

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 POLYSACHARIDU A HYDROFOBNÍCH MOLEKUL

PROGRAM-CONTROLLED FREEZE DRYING FOR THE PREPARATION OF THE DRUG-DELIVERY SYSTEM
BASED ON POLYSACCHARIDE AND HYDROPHOBIC MOLECULES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Michaela Dufková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1752/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Michaela Dufková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Programově řízená lyofilizace pro přípravu nosičových systémů na bázi polysacharidu a hydrofobních molekul

Zadání bakalářské práce:

Cílem této bakalářské práce je připravit systém na bázi nativního dextranu, jako vhodného nosiče pro léčiva využívající hydrofobních interakcí mezi tímto biopolymerem a modelových hydrofobních molekul, které budou reprezentovány fluorescenčními sondami.

Nejprve bude studentkou provedena podrobná a aktuální literární rešerše, která bude konkrétně reflektovat vybraný typ polysacharidu, potenciál tohoto systému pro medicínské aplikace a dále i metody přípravy za použití programově řízené lyofilizace.

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

Interakce sond s dextranem budou studovány pomocí fluorescenční spektrometrie, které budou doplněny o další spektrometrické a termické metody.

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2023:

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

Michaela Dufková
studentka

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

Proces lyofilizace upřednostňuje hydrofobní efekt mezi jednotlivými řetězci dextranu. Tento hydrofobní efekt umožňuje hydrofobním léčivům se usadit a setrvat v rámci biopolymeru. Dextran může díky hydrofobnímu efektu sloužit jako nosič pro distribuci hydrofobních léčiv. Cílem této diplomové práce bylo připravit pomocí programově řízené lyofilizace nosičový systém na bázi nativního dextranu. Hydrofobní léčiva byla modelována pomocí fluorescenčních sond pyrenu a prodanu. Účinnost podpory hydrofobního efektu byla studována pomocí infračervené spektrometrie, fluorescenční spektrometrie a skenovacího elektronového mikroskopu. Pomocí ATR-FTIR spektrometrie byl pozorován posun absorpčního pásu valenční vibrace C–O vazby v OH skupinách v alkoholu. Pomocí fluorescenční spektrometrie byl u pyrenu vypočítán emisní polaritní index z 1. a 3. maxima intenzity fluorescence a u prodanu byl pozorován posun maxima intenzity fluorescence k nižším vlnovým délkám. SEM snímky ukázaly, že při procesu lyofilizace struktura dextranu vytvořila hustou síť vláken, což naznačuje přítomnost mnoha míst s vyšším obsahem hydrofobních domén. Těmito metodami byly získány pozitivní výsledky, které dokázaly pozitivní vliv lyofilizace na tvorbu hydrofobního efektu mezi jednotlivými řetězci polysacharidu. Výsledky této práce mohou přispět k vývoji nosičových systémů pro hydrofobní léčiva.

KLÍČOVÁ SLOVA

nativní dextran, nosičový systém, hydrofobní efekt, lyofilizace, ATR-FTIR spektrometrie, fluorescenční spektrometrie, skenovací elektronová mikroskopie

ABSTRACT

The lyophilization process favors the hydrophobic effect between the individual dextran chains. This hydrophobic effect allows hydrophobic drugs to settle and remain within the biopolymer. Due to hydrophobic effect, dextran can serve as a carrier for the distribution of hydrophobic drugs. The goal of this thesis was to prepare a carrier system based on native dextran using program-controlled freeze-drying. Hydrophobic drugs were modeled using the fluorescent probes pyrene and prodane. The effectiveness of promoting the hydrophobic effect was studied using infrared spectrometry, fluorescence spectrometry and scanning electron microscopy. Using ATR-FTIR spectrometry, a shift of the absorption band of the valence vibration of the C–O bond in OH groups in alcohol was observed. Using fluorescence spectrometry, the emission polarity index was calculated for pyrene from the 1st and 3rd maximum fluorescence intensity, and for prodan, a shift of the maximum fluorescence intensity to lower wavelengths was observed. SEM images showed that during the lyophilization process, the dextran structure formed a dense network of fibers, indicating the presence of many sites with a higher content of hydrophobic domains. Positive results were obtained with these methods, which proved the positive effect of lyophilization on the formation of a hydrophobic effect between individual polysaccharide chains. The results may contribute to the development of carrier systems for hydrophobic drugs.

KEYWORDS

native dextran, carrier system, hydrophobic effect, freeze-drying, ATR-FTIR spectrometry, fluorescence spectrometry, scanning electron microscopy

DUFKOVÁ, Michaela. *Programově řízená lyofilizace pro přípravu nosičových systémů na bázi polysacharidu a hydrofobních molekul* [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-05-13]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/149046>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Vojtěch Enev.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla velice poděkovat svému vedoucímu doc. Ing. Vojtěch Enev, Ph.D. za jeho trpělivost, ochotu, odborné vedení a věnovaný čas při psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat za výpomoc při měření a zpracování naměřených dat Ing. Michalovi Kalinovi, Ph.D., Ing. Monice Trudičové a laborantce Leoně Kubíkové za jejich ochotu a čas. Zároveň bych chtěla poděkovat za podporu mojí rodiny, přítele a přátel v průběhu celého studia.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Dextran	9
2.1.1	Vlastnosti.....	9
2.2	Využití	10
2.2.1	Plazmové expandéry	10
2.2.2	Cílená distribuce léčiv	10
2.2.2.1	<i>Micely</i>	10
2.2.2.2	<i>Pasivní cílení</i>	11
2.2.2.3	<i>Aktivní cílení</i>	11
2.2.3	Hojení ran	11
2.2.4	Další využití	12
2.3	Lyofilizace	12
2.3.1	Lyofilizátor	12
2.3.2	Proces lyofilizace	13
2.3.3	Organická rozpouštědla	14
2.3.4	Způsoby zamražení vzorku	14
2.4	Fluorescence	14
2.4.1	Jablonského diagram	15
2.4.2	Fluorescenční sondy	16
2.4.2.1	<i>Pyren</i>	16
2.4.2.2	<i>Prodan</i>	16
2.4.3	Steady-state	16
2.4.4	Anizotropie	17
2.5	Současný stav řešené problematiky	17
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	19
3.1	Použité chemikálie.....	19
3.2	Použité přístroje, programy a pomůcky	19
3.3	Příprava vzorků.....	20
3.3.1	Postup přípravy zásobních roztoků	20
3.3.2	Příprava vzorku pro měření molekulové hmotnosti dextranu pomocí vylučovací chromatografie s víceúhlovým statickým rozptylem světla	20
3.3.3	Příprava vzorků pro lyofilizaci.....	20

3.3.4	Příprava vzorků pro měření na fluorescenčním spektrometru	20
3.4	Postup měření	21
3.4.1	Změření molekulové hmotnosti dextransu pomocí vylučovací chromatografie s víceúhlovým statickým rozptylem světla	21
3.4.2	Nastavení lyofilizátoru	21
3.4.3	Měření vlhkosti vzorků pomocí termogravimetrické analýzy	22
3.4.4	Měření na ATR-FTIR a RAMAN spektrometru	22
3.4.5	Měření na fluorescenčním spektrometru	23
3.4.6	Měření na skenovacím elektronovém mikroskopu	23
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	24
4.1	Výsledná molekulová hmotnost dextransu	24
4.2	Termogravimetrická analýza	24
4.3	ATR-FTIR a RAMAN spektrometrie.....	24
4.3.1	Pyren.....	24
4.3.2	Prodan.....	28
4.4	Fluorescenční spektrometrie	30
4.4.1	Pyren.....	31
4.4.2	Prodan.....	32
4.5	SEM	34
5	ZÁVĚR.....	37
6	POUŽITÁ LITERATURA	39
7	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	42
7.1	Seznam zkratek	42
7.2	Seznam symbolů	42
8	PŘÍLOHY	44

1 ÚVOD

Polysacharidy jsou složeny z řady monosacharidů, které jsou spojeny glykosidickými vazbami. Tyto biopolymery jsou biokompatibilní, biodegradabilní a dobře rozpustné jak ve vodě, tak v organických rozpouštědlech. Polysacharidy mohou být modifikovány a mít tak velkou vazebnou kapacitu. Polysacharidy jsou látky, které díky svým vlastnostem mohou být dobrým nosičovým systémem pro hydrofobní léčiva.

Nosičové systémy na bázi biopolymer-hydrofobní léčivo mohou být micely, polymerní micely a liposomy. Všechny tyto systémy mají hydrofobní a hydrofilní část, díky kterým dokáže dovnitř struktury inkorporovat aktivní látku a transportovat ji. Ve vodném roztoku je hydrofilní povrch orientován do roztoku a hydrofobní povrch je skryt uvnitř domény. Nepochybně oblasti jsou pak chráněny hydratačním obalem [1].

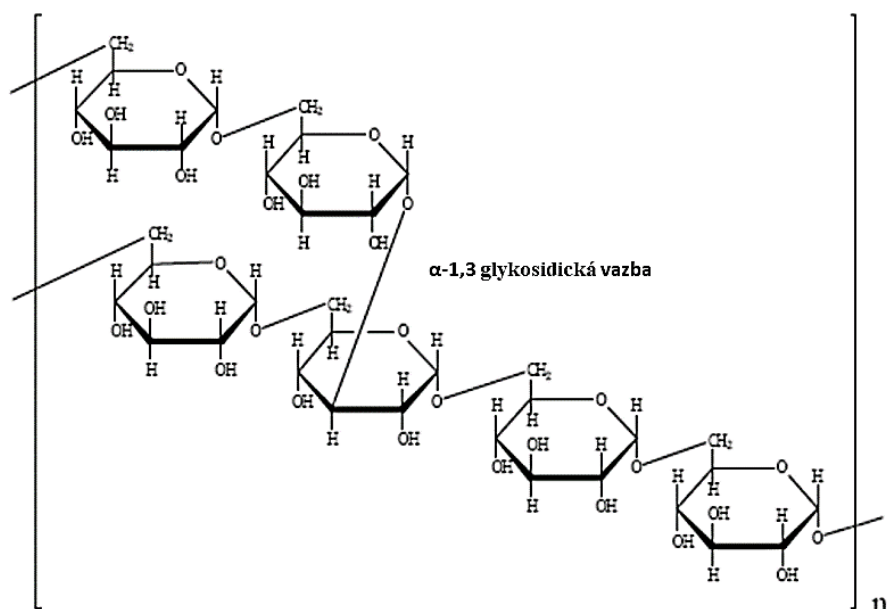
Dextran má velmi příznivé vlastnosti pro to, aby mohl být používán jako nosič hydrofobních léčiv. Má velkou molekulovou hmotnost a je biokompatibilní, biologicky odbouratelný a velmi stabilní. Již v dnešní době má všestranné využití [2]. Intravenózní roztoky s dextranem jsou používány jako objemové expandéry a prostředky parenterální výživy [3]. Deriváty dextranu jsou často používány jako nosiče pro cílenou distribuci léčiv, např. pro chemoterapeutika, vakcíny a léčiva [1], [4]. Dále se z něj vyrábějí hydrogely pro hojení ran anebo se používá v kosmetice, očních kapkách, stabilizátorech pro léčiva a parfuzních roztocích pro konzervaci orgánů [3].

Cílem této bakalářské práce bylo připravit pomocí lyofilizace systém na bázi nativního dextranu jako vhodného nosiče léčiv využívající hydrofobního efektu mezi polysacharidem a hydrofobními molekulami, které jsou modelovány fluorescenčními sondami pyrenu a prodanu. Pomocí lyofilizace bylo odstraněno rozpouštědlo a poté byla účinnost tohoto procesu vyhodnocena použitím infračervené spektrometrie a skenovacího elektronového mikroskopu. Dále byl sledován výskyt hydrofobního efektu, který umožňuje umístění hydrofobního léčiva v rámci polysacharidového řetězce, pomocí ustálené fluorescenční spektrometrie.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Dextran

Dextran je přírodní polysacharid skládající se z dlouhého řetězce glukózových jednotek navzájem spojených převážně pomocí α -1,6, α -1,3 a α -1,4 glykosidických vazeb. V tomto polysacharidu se převážně vyskytuje α -1,6 glykosidická vazba, další vazby zajišťují větvení řetězce (viz Obr. 1). Hydroxylové skupiny přítomné v dextransu nabízejí mnoho míst pro derivatizaci, což umožňuje navrhování funkcionalizovaných konjugátů s různými molárními hmotnostmi, tvary a funkčními skupinami v řetězci. Dextran se komerčně vyrábí z média obsahujícího sacharózu, jako je melasa, nebo také pomocí fermentačního procesu využívající bakterie *Leuconostoc mesenteroides*. Parametry procesu ovlivňují výtěžek a střední molekulovou hmotnost dextransu [2], [3], [5], [6].



Obr. 1: Struktura dextransu [7].

2.1.1 Vlastnosti

Střední molekulová hmotnost frakcí dextransu se může pohybovat v rozmezí od 1 000 do 2 000 000 Daltonů. S rostoucí molekulovou hmotností se řetězec polysacharidu čím dál více větví, to má velký vliv na jeho vlastnosti. Dextran má velmi příznivé vlastnosti, díky kterým má všestranné využití. Je to neutrální polysacharid, a proto je dobře rozpustný ve vodě, methylsulfoxidu, formamidu, ethylenglykolu a glycerolu. A naopak je nerozpustný v nižších alifatických alkoholech, ketonech a esterech, např. v methanolu, ethanolu, butanolu, acetonu a ethylacetátu. Dextran je také nerozpustný v chloroformu, ethylenchloridu, pyridinu, benzenu a diethyletheru. Jeho rozpustnost neovlivňuje ani pH. Je biokompatibilní, biologicky odbouratelný a velmi stabilní [2], [3], [4].

2.2 Využití

2.2.1 Plazmové expandéry

Dextran má velmi rozmanitou oblast použití. Intravenózní roztoky s dextranem jsou používány jako objemové expandéry a prostředky parenterální výživy. Takový roztok poskytuje osmoticky neutrální tekutinu, která je v těle trávena buňkami na glukózu a volnou vodu, a tedy nezvyšuje kapacitu krve přenášet kyslík, ale pouze nahrazují její objem. Občas se používá k náhradě ztracené krve v nouzových situacích, kdy krevní derivát není k dispozici. Používají se také k léčbě dehydratace. Dále je dextran známý pro své účinky snižující viskozitu krve a antitrombotické účinky [3], [4].

2.2.2 Cílená distribuce léčiv

Dextran je nejčastěji používán ve farmaceutickém průmyslu. Dextranový řetězec má amfifilní charakter, a tedy obsahuje jak hydrofilní část, tak hydrofobní část. V jeho struktuře se nacházejí dextranové, resp. sacharidové funkční hydroxylové (–OH) skupiny, které nabízejí snadný bod pro chemickou konjugaci s jinými materiály. Ve vodném roztoku dochází k uspořádání řetězce do podoby kroucené stuhly, ve které je hydrofilní povrch orientován do roztoku a hydrofobní povrch je skryt uvnitř domény. Nepolární oblasti jsou pak chráněny hydratačním obalem. Jako příklad lze dextran modifikovat hydrofobními skupinami za účelem vytvoření amfifilů na bázi dextranu. Tyto amfifilní materiály mohou zapouzdřit chemoterapeutika špatně rozpustná ve vodě prostřednictvím hydrofobního efektu a sestavit se do nanonosičů. Tento nosič poté zajišťuje transport aktivní látky přímo do postižené tkáně. Dextran může být nosičem pro různé vakcíny a léčiva. Pro toto využití se často používají deriváty dextranu, zejména DEAE-dextran [1], [4], [8].

2.2.2.1 Micely

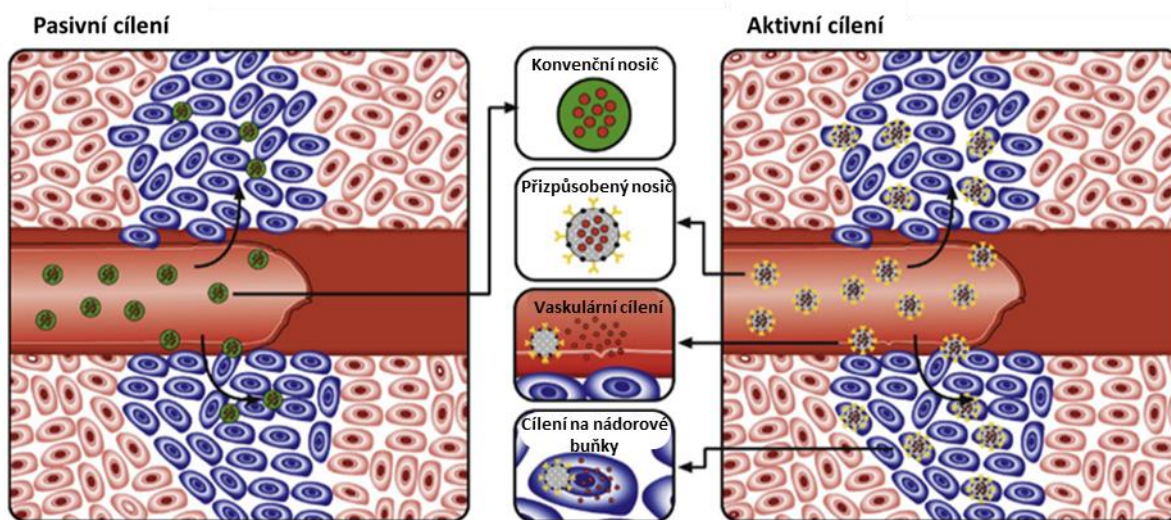
Polymerní micely jsou nosičové systémy, které fungují na základě hydrofobního efektu. Velikost jejich částic se pohybuje v rozmezí 5–100 nm. Micely mají vnější hydrofilní část a vnitřní hydrofobní část, díky kterým dokáže dovnitř struktury inkorporovat aktivní látku a transportovat ji. Micely jako nosiče léčiv dokážou poskytnout řadu výhod, dokážou rozpouštět špatně rozpustná léčiva, a tím zvýšit jejich biologickou dostupnost, mohou zůstat v krvi dostatečně dlouho a zajistit postupnou akumulaci v požadované oblasti. Tato odolnost je mimořádně důležitou vlastností micel jako nosičů léčiv. Jejich velikost jim umožňuje akumulovat se v oblastech těla s prosakující vaskulaturou. Mohou být cíleny připojením specifického ligandu k vnějšímu povrchu a mohou být snadno a reprodukovatelně připraveny ve velkých množstvích. V micelární formě je léčivo (především špatně rozpustné léčivo) dobře chráněno před možnou inaktivací působením biologického prostředí a nevyvolává nežádoucí vedlejší účinky [9].

2.2.2.2 Pasivní cílení

Dlouho cirkulující mikročástice o relativně malé velikosti (100–200 nm) obsahující léčivo nebo velké makromolekulární agregáty. Tyto mikročástice se mohou pomalu akumulovat v patologických místech s postiženou a děravou vaskulaturou (jako jsou nádory, záněty a infarktové oblasti) prostřednictvím efektu zvýšené permeability a retenčního efektu, známé také jako pasivní cílení nebo akumulace prostřednictvím narušeného filtračního mechanismu [9].

2.2.2.3 Aktivní cílení

Aktivního cílení je obvykle dosaženo konjugací nanočástice na cílenou oblast, čímž se umožní preferenční akumulace léčiva v postižené tkáni. Tyto nanočástice mohou být nasměrovány na sacharidy, receptory a antigeny na povrchu buněk. Častým sacharidem nádorových buněk je lektin. Právě na tento sacharid může být cílena nanočástice nesoucí léčivo. Má to však své nevýhody, interakce mezi sacharidy a lektiny jsou zaměřeny na celé orgány, a mohly by tak být škodlivé pro normální tkáň. Další typ cílení je řízený receptorem a antigenem. Jedná se o proces, při kterém extracelulární částice vstupují do intracelulárního prostředí. Obecně je léčivo navázané na polymerní nosič přijato do buňky prostřednictvím interakcí ligand-receptor. K disociaci léku z jeho polymeru může dojít v extracelulárním prostoru, na buněčném povrchu nebo v lysozomech lysozomálními enzymy, což vede k uvolnění léčiva do cytosolu [10].



Obr. 2: Pasivní a aktivní cílení [11].

2.2.3 Hojení ran

Na hojení ran a popálenin se pro své vlastnosti často používají hydrogely. Hydrogely jsou široce používány při léčbě ran díky své vynikající biokompatibilitě, zadržování vody a nastavitelným mechanickým vlastnostem. Hydrogely jsou makromolekulární zesíťované biopolymery, které se hojně používají při cíleném dodávání léčiv nebo transportu buněk a molekul. Hydrogel na bázi dextranu podporuje pozoruhodnou neovaskularizaci a regeneraci

kůže bez jakýchkoli dalších růstových faktorů, cytokinů nebo buněk. Hydrogely jsou také účinným nosičem pro orgánově specifické dodávání hydrofobních léčiv. Dextranový hydrogel může být také účinně použit jako antibakteriální sloučenina [12], [13], [14].

2.2.4 Další využití

Dextran může být také nalezen v kosmetice, očních kapkách, stabilizátorech pro léčiva a perfuzních roztocích pro konzervaci orgánů. Může být použit jako aktivní složka v očních kapkách nebo jako náhrada slz díky jeho lubrikační povaze [3].

Dextran se hojně používá jako pomocná látka při lyofilizaci. Je známo, že molekula dextranu prospívá strukturální stabilitě lyofilizovaných produktů, stabilitě proteinu a obnově enzymové aktivity po lyofilizaci. Dále lze Dextrany použít ke kryokonzervaci buněčných linií, přípravků kmenových buněk a biologických vzorků, nebo také pro skladování orgánů pro transplantaci [3].

2.3 Lyofilizace

Lyofilizace je metoda široce používaná ve farmaceutickém a biotechnologickém průmyslu. Lyofilizace je proces používaný pro sušení a zlepšení stability různých farmaceutických produktů včetně virů, vakcín, proteinů, peptidů nebo koloidních nosičů (liposomů, nanočástic, nanoemulzí). Lyofilizační techniky se také používají ke zlepšení rychlosti rozpouštění a orální biologické dostupnosti léků se špatnou rozpustností a vysokou permeabilitou. Metoda snižuje kontaminaci a zlepšuje kvalitu produktu. Rostoucí počet parenterálních produktů se připravuje technikami lyofilizace. Při tomto způsobu se vodný roztok léčiva zmrazí a vázaná voda se asepticky odstraní sublimací, respektive vakuovým sušením. Roztoky farmaceutických prášků připravené pro lyofilizaci často obsahují různé koncentrace organického rozpouštědla. Lyofilizace je běžně používaná technika pro vývoj formulací malých molekul, proteinů a vakcín, které jsou nestabilní v médiu nebo jsou termolabilní povahy. Lyofilizace samotného léčiva však představuje určité problémy při vývoji lékové formy, které lze překonat začleněním pomocných látek do formulace [3], [15], [16], [17].

2.3.1 Lyofilizátor

Typická vymrazovací sušička ve výrobním měřítku sestává ze sušící komory obsahující police s regulovanou teplotou, která je spojena s kondenzační komorou přes velký ventil. V komoře kondenzátoru je umístěna řada desek nebo cívek, které lze udržovat při velmi nízké teplotě (méně než $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$). Ke kondenzátorové komoře je zapojeno jedno nebo více vývěv v sérii pro dosažení tlaků v rozsahu 4 až 40 Pa v celém systému [16]. Pro příklad v této práci je použit novější přístroj SP VirTis AdVantage Pro lyofilizátor zobrazený na Obr. 3.



Obr. 3: SP VirTis AdVantage Pro lyofilizátor [18].

2.3.2 Proces lyofilizace

Proces ve své podstatě spočívá v oddělení kapalné vody z vlhkého pevného produktu nebo z roztoku či disperze dané koncentrace ve formě pevné fáze (ledu) a jejím následném odstranění vakuovou sublimací, přičemž zůstanou rozpuštěné látky nebo substráty v jejich bezvodém nebo téměř bezvodém stavu. Hnací silou pro lyofilizaci je parciální tlakový rozdíl vody na sublimující ledové ploše a na kondenzátoru [17].

Cyklus se skládá ze čtyř odlišných fází, které se však mohou částečně překrývat:

1. Roztok obsahující sušený produkt se zmrazí na chlazených policích. Během tohoto procesu se kapalný roztok nebo suspenze ochladí natolik, že dojde ke krystalizaci vody a vytvoření ledu. Jak proces zmrazování pokračuje, stále více vody obsažené v kapalině zamrzá. To má za následek zvýšení koncentrace zbývající kapaliny. Jak se roztok nebo suspenze stává koncentrovanější, její viskozita se zvyšuje, což vyvolává inhibici další krystalizace. Tato vysoce koncentrovaná a viskózní kapalina tuhne a poskytuje amorfní, krystalickou nebo kombinovanou amorfně-krystalickou fázi [16], [17].

2. **Primární sušení:** Stupeň primárního sušení zahrnuje sublimaci ledu ze zmrazeného produktu. V tomto procesu se teplo přenáší z police do zmrazeného roztoku přes ták a lyofilizační baňku. Led sublimuje a vytvořená vodní pára prochází vysušenou částí produktu do povrchu vzorku. Vodní pára je přenesena z povrchu produktu přes komoru do kondenzátoru, kde kondenzuje [16], [17].

3. **Sekundární sušení** zahrnuje odstranění absorbované vody z produktu zvýšením teploty polic. Jedná se o pevně vázanou vodu (krystalická a semi-krystalická subpopulace molekulární vody), která se během zmrazování neoddělila jako led a nesublimovala [16], [17].

4. Kondenzátor se zahřeje, aby se rozpustil a odstranil nasbíraný led [17].

2.3.3 Organická rozpouštědla

Rozpouštědla mohou být přidána ke snížení rychlosti degradace aktivního materiálu ve vodě během zpracování. Přítomnost organických rozpouštědel ovlivňuje vlastnosti zmrazování produktů chlazených konvenčními technikami. Rozpouštědla zadržují různá množství vody a různé koncentrace rozpuštěného léčiva. Množství zadržené vody se může lišit v závislosti na hydrofilních vlastnostech rozpouštědla. Přítomnost rozpouštědel ovlivňuje rychlost sušení, volbu konstrukce zařízení, výrobní kapacitu a kvalitu produktu. Příklady rozpouštědel vhodných pro lyofilizaci: terc-butylalkohol, ethanol, n-propanol, n-butanol, isopropylalkohol, ethylacetát, dimethylkarbonát, acetonitril, dichlormethan a methylethylketon [15], [19].

2.3.4 Způsoby zamražení vzorku

Správná teplota, na kterou musí být roztok ochlazen, je mírně pod teplotou skelného přechodu. Přímou lze proces lyofilizace řídit pouze třemi parametry: teploty kondenzátoru a police, tlak v komoře a čas jednotlivých kroků sušení [16], [17].

2.4 Fluorescence

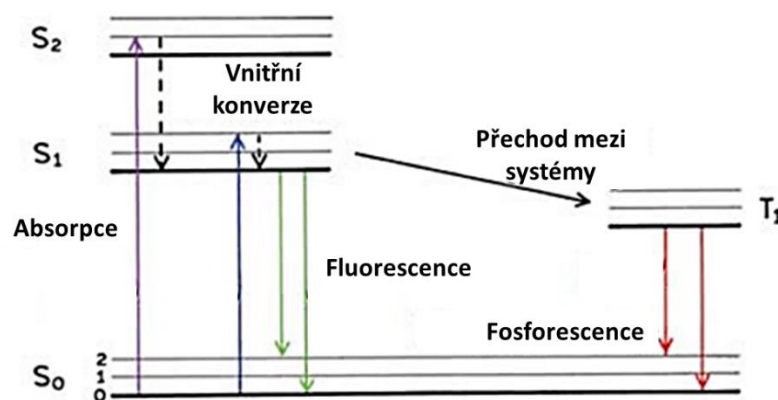
Luminiscence je emise ultrafialových, viditelných nebo infračervených fotonů z elektronicky excitovaných stavů. Fluorescence a fosforescence jsou zvláštní případy luminiscence. Fluorescence je emise fotonů, ke které dochází během nanosekund po absorpci světla, které má typicky kratší vlnovou délku. Nejprve dochází k excitaci, která je způsobena absorpcí fotonu. Tato absorpce přivádí absorbující látky do elektronově excitovaného stavu. Poté dochází k emisi fotonů doprovázející deexcitaci, ta se pak nazývá fotoluminiscence (fluorescence, fosforescence nebo zpožděná fluorescence). Emisní rychlosti fluorescence obvykle dosahují hodnot kolem 10^8 s^{-1} , což znamená, že typická doba života fluorescence se pohybuje kolem 10 ns. Emisní spektra se výrazně odlišují a jsou závislá na chemické struktuře fluoroforu a rozpouštědla, ve kterém je rozpuštěn. Rozdíl mezi excitační a emitovanou vlnovou délkou je známý jako Stokesův posun. Podle Stokesova pravidla by vlnová délka fluorescenční emise měla být vždy vyšší než absorpce. Ve většině případů však absorpční spektrum částečně překrývá fluorescenční spektrum, tj. část světla je emitována na kratších vlnových délkách než absorbované světlo. Takové pozorování se zdá být na první pohled v rozporu s principem zachování energie. Takový energetický defekt je však kompenzován tím, že při pokojové teplotě je malý zlomek molekul na vibrační úrovni vyšší než na úrovni 0 (distribuce mezi úrovněmi energie splňujícími Boltzmannův zákon) v základním stavu i v excitovaném stavu. Při nízké teplotě by tato odchylka od Stokesova zákona měla zmizet. Fluorescence se typicky vyskytuje u aromatických molekul. Jedním široce používaným fluoroforem je chinin, který je přítomen v tonické vodě. Další známé fluorofory jsou například fluorescein, rhodamin, antracen a perylen. Spektra některých sloučenin např. perylenu, vykazují významnou strukturu díky individuálním vibračním energetickým hladinám základního a excitovaného stavu. Jiné sloučeniny, jako je chinin, vykazují spektra bez vibrační struktury. Důležitou vlastností fluorescence je vysoká citlivost detekce [20], [21].

Analytické techniky založené na fluorescenční detekci jsou velmi oblíbené pro svou vysokou citlivost a selektivitu spolu s výhodami prostorového a časového rozlišení a možností dálkového

snímání pomocí optických vláken. Když je analyt fluorescenční, je možná přímá fluorimetrická detekce pomocí spektrofluorometru pracujícího při vhodných excitačních a pozorovacích vlnových délkách. Byla popsána řada oblastí použití: analýza látek znečišťujících ovzduší a vodu, monitorování průmyslových procesů, monitorování klinicky významných druhů a kriminologie [20].

2.4.1 Jablonského diagram

Procesy, ke kterým dochází mezi absorpcí a emisí světla, jsou obvykle znázorněny Jablonského diagramem. Jablonského diagramy se často používají jako výchozí bod pro diskusi o absorpci a emisi světla.



Obr. 4: Jablonského diagram [20]

V tomto diagramu jsou uzemnění singletu, první a druhý elektronický stav znázorněny pomocí S₀, S₁ a S₂. Na každé z těchto úrovní elektronové energie mohou fluorofory existovat v řadě vibračních energetických úrovní znázorněných číslem 0, 1, 2. Přechody mezi stavy jsou znázorněny jako svislé čáry pro ilustraci okamžité povahy absorpce světla. K absorpci a emisi dochází většinou z molekul s nejnižší vibrační energií. Větší energetický rozdíl mezi excitovanými stavy S₀ a S₁ je příliš velký pro tepelnou populaci S₁. Z tohoto důvodu používáme k indukci fluorescence světlo a ne teplo. Po absorpci světla obvykle probíhá několik dějů. Fluorofor je obvykle excitován na vyšší vibrační úroveň buď S₁ nebo S₂. Z důvodu nestability fluoroforu v těchto úrovních se molekuly v kondenzovaných fázích rychle uvolňují na nejnižší vibrační úroveň S₁. Tento nezářivý proces se nazývá vnitřní konverze. Fluorescenční emise je obecně návrat z tepelně ekvilibrovaného excitovaného stavu, tj. vibračního stavu S₁ s nejnižší energií na vyšší excitovanou vibrační hladinu základního stavu. Konverze z úrovně S₁ na T₁ se nazývá mezisystémové křížení. Emise z tripletového stavu T₁ do singletového stavu S₀ se nazývá fosforescence a je obecně posunuta k delším vlnovým délkám (nižší energie) vzhledem k fluorescenci. Přechod z T₁ do základního stavu singletu je však zakázán a v důsledku toho jsou rychlostní konstanty pro tripletovou emisi o několik řádů menší než pro fluorescenci [20], [21].

2.4.2 Fluorescenční sondy

V důsledku silného vlivu okolního prostředí na fluorescenční emisi se v současnosti fluorescenční molekuly používají jako sondy pro výzkum fyzikálně-chemických, biochemických a biologických systémů. Fluorescenční sondy mohou nabídnout velké množství informací v různých oblastech. Fluorescenční sondy lze rozdělit do tří tříd: vnitřní (vlastní) sondy, vnější kovalentně vázané sondy a vnější asociační sondy. Ideální jsou vnitřní sondy, ale existuje jen několik příkladů (např. tryptofan v proteinech). Výhodou kovalentně vázaných sond oproti vnějším asociačním sondám je to, že je známa jejich poloha. Existují různé příklady sond kovalentně připojených k surfaktantům, polymerním řetězcům, fosfolipidům, proteinům, polynukleotidům. Nejznámější je anthroyloxystearová kyselina (derivát kyseliny stearové) s anthracenovou skupinou, která umožňuje sondování micelárních systémů nebo dvojvrstev v různých hloubkách. Výše uvedené příklady ukazují, že velmi důležitým kritériem při výběru sondy je její citlivost na konkrétní vlastnost mikroprostředí, ve kterém se nachází, jako například polarita, kyselost atd. Na druhou stranu je v některých případech výhodnější necitlivost k chemické povaze prostředí, například při fluorescenční polarizaci nebo experimentech s přenosem energie [20], [21].

2.4.2.1 Pyren

Pyren je kondenzovaný aromatický uhlovodík, který je vysoce hydrofobní a citlivý na polaritu okolního prostředí. Je málo rozpustný ve vodě, a tedy fluoreskuje i z vodného prostředí. Pyren je dobře známá fluorescenční sonda pro hodnocení polarit různých médií na základě poměru intenzit vibronických pásů nebo na základě fluorescence. Poměr intenzit vibronických pásů klesá v méně polárním médiu. A čím větší je pokles fluorescence ze singletového elektronově excitovaného stavu, tím méně polární je prostředí, ve kterém se pyren nachází [22], [23].

2.4.2.2 Prodan

Prodan se široce používá ke stanovení fyzikálních vlastností fosfolipidových membrán. Prodan je velmi citlivý na specifické i nespecifické vlastnosti mikroprostředí. Při měření pomocí fluorescence dochází k výraznému posunu emisního pásma směrem ke vyšším vlnovým délkám při zvýšení polarit a schopnosti donoru vodíku média [24].

2.4.3 Steady-state

Fluorescenční měření lze obecně rozdělit do dvou typů měření: v ustáleném stavu (steady-state) a časově rozlišené (time resolved). Nejběžnějším typem měření v ustáleném stavu jsou měření prováděná s konstantním osvětlením a pozorováním. Vzorek se osvětlí spojitým paprskem světla a zaznamená se spektrum intenzit fluorescence nebo emise. U časově rozlišené fluorescenční spektrometrie se navíc sleduje životnost excitovaných stavů vzorku. Navzdory složitosti je časově rozlišená fluorescence široce používána kvůli většímu množství informací dostupných z dat ve srovnání s měřeními v ustáleném stavu [20].

2.4.4 Anizotropie

Měření anizotropie se týká polarizace světla emitovaného z fluoroforu a poskytuje informace o velikosti a tvaru proteinů nebo rigiditě různých molekulárních prostředí. Fluorofory absorbují světlo v určitém směru vzhledem k molekulárním osám. Anizotropii určuje rozsah, ve kterém se fluorofor otáčí během životnosti excitovaného stavu. Měření anizotropie je tedy založeno na principu fotoselektivní excitace fluoroforů polarizovaným světlem. Fluorofory přednostně absorbují fotony, jejichž elektrické vektory jsou uspořádány paralelně s přechodovým momentem fluoroforu. Při excitaci polarizovaným světlem se selektivně excitují ty molekuly fluoroforu, jejichž absorpční přechodový dipól je rovnoběžný s elektrickým vektorem excitace. Emise také nastává se světlem polarizovaným podél pevné osy ve fluoroforu. Relativní úhel mezi těmito momenty určuje maximální naměřenou anizotropii [20], [21].

2.5 Současný stav řešené problematiky

Problematika lyofilizace ve spojení s nosičovými systémy léčiv je v současnosti velmi rozmanitá a její charakter může být různý v závislosti na konkrétním typu nosiče a léčivé látce. V posledních letech se vědci aktivně zabývají vývojem nových metod a technologií s cílem vylepšit vlastnosti lyofilizovaných nosičových systémů léčiv, například biologickou aktivitu, stabilitu, anebo degradaci během procesu lyofilizace.

V rámci této problematiky jsou zkoumány nové typy nosičů, optimalizace složení lyofilizačních roztoků, použití různých aditiv a stabilizátorů, využití nových metod vysoušení a dalších technik. Také je snaha vyvinout metody pro charakterizaci nosičů a sledování změn během lyofilizace, což je důležité pro kontrolu kvality a stability výsledného produktu.

V publikaci od Phuong H. L. Tran a kol. [25] je diskutováno začlenění různých formulací do lyofilizovaných tablet. Dále je popsáno využití pomocných látek, optimalizace podmínek lyofilizace, rekonstituce formulací a struktury tablet za účelem zlepšení výkonu lyofilizovaných tablet. Byly navrženy a diskutovány různé strategie pro výrobu lyofilizovaných tablet s odlišnými strukturami pro řízené uvolňování léčiva. Použití omezených charakterizačních metod může poskytnout příležitosti pro hodnocení fyzikálně-chemických vlastností lyofilizovaných tablet. Tato diskuse s potenciálními přístupy představuje přínos pro další vývoj lyofilizovaných tablet obsahujících léčiva ve farmaceutickém průmyslu.

Článek od autorů Michalicová a kol. [26] popisuje metodu lyofilizace, která umožňuje rozpouštění hydrofobních molekul ve vodných roztocích nativního hyaluronanu. Metoda je založena na narušení hydratačního obalu, které zpřístupní domnělé hydrofobní oblasti na molekule hyaluronanu. Hydrofobní molekuly byly modelovány pomocí fluorescenčních sond. Tyto sondy signalizovaly interakce s hydrofobními oblastmi. Výsledkem bylo potvrzení účinnosti metody lyofilizace prostřednictvím inkorporace hydrofobní fluorescenční sondy do struktury hyaluronanu. Tato práce představuje počáteční krok ve vývoji biokompatibilních a biodegradabilních nosičů pro hydrofobní léčiva.

V práci od Kimberley Elbrink a kol. [27] byl hodnocen vliv typu kryoprotektantu a parametrů procesu lyofilizace za účelem stanovení optimálního lyofilizačního procesu pro pevné lipidové nanočástice s obsahem celekoxibu. Různé kryoprotektivní látky byly testovány v různých hmotnostních poměrech s lipidem. Tato práce optimalizuje proces lyofilizace prostřednictvím

experimentálních návrhů pro přesné definování podmínek procesu. Při optimalizaci byly použity biopolymery trehalóza, maltóza a sacharóza. Optimální lyofilizované pevné lipidové nanočástice byly podrobeny 6měsíční studii stability. Pozitivní výsledek byl u nanočástic s trehalózou jako kryoprotektantem a skladováním při 4 °C. Dále bylo zjištěno, že údaje o in vitro uvolňování vykazují výrazně odlišný profil před a po optimalizaci procesu lyofilizace, což naznačuje, že optimalizace procesu lyofilizace má vliv na kvalitu lyofilizovaného produktu. Tyto podmínky poskytly přijatelný nezhroucený lyofilizovaný koláč s dobrou redispersovatelností, minimálními změnami ve fyzikálně-chemických vlastnostech a dlouhodobou stabilitou.

Další článek od Séverine Vessot a Julien Andrieu [28] se zabývá nevodnými pomocnými organickými rozpouštědly, která jsou stále více prakticky používána při lyofilizaci léčiv a farmaceutických produktů. Tyto pomocná rozpouštědla jsou předmětem zájmu pro vysoké teploty tuhnutí, velké zvýšení rychlosti sublimace, zvýšení stability lyofilizovaných produktů, nízké entalpie sublimace, vysoké hodnoty rovnovážného tlaku páry/pevné látky a nízkou toxicitu. Studovaným pomocným rozpouštědlem byl terc-butylalkohol. Byly přezkoumány termodynamické vlastnosti systému voda + TBA. Tento systém měl velmi pozitivní výsledky. Bylo prokázáno, že optimální cykly lyofilizace jsou stanoveny s ohledem na proměnné složení, zejména obsah terc-butanolu, a proměnných procesu lyofilizace. Tím se maximalizují rychlosti sušení a minimalizují hladiny zbytkového rozpouštědla, přičemž jsou zachovány hlavní atributy kvality lyofilizovaného prášku.

Studie od Eknath Kole a kol. [29] se zaměřuje na řešení plicních onemocnění pomocí nanoterapeutik. V této práci byly přezkoumány některé standardní metody používané k vývoji nanoterapeutik pro inhalaci. Nanomedicína může dodávat léky přímo do plicní tkáně prostřednictvím aerosolu nebo suchého prášku pro inhalaci, aby se zaměřila na hluboké ukládání v plicích a následnou terapeutickou účinnost. Technologický pokrok v inhalačních zařízeních zlepšil účinnost mechanismů podávání léků na bázi plic. Tento přehled také vyjmenoval hodnocení plicních systémů dodávání léků, tj. modelů in vitro, ex vivo, in vivo nebo in silico, které v posledních letech zaznamenaly významný pokrok.

Celkově lze říct, že v oblasti lyofilizace nosičových systémů léčiv se stále výrazně rozvíjejí nové technologie, které si kladou za cíl zlepšit stabilitu a účinnost sušených produktů.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

- Nativní dextran získaný z bakterie *Leuconostoc mesenteroides*, střední molekulová hmotnost 60–76 kDa, CAS: 9004-54-0, výrobce Sigma Aldrich (USA);
- Deionizovaná voda; Přístroj PureLab Flex;
- Terc-butylalkohol (bezvodý $\geq 99,5\%$), CAS: 75-65-0, výrobce Penta (ČR);
- Pyren, CAS: 129-00-0, výrobce Sigma Aldrich (Švýcarsko);
- N,N-Dimetyl-6-propionyl-2-naftylamin (prodan), CAS: 70504-01-7, výrobce Sigma Aldrich (ČR).

3.2 Použité přístroje, programy a pomůcky

- Parafilm® M, výrobce Bemis® (USA);
- PureLab® Classic, deionizovaná voda, výrobce ELGA LabWater (UK);
- Analytická váha Denver, dílek 0,001 g, výrobce Denver Instrument (Německo);
- Termogravimetrický analyzátor Q5000 (TA Instruments, New Castle, Delaware, USA);
- Program TA univerzal analysis pro vyhodnocení TGA;
- Míchačka magnetická Cimarec i Poly, výrobce Thermo Scientific;
- Chromatograf SEC-MALS-dRI; 0.6 ml/min 0.1 M fosfátový pufř (pH = 7), objem nástríku 25 a 50 ml, kolona: PL aquagel-OH MIXED-M 8 μ m 300 x 7.5 mm, filtrováno přes 0.45 mm stříkačkový filtr (membrána – nylon);
- SP VirTis AdVantage Pro Lyofilizátor s Intellitronics™ kontrolorem, výrobce SP Scientific (USA);
- Thermo Scientific™ Nicolet™ iS™ 50 FTIR Spektrometr, výrobce ThermoFisher Scientific (USA);
- Thermo Scientific iS50 Raman Modul, výrobce ThermoFisher Scientific (USA);
- Program OMNIC 9, vyhodnocování spekter z FTIR a RAMAN spektrometru;
- FS5 Fluorescenční spektrometr; výrobce Edinburgh Instruments (UK);
- Software Fluoracle®, vyhodnocování měření z fluorescenčního spektrometru;
- Quorum/Polaron SC7640 Auto/Manual High Resolution Sputter Coater, výrobce Quorum Technologies (UK);
- Skenovací elektronový mikroskop SEM ZEISS EVO® LS10, výrobce CARL ZEISS AG (Německo);
- Zobrazování SEM: Software ZEISS SmartSem, program SmartSEM User Interface;
- Software Microsoft Office Excel 2016, zpracování dat;
- Program Origin 2019b 64Bit.

3.3 Příprava vzorků

V následujících kapitolách jsou popsány způsoby přípravy vzorků pro lyofilizaci a pro jednotlivá měření. Navážky byly váženy na analytických vahách a příprava roztoků probíhala při laboratorní teplotě.

3.3.1 Postup přípravy zásobních roztoků

Před přípravou zásobních vzorků byla lahev s koncentrovaným terc-butylalkoholem ponořena do teplé vody, z důvodu jeho vlastnosti krystalizovat při 25,5 °C. Poté bylo připraveno 450 ml 20% roztoku TBA v deionizované vodě. Dále byly připraveny zásobní roztoky sond o koncentraci $2 \cdot 10^{-4}$ M do 100 ml odměrných baněk, kde rozpouštědlo byl koncentrovaný TBA. Také byl připraven zásobní roztok dextransu o koncentraci $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ v 150 ml 20 % TBA. Tímto způsobem byl zásobní roztok dextransu připraven třikrát. Veškeré roztoky se ponechaly den míchat na magnetické míchače.

3.3.2 Příprava vzorku pro měření molekulové hmotnosti dextransu pomocí vylučovací chromatografie s víceúhlovým statickým rozptylem světla

Pro měření bylo potřeba připravit roztok nativního dextransu o koncentraci $4 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ ve fosfátovém pufru. Do odměrné baňky o objemu 10 cm^3 bylo naváženo 40 mg nativního dextransu. Poté byla baňka doplněna po rysku fosfátovým pufrům o koncentraci 0,1 M a pH=7.

3.3.3 Příprava vzorků pro lyofilizaci

Vzorky pro lyofilizaci byly připraveny tak, aby koncentrace fluorescenčních sond ve výsledném vzorku byla $1 \cdot 10^{-6}$ M. Do dvou baněk se 150 ml zásobního roztoku dextransu bylo jednotlivě napipetováno 750 μl fluorescenčních sond pyrenu a prodanu. Třetí zásobní roztok je používán jako slepý vzorek, neobsahuje tedy žádnou sondu. Poté se každý ze tří roztoků rozdělil do tří lyofilizačních baněk po 50 ml. Finální vzorky byly překryty parafilmem a nechaly se den míchat na magnetické míchače.

3.3.4 Příprava vzorků pro měření na fluorescenčním spektrometru

Před přípravou vzorků byla malá část lyofilizovaných vzorků odebrána pro měření na skenovacím elektronovém mikroskopu (SEM). Lyofilizované vzorky byly poté rozpuštěny v kádinkách s 50 cm^3 deionizované vody. Do dvou kádinek s rozpuštěným slepým vzorkem bylo přidáno 250 μl zásobního roztoku fluorescenční sondy, aby se koncentrace sondy nelišila od ostatních lyofilizovaných vzorků. Dále byly připraveny vzorky, které obsahovaly pouze fluorescenční sondu a deionizovanou vodu, a to tak, že do kádinek s 50 cm^3 deionizované vody bylo napipetováno 250 μl fluorescenční sondy. Rozpuštěné vzorky se překryly parafilmem a nechaly se 4 dny míchat na magnetické míchače.

3.4 Postup měření

Nejprve bylo potřeba změřit přesnou molekulovou hmotnost zakoupeného dextranu pomocí vylučovací chromatografie (SEC-MALS) z důvodu rozmezí molekulové hmotnosti 60–76 kDa udávané výrobcem dextranu SigmaAldrich.

Připravené vzorky byly lyofilizovány, a poté probíhala veškerá měření pro zjištění účinnosti procesu sušení mrazem. Byla provedena ATR-FTIR spektrometrie, Ramanova spektrometrie, fluorescenční spektrometrie a skenovací elektronová mikroskopie.

3.4.1 Změření molekulové hmotnosti dextranu pomocí vylučovací chromatografie s víceúhlovým statickým rozptylem světla

Pro změření molekulové hmotnosti dextranu byl použit přístroj SEC-MALS-dRI. Princip metody spočívá v oddělování makromolekulárních sloučenin na základě velikosti (SEC). Při průchodu kolonou se využívá detekce refraktivního indexu (dRI) pro získání informací o změnách v indexu lomu vzorku. Po oddělení se makromolekulární sloučeniny přivádějí do optického detektoru, který využívá víceúhlový statický rozptyl světla (MALS) k měření jejich molekulární hmotnosti. MALS funguje tak, že světelný paprsek prochází roztokem makromolekul a interaguje s nimi. Tyto interakce způsobují rozptýlení světla, které je poté detekováno v různých úhlech. Na základě toho lze vypočítat molární hmotnost makromolekulárních sloučenin v roztoku [30].

Měření bylo provedeno při dvou objemech nástřiku: 25 μl a 50 μl . Vzorek byl přefiltrován přes 0,45 mikronový stříkačkový vzorek (membrána – nylon). Měření bylo pro oba objemy opakováno dvakrát.

3.4.2 Nastavení lyofilizátoru

Pro odstranění rozpouštědla ze vzorků byl použit proces lyofilizace pomocí přístroje SP VirTis AdVantage Pro Lyofilizátor s Intellitronic kontrolorem. Parafilm na připravených vzorcích byl několikrát propíchnut a poté byly vzorky vloženy na policičku uvnitř lyofilizátoru. Nastavení lyofilizátoru se odkazuje na postup pilotní práce Michalicová a kol. z roku 2017 [26]. Tento postup byl modifikován a byly nastaveny parametry sepsané v Tab. 1 a Tab. 2.

Tab. 1: Nastavené parametry procesu lyofilizace. T představuje teplotu uvnitř lyofilizátoru. Rampa představuje dobu potřebnou k dosažení dané teploty. Doba setrvání představuje dobu, kdy se udržuje daná teplota.

Krok	T [°C]	Rampa [min]	Doba setrvání [min]	Krok	T [°C]	Rampa [min]	Doba setrvání [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. 2: Nastavené parametry procesu lyofilizace. *T* představuje teplotu uvnitř lyofilizátoru. Rampa představuje dobu potřebnou k dosažení dané teploty. Doba setrvání představuje dobu, kdy se udržuje daná teplota. Vakuum představuje tlak v lyofilizátoru v daný čas

Krok	T [°C]	Rampa [min]	Doba setrvání [min]	Vakuum [mTorr]	Krok	T [°C]	Rampa [min]	Doba setrvání [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

Po lyofilizaci byly vzorky do měření ponechány ve vialkách v exsikátoru naplněného předem vysušeným silikagelem, aby neabsorbovaly vzdušnou vlhkost.



Obr. 5: Vzorky po lyofilizaci uložené ve vialkách.

3.4.3 Měření vlhkosti vzorků pomocí termogravimetrické analýzy

Malé množství lyofilizovaných vzorků a nelyofilizovaného dextranu bylo nasypáno do platinového nosiče vzorku. Lyofilizované vzorky byly zahřívány do 600 °C s teplotním krokem 10 °C. Přístroj zaznamenával pokles hmotnosti do konstantní hodnoty. Změřený pokles odpovídá vlhkosti obsažené ve vzorku. Proces byl u každého vzorku opakován 3krát.

3.4.4 Měření na ATR-FTIR a RAMAN spektrometru

ATR-FTIR je infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací a režimem utlumené celkové odrazivosti. Je to nedestruktivní vibrační spektroskopická technika, která funguje tak, že analyzuje rotačně-vibrační energetické stavy v závislosti na změnách dipólového momentu molekuly, ke kterým dochází při kontaktu infračerveného paprsku se vzorkem. Infračervený paprsek je nasměrován na opticky hustý krystal s vysokým indexem lomu pod určitým úhlem [31].

Na ATR-FTIR spektrometru byly změřeny připravené vzorky a nelyofilizovaný dextran. Měření probíhalo při laboratorní teplotě. V programu OMNIC byly nastaveny parametry měření: Vlnočet 4 000–400 cm^{-1} s rozlišením 8 cm^{-1} a počtem akumulovaných skenů 64. ATR krystal byl očištěn pomocí buničiny a ethanolu. Jako pozadí byla zaznamenána vzdušná atmosféra v laboratoři. Poté bylo na krystal nanášeno malé množství vzorku. Vzorek byl přitlačen na krystal pomocí přitlačného zařízení, a bylo spuštěno měření. Po skončení měření byl krystal znovu očištěn buničinou a ethanolem. Naměřená data v programu OMNIC byla uložena a exportována do programu MS Excel. Naměřená spektra byla později upravena.

Dále bylo doplňkově provedeno měření pomocí Ramanovy spektrometrie, resp. Ramanova modulu Nicolet. Ramanovo spektrum je citlivé na vibrace, kde se mění polarizovatelnost (nepolární motivy, alifatické skupiny, vazba C–C atd). V programu OMNIC byly nastaveny parametry měření: Vlnočet 4 000–400 cm^{-1} s rozlišením 8 cm^{-1} a počtem akumulovaných skenů 512. Výkon laseru byl nastaven na 0,35 W. Do nástavce bylo vtlačeno malé množství vzorku, ten byl poté vložen do přístroje. Zavřela se dvířka a spustil se laser. Po skončení měření byl vzorek z nástavce vytlačen, a poté byl vložen další vzorek. Naměřená data v programu OMNIC byla uložena a exportována do programu MS Excel. Naměřená spektra byla později upravena.

3.4.5 Měření na fluorescenčním spektrometru

Během fluorescenčního procesu molekula absorbující světlo vstoupí do excitovaného stavu, při kterém se elektronový obal molekuly přesune do vyššího energetického stavu. Tento stav je nestabilní a molekula se brzy vrátí zpět do svého původního stavu, přičemž uvolňuje energii v podobě světla s delší vlnovou délkou. Fluorescenční spektrometr vystavuje zkoumaný vzorek záření o různých vlnových délkách a následně zaznamenává intenzitu fluorescenčního záření emitované vzorkem.

Na měření byly použity lyofilizované a poté rozpuštěné vzorky, slepé vzorky s přidanými sondami po lyofilizaci a deionizovaná voda s rozpuštěnými sondami. Vzorky byly nality do křemenné kyvety a v softwaru Fluoracel byly nastaveny parametry měření pro pyren: Emisní spektrum 361–530 nm s excitací při 335 nm, excitační sken 310–360 nm a emisní monochromátor 392 nm. Pro prodan: Emisní spektrum 370–600 nm s excitací při 360 nm, excitační sken 310–360 nm a emisní monochromátor 392 nm, a bylo spuštěno měření. Poté byla křemenná kyveta vymyta mýdlovou vodou a ethanolem a byl do ní nalit další vzorek.

3.4.6 Měření na skenovacím elektronovém mikroskopu

Elektronový mikroskop vyzařuje na vzorek proud elektronů. Tento proud elektronů umožňuje mnohonásobně větší zvětšení než u optických mikroskopů. Elektronový paprsek se odráží od vzorku ve formě sekundárních elektronů, které zachytí pozitivně nabitý detektor s Faradayovou pastí.

Pro měření na SEM byly použity lyofilizované vzorky a zakoupený nelyofilizovaný dextran. Na kovový stojan s uhlíkovou páskou bylo nanášeno malé množství vzorku. Stojany se vzorky byly nejdříve vloženy do naprašovačky značky Quorum/Polaron SC7640, aby byly vzorky pokovány zlatem. Po pokování byly vzorky vloženy do elektronového mikroskopu. Snímky byly zaznamenávány při zvětšení 1 000 \times a 5 000 \times a byly zpracovány v programu SmartSEM.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Výsledná molekulová hmotnost dextransu

V Tab. 3 se nacházejí změřené hodnoty molekulové hmotnosti dextransu při objemech nástřiku 25 μl a 50 μl .

Tab. 3: Zadané parametry měření a naměřené hodnoty molekulové hmotnosti pomocí vylučovací chromatografie.

objem nástřiku [μl]	číslo měření	koncentrace vzorku [$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Mw [kDa]
25	1	4	73,30
	2	4	74,59
50	1	4	73,39
	2	4	74,27

Změřená hodnota molekulové hmotnosti nelyofilizovaného dextransu byla zprůměrována na hodnotu 73,89 kDa s průměrnou odchylkou 0,64 kDa.

4.2 Termogravimetrická analýza

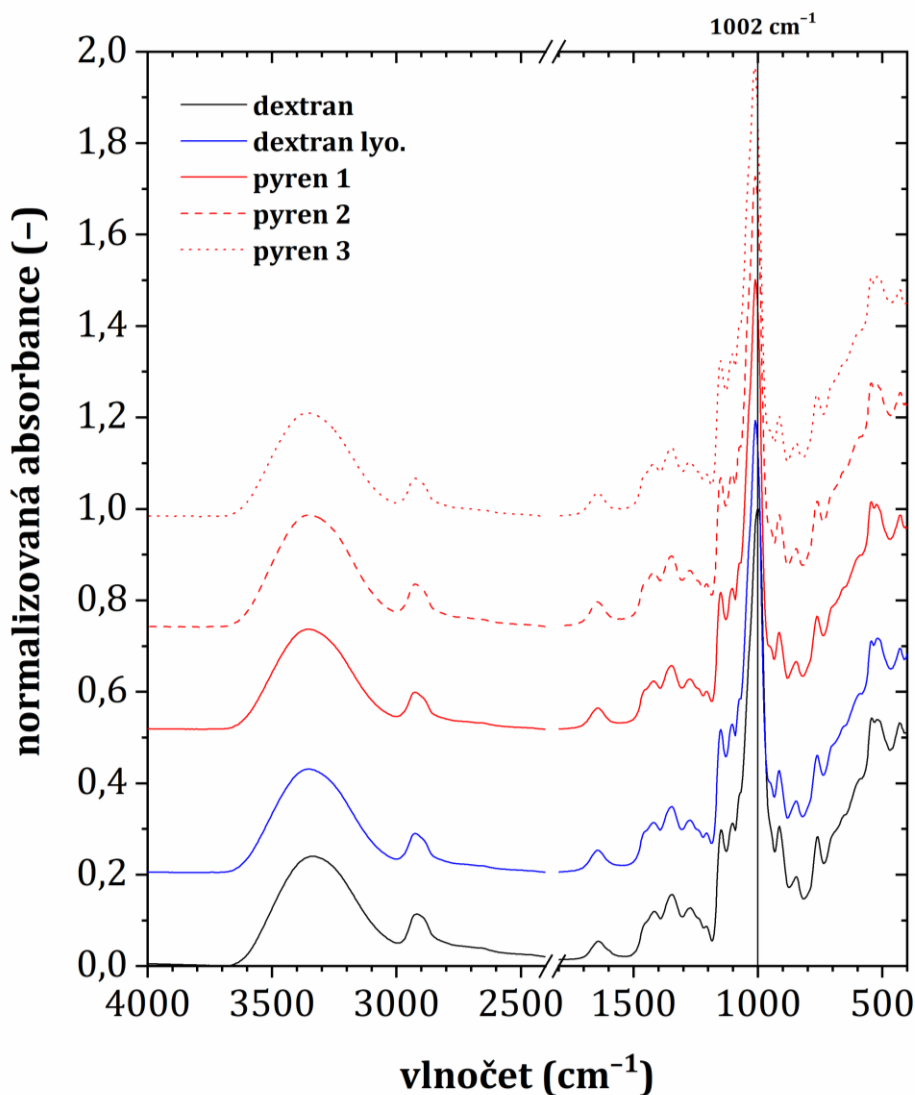
Dextran před lyofilizací obsahoval průměrně 6,99 hm. % vlhkosti. Lyofilizovaný dextran bez sondy obsahoval průměrně 8,16 hm. % vlhkosti. Vzorky, které obsahovaly fluorescenční sondu obsahovaly 8,62 hm. % vlhkosti pro prodan a 8,33 hm. % pro pyren. Viz Tab. 6.

4.3 ATR-FTIR a RAMAN spektrometrie

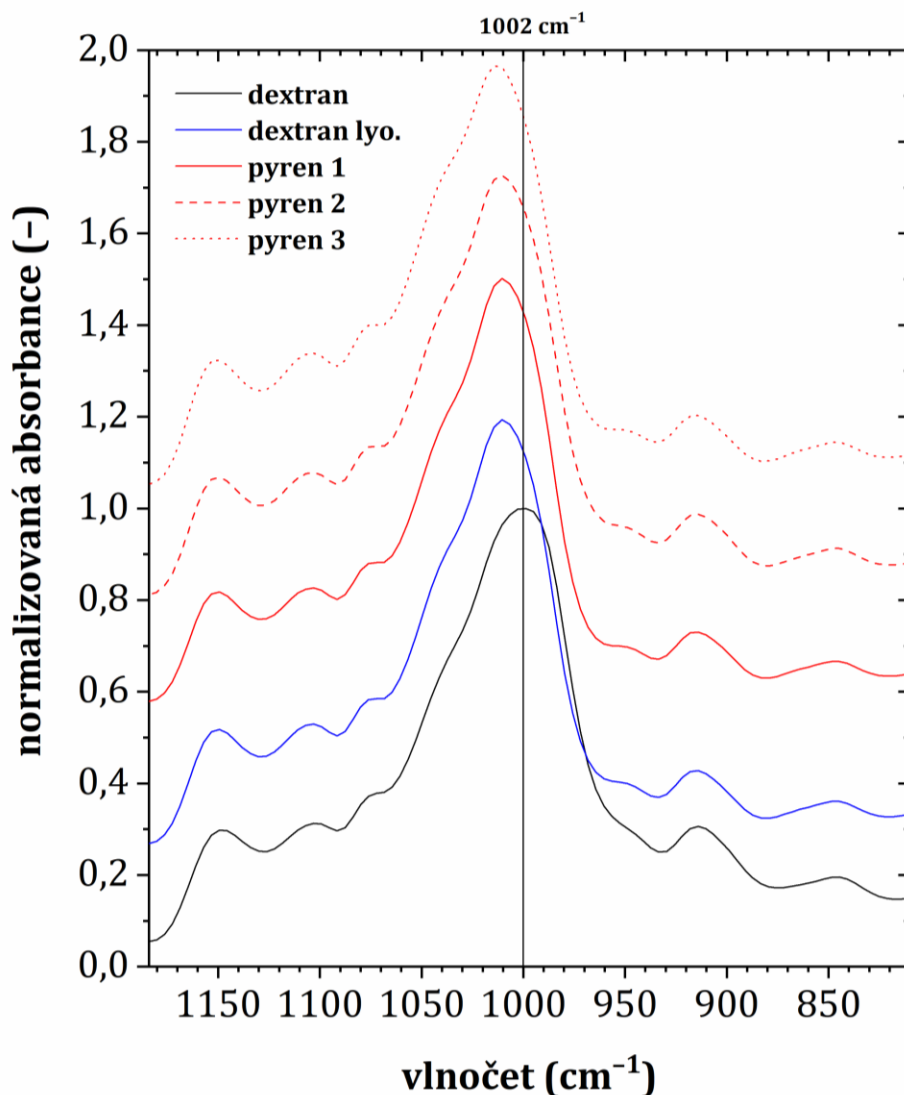
4.3.1 Pyren

Na Obr. 6 je zobrazen graf, ve kterém jsou zaznamenána ATR-FTIR spektra veškerých vzorků obsahujících pyren, slepého vzorku (lyofilizovaného dextransu bez sondy) a zásobního nelyofilizovaného dextransu. Graf byl vytvořen v programu Origin 2019b a ukazuje závislost normalizované absorpce na vlnočtu. Normalizovaná hodnota znamená, že veškeré naměřené hodnoty byly převedeny tak, aby nejvyšší absorpční pás měl maximum vždy v hodnotě 1. Na spektru je pozorovatelný široký absorpční pás při vlnočtu 3 650–3 000 cm^{-1} , který odpovídá valenční symetrické vibraci O–H vazeb nejen v alkoholech, ale i v sorbované vzdušné vlhkosti, kterou můžeme rozdělit na vodu volnou a pevně vázanou či semi-krystalickou. Tato alkoholová skupina se nachází jak v molekule TBA, tak i v polysacharidu dextransu. Absorpční pás při vlnočtu 2 931 cm^{-1} je připisován asymetrické vibraci C–H vazby v methylových skupinách. Při vlnočtu 1 643 cm^{-1} je připisována valenční vibrace OH skupiny ve vodě. Malé dva absorpční pásy při vlnočtu 1 470 cm^{-1} a 1 458 cm^{-1} odpovídají deformační vibraci u –CH₂– a –CH₃ skupin. Další absorpční pás odpovídá vibraci OH skupiny v polysacharidu a vyskytuje se při vlnočtu 1 423 cm^{-1} . Dále se ve spektru nachází absorpční pás odpovídající deformační vibraci methylenových skupin při vlnočtu 1 350 cm^{-1} . Menší absorpční pás při vlnočtu 1 268 cm^{-1} odpovídá vibracím primárních a sekundárních alkoholů.

Také by ale mohl odpovídat vibraci etherové vazby v cyklu polysacharidu. Větší absorpční pás při vlnočtu $1\,150\text{ cm}^{-1}$ je připisován vibraci α -1,6 glykosidické vazby a absorpční pás při $1\,103\text{ cm}^{-1}$ je připisován vibraci α -1,3 glykosidické vazby. Málo viditelný absorpční pás při vlnočtu $1\,070\text{ cm}^{-1}$ se vztahuje k asymetrické vibraci v etherové vazbě C–O–C a absorpční pás při 877 cm^{-1} se vztahuje k symetrické vibraci C–O–C vazby. Pro potvrzení hydrofobního efektu, který vytváří více možností pro umístění hydrofobního léčiva v rámci biopolymeru, je klíčový absorpční pás v $1\,002\text{ cm}^{-1}$, protože odpovídá valenční vibraci C–O vazby v OH skupinách v alkoholu. Sledovaný absorpční pás je přiblížen na Obr. 7.



Obr. 6: Graf závislosti normalizované absorbance na vlnočtu pro lyofilizované vzorky dextranu obsahujících pyren, slepý vzorek a nelyofilizovaný dextran.

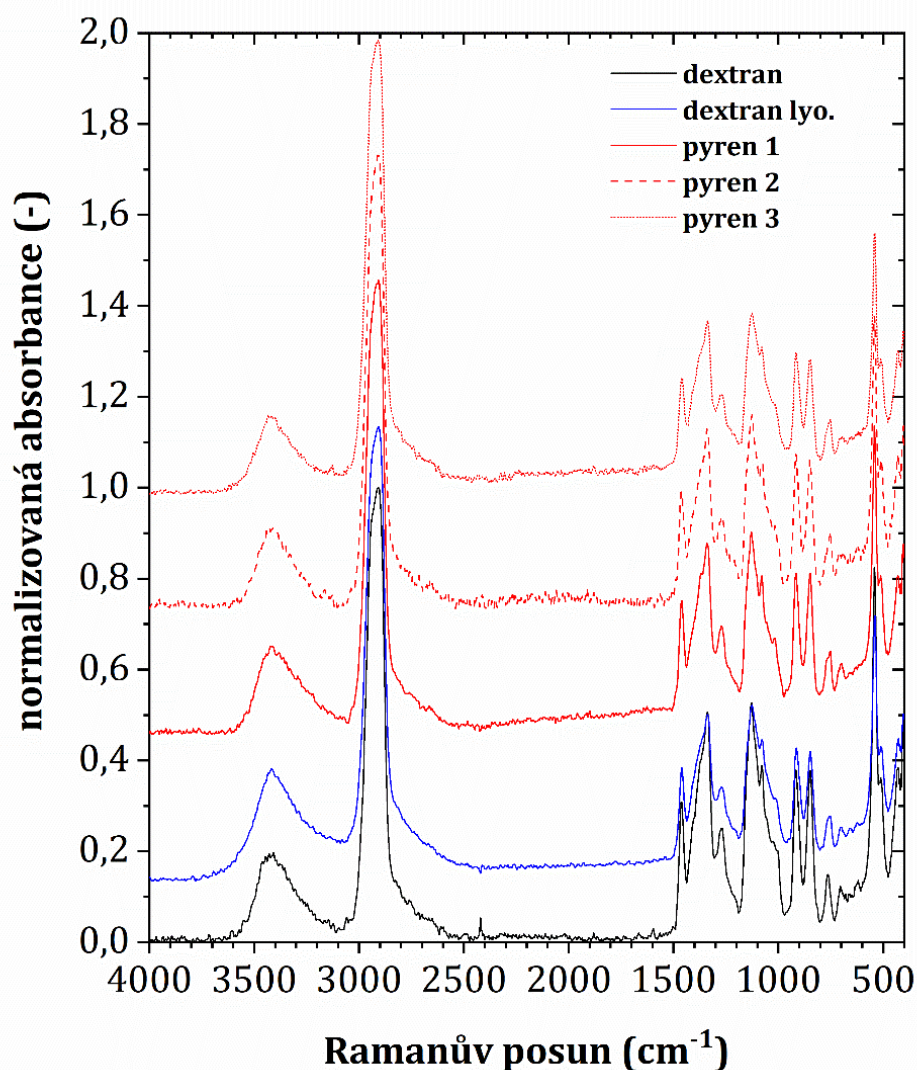


Obr. 7: Graf závislosti normalizované absorbance na vlnočtu pro lyofilizované vzorky dextransu obsahujících pyren, slepý vzorek a nelyofilizovaný dextran; rozlišení od 1184 cm^{-1} do 810 cm^{-1} .

Díky přiblížení na Obr. 7 je možné pozorovat rozdíly v poloze maxim absorpčních pásů jednotlivých lyofilizovaných vzorků ve srovnání s položkou absorpčního pásu nelyofilizovaného dextransu. Toto posunutí naznačuje zesílení hydrofobního efektu v molekule. Hydrofobní efekt je interakce mezi nepolárními molekulami, které se shlukují, aby minimalizovaly kontakt s polárním rozpouštědlem. Hydrofobní efekt tak mohou ovlivnit vibrace v molekule, a tím i infračervené spektrum [32].

Jako doplňkové měření pro potvrzení hydrofobního efektu bylo použito měření v Ramanově modulu, který analyzuje podobné charakteristiky jako ATR-FTIR spektrometrie. Ramanovo spektrum je citlivé na vibrace, kde se mění polarizovatelnost (alifatické skupiny, vibrace vazby uhlík-uhlík atd.).

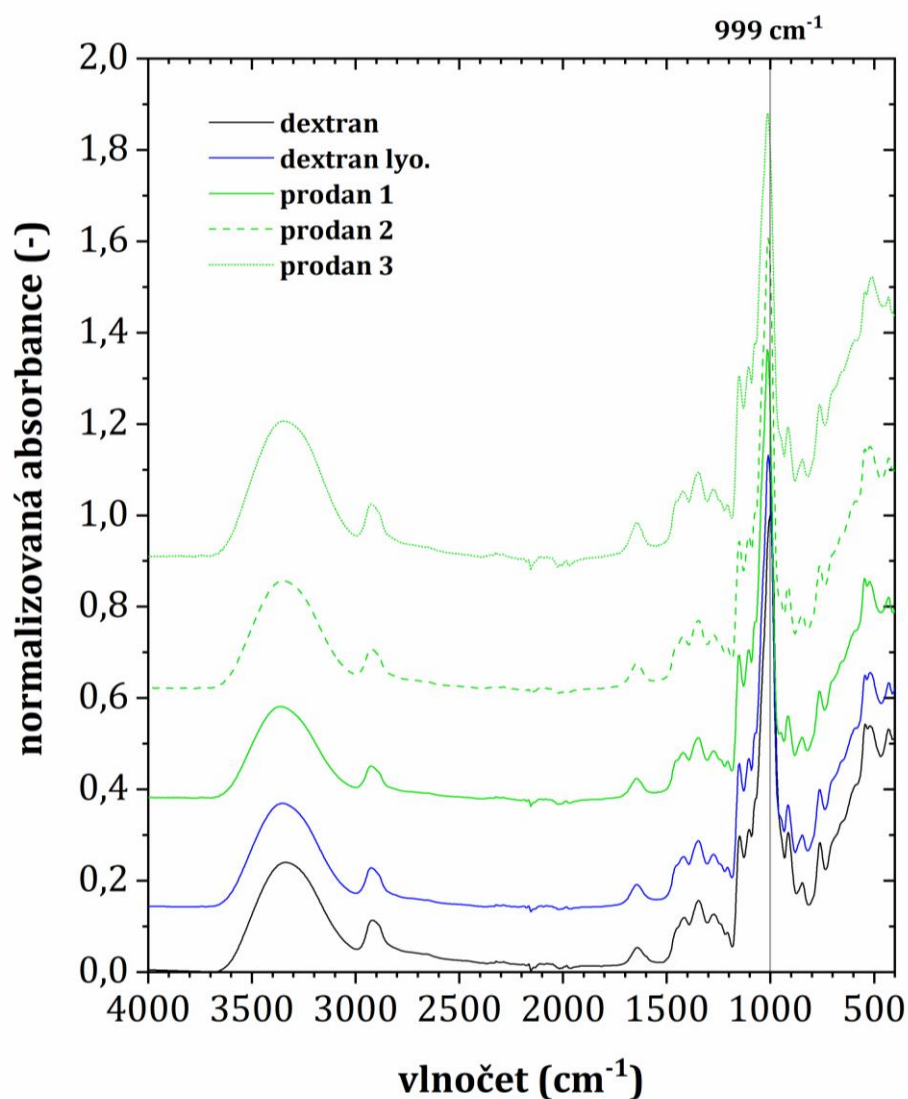
Na Obr. 8 je vyobrazen graf měření v Ramanově modulu. Graf zobrazuje závislost normalizované absorpce na Ramanově posunu. Na spektru je možné pozorovat vysoký absorpční pás při Ramanově posunu $2\,910\text{ cm}^{-1}$, ten odpovídá asymetrické vibraci CH_2 . Další absorpční pás při R. posunu $1\,464\text{ cm}^{-1}$ odpovídá deformaci vazby $-\text{CH}_2-$. Absorpční pás při R. posunu $1\,420\text{ cm}^{-1}$ je připisován alkoholové skupině v polysacharidu. Dále se v grafu nachází absorpční pás odpovídající deformační vibraci methylenových skupin při R. posunu $1\,337\text{ cm}^{-1}$. Menší absorpční pás při R. posunu $1\,271\text{ cm}^{-1}$ odpovídá vibracím primárních a sekundárních alkoholů. Také by ale mohl odpovídat vibraci etherové vazby v cyklu polysacharidu. Větší absorpční pás při R. posunu $1\,085\text{ cm}^{-1}$ se vztahuje k vibraci glykosidické vazby. V Ramanově spektru se dal očekávat posun mezi jednotlivými absorpčními pásy, které odpovídají výše zmíněným vibracím, což naznačuje reorganizaci jednotlivých řetězců polysacharidu dextranu s cílem zvýšit mezi nimi hydrofobní efekt. Bohužel, tato spektrometrická metoda se jevila jako málo senzitivní k pozorování tohoto fenoménu slabých vazebných interakcí.



Obr. 8: Graf závislosti normalizované absorpce na Ramanově posunu pro lyofilizované vzorky dextranu obsahujících pyren, slepý vzorek a nelyofilizovaný dextran.

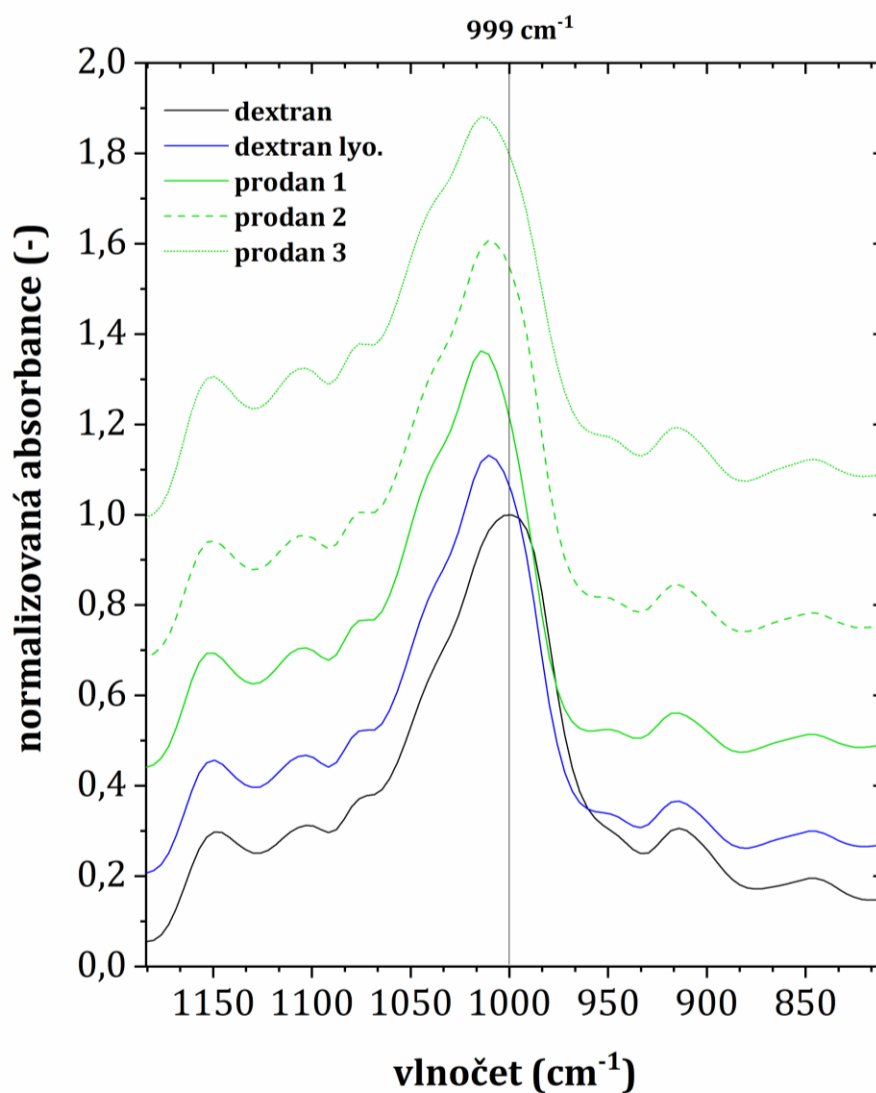
4.3.2 Prodan

Na Obr. 9 je zobrazen graf, ve kterém jsou zaznamenána ATR-FTIR spektra veškerých vzorků obsahujících prodan, slepého vzorku a zásobního nelyofilizovaného dextranu. Graf byl vytvořen v programu Origin 2019b a ukazuje závislost normalizované absorbance na vlnočtu. Na spektru jednotlivé absorpční pásy odpovídají určitým vibracím podobně jako u pyrenu, ale mohou se lišit o pár jednotek cm^{-1} . Pro potvrzení hydrofobního efektu, který vytváří více možností pro umístění hydrofobního léčiva v rámci biopolymeru, je důležitý absorpční pás v 999 cm^{-1} , protože odpovídá valenční vibraci C–O vazby v OH skupinách v alkoholu. Sledovaný absorpční pás je přiblížen na Obr. 10.

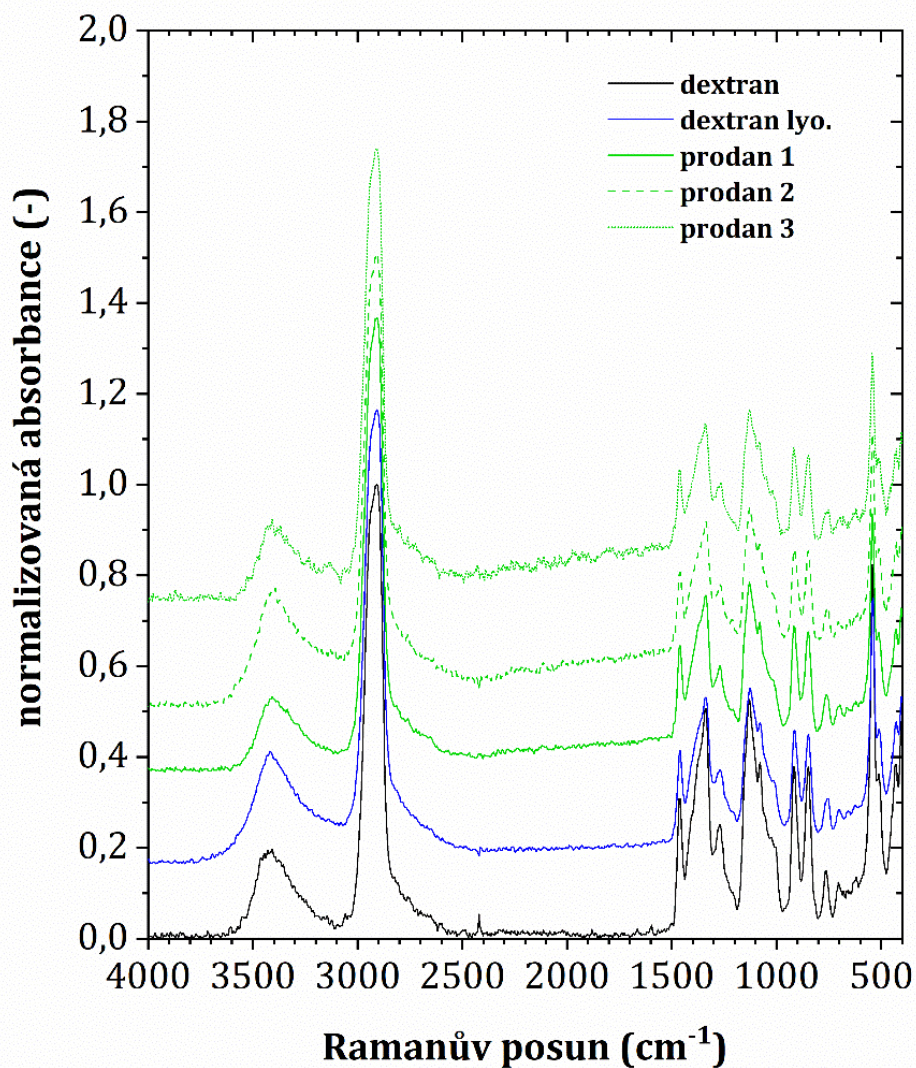


Obr. 9: Graf závislosti normalizované absorbance na vlnočtu pro lyofilizované vzorky dextranu obsahujících prodan, slepý vzorek a nelyofilizovaný dextran.

Na Obr. 10 je pozorovatelný rozdíl v maximální absorbanci mezi lyofilizovanými vzorky a nelyofilizovaným dextranem. Měření potvrdilo, že díky lyofilizaci byl podpořen hydrofobní efekt mezi jednotlivými řetězci polysacharidu.



Obr. 10: Graf závislosti normalizované absorbance na vlnočtu pro lyofilizované vzorky dextranu obsahujících prodan, slepý vzorek a nelyofilizovaný dextran; rozlišení od 1184 cm^{-1} do 810 cm^{-1} .



Obr. 11: Graf závislosti normalizované absorbance na Ramanově posunu pro lyofilizované vzorky dextranu obsahujících prodan, slepý vzorek a nelyofilizovaný dextran.

Na Obr. 11 je vyobrazen graf měření v Ramanově modulu. Graf zobrazuje závislost normalizované absorbance na Ramanově posunu pro prodan. Ani u prodanu nebyl pozorován posun mezi jednotlivými absorpčními pásy. A tedy i pro prodan je tato spektrometrická metoda málo senzitivní k pozorování tohoto fenoménu slabých vazebných interakcí

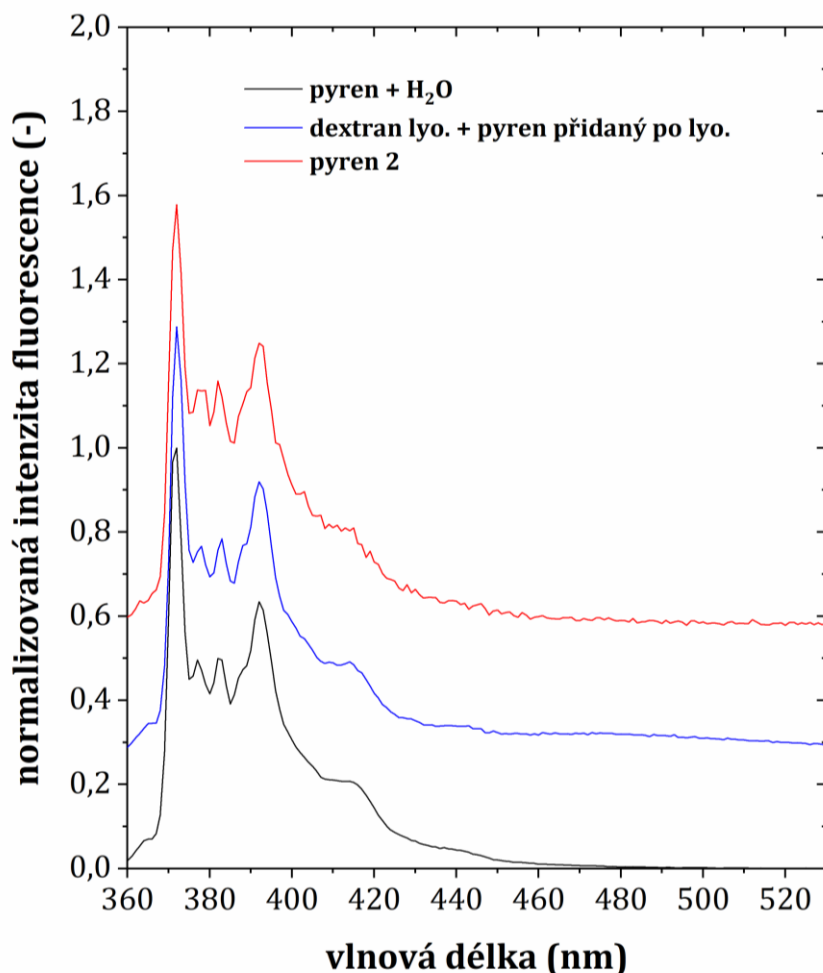
4.4 Fluorescenční spektrometrie

Pomocí fluorescenční spektrometrie byly sledovány lyofilizované vzorky oproti slepým vzorkům a roztokům fluorescenční sondy v deionizované vodě.

4.4.1 Pyren

Na Obr. 12 je zobrazen graf, ve kterém je zaznamenána závislost normalizované intenzity fluorescence na vlnové délce. Normalizovaná hodnota znamená, že veškeré naměřené hodnoty byly převedeny tak, aby nejvyšší absorpční pás měl maximum vždy v hodnotě 1. V grafu je zobrazena fluorescence jednoho reprezentativního vzorku obsahujícího pyren, fluorescence slepého vzorku s přidáním fluorescenční sondy po lyofilizaci a fluorescence pyrenu rozpuštěného v deionizované vodě. Graf byl vytvořen v programu Origin 2019b.

Fluorescence pyrenu se široce používá ke stanovení polarity média, ve kterém je přítomen. Pyren má z hlediska symetrie zakázaný absorpční přechod $S_0 \rightarrow S_1$. V polárních rozpouštědlech dochází ke zvýšení pravděpodobnosti vibračního přechodu zakázaného pásma symetrie (0-0). Relativní intenzita prvního a třetího vibronického pásu první emise singletu (S_1-S_0) poměrně dobře koreluje s polaritou rozpouštědla. Emisní polaritní index v emisním spektru pyrenu se tedy vypočítá jako poměr intenzit prvního vibračního maxima při vlnové délce 372 nm, který odpovídá přechodu 0-0, a třetího maxima při vlnové délce 383 ± 1 nm, který odpovídá přechodu 0-2 [33].



Obr. 12: Graf závislosti normalizované intenzity fluorescence na vlnové délce pro reprezentativní vzorek lyofilizovaného dextranu obsahujícího pyren, slepý vzorek a pyren v H₂O.

Ve fluorescenčním spektru pyrenu byly sledovány intenzity prvního (372 nm) a třetího (383 nm) píku, resp. fluorescenčního maxima veškerých sledovaných vzorků. Pro důkaz hydrofobního efektu byl spočítán emisní polaritní index z hodnot před normalizací. Vypočítané emisní polaritní indexy jsou zobrazeny v Tab. 4.

Tab. 4: Vypočítané hodnoty emisního polaritního indexu lyofilizovaných vzorků dextranu obsahujících pyren, slepého vzorku a pyrenu v H₂O. Dále je vypočítán rozdíl emisního polaritního indexu lyofilizovaných vzorků s pyrenem od emisního polaritního indexu slepého vzorku.

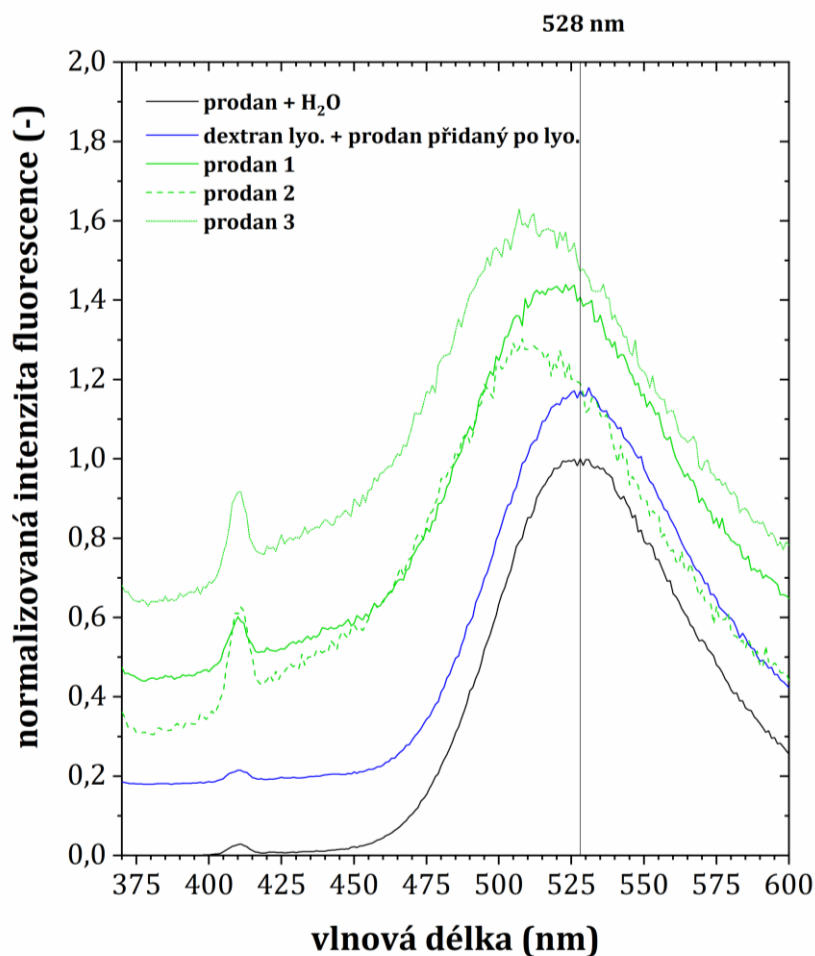
Vzorek	EmPI [-]	Průměr EmPI [-]	Δ EmPI [-]
Pyren 1	1,89	1,73 ± 0,13	0,10
Pyren 2	1,71		0,28
Pyren 3	1,58		0,41
Blank + Pyren	1,99	–	–
Pyren + voda	2	–	–

Emisní polaritní index slepého vzorku a samotného pyrenu ve vodě si jsou velmi podobný a jsou vyšší než polaritní index u lyofilizovaných vzorků. Vyšší hodnota polaritního indexu (1,99) indikuje hydrofilní prostředí a nižší hodnota polaritního indexu (1,73) indikuje hydrofobní prostředí. Nižší emisní polaritní index vypovídá o tom, že se prodan nachází v blízkosti jednotlivých řetězců dextranu, jejichž vzájemná orientace je převážně řízena hydrofobním efektem. Hydrofobní prostředí vysvětluje přítomnost hydrofobního efektu mezi jednotlivými řetězci dextranu. Proces lyofilizace byl tedy úspěšný pro tvorbu hydrofobního efektu.

4.4.2 Prodan

Na Obr. 13 je zobrazen graf závislosti normalizované hodnoty fluorescence na vlnové délce všech vzorků obsahujících prodan, slepého vzorku s prodanem přidaným po lyofilizaci a prodanu rozpuštěného v deionizované vodě. Graf byl vytvořen v programu Origin 2019b.

Prodan je sonda zvláště citlivá na polaritu prostředí. V závislosti na polaritě prostředí vykazuje silné posuny v absorpčním a emisním spektru. Čím je prostředí polárnější, tím více dochází k posunu emisního maxima směrem k vyšším vlnovým délkám [34].



Obr. 13: Graf závislosti normalizované hodnoty fluorescence na vlnové délce pro lyofilizované vzorky dextransu obsahujícího prodan, slepý vzorek a prodan v H_2O .

Na Obr. 13 byl pozorován posun emisního maxima. Slepý vzorek a prodan ve vodě měli emisní maximum ve vlnové délce 528 nm a 531 nm. U lyofilizovaných vzorků obsahujících prodan bylo emisní maximum posunuto k nižší vlnové délce a jsou tedy v méně polárním prostředí než slepé vzorky. Na základě posunu emisního maxima lze říct, že se prodan nachází v blízkosti jednotlivých řetězců dextransu, jejichž vzájemná orientace je převážně řízena hydrofobním efektem. Posun lze také vidět v Tab. 5.

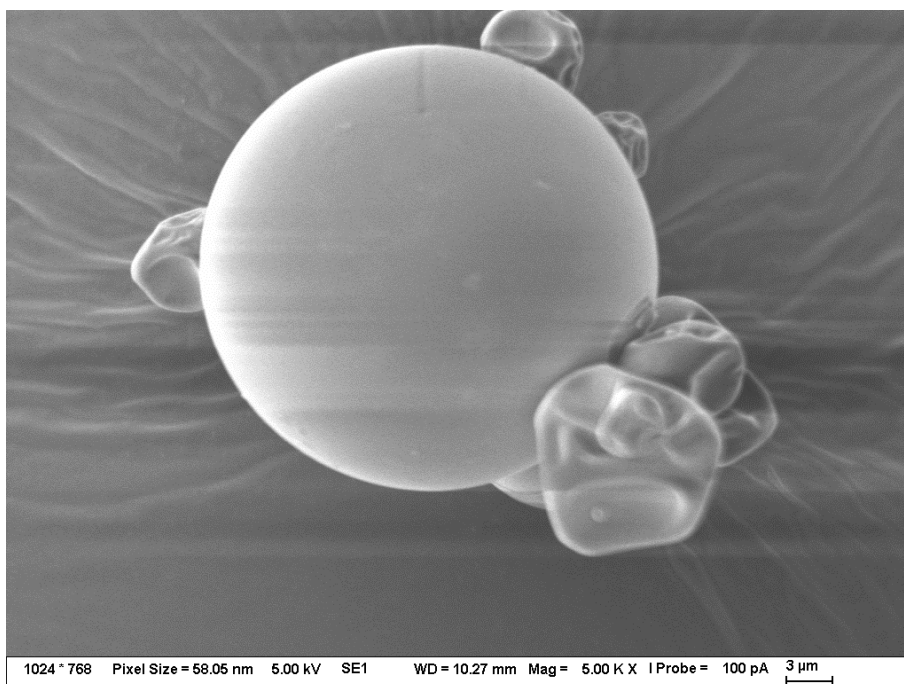
Tab. 5: Naměřené maximální vlnové délky a průměrný posun vlnové délky.

Vzorek	λ max [nm]	$\Delta\lambda$ [nm]	průměr $\Delta\lambda$ [nm]	$\pm \delta$ [nm]
Prodan 1	523	8	18	7
Prodan 2	508	23		
Prodan 3	507	24		
Blank + Prodan	531	—	—	—
Prodan + voda	528	—	—	—

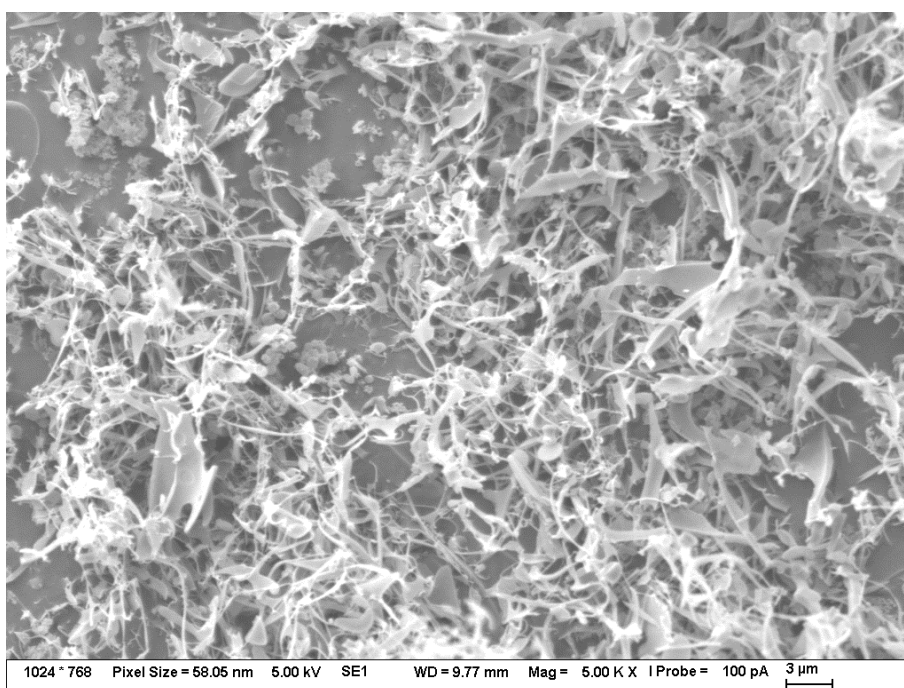
Byl vypočítán a zprůměrován posun vlnové délky lyofilizovaných vzorků obsahujících prodan od slepého vzorku s prodanem přidáním po lyofilizaci na hodnotu $18 \text{ nm} \pm 7 \text{ nm}$.

4.5 SEM

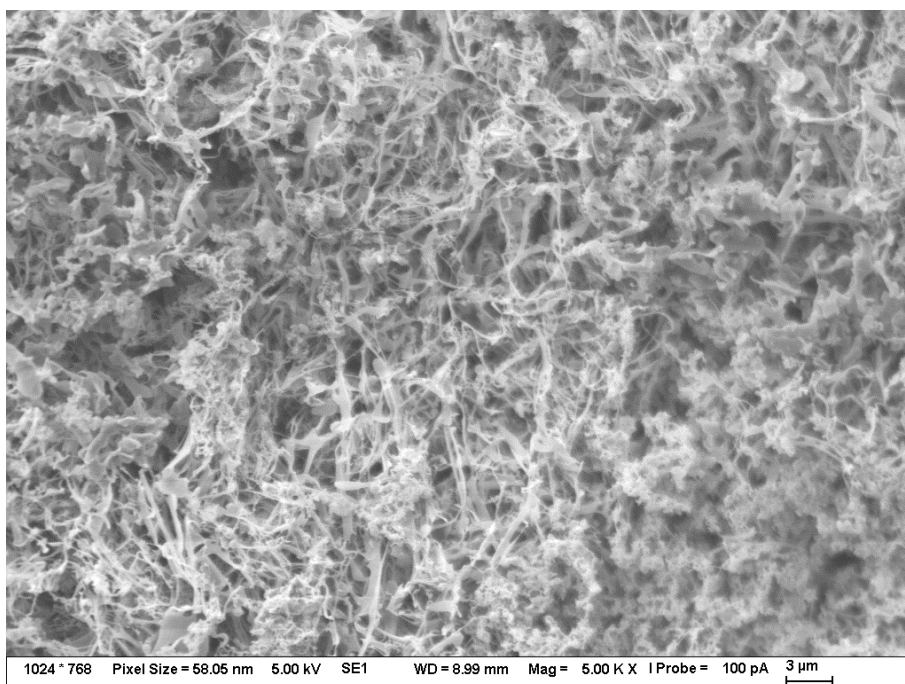
V elektronovém mikroskopu byly mezi sebou porovnány vzorky nelyofilizovaného dextranu, slepý lyofilizovaný vzorek a lyofilizované vzorky obsahující pyren a prodan. Z několika snímků o různém zvětšení byly vybrány snímky o zvětšení $5\,000\times$. Kromě zvětšení bylo vybráno místo fokusace, resp. pozorování na vzorku tak, aby na uhlíkové pásce bylo reprezentativní množství vzorku a vzorek nebyl poškozen od pinzety při nanášení vzorku na uhlíkovou pásku.



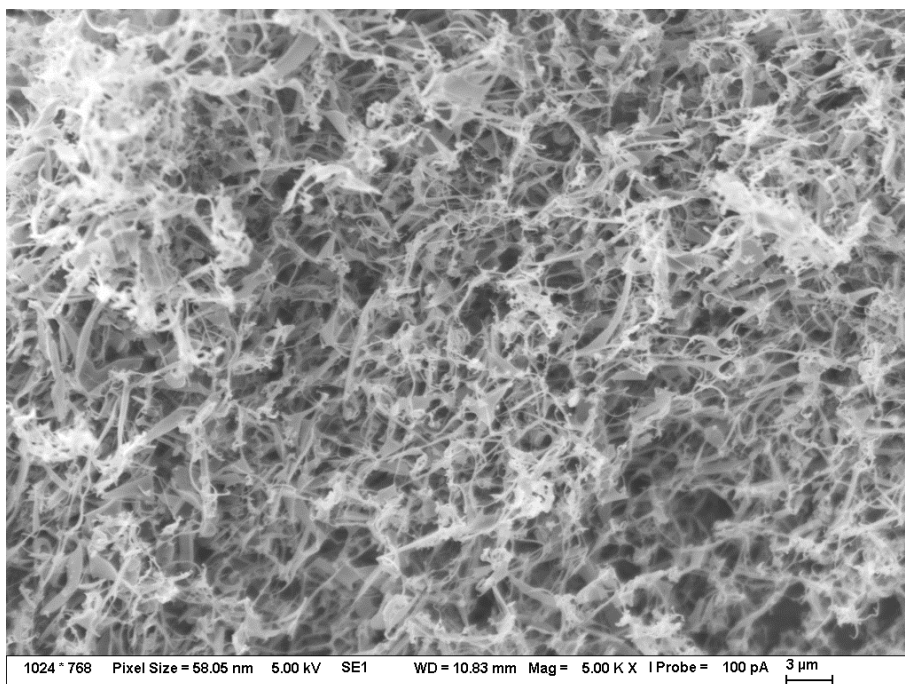
Obr. 14: SEM snímek nelyofilizovaného dextranu o molekulové hmotnosti 73,89 kDa; $5\,000\times$ zvětšení.



Obr. 15: SEM snímek lyofilizovaného slepého vzorku bez sondy; $5\,000\times$ zvětšení.



Obr. 16: SEM snímek lyofilizovaného dextransu obsahující fluorescenční sondu pyren; 5 000× zvětšení.



Obr. 17: SEM snímek lyofilizovaného dextransu obsahujícího fluorescenční sondu prodan; 5 000× zvětšení.

Na Obr. 14 je zobrazen nelyofilizovaný nativní dextran, který má kulovitý tvar, kterým se výrazně odlišuje od ostatních vzorků. U lyofilizovaných vzorků lze pozorovat, že struktura dextransu vytvořila hustou síť vláken, což naznačuje přítomnost mnoha míst s vyšším obsahem hydrofobních domén. Na těchto místech lze předpokládat přítomnost hydrofobní sondy (modelového léčiva), protože hydrofobní molekuly mohou být uzavřeny do těchto hydrofobních oblastí. Předpoklad pro výskyt hydrofobních oblastí se zvětšuje

s počtem vláken ve vzorku. Tato vlákna současně přispívají k lepšímu udržení struktury dextranu, což je možné pozorovat i pouhým okem. Nelyofilizovaný dextran byl sypký, zatímco lyofilizovaný dextran byl spojený do větších chomáčků (viz Obr. 5). Dále lze pozorovat, že u slepého vzorku (viz Obr. 15) se vytvořilo menší množství vláken a polysacharid tak neudržel strukturu tak dobře. Naopak u lyofilizovaných vzorků obsahujících fluorescenční sondu bylo pozorováno větší množství vláken a vzorek tak udržoval svou strukturu lépe. To může být zapříčiněno absencí hydrofobních molekul. Vytvořená vlákna dokazují, že proces lyofilizace je pro tvorbu nosiče léčiv velmi účinný.

5 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo připravit nosičový systém na bázi nativního dextransu pro distribuci léčiv využívající hydrofobního efektu. Hydrofobní molekuly jsou modelovány fluorescenčními sondami pyrenem a prodanem. Tyto sondy mají díky hydrofobnímu efektu mezi jednotlivými řetězci polysacharidu více možností kde setrvat rámci biopolymeru.

Tato práce má za cíl přispět k rozvoji biokompatibilních a biologicky odbouratelných nosičových systémů pro hydrofobní léčiva. Zaměřuje se na využití nativního dextransu jako vhodného nosiče a zkoumá přínos lyofilizace pro vznik hydrofobního efektu, a tedy vhodných míst pro inkorporaci hydrofobních léčiv. Tato práce také přispívá k rozšíření využití procesu lyofilizace při přípravě nosičových systémů hydrofobních léčiv.

Jako první byla stanovena přesná molekulová hmotnost nativního dextransu pomocí vylučovací chromatografie s víceúhlovým statickým rozptylem světla. Poté byly připraveny roztoky dextransu obsahující fluorescenční sondy pyren a prodan, a slepý vzorek obsahující pouze dextran. Připravené roztoky byly podrobeny procesu lyofilizace. Pro zjištění obsahu vody ve lyofilizovaných vzorkách byla provedena termogravimetrická analýza.

Účinnost sušení mrazem byla studována pomocí infračervené spektrometrie a skenovacího elektronového mikroskopu. U infračervené spektrometrie byly porovnány IČ spektra lyofilizovaných vzorků oproti nelyofilizovanému dextransu. Díky posunu absorpčního pásu valenční vibrace OH skupiny v alkoholu lze vyvodit, že u lyofilizovaných vzorků došlo k posílení hydrofobního efektu mezi jednotlivými řetězci dextransu. Jinými slovy, lyofilizace způsobuje eminentní zvýšení možných interakcí hydrofobní povahy ve struktuře polysacharidu, a tudíž se v takto připraveném systému nachází více aktivních míst pro inkorporaci a následné setrvání hydrofobních sloučenin.

Hydrofobní efekt mezi jednotlivými řetězci dextransu reprezentovaný i hydrofobním efektem mezi tímto biopolymerem a příslušnou fluorescenční sondou byly dále sledovány pomocí ustálené fluorescenční spektrometrie. U vzorků obsahující fluorescenční sondu pyren byly v emisním spektru porovnávány intenzity prvního (372 nm) a třetího (383 nm) píku. Pro důkaz podpoření hydrofobního efektu v průběhu lyofilizace byl spočítán emisní polaritní index. Vyšší hodnota emisního polaritního indexu (1,99) u nelyofilizovaného dextransu indikuje, že se fluorescenční sonda nachází v mikroprostředí s vyšší hodnotou polarity. Naproti tomu, nižší hodnoty (1,73) vypočteného koeficientu vypovídají o fenoménu, a to, že se fluorescenční sonda nachází v blízkosti jednotlivých řetězců dextransu, jejichž vzájemná orientace je převážně řízena působením zvýšení entropie molekul rozpouštědla tzn. hydrofobním efektem. Změna polaritního indexu poukazuje na to, že lyofilizace úspěšně vytvořila hydrofobní efekt mezi jednotlivými řetězci dextransu pro umístění pyrenu.

Podpora hydrofobního efektu po lyofilizaci systému polysacharidu a fluorescenční sondy prodanu byla potvrzena významným hypsochromním posunem, resp. blue shift fluorescenčního maxima, který nabýval hodnot $18 \text{ nm} \pm 7 \text{ nm}$ v porovnání se systémem roztoku nativního dextransu, do kterého byla daná fluorescenční sonda přidána těsně před vlastním měřením fluorescenčních spekter. Tento posun emisního maxima k nižším vlnovým délkám ukazuje, že prodan se po lyofilizaci nachází v méně polárnějším prostředí (v hydrofobním). U prodanu se také potvrdilo podpoření hydrofobního efektu.

Porovnáním SEM snímků se dospělo k závěru, že lyofilizace měla pozitivní vliv na vytvoření míst s vyšším obsahem hydrofobních domén. Proces lyofilizace vytvořil velké množství vláken polysacharidu. Pouhým okem lze také sledovat, že lyofilizované vzorky lépe udržují strukturu, zatímco nelyofilizovaný dextran byl sypký.

Z výsledků provedených měření lze ohodnotit metodu lyofilizace jako účinnou při navýšení hydrofobního efektu mezi nativním dextranem a silně nepolárními sloučeninami. Tato práce může svými výsledky přispět k dalšímu vývoji nosičových systémů na bázi chemicky nemodifikovaného dextranu pomocí procesu lyofilizace pro distribuci léčiv.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] GASPAR, Vítor M., André F. MOREIRA, Elisabete C. COSTA, João A. QUEIROZ, Fani SOUSA, Chantal PICHON a Ilídio J. CORREIA. Chapter 6 - Multifunctional nanocarriers for codelivery of nucleic acids and chemotherapeutics to cancer cells. 8. In: *Nanobiomaterials in Medical Imaging: Applications of Nanobiomaterials*. 2016, s. 163-207. ISBN 9780323417365. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-41736-5.00006-6
- [2] Dextran. *Merck* [online]. Darmstadt, Germany [cit. 2022-06-29]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/protocol/protein-biology/protein-pulldown/dextran>
- [3] What is dextran?. *TdB Labs* [online]. Uppsala, Sweden [cit. 2022-06-29]. Dostupné z: <https://tdblabs.se/applications/what-is-dextran/>
- [4] Dextran: Application Area. *Pharmacosmos* [online]. Denmark [cit. 2023-06-29]. Dostupné z: <https://www.dextran.com/application-areas>.
- [5] INAMDA, Nazma N. a Vishnukant MOURYA. Applications of Polymers in Delivery of Biologics. MISRA, Ambikanandan. *Applications of Polymers in Drug Delivery*. 2nd ed. Elsevier, 2021, 450–504. ISBN 978-0-12-819659-5. Dostupné také z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpAPDDE00C/applications-polymers/applications-polymers>
- [6] VALAPPIL SAJNA, Kuttuvan, Lalitha D. GOTTUMUKKALA, Rajeev K. SUKUMARAN a Ashok PANDEY. Chapter 18 - White Biotechnology in Cosmetics. In: *Industrial Biorefineries & White Biotechnology* [online]. 2015, s. 607-652 [cit. 2023-06-29]. ISBN 9780444634535. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780444634535000203?via%3Dihub>
- [7] A comparative study of molecular structure, solution properties and food application for three branched polysaccharides: Amylopectin, glycogen, and dextran. In: REZA KASAAI, Mohammad. *Current Trends in Polymer Science* [online]. 2012, s. 49-63 [cit. 2023-06-29]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/303312764_A_comparative_study_of_molecular_structure_solution_properties_and_food_application_for_three_branched_polysaccharides_Amylopectin_glycogen_and_dextran
- [8] ŠMEJKALOVÁ, Daniela, Tomáš MUTHNÝ, Kristina NEŠPOROVÁ, et al. Hyaluronan polymeric micelles for topical drug delivery. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2017, **156**, 86-96 [cit. 2023-05-14]. ISSN 0144-8617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2016.09.013
- [9] TORCHILIN, Vladimir P. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* [online]. 2001, **73**, 137-172 [cit. 2023-06-29]. ISSN 0168-3659. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-3659(01)00299-1
- [10] SINHA, Rajni, Gloria J. KIM, Shuming NIE a Dong M. SHIN. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. *Molecular Cancer Therapeutics* [online]. 2006, **5**(8), 1909–1917 [cit. 2023-06-29]. ISSN 1538-8514. Dostupné z: doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0141
- [11] ORIVE, G., O.A. ALI, E. ANITUA, J.L. PEDRAZ a D.F. EMERICH. Biomaterial-based technologies for brain anti-cancer therapeutics and imaging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* [online]. 2010, **1806**, 96-107 [cit. 2023-06-29]. ISSN 0304-419X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbcan.2010.04.001
- [12] HEHRE, Edward J., Frederic R. SENTI a Nison N. HELLMAN. Natural synthesis of low molecular weight (clinical type) dextran by a streptococcus strain. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1956, **222**, 739-750 [cit. 2023-06-29]. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(20)89932-3

- [13] BANERJEE, Aparna, Rajib BANDOPADHYAY a Nison N. HELLMAN. Use of dextran nanoparticle: A paradigm shift in bacterial exopolysaccharide based biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2016, **87**, 295-301 [cit. 2023-06-29]. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.02.059
- [14] ZHOU, Lisheng, Liming ZHOU, Chengxiu WEI a Rui GUO. A bioactive dextran-based hydrogel promote the healing of infected wounds via antibacterial and immunomodulatory. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2022, **291** [cit. 2023-06-29]. ISSN 0144-8617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2022.119558
- [15] SEAGER, H., C. B. TASKIS, M. SYROP a T. J. LEE. Structure of Products Prepared by Freeze-Drying Solutions Containing Organic Solvents. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* [online]. 1985, **39**(4), 161-179 [cit. 2023-06-29]. ISSN 1948-2124. Dostupné z: <https://journal.pda.org/content/39/4/161>
- [16] ABDELWAHED, Wassim, Ghania DEGOBERT, Serge STAINMESSE a Fessi HATEM. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2006, **58**(15), 1688-1713 [cit. 2023-06-29]. ISSN 0169-409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2006.09.017
- [17] TSINONTIDES, S.C., P. RAJNIAK, D. PHAM, W.A. HUNKE, J. PLACEK a S.D. REYNOLDS. Freeze drying—principles and practice for successful scale-up to manufacturing. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2004, **280**(1–2), 1-16 [cit. 2023-06-29]. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2004.04.018
- [18] SP VirTis AdVantage Pro Freeze Dryer. In: ATS: Life sciences Scientific products [online]. [cit. 2023-05-08]. Dostupné z: <https://www.scientificproducts.com/products/sp-virtis-advantage-pro-freeze-dryer>
- [19] SIN-HEE Kim a Chu CHIH-CHANG. Synthesis and characterization of dextran–methacrylate hydrogels and structural study by SEM. *Journal of Biomedical Materials Research* [online]. 2000, **49**(4), 517-527 [cit. 2023-06-29]. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1097-4636(20000315)49:4<517::AID-JBM10>3.0.CO;2-8
- [20] LAKOWICZ, Joseph R. Instrumentation for Fluorescence Spectroscopy. In: *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, 2006., s. 27-61. ISBN 03-873-1278-1
- [21] VALEUR, Bernard a Mário NUNO BERBERAN-SANTOS. 10.1002/9783527650002. In: *Molecular Fluorescence: Principles and Applications* [online]. 2012 [cit. 2023-05-14]. ISBN 9783527650002. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9783527650002>
- [22] JONES, Marie Ch. a Jean Ch. LEROUX. Polymeric micelles – a new generation of colloidal drug carriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 1999, **48**(2), 101-111 [cit. 2023-06-29]. ISSN 0939-6411. Dostupné z: doi:10.1016/S0939-6411(99)00039-9
- [23] BALDI, Leonardo D.C., Eduardo T. IMAZAKI a Teresa D.Z. ATVARS. Evaluation of the polarity of polyamide surfaces using the fluorescence emission of pyrene. *Dyes and Pigments* [online]. 2008, **76**(3), 669-676 [cit. 2023-05-09]. ISSN 0143-7208. Dostupné z: doi:10.1016/j.dyepig.2007.01.011
- [24] ORELLANO, M. Soledad, Diego A. CHIAPPETTA, Juana J. SILBER, R. Darío FALCONE a N. Mariano CORREA. Monitoring the microenvironment inside polymeric micelles using the fluorescence probe 6-propionyl-2-dimethylaminonaphthalene (PRODAN). *Journal of Molecular Liquids* [online]. 2021, **343** [cit. 2023-05-09]. ISSN 0167-7322. Dostupné z: doi:10.1016/j.molliq.2021.117552
- [25] TRAN, Phuong H.L., Beom-Jin LEE a Thao T.D. TRAN. Strategies and formulations of freeze-dried tablets for controlled drug delivery. *International Journal of*

- Pharmaceutics* [online]. 2021, **597** [cit. 2023-05-18]. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2021.120373
- [26] MICHALICOVÁ, Petra, Filip MRAVEC a Miloslav PEKAŘ. Fluorescence study of freeze-drying as a method for support the interactions between hyaluronan and hydrophobic species. *PLOS ONE* [online]. PLOS, 2017, **12**(9), 1-13 [cit. 2023-05-09]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0184558
- [27] ELBRINK, Kimberley, Sofie Van HEES, René HOLM a Filip KIEKENS. Optimization of the different phases of the freeze-drying process of solid lipid nanoparticles using experimental designs. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2023, **635** [cit. 2023-05-18]. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2023.122717
- [28] VESSOT, Séverine a Julien ANDRIEU. A Review on Freeze Drying of Drugs with tert-Butanol (TBA) + Water Systems: Characteristics, Advantages, Drawbacks. *Drying Technology* [online]. 2012, **30**(4), 377-385 [cit. 2023-05-18]. ISSN 1532-2300. Dostupné z: doi:10.1080/07373937.2011.628133
- [29] KOLE, Eknath, Krishna JADHAV, Nitin SHIRSATH a Prashik DUDHE. Nanotherapeutics for pulmonary drug delivery: An emerging approach to overcome respiratory diseases. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* [online]. 2023, **81** [cit. 2023-05-18]. ISSN 1773-2247. Dostupné z: doi:10.1016/j.jddst.2023.104261
- [30] M. STRIEGEL, André a Pritish SINHA. Absolute molar mass determination in mixed solvents. 1. Solving for the SEC/MALS/DRI “trivial” case. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2019, **1053**, 186-195 [cit. 2023-05-09]. ISSN 0003-2670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2018.11.051
- [31] ATR-FTIR Spectroscopy. *Agilent* [online]. Santa Clara, USA [cit. 2023-05-11]. Dostupné z: <https://www.agilent.com/en/product/molecular-spectroscopy/ftir-spectroscopy/atr-ftir-spectroscopy>
- [32] SMITH, J., A. JONES a B. BROWN. Hydrophobic Interaction in Proteins: Insights from Infrared Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*. 2001, **123**(45), 11234-11241. Dostupné z: doi:10.1021/ja016438o
- [33] MOHANAMBE, L. a S. VASUDEVAN. Aromatic Molecules in Restricted Geometries: Pyrene Excimer Formation in an Anchored Bilayer. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2006, **110**(29), 14345-14354 [cit. 2022-04-26]. ISSN 1520-6106. Dostupné z: doi:10.1021/jp061695e
- [34] MOYANO, Fernando, M. ALICIA BIASUTTI, Juana J. SILBER a N. MARIANO CORREA. New Insights on the Behavior of PRODAN in Homogeneous Media and in Large Unilamellar Vesicles. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2006, **110**(24), 11838-11846 [cit. 2023-05-11]. Dostupné z: doi: 10.1021/jp057208x

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

7.1 Seznam zkratek

Zkratka	Význam
TGA	termogravimetrická analýza
H ₂ O	voda
TBA	terc-butylalkohol
M _w	molekulová hmotnost
SEC-MALS-dRI	vylučovací chromatograf s více úhlovým statickým rozptylem světla
ATR-FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (zeslabená celková odrazivost)
RAMAN	Ramanova spektroskopie
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
pH	potenciál vodíku
EmPI	emisní polaritní index
T	teplota
Lyo.	Lyofilizovaný

7.2 Seznam symbolů

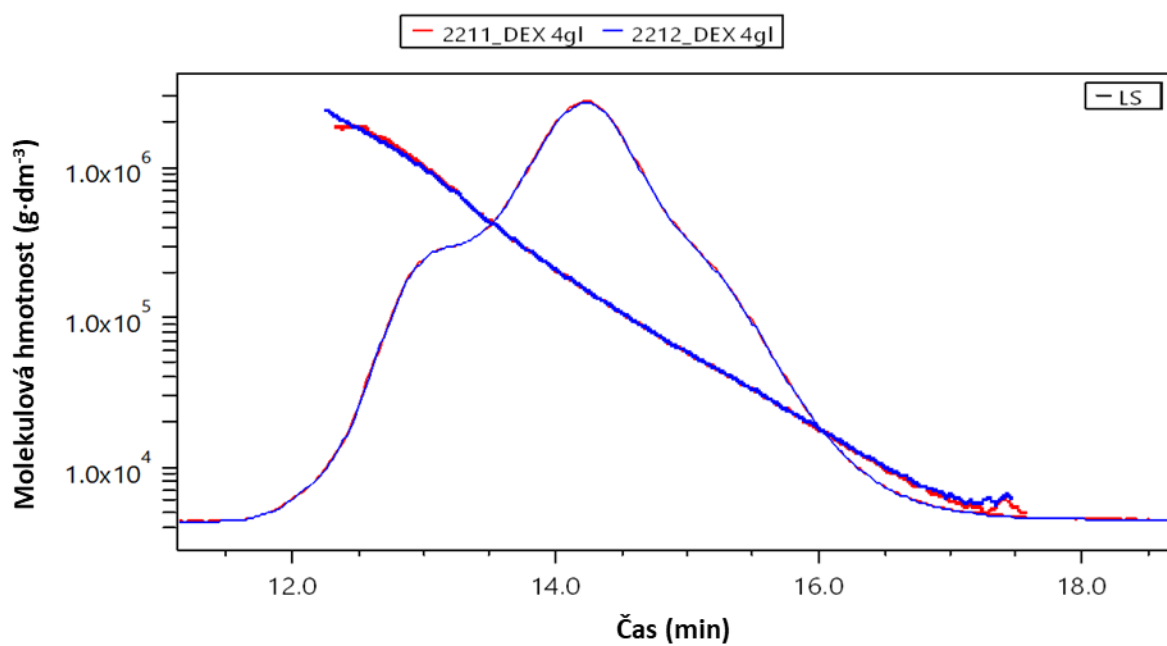
Symbol	Název veličiny
g	gram
g·mol ⁻¹	gram na mol
mol·dm ⁻³	mol na decimetr krychlový
nm	nanometry
min	minuty
mTorr	millitorr
mg·ml ⁻¹	miligram na mililitr
cm ⁻¹	centimetr na minus první
M	mol na decimetr krychlový
°C	stupeň Celsia
W	watt
kDa	kilodalton
l	litr
μl	mikrolitr
M _w	molekulová hmotnost
%	procenta
hm. %	hmotnostní procenta
Pa	pascal
s ⁻¹	sekunda na minus první
c	koncentrace
λ _{max}	vlnová délka při maximální intenzitě fluorescence

S_0	základný stav molekuly
S_1	prvý excitovaný singletový stav molekuly
S_2	druhý excitovaný singletový stav molekuly
$\Delta\lambda$	posun maxima vlnové délky
$\pm \delta$	směrodatná odchylka

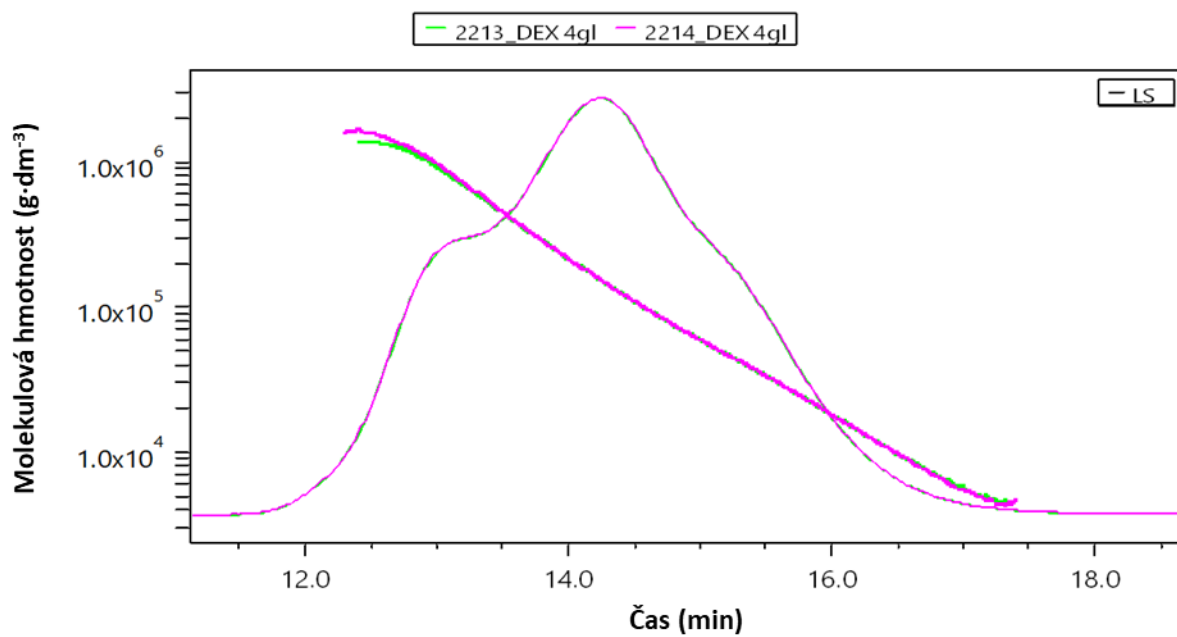
8 PŘÍLOHY

Tab. 6: Naměřené hodnoty vlhkosti lyofilizovaných vzorků a nelyofilizovaného dextranu pomocí termogravimetrické analýzy.

vzorek	vlhkost [hm. %]	vlhkost [hm. %]	$\pm \delta$ [hm. %]
slepý vzorek (dextran lyo.)	8,46	8,16	0,21
	8,09		
	7,95		
pyren	9,96	8,33	1,16
	7,28		
	7,77		
prodan	8,50	8,62	0,1
	8,73		
	8,64		
dextran	6,99	6,99	0



Obr. 18: SEC-MALS-dRI chromatogram pro nástřik 50 μl .



Obr. 19: SEC-MALS-dRI chromatogram pro nástřik 25 μl .