurella multocida*, která je schopna uvolnit, navázat a prodloužit rostoucí řetězec hyaluronanu na neredukujícím konci, přičemž prekursor této reakce jsou N-acetylglukosamin a kyselina glukoronová aktivované navázaným UDP [19]. Hyaluronan syntáza je rekombinantního původu – k jejímu zisku se používá zanesení genu pro jeho expresi do genomu *E. Coli*. Hlavní výhodou takto připraveného enzymu je příprava polymerních molekul hyaluronanu o definované molekulové hmotnosti [20]. Přehled výhod a nevýhod všech tří zmíněných metod produkce hyaluronanu obsahuje Tab. 1.

Tab. 1: Přehled výhod a nevýhod jednotlivých metod produkce hyaluronanu. Tabulka byla převzata z práce Boeriu a kol. *Production methods of hyaluronan* [20].

	Výhody	Nevýhody
Extrakce z živočišných tkání	Dobře zavedená technologie	Různá kvalita produktu
	Dostupný materiál s nízkými náklady	Nebezpečí degradace polymeru
	Produkce vysokomolekulárního hyaluronanu (až 20 MDa)	Nebezpečí kontaminace s proteiny, nukleovými kyselinami a viry
	Přírodní produkt	Nutná purifikace Nízký výtěžek
Bakteriální produkce	Pokročilá technologie Vysoký výtěžek	Využití geneticky modifikovaných organismů
	Produkt o vysoké molekulové hmotnosti (1–4 MDa)	Nebezpečí kontaminace s bakteriálními endotoxiny, proteiny, neukleovými kyselinami a těžkými kovy
Enzymatická syntéza	Univerzální technologie	
	Možnost kontroly molekulární hmotnosti produktu	Technologie ve fázi vývoje
	Bez nebezpečí kontaminace	Neprokázaná technologická a ekonomická proveditelnost
	Konstantní kvalita produktu	

Získ čistého hyaluronanu jako takového, tedy jeho purifikace, je v prvním kroku proveden extrakcí z mikrobiální granule pomocí povrchově aktivní látky typu dodecylsulfátu sodného. V úvahu však přicházejí i další metody izolace jako je centrifugace, filtrace nebo precipitace [21].

2.5 Hyaluronan v medicíně

Vlastnosti hyaluronanu obecně závisejí na délce jeho řetězce. Vysokomolekulární hyaluronan (200–4000 kDa) nese významné množství negativního náboje a díky své velikosti zaujímá prostor především v kloubním pouzdře, kde slouží jako mazivo a tlumič nárazů. Dále je také hlavním materiálem výplně mezibuněčných prostor a definuje jejich specifické vlastnosti. Jeho koncentrace se také zvyšuje v silně stresových situacích jako je šok, ztráta krve nebo popáleniny, kdy pravděpodobně slouží jako zvyšovatel intravaskulárního objemu. Díky své vlastnosti vyplňovat prostor je také vysokomolekulární hyaluronan schopen odvádět menší molekuly a vykazuje anti-angiogenní, protizánětlivé a imunosupresivní vlastnosti [22].

Délka řetězce hraje významnou roli také při hojení ran. V první fázi dochází k syntéze vysokomolekulárního hyaluronanu, který otevírá prostor rány přístupu speciálních bílých krvinek coby první linie bojovníků odstraňující odumřelou tkáň a případné bakterie. Během druhé fáze dochází v ráně k akumulaci kratších hyaluronových řetězců, které indukují expresi zánětlivých cytokinů. Ve třetí fázi hrají významnou roli nízkomolekulární řetězce hyaluronanu coby signální molekuly indukující mnoho metabolických cest vedoucích k buněčné proliferaci, tvorbě kolagenu a hojení rány [23].

2.5.1 Role hyaluronanu v oblasti studie karcinogenních onemocnění

Jak již bylo zmíněno dříve, v savčím genomu se nachází pět genů kódujících enzymy potřebné k biodegradaci hyaluronanu. U dvou z těchto genů, respektive enzymů, byla pak prokázána přímá souvislost s nádorovým bujením.

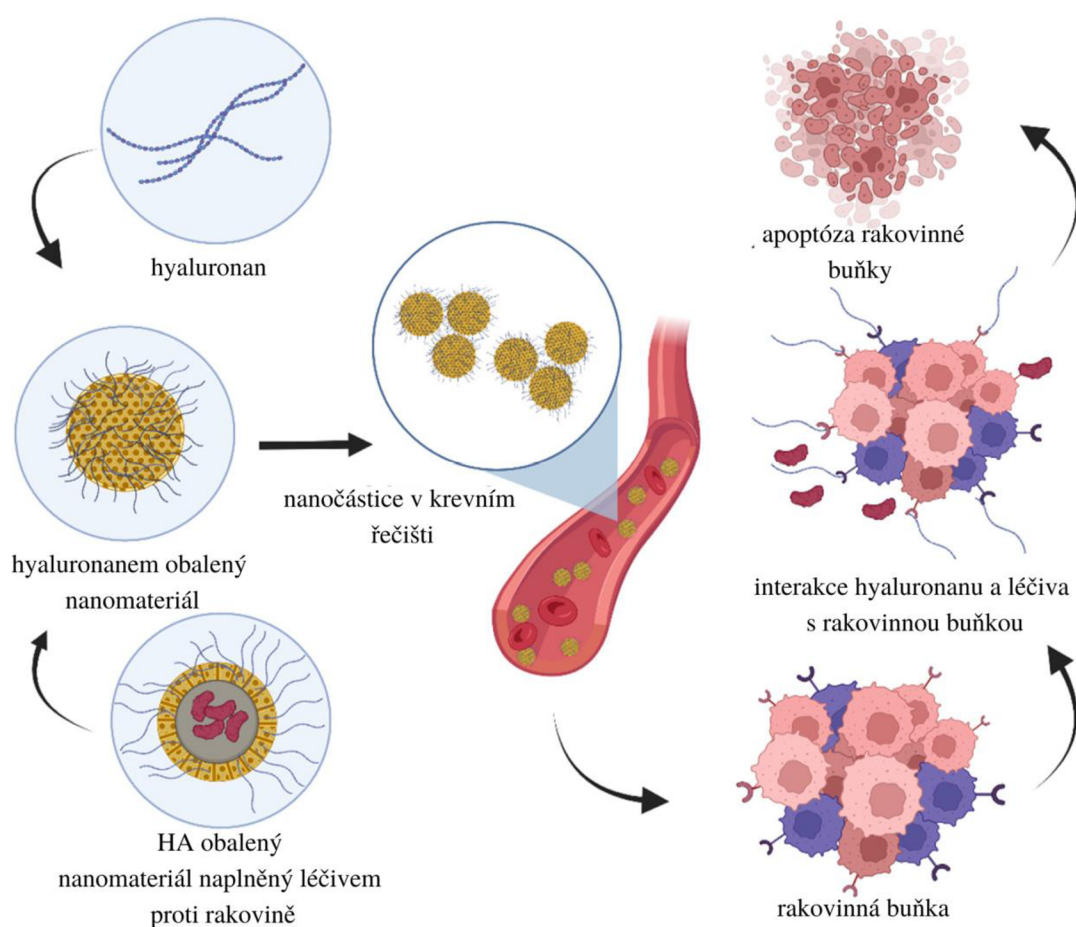
Zvýšená hladina enzymu Hyal1 v močovém měchýři a jeho následné vylučování močí bývá často markerem karcinomu močového měchýře. Stejně tak dochází ke zvýšené expresi genu v případě výskytu nádorových buněk v prostatě [24]. Studie ukázaly, že se inhibicí exprese HYAL1 snižuje rychlost buněčné proliferace a potvrdilo se tak, že nádorové buňky ke svému růstu potřebují gen HYAL1. Tento gen však zároveň může vystupovat jako tumorový supresorový gen čili plnit funkci antionkogenu. Zda bude HYAL1 vystupovat jako supresor nebo promotor tvorby rakovinných buňka tak dle studie Lokeshwara a kol. (2005) závislí na typu tumoru a dále na koncentraci hyaluronidázy [25].

V případě genu HYAL2 jsou jeho vlastnosti velmi podobné. Při přílišné expresi může vystupovat jako onkogen, avšak jeho vlastnosti mohou být také v pozici supresoru.

Role hyaluronanu jako takového v kontextu výzkumu nádorů se také různí. V závislosti na molekulové hmotnosti může hyaluronan po navázání na receptor CD44 vystupovat jako signální molekula thyrosin kinázové kaskády a vést tak k buněčné proliferaci a onkogenezi. Zároveň může přispívat k získání rezistence rakovinných buněk na chemoterapeutika nebo být markerem rakoviny prsu.

Na druhou stranu, vysokomolekulární hyaluronan má antionkogenní účinky. Jeho štěpením enzymy Hyal 1 a 2 však dochází ke vzniku fragmentů o nižší molekulové hmotnosti, které mohou z pozice signálních molekul vést k onkogenezi [26]. Stejně tak jako se tedy lišily účinky hyaluronanu v organismu v závislosti na molekulové hmotnosti, jsou i v oblasti studie malignity jeho vlastnosti různorodé [27].

Vzhledem ke specifické interakci s CD44 receptory se však hyaluronan také používá pro cílený transport antionkogenu k nádorovým buňkám. Základem této praxe je pokrytí nanočástice, této praxe je pokrytí nanočástice, která ve svém jádru nese léčivo, hyaluronanem. Zvýšená exprese receptorů CD44 je pro některé typy rakoviny typická, proto využití takovýchto nanočástic je ideální metodou, jak dopravit léčivo do místa potřeby, aniž by intoxikovalo zdravou tkáň [28]. Schematicky je proces znázorněn na Obr. 4.



Obr. 4: Schéma cílení hyaluronanem obalené nanočástice na rakovinnou buňku [28].

2.5.2 Léčba osteoartrózy

Díky svým charakteristickým viskoelastickým vlastnostem slouží hyaluronan jako lubrikační činidlo v kloubech. Kromě tlumení nárazu zde také hraje důležitou roli při přivádění živin do tkání a jako protizánětlivé činidlo navázáním na receptory CD44, čímž inhibuje produkci enzymů štěpících chrupavku [29].

Osteoartróza je onemocnění kloubů, které se objevuje především u pacientů ve vyšším věku a projevuje se degenerací chrupavky. Ve vědeckých pracích převládají dvě vzájemně se propojující teorie vzniku tohoto onemocnění. První z nich říká, že osteoartróza se projevuje v návaznosti na lokální zánět v prostředí kloubu. Vzhledem k tomu, že jednou napadená chrupavka nemá schopnost samoregenerace je její funkce nevratně poškozena, což vede ke klasickým projevům osteoartrózy jako jsou bolesti a otoky kloubů [30]. Druhá teorie přikládá větší význam dlouhodobé zátěži kloubů vedoucí k postupnému odbourávání chrupavky a rozvoji osteoartrózy tímto způsobem. Kromě starších lidí tak nemoc postihuje také pacienty trpící obezitou, která vystavuje klouby větší zátěži, než na jakou jsou stavěny [31].

Osteoartróza obvykle vede k totální náhradě kloubu. Lékaři se však takovému zákroku snaží předejít pomocí vpichů hyaluronanu, za účelem ztlumit projevy tohoto onemocnění. Vpichem hyaluronanu do kloubní jamky je podpořena jak buněčná proliferace, tak syntéza vlastního hyaluronanu. Dále jsou inhibovány prozánětlivé procesy a redukovány nervové impulzy způsobující obvyklé bolesti [32].

2.5.3 Umělé oplodnění pomocí PICSÍ metody

Hyaluronan nachází své využití také v oblasti asistované reprodukce. Vzhledem k tomu, že v lidském těle obaluje velké procento hyaluronanu oocyt, rozhodli se vědci tohoto faktu využít pro výběr vhodné spermie pro umělé oplodnění vajíčka. Zatímco běžná technika ISCI (intracytoplasmic sperm injection) je založena na výběru vhodných spermií pomocí mikroskopické analýzy, PICSÍ metody (physiological intracytoplasmic sperm injection) využívá k selekci hyaluronový gel. Takto vybrané spermie vykazují nižší procento výskytu poškozené DNA a aneuploidie (chyba v počtu chromozomů [33]). Přestože zatím nebyla potvrzena zvýšená porodnost využitím této metody, podařilo se dojít k výsledku, že se jedná o metodu, která snižuje riziko potratu bezprostředně po umělém oplodnění [34],[35].

2.5.4 Tkáňové inženýrství

Hydrogely na bázi hyaluronanu jsou podstatnou součástí léčby kožních poranění a nemocí. Do takovýchto hydrogelů se často přidávají další látky podporující epitalizaci a regeneraci tkáně, což vede ke zrychlenému a bezjizevnatému hojení. Vzhledem k tomu, že se jedná o tělu vlastní látku, má výborné vlastnosti z pohledu buněčné adheze, migrace a proliferace. Zároveň se jedná o prostředí, které vykazuje antimikrobiální aktivitu, což je v případě hojení ran klíčová vlastnost [36].

Bezjizevnatého hojení je dosaženo regulací produkce hyaluronanu v místě rány. Přítomnost krátkých úseků hyaluronových řetězců snižuje množství kolagenu, které se soustředí v místě rány, a zabraňuje tak formaci nevzhledně vypadajících jizev. Za fyziologii fibroblastu je zodpovědná interakce hyaluronanu s receptorem CD44, která může být regulována pomocí aktivátorů a inhibitorů, čímž může být docíleno požadované regulace množství kolagenu v ráně [37].

2.5.5 Estetická medicína a kosmetika

Na hyaluronanu je postavena řada marketingových kampaní kosmetických firem, které využívají poměrně komplikovaného názvu k upoutání pozornosti potenciálních zákazníků. V obchodech tak najdeme celou řadu výrobků s touto sloučeninou, ať už se jedná o krémy, čisticí vody, pleťové masky nebo např. balzámy na rty. Cílem takovýchto přípravků je především hydratace pokožky. Dále se také hyaluronan používá pro boj s vráskami a k přírodnímu zisku objemnějších rtů. Zda přípravky opravdu fungují, jak uvádí výrobce, je sporné, avšak hydratace pokožky je vysoce pravděpodobná. V závislosti na molekulové hmotnosti hyaluronanu dochází buď k hydrataci vrchní části (vysokomolekulární hyaluronan sice poutá velké množství vody, ale není schopen procházet do hlubších vrstev pokožky) nebo dlouhodobější hydrataci spodnějších částí (nizkomolekulární hyaluronan je schopen putovat hlouběji, ale není schopen na sebe vázat tak velké procento vody) [38].

Své využití v estetické medicíně našla praktika injektace hyaluronanu, která ve velké míře supluje dříve hojně využívané vpichování botulotoxinu. Vzhledem k tomu, že se jedná o přírodní netoxickou, tělu vlastní látku, organismus ji přijímá a snadno ji také odbourává. Právě z tohoto důvodu se nejedná o permanentní výplň vrásek či jiných kožních ohybů a procedura tak musí být po čase opakována. Ze zdravotního hlediska lehké riziko představují síťovací činidla, která se používají pro přípravu hyaluronových výplňových hydrogelů. Lékaři se tak snaží přistupovat k využití těchto činidel v co nejnižší míře [37].

2.6 Biopolymery

Polymer je makromolekula složená z většího množství jednotek zvaných monomery, které jsou vzájemně chemicky propojeny [39]. V případě biopolymerů se jedná o makromolekuly, které jsou biologického původu nebo alespoň svými vlastnostmi napodobují makromolekuly tohoto původu. Hlavními zmíněnými vlastnostmi jsou biokompatibilita, biodegradabilita (ne však výhradně) a netoxičita [40]. Jak se bude daný biopolymer chovat je dáno jeho strukturou – nejnázornějším příkladem pro vysvětlení jednotlivých stupňů struktury jsou proteiny.

a) Primární struktura

Základním stavebním kamenem proteinů jsou aminokyseliny. Pořadí aminokyselin, které je zakódované v genetické informaci organismu udává primární struktura. Mezi jednotlivými aminokyselinami je pevná vazba nazvaná peptidová a vzniká kondenzací karboxylové skupiny první kyseliny s aminoskupinou druhé aminokyseliny za uvolnění vody.

b) Sekundární struktura

Sekundární struktura udává konformaci řetězce v prostoru. Popisuje tak vnitřní prostorovou strukturu jednotlivých částí molekuly. Nacházíme zde dva stavy, α -helix a β skládaný list, kdy tyto struktury jsou stabilizované nekovalentními vazbami – konkrétně vodíkovými můstky mezi vodíkem zbytku amidové skupiny jedné kyseliny a kyslíkem zbytku karboxylové skupiny druhé kyseliny. Vzhledem k tomu, že se do stabilizace těchto struktur zapojují výhradně vodíky a kyslíky z peptidické vazby, hovoříme o interamidových vodíkových vazbách.

c) Terciární struktura

Terciární struktura je dána interakcí postranních skupin a dochází tak ke stabilizaci pomocí nekovalentních interakcí – hydrofobních, elektrostatických interakcí a významně také disulfidických můstků. Protein tak dostává svou charakteristickou trojrozměrnou strukturu a díky zmíněným interakcím se tímto způsobem uspořádávají jednotlivé úseky makromolekuly v prostoru [41].

d) Kvarterní struktura

Nejvyšší strukturní kategorie, která dává proteinu jeho charakteristické vlastnosti je stabilizována vodíkovými můstky a van der Waalsovými interakcemi mezi jednotlivými proteinovými řetězci nebo podjednotkami a uspořádává je tak do komplexní struktury [42].

V případě sacharidů je situace obdobná, avšak jak již bylo uvedeno v kapitole 0, sekundární a vyšší struktura nebývá natolik organizovaná jako v případě proteinů a nukleových kyselin. V případě hyaluronanu je monomer tvořen molekulou kyseliny D-glukoronové a D-N-acetylglukosaminu, které jsou vzájemně propojeny střídající se β -1-3 a β -1-4 glykosidovou vazbou. V rámci sekundární struktury to však není až tak jednoznačné. Výrazně se liší vlastnosti hyaluronanu ve vodném roztoku a bezvodém stavu. Zároveň na rozdíl od ostatních glykosaminoglykanů, které procházejí post-polymerizačními úpravami, hyaluronan je ihned po své syntéze extrudován z buňky a není tak obohacen o funkční skupiny, které stabilizují uspořádanost sekundární struktury. Díky NMR analýze a počítačové simulaci byla potvrzena teorie, že hyaluronan tvoří vodíkové můstky jak mezi funkčními skupinami navázanými na šestiuhlíkatý skelet sacharidu, tak s molekulami vody v roztoku [43].

Právě vodné prostředí je pro konformaci hyaluronanu klíčové. Jelikož přítomnost polárních skupin dodává makromolekule výrazný hydrofilní charakter, je hyaluronan ve své struktuře schopen sorbovat velké množství vody. Voda v náhodně stočeném klubku je přítomna ve třech subpopulacích: volná, pevně vázaná a semikrystalická. První zmíněná dává roztoku polymerního řetězce především jeho objem, avšak při vysychání jsou to molekuly, které systém opouští jako první. Druhé dvě subpopulace jsou interakcemi udržovány pevněji a definují tak konformaci polymeru jako i přispívají k její stabilizaci [44].

Vzhledem k tomu, že je hyaluronan nepostradatelnou součástí extracelulární matrix, kterou prochází řada hydrofilních molekul, jsou polární skupiny orientovány tak, aby vznikly útvary podobné mikrokánálkům zabezpečující průchod částic k buňkám.

Jak již bylo uvedeno výše, hyaluronan však ve své struktuře obsahuje také hydrofobní domény, které jsou sice kryty převládajícími polárními skupinami, ale jejich význam není zanedbatelný. Přestože není úplně detailně prostudována biologická funkce těchto domén, lze předpokládat, že se podílejí na interakci hyaluronanu s proteiny a buněčnou membránou, jako se i významně podílejí na samouspořádání celé makromolekuly [43].

2.6.1 Hyaluronan jako polyelektrolyt

Z pohledu fyzikální chemie je hyaluronan charakterizován jako polyelektrolyt a od toho se také odvíjejí jeho charakteristické vlastnosti v roztoku. Vzhledem k přítomnosti náboje, který je přítomen disociací karboxylové skupiny, se na konformaci polymeru ve vodě podílejí kromě sil krátkého a dlouhého dosahu také síly elektrostatické. V závislosti na koncentraci malých iontů – v případě hyaluronanu kationty Na^+ - se dostávají do poměru síly přitažlivé mezi opačnými náboji se silami repulzními mezi shodnými náboji [45]. Rozložení nábojů a s ním související vlastnosti polymeru v roztoku jsou předmětem jak teoretických – statistických – výpočtů tak konkrétních měření. Při těchto analýzách bývá bráno v potaz, zda se polymer nachází v čistém rozpouštědle nebo je toto rozpouštědlo obohaceno o nízkomolekulární ionty a dále jaká je koncentrace celé systému.

Nachází-li se polymerní řetězec v čistém rozpouštědle bez přítomnosti soli v nízké koncentraci, silně se projevují odpudivé interakce mezi disociovanými karboxylovými skupinami. Tento jev nastává z důvodu uvolnění disociovaných protiontů do objemného disperzního prostředí, čímž je odstraněn efekt stínění ve smyslu Debye-Hückelovy teorie a řetězec tak expanduje [45].

Je-li koncentrace vyšší, protionty začínají hrát svou roli z hlediska odstiňování repulzních interakcí shodných nábojů a polymerní řetězec tak je schopen zaujmout konformaci klubka. Ke stejnému efektu dochází také přidáním soli i do velmi zředěného systému [45].

2.7 Slabé vazebné interakce

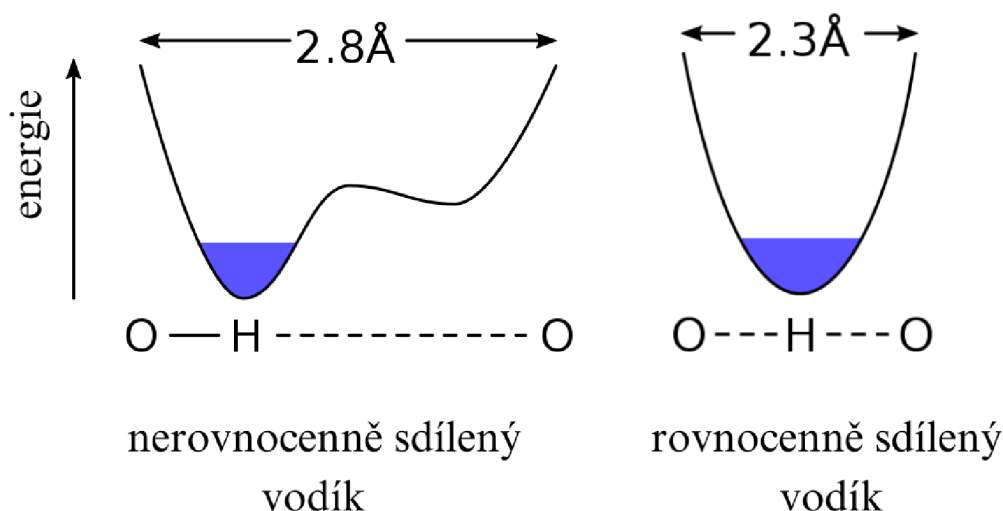
Jako o vyšších strukturách proteinů, tak i o vlastnostech polymeru v roztoku rozhodují mimo kovalentních vazeb formujících základ celého systému také nekovalentní interakce. Přestože bývají nazývány slabými, jejich význam je nezanedbatelný. Řadí se sem vazby vodíkovými můstky, van der Waalsovy interakce a hydrofobní efekt.

2.7.1 Vodíkové můstky

„Vazba vodíkovými můstky je přitažlivá interakce mezi atomem vodíku vázaného v rámci molekuly nebo vodíkem molekulárního fragmentu X-H, kde X je elektronegativnější než H, a atomem nebo skupinou atomů téže nebo jiné molekuly, ve které je prokazatelný projev vytvoření vazby [46].“

Vodíkové můstky jsou nepostradatelnou interakcí, na které stojí fungování živých organismů – např. enzymatické reakce, komplementarita vláken nukleových kyselin, sbalování proteinů a další. Bez tohoto typu interakce by voda sama o sobě neměla charakteristické vlastnosti, kterými vybočuje z řady ostatních kapalin – vzhledem k přítomnosti vodíkových můstků má ve srovnání s jí podobnými molekulami (CH_4 , NH_3 , H_2S) vysokou teplotu varu a teplotu tání a řadu dalších zvláštností, kterým jsou věnovány rozsáhlé studie [47].

Pevnost vodíkové vazby závisí na míře sdílení vodíku silně elektronegativními atomy. Délka normální vodíkové vazby O–H---O odpovídá přibližně 2,8 Å. V tomto případě je vodík silněji poután k jednomu ze dvou kyslíků a elektronová hustota je tak vyšší u tohoto kyslíku kovalentně vázaného s vodíkem. Druhý kyslík vstupující do interakce si přitahuje parciálně kladný vodík díky disproporcionálnímu rozložení elektronů v rámci molekuly, které jsou vyšší míře lokalizovány na tomto kyslíku, čímž dochází k vzniku parciálního záporného náboje. V některých případech je však sdílení vodíku oběma elektronegativními atomy natolik vyrovnané, že není možno jednoznačně určit, ke kterému atomu vodík náleží a vazba se zkracuje na 2,3 Å. Změna energetických hladin je vidět na Obr. 5 [48].

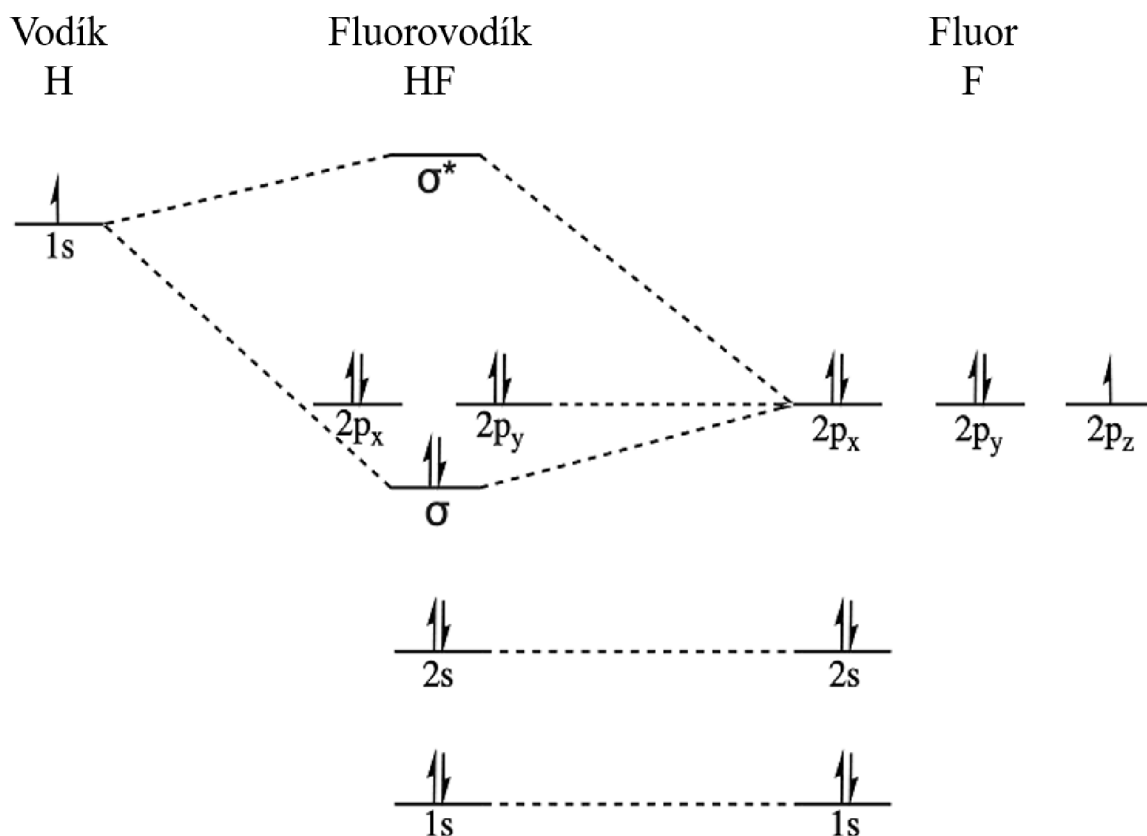


Obr. 5: Energie vodíkových vazeb v závislosti na míře sdílení atomu vodíku atomy kyslíku [49].

Z pohledu teorie molekulových orbitalů je situace poměrně komplikovaná, protože nedochází ke sdílení elektronů ve smyslu vzniku kovalentní vazby. Elektrony jsou odčerpávány z vodíků na elektronegativnější kyslík, čímž na něm vzniká parciální záporný náboj, který při správném natočení dvou molekul vstupujících do interakce přitahuje elektronově chudší vodík druhé molekuly. (Nemusí se však jednat o molekulu rozdílnou – častým jevem jsou také intramolekulární vodíkové vazby. Příkladem mohou být proteiny, kde se vyskytují vodíkové můstky mezi atomy jedné polymerní molekuly [50].) Studium inkorporace jednotlivých atomových orbitalů a sestavení diagramu překryvu molekulárních orbitalů v rámci dimeru vody se věnoval tým Bo Wanga. Ve svém článku konstatovali, že ke stabilní tvorbě vodíkových můstků mezi dvěma molekulami vody dochází překryvem dvou molekulárních orbitalů, které jsou zabezpečeny především 2p orbitalem kyslíku a 1s orbitalem vodíku donorové molekuly [53].

Kvantově-mechanický pohled na problematiku vodíkových vazeb je pravděpodobně nejjednodušší vysvětlit na molekule HF. Podíváme-li se na grafické znázornění zaplnění molekulových orbitalů, povšimneme si, že elektrony jsou oběma atomy sdíleny v rámci kovalentní σ vazby. Vodík ve své valenční sféře obsahuje pouze 1 elektron v orbitalu 1s, fluor oproti tomu má plně obsazený orbital 2s, a do vazby tak vstupuje orbitalem 2p, ve kterém se již

nacházejí dva elektronové páry. Projev elektrostatických interakcí ústí v projev vodíkové vazby. Molekuly HF se navzájem snaží, aby došlo k překryvu elektronového páru s protivazebným vakantním orbitalem σ^* téměř ve smyslu koordinačně-kovalentní donor-akceptorové interakce. Dochází tak k prodloužení a oslabení vazby H–F, avšak zároveň k formaci vodíkového můstku F–H---F [51].



Obr. 6: Schéma molekulových orbitalů fluorovodíku [52].

2.7.2 Van der Waalsovy síly:

Keesomovy interakce

Keesomovy interakce jsou speciálním typem interakcí vyskytujícím se mezi dvěma permanentními dipóly. Jedná se o přitažlivé interakce, které jsou závislé na vzájemném natočení zúčastněných molekul [54]. Energie těchto interakcí je v případě volné otáčivosti molekul nepřímo úměrná teplotě a šesté mocnině vzdálenosti obou dipólů [55]. Jedná se tedy o interakce krátkého dosahu, které jsou však nejsilnějšími interakcemi Van der Waalsova typu. Zatímco v plynech jsou téměř zanedbatelné vzhledem k velké vzdálenosti molekul, v případě kapalin a pevných látek hrají významnou roli [56]. V biologických systémech je jejich projev značný v peptidických vazbách, kde přítomností karboxylové a amino skupiny vzniká značný dipólový moment [57].

Debyeovy interakce

Tímto termínem jsou označovány interakce mezi polární a nepolární molekulou, kdy přítomností permanentního dipólu dochází ke vzniku indukovaného dipólu na druhé polarizovatelné molekule [54].

Londonovy síly

Londonovy disperzní síly jsou speciální skupinou van der Waalsových sil, avšak v tomto případě se nejedná o interakce permanentních dipólů nebo indukovaných dipólů, jako tomu je v případě Keesomových a Debyeových interakcí. London upozornil, že i rozmístění elektronů neutrální resp. nepolární molekuly se může měnit a tedy že i tyto molekuly vykazují interakce dlouhého dosahu van der Waalsova typu. Ve stručnosti se to děje díky kmitání elektronů v rámci molekuly a tím vzniku elektronově hustších, resp. chudších míst na molekule. Díky nerovnoměrnému rozmístění elektronů v daném momentu tak molekula získává negativnější a pozitivnější domény, které intermolekulárně zapříčiňují projevy Londonem popsanych sil [58].

2.7.3 Hydrofobní efekt

Přestože Londonovy disperzní síly byly charakterizovány jako síly vyskytující se u okamžitých dipólů, bývají k nim řazeny i síly hydrofobní, které však z důvodu permanentního dipólu molekuly vody tuto kategorizaci narušují. Hydrofobní efekt jsou důležité při sbalování proteinů nebo např. při formaci micel. Díky těmto interakcím dochází k agregaci hydrofobních domén ve snaze vyhnout se kontaktu s vodou. S tímto dějem je také spojeno zvyšování entropie systému, protože samouspořádáváním hydrofobních domén k sobě dochází k vytlačování molekul vody z objemu a tím k nárůstu entropie [59],[60].

2.8 Léčiva a léčivé látky

V české terminologii je poměrně obtížné najít přesnou definici anglického slova drug, které se vyskytuje v odborných medicínských, farmaceutických, biochemických a obdobných textech. Nejběžněji se pro tento termín používá české slovo léčivo, které je dle zákona č. 402/2000 Sb. definováno jako: „Léčivý se rozumějí léčivé látky nebo jejich směsi anebo léčivé přípravky, které jsou určeny k podání lidem nebo zvířatům, nejde-li o doplňkové látky a premixy [61].“ V angličtině však pojem drug označuje také sloučeniny, které interagují s biologickým systémem za vzniku biologické odpovědi [62]. Tato definice tak blíže odpovídá českému termínu léčivá látka, kterou výše zmíněný zákon definuje jako: „Léčivými látkami se rozumějí látky přírodního nebo syntetického původu, zpravidla s farmakologickým či imunologickým účinkem nebo ovlivňující metabolismus, které slouží k prevenci, léčení a mírnění chorob, určení diagnózy a k ovlivňování fyziologických funkcí.“ Diskuze by se dala dále rozvést o definici API, která se v českém překladu běžně používá jako farmaceuticky aktivní látka, což v podstatě odpovídá popisu termínu léčivá látka stanovenému zákonem. Pro vědu je však mnohem více než toto lingvistické okénko důležitější podstata interakce léčivé látky s buňkou potažmo s celým lidským organismem. Lidské (savčí) buňky jsou od okolí odděleny cytoplasmatickou membránou, která chrání vnitřní obsah buňky. Z chemického pohledu je membrána tvořena fosfolipidovou dvojvrstvou, cholesterolem a proteiny různých druhů a modifikací. Právě tyto proteiny jsou pro léčivé látky a jejich interakci s buňkou klíčové. Proteiny mohou mít funkci receptorovou, enzymatickou nebo přenašečovou. Zároveň v kombinaci se sacharidy mohou tvořit tzv. glykoproteiny, které slouží jako receptory pro buněčné rozpoznávání.

Léčivé látky tak mohou cílit na zmíněné proteiny buněčné membrány nebo na nukleové kyseliny uvnitř buňky. Principiálně dochází k interakci látky s vazebným místem makromolekuly. Síly podílející se na těchto interakcích řadíme mezi nekovalentní interakce, které jsou dostatečně silné na udržení léčivé látky ve vazebném místě po dostatečně dlouhou dobu a zároveň schopné ji po tomto čase uvolnit. Mezi nekovalentní interakce patří elektrostatické síly, vazby vodíkovými můstky, Van der Waalsovy interakce (interakce dipól-dipól, disperzní a hydrofobní efekt) Právě poslední zmíněné jsou velmi zajímavé, vezmeme-li v úvahu, že lidský organismus je vodním prostředím. Léčivá látka tak, stejně jako vazebné místo, je solvatována molekulami vody a aby mohlo dojít k navázání, musí být solvatační vrstva odstraněna, což vyžaduje určité množství energie. Existují však i léčiva, která obsahují polární skupiny podporující interakci s vodou a není pro ně potřeba zbavit se molekul vody pro interakci s vazebným místem. U nepolárních léčivých látek z pohledu entropie dochází vlivem odpuzování molekul vody k vytvoření organizovanějších struktur molekul vody a nežádoucímu poklesu entropie. Při interakci s hydrofobním místem jsou však molekuly vody uvolněny do okolí, což vede ke zvýšení entropie a posílení preference vazebné interakce [62].

2.9 Receptory

Lidský organismus je komplikovaný systém skládající se z desítek trilionů buněk [63]. Toto číslo, které je pro člověka nepředstavitelné, zákonitě vybízí k úvaze, že aby takto bohatý systém mohl fungovat, musí být řízen; mezi jednotlivými buňkami musí docházet ke komunikaci. Od narození jedince až po jeho smrt dochází k neustálému toku informací, díky kterému je zajištěna funkce tkání, orgánů a celého těla. Život organismu je podmíněn správnou funkcí všech složek signálních a komunikačních drah a jejich porušení může být pro organismus fatální. Zároveň dojde-li k porušení funkce některé z komponent organismu, je nutné, aby specifické buňky na změnu reagovali, případně aby reagovali na přítomnost xenobiotika, které bylo do organismu dodáno, aby mu napomohlo k jeho léčbě.

Aby byla buňka schopna komunikovat s okolními buňkami a přijímat signály, disponuje útvary zvanými receptory. Jedná se o proteiny na povrchu nebo uvnitř buňky, které jsou schopny vázat konkrétní molekulu – ligand, čímž dojde ke změně v buňce. Konkrétní proces, ke kterému po navázání ligandu dojde, je dán typem receptoru a ligandu [64].

2.9.1 Rozdělení signálních molekul dle drah v organismu

Ligandy neboli signální molekuly, mohou být v podobě makromolekulárních sloučenin jako i jednoduchých chemických látek. Dle dráhy je rozdělujeme na autokrinní, parakrinní a endokrinní.

V případě autokrinní dráhy se jedná o produkci signálních molekul buňkou, která je zároveň akceptorem tohoto signálu. Jinými slovy dojde k navázání ligandu na receptor téže buňky, která vyprodukovala danou signální molekulu. Tento druh buněčné signalizace je ve zdravém organismu poměrně ojedinělým fenoménem. Je však možné jej nalézt u nádorových buněk, jejichž proliferace může být poháněna právě v závislosti na navázání signální molekuly dané buňky [65].

Parakrinní dráha funguje na principu produkce signální molekuly buňkou za navázání této molekuly na receptory buněk v bezprostřední blízkosti. Jedná se o lokální signalizační dráhu typickou pro záněť a angiogenesi [65]. Signální molekuly v tomto případě jsou schopny putovat jen na krátké vzdálenosti a jsou snadno odbouratelné. Příkladem může být produkce ATP buňkami v místě rány, kdy koncentrační gradient ATP v okolí a uvnitř zdravých buněk vyvolá odezvu v podobě stimulace produkce růstových faktorů potřebných k hojení rány [66].

Endokrinní dráha je svým dosahem nejširší. Dochází k buněčné produkci signálních molekul schopných putovat krevním oběhem do místa potřeby, tedy ke konkrétní tkáni, kde dojde k jejímu navázání na receptor. Rozdíl mezi endokrinní a parakrinní signalizační dráhou však není přesně vymezen a některé signální molekuly tak mohou spadat do obou kategorií. Endokrinní systém je navíc úzce spojen s „univerzálním“ zdrojem informací, kterým je nervový systém. Ten díky elektrickým vzruchům rozvádí informace po organismu a podněcuje mimo jiné funkce všech výše uvedených systémů. Nervová buňka však neovlivňuje buňky ve svém okolí přímo. Využívá k tomu neurotransmiterů, které se vážou na buněčné receptory a jsou tedy převodníkem mezi elektrickým vzruchem nervového systému a buněčnou signalizací buněk i jiného než neuronového typu [67]. Neurotransmiterů je celá řada od jednoduchých molekul

jako například acetylcholinu nebo serotoninu až po složitější struktury prostaglandinů, enzymů (př. trombin), neuropeptidů a peptidových hormonů [39].

Kromě neurotransmiterů jsou významným šířitelem informací v rámci organismu také hormony produkované tělními žlázami. Hormony je možno dělit několika způsoby (dle chemického složení, rozpustnosti, ...), zde je však věnován prostor dělení hormonů dle mechanismu jejich účinku. První skupinou jsou hormony lipofilní, které jsou schopny difúze skrz membránu a vážou se na receptory uvnitř buňky. Příkladem mohou být androgeny a estrogeny [67].

Druhou skupinou jsou hormony vystupující jako ligandy receptorů na povrchu buněk. Ke stimulaci buněčných procesů využívají molekul tzv. druhých posílů, kterými jsou cAMP, cGMP, vápenaté kationty, fosfatidylinositidy nebo diacylglycerol [67].

Tak jako všechny výše zmíněné signální molekuly cílí na daný typ receptoru, stejně je tomu i s léčivými v organismu. Aby bylo dosaženo požadované odezvy na léčivou látku, je potřeba navrhnout léčivo, respektive jeho nosič tak, aby cílilo na požadovaný receptor.

2.9.2 Iontové kanálky

Prvním typem receptorů jsou iontové kanály, kterým je věnována pozornost především z pohledu léčby nemocí nervového systému. Léčiva cílená na iontové kanálky tak ovlivňují centrální nervovou soustavu, periferní nervovou soustavu a kardiovaskulární systém [68].

Iontové kanálky jsou transmembránové (integrální) proteiny často složené z řady podjednotek. Mohou být selektivní na ionty, typ náboje nebo bez selekce. Obecně se jedná o usnadněnou difúzi poháněnou gradientem náboje na obou stranách membrány. Jejich funkce je podstatou fungování centrálního nervového systému stejně jako oxidační fosforylace, tedy procesu získu ATP energickým spřažením procesů metabolických drah [69].

2.9.3 Receptory vázané na G-proteiny

Další skupinou receptorů jsou receptory vázané na G-proteiny. Takovéto receptory jsou obvykle spřaženy se sedmi hydrofobními transmembránovými doménami helikální struktury. Navázáním ligandu na receptor dochází ke konformační změně tohoto receptoru a tím ke zpřístupnění vazebného místa receptoru na vnitřní straně membrány. Do zpřístupněného vazebného místa se váže G-protein sestávající ze tří podjednotek, jejichž soudržnost je navázáním narušena [39] a dochází tak k uvolnění GDP a navázání GTP na α jednotku komplexu, která následně stimuluje enzymatickou aktivitu. Nejznámějším takto fungujícím enzymem je adenylátcykláza, která katalyzuje formaci cyklického AMP [67]. Za objev G-proteinů byla v roce 1994 udělena Nobelova cena Martinu Rodbellovi a Alfredu G. Gilmanovi [70]. Jak v následujících letech ukázala analýza lidského genomu, v organismu existuje minimálně 800 receptorů spřažených s G-proteiny. Tento typ receptorů je významným také při vývoji léčiv – odhaduje se, že až polovina všech léků na předpis (vyjímaje antibiotika) cílí právě na tuto třídu receptorů [71].

2.9.4 Tyrosin-kinázové receptory

Speciální skupinu tvoří tyrosin-kinázové receptory, které se vyznačují jedinou doménou prostupující membránou. Primárně se jedná o receptory, jejichž ligandem je inzulin nebo peptidický růstový hormon. Navázáním dochází k opakované fosforylaci a defosforylaci budující tzv. kaskádu. Výsledkem je regulace buněčného růstu a diferenciací. Při navázání ligandů dochází k fosforylaci kináz, které v případě růstových faktorů (inzulin nevyjímaje) vedou postupnou fosforylaci kináz přes zapojení Ras proteinů až do buněčného jádra a k aktivaci zde se vyskytujících transkripčních faktorů. Inzulin samostatně má další dvě funkce – jednou je zabránění inaktivace glykogen syntázy přes fosforylaci proteinkinázy B díky navázání aktivovaného fosfatidylinositol 3,4,5-trifosfátu navázaného na buněčnou membránu. Druhou je zabezpečení prostupu molekul glukózy dovnitř buněk. V tomto případě dochází k relokizaci GLUT4 přenašeče na povrch buňky a tím k zahájení přenosu glukózy z extracelulárního prostoru [71].

2.9.5 Jaderné receptory

Poslední významnou skupinou receptorů jsou receptory umístěné uvnitř buňky. Jejich ligandy jsou hydrofobní sloučeniny schopné procházet buněčnou membránou. Jedná se tak o steroidy a jim podobné hormony, které se v cytosolu vážou na receptor a v podobě komplexu receptor-ligand putují do jádra, kde působí na genovou expresi. Pro svou oblast působení dostala tato skupina název jaderné receptory [71]. Aktivací ligand-dependetního jaderného receptoru dochází k regulaci transkripce genů a tím k ovlivnění proliferace, metabolických drah i reprodukce. Do hry kromě ligandů, vstupují také koaktivátory a korepresory upravující transkripční aktivitu dle potřeby buňky. Zda se na receptor navážou je allostericky kontrolováno již vázaným ligandem [72]. Z pohledu farmacie se jedná o skupinu receptorů, na které cílí celá řada léčiv. Významného pokroku bylo dosaženo například při léčbě rakoviny prsu cílením na jaderné receptory estrogenu nebo rakoviny prostaty cílením na receptory androgenu [73]. Důležitou roli také hrají například jaderné receptory glukokortikoidů, které bojují proti zánětům a autoimunním chorobám. Z tohoto důvodu pacienti trpící astmatem, revmatoidní artritidou nebo roztroušenou sklerózou užívají léčiva na bázi syntetických glukokortikoidů. Jejich příjem však musí být regulován z důvodů vážných vedlejších účinků. Dlouhodobém užívání těchto léčiv vede k osteoporóze, atrofii kůže, diabetu a dalším vážným onemocněním [74].

2.10 Nosičové systémy

Nosičové systémy jsou moderní metodou distribuce léčiva do konkrétního místa účinku. Léčivá látka je tak doručena do konkrétního orgánu, tkáně nebo buňky v požadované koncentraci, čímž dochází jak ke zlepšení účinků této látky, tak k předejití možným vedlejšími účinkům v jiných částech organismu, než ve kterých je daná látka potřebná. Díky nosiči je tak kontrolována rychlost, doba a místo uvolnění léčiva v organismu [75].

Nosičové systémy můžeme rozdělit dle řady charakteristik, nejčastějším je jejich dělení dle chemické struktury nebo dle způsobu dodání do organismu. Kromě běžného rozdělení na perorální, parenterální, rektální a lokální aplikace tak přichází v úvahu také implantace a site-specific aplikace (pozn. Přestože site-specific aplikace bývá uváděna jako samostatný typ

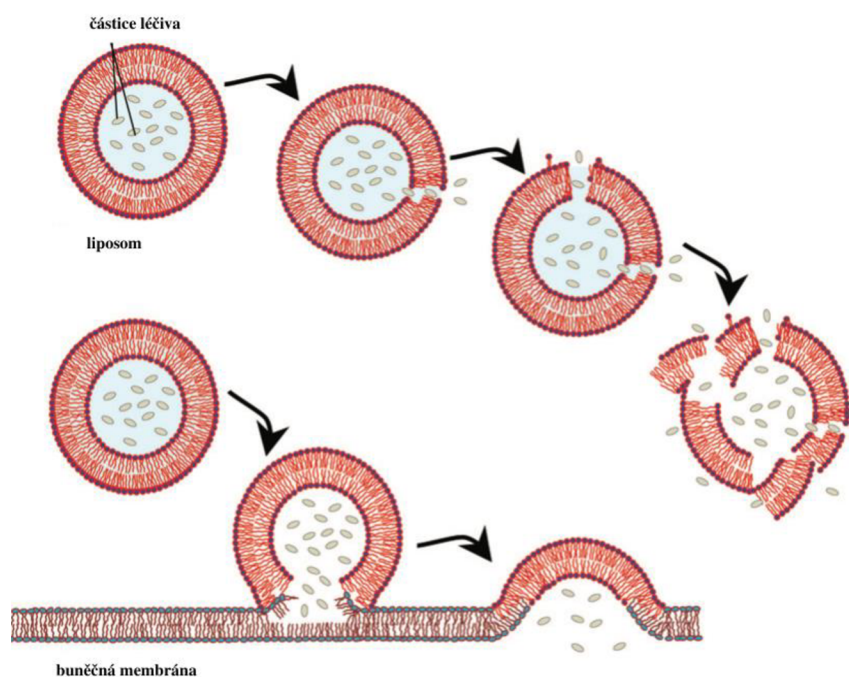
aplikace, z pohledu čistě farmaceutického se jedná o typ parenterálního podání přípravku, jelikož je nejběžněji injektován [76].)

Coby nosičové systémy může vystupovat celá řada systémů – nejčastěji se setkáváme s polymery ať už přírodního nebo syntetického původu, fibroblasty, lipoproteiny, liposomy, micelami, uhlíkovými nanočásticemi a magnetickými částicemi.

Samotná doprava do místa účinku obecně probíhá dvěma způsoby: hovoříme o aktivním a pasivním transportu. V případě aktivního transportu je na konjugát léčivo–nosič navázán rozpoznávací ligand cílicí na konkrétní místo. Zároveň však může být aktivního cílení dosaženo i pomocí fyzikálních stimulů, jako jsou teplota, pH nebo magnetismus. Pasivní cílení oproti tomu spočívá v cirkulaci částic krevním řečištěm a prostupu skrze prosakující vaskulaturu [76]. Její disintegrace je charakteristická pro chronické zápaly a rakovinu [77]. Díky EPR efektu (z angl. enhanced permeability and retention) dochází k akumulaci léčiva v místě tumoru, k jeho uvolnění do extracelulární matrice a následné difúzi do rakovinné buňky [76].

2.10.1 Liposomy

Liposomy jsou jedním z nejhojněji využívaných nosičů užívaných při cíleném transportu léčiva. Díky svým dobře prozkoumaným vlastnostem se jeví jako vhodný enkapsulační prostředek pro transport hydrofobního léčiva skrze vodné prostředí organismu až do místa požadovaného účinku. Strukturně se jedná o sférické částice tvořené fosfolipidovou dvojvrstvou obdobné struktury jako je ta tvořící buněčnou membránu živých organismů.



Obr. 7 Příklad rozpadu liposomální částice a uvolnění léčiva inkorporací liposomální částice do buněčné membrány [78].

Sférický tvar obvykle vzniká samouspořádáním a může být unilamelární nebo multilamelární. V jádru liposomů se nachází hydrofilní prostor, který tvoří vhodné prostředí pro hydrofilní léčiva. V případě hydrofobních léčiv je možná jejich inkorporace přímo do lipofilní dvojvrstvy.

Výhodou liposomálních částic je možnost úpravy jejich povrchu. Ten může být modifikován například ve smyslu změny náboje. Nese-li micela na svém povrchu záporný náboj, dochází k fúzi micelární fosfolipidové dvojvrstvy a buněčné membrány, čímž je léčivo uvolněno do cytoplasmy. Neneše-li na povrchu žádný náboj, vstupuje léčivo do buňky pomocí fagocytózy a cílí tak na lysozomy. Častým je také navázání polyethylenglykolu, který zlepšuje vlastnosti částic ve smyslu schopnosti stabilizovat strukturu liposomu i při vyšším množství poutaného léčiva [79]. Kromě PEG je další využívanou sloučeninou hyaluronan, který slouží jako molekula pro cílený transport léčiva k rakovinným buňkám [80]. Své uplatnění při modifikaci liposomálních povrchů nachází dále např. imunoglobuliny nebo peptidy [79].

2.10.2 Pevné lipidové nanočástice

Pevné lipidové nanočástice mají coby svůj materiální základ přírodní sloučeniny – vosky, triglyceridy, mastné kyseliny a steroidní látky [81]. Výhodnou vlastností je jejich pevný stav při pokojové teplotě a schopnost přenášet velké množství aktivní terapeutické látky jakož i její následné pozvolné uvolňování. Vzhledem k vysoké hydrofobicitě bývá povrch těchto částic modifikován pomocí vhodných hydrofilních sloučenin, jako např. PEG [82].

2.10.3 Micely

Micely vycházejí z podobného základu jako liposomy. K jejich uspořádání dochází v závislosti na hydrofilitě/lipofilitě domén amfifilních částic tvořících celou strukturu útvaru v daném prostředí. Na rozdíl od liposomů zde však nedochází k formaci dvojvrstvy nýbrž ke shlukování elementárních částic do sférických útvarů tak, aby doména s vyšší afinitou k okolnímu prostředí s ním byla v kontaktu. Při volbě vodného prostředí tak polární hlavu tvoří povrch sférického útvaru, zatímco hydrofobní konce směřují do středu částice [83].

2.10.4 Nosiče na bázi polymerních sloučenin

Rozsáhlou kategorií jsou nosiče na bázi polymerních sloučenin. Spadají sem polysacharidy, polymery kyseliny mléčné a glykolové, proteiny, polypeptidy a další. Mezi jejich významné vlastnosti řadíme především jejich vysokou stabilitu v krevním oběhu, a to až na úroveň kapilár a setrávat v něm po delší čas. Dále schopnost putovat skrze tkáň a cílit tak na konkrétní místa. Díky citlivosti na změnu teploty, pH a iontovou sílu je významnou také možnost kontrolovatelného uvolňování léčiva. Právě léčivo je nejčastěji poutáno v matici a díky jej obklopující polymerní sféře je chráněno před okolním prostředím jakož i získává vlastnosti potřebné pro transport léčiva do místa účinku, jako např. i hydrofobní léčiva mohou být díky navázání na polymerní nosič rozpustná [84]. Společně s liposomy se jedná o historicky nejstarší metodu přípravy transportních systémů.

2.10.5 Anorganické nanomateriály

Zatímco výše uvedené způsoby přípravy transportních systémů byly založeny na stavebních jednotkách přírodního původu nebo původu syntetického, avšak svými vlastnostmi inspirovaného v živých organismech, další kategorie spadá mezi částice připravené ryze synteticky. Jedná se o nanočástice využívající poznatky anorganické chemie s přesahem do chemie organické a biochemie. Díky syntetické přípravě je možno přesně regulovat vlastnosti transportních částic, jako je velikost, tvar, povrch atd. Klasicky se sem řadí struktury na bázi uhlíku, magnetické nanočástice, zlaté nanočástice a kvantové tečky [85].

Uhlíkové nanočástice

Uhlíkové nanomateriály vykazují výborné výsledky v oblasti nosičových systémů – jedná se především o fullereny, uhlíkové nanotrubičky a grafeny. V případě fullerenů se jedná o silně hydrofobní částice s dutým jádrem, jejichž povrch je však možno funkcionalizovat a získat tak částice rozpustné ve vodě. Léčivo uvnitř struktury může být kovalentně vázáno nebo jímáno pouze pomocí nekovalentních interakcí. Oblasti výzkumu uhlíkových nanočástic je věnována velká pozornost. Stále však nejsou zodpovězeny všechny otázky týkající se cytotoxicity, optimálního řízeného uvolňování nebo farmakokinetického profilu [85].

Magnetické nanočástice

Z řady magnetických nanočástic, jejichž jádro nejčastěji tvoří kovy kobalt, nikl, mangan nebo železo, hrají v problematice nosičových systémů významnou roli ferrity odvozené od struktury oxidu železitého. Výhodou takovýchto částic je jejich superparamagnetická povaha, tedy že svých magnetických vlastností nabývají pouze v prostředí magnetického pole. Obecně platným problémem využití magnetických nanočástic je však jejich nízká biokompatibilita, která je základním požadavkem pro nosičové systémy. Aby částice mohla přijít do kontaktu s buňkami lidského organismu, je potřeba modifikovat její povrch, čehož je dosaženo obalením částice například do polysacharidu typu dextranu [85]. Kromě pokrytí povrchu biopolymerem se také přistupuje k jeho pozlacení, navázání dendrimerů nebo silanových skupin. K vytvoření konjugátu s léčivem může dojít několika cestami – pomocí kovalentního navázání, elektrostatickou interakcí, enkapsulací nebo adsorpcí. Magnetické nanočástice jsou nejčastěji využívány ke zobrazování a pro léčbu nádorových onemocnění. Vzhledem k tomu, že jsou stále předmětem zkoumání, je pravděpodobné, že své využití naleznou i v dalších oblastech medicíny [78].

2.11 Lyofilizace

Lyofilizace neboli sušení mrazem, je moderní metoda přípravy stabilních biologických materiálů poskytující možnost zachovat jejich biologickou funkci díky podmínkám vyhovujícím i citlivým biologickým materiálům. Své využití tato technika našla i v potravinářství, kde slouží k sušení ovoce a zeleniny za ponechání si jeho původní barvy i chuti. Z vědecko-výzkumného hlediska je však tato metoda zajímavou především při přípravě transportních systémů s širokým spektrem následného využití. Kromě přípravy vakcín, léčiv a scaffoldů pro buněčnou proliferaci může být použita i pro přípravu ve vodě rozpustných

nosičových systémů typu hyaluronanu s navázaným hydrofilním léčivem, přičemž tato aplikace je předmětem zájmu této práce.

2.11.1 Metoda a princip přípravy systémů

Sušení hydratovaných systémů je poměrně náročným procesem, chceme-li zachovat jeho biologickou aktivitu. Vystavením bio-materiálů vysokým teplotám v horkovzdušných sušičkách dochází k jeho strukturálním i funkčním změnám, což vede k jeho znehodnocení. Alternativou je tzv. sušení mrazem, které místo teplot vysokých využívá těch hluboko pod bodem mrazu a následného efektu sublimace ve vakuu, kdy dochází k přechodu rozpouštědla z pevné fáze přímo do fáze plynné a jeho následnému uvolnění ze systému. Schéma procesu se skládá ze tří částí: zmrazení, primární sušení (sublimace ledových krystalů) a sekundární sušení (desorpce) [86].

Vzhledem k tomu, že požadovaná látka, kterou se snažíme sušením z roztoku získat, je obvykle ve velmi malé koncentraci, přidávají se do systému stabilizační pomocné látky, na které je původní sloučenina (v tomto případě API) fyzikálně či chemicky navázána. Díky svým vlastnostem v roztoku se vhodnými jeví sacharidy, které při vymrazování ochotně přecházejí do skelné fáze polymeru a stávají se tak tvrdými a křehkými [87]. Právě znalost teploty skelného přechodu anebo eutektické teploty je esenciální pro celý proces zvláště pokud používáme kromě vody coby rozpouštědla i další nejčastěji organické rozpouštědlo.

Lyofilizátor jako takový se skládá ze tří základních částí, kterými jsou vymrazovací komora, kondenzátor a vakuová pumpa. Do vymrazovací komory s rošty se dávají vzorky ve vhodných nádobách – nejčastěji se používají lyofilizační baňky různých velikostí dle objemu lyofilizovaného systému, které jsou schopny odolávat velkým teplotním rozdílům. Kondenzátor odvádí zkondenzované páry rozpouštědla, zatímco vakuová pumpa nasává páry, které nejsou schopny kondenzace a jsou tak volně odváděny během primárního sušení za současného postupného odstraňování vzduchu a vytváření vakua [87].

Samotný proces lyofilizace se skládá ze tří fází. V první fázi dochází k mrazení celého systému v postupných krocích, přičemž při programově řízené lyofilizace nastavujeme jednotlivé kroky tak, aby systém nebyl vystaven náhlému prudkému ochlazení, které by mohlo danou biologicky aktivní látku zničit. Postupný pokles teploty je tak prováděn v krocích, přičemž při jednotlivých teplotách je systém vždy ponechán po určitou námi zvolenou dobu.

Ve druhé fázi je postupně zvyšována teplota, zároveň s měnícím se tlakem vakua uvnitř lyofilizátoru. V této fázi hovoříme o tzv. primárním sušení, během kterého krystaly vody sublimují a ze systému je odvedeno velké množství rozpouštědla. Hnací silou sublimace je rozdíl parciálních tlaků vodní páry a ledu při příslušné teplotě, přičemž čím nižší je tlak vodní páry v komoře oproti tlaku par ledu na sublimačním rozhraní, tím rychleji probíhá sublimace [88]. Teplota je sice postupně zvyšována, ale neměla by se dostat nad teplotu skelného přechodu (u amorfních sloučenin), respektive nad eutektickou teplotu (u krystalických sloučenin) [87].

Ve třetí fázi, tedy tzv. sekundárním sušení, dochází k desorpci zbývající vody způsobené krokovým zvyšováním teploty nad teplotu počáteční, avšak do takové míry, aby biologická aktivita sušeného systému zůstala zachována a došlo pouze k odstranění nechtěné vody. Lyofilizát, tedy výsledný lyofilizovaný systém, je velmi suchý a má tak silné hygroskopické vlastnosti, proto je vhodné ho z lyofilizátoru co nejrychleji přemístit do vhodného suchého prostředí [87]. Veškerá voda jak z primárního, tak sekundárního sušení je odvedena do kondenzátoru, který je následně zahříván a do něj jímaný led je odstraněn.

I přes spoustu výhod, díky kterým je lyofilizace cennou a užitečnou metodou přípravy biologicky aktivních systémů, existuje několik důvodů, kvůli kterým není až tak využívanou, jak by mohla být. Prvním z nich je cena – pro hluboké zmražení vzorku a jeho následné ohřátí je potřebné poměrně značné množství energie, což se výrazně projeví na finanční náročnosti této metody. Dále z pohledu chemického zůstává stále problémem různorodosti farmaceuticky aktivních látek, kdy ne všechny jsou stabilní a ochotny se vázat na nosič. V neposlední řadě také ne všechny bioaktivní látky jsou odolné vůči mrazu a mohou tak být znehodnoceny, zvláště pokud není vhodně zvolena rychlost mražení a následné sublimace [89].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

V roce 1992 publikovali John E. Scott a kol. článek zabývající se studii sekundárních a terciárních struktur vybraných proteoglykanů (chondoritinu a chondroitin sulfátu) a hyaluronanu. Pomocí NMR, elektronové mikroskopie s rotačním stínováním a počítačové simulace byly získány výsledky, které přiřadily sekundární struktury hyaluronanu ve vodném roztoku konformaci dvakrát stočené šroubovice. Zároveň bylo odvozeno, že na agregaci jednotlivých řetězců se podílí kromě vazeb vodíkovými můstky i hydrofobní interakce, tedy že struktura hyaluronanu je kromě silně hydrofilního charakteru ovlivněna přítomností hydrofobních domén. Tyto domény pak v živých organismech, konkrétně v mezibuněčném prostoru interagují s hydrofobními makromolekulami typu kolagenu a dávají tak extracelulární matici její specifické vlastnosti. Samotná studie tedy potvrdila formaci agregátů a vznik komplexů v závislosti na hustotě náboje. Hyaluronan stejně jako nesulfatovaný polymerní chondroitin s ochotou tvořil duplexy a vyšší struktury [43].

V roce 2002 dále stejný autor publikoval článek, ve kterém potvrdil sekundární a terciární strukturu hyaluronanu. Terciární struktura je podle studia projevem interakcí vysokomolekulárního polymerního řetězce, kdy dochází k vazbě vodíkovými můstky acetamino NH skupiny s karboxylátovou skupinou sousedních řetězců. Na stabilizaci se navíc podílejí hydrofobní interakce. Pomocí NMR tak byla v závislosti na sekundární a terciární struktury vysvětlena denaturace za vysoké hodnoty pH a při zahřívání, což zároveň podalo užitečné informace objasňující některé děje v živých organismech [8].

Podstatným pro tuto diplomovou práci se stal výzkum Michalicové a kol., který se zabývá solvatací hydrofobních molekul vázaných na nativní hyaluronan coby nosič připravený pomocí lyofilizace. Podstatou práce bylo využití sušení mrazem jakožto vhodné metody pro narušení solvatačního obalu řetězce hyaluronanu, který by jinak bránil navázání hydrofobních molekul na tuto silně hydrofilní sloučeninu. Schopnost metody vodnou vrstvou odkryt potvrdila autorka již ve své bakalářské práci [90], která se tak stala základem celého výzkumu. V případě nového výzkumu přistoupila k navázání fluorescenční sondy na hydrofobní část nativního hyaluronanu užitím *terc*-butylalkoholu jakožto korozpouštědla podporující rychlejší, efektivnější a pro produkt bezpečnější sušení [91].

Samotnému procesu sušení mrazem hyaluronových nosičů se zabývá diplomová práce Kristíny Waczulíkové. Ve svém výzkumu se Waczulíková zaměřila na jednotlivé parametry lyofilizace systémů, kde byl coby nosič použit hyaluronan o dvou středních molekulových hmotnostech, a sice 13 kDa a 1,91 MDa. Referenčními činidly zastupujícími léčiva se staly fluorescenční sondy pyren, perylén, prodan a DPH. Důležité informace z této práce plynou především z použití rozpouštědla připraveného smísením *terc*-butylalkoholu s vodou a z podrobného výzkumu vlastností tohoto solventu ve smyslu získání nejnižší možné teploty pro efektivní sušení mrazem. Tato teplota byla po zaokrouhlení stanovena na $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, což by mělo odpovídat teplotě blízké buď teplotě skelného přechodu nebo eutektickému bodu. Pro charakterizaci navázání fluorescenčních sond na molekulu hyaluronanu byly lyofilizované vzorky podrobeny analýze na infračerveném spektrofotometru a vizualizovány pomocí skenovacího elektronového mikroskopu. Navázání fluorescenční sondy bylo prokázáno přítomností

absorpčního pásu ve spektrech lyofilizovaných vzorků při vlnočtu 1477 cm^{-1} , který je charakteristický pro valenční vibrace C=C vazeb v aromatických kruzích fluorescenčních sond. Toto tvrzení následně bylo potvrzeno také pomocí ustálené a časově rozlišené fluorescenční spektroskopie. Ze získaných dat tak bylo potvrzeno, že sušení mrazem je při vhodně zvolených podmínkách účinnou metodou přípravy systémů využívajících hydrofobní interakce mezi sondou a hydrofobními doménami nativního hyaluronanu [92].

Koncentrací residuí rozpouštědla v lyofilizátu se zabývá článek z roku 1998, jehož autory jsou Sakchai Wittaya-Areekul a Steven L. Nail. Ve své práci nejprve shrnují výhody využití terc-butylalkoholu jako korozpouštědla – mimo jiné přítomnost této sloučeniny napomáhá díky vzniku dlouhých jehlicovitých krystalů k rychlejšímu vysušení lyofilizačního koláče během primárního sušení. Samotný výzkum pak byl věnován porovnávání residuí korozpouštědla ve vysušených vzorcích. Coby modelové vzorky určené k sušení byly použity 5% roztok sacharózy a 5% roztok glycinu s měnicími se koncentracemi TBA. V prvním kroku byla pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie určena eutektická teplota systémů na -10 °C pro systém obsahující sacharózu a -7 °C pro systémy s glycinem. Z následných výsledků analýzy lyofilizačních koláčů vyplynulo, že koncentraci residuálního TBA lze snížit přípravou takových systémů, kde se TBA nachází nad eutektickou koncentrací, tedy v krystalickém stavu. Pro amorfni stav byly hodnoty residuí značně vyšší. Nižší koncentrace korozpouštědla ve výsledném systému je možno dále dosáhnout delší dobou mražení a vyšší teplotou při sekundárním sušení [93].

Samotné metodě stanovení residuí v lyofilizaci připravených systémech se ve své bakalářské práci zabývala Tereza Borůvková v roce 2014. Jako vhodné analytické metody pro určení residuí TBA byly použity: metoda mikroextrakce tuhou fází se vzorkováním z rovnovážné plynné fáze (Head-Space SPME) a metoda analýzy rovnovážné plynné fáze (Head-Space). Porovnání obou metod vedlo k tezi, že Head-Space technika podporuje opakovatelnost a je zároveň podává objektivní informace o výsledcích měření. V rámci práce bylo také zhodnoceno, že vzorky obsahující na počátku 20 obj. % a 40 obj. % TBA vykazují nižší hodnoty koncentrací residuálního TBA než vzorky připravené s využitím 60 obj. % TBA [94].

Kromě hyaluronanu se vědecké týmy zabývají také přípravou lyofilizovaných nosičů pro řízené uvolňování s využitím chitosanu coby nosičového materiálu. Příkladem může být práce Fouad Damiri a kol. z roku 2020, která zkoumá vlastnosti systémů připravených z lyofilizovaného chitosanu s navázaným benzaldehydem. Díky přítomnosti aromatických jader na benzaldehydu dochází k formaci fyzikálně zesíťovaného hydrogelu, který je schopen v sobě nést léčiva (v tomto případě vzorové látky: kofein, kyselina askorbová a 5-fluorouracil) a následně je rozpouštěním postupně uvolnit. K samotnému zasíťování zde dochází díky hydrofobním interakcím, které vznikají mezi aromatickými jádry a vedou tak k samouspořádávání systémů za vzniku hydrofobních domén, v nichž by teoreticky mohla být poutána hydrofobní léčiva [95].

Hydrofobními interakcemi se zabýval také tým Zhixuan Wanga, Yingjie Denga a Xiaopeng Zhanga, který zkoumal přípravu nosičových systémů na bázi hydroxypropyl β -cyklodextrinu s využitím TBA coby rozpouštědla vhodného k navázání hydrofobního léčiva na výše uvedenou sloučeninu. Výsledkem bylo úspěšné získání lyofilizovaného systému, který podpořil rozpustnost léčiva [96].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Obecný úvod experimentální části

Experimentální část diplomové práce je z velké části věnována procesu lyofilizace a následné analýzou získaných systémů. V úvodu se věnuje získání a zpracování informací o jednotlivých vzorcích, tedy léčivech dodaných společností Boehringer Ingelheim. Cílem experimentální části je připravit systémy poutající v sobě díky hydrofobnímu efektu hydrofobní léčiva, která se právě díky svému nosiči budou ochotna rozpouštět ve vodném prostředí.

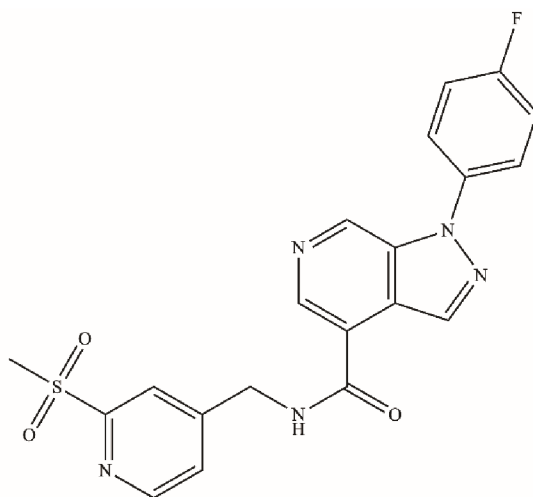
Coby metody využitě pro charakterizaci jednotlivých systémů byly použity steady-state infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací na ATR krystalu, fluorescenční spektrometrie (steady-state i časově rozlišená), UV/Vis spektrometrie a termogravimetrická analýza.

4.2 Použité chemikálie

- Nativní hyaluronan, střední molekulová hmotnost 13 000 Da, výroba Contipro (ČR);
- Terc-butylalkohol (bezvodý $\geq 99,5\%$), CAS: 75-65-0;
- Chloroform (stabilizován amylem, 99,8%), Sigma Aldrich;
- Léčiva od společnosti Boehringer Ingelheim:

a) Vzorek 1 - BI 638683

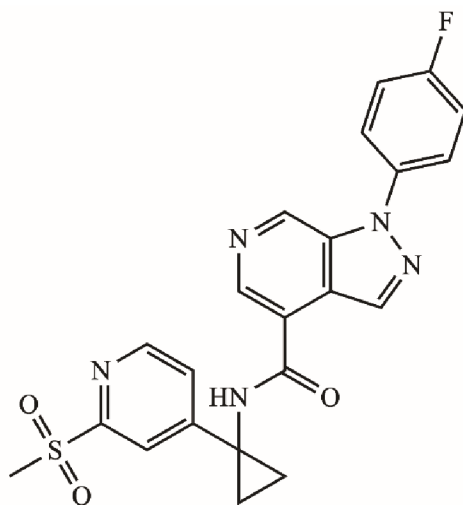
1-(4-fluorophenyl)-N-((2-methylsulfonyl)pyridin-4-yl)methyl)-1H-pyrazolo[3,4-c]pyridine-4-carboxamide



Obr. 8: Strukturální vzorec léčiva BI 638683

b) Vzorek 2 - BI 639667

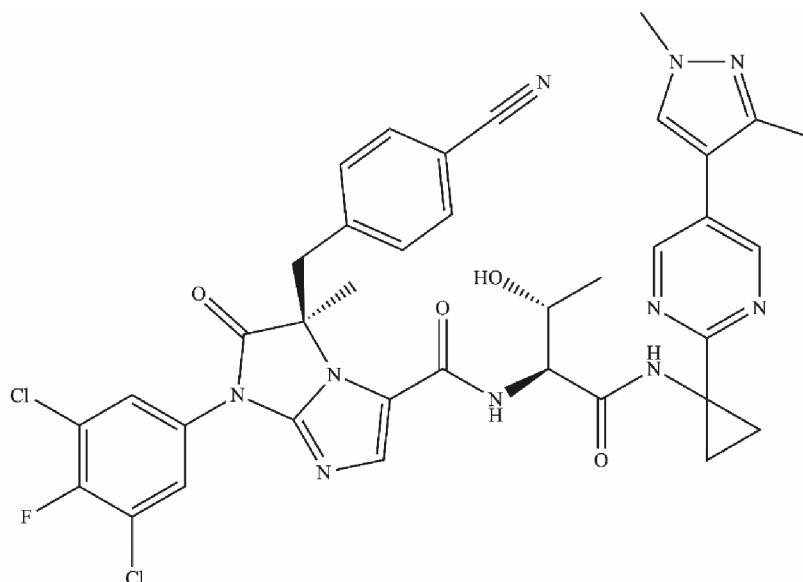
1-(4-fluoro-phenyl)-1H-pyrazolo[3,4-c]pyridine-4-carboxylic acid [1-(2-methanesulfonyl-pyridin-4-yl)cyclopropyl]amide



Obr. 9: Strukturní vzorec léčiva BI 639667

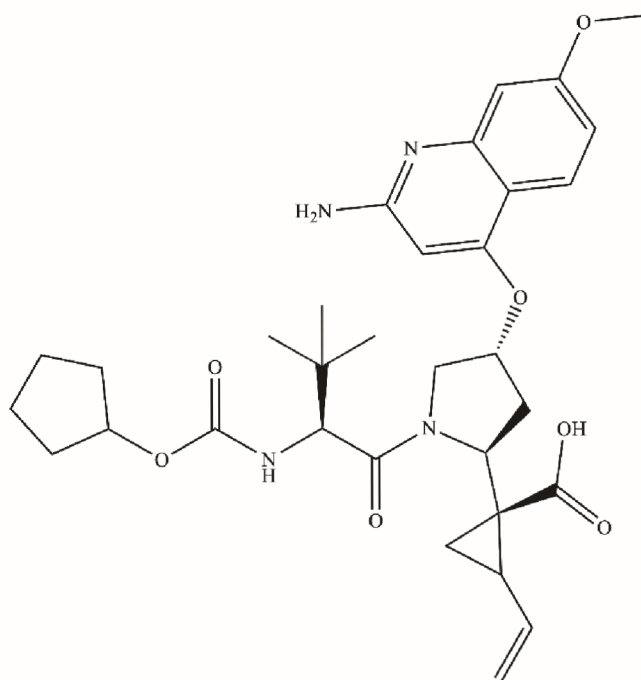
c) Vzorek 3 - BI 666877

(R)-3-(4-cyanobenzyl)-1-(3,5-dichloro-4-fluorophenyl)-N-(2S,3R)-1-((1-(5-(1,3-dimethyl-1H-pyrazol-4-yl)pyrimidin-2-yl)cyclopropyl)amino)-3-hydroxy-1-oxobutan-2-yl)-3-methyl-2-oxo-2,3-dihydro-1H-imidazo[1,2-a]imidazole-5-carboxamide



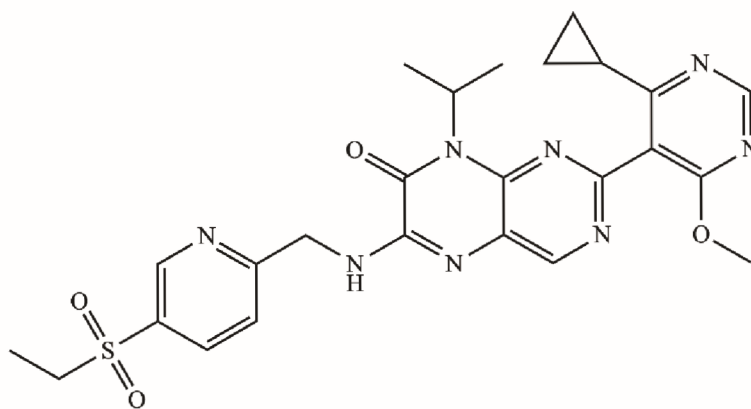
Obr. 10: Strukturní vzorec léčiva BI 666877

- d) Vzorek 4 - BI 201335 (vyřazené léčivo)
 (R)-1-([2S,4R]-4-(2-amino-7-methoxy-quinolin-4-yloxy)-1-((S)-2-cyclopentylloxycarbonylamino-3,3-dimethyl-butyl)-pyrrolidine-2-carbino]-2-vinyl-cyclopropanecarboxylic acid



Obr. 11: Strukturní vzorec léčiva BI 201335

- e) Vzorek 5 - BI 729802
 2-(4-cyclopropyl-6-methoxypyrimidin-5-yl)-6-(((5-(ethylsulfonyl)pyridin-2-yl)methyl)amino)-8-isopropylpteridin-7(8H)-one



Obr. 12: Strukturní vzorec léčiva BI 729802

4.3 Použité přístroje:

- Thermo Scientific Nicolet iS 50 FTIR Spektrometr, od společnosti ThermoFisher Scientific;
- FS5 Fluorescenční spektrometr, od společnosti Edinburgh Instruments;
- Horiba Jobin Yvon Fluorocube fluorescenční spektrometr pro měření časově rozlišené fluorescence, od společnosti HORIBA;
- U-3900H Spectrophotometer;
- Termogravimetrická analýza TGA Q5000 TA instruments;
- Lyofilizátor SP VirTisAdVantage Pro od společnosti ATS;
- Fluorolog HORIBA Jobin Yvon;
- Thermo Scientific TriPlus RSH
- Thermo Scientific TRACE 1310 Gas Chromatograph
- Thermo Scientific ISQ LT Single Quadrupole Mass Spectrometr
- SUPLECO SPME Fiber Assembly vlákna pro HS-SPME

4.4 Použité programy

- OMNIC 9, program pro vyhodnocování spekter z FTIR spektrometru;
- Fluoracle, program pro vyhodnocování dat z fluorescenčního spektrometru;
- Data Station v2.6 program pro získání dat časově rozlišené fluorescence;
- Decay Analysis v6.6 program pro vyhodnocování dat časově rozlišené fluorescence;
- Origin 2019b 64bit;

4.5 Zjištění rozpustnosti vzorků léčiv v *tert*-butylalkoholu

Vzhledem k tomu, že jako vhodné rozpouštědlo pro přípravu nosičových systémů využívajících hydrofobní efekt byl zvolen *tert*-butylalkohol, bylo potřeba ověřit rozpustnost jednotlivých vzorků v tomto rozpouštědle.

Nejprve proto byly připraveny systémy o objemu 10 ml, kde v tomto objemu *tert*-butylalkoholu bylo rozpuštěno přibližně 10 mg jednotlivých léčiv. Vzorky byly ponechány po dobu 48 hodin k promíchání.

Zároveň byly do 50ml odměrných baněk připraveny vzorky obsahující stejnou navážku léčiva, ale kromě 10 ml *tert*-butylalkoholu bylo do těchto systémů navíc přidáno 40 ml deionizované vody. Vznikly tak systémy s 20 obj. % *tert*-butylalkoholu, což je dle předchozích výzkumů vhodná koncentrace korozpouštědla pro přípravu požadovaných nosičových systémů [92].

4.5.1 Vyhodnocení rozpustnosti léčiv v *tert*-butylalkoholu

Při vyhodnocení vzorky 1 a 2 vykazovaly po 48 hodinách v čistém rozpouštědle vznik bílé sraženiny, zatímco zbylé vzorky se rozpustily dokonale. Po dalších 48 hodinách však již došlo k dokonalému rozpuštění.

Zajímavý jev nastal u systémů, kde byl *tert*-butylalkohol použit jako korozpouštědlo. Zde došlo k dokonalému rozpuštění všech vzorků kromě vzorku č. 4. Ten byl tedy ponechán k dalšímu míchání po dobu 72 hodin. Ani po této době však nedošlo k jeho rozpuštění a pro plánovanou

přípravu nosičových systémů tak bylo toto léčivo vyloučeno. Velmi špatná rozpustnost vzorku 4 v systému 20% *tert*-butylalkoholu byla způsobena silnou hydrofobicitou této sloučeniny, což v prostředí s nadbytkem vody vedlo k tvorbě bílé sraženiny.

4.6 Postup přípravy vzorků pro UV/Vis analýzu

Za účelem získání absorpčních spekter byly v chloroformu rozpuštěny jednotlivé vzorky léčiv tak, aby výsledná koncentrace odpovídala $1 \cdot 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Tato koncentrace byla zvolena v návaznosti na dřívější práce zabývající se obdobnými postupy s fluorescenčními sondami.

4.7 Příprava vzorků pro zhotovení kalibračních křivek

Díky získaným absorpčním spektrům byla určena vhodná vlnová délka pro sestavení kalibračních křivek jednotlivých vzorků léčiv. Za tímto účelem tedy byly připraveny 50ml zásobní roztoky léčiv rozpuštěných v chloroformu tak, aby maximální absorbance odpovídala hodnotě 1,5. Po navážení byly roztoky ponechány na magnetické míchačce po dobu 6 hodin pro rozpuštění léčiva. Následně byly rozředěny na kalibrační řadu koncentrací 2; 2,5; 5; 7,5; 8 a 10 hm. %. Vzorky o jednotlivých koncentracích byly pipetovány do vialek, přičemž jednotlivé roztoky byly připraveny v objemu 10 ml. Hmotnosti jednotlivých vzorků, které byly použity pro přípravu zásobních roztoků v 50ml odměrných baňkách jsou uvedeny v Tab. 2.

Tab. 2: Hmotnosti navážených léčiv pro přípravu zásobních roztoků pro sestavení kalibračních křivek.

Číslo vzorku	Hmotnost [mg]
1	5,0
2	5,3
3	3,6
4	3,3
5	2,7

4.8 Příprava vzorků pro získání excitačně-emisních spekter

Ze získaných kalibračních křivek byla vypočtena požadovaná koncentrace jednotlivých vzorků, aby se absorbance pohybovala okolo hodnoty 1,5. Pro změření excitačně-emisních spekter tak byly nejprve připraveny zásobní roztoky do 50ml odměrných baněk obsahující léčiva o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Excitačně emisní spektra byla zhotovena jak z důvodu potřebného potvrzení fluorescence jednotlivých léčiv, tak pro výsledné vyhodnocování úspěšnosti navázání léčiva na nosič. Jakmile byla léčiva dokonale rozpuštěna v chloroformu, došlo k rozředění roztoků do finálních objemů 50 ml dle Tab. 3.

Tab. 3: Objemy napipetovaných zásobních roztoků léčiv.

Číslo vzorku	Objem zásobního roztoku [ml]
1	3,5
2	5,2
3	2,0
5	1,6

4.9 Příprava vzorků pro lyofilizaci

Vzhledem k tomu, že léčivo č. 4 bylo z dalších měření vyloučeno, byly pro lyofilizaci připraveny systémy pouze pro ostatní léčiva. Příprava vzorků pro lyofilizované systémy byla obdobná jako pro předchozí získání excitačně-emisních spekter. V prvním kroku tak byly připraveny zásobní roztoky obsahující léčiva o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ v čistém *tert*-butylalkoholu. Aby došlo k dokonalému rozpuštění léčiv, byly všechny roztoky ponechány k promíchání po dobu 5 dnů na magnetické míchačce. Následně byly do kádinek odebrány objemy shodné s objemy použitými pro získání excitačně-emisních spekter a doplněny *tert*-butylalkoholem na objem 10 ml. Objemy jednotlivých zásobních roztoků jsou uvedeny v Tab. 3.

Zároveň s přípravou zásobních vzorků léčiv byl připraven také zásobní roztok hyaluronanu o střední molekulové hmotnosti 13 kDa. Do kádinky bylo naváženo 2,15 g této sloučeniny, což bylo rozpuštěno ve 400 ml deionizované vody. Uvedená hmotnost byla vypočtena z předem zjištěné vlhkosti použitého hyaluronanu a z požadavku koncentrace $0,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Následně byly vzorky léčiv v 10 ml *tert*-butylalkoholu smíseny s 40 ml zásobního roztoku hyaluronanu, čímž vznikly systémy obsahující *tert*-butylalkohol jako 20 obj. % korozpouštědlo. Výsledná koncentrace hyaluronanu tak byla $0,4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Všechny vzorky byly připraveny ve dvou sériích, a navíc byl pro lyofilizaci připraven jeden slepý vzorek obsahující pouze 50 ml roztoku hyaluronanu o stejné koncentraci jako v předchozím případě.

4.10 Příprava vzorků pro fluorescenční spektrometrii

4.10.1 Rozpuštění lyofilizovaných systémů

Vzorky pro tento typ analýzy byly připraveny rozpuštěním lyofilizátů v 10 ml vody tak, aby výsledná koncentrace hyaluronanu v roztoku odpovídala 0,5 hm. %. Jednotlivé vzorky byly rozpuštěny ve vialkách. Připravené roztoky byly následně použity pro steady-state fluorescenční spektrometrii a časově rozlišenou fluorescenční spektrometrii.

4.10.2 Rozpuštění vzorků léčiv ve vodě

Pro porovnání doby fluorescence jednotlivých léčiv v různých prostředích byly připraveny vzorky obsahující rozpuštěná léčiva. Cílem bylo připravit roztoky koncentračně co nejbližší koncentraci léčiv v jednotlivých lyofilizátech. Vzhledem k tomu, že jsou však všechna zkoumaná léčiva hydrofobní, do vody z původní navážky směřující ke koncentraci zásobního roztoku $1 \cdot 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ přešla jen malá část léčiva. Aby se do vody uvolnilo co největší možné množství, byly vzorky ponechány 4 dny na magnetické míchačce. Po uplynutí tohoto času byly přefiltrovány a rozředěny dle Tab. 3.

4.11 Příprava vzorků pro mikroextrakci na pevné fázi

Za účelem detekce residuálního *tert*-butylalkoholu v lyofilizátech bylo naváženo přibližně 10 mg lyofilizovaných vzorků do jednotlivých vialek. Ty byly následně doplněny 20 ml vody. Po rehydrataci lyofilizátu byly 4 ml takto připravených roztoků napipetovány do vialek o objemu 10 ml. Do systémů byl následně přidán 1 g NaCl p.a., což odpovídalo těsné hranici přesycení roztoku za účelem podpoření přestupu analytu do plynné fáze. Vialky následně byly uzavřeny víčkem s teflonovým septem.

4.12 Postup měření

4.12.1 UV/Vis analýza a nastavení pro zhotovení kalibračních křivek

Pro změření absorpčních spekter jednotlivých vzorků v chloroformu byl na přístroji U-3900 H Spectrophotometer nastaven mód absorbance, vlnová délka v rozmezí 240-700 nm s rychlostí skenu $600 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ a šířkou štěrbinu 2 nm.

Pro zhotovení kalibračních křivek byly pro jednotlivé vzorky nastaveny vlnové délky, které odpovídaly lokálnímu maximu absorbance z předešlého měření absorpčních spekter jednotlivých vzorků. Na přístroji byla následně odečtena absorbance při dané vlnové délce. Měření každého bodu kalibrační křivky probíhalo ve třech sériích. Vlnové délky, při nichž byly jednotlivé absorbance pro body kalibrační křivky měřeny, jsou uvedeny v Tab. 4.

Tab. 4: Vlnové délky nastavené pro změření absorpance jednotlivých vzorků pro sestavení kalibrační křivky.

Číslo vzorku	Vlnová délka záření [nm]
1	331
2	332
3	260
4	277
5	330

4.12.2 Excitačně-emisní spektra

Přístroj Fluorog od společnosti HORIBA byla zvolen pro získání 3D spekter dávajících do vzájemného vztahu excitaci, emisi a jejich intenzitu. Pro redukci šumu pramenící z Ryaleigho rozptylu bylo v nastavení povoleno maskování prvního řádu. Integrační čas byl nastaven na 0,1 s. Excitační spektrum se pohybovalo v rozmezí hodnot vlnové délky 245-400 nm, s inkrementem 5,0 nm. Emise byla měřena v rozmezí 300-600 nm s inkrementem 5,0 nm. Vzorky 1 a 2 byly měřeny při velikosti štěrbin (excitace i emise) 1,0 nm, vzorek 5 byl měřen při velikosti štěrbin 2,0 nm a v případě vzorku 3, který vykazoval nižší odezvu, byla šířka štěrbin emise zvýšena na 4,0 nm.

4.12.3 Lyofilizace

Do lyofilizátoru byly na rošt postaveny kádinky obsahující vzorky hyaluronanu s léčivý a hyaluronanu samotného. Tyto kádinky obsahovaly 50 ml roztoků s 13 kDa hyaluronanem o koncentraci $0,4 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Všechny kádinky byly překryty parafilmem, do kterého byly perforovány v dostatečném množství malé otvory podporující sušení. Lyofilizátor byl uzavřen a nastaven dle Tab. 5 a Tab. 6.

Ve zmíněných tabulkách T představuje teplotu uvnitř komory lyofilizátoru, rampa odpovídá času během kterého se má teplota změnit na teplotu zadanou a sloupec Držet představuje dobu, po kterou setrvává nastavená teplota v lyofilizátoru. Ve druhé části se dále přidává nastavení tlaku v lyofilizační komoře – odsátím vzduchu dochází k tvorbě vakua.

Tab. 5 Nastavení lyofilizátoru pro první část procesu lyofilizace – mražení.

Krok	T [°C]	Rampa [min]	Držet [min]	Krok	T [°C]	Rampa [min]	Držet [min]
1	2	60	30	6	-15	30	300
2	0	15	30	7	–	–	–
3	-5	30	15	8	–	–	–
4	-10	30	60	9	–	–	–
5	-12	30	180	10	–	–	–

Tab. 6 nastavení lyofilizátoru pro druhou část procesu lyofilizace za vakua (primární a sekundární sušení).

Krok	T [°C]	Rampa [min]	Držet [min]	Vakuum [mTorr]	Krok	T [°C]	Rampa [min]	Držet [min]	Vakuum [mTorr]
1	-15	10	300	100	7	-5	60	600	300
2	-14	10	300	120	8	-2	60	600	400
3	-13	10	300	140	9	0	30	600	500
4	-12	10	300	160	10	5	60	300	600
5	-11	10	300	180	11	15	60	300	700
6	-10	10	300	200	12	25	120	450	800

4.12.4 Nastavení přístroje pro zjištění teplotní stability vzorků

Za účelem zjištění teplotní stability lyofilizovaných vzorků a pro porovnání, jak velké množství vody je ve struktuře vázáno, byly vzorky podrobeny termogravimetrické analýze. Ta spočívala v nanesení vzorku na platinovou pánvičku, umístění pánvičky do pece analyzátoru a postupném zahřívání vzorku v inertní dusíkové atmosféře na finální teplotu 200 °C s krokem 5 °C · min⁻¹.

4.12.5 Nastavení přístroje pro steady-state fluorescenční spektrometrii

Technika ustálené fluorescenční spektrometrie byla především použita pro potvrzení fluorescence léčiv ve vodném prostředí. Protože při zisku excitačně-emisních spekter byl coby

rozpouštědlo použít chloroform, měla tato metoda pomoci popsat chování léčiv a lyofilizovaných systémů ve vodném prostředí.

Přístroj FS5 Edinburgh byl nastaven pro emisní sken v rozmezí vlnových délek 370-600 nm. Vlnové délky excitačního zdroje se měnily dle potřeb pro jednotlivé vzorky a jsou uvedena v Tab. 7. Vlnové délky uvedené v této tabulce vycházejí z lokálních emisních maxim získaných z excitačně-emisních spekter měřených v chloroformu.

Šířka štěrbin pro excitační paprsek byla pro lyofilizované systémy nastavena na hodnotu 3,0 nm, pro samotná léčiva ve vodě 4,0 nm. Na stejné rozměry byla také nastavena štěrbina pro emisi. K měření byla použita coby zdroj záření použita xenonová lampa.

Tab. 7: Excitační vlnové délky pro jednotlivé vzorky.

Číslo vzorku	Excitační vlnové délky [nm]	
1	250	330
2	250	330
3	250	270
5	330	

4.12.6 Nastavení přístroje pro časově rozlišenou fluorescenční spektrometrii

Časově rozlišená fluorescence na přístroji Horiba Jobin Yvon Fluorocube byla měřena TCSPC technikou, která je založena na předpokladu, že časová distribuce jednoho elektronu spadá do pravděpodobnostního zastoupení časů všech emitovaných elektronů. Jinými slovy, že je možno rozdělit časy jednotlivých elektronů od pulzu vydaného ze zdroje záření po návrat do základní elektronové hladiny dle statického zastoupení všech emitovaných elektronů. V praxi je výstupem této metody histogram, který dává do závislosti počet elektronů na čase. Tento počet je zároveň přímo úměrný intenzitě fluorescence [97]. V této práci byl přístroj použit pro změření doby života jednotlivých léčiv v závislosti na měnícím se prostředí.

V prvním kroku byla pro daný vzorek vybrána správná dioda dle potřebné vlnové délky pro efektivní excitaci. Následně byl změřen prompt právě při této vlnové délce. Měření promptu je důležité pro každé měření, protože výsledná křivka udává nejkratší možný čas dohasínání, který je přístroj schopen detekovat. Následně byl přístroj nastaven na 2048 kanálů (počet bloků, na které dle času rozděluje jednotlivé elektrony), s maximálním počtem zaznamenaných fotonů 10 000 (v případě vodného vzorku 3 byla tato hodnota snížena na 5 000). Následně byla do přístroje vložena kyveta s vodným roztokem rozpuštěného lyofilizátu nebo volným léčivem ve vodě. Nastavení přístroje pro jednotlivé vzorky je uvedeno v Tab. 8.

Analýza dat probíhala pomocí softwaru Decay Analysis v6.6, kde byly jednotlivé rozpadové řady fitovány a hodnoceny dle reziduí a hodnoty χ^2 , která vyjadřuje, jak dobře proložená data odpovídají pravděpodobnostnímu rozložení.

Tab. 8: Nastavení přístroje pro měření časově rozlišené fluorescence.

		šterbina	Emise [nm]	TAC [ns]	f [MHz]	Dioda [nm]	Delay [ns]	Počet fotonů
Vzorek 1	A	12	480	50	1	329	10	10 000
	B	12	480	50	1	329	10	10 000
	Léčivo	16	480	50	1	329	10	10 000
Vzorek 2	A	12	480	50	1	329	10	10 000
	B	12	480	50	1	329	10	10 000
	Léčivo	16	480	50	1	329	10	10 000
Vzorek 3	A	32	400	50	1	281	10	10 000
	B	32	400	50	1	281	10	10 000
	Léčivo	32	400	50	1	281	10	5 000
Vzorek 5	A	16	390	50	1	329	10	10 000
	B	16	390	50	1	329	10	10 000
	Léčivo	16	390	50	1	329	10	10 000

4.12.7 Nastavení FTIR-ATR

Pro získání informací o získaných léčivech byla využita metoda infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací na ATR krystalu. Tato technika spočívá v nanesení vzorku na krystal, ke kterému je pomocí zrcadel přiveden paprsek záření s vlnovou délkou nejčastěji se vyskytující ve střední oblasti infračerveného záření (4000-400 cm^{-1}). Na rozhraní krystalu

a vzorku dochází k úplnému odrazu paprsku, přičemž odražený paprsek je oslaben o část spektra absorbovaného látkou. Výstupem je spektrum získané aplikací Fourierovy transformace na získaná data. Z výsledného spektra je možno vyčíst, jaké funkční skupiny jsou ve vzorku zastoupeny. Dle změn intenzity a posunů je také možno charakterizovat strukturní změny vzorku nebo vliv změny prostředí na daný vzorek [98].

Analýza na ATR diamantovém krystalu probíhala v rozmezí vlnočtu 4000-400 cm^{-1} při rozlišení 4 cm^{-1} a s celkovým počtem skenů nastaveným na hodnotě 64. Před měřením bylo v prvním kroku změřeno spektrum čistého diamantového krystalu, které sloužilo jako background pro jednotlivá měření. Aby došlo k rovnoměrnému a úplnému pokrytí krystalu, byl každý vzorek na krystal pevně přitlačen raménkem, které je součástí přístroje.

Obdobné nastavení přístroje bylo také provedeno pro vyhodnocení lyofilizovaných vzorků, hyaluronanu po lyofilizaci a nativního hyaluronanu. Při zpracování dat, však byla pozornost věnována charakteristickým absorpčním pásům v rozmezí vlnočtů 1200-900 cm^{-1} tzn. v oblasti otisku prstu.

4.13 Nastavení přístrojů pro stanovení residuálního *terc*-butylalkoholu

Pro analýzu residuálního *terc*-butylalkoholu, tedy použitého ko-rozpouštědla pro přípravu lyofilizovaných systémů, byl využit tandem několika technik, konkrétně již zmíněné head-space mikroextrakce na pevné fázi, na kterou navázala separační technika v podobě plynové chromatografie a celé měření bylo zakončeno hmotnostní spektrometrií.

4.13.1 Mikroextrakce

Pro detekci residuálního rozpouštědla byla zvolena metoda mikroextrakce na pevné fázi s využitím head-space technologie. Tuto metodu je možno v literatuře najít pod zkratkou HS-SPM z anglického head-space solid phase mikroextraction. Jedná se o poměrně přesnou analytickou metodu využívající adsorpce a následně termálně řízené desorpce analytu. Ten se v prvním kroku adsorbuje na porézní vlákno pokryté polymerem, který je volen dle charakteristiky analytu. Pro toto měření byl zvolen kompozitní povrch složený z DVB (*divinylbenzen*), CAR (*carboxen*) a PDMS (*polydimethylsiloxyn*). Ve druhém kroku dochází k desorpci a jeho analýze pomocí vhodné analytické metody, kterou se v tomto výzkumu stala plynová chromatografie v tandemu s hmotnostní spektrometrií.

Nastavení parametrů, které bylo použito pro tuto práci, je uvedeno v Tab. 9.

Tab. 9: Složení použitého vlákna a nastavené parametry pro mikroextrakci na pevné fázi.

Typ vlákna:	DVB/CAR/PDMS 50/30 μm
Inkubace:	20 min při 40 $^{\circ}\text{C}$
Extrakce:	30 min při 40 $^{\circ}\text{C}$
Rychlost míchání:	500 $\text{ot} \cdot \text{min}^{-1}$

Vlákno bylo pomocí autosampleru vsunuto skrze teflonové septum do vialky tak, aby nedošlo ke kontaktu mezi roztokem a vzorkem. Bylo tak využito těkavosti analytu, který byl odebírán z prostoru nad roztokem.

4.13.2 Plynová chromatografie

Vlákno bylo překryto, vysunuto z vialky a přemístěno do injektoru plynového chromatografu. Zde bylo ponecháno k desorpci analytu. Chromatograf pracoval v režimu splitless, nosným plynem bylo helium s konstantním průtokem $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Protože desorpce byla řízena termicky, byla teplota zvednuta na hodnotu $230 \text{ }^\circ\text{C}$, k čemuž došlo postupným zvyšováním z $40 \text{ }^\circ\text{C}$ s krokem $10 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ do dosažení $100 \text{ }^\circ\text{C}$ a následně s krokem $25 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$. Celková doba chromatografie byla nastavena na 10 min. Na chromatografii byla použita kolona TG-WAXMS ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,5 \text{ } \mu\text{m}$) od společnosti Thermo Scientific.

4.13.3 Hmotnostní spektrometrie

Na chromatografii navázala hmotnostní spektrometrie, v níž byl coby detektor použit kvadrupól. Hmotnostní analýza probíhala na základě poměru hmotnosti a náboje, přičemž *tert*-butylalkoholu odpovídala hodnota m/z 59. Teplota transferové linie byla nastavena na $200 \text{ }^\circ\text{C}$ a na tutéž teplotu byl nastaven také iontový zdroj. Snímání probíhalo v režimu SCAN v nastavení 300 scanů za minutu. Výsledné vyhodnocení probíhalo pomocí NIST knihovny spekter.

5 VYHODNOCENÍ A DISKUZE

5.1 Informace o léčivech

Prvním krokem na pomezí teoretické a praktické části bylo sestavení strukturních vzorců získaných léčiv. Vzorce byly nakresleny pomocí programu ChemDraw 22.2.0. Díky znalosti struktury tak mohlo být odhadnuto, jaké výsledky je možno očekávat například v případě jejich absorpčních spekter při infračervené spektroskopii.

Z pohledu čistě informativního byla jednotlivá léčiva také charakterizována ve smyslu svého účinku v organismu. Vzorek 1 je antagonistou receptoru CCR1, který reguluje migraci monocytů a makrofágů do kostí a kloubů. Potlačení této funkce dochází ke snížení zásobování těchto míst monocyty a cytokiny, čímž může být zamezeno běžným projevům revmatoidní artritidy [99].

Stejnou funkci nese také vzorek 2. Navázáním na CCR1 receptor, který se řadí mezi receptory s vázanými G-proteiny (viz. Oddíl 2.9.3) dochází k allosterické blokaci receptoru, čímž jsou pozastaveny pro-zánětlivé buněčné procesy. V nepřítomnosti antagonisty (léčiva) vede navázání specifických chemokinů na CCR1 receptor imunitní buňky k projevům již zmíněné revmatoidní artritidy a sklerózy multiplex [100].

Vzorek 3 je modifikací vývojově staršího léčiva BI-1950, které má za úkol inhibovat navázání LFA-1 (z angl. *Lymphocyte function-associated antigen*) na ICAM 1 (z angl. *Intercellular adhesion molecule*). LFA-1 se řadí mezi integriny, tedy proteiny zabezpečující kontakt a přenos informací mezi dvěma buňkami nebo buňkou. Vyskytuje se na buňkách kostní dřeně, T a B-lymfocytech, monocytech a granulocytech. ICAM 1 spadá do skupiny intravenózních imunoglobulinů a k jeho zvýšené expresi na buněčném povrchu dochází především v případě zánětu. Přítomnost ICAM 1 vede k interakci s LFA-1 antigeny buněk, které jsou schopny regulovat zánětlivé procesy [101]. Inhibice této interakce pomocí zkoumaného léčiva je využívána především pro studium funkce integrinů a farmakologické hypotézy v širším kontextu [102].

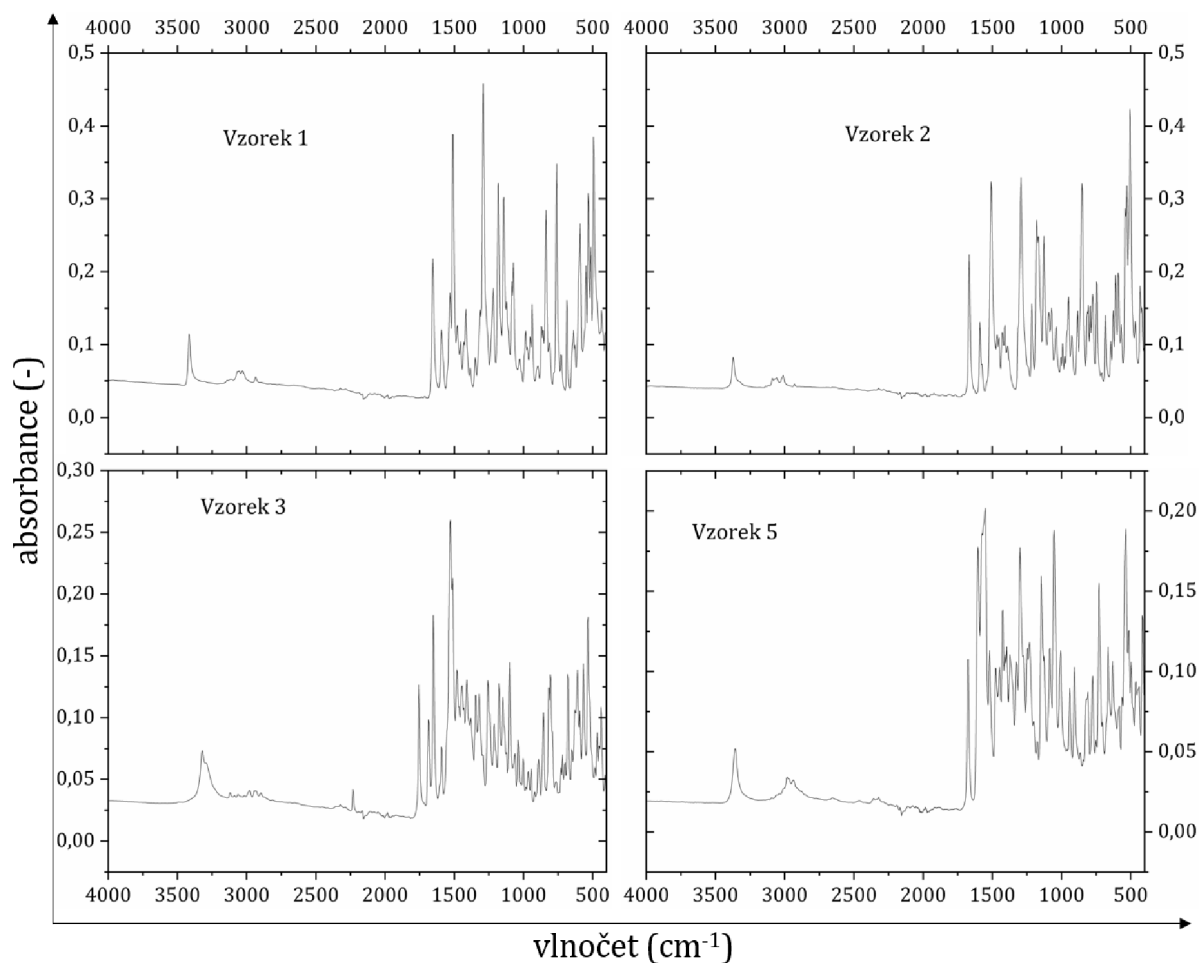
Vzorek 4 dostal název faldaprevir a jedná se o inhibitor proteázy žloutenky typu C – díky inhibici tohoto enzymu nemůže docházet k reprodukci viru. Jde o léčivo řazené do nové generace léčiv bojujících s tímto typem hepatitidy. Toto léčivo společnosti Boehringer-Ingelheim se však dostalo pouze do třetí fáze testování, protože došlo k projevům toxicity v kardiovaskulárním systému [103].

Vzorek 5 má stejné vlastnosti jako vzorky 1 a 2, tedy jedná se o antagonistu receptoru CCR1 [104]. Informace o tomto léčivu jsou však získány pouze z patentu chránícího jeho syntézu. Farmakokinetické a farmakodynamické účinky nebyly nalezeny, proto na tomto místě není možno uvést, pro jaké konkrétní onemocnění je lék určen.

5.2 Steady-state infračervená spektroskopie vzorků léčiv

Na prvním místě je potřeba uvést a objasnit výsledky infračervené spektrometrické analýzy s Fourierovou transformací, která vedla ke zjištění, že zkoumané vzorky tak jak jsou označeny neodpovídají dokumentaci, kterou společně s nimi výrobce zaslal.

ATR-FTIR analýza jednotlivých léčiv potvrdila, že zasláné vzorce v tom pořadí, v jakém byly získány, neodpovídají číslu označení vzorku, proto právě díky této analýze byl číslu vzorku přiřazen také jeho strukturální vzorec.



Obr. 13: Normalizovaná FTIR-ATR spektra jednotlivých vzorků.

Jak je zřejmé z Obr. 13 přestože se jedná o různé chemické sloučeniny, v jejich spektrech najdeme i jisté podobnosti. Jednotlivé projevy charakteristických vibrací vazeb společných pro daná léčiva shrnuje Tab. 10. Pomocí křížků je znázorněna relativní intenzita daného absorpčního pásu, ve smyslu čím více křížků, tím je absorpční pás výraznější.

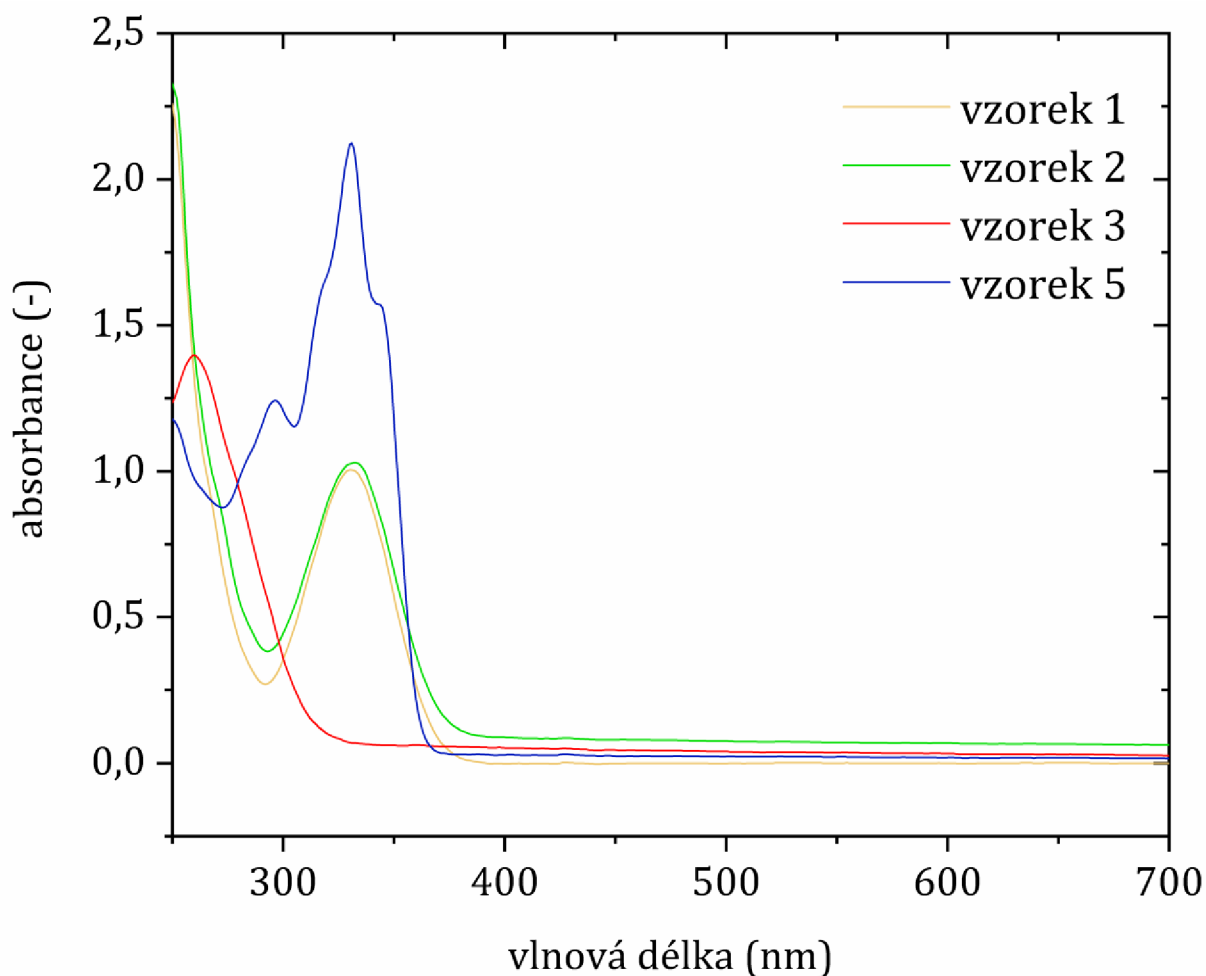
Tab. 10: Charakteristické absorpční pásy společné pro všechny vzorky s hodnocení relativní výšky těchto pásů.

Typ skupiny	Vlnočet [cm^{-1}]	Charakterizace	Číslo vzorku			
			1	2	3	5
N-H	3300	Symetrická u vibrace sekundárního aminu	xx	x	xx	xx
C-H	3100-3030	Aromáty	x	x		x
C=O	1680-1630	Symetrická u vibrace amidu	xxx	xxx	xx	xxx
C=C	1590-1560	Aromatický kruh	xx	xx	xx	
C-C	1500	Aromatický kruh	xx	xx	xxxx	xxxx
C=O nebo S=O	1415	Karboxylát nebo sulfonyl	xx	xx		xxx
C-N-C	1300	Asymetrická u vibrace	xxx	xxx	xx	xxx

Zatímco struktury vzorků 1, 2 a 4 bylo možno přiřadit pomocí BI čísla, u vzorků 3 a 5 byla situace komplikovanější z důvodu nemožnosti nalezení těchto BI čísel v databázi. Z uvedených IČ spekter však jasně vyplývá, že vzorek 3 odpovídá BI 666877. Prvním důkazem je úzký, ale zřetelný absorpční pás v oblasti 2230 cm^{-1} , který je projevem valenční vibrace $\text{C}\equiv\text{N}$ skupiny. Dále jako jediný ve svém spektru neobsahuje absorpční pás v oblasti 1415 cm^{-1} , který je charakteristický pro vibrace $\text{C}=\text{O}$ nebo $\text{S}=\text{O}$ skupiny v karboxylátu nebo sulfonylu. Ze strukturního vzorce je zřejmé, že ani jednu z těchto skupin daný vzorek neobsahuje, zatímco vzorek 5 ano, což se ostatně také projevuje charakteristickým absorpčním pásem v jeho spektru.

5.3 UV/Vis spektra vzorků léčiv

Pomocí UV/Vis analýzy byla získána spektra jednotlivých vzorků, díky nimž bylo možné vybrat vhodnou vlnovou délku pro následné sestavení kalibračních křivek jednotlivých vzorků. Jak je zřejmé z Obr. 14, vzorky 1 a 2 mají téměř shodné absorpční spektrum s lokálním maximem v rozmezí 331-333 nm. Totožná vlnová délka odpovídá také vzorku 5, který však svou intenzitou v tomto místě značně převyšuje intenzitu prvních dvou vzorků. V případě vzorku 3 se lokální maximum nachází na samotném okraji zvoleného rozmezí vlnových délek, avšak pro další využití získaných dat je získ tohoto maxima užitečný.



Obr. 14 Normalizovaná absorpční spektra jednotlivých vzorků.

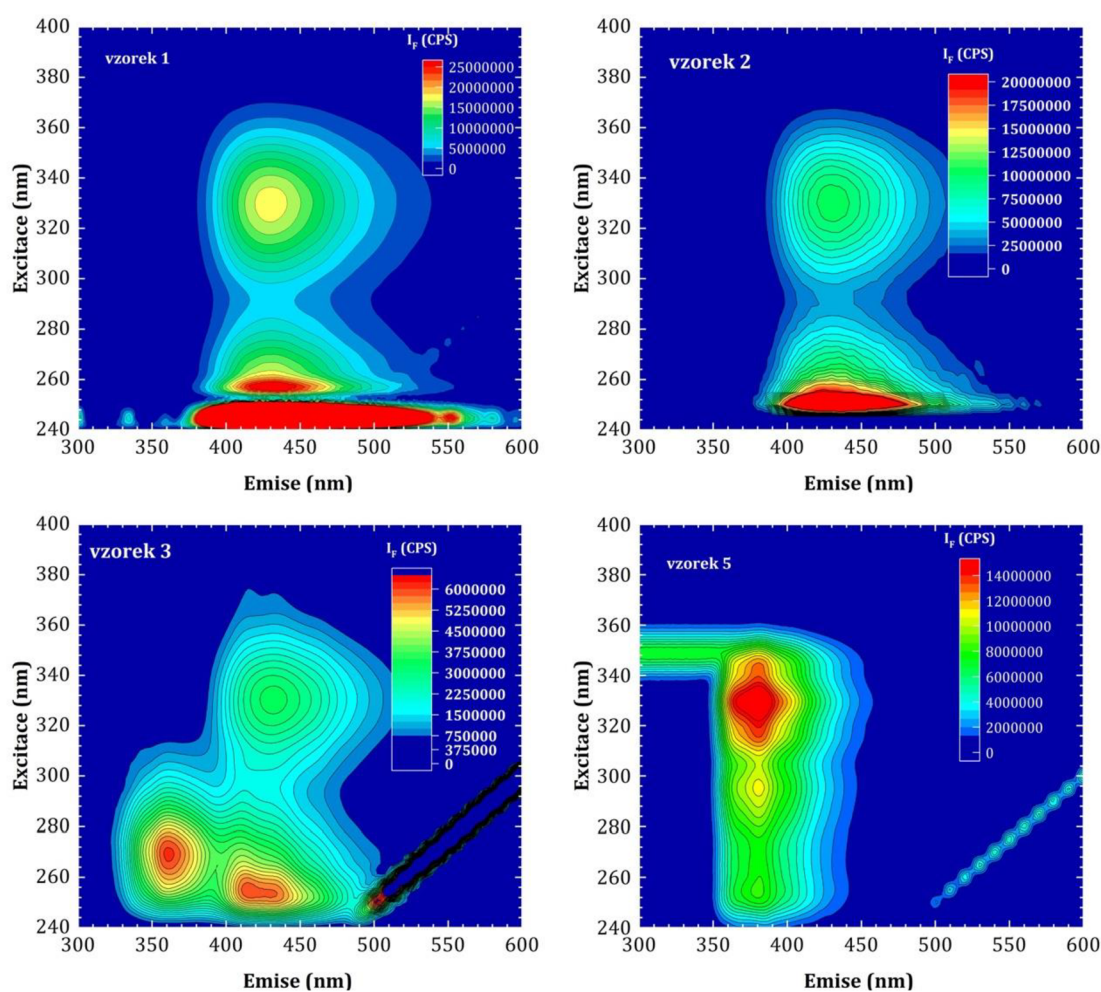
Vzhledem k poměrně vysokým hodnotám absorbance byly pro sestavení kalibračních křivek sníženy koncentrace léčiv tak, aby nejvyšší absorbance ideálně nepřesahovala hodnotu 1,5. Na tomto místě je nutno říci, že vzorek 3 už při sestavování absorpčního spektra uvedeného na Obr. 14 byl připraven navážením pouze polovičního množství oproti vzorkům ostatním, protože při prvním přeměření vykazoval příliš vysoké hodnoty absorbance.

Pro sestavení kalibračních křivek tak byly proměřeny absorbance jednotlivých rozředěných roztoků, přičemž nejvyšší koncentrace odpovídala 10 hm. % a nejnižší 2 hm. %. I přes předchozí výpočty nedošlo u všech vzorků k dokonalému dodržení snahy nepřekročit hodnotu absorbance 1,5 a u vzorků 1 a 5 ji tak bod o nejvyšší koncentraci v rámci kalibrační řady překročil. Pro další měření tak byly ze získaných kalibračních křivek striktně použity takové koncentrace, které se překročení této hodnoty vyhýbaly, čímž bylo docíleno předpokladu pro relevanci výsledků s ohledem na Lambert-Beerův zákon a jeho koncentrační závislost.

5.4 Excitačně-emisní spektra

Excitačně-emisní spektra byla získána pomocí přístroje Fluorolog a potvrdila tak předpokládanou fluorescenci všech vzorků. Pro přehlednost bylo zvoleno sestavení právě 3D spekter, která dovolují prozkoumat emisi v závislosti na excitaci v celé šířce předem zjištěného absorpčního spektra a je tak možno dojít k výběru vhodné vlnové délky resp. vhodných vlnových délek pro finální hodnocení lyofilizovaných systémů.

V excitačně-emisních spektrech (Obr. 15) jsou zřetelné pásy odpovídající Ryleigho rozptylu. Pro lepší vizualizaci byl tento rozptyl softwarem potlačen a byla tak podpořena viditelnost spekter jednotlivých léčiv.



Obr. 15 Excitačně-emisní spektra jednotlivých vzorků.

I v tomto případě se opakoval fenomén sledovaný již při měření čistě absorpčního spektra, a sice že vzorky 1 a 2 vykazovaly podobné vlastnosti. V obou případech se excitační maximum nachází v oblasti hodnoty 250 nm, s výrazným zvýšením intenzity v oblasti 330 nm. Velmi zajímavým se ukázalo excitačně-emisní spektrum vzorku 3, které vykazuje dvě emisní maxima blízko sebe – tento jev může být zapříčiněn jak složitostí organické molekuly, tak například možností přenosu náboje v průběhu fluorescence, jak je tomu v případě strukturně složitých molekul léčiv.

Vzorek 5 má své lokální maximum ve vyšších vlnových délkách oproti ostatním vzorkům – jedná se přibližně o hodnotu 330 nm, což přibližně odpovídá výrazně intenzivním pikům vzorků 1 a 2. Ve zmíněném spektru vidíme také výrazný výřez mezi excitačními vlnovými délkami 240-336 nm a emisními vlnovými délkami 300-350 nm, který je způsoben snahou přístroje krýt rozptyl ve prospěch získání informací o fluorescenci molekul.

Získaná excitačně-emisní spektra potvrdila předpoklad fluorescence jednotlivých léčiv a napomohla k výběru vlnových délek excitačních zdrojů (diod) pro časově rozlišenou fluorescenci. Jak je zřejmé z předchozího odstavce, v rámci svých emisních maxim se všechny vzorky pohybují kolem blízkých hodnot excitační vlnových délek, kterými jsou 250, 270 nebo 330 nm, čímž se zúžil výběr zdrojů pro časově rozlišenou fluorescenční spektroskopii na pouhé tři vlnové délky.

5.5 Lyofilizace

Po všech analýzách zabývajících se prací s léčivy jako takovými bylo přistoupeno k samotné lyofilizaci a vyhodnocení jednotlivých lyofilizátů. Jak je již čistě z vizuálního hlediska patrné (Obr. 16), po vytažení vzorků z lyofilizátoru a sundání parafilmu bylo možno pozorovat výrazný rozdíl mezi strukturou čistého lyofilizovaného hyaluronanu a hyaluronanu obsahujícího léčiva. Zatímco čistý hyaluronan vytvářel pórovitou, poměrně vysokou, uniformní, vatovitou vrstvu, nosiče obsahující léčiva vykazovala propad lyofilizačního koláče ve svém středu se sníženou snahou držet ve formě jednoho kusu. Na tomto místě je potřeba podotknout, že koncentrace léčiv ve výsledném koláči se pohybovala v řádech desetin mg a přesto dokázala takto výrazně pozměnit strukturu výsledného lyofilizátu.



Obr. 16 Čistý hyaluronan po lyofilizaci (vlevo), lyofilizovaný systém hyaluronan s navázaným vzorkem 1 (vpravo).

5.6 Teplotní stabilita jednotlivých vzorků

Pomocí termogravimetrické analýzy byly získány hodnoty teplot, při nichž dochází k tepelné degradaci vzorku a procentuální zastoupení vody ve vzorcích. Získaná data jsou uvedena v Tab. 11.

Tab. 11 Získané hodnoty průměrných teplot rozkladu a průměrné vlhkosti lyofilizovaných systémů.

Vzorek	Průměrná teplota rozkladu [°C]	Průměrná vlhkost
1	147,83	13,47 %
2	146	15,11 %
3	138,68	13,27 %
5	145,42	13,03 %
HYA	140,22	13,57 %

Jak je z hodnot zřejmé, nedochází z hlediska termogravimetrické analýzy k výskytu výraznějšího trendu. Předpokladu, že nejvyšší množství vody bude poutat čistý hyaluronan, odporuje průměrná hodnota vlhkosti vzorku 2, která hodnotu stanovenou pro hyaluronan značně převyšuje. Vysvětlením tohoto jevu by mohla být domněnka, že při manipulaci s tímto vzorkem došlo k absorpci vzdušné vlhkosti, která vedla ke zkreslení dat. I přes toto vysvětlení je však nutno konstatovat, že druhá nejbližší hodnota průměrné vlhkosti patří vzorku 1 a oproti čistému hyaluronanu se liší pouze o 0,1 %, což není hodnota prokazatelně charakterizující rozdílné vlastnosti těchto dvou systémů.

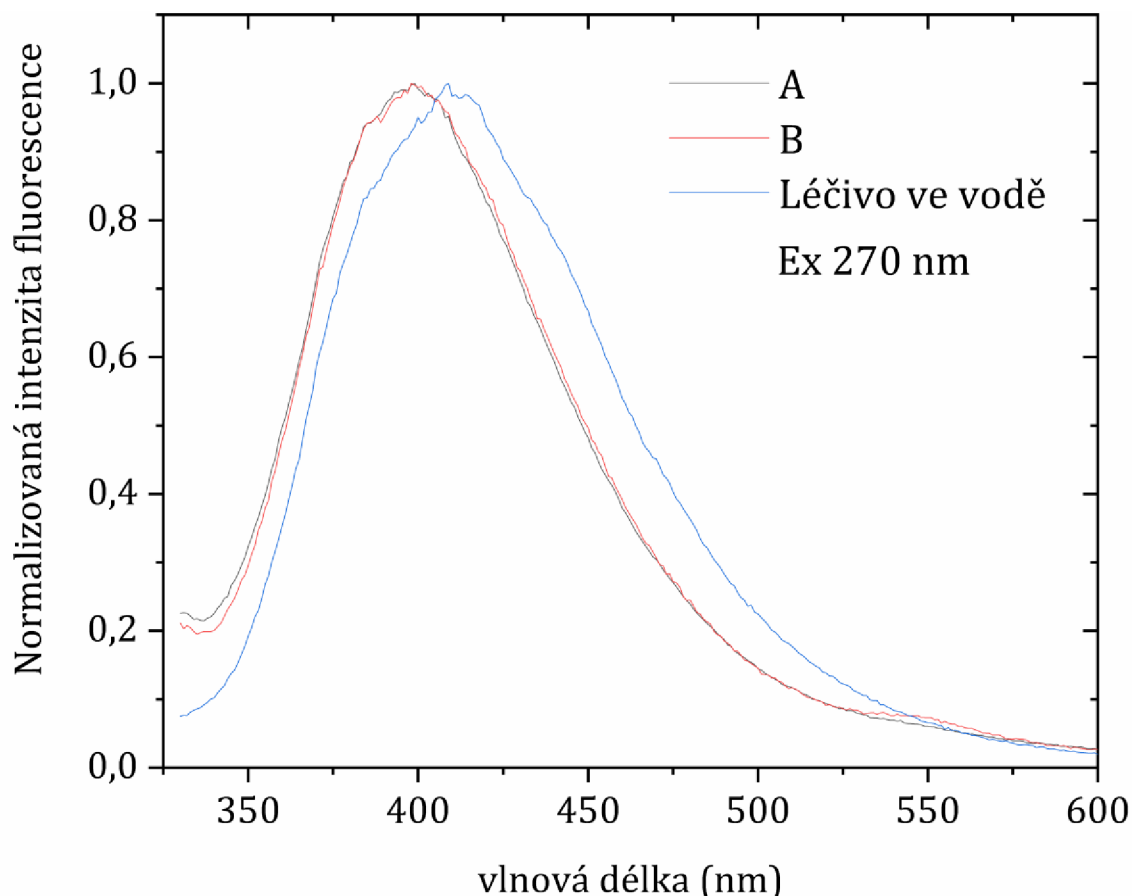
Zajímavým se stal rozdíl teplot u vzorku 3, které se mezi sérií A a sérií B lišily o 16 °C. U ostatních vzorků se rozdíl pohyboval mezi 5–8 °C. Možnost, že by k tomuto rozdílu na základě chyby při přípravě jednoho ze vzorků, je nepravděpodobná vzhledem k výsledkům infračervené spektrometrie (viz. Oddíl 5.9). Že je mezi oběma vzorky rozdíl, který se neprojevil při steady-state infračervené spektrometrii, je zřetelné z časově rozlišené fluorescence (viz. Oddíl 5.8) a termogravimetrické analýzy. Pravděpodobně je spojen s efektem léčiva na konformaci celého polymerního klubka, který je různý vzhledem k nahodilosti stočení polymerního řetězce.

Termogravimetrická analýza, při tomto nastavení měření (na základě výše uvedeného vyhodnocení) tedy sama o sobě není vhodnou metodou pro charakterizaci studovaných systémů. Jako metoda doplňující však své využití jistě má.

5.7 Steady-state fluorescenční spektrometrie

Jak již bylo zmíněno dříve, ustálená fluorescence byla původně měřena pouze pro potvrzení si, že vzorky intenzivně fluoreskují i v polárním (vodném) prostředí. Výsledky této metody však jsou natolik zajímavé, že je vhodné zde uvést a okomentovat.

V prvním kroku bylo potvrzeno, že všechny vzorky jak lyofilizované, tak samostatně rozpuštěné, ve vodě fluoreskují a navržená metoda časově rozlišené fluorescence pro vyhodnocení efektivity hydrofobního efektu při přípravě lyofilizovaného nosičového systému na bázi hyaluronanu je teoreticky možná.

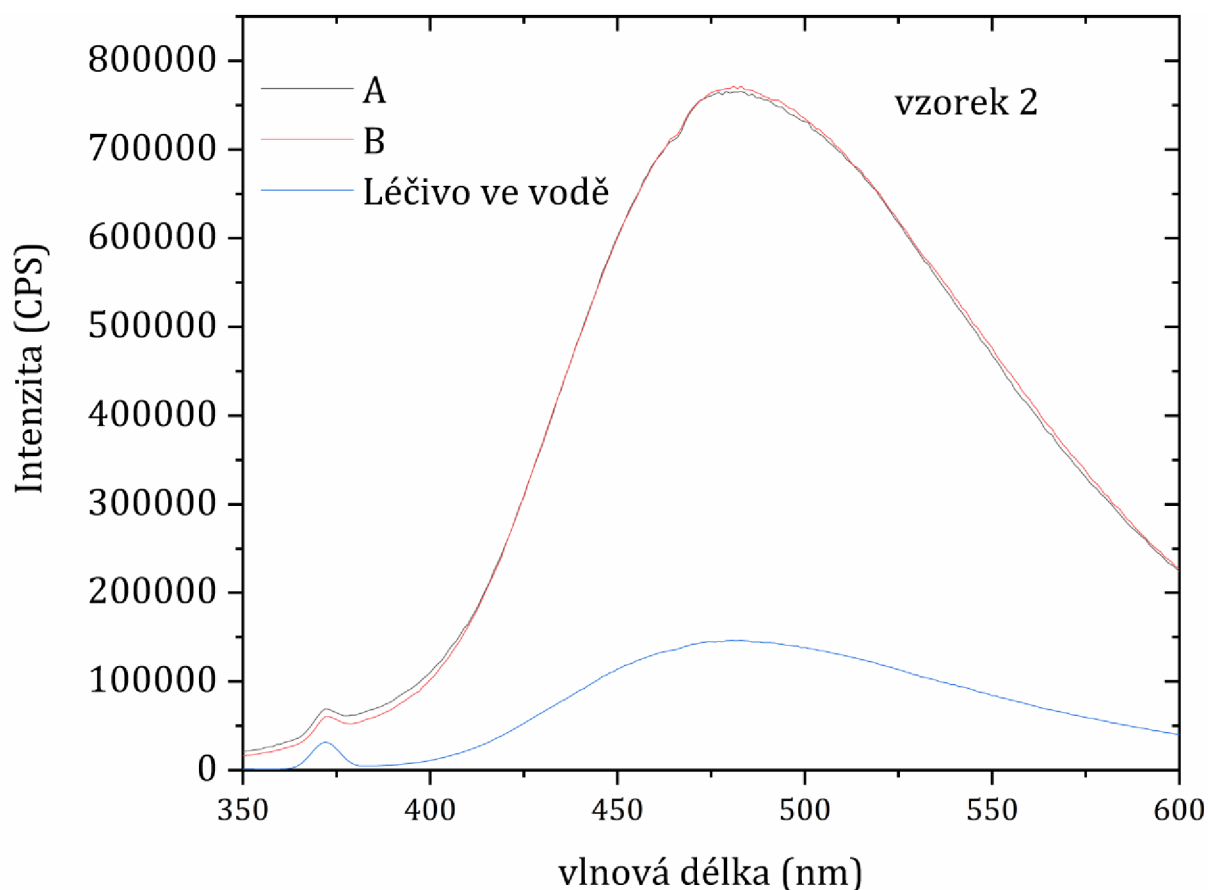


Obr. 17: Emisní fluorescenční spektrum vzorku 3 při excitační vlnové délce 270 nm.

Velmi zajímavým se ukázalo emisní spektrum vzorku 3. Jak je zřejmé z Obr. 17, lyofilizací došlo k modrému posunu (*blue-shift*) v emisním spektru vzorku. Modrý posun je charakterizován posuvem maxima intenzity emise k nižším vlnovým délkám. Vzorek tak v rámci svého zářivého přechodu emituje po lyofilizaci záření o vyšší energii, než tomu je u vzorku samostatně rozpuštěného ve vodě. Na tomto místě je nutno konstatovat, že koncentrace léčiva ve vodě je nižší než léčiva v lyofilizovaném systému, protože s podstaty hydrofobního chování léčiva nebylo možno ho do vody převést ve stejné koncentraci jako při rozpuštění hyaluronového nosiče s tímto léčivem. Posun však není projevem rozdílných koncentrací vzorku 3. Pravděpodobnější je vysvětlení, že k posunu došlo změnou polaroty prostředí, ve

kterém se léčivo nachází. Po lyofilizaci se přiblížilo ke svému maximu, které vykazovalo v přítomnosti nepolárního chloroformu, tedy léčivo se po lyofilizaci chová, jako by se nacházelo v nepolárním prostředí. To je možno interpretovat jako důsledek projevu hydrofobního efektu, kdy se léčivo díky *terc*-butylalkoholu coby ko-rozpouštědla a lyofilizaci coby technice sušení dostalo do kontaktu s hydrofobními doménami hyaluronanu, ke kterým má vyšší afinitu než k prostředí polárnímu a setrvalo tam i po přenesení do vodného prostředí. Posun maxima spektra je tak potvrzením, že dochází k hydrofobnímu efektu mezi léčivem a hydrofobními doménami hyaluronanu, čímž je možno zabezpečit jeho rozpustnost ve vodě.

Další vzorky tento posun nevykazovali, přesto je možno konstatovat, že i u nich došlo k úspěšnému začlenění léčiva do nosiče, což se projevilo nárůstem intenzity fluorescence. Vzhledem k tomu, že k tomuto nárůstu došlo u všech vzorků, je zde pro přehlednost uvedeno pouze emisní spektrum vzorku 2 (viz. Obr. 18), zatímco další spektra jsou k dispozici v přílohách této práce.



Obr. 18: Emisní spektrum vzorku 2 při excitační vlnové délce 330 nm.

Změna intenzity fluorescence je také, z jedním z projevů efektu rozpouštědla, respektive prostředí, ve kterém se léčivo nachází [105]. Zatímco v polárním prostředí je intenzita fluorescence nízká, po navázání na nosič dochází k několikanásobnému nárůstu, což je projevem snížené polarizace prostředí v okolí léčiva. Vzhledem k tomu, že nejsou prostudovány přechody mezi excitovanými stavy, není možno přesně popsat hodnotu emisních polaritních koeficientů. Pokud bychom přistoupili na teorii, že dochází k obdobným přechodům, jako je

tomu například v případě fluorescenční sondy pyrenu, byly by hodnoty EmPI vzorku 1, 2 a 3, pro které byla změřena emise ve dvou excitačních maximech rovny hodnotám uvedeným v Tab. 12. Z té je taky patrné, že polaritní index samotného léčiva ve vodě je ve všech případech vyšší, než pro léčiva v rozpuštěných lyofilizátech. Právě nižší hodnoty by mohly být ukazatelem projevu fluorescence v hydrofobním – nepolárním – prostředí, což by potvrdovalo hydrofobní efekt. Je však potřeba dbát zvýšené pozornosti při interpretaci těchto výsledků, protože, jak již bylo zmíněno výše, zatím není přesně prostudováno chování léčiv a diskutované závěry tak pouze vycházejí z porovnání s chováním fluorescenční sondy pyrenu.

Tab. 12: Vypočtené emisní polaritní indexy (EmPI) pro vzorky 1, 2 a 3.

Číslo vzorku	EmPI [-]		
	A	B	Léčivo ve vodě
1	1,07	1,03	1,41
2	0,87	0,92	1,32
3	0,82	0,86	0,97

5.8 Časově rozlišená fluorescenční spektrometrie

První použitou metodou pro vyhodnocení úspěšnosti navázání hydrofobního léčiva na nosič v podobě hyaluronanu byla časově rozlišená fluorescence, díky níž byly získány informace o době života fluoroforů (léčiv) v různých prostředích. Prvním prostředím, ve kterém byla fluorescence měřena byl roztok rozpuštěného lyofilizovaného hyaluronanu s léčivem, druhým prostředím poté byla voda bez přítomnosti makromolekuly. Obr. 19 a Obr. 20 jsou grafickým znázorněním počtu fotonů (counts) v logaritmickém měřítku v závislosti na čase, který je rozdělený do jednotlivých kanálů. Na jednotlivých řádcích tak vidíme grafy pro jednotlivá léčiva, přičemž první sloupec odpovídá sérii A, druhý sloupec sérii B – každé léčivo bylo smíšeno s hyaluronanem a lyofilizováno ve dvou opakováních – a třetí sloupec představující pouze léčivo ve vodě.

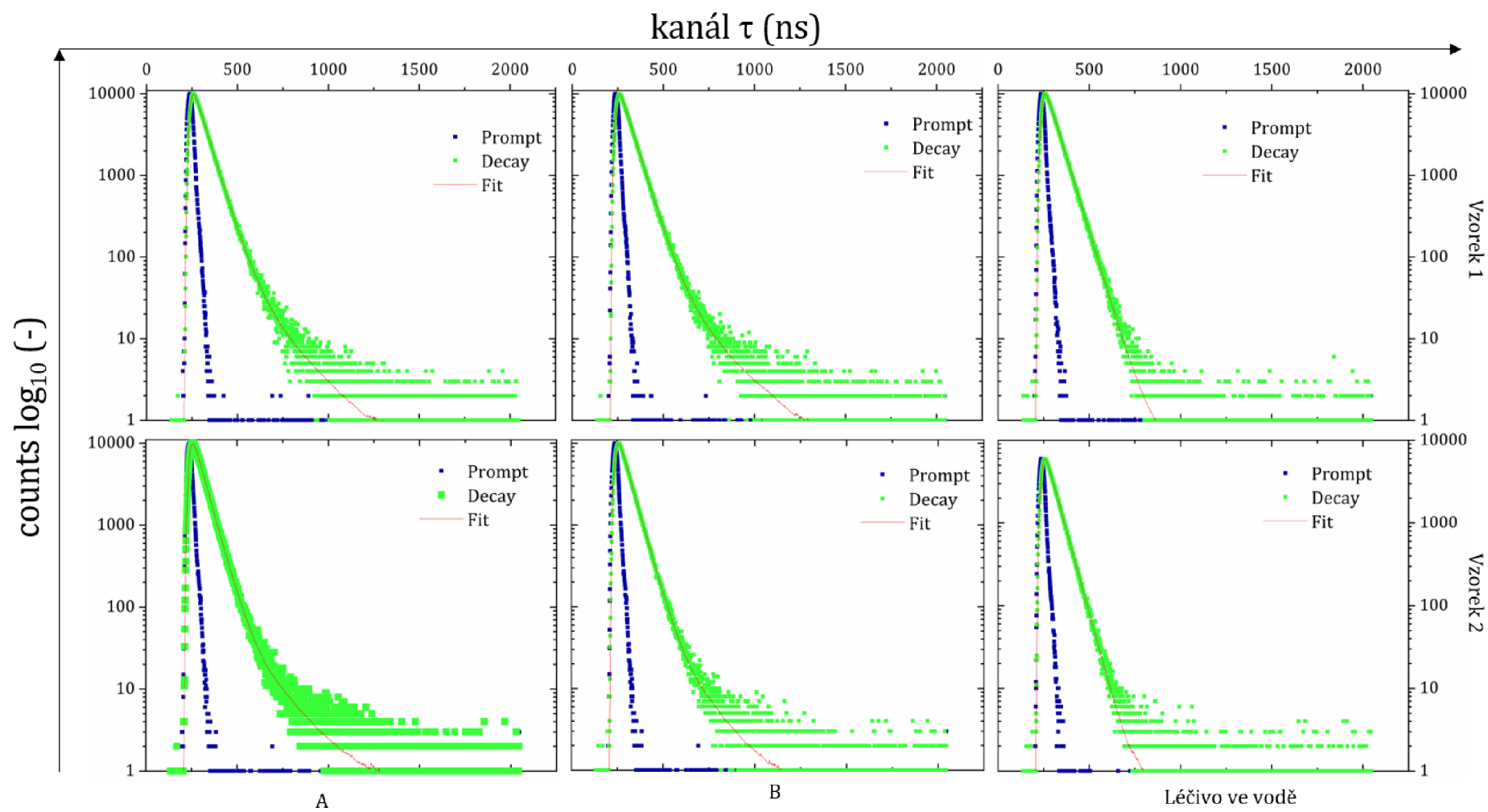
Zatímco léčiva ve vodě mají veskrze linární průběh po dosažení maxima, v případě léčiv v přítomnosti polymeru se na křivce prokládající tyto hodnoty nachází o minimálně jeden inflexní bod více daný kvazi-exponenciálním poklesem. Získáním těchto bodů byly zjištěny doby života fluoroforu poutaného v polymerní matici. Nejvýrazněji je tento trend zřetelný v případě vzorku 5, kde křivka téměř kopíruje prompt, zatímco v přítomnosti polymerního řetězce hyaluronanu dochází k výraznému odklonu od původní lineárně deklinačního trendu.

Pozornost je třeba věnovat vzorku číslo tři, u něhož v případě léčiva ve vodě nebylo možno dosáhnout stejného počtu fotonů jako u ostatních vzorků. Toto léčivo bylo natolik špatně rozpustné ve vodě, že maximální hodnota 10 000 countů musela být snížena na polovinu, aby byla výstupní data relevantní, a aby bylo možno měření provést v akceptovatelném čase. Právě

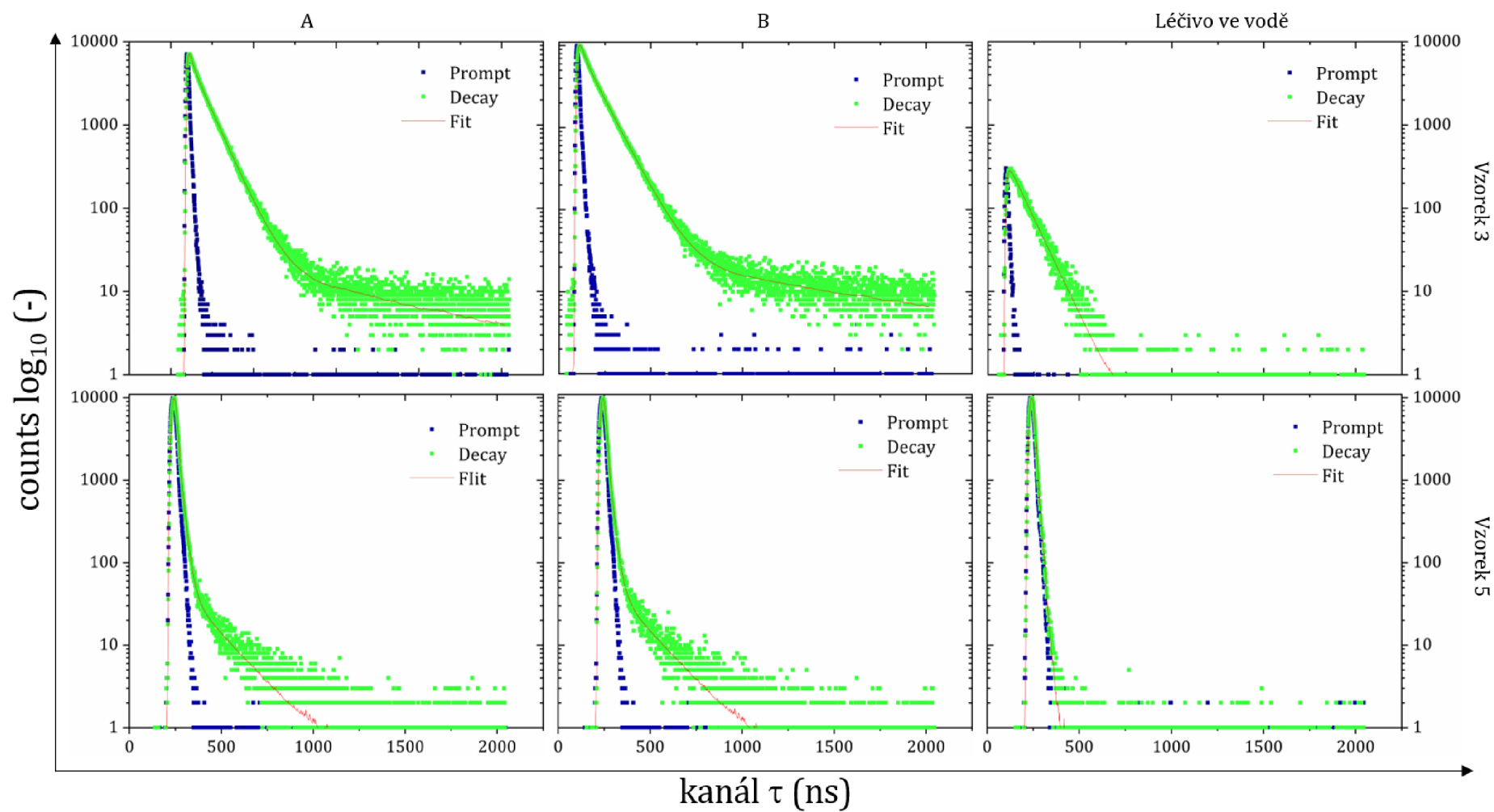
tento vzorek tak na první pohled potvrzuje úspěšnost provedené práce, a sice že lyofilizace je vhodnou metodou, jak pomocí hydrofobního efektu za využití *tert*-butylalkoholu coby korozpouštědla je možno připravit systém, který ve své struktuře bude poutat hydrofobní látku, zabezpečí její rozpustnost a následně také její uvolnění. Právě toto uvolnění je potvrzeno získkem dvou časů – první, který je zpravidla nižší odpovídá času léčiva uvolněného do vody a je shodný s časem získaným z měření léčiva v prostředí vody bez přítomnosti polymerního klubka. Druhý čas potom odpovídá částicím, které jsou poutány nebo pro stočení řetězce setrvávají v prostředí makromolekulárního klubka hyaluronanu.

Tabulka shrnuje časy získané z proložení získaných dat. Ve většině případů je v úvahu brán rozptyl, pevně daný na hodnotu kanálu 0,5 – jedná se o rozmezí se statisticky největší pravděpodobností výskytu rozptylu, a aby měření nebyla zatěžkána touto chybou, bývá tímto způsobem eliminován. Na tomto místě je vhodné okomentovat vzorek 3 a 5. V případě vzorku 3 jsou výrazné poměrně vysoké časy t_3 , které by měly představovat dobu života fluoroforu (léčiva) inkorporovaného v polymerním klubku hyaluronanu. Mezi oběma časy je rozdíl přibližně 9 ns, což by mohlo nasvědčovat rozdílnému chování série A a série B. Jak již bylo zmíněno v oddíle 5.6, tento rozdíl je pravděpodobně způsoben různým stočením makromolekulárního řetězce. Zároveň je však potřeba zmínit, že data pro tento vzorek byla získána při poměrně velké šířce štěrbin (viz. Tab. 8), tedy výsledky mohou být zatěžkány chybou, čemuž také nasvědčují velmi vysoké časy přiřazované době fluorescence léčiva poutaného v matici.

Za zmínku také stojí graf získaný pro vzorek 3 ve vodě bez přítomnosti polymeru. Ke změření tohoto vzorku muselo dojít dvakrát – při prvním pokusu nebyla získána žádná měřitelná data. Vzorek byl tedy připraven znovu s dobou míchání na magnetické míchačce 8 dnů. Kvůli nízké odezvě byl počet countů snížen na hodnotu 5 000, čímž bylo možno získat interpretovatelná data. Z výsledku je zřejmé, že tento silně hydrofobní vzorek snižuje svou hydrofobicitu po navázání na polymerní nosič, což bylo cílem této práce. Měření tak prokazatelně dokázalo, že lyofilizace je účinnou metodou pro navázání hydrofobních získaných léčiv na hyaluronan coby hydrofilní nosič.



Obr. 19: Průběhy časově rozlišené fluorescence pro vzorky 1 a 2, sloupce zleva odpovídají sérii A, sérii B a léčivu ve vodě bez přítomnosti hyaluornanu.



Obr. 20: Průběhy časově rozlišené fluorescence pro vzorky 3 a 5, sloupce zleva odpovídají sérii A, sérii B a léčivu ve vodě bez přítomnosti hyaluornanu.

Tab. 13: Doby fluorescence získané z proložení dat časově rozlišené fluorescenční spektrometrie jednotlivých vzorků.

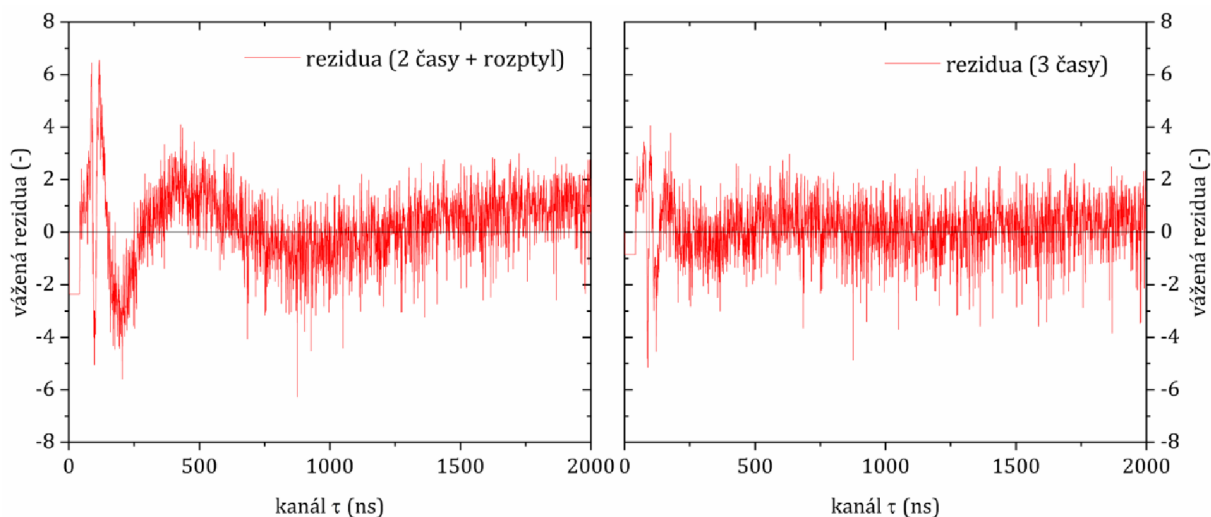
Vzorek 1			
	A	B	Léčivo ve vodě
	čas [ns]	čas [ns]	čas [ns]
rozptyl	0,01	0,01	0,01
t ₁	1,57	1,58	1,62
t ₂	4,59	5	-
Vzorek 2			
	A	B	Léčivo ve vodě
	čas [ns]	čas [ns]	čas [ns]
rozptyl	0,01	0,01	0,01
t ₁	1,43	1,43	1,46
t ₂	4,94	4,65	-
Vzorek 3			
	A	B	Léčivo ve vodě
	čas [ns]	čas [ns]	čas [ns]
rozptyl	0,8	1,0	0,03
t ₁	5,2	5,4	5,02
t ₂	47,1	56,9	-
Vzorek 5			
	A	B	Léčivo ve vodě
	čas [ns]	čas [ns]	čas [ns]
t ₁	0,13	0,13	0,11
t ₂	0,61	0,65	0,61
t ₃	4,65	4,72	-

V případě vzorku 5 a 3 nebylo možno použít fixní hodnotu kanálu pro rozptyl 0,5, protože hodnota kvadrátu koeficientu χ byla příliš vysoká (viz. Tab. 14). Vypovídá o tom také nerovnoměrné rozložení reziduí, která jsou vidět na Obr. 21 a Obr. 22. V tomto případě je nepravděpodobné, že by léčiva měla tři různé časy, spíše je na místě konstatovat, že první čas odpovídá rozptylu spadajícímu do jiného kanálu než obvykle a dva další časy už patří volnému léčivu ve vodě a léčivu v matrici.

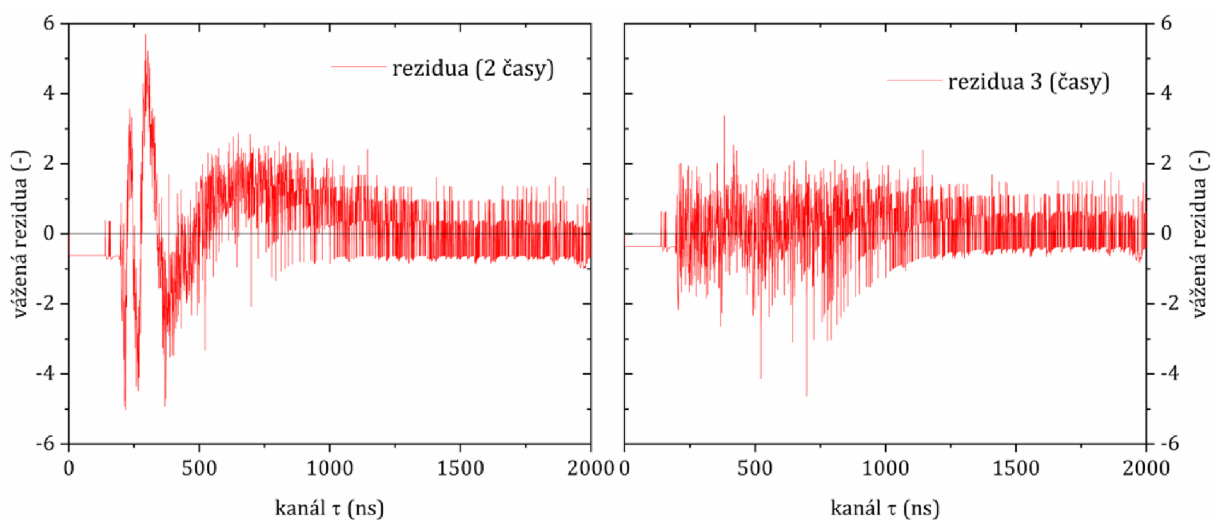
Kromě reziduální analýzy je potřeba brát v potaz také hodnoty kvadrátu χ . Jedná se o statistický test zabývající se rozptylem hodnot, jehož druhá mocnina by v ideálním případě měla být v rozmezí 0,8-1,3. Hodnoty χ^2 jsou uvedeny v Tab. 14. I přesto, že většina hodnot se nachází pod ideálním limitem, dohromady s reziduální analýzou je možno tyto hodnoty χ^2 považovat za potvrzující vhodnost zvoleného proložení. Tedy potvrzující korektnost získaných dat.

Tab. 14: Hodnoty χ^2 získané z proložení dat.

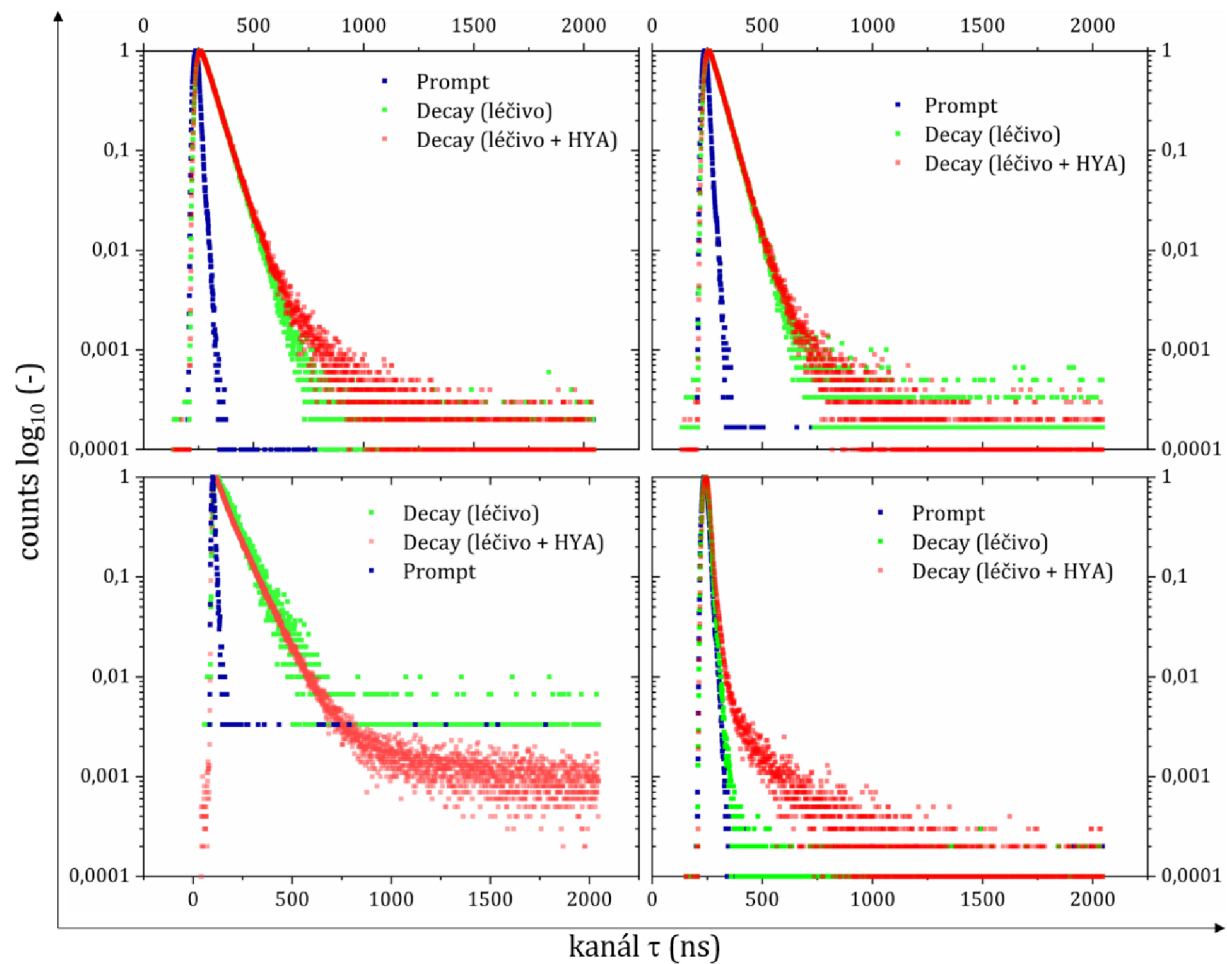
	A	B	Léčivo ve vodě
χ^2	0,8	0,8	0,7
	0,7	0,7	0,6
	1,3	1,3	0,5
	0,7	0,7	0,3



Obr. 21: Reziiduální analýza vzorku 3 zobrazující nerovnoměrné rozložení při proložení dat exponenciálou druhého řádu s fixní hodnotou rozptylu na kanálu 0,5 (vlevo), rovnoměrné rozložení vážených reziduí při proložení dat exponenciálou třetího řádu (vpravo).



Obr. 22: Reziiduální analýza vzorku 5 zobrazující nerovnoměrné rozložení při proložení dat exponenciálou druhého řádu s fixní hodnotou rozptylu na kanálu 0,5 (vlevo), rovnoměrné rozložení vážených reziduí při proložení dat exponenciálou třetího řádu (vpravo)



Obr. 23: Normalizované změřené průběhy časově rozlišené fluorescence pro všechny vzorky vynesené do grafů pro porovnání těchto průběhů pro lyofilizované systémy a léčiva samostatně se nacházející ve vodě. (vzorek 1 – nahoře vlevo, vzorek 2 – nahoře vpravo, vzorek 3 – dole vlevo, vzorek 5 – dole vpravo)

Jednotlivé průběhy měření byly normalizovány a vyneseny společně do grafů, pro názorné ukázání rozdílů mezi sklony trendů dat samotných léčiv ve vodném prostředí a léčiv poutaných v lyofilizovaných systémech. Z Obr. 23 je tak zřetelné, že při začlenění léčiva do matrice dochází k fluorescenci léčiva, které se po rozpuštění nosiče uvolní do roztoku, a delší době života fluoroforu zadržovaného v nosiči. Graficky se tento fenomén projevuje odklonem řady od původně přibližně lineárního průběhu po dosažení maxima počtu countů.

V případě vzorku 3 je zřetelné, že hodnoty odpovídající léčivu ve vodě bez přítomnosti hyaluronanu nenabývají takových rozměrů jako v případě rozpuštěného lyofilizovaného systému. Právě tento úkaz, jak již bylo komentováno výše, je zřetelným důkazem účinnosti lyofilizace ve smyslu začlenění léčiva do matrice a umožňující jeho rozpustnost ve vodě.

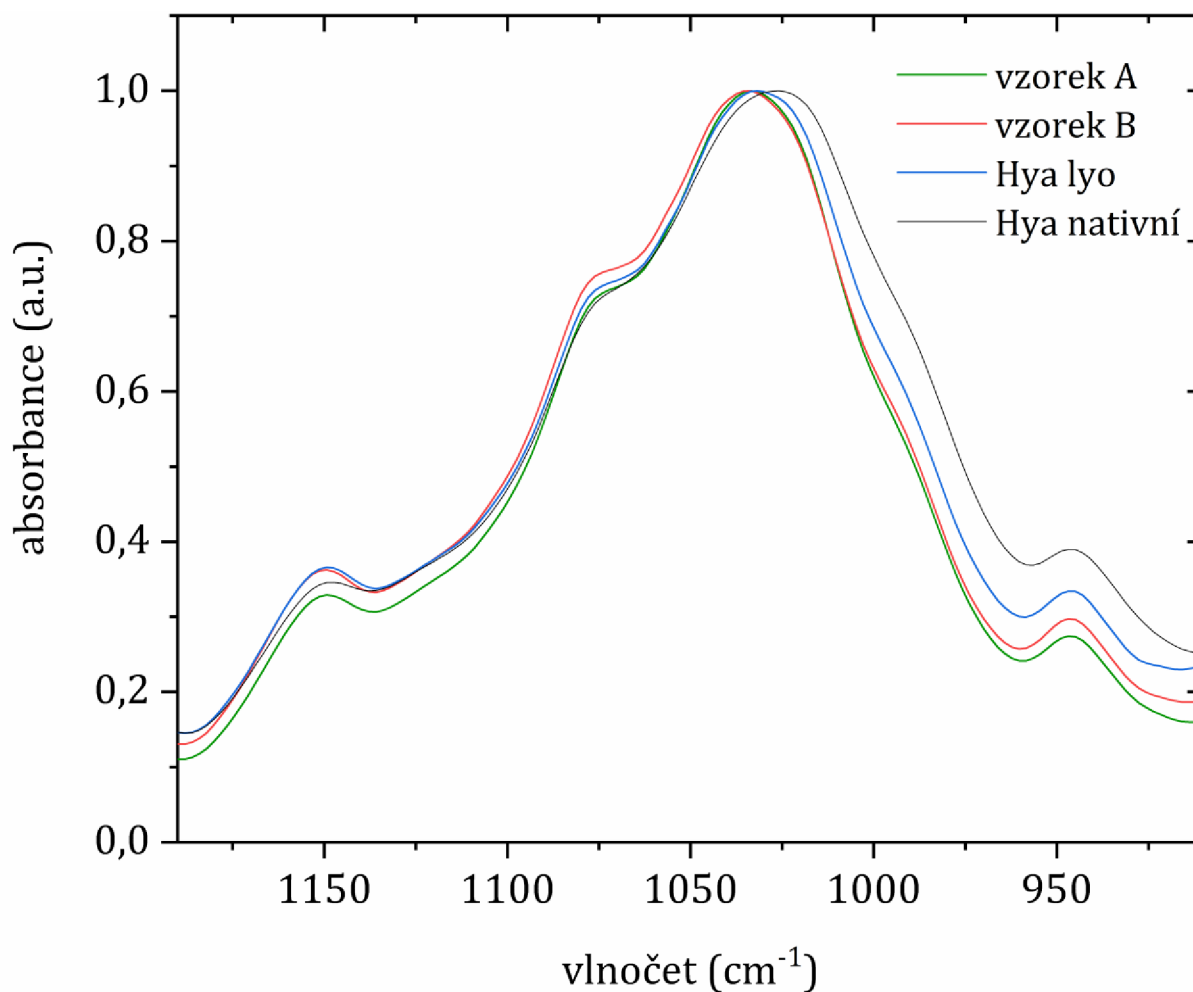
O účinnosti začlenění léčiva do nosiče přehledně vypovídá také graficky znázorněné zastoupení dob života fluoroforů vzorku 5. Zatímco léčivo v nepřítomnosti hyaluronanu téměř splývá s promptem, po lyofilizaci je možno detekovat zvýšené zastoupení dob života fluoroforů ve vyšších časech, což se graficky projevuje odklonem od křivky vyhasínání fluorescence samotného léčiva, a je to tedy potvrzením inkorporace léčiva do nosiče.

5.9 Steady-state infračervená spektrometrie lyofilizátů

Mimo časově rozlišenou fluorescenční spektroskopii byla provedena také analýza lyofilizátů pomocí infračervené spektrofotometrie s Fourierovou transformací. Jak již bylo uvedeno dříve, na diamantovém krystalu byly postupně změřeny jednotlivé vzorky lyofilizovaných nosičů s navázaným léčivem, čistý lyofilizovaný hyaluronan bez léčiva a nativní hyaluronan bez jakýchkoliv úprav. Pro sledování změn byl zvolen ostrý a intenzivní absorpční pás odpovídající vlnočtu 1040 cm^{-1} , který je projevem valenční vibrace C–OH vazby primárních alkoholů. Důvodem zvolení tohoto pásu byl zprvu fakt, že není ovlivněn přítomností jiných pásů a zároveň je charakteristickým právě pro hyaluronan.

Jak je zřejmé z Obr. 24, lyofilizací dochází k tzv. modrému posunu (*blue shift*), tedy že charakteristický pás se posouvá do oblasti vyšších vlnočtů. Protože vlnocet je přímo úměrný energii záření, je tento jev možno interpretovat jako potřebu dodání záření o vyšší energii, aby došlo k projevu valenční vibrace C–OH vazby. Jinými slovy, vazba absorbuje záření o nižší vlnové délce (vyšší energii), což se projeví ve formě valenční vibrace, než v případě nativního hyaluronanu. Vysvětlení tohoto jevu spočívá v uvědomění si, že hyaluronan je přirozeně obalen hydratační vrstvou vody. Jedná se o silně hydrskopickou látku, proto i ve formě prášku ve své struktuře jímá značné množství vody. Ve chvíli, kdy je pomocí lyofilizace vysoušen dochází ke dvěma důležitým procesům. Prvním je desorpce volně vázané vody, která je strukturou pouze jímána pomocí slabých interakcí. Druhým procesem, ke kterému dochází během sekundárního sušení, je eliminace vody pevně vázané. V tomto okamžiku dochází ke kontrakci vazeb, které do té doby přispívali k projevům hydrofilicity sloučeniny a vazbám pomocí vodíkových můstků a silněji se začne projevovat hydrofobní efekt - tedy hydrofobní části se začnou výrazněji k sobě přibližovat. Hydrofilní domény, které se postupně nacházejí v prostředí chudém na molekuly, se kterými by mohli vstupovat do hydrofilních interakcí, na tento jev odpovídají zkracováním

vazeb u skupin dříve se podílejících na vazbách vodíkovými můstky s vodou a všeobecně přítomnou snahou uspořádat se do energeticky výhodné konformace [106].



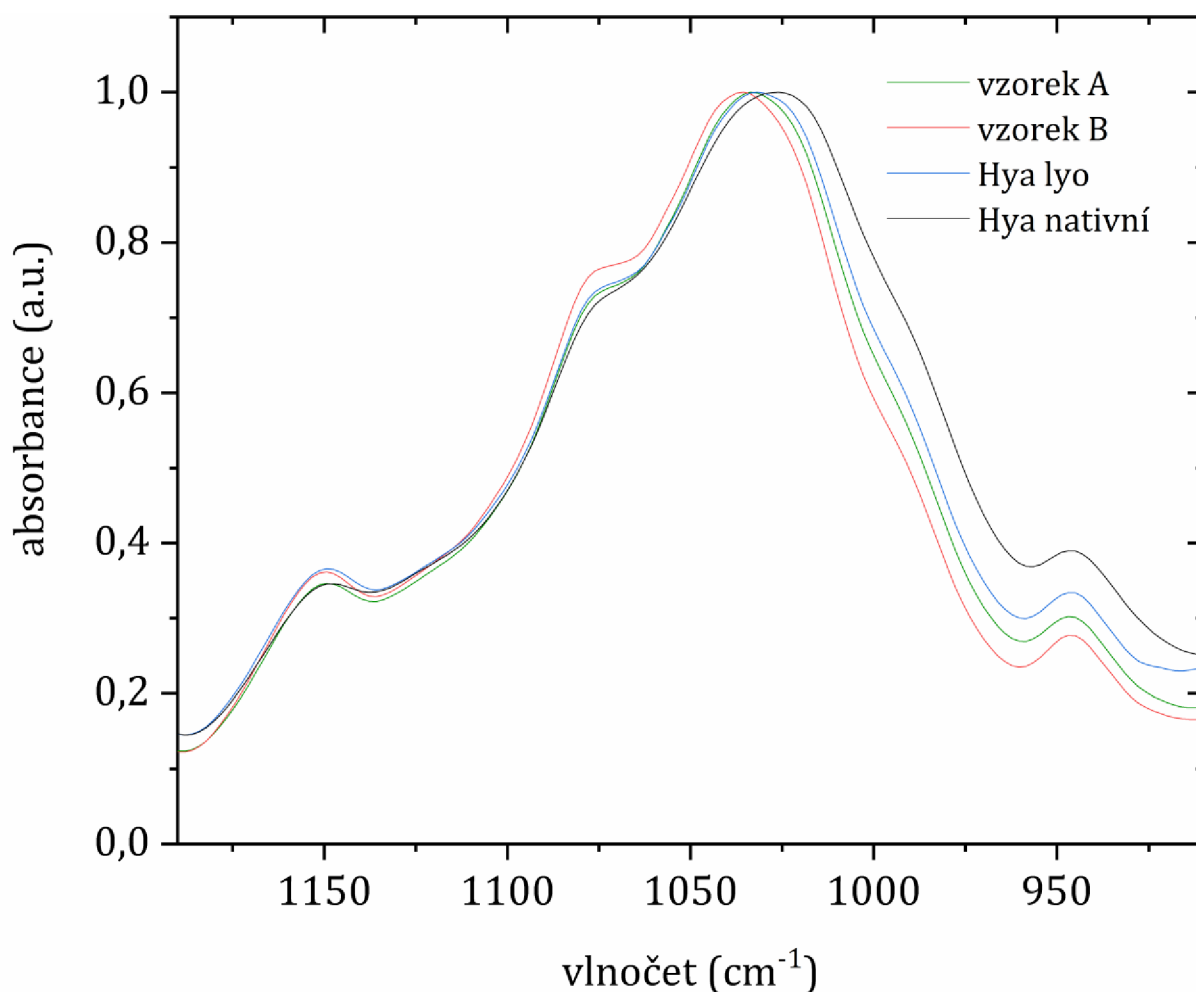
Obr. 24: IČ spektrum vzorku 3 se zaměřením na absorpční pás valenčních vibrací C-OH vazeb v primárních alkoholech.

V případě přítomnosti hydrofobního léčiva je tento efekt o to více posílen, protože začne převažovat vliv hydrofobních domén hyaluronanu, které se po zbavení hydratačního obalu, který z velké části definoval konformaci celého řetězce, začnou snažit dostat do bližšího kontaktu s hydrofobním léčivem. Odtraněním vody tak dojde ke snížení možnosti interakce hydrofilních skupin a projevu hydrofobního efektu.

Zmíněný modrý posun charakteristického absorpčního pásu C–OH valenční vibrace je tak důkazem vlivu hydrofobního léčiva na konformaci dehydratovaného polymerního řetězce hyaluronanu a zároveň potvrzuje projev hydrofobních interakcí mezi léčivem a hydrofobními doménami hyaluronanu. Že je léčivo pomocí hydrofobního efektu ke struktuře obravdu poutáno ukazuje také modrý posun nejen vůči nativnímu hyaluronanu, ale i vůči hyaluronanu lyofilizovanému.

Reprezentativním zástupcem je normalizované spektrum vzorku 3, kde se téměř dokonale překrývá série A a B. V nižších hodnotách vlnočtu se nachází absorpční pás lyofilizovaného hyaluronanu a v nejnižších hyaluronanu nativního.

V přílohách je možno nalézt spektra i zbývajících vzorků. Na tomto místě je vhodné komentovat dále vzorek 1, jehož spektrum pro sérii A a sérii B se liší, respektive je mezi absorpčními pásy zřetelný posun (viz. Obr. 25). K tomu došlo nedokonalým zacházením se vzorkem A, který byl před měřením vytažen z exikátoru a dostal se tak do kontaktu se vzdušnou vlhkostí. I zde je však zřejmé, že byť se absorpční pás posunul blíže k pásu lyofilizovaného hyaluronanu, stále mezi nimi, a především mezi ním a nativním hyaluronanem zůstává výrazný rozdíl.



Obr. 25: IČ spektrum vzorku 1 se zaměřením na absorpční pás valenčních vibrací C-OH vazeb v primárních alkoholech.

5.10 Stanovení residuálního *terc*-butylalkoholu

Stanovení residuálního *terc*-butylalkoholu proběhlo pomocí mikroextrakce na pevné fázi propojené s plynovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií. Samotné vyhodnocování probíhalo dvěma způsoby. První byla metoda standardního přídatku, při které nejprve došlo ke změření samotného vzorku a následně vzorku doplněného o známý objem standardu o koncentraci $5,8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Následně byl porovnán retenční čas obou měřených roztoků a vypočtena koncentrace vzorku bez přídatku. Druhou metodou bylo stanovení koncentrace residuí pomocí kalibrační křivky. Následně byly zprůměrovány hodnoty koncentrací získané těmito dvěma různými metodami (viz. Tab. 15).

Tab. 15: Koncentrace získané vyhodnocením dat z plynové chromatografie.

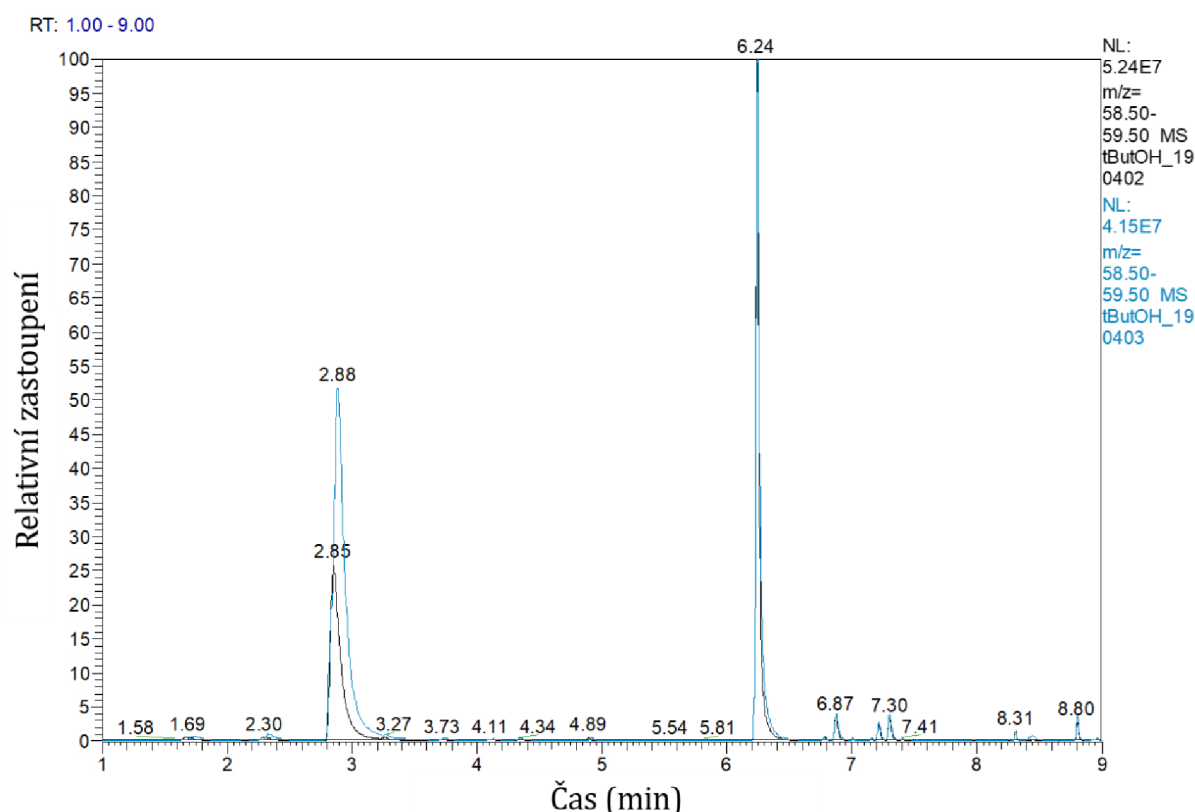
vzorek	Koncentrace bez přídatku [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]	Koncentrace z kalibrační křivky [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]	Průměrná koncentrace [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]
1A	1,14	1,22	1,21±0,07
1B	1,20	1,30	
2A	0,56	0,73	0,7±0,1
2B	0,76	0,74	
3A	0,49	0,49	0,53±0,05
3B	0,59	0,55	
5A	1,19	1,24	1,18±0,05
5B	1,12	1,15	

Jak je zřejmé z Tab. 14, hodnoty koncentrací u jednotlivých vzorků získané dvěma metodami (metodou standardního přídatku a metodou kalibrační křivky) obsahují ve všech případech jen nepatrné rozdíly. V případě vzorku 3, série A, dokonce došlo k dokonalé shodě. Je proto na místě konstatovat, že získaná data touto analytickou metodou důvěryhodně informují o množství residuí v lyofilizovaných systémech.

Ze získaných dat tak bylo vypočteno množství *terc*-butylalkoholu v jednotlivých vzorcích, a to bylo následně vztaženo na původní navážku lyofilizátu. Zastoupení residuálního ko-rozpouštědla v podobě hmotnostních procent je uvedeno v Tab. 16.

Tab. 16: Množství residuálního *tert*-butylalkoholu vztažené na navážku lyofilizátu.

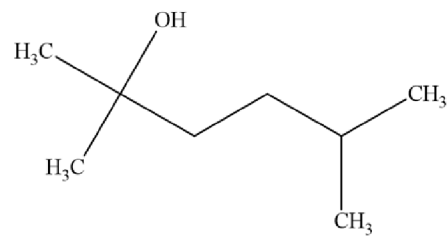
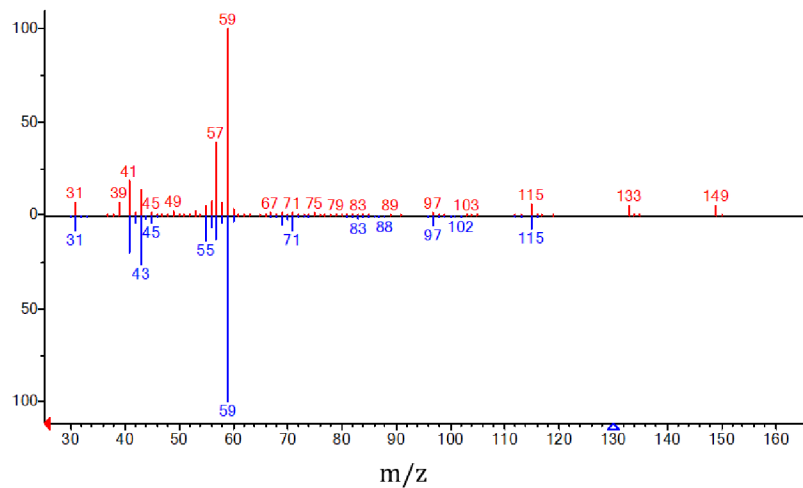
vzorek	hm. %
1	0,2
2	0,1
3	0,1
5	0,2



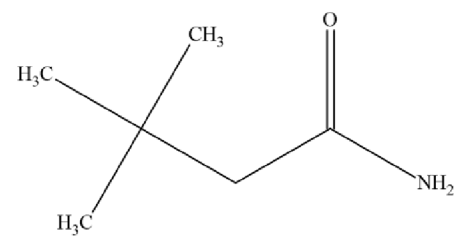
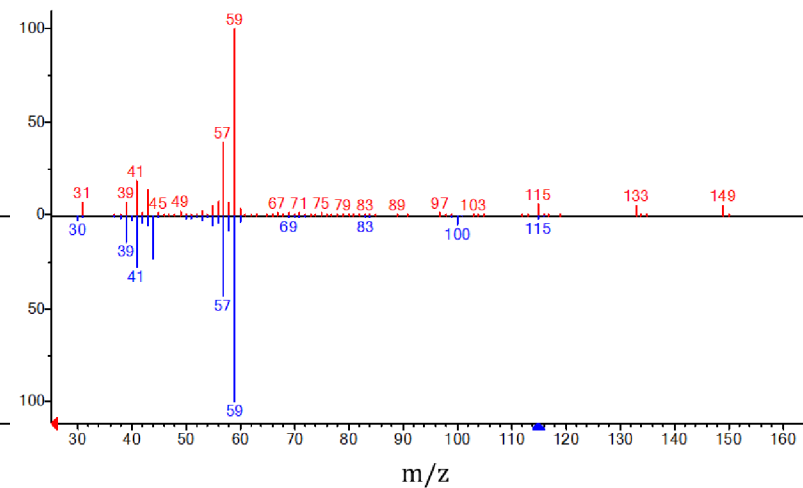
Obr. 26: Příklad chromatogramu, kde černá křivka odpovídá vzorku bez přídavku a modrá vzorku s přídavkem.

Při pohledu na chromatogram jednotlivých vzorků není možno si nevšimnout na výrazný pík s retenčním časem 6,24 min. Knihovna hmotnostních spekter navrhla dvě možné sloučeniny, kterým by tento čas mohl odpovídat. Jednalo se o 2,5-dimethylhexan-2-ol a 3,3-dimethylbutanamid, přičemž vypočtená podobnost spekter dle knihovny více odpovídala první zmíněné sloučenině. Při pohledu na obě spektra (viz. Obr. 27) však výrazné píky odpovídají spíše druhé ze sloučenin, která je však z pohledu organické chemie nepravděpodobná ve smyslu reakce rozpouštědla s jinou sloučeninou. První na druhou stranu vybízí k úvaze, že počet uhlíků odpovídá zkondenzovaným dvěma molekulám *tert*-butylalkoholu, avšak v rámci provedené rešerše nebyl nalezen mechanismus, kterým by k takovéto kondenzaci mohlo dojít.

Nepochybně je na místě také úvaha, že by se mohlo jednat o sloučeninu, která je výsledkem mikrobiální aktivity. Šlo by tedy o sloučeninu získanou degradací hyaluronanu, což by objasňovalo, proč je, byť v různém zastoupení, tato látka přítomna v chromatogramech všech vzorků.



2,5-dimethylhexan-2-ol



3,3-dimethylbutanamid

Obr. 27: Hmotnostní spektrum 2,5-dimethylhexan-2-olu a 3,3-dimethylbutanamidu s odpovídajícími vzorci. Modrá část hmotnostního spektra odpovídá spektru *tert*-butylalkoholu, červená daným sloučeninám.

6 ZÁVĚR

Tato práce, která navazuje na předchozí výzkumy provedené na chemické fakultě Vysokého učení technického (viz. [91], [92], [94]), potvrdila vhodnost využití lyofilizace, metody sušení mrazem, k přípravě nosičových systémů na bázi hyaluronanu, přičemž bylo využito amfifilního charakteru této sloučeniny. Jako ko-rozpouštědlo byl využit *tert*-butylalkohol, díky kterému bylo možno rozpustit hydrofobní léčiva a napomoci k jejich adsorpci na hyaluronan o střední molekulové hmotnosti 13 kDa v místě nepolárních domén pomocí hydrofobního efektu. Úspěšnost provedení byla potvrzena pomocí steady-state fluorescenční spektrometrie, časově rozlišené fluorescenční spektrometrie a infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací (ATR-FTIR).

Technika steady-state fluorescenční spektrometrie potvrdila, že po rozpuštění léčiva ve 20% *tert*-butylalkoholu, smíchání s hyaluronanem o výsledné koncentraci $0,4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ a následná lyofilizace prokázali navázání léčiva na hyaluronan, což se projevilo zvýšením intenzity fluorescence a v případě vzorku 3 posunem emisního spektra k vyšším vlnovým délkám, což odpovídá emisi v hydrofobním prostředí.

Časově rozlišená fluorescence také potvrdila, že příprava nosičových systémů byla úspěšná. Ve všech případech došlo k získání dvou časů pro vzorky obsahující rozpuštěné lyofilizáty ve vodě, přičemž první čas odpovídal léčivu uvolněnému do vody a druhý reprezentující léčivo poutané v matici. Právě první čas ve všech případech odpovídal času získanému rozpuštěním samotného léčiva bez přítomnosti hyaluronanu a procesu lyofilizace. Na tomto místě je také nutno podotknout, že z povahy léčiva nebylo možno ho dokonale rozpustit pro přípravu referenčních vzorků. Naproti tomu podpořením slabých fyzikálních interakcí zvláště pak hydrofobního efektu mezi vzorkem a daným polysacharidem došlo k rozpuštění daného „drug-delivery“ systému jako celku. Reprezentativním ukazatelem byl vzorek 3, pro nějž musel být snížen počet detekovaných fotonů při měření samotného léčiva ve vodě, protože nevykazoval dostatečně silnou odezvu, aby dosáhl pro ostatní vzorky nastaveného počtu 10 000 akumulovaných fotonů. V případě měření lyofilizátu obsahujícího tento vzorek však již měření dosáhlo cíleného počtu fotonů, a bylo tak potvrzeno začlenění léčiva do struktury trojrozměrné struktury polymerního řetězce. Je však nutno konstatovat, že toto měření probíhalo při otevření štěrbin na maximální hodnotu, proto získaný výsledek je diskutabilní. Úspěšnost přípravy systému tak potvrzuje především vzorek 5, který jasně vykazuje rozdílné chování mezi vzorky v přítomnosti hyaluronanu a samotným léčivem ve vodném prostředí bez přítomnosti nosiče.

Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací na ATR krystalu byla zaměřena na absorpční pás odpovídající C–OH valenčním vibracím primárních alkoholů. Právě posun tohoto pásu k vyšším vlnovkám (tzv. *blue-shift*) prokázal projev hydrofobního efektu, který se projevuje zkrácením vazeb mezi skupinami původně aktivně se podílejících na slabých vazebných interakcích s rozpouštědlem typu vodíkových vazeb a samouspořádáním struktury ve smyslu vyhledávání kontaktu mezi stejnorodými doménami v rámci amfifilní povahy hyaluronanu.

Z výsledků analytické metody užití pro stanovení residuí *tert*-butylalkoholu, kterou byla head-space mikroextrakce na pevné fázi, je zřejmé, že rozpouštědlo zůstává po lyofilizaci ve struktuře pouze ve stopovém množství, konkrétně v desetinách hmotnostních procent. Využitá metoda pro stanovení těchto residuí přinesla užitečné a dle vypočtených odchylek také relevantní výsledky s dobrou opakovatelností a je proto vhodnou metodou k analýze zbytků *tert*-butylalkoholu coby ko-rozpouštědla pro přípravu nosičových systémů využívajících toto rozpouštědlo pro podpoření hydrofobního efektu. V budoucnosti by se výzkum dále mohl zaměřit na určení sloučeniny, která se projevuje v chromatogramech všech vzorků a v této práci se nepodařilo ji charakterizovat.

Vyjmaje vzorku 4, který nebylo možno rozpustit v 20% *tert*-butylalkoholu, pro všechny zbylé vzorky se podařilo připravit vhodné nosičové systémy zabezpečující rozpuštění samostatně hydrofobních vzorků. Bylo tedy potvrzeno, že lyofilizace je vhodnou metodou pro přípravu nosičových systémů upravující chování reálných léčiv pro distribuci v lidském organismu, i bez potřeby funkcionalizace hyaluronanu. Zároveň byl vytyčen nový cíl dalšího výzkumu – sice zaměřit se na hledání vhodného rozpouštědla, které by zajistilo rozpuštění vzorku 4, dopomohlo jeho navázání na nosič tak, aby po lyofilizaci vykazoval stejné vlastnosti, jako zbylé vzorky. Dále bylo potvrzeno, že fluorescenční a infračervená spektrometrie jsou vhodné techniky pro charakterizaci lyofilizovaných nosičových systémů.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] RISSE, Guenter, 1986. Imhotep and Medicine--a Reevaluation. *The Western journal of medicine*. [online]. **622**(4), 144 [cit. 2023-04-06]. ISSN 1476-2978. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/19641019_Imhotep_and_Medicine--a_Reevaluation
- [2] TSIOMPANOOU, Eleni a Spyros G. MARKETOS, 2013. Hippocrates: timeless still. *Journal of the Royal Society of Medicine* [online]. **106**(7), 288-292 [cit. 2023-04-06]. ISSN 0141-0768. Dostupné z: doi:10.1177/0141076813492945
- [3] BEAUREGARD, H., 1880. Étude de corps vitré. *Journal de l'anatomie et de la physiologie normales et pathologiques de l'homme et des animaux*. Paris: Libraire Germer Baillière et C, **16**(1), 240-242.
- [4] MEYER, Karl a John W. PALMER, 1934. THE POLYSACCHARIDE OF THE VITREOUS HUMOR. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 107(3), 629-634 [cit. 2022-09-19]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(18)75338-6
- [5] PREHM, P, 1983. Synthesis of hyaluronate in differentiated teratocarcinoma cells. Mechanism of chain growth. *Biochemical Journal* [online]. 211(1), 191-198 [cit. 2022-09-19]. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/bj2110191
- [6] HARDINGHAM, Tim, 2004. Chapter 1 - Solution Properties of Hyaluronan. In: *Chemistry and Biology of Hyaluronan* [online]. 1. Manchester: Elsevier Science Ltd, s. 1-19 [cit. 2022-09-19]. ISBN 9780080443829. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-008044382-9/50032-7>
- [7] NECAS, J., L. BARTOSIKOVA, P. BRAUNER a J. KOLAR, 2008. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinární Medicina* [online]. **53**(8), 397-411 [cit. 2022-09-19]. ISSN 03758427. Dostupné z: doi:10.17221/1930-VETMED
- [8] SCOTT, John E. a Frank HEATLEY, 2002. Biological Properties of Hyaluronan in Aqueous Solution Are Controlled and Sequestered by Reversible Tertiary Structures, Defined by NMR Spectroscopy. *Biomacromolecules* [online]. **3**(3), 547-553 [cit. 2023-02-05]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm010170j
- [9] Hascall, Vincent C.; Laurent, Torvard C. Hyaluronan: Structure and properties . *Glycoforum* [online]. 1997, no. 1, [cit. 2022-09-18]. Dostupné na [www: http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html](http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html). ISSN 1349- 9416.
- [10] NECAS, J., L. BARTOSIKOVA, P. BRAUNER a J. KOLAR, 2008. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinární medicina* [online]. 53(8), 397-411 [cit. 2023-02-05]. ISSN 03758427. Dostupné z: doi:10.17221/1930-VETMED
- [11] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ, 2010. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav* [online]. Vyd. 6., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT [cit. 2022-09-19]. ISBN 978-80-7080-745-3. Dostupné z: https://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog/publikace?uid=uid_isbn-978-80-7080-745-3
- [12] SZE, Jun Hui, Jeremy C. BROWNLIE a Christopher A. LOVE, 2016. Biotechnological production of hyaluronic acid: a mini review. *3 Biotech* [online]. **6**(1), 2-3 [cit. 2022-09-20]. ISSN 2190-572X. Dostupné z: doi:10.1007/s13205-016-0379-9
- [13] STERN, Robert, 2004. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *European Journal of Cell Biology* [online]. 83(7), 317-325 [cit. 2022-11-03]. ISSN 01719335. Dostupné z: doi:10.1078/0171-9335-00392

- [14] DEANGELIS, Paul L., 1996. Enzymological Characterization of the Pasteurella multocida Hyaluronic Acid Synthase. *Biochemistry*[online]. **35**(30), 9768-9771 [cit. 2022-10-09]. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi960154k
- [15] SIISKONEN, Hanna, Sanna OIKARI, Sanna PASONEN-SEPPÄNEN a Kirsi RILLA, 2015. Hyaluronan Synthase 1: A Mysterious Enzyme with Unexpected Functions. *Frontiers in Immunology* [online]. **6**(43), 1-2 [cit. 2022-10-09]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2015.00043
- [16] CHOI, Sungchul, Woncheol CHOI, Sekweon KIM, Su-Yeon LEE, Insup NOH a Chan-Wha KIM, 2014. Purification and biocompatibility of fermented hyaluronic acid for its applications to biomaterials. *Biomaterials Research* [online]. **18**(1), 1-3 [cit. 2022-10-09]. ISSN 2055-7124. Dostupné z: doi:10.1186/2055-7124-18-6
- [17] LIU, Long, Yanfeng LIU, Jianghua LI, Guocheng DU a Jian CHEN, 2011. Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microbial Cell Factories* [online]. **10**(1), 1-8 [cit. 2022-12-29]. ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/1475-2859-10-99
- [18] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila, 2002. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii*. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia. ISBN 80-200-1024-6.
- [19] DEANGELIS, Paul, 2008. Monodisperse Hyaluronan Polymers: Synthesis and Potential Applications. *Current Pharmaceutical Biotechnology* [online]. **9**(4), 246-248 [cit. 2023-01-05]. ISSN 13892010. Dostupné z: doi:10.2174/138920108785161550
- [20] BOERIU, Carmen G., Jan SPRINGER, Floor K. KOOY, Lambertus A. M. VAN DEN BROEK a Gerrit EGGINK, 2013. Production Methods for Hyaluronan. *International Journal of Carbohydrate Chemistry* [online]. **2013**, 1-14 [cit. 2023-01-05]. ISSN 1687-9341. Dostupné z: doi:10.1155/2013/624967
- [21] ROSSATTO, Andressa, Jandler TROCADO DOS SANTOS, Maurício ZIMMER FERREIRA ARLINDO, Matheus SARAIVA DE MORAIS, Taiana DENARDI DE SOUZA a Christiane SARAIVA OGRODOWSKI, 2022. Hyaluronic acid production and purification techniques: a review. *Prep Biochem Biotechnol* [online]. **52**(1-11), 1-11 [cit. 2022-12-29]. ISSN 1082-6068. Dostupné z: doi:10.1080/10826068.2022.2042822
- [22] STERN, Robert, Akira A. ASARI a Kazuki N. SUGAHARA, 2006. Hyaluronan fragments: An information-rich system. *European Journal of Cell Biology* [online]. **85**(8), 699-715 [cit. 2022-12-29]. ISSN 01719335. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejcb.2006.05.009
- [23] FRENKEL, Joseph S, 2014. The role of hyaluronan in wound healing. *International Wound Journal* [online]. **11**(2), 159-163 [cit. 2023-01-07]. ISSN 17424801. Dostupné z: doi:10.1111/j.1742-481X.2012.01057.x
- [24] BAHR, Debmalya, Angelo CARPI, Mukesh VERMA a Mehmet GUNDZU, ed., 2014. Cancer Biomarkers: Minimal and Noninvasive Early Diagnosis and Prognosis. 1. Boca Ranton, FL: Taylor & Francis Group. ISBN 9781138076808.
- [25] LOKESHWAR, Vinata B., Wolfgang H. CERWINKA, Tadahiro ISOYAMA a Bal L. LOKESHWAR, 2005. HYAL1 Hyaluronidase in Prostate Cancer: A Tumor Promoter and Suppressor. *Cancer Research* [online]. **65**(17), 7782-7789 [cit. 2022-11-03]. ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1022

- [26] DOMINGUEZ-GUTIERREZ, Paul R., Elizabeth P. KWENDA, William DONELAN, Padraic O'MALLEY, Paul L. CRISPEN a Sergei KUSMARTSEV, 2021. Hyal2 Expression in Tumor-Associated Myeloid Cells Mediates Cancer-Related Inflammation in Bladder Cancer. *Cancer Research*[online]. 81(3), 648-657 [cit. 2022-11-03]. ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-20-1144
- [27] PRICE, Zoe, Noor LOKMAN a Carmela RICCIARDELLI, 2018. Differing Roles of Hyaluronan Molecular Weight on Cancer Cell Behavior and Chemotherapy Resistance. *Cancers* [online]. 10(12), 1-12 [cit. 2022-11-03]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers10120482
- [28] SARAVANAKUMAR, Kandasamy, SeonJu PARK, Sugavaneswaran Siva SANTOSH, et al., 2022. Application of hyaluronic acid in tissue engineering, regenerative medicine, and nanomedicine: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 222(B), 2744-2760 [cit. 2023-03-03]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.10.055
- [29] VALACHOVÁ, Katarína a Ladislav ŠOLTÉS, 2021. Hyaluronan as a Prominent Biomolecule with Numerous Applications in Medicine. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 22(13) [cit. 2023-03-03]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22137077
- [30] BERENBAUM, F., 2013. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis and Cartilage*[online]. 21(1), 16-21 [cit. 2023-03-03]. ISSN 10634584. Dostupné z: doi:10.1016/j.joca.2012.11.012
- [31] LAWANDE, Malini, Aditya DAFTARY, Ankita AHUJA a Bhushan SABNIS, 2022. Role of imaging in surgical decision making in young knee osteoarthrosis. *European Journal of Radiology Open* [online]. 9(100436) [cit. 2023-03-03]. ISSN 23520477. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejro.2022.100436
- [32] MIGLIORE, A, 2015. Effectiveness and utility of hyaluronic acid in osteoarthritis. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism* [online]. 12(1), 31-33 [cit. 2023-03-03]. ISSN 1724-8914. Dostupné z: doi:10.11138/ccmbm/2015.12.1.031
- [33] Aneuploidy, 2023. In: *National Cancer Institute* [online]. USA: National Institute of Health [cit. 2023-03-03]. Dostupné z: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/genetics-dictionary/def/aneuploidy>
- [34] MILLER, David, Susan PAVITT, Vinay SHARMA, et al., 2019. Physiological, hyaluronan-selected intracytoplasmic sperm injection for infertility treatment (HABSelect): a parallel, two-group, randomised trial. *The Lancet* [online]. 393(10170), 416-422 [cit. 2023-03-03]. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(18)32989-1
- [35] WORRILOW, K.C., S. EID, D. WOODHOUSE, et al., 2013. Use of hyaluronan in the selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection (ICSI): significant improvement in clinical outcomes—multicenter, double-blinded and randomized controlled trial. *Human Reproduction* [online]. 28(2), 306-314 [cit. 2023-03-03]. ISSN 1460-2350. Dostupné z: doi:10.1093/humrep/des417
- [36] SARAVANAKUMAR, Kandasamy, SeonJu PARK, Sugavaneswaran Siva SANTOSH, et al., 2022. Application of hyaluronic acid in tissue engineering, regenerative medicine, and

- nanomedicine: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 222(B), 2744-2760 [cit. 2023-03-03]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.10.055
- [37] MAYTIN, Edward V, 2016. Hyaluronan: More than just a wrinkle filler. *Glycobiology* [online]. 26(6), 553-559 [cit. 2023-03-03]. ISSN 0959-6658. Dostupné z: doi:10.1093/glycob/cww033
- [38] The hype on hyaluronic acid, 2020. *Harvard Health Publishing* [online]. Harvard: The President and Fellows of Harvard College [cit. 2023-03-03]. Dostupné z: <https://www.health.harvard.edu/blog/the-hype-on-hyaluronic-acid-2020012318653>
- [39] GAD, S.E., 2014. Polymers. *Encyclopedia of Toxicology* [online]. Elsevier, 2014, 1045-1050 [cit. 2023-03-01]. ISBN 9780123864550. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-386454-3.00912-X
- [40] CHRISTIAN, S.J., 2016. Natural fibre-reinforced noncementitious composites (biocomposites). *Nonconventional and Vernacular Construction Materials* [online]. Elsevier, 2016, 111-126 [cit. 2023-03-01]. ISBN 9780081008713. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100038-0.00005-6
- [41] VODRÁŽKA, Zdeněk, 1996. Biochemie. 2. opr. vyd. Praha: Academia. ISBN 80-200-0600-1.
- [42] OUELLETTE, Robert J. a J. David RAWN, 2015. Amino Acids, Peptides, and Proteins. *Principles of Organic Chemistry* [online]. Elsevier, 2015, 371-396 [cit. 2023-03-01]. ISBN 9780128024447. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-802444-7.00014-8
- [43] SCOTT, J. E., 2007. Secondary Structures in Hyaluronan Solutions: Chemical and Biological Implications. Ciba Foundation Symposium 143 - The Biology of Hyaluronan [online]. Chichester, UK, 2007-09-28, 6-20 [cit. 2023-02-27]. Novartis Foundation Symposia. ISBN 9780470513774. Dostupné z: doi:10.1002/9780470513774.ch2
- [44] ENEV, Vojtěch a kol., 2022. IR-Supported Thermogravimetric Analysis of Water in Hydrogels. *Frontiers in Materials* [online]. 9 [cit. 2023-02-27]. ISSN 2296-8016. Dostupné z: doi:10.3389/fmats.2022.931303
- [45] POUCHLÝ, Julius, 2008. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav* [online]. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT [cit. 2023-03-01]. ISBN 978-80-7080-674-6. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_isbn-978-80-7080-674-6/pages-img/134.html
- [46] ARUNAN, Elangannan, Gautam R. DESIRAJU, Roger A. KLEIN, et al., 2011. Definition of the hydrogen bond (IUPAC Recommendations 2011). *Pure and Applied Chemistry* [online]. 83(8), 1637-1641 [cit. 2023-02-25]. ISSN 1365-3075. Dostupné z: doi:10.1351/PAC-REC-10-01-02
- [47] ČERNÝ, Jiří a Pavel HOBZA, 2007. Non-covalent interactions in biomacromolecules. *Physical Chemistry Chemical Physics* [online]. 9(39), 5291-5303 [cit. 2023-03-01]. ISSN 1463-9076. Dostupné z: doi:10.1039/b704781a
- [48] CHAPLIN, Martin, 2016. Hydrogen bonds. *Water structure and science* [online]. England: Creative Commons Attribution [cit. 2023-04-05]. Dostupné z: https://water.lsbu.ac.uk/water/hydrogen_bonds.html

- [49] Low-barrier hydrogen bond, 2021. In: *Wikipedia* [online]. Wikimedia Foundation [cit. 2023-04-05]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hbond_lengths.svg#/media/File:Hbond_lengths.svg
- [50] TAKANO, Kazufumi, Yuriko YAMAGATA, Jun FUNAHASHI, Yusaku HIOKI, Seiki KURAMITSU a Katsuhide YUTANI, 1999. Contribution of Intra- and Intermolecular Hydrogen Bonds to the Conformational Stability of Human Lysozyme. *Biochemistry* [online]. **38**(39), 12698-12708 [cit. 2023-04-05]. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi9910169
- [51] JOSEPH, Jorly a Eluvathingal D. JEMMIS, 2007. Red-, Blue-, or No-Shift in Hydrogen Bonds: A Unified Explanation. *Journal of the American Chemical Society* [online]. **129**(15), 4620-4632 [cit. 2023-04-19]. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja067545z
- [52] How does the molecular orbital theory describe the bonding in the HF molecule?, 2023. In: *Study.com* [online]. Homework.Study.com [cit. 2023-04-19]. Dostupné z: <https://homework.study.com/explanation/how-does-the-molecular-orbital-theory-describe-the-bonding-in-the-hf-molecule.html>
- [53] WANG, Bo, Wanrun JIANG, Xin DAI, Yang GAO, Zhigang WANG a Rui-Qin ZHANG, 2016. Molecular orbital analysis of the hydrogen bonded water dimer. *Scientific Reports* [online]. **6**(1), 1-7 [cit. 2023-04-05]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep22099
- [54] INOUE, M., 2011. Structural integrity of metal–polymer adhesive interfaces in microelectronics. *Advanced Adhesives in Electronics* [online]. Elsevier, 2011, 157-198 [cit. 2023-04-05]. ISBN 9781845695767. Dostupné z: doi:10.1533/9780857092892.2.157
- [55] BATTEZZATI, Michele a Valerio MAGNASCO, 2009. Classical and quantum evaluation in the low temperature limit of the Keesom integral for the interaction between permanent dipoles. *Comptes Rendus Chimie* [online]. **12**(8), 854-860 [cit. 2023-04-05]. ISSN 16310748. Dostupné z: doi:10.1016/j.crci.2008.09.026
- [56] MOELLER, Therald, John C. BAILAR, Jacob KLEINBERG, Cyrus O. GUSS, Mary E. CASTELLION a Clyde METZ, 1980. THE CHEMICAL BOND. *Chemistry* [online]. Elsevier, 1980, 232-272 [cit. 2023-04-05]. ISBN 9780125033503. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-503350-3.50014-7
- [57] RAYMENT, Ivan, 2003. Protein Structure. *Encyclopedia of Physical Science and Technology* [online]. Elsevier, 2003, 191-218 [cit. 2023-04-05]. ISBN 9780122274107. Dostupné z: doi:10.1016/B0-12-227410-5/00616-5
- [58] FRENCH, Roger H., 2000. Origins and Applications of London Dispersion Forces and Hamaker Constants in Ceramics. *Journal of the American Ceramic Society* [online]. **83**(9), 2117-2146 [cit. 2023-03-01]. ISSN 00027820. Dostupné z: doi:10.1111/j.1151-2916.2000.tb01527.x
- [59] MEYER, Emily E., Kenneth J. ROSENBERG a Jacob ISRAELACHVILI, 2006. Recent progress in understanding hydrophobic interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **103**(43), 15739-15746 [cit. 2023-03-01]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0606422103

- [60] HOLTROP, Flip, Klaas W. VISSCHER, Andrew R. JUPP a J. Chris SLOOTWEG, 2020. Steric attraction: A force to be reckoned with. *Advances in Physical Organic Chemistry* [online]. Elsevier, 2020, 54, 119-141 [cit. 2023-03-01]. *Advances in Physical Organic Chemistry*. ISBN 9780128218204. Dostupné z: doi:10.1016/bs.apoc.2020.08.001
- [61] Zákon č. 402/2000 Sb, Zákon o léčivech. In: Sbíрка zákonů. 2000, částka 113, číslo 402. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/print/cs/2000-402/zneni-0.htm?sil=1>.
- [62] PATRICK, Graham L., 2013. An introduction to medicinal chemistry. 5th ed. Oxford: Oxford University Press. ISBN 978-019-9697-397.
- [63] BIANCONI, Eva, Allison PIOVESAN, Federica FACCHIN, et al., 2013. An estimation of the number of cells in the human body. *Annals of Human Biology* [online]. **40**(6), 463-471 [cit. 2023-02-20]. ISSN 0301-4460. Dostupné z: doi:10.3109/03014460.2013.807878
- [64] MILLER EJ, LAPPIN SL. Physiology, Cellular Receptor. [Updated 2022 Sep 14]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554403/>
- [65] KING, Thomas C., 2007. Tissue Homeostasis, Damage, and Repair. *Elsevier's Integrated Pathology* [online]. Elsevier, 2007, 59-88 [cit. 2023-02-28]. ISBN 9780323043281. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-04328-1.50009-7
- [66] HANDLY, L Naomi, Anna PILKO a Roy WOLLMAN, 2015. Paracrine communication maximizes cellular response fidelity in wound signaling. *ELife* [online]. **4** [cit. 2023-02-28]. ISSN 2050-084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.09652
- [67] MURRAY, Robert K., c2012. *Harperova ilustrovaná biochemie*. 5. české vyd., 1. v nakl. Galén. Praha: Galén. ISBN ISBN978-80-7262-907-7.
- [68] M. WASZKIELEWICZ, A., A. GUNIA, N. SZKARADEK, K. SLOCZYNSKA, S. KRUPINSKA a H. MARONA, 2013. Ion Channels as Drug Targets in Central Nervous System Disorders. *Current Medicinal Chemistry* [online]. **20**(10), 1241-1285 [cit. 2023-02-28]. ISSN 09298673. Dostupné z: doi:10.2174/0929867311320100005
- [69] GARRETT, R. a Charles M. GRISHAM, 2013. *Biochemistry*. 5th ed. Belmont, CA: Brooks/Cole, Centrage Learning. ISBN 978-1133106296.
- [70] The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1994, 2023. *Nobel Prize Outreach AB* [online]. Sweden: Nobel Prize Outreach AB, 1994 [cit. 2023-02-28]. Dostupné z: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1994/press-release>
- [71] APPLING, Dean R., Spencer J. ANTHONY-CAHILL a Christopher K. MATHEWS, 2016. *Biochemistry Concepts and Connections*. Essex, England: Pearson Education Limited. ISBN 978-1-292-11200-8.
- [72] SEVER, R. a C. K. GLASS, 2013. Signaling by Nuclear Receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. **5**(3), a016709-a016709 [cit. 2023-02-23]. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a016709

- [73] ZHAO, Linjie, Shengtao ZHOU a Jan-Åke GUSTAFSSON, 2019. Nuclear receptors: recent drug discovery for cancer therapies. *Endocrine Reviews* [online]. **40**(5), 1207–1249 [cit. 2023-02-23]. ISSN 0163-769X. Dostupné z: doi:10.1210/er.2018-00222
- [74] OAKLEY, Robert H. a John A. CIDLOWSKI, 2013. The biology of the glucocorticoid receptor: New signaling mechanisms in health and disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. **132**(5), 1033-1044 [cit. 2023-02-23]. ISSN 00916749. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaci.2013.09.007
- [75] RANI, Kirti & PALIWAL, Saurabh. (2014). A Review on Targeted Drug Delivery: Its Entire Focus on Advanced Therapeutics and Diagnostics. *Scholars Journal of Applied Medical Sciences*. 2. 328-331.
- [76] FAROKHZAD, Omid C. a Robert LANGER, 2009. Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. *ACS Nano* [online]. 3(1), 16-20 [cit. 2023-02-25]. ISSN 1936-0851. Dostupné z: doi:10.1021/nn900002m
- [77] CLAESSION-WELSH, Lena, 2015. Vascular permeability—the essentials. *Upsala Journal of Medical Sciences* [online]. 120(3), 135-143 [cit. 2023-02-25]. ISSN 0300-9734. Dostupné z: doi:10.3109/03009734.2015.1064501
- [78] WILCZEWSKA, Agnieszka Z.; NIEMIROWICZ, Katarzyna; MARKIEWICZ, Karolina H.; CAR, Halina, 2012. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological Reports*, 64(5), 1020–1037. doi:10.1016/S1734-1140(12)70901-5
- [79] KHAN, Amjad Ali, Khaled S. ALLEMAILEM, Saleh A. ALMATROODI, Ahmed ALMATROUDI a Arshad Husain RAHMANI, 2020. Recent strategies towards the surface modification of liposomes: an innovative approach for different clinical applications. *3 Biotech* [online]. **10**(4), 163-178 [cit. 2023-02-25]. ISSN 2190-572X. Dostupné z: doi:10.1007/s13205-020-2144-3
- [80] NEGI, Lalit Mohan, Manu JAGGI, Vidushi JOSHI, Kar RONODIP a Sushama TALEGAONKAR, 2015. Hyaluronan coated liposomes as the intravenous platform for delivery of imatinib mesylate in MDR colon cancer. *International Journal of Biological Macromolecules*[online]. **73**(), 222-235 [cit. 2023-02-25]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.11.026
- [81] LU, Hongyun, Shengliang ZHANG, Jinling WANG a Qihe CHEN, 2021. A Review on Polymer and Lipid-Based Nanocarriers and Its Application to Nano-Pharmaceutical and Food-Based Systems. *Frontiers in Nutrition* [online]. **8** [cit. 2023-02-23]. ISSN 2296-861X. Dostupné z: doi:10.3389/fnut.2021.783831
- [82] FILIPOVÁ, M., R. RUSINA a K. HOLADA, 2016. Nanočástice jako nosiče léků přes hematoencefalickou bariéru – naděje pro léčbu neurodegenerativních onemocnění v budoucnosti?. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie* [online]. **79/112**(2), 160-167 [cit. 2023-02-23]. Dostupné z: <https://www.csnn.eu/casopisy/ceska-slovenska-neurologie/2016-2-9/nanocastice-jako-nosice-leku-pres-hematoencefalickou-barieru-nadeje-pro-lecbu-neurodegenerativnich-onemocneni-v-budoucnosti-57771>
- [83] AGUILAR, Zoraida P., 2013. Types of Nanomaterials and Corresponding Methods of Synthesis. *Nanomaterials for Medical Applications*[online]. Elsevier, 2013, 33-82 [cit. 2023-03-03]. ISBN 9780123850898. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-385089-8.00002-9

- [84] LIU, Zonghua, Yanpeng JIAO, Yifei WANG, Changren ZHOU a Ziyong ZHANG, 2008. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. **60**(15), 1650-1662 [cit. 2023-02-23]. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2008.09.001
- [85] FREIRE, R. M. a E. LONGHINOTTI, 2014. Inorganic Nanoparticle Materials for Controlled Drug Delivery Systems. In: TIWARI, Atul a Ashutosh TIWARI, ed. *Bioengineered Nanomaterials*. 1. Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group, s. 327-348. ISBN 978-1-4665-8595-9.
- [86] ABLA, Kawthar K. a Mohammed M. MEHANNA, 2022. Freeze-drying: A flourishing strategy to fabricate stable pharmaceutical and biological products. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. **628**(122233), 1-15 [cit. 2022-11-20]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2022.122233
- [87] The freeze Drying Theory and Process Things to Consider, 2018. In: Ellab [online]. Dánsko: Ellab A/S [cit. 2022-12-04]. Dostupné z: https://www.ellab.com/wp-content/uploads/2020/08/the-freeze-drying-theory-and-process_ellab-whitepaper.pdf
- [88] KHAIRNAR, Sandip a Rajesh KINI a Mallinath HARWALKAR a Kishor SALUNKHE a Sanjay CHAUDHARI, 2012. A Review on Freeze Drying Process of Pharmaceuticals. *International Journal of Research in Pharmacy and science* [online]. IJRPS 2013. 76-94 [cit. 2022-11-22]. ISSN 2249-3522.
- [89] SHUKLA, Soham, 2011. Freeze drying process: a review. *International journal of pharmaceutical sciences and research* [online]. 2011-12-1, 12(2), 3061-3068 [cit. 2022-11-19]. ISSN 0975-8232. Dostupné z: doi:10.13040/ijpsr.0975-8232.2(12).3061-68
- [90] Michalicová, P. Podpora fyzikální interakce hyaluronanu a vybraných hydrofobních solutů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 35 s. Vedoucí bakalářské práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
- [91] MICHALICOVÁ, P. Nativní hyaluronan jako nosič hydrofobních molekul. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 79 s. Vedoucí diplomové práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
- [92] 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.
- [93] WITTAYA-AREEKUL, Sakchai a Steven L. NAIL, 1998. Freeze-Drying of tert-Butyl Alcohol/Water Cosolvent Systems: Effects of Formulation and Process Variables on Residual Solvents. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. **87**(4), 491-495 [cit. 2023-03-03]. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1021/js9702832
- [94] BORŮVKOVÁ, T. Stanovení reziduálních látek z přípravy koloidních systémů na bázi biopolymerů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 55 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.

- [95] DAMIRI, Fouad, Yahya BACHRA, Chaimaa BOUNACIR, Asmae LAARAIBI a Mohammed BERRADA, 2020. Synthesis and Characterization of Lyophilized Chitosan-Based Hydrogels Cross-Linked with Benzaldehyde for Controlled Drug Release. *Journal of Chemistry* [online]. **2020**, 1-10 [cit. 2023-03-03]. ISSN 2090-9063. Dostupné z: doi:10.1155/2020/8747639
- [96] WANG, Zhixuan, Yingjie DENG a Xiaopeng ZHANG, 2006. The novel application of tertiary butyl alcohol in the preparation of hydrophobic drug-HP β CD complex. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* [online]. **58**(3), 409-414 [cit. 2023-03-03]. ISSN 0022-3573. Dostupné z: doi:10.1211/jpp.58.3.0017
- [97] ARNAUT, Luis, 2021. Experimental methods. *Chemical Kinetics* [online]. Elsevier, 2021, **2**, 37-91 [cit. 2023-04-01]. ISBN 9780444640390. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-64039-0.00004-2
- [98] ANDERSON, J.M. a G. VOSKERICIAN, 2010. The challenge of biocompatibility evaluation of biocomposites. *Biomedical Composites*[online]. Elsevier, 2010, 325-353 [cit. 2023-04-02]. ISBN 9781845694364. Dostupné z: doi:10.1533/9781845697372.3.325
- [99] BAUM, P., C. SCHOELCH, H. ZIMDAHL-GELLING, et al., 2014. THU0128 Evaluation of Safety, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of BI 638683, A Novel CCR1 Antagonist. *Annals of the Rheumatic Diseases* [online]. **73**(Suppl 2), 223.1-223 [cit. 2023-04-03]. ISSN 0003-4967. Dostupné z: doi:10.1136/annrheumdis-2014-eular.2352
- [100] HARCKEN, Christian, Daniel KUZMICH, Brian COOK, et al., 2019. *Identification of novel azaindazole CCR1 antagonist clinical candidates*[online]. **29**(3), 441-448 [cit. 2023-04-03]. ISSN 0960894X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmcl.2018.12.024
- [101] MAK, Tak W. a Mary E. SAUNDERS, 2006. T Cell Activation. *The Immune Response* [online]. Elsevier, 2006, (14), 373-401 [cit. 2023-04-04]. ISBN 9780120884513. Dostupné z: doi:10.1016/B978-012088451-3.50016-8
- [102] LFA-1 antagonist | BI-1950, 2017. *OpnMe* [online]. Boehringer Ingelheim: Boehringer Ingelheim Open Innovation Portal [cit. 2023-04-04]. Dostupné z: <https://www.opnme.com/molecules/lfa-1-bi-1950>
- [103] GUNDALA, Rishitha, Himani BALUTIA, R. LAVANYA, Ravichandiran VELAYUTHAM a Kuldeep K. ROY, 2020. HCV NS3 serine protease as a drug target for the development of drugs against hepatocellular carcinoma (liver cancer). *Cancer-Leading Proteases* [online]. Elsevier, 2020, 243-263 [cit. 2023-04-04]. ISBN 9780128181683. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-818168-3.00009-7
- [104] COOK, Brian Nicholas a kol, 2010. *INDAZOLEANDPYRAZOLOPYRIDINE COMPOUNDS AS CCR1 RECEPTOR ANTAGONISTS*. USA. US 9,056,858B2. Uděleno 19. 6. 2012. Zapsáno 19. 10. 2010.
- [105] JAWAD, Yaqoob M., Hadeel Tareq HAMAD a Asmaa Satar Jeeiad Mheesin AL-RAGEHEY, 2015. Effect of solvent polarity on the fluorescence properties of (Acridine) molecular. *Journal of the college of basic education* [online]. **21**(89), 197 [cit. 2023-04-07]. Dostupné z: <https://www.iasj.net/iasj/download/01f2ed391fa7a0d8>

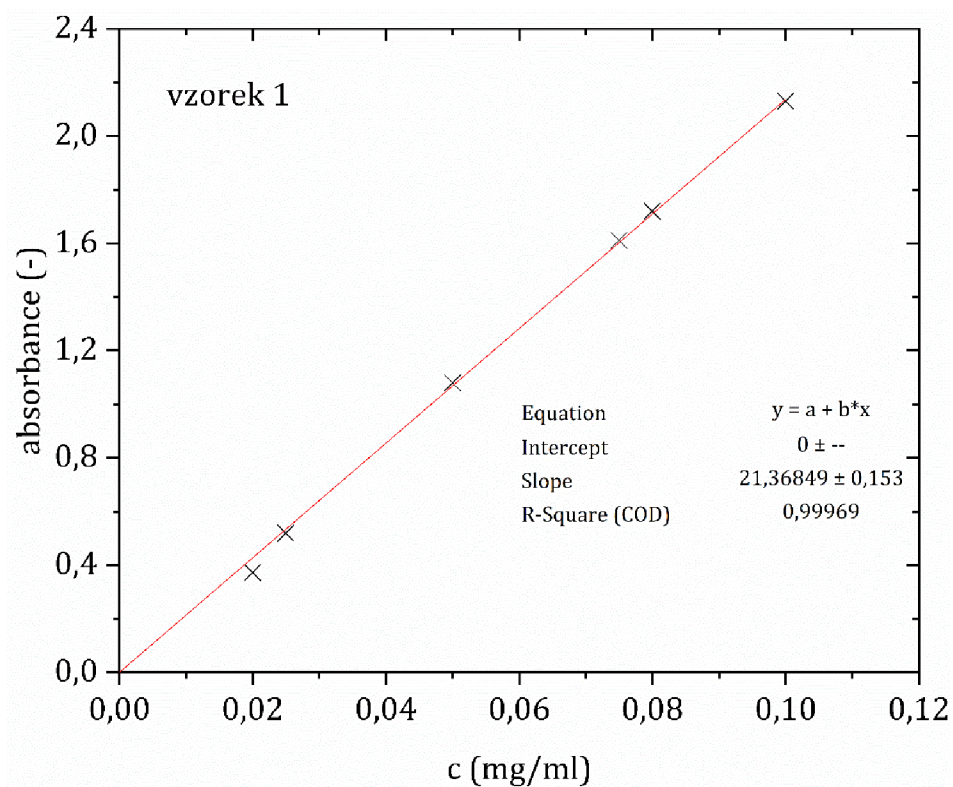
- [106] HEIKO A. SCHIFFTER, Heiko A. a Sebastian VANHOFF, 2009. The determination of structural changes of biopharmaceuticals during Freeze-Drying using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *European Pharmaceutical Review* [online]. **2009**(2), 1-5 [cit. 2023-04-12]. Dostupné z: <https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/944/the-determination-of-structural-changes-of-biopharmaceuticals-during-freeze-drying-using-fourier-transform-infrared-spectroscopy/>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

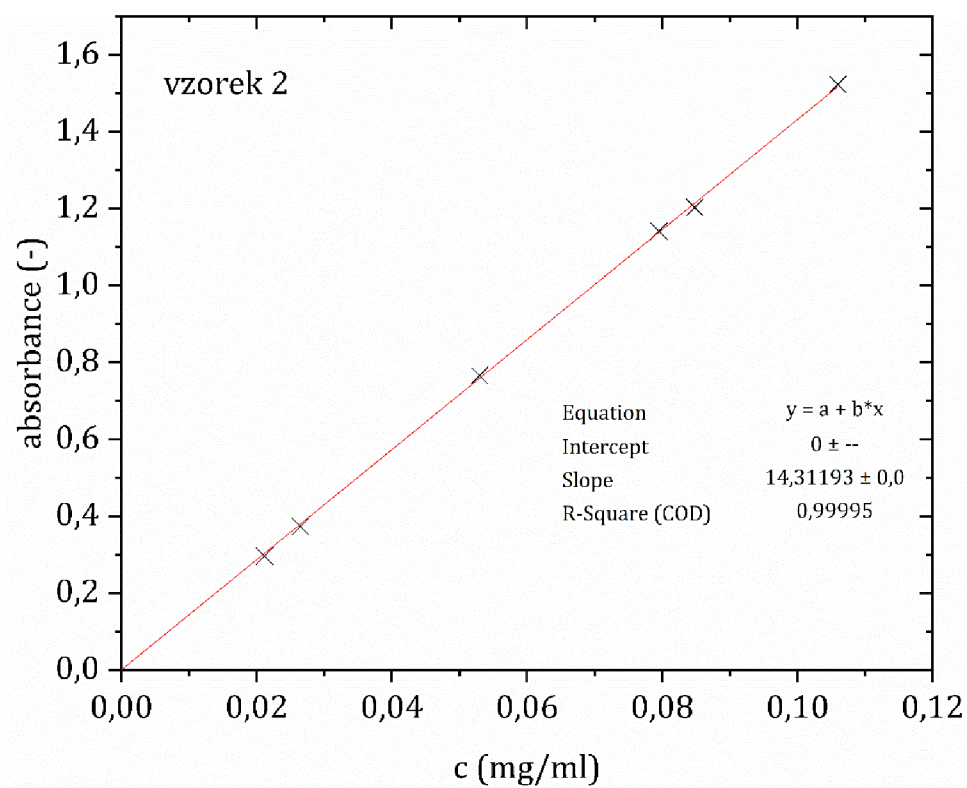
Zkratka	Vysvětlení zkratky
API	farmaceuticky aktivní látka
ATP	adenosintrifosfát
ATR	zeslabená totální reflektance
FTIR	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací
HA	kyselina hyaluronová
HAS	syntáza kyseliny hyaluronové
HS-SPM	head-space mikroextrakce na pevné fázi
HYA	hyaluronan
TBA	terc-butylalkohol
UDP	uridindifosfát

Symbol	Vysvětlení symbolu
χ^2	chí-kvadrátový test
ν	valenční vibrace

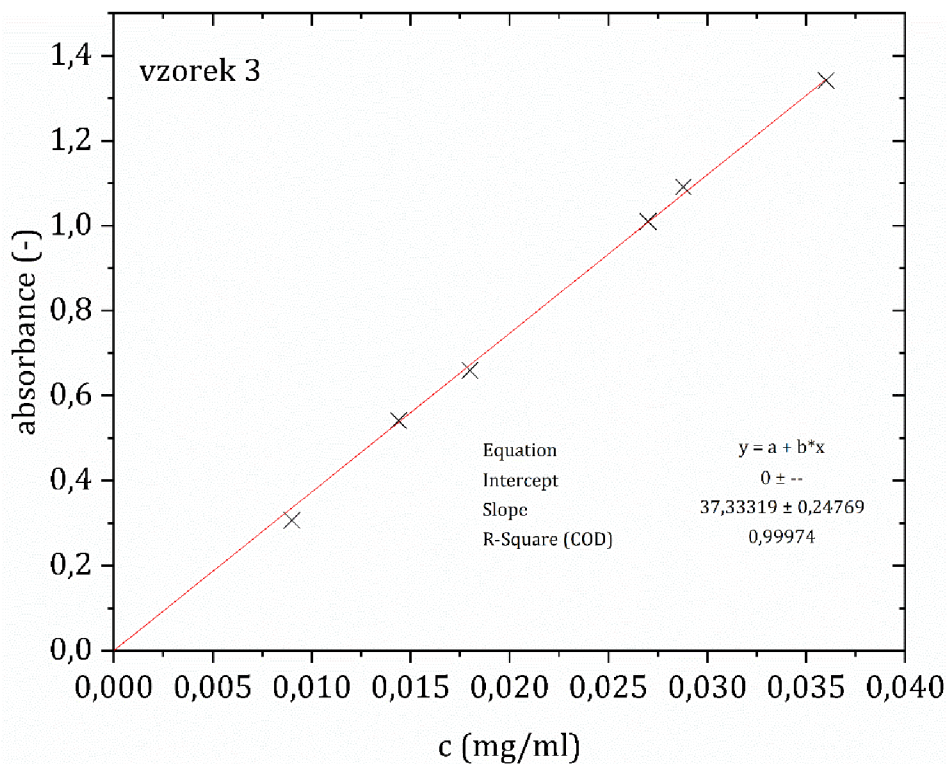
9 PŘÍLOHY



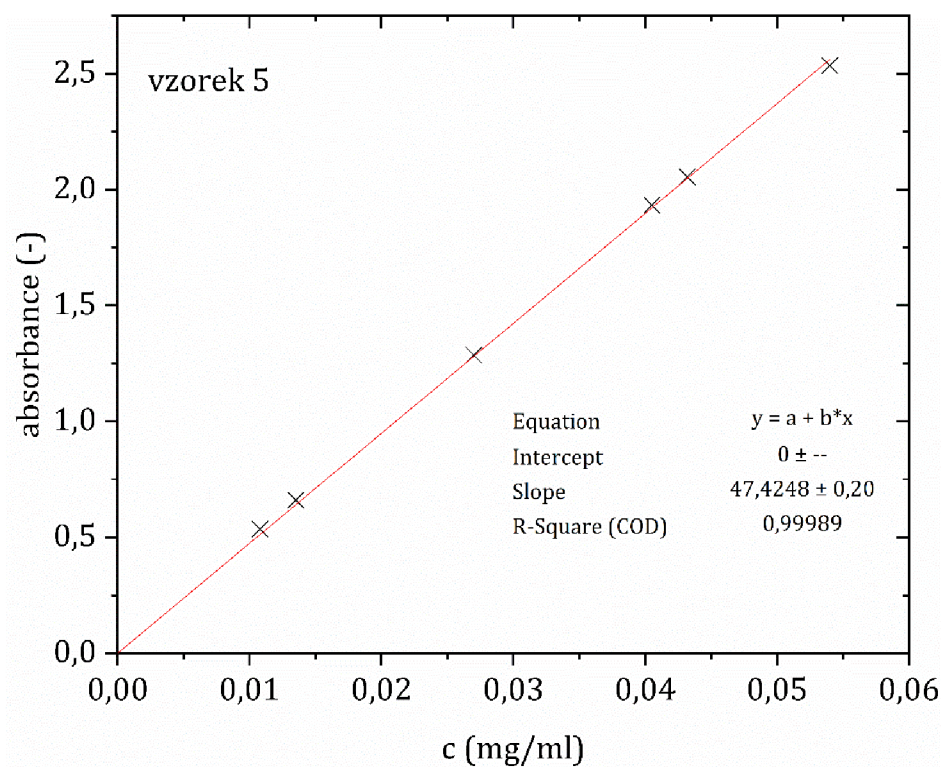
Příloha 1: Kalibrační křivka vzorku 1.



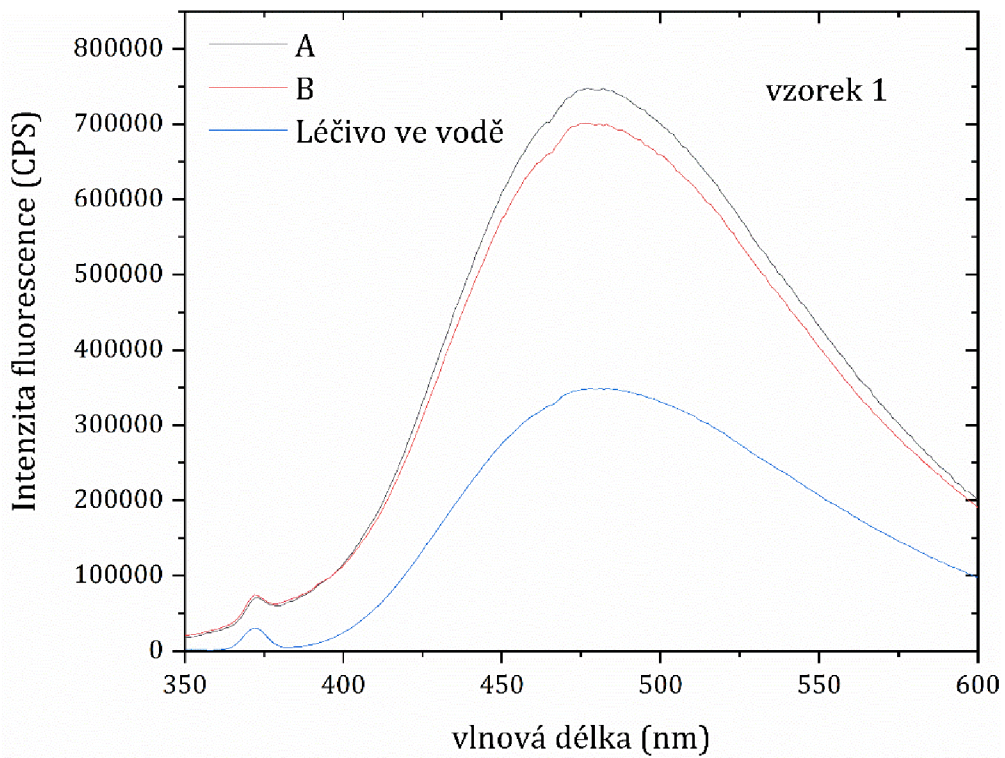
Příloha 2: Kalibrační křivka vzorku 2.



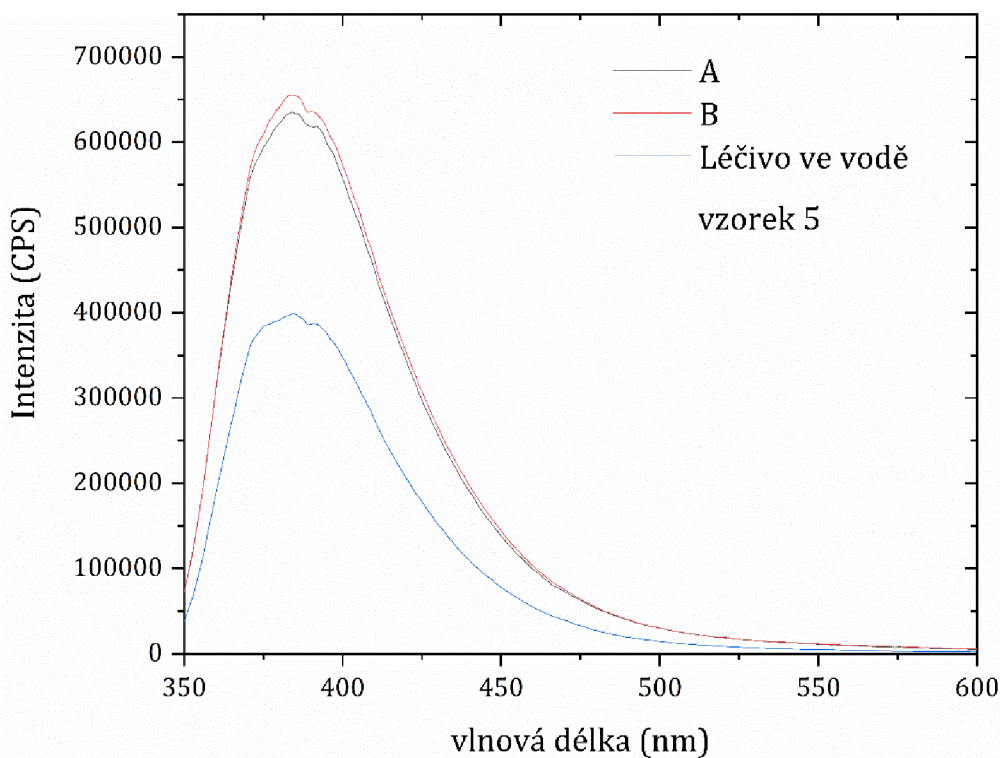
Příloha 3: Kalibrační křivka vzorku 3.



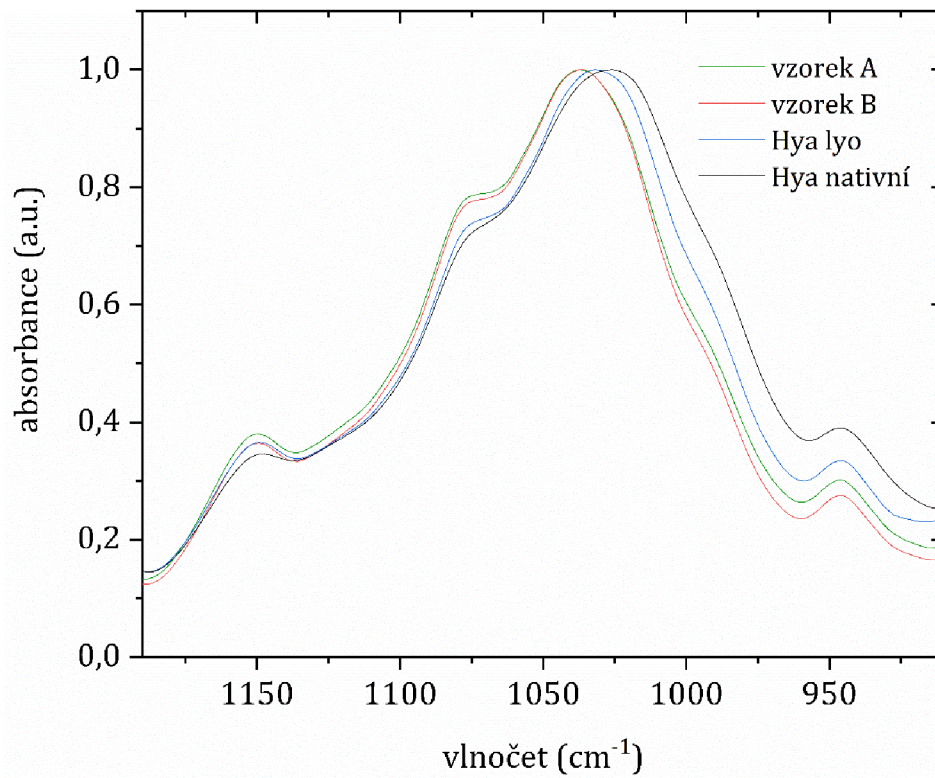
Příloha 4: Kalibrační křivka vzorku 5.



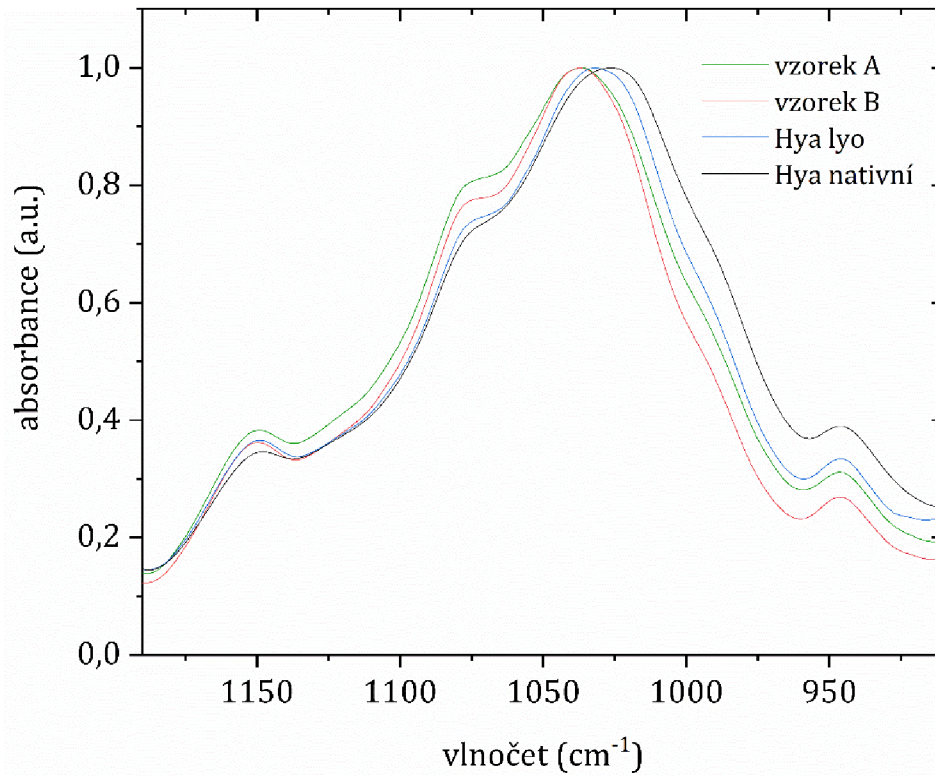
Příloha 5: Emisní fluorescenční spektrum vzorku 1.



Příloha 6: Emisní fluorescenční spektrum vzorku 5.



Příloha 7: IČ spektrum vzorku 2 se zaměřením na absorpční pás valenční vibrace primárních alkoholů.



Příloha 8: IČ spektrum vzorku 5 se zaměřením na absorpční pás valenční vibrace primárních alkoholů.