



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta mechatroniky, informatiky
a mezioborových studií ■

Syntéza derivátů cyklodextrinů vhodných k modifikaci nanovláken

Bakalářská práce

Studijní program: B3942 – Nanotechnologie
Studijní obor: 3942R002 – Nanomateriály
Autor práce: **Josef Světlík**
Vedoucí práce: RNDr. Michal Řezanka, Ph.D.





TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC
Faculty of Mechatronics, Informatics
and Interdisciplinary Studies ■

Synthesis of cyclodextrin derivatives suitable for nanofibre modification

Bachelor thesis

Study programme: B3942 – Nanotechnology
Study branch: 3942R002 – Nanomaterials

Author: **Josef Světlík**
Supervisor: RNDr. Michal Řezanka, Ph.D.



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Josef Světlík**
Osobní číslo: **M13000170**
Studijní program: **B3942 Nanotechnologie**
Studijní obor: **Nanomateriály**
Název tématu: **Syntéza derivátů cyklodextrinů vhodných k modifikaci nanovláken**
Zadávací katedra: **Katedra chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Literární rešerše (syntéza derivátů cyklodextrinů, modifikace nanovláken cyklodextriny).
2. Syntéza a charakterizace derivátů cyklodextrinů vhodných k modifikaci nanovláken.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

- Bláhová, M.; Bednářová, E.; Řezanka, M.; Jindřich, J. J. Org. Chem. 2013, 78, 697-701.
- Celebioglu, A.; Demirci, S.; Uyar, T. Applied Surface Science 2014, 305, 581-588.
- Li, R.; Dou, J.; Jiang, Q.; Li, J.; Xie, Z.; Liang, J.; Ren, X. Chemical Engineering Journal 2014, 248, 264-272.

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Michal Řezanka, Ph.D.
Katedra chemie

Datum zadání bakalářské práce: **1. října 2015**

Termín odevzdání bakalářské práce: **16. května 2016**


prof. Ing. Václav Kopecký, CSc.
děkan




prof. Ing. Josef Šedlbauer, Ph.D.
vedoucí katedry

V Liberci dne 1. října 2015

Prohlášení

Byl jsem seznámen s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum: 16. 5. 2016

Podpis:



Poděkování

Velké díky na úvod patří především RNDr. Michalu Řezankovi, Ph.D. za vřelý způsob vedení bakalářské práce k zdárnému konci, pod což lze zahrnout nejen nemalé množství užitečných rad spojených se zasvěcováním do správných laboratorních návyků, ale i mnoho doporučení při sepisování této práce. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Markétě Řezankové za bleskové měření NMR spekter a Ing. Martinu Stuchlíkovi za naměření FTIR a Ramanových spekter.

Další dík patří Ing. Janu Lukáškoví za obeznámení mě s prací na flash chromatografii a za jiné, drobnější, ale přesto velice přínosné rady. Také bych rád projevil vděk všem ostatním členům laboratoře, jmenovitě prof. Ing. Ivanu Stiborovi, CSc., Mgr. Janě Karpíškové, Mgr. Veronice Zajícové, Ph.D. a M.Sc. Sumitě Swar, za vytváření příjemné atmosféry během celého uplynulého akademického roku.

Nebyl bych patrně tam, kde jsem dnes bez podpory svých drahých rodičů, i jim tedy skládám hluboké díky.

Nakonec bych rád poděkoval GAČR za finanční prostředky poskytnuté v rámci projektu č. 16-02316Y.

Abstrakt

Během této bakalářské práce byly získány per-*O*-acetyl-6^A-*O*-propargyl-β-cyklodextrin a 6^A-*O*-propargyl-β-cyklodextrin. Podle autorova nejlepšího vědomí zatím nebyla publikována přesvědčivá studie, zabývající se izolací a charakterizací druhé z uvedených látek.

Úvodní část literární rešerše je věnována cyklodextrinům samotným, jejich historii, struktuře, metodám výroby, vlastnostem a aplikacím. Následující kapitola pojednává o derivátech cyklodextrinů a možnostech jejich navázání na vlákna. Poslední část rešerše je zaměřena na obor tkáňového inženýrství, jeho výzvy a výhody aplikace derivátů cyklodextrinů.

Pro ověření funkčnosti metody přípravy a získání spolehlivějších výsledků byla nejprve provedena pilotní studie, kterou následovala syntéza ve větším množství. Produkty byly charakterizovány NMR, FTIR, Ramanovou spektroskopií a hmotnostní spektrometrií.

Klíčová slova: cyklodextriny, propargyl, deriváty, vlákna, tkáňové inženýrství

Abstract

Per-O-acetyl-6^A-O-propargyl- β -cyclodextrin and 6^A-O-propargyl- β -cyclodextrin were obtained during this bachelor thesis. To the best of author's knowledge isolation and conclusive characterization of the second one has not been published yet.

Opening part of literature research pays attention to cyclodextrins themselves, their history, structure, methods of production, properties and applications. Following chapter deals with derivatives of cyclodextrins and options of fiber functionalization by these chemical compounds. Final part of research is focused on tissue engineering specialization, its challenges and benefits of cyclodextrin derivatives application.

At first, the preliminary study were done for verification of preparation method and more credible results. It was followed by larger scale synthesis. Product were characterized by NMR, FTIR, Raman spectroscopy and molar mass spectrometry.

Keywords: cyclodextrins, propargyl, derivatives, fibers, tissue engineering

Obsah

<u>Seznam zkratk.....</u>	<u>9</u>
<u>1 Úvod.....</u>	<u>10</u>
<u>2 Teoretická část.....</u>	<u>11</u>
<u>2.1 Stručná historie cyklodextrinů.....</u>	<u>11</u>
<u>2.2 Struktura cyklodextrinů.....</u>	<u>12</u>
<u>2.3 Výroba cyklodextrinů.....</u>	<u>13</u>
<u>2.4 Vlastnosti cyklodextrinů.....</u>	<u>14</u>
<u>2.5 Fenomén inkluzních komplexů.....</u>	<u>15</u>
<u>2.6 Využití CD.....</u>	<u>18</u>
<u>2.7 Deriváty cyklodextrinů.....</u>	<u>19</u>
<u>2.7.1 Vybrané 6^A-O monosubstituované β-cyklodextriny.....</u>	<u>20</u>
<u>2.8 Metody tvorby cyklodextriny funkcionalizovaných vláken.....</u>	<u>25</u>
<u>2.9 Aplikace cyklodextrinů v tkáňovém inženýrství.....</u>	<u>27</u>
<u>3 Experimentální část.....</u>	<u>35</u>
<u>3.1 Příprava per-O-acetyl-6^A-O-propargyl-β-cyklodextrinu.....</u>	<u>35</u>
<u>3.2 Příprava 6^A-O-propargyl-β-cyklodextrinu.....</u>	<u>36</u>
<u>4 Výsledky a diskuse.....</u>	<u>37</u>
<u>5 Závěr.....</u>	<u>44</u>
<u>Seznam literatury.....</u>	<u>45</u>

Seznam zkratek

Ac	acetyl
CD	cyklodextrin(y)
CD-Py	cyklodextrin-pyrrolový derivát
CGTáza	cyklodextrin glykosyltransferáza
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA shuffling PCR	polymerázová řetězová reakce kombinující různě mutované genomy
ECM	extracelulární matrix
error-prone PCR	polymerázová řetězová reakce generující náhodné mutace
FTIR	infračervená spektroskopie s využitím Fourierovy transformace
NMR	nukleární magnetická rezonance
PPy	polypyrrol
RVO	rotační vakuová odparka
SC	kmenové buňky
TEA	triethylamin
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TsCl	tosylchlorid
TsO-CD	6 ^A -O-tosyl-β-cyklodextrin
PCL	polykaprolakton
PEO	polyethylenoxid
PEVA	polyethylenvinylacetát
PGA	polyglykolová kyselina
PLA	polymléčná kyselina
PLGA	kopolymer polymléčné a glykolové kyseliny
PLLA-CL	kopolymer poly(L-mléčné kyseliny) a kaprolaktonu
PMMA	polymethylmethakrylát
PU	polyuretan
PVB	polyvinylbutyral
QSAR analýza	analýza kvantitativních vztahů mezi strukturou a aktivitou

1 Úvod

Nanotechnologie, s nimiž jsem se během bakalářského kurzu seznamoval, představují vsutku interdisciplinární problematiku. Přemostují znalosti mnoha oborů, jako např. fyziky, chemie, materiálového inženýrství a v případě zdravotnických aplikací i biologie. Sám jsem při sepisování následujících řádků musel čerpat ze znalostí všech uvedených odvětví, jelikož se oblastí mého zájmu staly deriváty cyklodextrinů vhodné k modifikaci nanovláken pro konstrukci tkáňových nosičů. Ty se používají v regenerativní medicíně jako jakési člověkem zkonstruované lešení pro buňky, na kterém by mohly růst, množit se a následně stvořit funkční tkáň.

Takovéto *ex vivo* vypěstované orgány by mohly pacientům podstupujícím transplantaci poškozené části těla značně zredukovat dobu čekání na dárce, kterážto se jím často stane osudnou. Dalším cílem regenerativní medicíny je napomoci tělu při procesu hojení, aby se namísto jizvy tvořila původní zdravá tkáň a *in vitro* příprava částí těla, jejichž přirozená obnovovací schopnost není dostačující.

Mezi tkáně, v jejichž moci není přirozená obnova, patří i nervový systém. Právě přípravu cyklodextriny funkcionalizovaných vodivých vláken pro pěstování neurálních drah si klade za cíl výzkumný tým, do nějž jsem se v rámci bakalářských studií zapojil. V rámci projektu bylo třeba mimo jiné připravit vhodné deriváty cyklodextrinů, kterými by se nanovláknemohla funkcionalizovat, což se stalo náplní mé práce.

2 Teoretická část

2.1 Stručná historie cyklodextrinů

Éra cyklodextrinů (CD) započala v roce 1891, kdy je objevil francouzský lékárník a chemik A. Villiers¹, který se zabýval vlivem enzymů na mnohé sacharidy. Získal je v nepatrném výtěžku (0,3 %) a navíc se nejednalo o čisté CD, ale pravděpodobně o směs α - a β -CD. Jím popsany proces přípravy zahrnoval naočkování škrobové pasty bakteriální kulturou *Bacillus amylobacter* (která zřejmě obsahovala i spory *Bacillus macerans*)³, produkující máselný kvásek (*Clostridium butyricum*) a několikadenní inkubaci při 40 °C. Jelikož mu výsledný neobvyklý produkt, odolností vůči kyselé hydrolyze a neredukčními vlastnostmi připomínal celulosu, nazval jej „cellulosine“ a chybně odhadl, že by jeho vzorec mohl být $[(C_6H_{10}O_5)_2 + 3 H_2O]$.

O 12 let později CD znovuobjevil rakouský chemik a bakteriolog F. Schardinger², jehož majoritním zájmem byly mikroorganismy odolné vůči vysokým teplotám. A právě v roce 1903 objevil typ vysokoteplotně odolných mikroorganismů (tzv. termofilů), které byly schopny rozpouštět škrob a tvořit krystalické vedlejší produkty pozoruhodně podobné Villiersovu „cellulosinu“ ve výtěžku 25–30 %. Rozhodl se proto tento bakteriální kmen, zodpovědný za produkci enzymu, který zajišťuje přeměnu škrobu v CD, izolovat. Výsledkem byl objev *Bacillus macerans*⁴. O několik let později bylo zjištěno, že oním enzymem je cyklodextrin glykosyltransferáza (CGTáza). Dále se Schardingerovi podařilo pomocí jednoduchého barvicího testu (barvení roztokem jodu) rozlišit dva typy cyklodextrinů, jež nazval „krystalický dextrin A a B“. Mezi léty 1905 až 1911 pak podal první detailní popis přípravy, separace a čištění „cellulosinů“ a taktéž jejich chování v některých rozpouštědlech⁵. Právě proto je mnohými považován za „otce zakladatele“ chemie cyklodextrinů, nebo Schardingerových dextrinů, jak byly jeho následovníky zpočátku nazývány.

Skupina sdružující se kolem Němce Pringsheima⁶ zjistila, že mají CD tendenci tvořit komplexy s mnohými organickými sloučeninami. Freudenberg⁷ a jeho spolupracovníci dospěli k závěru, že Schardingerovi dextriny jsou tvořeny maltosovými jednotkami a obsahují pouze α -1,4-glykosidické vazby. Také popsali schéma izolace homogenních a čistých frakcí a postulovali cyklickou strukturu těchto krystalických dextrinů.

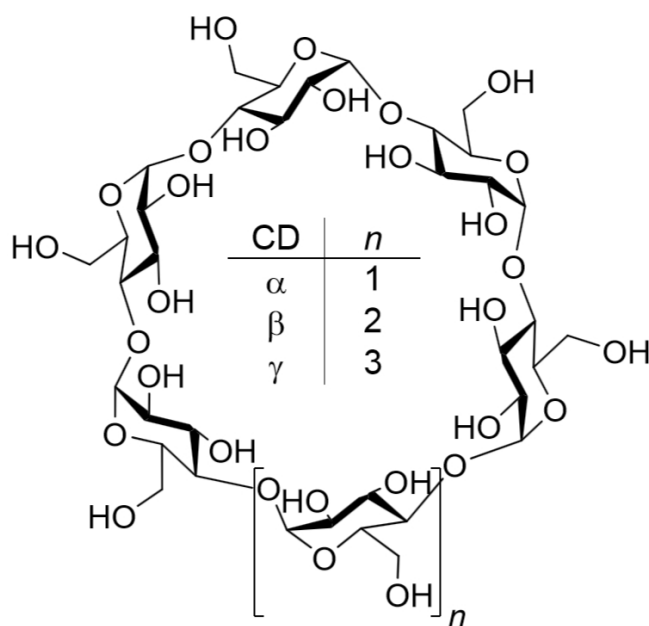
V roce 1935¹⁹ byl objeven γ -CD a v následujících letech objasněna jeho struktura⁸. První patent⁹ obdrželi v roce 1953 Freudenberg, Cramer a Plieninger. Pojednává o základních vlastnostech CD, o jejich přípravě a dále pokrývá několik nejdůležitějších oblastí aplikace CD, například komplexaci těkavých látek nebo látek snadno podléhajících oxidaci a využití komplexace k zvýšení rozpustnosti léčiv. V roce 1957 sepsal French review¹⁰ o CD, v rámci kterého uvedl informaci o jejich značné toxicitě (ve skutečnosti úhyn pokusných zvířat pravděpodobně způsobily nečistoty přítomné v CD). Tato ledabyly provedená studie způsobila úbytek zájmu o CD, jelikož tak ztratily velkou část potenciálu využití. Trvalo pak dlouhou dobu, než byla dezinformace vyvrácena a zájem opětovně narostl. První mezinárodní konference na téma CD proběhla v roce 1981 a od té doby se koná každý druhý rok až do teď. Letos probíhá osmnáctý ročník od 18. – 21. 5. v Gainesville na Floridě (USA)²⁰.

Ačkoli je historie CD bezesporu velice poutavá, není možno se jí v rámci této bakalářské práce dopodrobna věnovat, doporučil bych proto v případě čtenářova zájmu následující literaturu^{11,12}.

2.2 Struktura cyklodextrinů

Cyklodextriny (CD), někdy též zvané cykloamylosy, jsou cyklické oligosacharidy tvořené D-glukopyranosovými jednotkami, které jsou navzájem pospojované α -1,4-glykosydicnými vazbami. Podle toho zdali je těchto jednotek v kruhu 6, 7 nebo 8, jedná se postupně o α -, β - a γ -CD (obr. 1). Kromě těchto tří forem existují ještě jiné, s těmi se však setkáváme méně často. Mezi takové patří např. nejmenší člen rodiny cyklodextrinů pre- α -CD¹³ s 5 jednotkami, a dále pak větší útvary jako δ -CD (devítičlenný), ϵ -CD (desetičlenný) a další, dokonce s více než stovkou jednotek¹⁴.

Cyklodextriny s 8 a více glukosovými jednotkami v cyklu a jejich deriváty mají minoritní význam, který je způsoben ztrátou prostorově výhodné konformace, jež podmiňuje dobré komplexační schopnosti CD (se vzrůstajícím počtem jednotek dochází nejprve ke kolapsu kavity, jejíž skutečná velikost se ve výsledku zmenší a následně i k nechtěným překladům různých částí téhož kruhu přes sebe). Malá pozornost jim je taktéž věnována pro vysokou výrobní cenu, která mimo jiné souvisí s nepřítomností vhodných metod, které by umožnily přípravu těchto sloučenin ve vysokých výtěžcích.



Obr. 1: Struktura cyklodextrinů.

2.3 Výroba cyklodextrinů

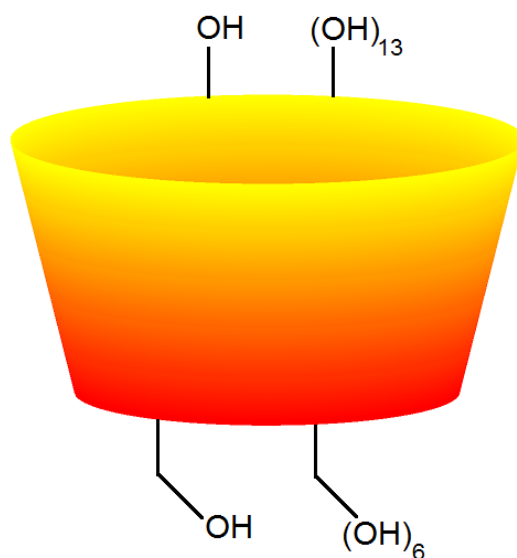
Cyklodextriny jsou dnes produkovány v řádu tisíců tun ročně. Vznikají relativně jednoduchou enzymatickou konverzí, přičemž výchozí látkou této reakce je jeden z nejběžnějších polysacharidů – škrob. Oním enzymem je již výše zmíněná CGTáza (E.C 2.4.1.19)¹⁶, která je produkována širokou škálou mikroorganismů, jednak z domény Archea a hlavně bakteriemi¹⁵. Jedná se např. o *Bacillus macerans*, *Klebsiella pneumoniae*, *B. Stearothermophilus*, *Klebsiella oxytoca*, *Bacillus circulans*, *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*, *Alkalophylic bacillus*, a *Micrococcus luteus*.

Jelikož mají jednotlivé CD celkem různorodé vlastnosti, pro určité aplikace je vhodné využívat jen jedné jeho konkrétní podoby. Naneštěstí dlouho byl snadno a s vysokými výtěžky vyráběn pouze β -CD, který má při působení CGTázy vylučujícími mikroorganismy na škrob povětšinou největší zastoupení ve směsi. Existují však i výjimky¹⁷, například bakterie z rodu *Klebsiella oxytoca* druhu *No. 19-1* jsou schopny produkovat $\alpha : \beta : \gamma$ -CD v poměru 96,5 : 3,5 : 0.

V posledních letech byl učiněn významný pokrok v oblasti produkce γ -CD metodami genetického inženýrství. Zajímavým způsobem získávání nových bakteriálních kultur, s lehce pozměněným genomem v oblasti kódující syntézu CGTázy, je využívání kombinace metod „error-prone PCR“ a „DNA shuffling PCR“ (polymer. řet. reakce kombinující různě mutované genomy). Těmito prostředky byla získána nová varianta CGTázy (S54), která produkuje formy β : γ -CD v poměru 1 : 7. Dále bylo dosaženo i zvětšení rozsahu pH, při kterém je enzym (nová forma S35) katalyticky aktivní¹⁸.

2.4 Vlastnosti cyklodextrinů

Cyklodextriny jsou bílé krystalické látky, které vykazují významně odlišné chování v porovnání s klasickými oligosacharidy (optická aktivita, stabilita v různém chemickém prostředí atd.). V důsledku 4C_1 konformace mají tvar dutého komolého kužele. Jeho vrchní část tvoří sekundární hydroxylové skupiny, kterých je vždy dvojnásobný počet než primárních hydroxylových skupin. Ty jsou orientovány na stranu opačnou, čímž vytvářejí základnu tělesa (obr. 2). Primární okraj CD je menší, poněvadž $-CH_2OH$ zbytky glukopyranosových jednotek mohou rotovat a zmenšovat tak efektivní průměr vstupu do kavity.



Obr. 2: Tvar cyklodextrinu.

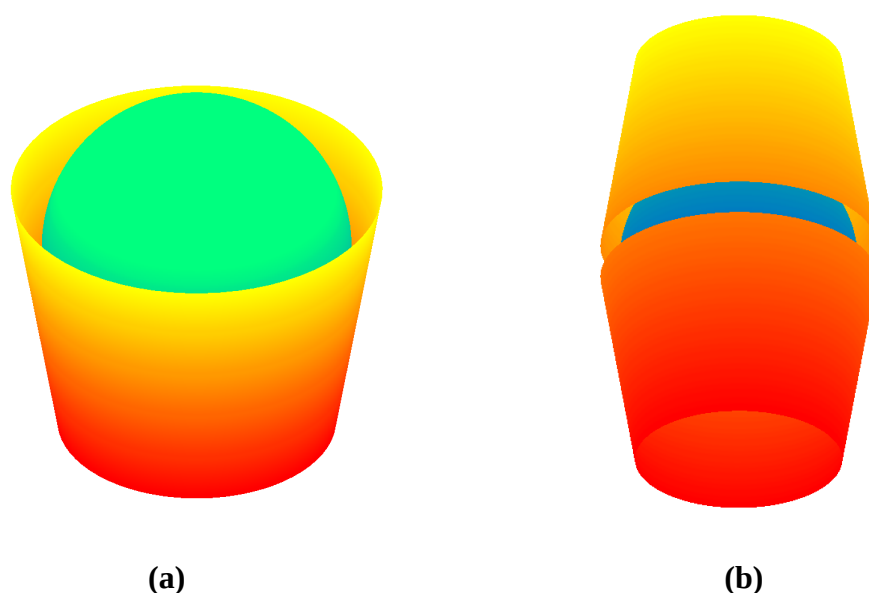
Jelikož je vnitřek dutiny CD tvořen uhlíkovými a na ně připojenými vodíkovými atomy, získává hydrofobní charakter. Navíc jsou zde ještě situovány glykosidické kyslíkové můstky. Protože jsou na těchto kyslících nevazebné elektronové páry, směřující dovnitř dutiny, dávají jí charakter Lewisovy báze.

Celý útvar navíc stabilizují vodíkové můstky mezi 2-OH a 3-OH skupinami sousedních glukopyranosových jednotek. U β -CD je sekundární pás vodíkových vazeb kompletní, proto je spíše rigidní strukturou. Právě tato skutečnost způsobuje jeho nejnižší rozpustnost ve vodě ze všech forem. U α -CD je pás vodíkových vazeb nekompletní, jelikož se jedna z jednotek vyskytuje ve vybočené poloze, tudíž můžou být plně zapojeny pouze 4 vazby z 6 možných. γ -CD je dosti flexibilní, tedy ve vodě nejsnadněji rozpustný¹¹.

Jsou stále v bazickém prostředí, pouze se deprotonují jejich hydroxylové skupiny, naopak v kyslejších prostředí dochází k hydrolýze (rozpadu cyklu).

2.5 Fenomén inkluzních komplexů

Jelikož je schopnost CD tvořit inkluzní komplexy s látkami všech skupenství právě tou vynikající vlastností, jíž se využívá v mnoha odvětvích průmyslu pro zlepšení fyzikálních, chemických nebo biologických charakteristik všemožných hostovaných molekul, budu se jí zabývat trochu více dopodrobna.



Obr. 3: Komplexy cyklodextrinů v poměru (a) 1:1 a (b) 2:1.

Inkluzní komplexy jsou dočasné útvary skládající se z hostitelské molekuly (CD) a hosta, který musí splnit určité požadavky na velikost a strukturu. Poměr hostitel : host je ve většině případů 1 : 1¹¹, ale existují i případy, kdy jednu molekulu hosta komplexují dva CD (např. komplexace fullerenu²¹ C₆₀), nebo naopak²². Další supramolekulární útvary s jiným poměrem hostitel : host byly též pozorovány²³.

Mezi molekulami CD a hosta se po čase ustanovuje dynamická rovnováha, která je dána konstantou stability $K = k_R/k_D$ vyjadřující poměr rychlosti vzniku (rekombinace) a zániku (disociace) sekundárních vazeb spojujících CD s hostem.

K schopnostem CD tvořit inkluzní komplexy přispívá hned několik sil různé povahy. Především jde o elektrostatické, van der Waalsovy a hydrofobní interakce a vazbu vodíkovými můstky. Význam jednotlivých silových příspěvků byl dříve posuzován podle změny entropie a entalpie systému, jelikož však často dochází k jejich vzájemné kompenzaci²⁵, neukázalo se toto kritérium vhodným.

Dlouho bylo za hnací sílu komplexace považováno tzv. vyloučení vysokoenergetické vody z dutiny CD. Tato voda uvnitř hydrofobní kavity CD je nazývána vysokoenergetickou z toho důvodu, že v těchto místech nemůže tvořit vodíkové můstky, které by jinak mohla vytvářet mimo kavitu, kde voda pomocí nich tvoří trojrozměrnou síť. Její uvolnění z CD je tedy doprovázeno uvolněním entalpie. Nesmíme však zapomínat na to, že uvnitř kavity má voda více stupňů volnosti, které při opuštění CD ztrácí (záporná změna entropie). Při vyloučení entalpicky bohaté vody dojde k reorganizaci rozpouštědla, aby se dříve komplexované molekuly vody mohly zapojit do sítě vodíkových můstků. Protože je tento jev doprovázen entropicko – entalpickou kompenzací bez uvolnění volné energie, která by mohla přispět ke vzniku komplexu, nejedná se o jev, kterým by bylo možno objasnit fenomén inkluzní komplexace a je potřeba pátrat po jiných důvodech. Dalším adeptem na objasnění tohoto jevu jsou elektrostatické interakce.

Elektrostatické (Coulombovské) interakce jsou buď typu ion – dipól nebo dipól – dipól. Interakce typu ion – ion se mohou vyskytovat jen v případě, když je CD vhodně substituován, čímž získá permanentní náboj. Ukazuje se obtížným zjistit, jak důležitou roli

interakce takového typu hrají, a to hlavně proto, že nutně nedochází k zesílení jevu komplexace se zvýšením náboje na hostovi. Ve skutečnosti totiž silné elektrostatické interakce nemusí být vůbec pro tvorbu komplexů příznivé, protože dochází i k zesílení vazby potenciálního hosta na rozpouštědlo, která může být ve výsledku upřednostněna před vazbou na CD. Velmi tedy záleží na prostředí, ve kterém se dvojice hostitel – host vyskytují. Když však předejdeme takovýmto efektům rozpouštědla a pozorujeme vliv elektrostatických interakcí na tvorbu komplexů v plynné fázi, zjistíme, že v takovýchto systémech mohou hrát stěžejní roli. Stejně tak samotná polarita CD je velmi závislá na okolním chemickém prostředí. Ačkoli starší publikace poukazovaly na značně větší hodnoty dipólového momentu (10-20 D)²⁷, nedávné studie využívající teoretických metod a výpočtů *ab initio*²⁸ předpověděly hodnoty nižší (< 10 D)³⁴.

Ukázalo se však, že obecně ve většině systémů elektrostatické interakce ovlivňují spíše konformační uspořádání komplexu než jeho stabilitu²⁴.

Badatelé zabývající se CD van der Waalsovými interakcemi míní především indukční a disperzní síly. Indukční síly vznikají působením permanentního dipólu (polární molekuly) na nepolární molekulu, u které vyvolá dočasný indukovaný dipól. Disperzními (Londonovými) silami je pak myšlena synchronizace elektronových oblaků dvou molekul, což má za následek vznik dočasných dipólových momentů, jež zapříčiní atrakci mezi molekulami. Poněvadž je tyto interakce při posuzování jejich vlivu na tvorbu inkluzních komplexů těžké navzájem odlišit, dává se při debatě přednost obecnému pojmu *van der Waalsovy síly*. Početné studie odhalily, že právě pomocí těchto sil jsou objemné substituenty v těsném kontaktu s kavitou CD²⁴. Fakt, že jsou CD schopny tvořit inkluzní komplexy i v takových rozpouštědlech jako DMF, DMSO a dokonce heptanu, je dalším z důkazů nezbytné důležitosti van der Waalsových sil. Také pomocí výpočtů a teoretických metod, při kterých se naprosto eliminoval vliv rozpouštědla na výsledky, jelikož se jednalo o tvorbu modelu chování plynu, bylo dovozeno, že van der Waalsovy síly tvoří hlavní příspěvek k silám formujícím CD komplex. Z tohoto výsledku však nelze vyvozovat žádné závěry o tom, jestli tyto síly hrají hlavní roli i v roztoku. Lze jen říci, že síla vazby substrátu na CD zůstává patrně podobně silná. Van der Waalsovy síly však nepůsobí jen mezi CD a substrátem, ale i mezi substrátem a rozpouštědlem (např. vodou). Poněvadž má

však CD větší hodnotu polarizability než voda, interakce substrátu a CD jsou většinou silnější a tvoří tak pozitivní příspěvek k stabilitě komplexu.

Hydrofobní interakce se týkají nepolárních látek, které mají povahu zvýšené vzájemné afinity v polárním (vodném) prostředí. Vazba takovýchto látek na rozpouštědlo je pak slabší, než vazba mezi molekulami rozpouštědla navzájem. Jedním z důkazů důležitosti této síly je skutečnost, že celková změna entropie systému při komplexaci bývá kladná, jediným možným zdrojem pozitivní entropie je však pouze hydrofobní interakce. Dále na přítomnost této síly poukazuje fakt, že hydrofobní části molekul jsou orientovány právě dovnitř lipofilní kavity CD. Napovídajícím je taktéž úbytek stability komplexu po přidavku organického nepolárního rozpouštědla a naopak nárůst stability s přidavkem anorganických solí, které polaritu vnějšího prostředí zvýší²⁴.

Vodíkové vazby mezi hostem a molekulami vody jsou často silnější než mezi hostem a CD, nemohou být pak v takových případech přispívající²⁴.

Při určování vazebných konstant komplexů a zjišťování, která síla má v daném systému největší význam se osvědčily *analýzy kvantitativních vztahů mezi strukturou a aktivitou (tzv. QSAR analýzy)*⁴⁰.

2.6 Využití CD

Široký rozsah využitelnosti CD je dán především jejich zdravotní nezávadností³⁷. Mohou být tedy využívány v potravinářském průmyslu²⁶ pro ochranu vůní, vitamínů a přírodních barviv před stresovými faktory vnějšího prostředí (teplota, záření, oxidace), nebo naopak k odstranění hořkých nebo jinak chuťově nepříjemných komponent a mikrobiologických kontaminantů. β -CD je též využíván při výrobě potravin s nízkým obsahem cholesterolu, se kterým tvoří dosti pevné komplexy. Tímto způsobem bývá většinou bez problému odstraněno kolem 80 % této steroidní látky³⁵.

Dále jsou CD široce využívány ve farmaceutickém průmyslu²⁹ pro zvýšení rozpustnosti hydrofobních léků ve vodě a tedy i lepší vstřebání medikamentů tělem nebo jejich stabilizaci. Taktéž mohou pomoci při odstraňování nežádoucích vedlejších účinků léků, jako např. podráždění žaludku, kůže nebo očí, tím, že se v těle postupně uvolňují, resp.

vstřebávají a lokální okamžitá koncentrace nedosahuje takových hodnot, jako v případě podání nezakomplexovaného léku³⁰. CD též našly uplatnění při výrobě zdravotnických textilií, kdy jsou s jejich pomocí připravovány antibakteriální obvazy, které navíc mohou obsahovat účinnou látku vstřebatelnou pokožkou³¹. Stojí za povšimnutí, že v tomto textu prvně narážíme na potřebu navázat CD na polymerní vlákno. Autoři tohoto článku uvádějí několik cest, které vedou k vytyčenému cíli. Například lze za asistence peroxosíranu amonného roubovat polyamid 66 předem připraveným akryloylovým derivátem, jež přes esterovou vazbu váže CD.

Dalším odvětvím využívajícím předností CD je chemie životního prostředí³². Po ekologicky šetrných metodách k odstraňování různých druhů polutantů (těžkých kovů, organických kontaminantů atd.) z půdy, vzduchu a vody je jistě záhodno v současné době pátrat, protože úroveň znečištění na některých místech Země přesáhla hranici únosnosti. Takto průmyslovou činností zničené ekosystémy pak jen těžko hledají ztracenou rovnováhu a po dlouhou dobu tyto oblasti nejsou schopny poskytnout domov většině organismům, vyjma těch nejodolnějších. Navíc rozsah znečištění má jen málokdy recesivní povahu, naopak často lokální půdní kontaminace difunduje do spodních vod a ohrožuje tak zdroje pitné vody a tedy bezprostředně i zdraví člověka. Odstraňování organických mikropolutantů z proudící vody porózními polymery funkcionalizovanými β -CD je jednou z nově představených a velice slibných metod³³.

V chemickém průmyslu může CD sloužit k důmyslnému řízení reakcí, kdy se využívá toho, že část imobilizované molekuly hosta je skryta v kavitě cyklodextrinu. S reakčním činidlem potom mohou interagovat jen vysunuté, stericky přístupné části hosta³⁵. Analytickou chemii CD obohatily o nové způsoby chirální separace enantiomerů a diastereoisomerů³⁶. Taktéž je lze nalézt v kosmetickém průmyslu³⁸ a zemědělství³⁹.

2.7 Deriváty cyklodextrinů

Hledání vhodných metod k přípravě derivátů cyklodextrinů je pro organické syntetiky úkolem majoritním, jelikož kvůli velkému počtu hydroxylových skupin přirozeně dochází k vzniku produktů o různém stupni substituce, s proměnlivým izomerním uspořádáním. Vzniklou směs je následně třeba často obtížně a zdlouhavě rozdělovat separačními technikami (obvykle chromatograficky), aby bylo možno chemické individuum

charakterizovat. Poněvadž se při procesu čištění látky spotřebuje mnoho materiálu (rozpouštědel, silikagelu atd.), zvýší se tím podstatně i její cena. Navíc výtěžky takových reakcí po oddělení látky ze směsi bývají bídné. Důvodů (ať už ekonomických, ekologických atd.) k nalezení nových prozíravějších metod syntézy je tedy mnoho.

Jedním ze způsobů, jakým si chemici usnadňují práci, je výroba náhodně substituovaných, nijak od sebe neseparovaných derivátů CD. Tímto způsobem se například může docílit lepší rozpustnosti CD ve vodě sulfonací nebo u β -CD methylací (v důsledku rozrušení pásu vodíkových vazeb). Taktéž lze zajistit dobrou rozpustnost v organických rozpouštědlech náhodnou silylací. Pro řadu aplikací však takovéto CD nejsou postačujícími. Jedním zajímavým příkladem je simulace enzymatického chování vhodně substituovanými CD. Umělé enzymy⁴¹ na bázi CD totiž katalyzují specifické reakce jen při splnění dosti náročných podmínek kladených na chemické složení, tvar a orientaci skupin na něj vázaných.

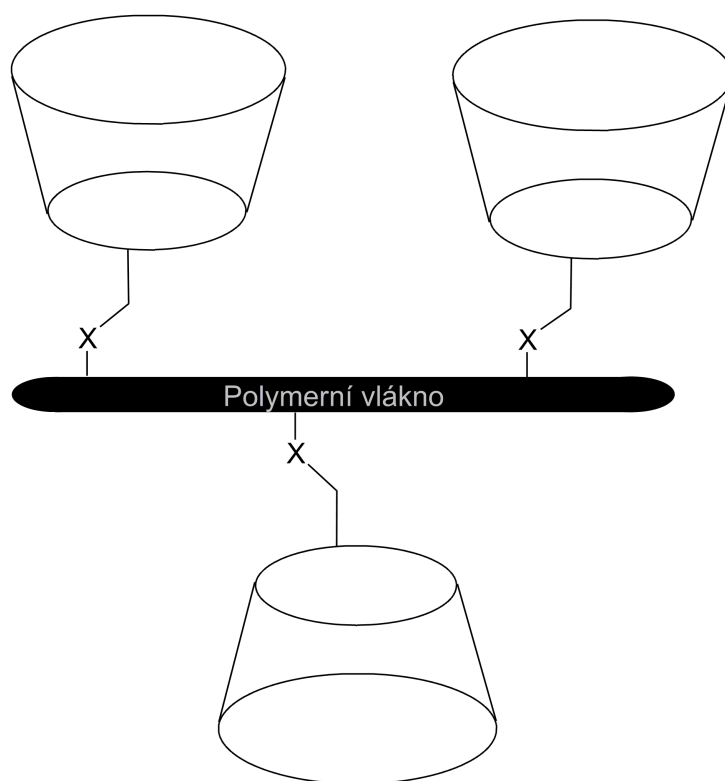
Druhou možností, jak se vyhnout nepříjemnostem spojeným se separací, je persubstituce, při které se nahradí všechny dostupné hydroxylové skupiny. Tímto způsobem lze pro představu kromě rozpustnosti regulovat např. velikost a tvar vstupu do kavity, čímž se změní komplexační vlastnosti a preference CD.

Opravdovou výzvu představuje syntéza monoderivátů, při které je jen jedna jediná hydroxylová skupina nahrazena jinou, protože z principu nic vícenásobným substitucím nebrání. Právě monoderiváty jsou však klíčové pro tvorbu CD-funkcionalizovaných polymerních vláken.

2.7.1 Vybrané 6^A-O monosubstituované β -cyklodextriny

V následující sekci se zaměřím na některé 6^A-O monosubstituované deriváty β -CD, které jsou důležité pro tvorbu funkcionalizovaných nanovláken. Na β -CD cílím, protože se jedná o nejlevnější a nejpoužívanější formu, se kterou navíc sám pracuji. 6^A-O deriváty volím kvůli důsledku, který mají na výslednou orientaci CD na polymerním vlákně. Již v sekci pojednávající o vlastnostech CD uvádím, že primární hydroxylové skupiny tvoří užší část vstupu do kavity, bude-li tedy -OH skupina nahrazena na této straně, po následném navázání na vlákno prostřednictvím substituentu bude CD do prostoru orientován širší částí

kavity (obr. 4).



Obr. 4: Orientace β -CD na polymerním vlákne při použití 6^A -O derivátů.

Při přípravě monosubstituovaných 6^A -O derivátů cyklodextrinů, vhodných k modifikaci vláken je výhodné si nejprve připravit 6^A -O-tosyl- β -cyklodextrin, protože ho lze získat selektivně, tedy existuje možnost vyvarovat se 2^A -O a 3^A -O derivátům.

6^A -O-tosyl- β -cyklodextrin

Literatura udává různé způsoby přípravy této sloučeniny (zkracována na TsO-CD), z nichž bych zde zmínil dva. První⁵⁴ využívá samotného tosylchloridu (TsCl) v pyridinu, druhá⁵⁵ imidazolem preaktivovaného v přítomnosti zředěného hydroxidu sodného.

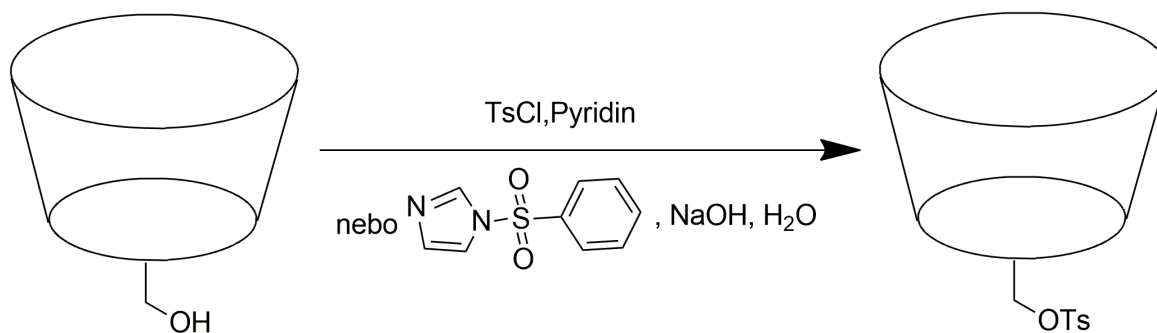


Schéma 1: Příprava 6^A -O-tosyl- β -cyklodextrinu.

Druhá cesta poskytuje téměř výhradně monosubstituovaný produkt na rozdíl od první, kterou vznikne i určité množství tosylem disubstituovaného CD. Výhodou této metody je tedy vyvarování se chromatografii, ale jen za cenu nižšího výtěžku (cca 20 % oproti 50 %). Další potíž spojenou s oběma těmito metodami představuje nemožnost přípravy etherových derivátů alkylového typu v následných krocích, jelikož při ataku alkoxidového iontu dochází k odtržení protonu z 3-OH skupiny doprovázené eliminací *p*-toluensulfonylu a vznikem 3,6-anhydridu za současné inverze cyklu (překlopení židličkové konformace glukopyranosové jednotky). O něco slabší nukleofilní činidla (azid, thioacetát) poskytují 6-deoxy produkty (viz př. thio- a azido-CD).

6^A-azido-6^A-deoxy-β-cyklodextrin

Takováto sloučenina vznikne zahříváním TsO-CD s azidem sodným nebo azidem lithným v DMF⁵⁸.

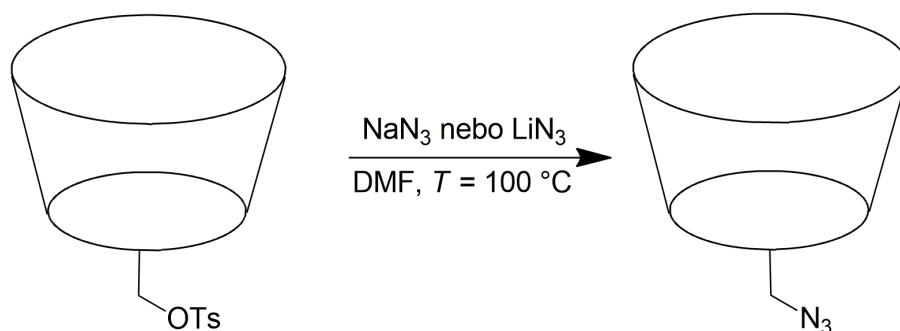


Schéma 2: Příprava 6^A-azido-6^A-deoxy-β-cyklodextrinu.

Azidový derivát představuje ideální výchozí produkt pro přípravu mnoha dalších chemických sloučenin. Nástroj, pomocí něž se následné látkové diverzity dosáhne, nese jméno Huisgenova⁷³ 1,3-dipolární cykloadice a k její uskutečnění potřebujeme na druhém z reaktantů alkylový zbytek. Výsledná sloučenina obsahuje tzv. triazolový kruh.

Nejstarší verze Huisgenovy reakce je iniciována pouze zvýšením teploty a poskytuje směs dvou produktů. Novější využívá katalýzy jednomocnou mědí, kterou lze získat redukcí pentahydrátu síranu měďnatého askorbátem sodným a zajistí specifický vznik 1,4-regioizomeru⁶¹. Pokud je vyžadován 1,5-regioizomer, musí se přistoupit k značně složitější katalýze pentamethylcyklopentadienylbis(trifenylfosfin)ruthenium(II) chloridem⁶² (zkracují na Cp*RuCl(PPh₃)₂).

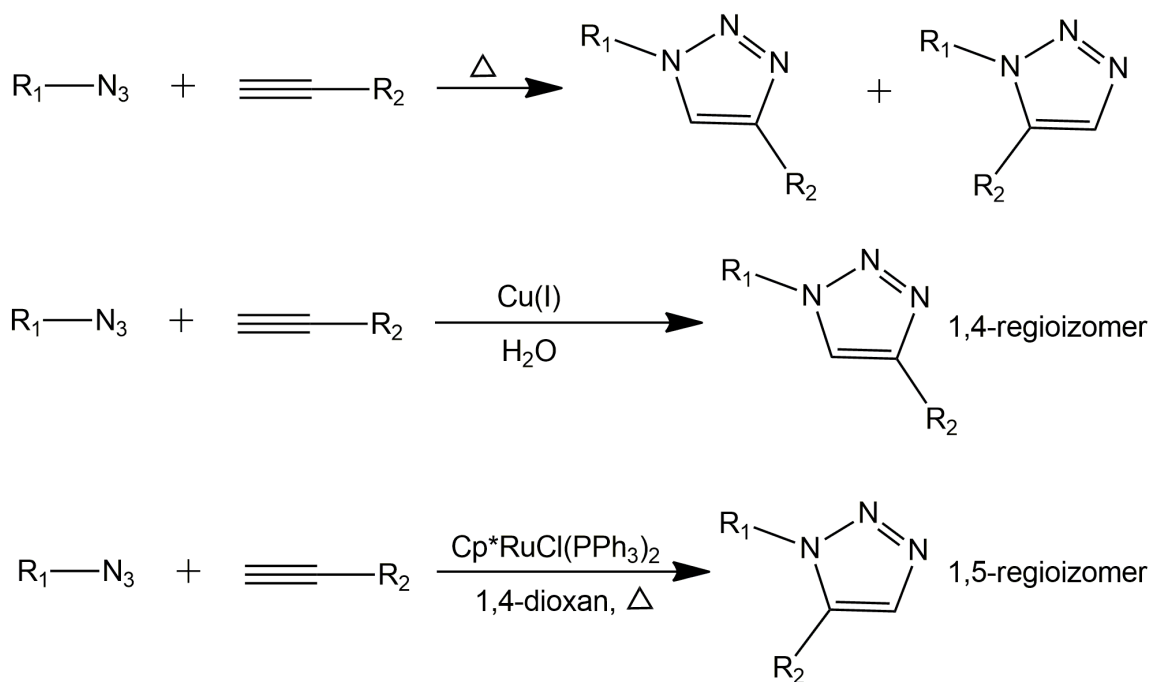


Schéma 3: Různé varianty Huisgenovy 1,3-dipolární cykloadice.

6^A-amino-6^A-deoxy-β-cyklodextrin

Při přípravě této látky se vychází z 6^A-azido-6^A-deoxy-β-cyklodextrinu, který je podroben redukci trifenylofosfinem v přítomnosti čpavkové vody⁵⁹ nebo DMF⁶⁰. Radikálnější možnost představuje hydrogenace plynným vodíkem za katalýzy na palladiu.

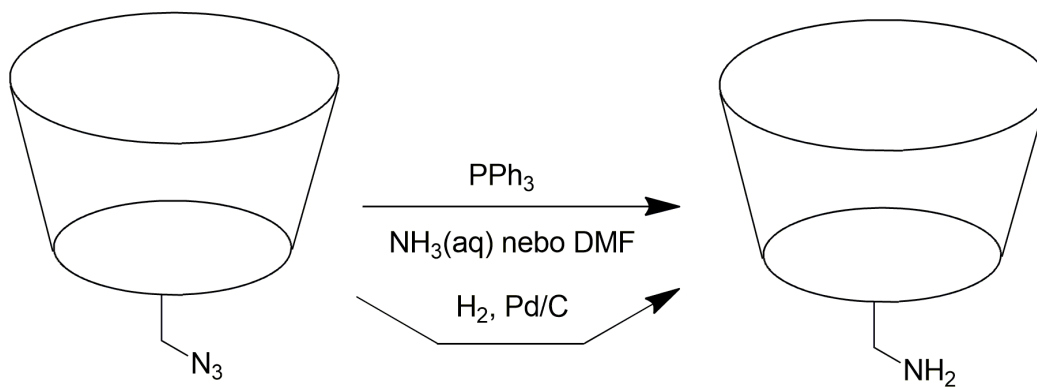


Schéma 4: Příprava 6^A-amino-6^A-deoxy-β-cyklodextrinu.

Tento derivát lze připojit k všemožným sloučeninám obsahujících karboxylovou skupinu amidovou vazbou za pomoci DCC (*N,N'*-Dicyklohexylkarbodiimid; ve vodě nerozpustný) nebo EDC [1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid . HCl; ve vodě rozpustný].

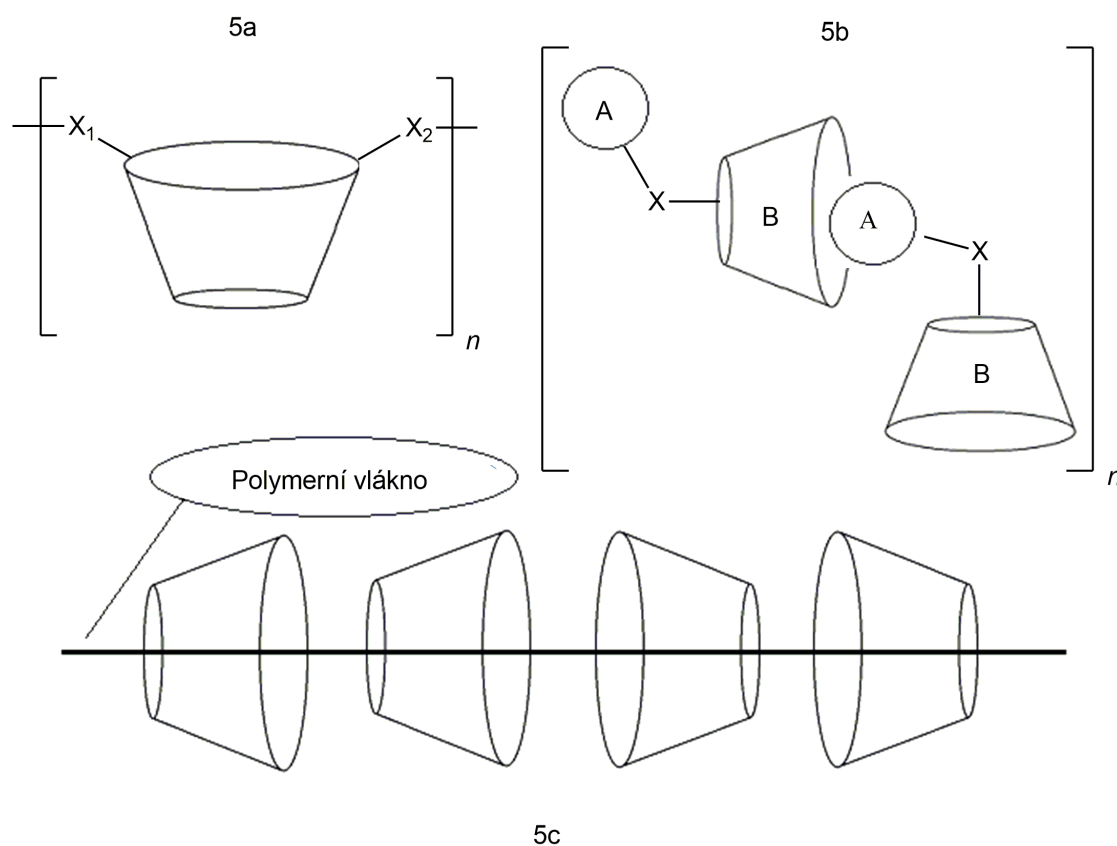
V našem případě se snažíme připravit CD-pyrrolový derivát, který poslouží jako monomer pro následnou polymerizační reakci a funkcionalizaci vláken.

2.8 Metody tvorby cyklodextriny funkcionalizovaných vláken

CD funkcionalizovaná vlákna lze z podstaty věci získat třemi způsoby:

1. tvorbou CD-substituovaného monomeru, jeho polymerizací a zvlákněním,
2. roubováním již hotového vlákna,
3. potažením vlákna vrstvou polymeru obsahujícím CD.

Kromě výše uvedených bych pro úplnost zmínil ještě možnost navlečení molekul CD na vlákno (obr. 5c), čímž vznikne tzv. poly(pseudo)rotaxanová struktura⁷⁰ (pravé rotaxany obsahují na obou koncích své lineární části objemné skupiny, které CD neumožní zpětné vyvlečení; pseudorotaxany nikoli). Druhou možnost představuje příprava derivátů CD, které mají schopnost vytvořit vlákno sami supramolekulárním shluknutím – tzv. „self-assembly“ proces (obr. 5b, A= host, B= β -CD). V obou těchto případech však dojde k obsazení kavity CD, čímž se ztratí valná část aplikačního potenciálu.



Obr. 5: Možné způsoby funkcionalizace vláken cyklodextriny.

Prvním způsobem je možno vytvořit buď vlákno, ze kterého CD jakoby vyrůstají (obr. 4) nebo CD zabudovat do páteře polymerního řetězce přípravou vhodně disubstituovaného CD, který následně zpolymerizuje⁷¹ a může být zvlákněn (obr. 5a).

Druhá možnost připadá v úvahu, pokud sledované polymerní vlákno obsahuje skupiny, se kterými by CD derivát mohl reagovat. Výsledek je stejný jako při postupu prvním způsobem.

Třetí cestou se vydala vědecká skupina, jíž jsem se stal během bakalářského ročníku součástí. Zahrnuje zvlášť přípravu vláken, čehož se zhostila skupina prof. Davida Lukáše, a zvlášť přípravu monomeru pro jejich následné potažení. Druhá část úkolu přísluší organické sekci.

Již jsem zmínil, že daný monomer obsahuje dvě části – pyrrolovou a cyklodextrinovou složku. Syntéze vhodných pyrrolových derivátů se věnoval v rámci bakalářské práce můj kolega Martin Oškera pod vedením Ing. Jana Lukáška.

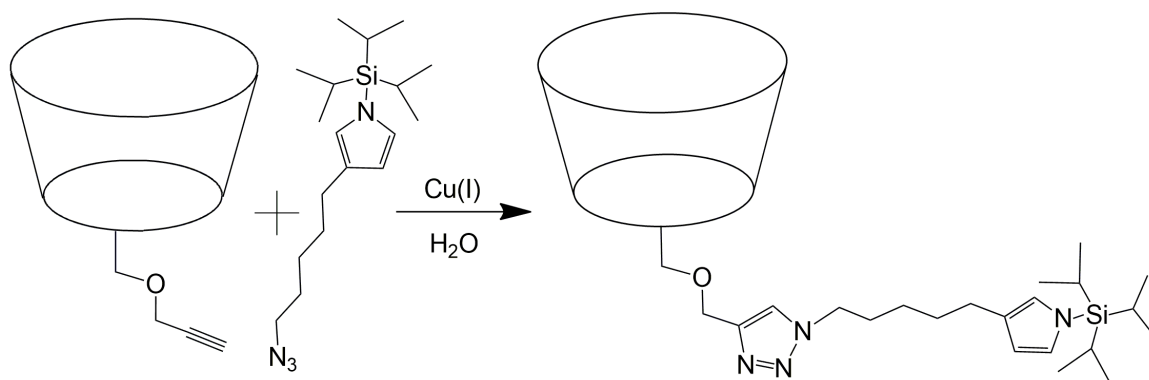


Schéma 6: Tvorba cyklodextrin-pyrrolového derivátu.

Huisgenova mědí katalyzovaná azid-alkynová 1,4-dipolární cykloadice, pomocí níž se pokusíme CD-pyrrolový derivát vytvořit, patří mezi tzv. click reakce, které našly širokého uplatnění i v chemii CD⁷² a musí podle definice splňovat následující podmínky:

- reakce vedou k vysokým výtěžkům,
- jsou široce aplikovatelné a jednoduše proveditelné,
- vznikají pouze takové vedlejší produkty, které lze jednoduše odstranit bez nutnosti chromatografie,
- jsou stereospecifické,
- probíhají v snadno odstranitelných rozpouštědlech.

Takovýto syntetický nástroj chemikům napomáhá k rychlé a snadné tvorbě knihoven látek všemožných podob a vlastností.

Námi připravený derivát CD může nabídnout využití relativně novému, progresivnímu a velice perspektivnímu oboru tkáňového inženýrství⁴², při tvorbě tkáňových nosičů. Jelikož se projekt, do kterého jsem se v rámci své bakalářské práce zapojil, zabývá aplikacemi právě takového druhu, věnuji jim následující kapitolu.

2.9 Aplikace cyklodextrinů v tkáňovém inženýrství

Tkáňové inženýrství představuje interdisciplinární odvětví stojící na pilířích mnoha oborů, ať už medicínských (molekulární a buněčná biologie, biochemie atd.), tak čistě technických a inženýrských. Za cíl si klade kultivaci biomateriálu (buněk a molekul), který by bylo možno využít v regenerativní medicíně pro opravu resp. náhradu poškozených částí těla (tkání resp. orgánů). V cestě jí stojí několik překážek:

(A) Prvním problémem k řešení je zdroj biomateriálu. Buďto lze odebrat směs dospělých buněk (nejlépe z těla pacienta), separovat je podle funkce, požadovaný druh kultivovat a zpětně implantovat do těla. Další pramen, dalo by se říci téměř bezendnou studnu pro získání biomateriálu, představují kmenové buňky (SC). Ty jsou podstatné z toho důvodu, že při dělení mateřské kmenové buňky vzniká jedna dceřiná diferencovaná buňka a jedna dceřiná kmenová buňka. Zárodečná linie je tak zachována, cyklus se může opakovat a populace buněk lineárně roste. Totipotentní a pluripotentní kmenové buňky (TPS resp. PSC) jsou dokonce schopné dělby na dvě dceřinné kmenové buňky, jejich populace potom bude po

n cyklech čítat 2^n členů. Jedinou limitu teoreticky nekonečné dělby takovýchto druhů buněk představuje zkracování telomerů (koncových částí chromozomů).

Kmenové buňky lze získat několika způsoby:

- z embrya ve stádiu blastocysty nebo moruly (ESC),
- izolací z dospělých jedinců (ASC),
- zvrácením osudu dospělé buňky, kdy se diferencované buňky stimulují tak, že se vrátí do pluripotentního stavu (iPSC).

Z etických důvodů je odebírání lidských ESC zakázáno, jejich zdrojem pro výzkum jsou pouze zvířecí (obvykle myši) embrya. Některé kmenové buňky lze však získat i z těla dospělého jedince nebo dokonce transformací zralé somatické buňky. Buněčný zvrát v případě tvorby iPSC se uskuteční prostřednictvím inzerce některých genů virovým vektorem. Druhá a zejména třetí možnost se zdá slibnou, jelikož poskytuje relativně jednoduchou metodu získání kmenových buněk velmi podobných těm embryonálním bez vstupu do šedé mravní zóny.

(B) Dalším důležitým úkolem, ležícím zejména na bedrech buněčných biologů, je nutnost objasnit přesné mechanismy speciace buněk. Ukazuje se, že podstatné jsou v tomto procesu nepatrné změny fyzikálně-chemického prostředí. Pro představu jedna sada hodnot pH, teploty, ale i tlaku a další faktorů dá vzniknout buňkám svalovým, jiné sady hodnot iniciují diferenciaci ESC do buněk kožních, jaterních, srdečních atd.

(C) Třetí hlavní úlohu představuje konstrukce vhodných tkáňových nosičů, které by zastaly funkci extracelulárního matrixu (ECM). Jedná se tedy o čistě technický problém, na němž pracují hlavně polymerní fyzici, syntetičtí chemici a konstruktéři.

ECM buňkám poskytuje nejen strukturní oporu pro proliferaci, ale i vhodné biochemické prostředí, možnost migrace a vzájemné komunikace. V důsledku toho se podílí i na procesu diferenciaci a ovlivňuje podobu resp. tvar výsledného orgánu. Při tvorbě umělého ECM je třeba dávat dobrý pozor na výběr materiálu. Volí se především různé druhy pěn, hydrogelů a polymerních vláken. V tomto ohledu se ukázaly nedoceníitelnými nanovlákna, díky velké porositě (materiál se snáze uchytl) a velkému měrnému povrchu

(příznivý poměr povrch : hmotnost). Svými vlastnostmi se tedy blíží přirozené architektuře mezibuněčného prostoru. Nejčastěji se nanovlákná připravují elektrostatickým zvlákňováním (electrospinning), kvůli největší efektivitě této metody, kdy se kapilární vlákna vytahují z trysky pomocí silného elektrostatického pole. Kromě tohoto způsobu přípravy lze nanovlákná připravit i jinými, méně efektivními metodami, které se však přesto mohou ukázat přínosné pro tvorbu vláken z biologických materiálů.

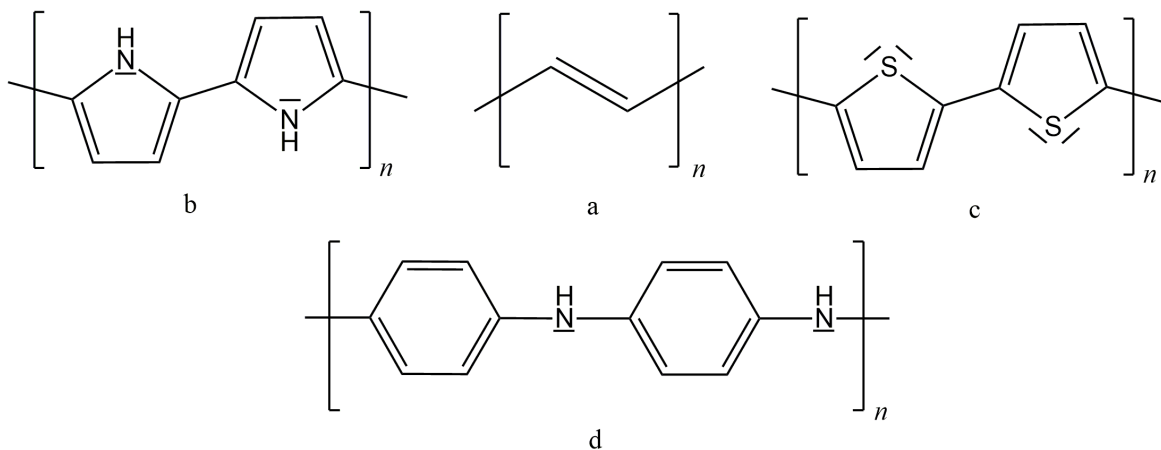
Vhodná vlákna mohou být připravena z přírodních látek (většinou bílkovinné nebo polysacharidové podstaty; např. kolagen, kyselina hyaluronová, fibroin, želatina a chitosan), ale i látek syntetických (PCL, PGA, PLA, PU, PEVA, PLLA-CL, PLGA)⁴³. Je třeba připravit vlákno, které organismus přijme za své nebo takové, jehož degradace nepovede ke vzniku a vyloučení nebezpečných látek pro tělo a zároveň tento rozpad neohrozí dokončení právě probíhající léčby (buňky se stihnou dostatečně namnožit). Materiál tedy musí být biokompatibilní (nevyvolávající imunitní reakci) a případně biodegradabilní (tělem odbouratelný a zpracovatelný).

Rozklad umělého ECM lze načasovat použitím polymeru s vhodnou chemickou stavbou a stupněm polymerace. Parametry roztoku, ze kterého se zvlákňuje, jako např. viskozita a povrchové napětí, předurčí průměr vláken. Další vlastnosti vláken lze ovlivnit čistě procesními technikami. Například může být docíleno kontroly trajektorie právě vznikajícího vlákna prostřednictvím elektrického pole. Takovýmto způsobem lze připravit vysoce orientovaná nanovlákná, která se ukazují být stěžejní při konstrukci ECM pro přestování nervových drah, jelikož vedou jejich růst a podporují zrání Schwannových buněk⁴⁵.

Neurální tkáně jsou vedle pojivových tkání předmětem hlavního zájmu současnosti, jelikož jejich schopnost přirozené regenerace je velmi špatná, v některých případech i nulová (kloubní chrupavky). Pomalu se pak tvořící jizva není schopna plnohodnotně zastat funkci původní zdravé tkáně a takto postihnutý člověk si nese trvalé následky, které v případě přerušení hlavní synaptické dráhy (míchy) vedou k doživotní paralýze. Implantací *in vitro* připravených neuronů by se poté mohlo dosáhnout přemostění poškozené oblasti a s tím související obnovou pohybových schopností pacienta.

K úspěšné tvorbě nervových drah je kromě běžně postačujících podmínek pro pěstování jiných druhů tkání (kyslík, pH, teplota, osmotický tlak, vlhkost, živiny, růstové faktory atd.) navíc třeba zajistit elektrickou stimulaci buněk. K tomu však potřebujeme vodivá vlákna, která by elektrické impulzy přenášela. Naneštěstí žádný z výše uvedených polymerních materiálů toto kritérium nesplňuje a je tedy nutno hledat materiály nové.

První možností, jak se vypořádat s tímto problémem je vytvořit přímo vodivá vlákna ze sloučenin, které obsahují konjugované dvojné vazby a poskytují tak delokalizované vodivostní π -elektrony a zároveň jsou polymerizovatelné. Mezi hlavní představitele vodivých polymerů dneška patří především polypyrrol, polyacetylen, polythiofen a polyanilin (obr. 6). Známých jich je ale podstatně více (přes 25)⁴⁴.



Obr. 6: a) polypyrrol; b) polyacetylen; c) polythiofen; d) polyanilin

Druhou cestu vedoucí k cíli představuje povrstvení nevodivých vláken konduktivními polymery. Právě tímto směrem jsme se rozhodli vydat, protože lze vhodně zvolený monomer substituovat CD a tak vznikajícím polymerem obalovaná vlákna nejen učinit vodivými, ale i funkcionalizovat CD. Za základní, nosný materiál buněčného lešení byl prozatím zvolen PCL (dále se bude testovat PEO, PVB, PMMA) pro letité zkušenosti s ním, resp. osvědčenou biokompatibilitu. Z kapky roztoku tohoto polymeru se mechanicky (na rozdíl od elektrostatického zvlákňování) vytahují vysoce orientovaná vlákna metodou zvanou „drawing“. Do jisté míry se dají orientovaná vlákna připravit i elektrostatickým zvlákňováním, avšak stupeň orientace tímto způsobem připravených vláken je nižší. Spolupráce fakulty textilní a strojní v předešlých letech přinesla vynález pojmenovaný „mikromanipulátor“, značně urychlující proces přípravy tkáňových nosičů. Takto připravená PCL vlákna je dále třeba potáhnout vrstvou polypyrrolu (Ppy), tedy

polymerem, který v sobě nese potenciál stát se vodivým. Samotný PPy v čisté formě má totiž konduktivitu nízkou a až procesem zvaným dopování se získá jeho vodivá forma⁴⁶. Princip dopování spočívá buď v oxidaci (p – typ; děrová vodivost) nebo redukci (n – typ; elektronová vodivost), kteroužto reakci doprovází začlenění odpovídajícího protiiontu.

Teoretický model objasňující dopovací efekt konstruujeme následovně⁴⁷:

- a) Existují dvě energetické sféry podstatné pro vyjasnění tohoto jevu – valenční a vodivostní. Valenční sféru představuje nejvyšší energetická hladina okupovaná elektrony, vodivostní naopak nejnižší neobsazená (v základním stavu).
- b) Aby se elektron stal vodivostním, musí překonat energetickou bariéru mezi těmito dvěma hladinami (získá tím volnost v pohybu).
- c) Běžné polymery mají plnou valenční a prázdnou vodivostní slupku a mezi nimi velkou energetickou díru.
- d) Dopováním vzniknou nové mezihladiny, čímž se sníží energetická bariéra.
- e) Výsledkem je zvýšení koncentrace nosičů náboje, které se mohou volně pohybovat po polymerním řetězci.

Teď už může být řečeno, co bylo dříve zamlčeno, tedy že sloučeniny s konjugovanými dvojnými vazbami jsou kandidáty pro zvolení do funkce vodivých polymerů právě pro jejich menší energetickou díru, která je navíc dopováním dále zúžena. Dopanty mohou být malé ionty solí, peptidy, polysacharidy, proteiny nebo i další molekuly (např. *p*-toluensulfonová nebo hyaluronová kyselina).

Vodivý Ppy lze připravit buď chemicky (reakční směs obsahuje monomer, oxidační činidlo a dopant rozpuštěný v roztoku) nebo elektrochemicky (systém v tomto případě tvoří tři elektrody – anoda, katoda, referenční elektroda a elektrolyt, který zastupuje funkci dopantu. První způsob poskytuje téměř nerozpustný, tmavě modrý prášek, druhý na anodě se tvořící, značně vodivější tenký film⁴⁸.

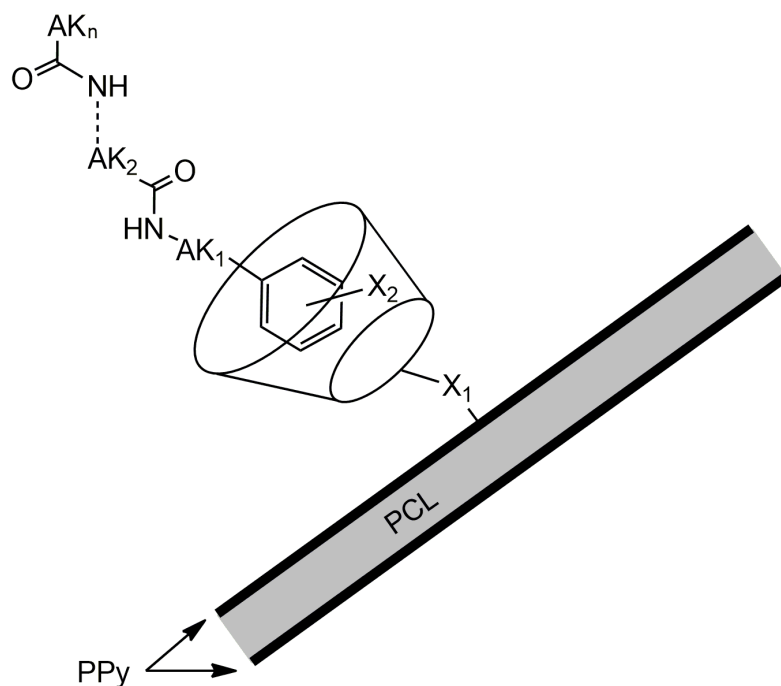
Pokud chceme polypyrrolem pokrýt PCL vlákna, není nic jednoduššího než je před samotnou polymerizací ponořit do roztoku, ve kterém polymerizaci provádíme. Vznikající polypyrrol pak díky značné afinitě k povrchu vlákna obalí.

Vlákna tohoto typu však už byla dříve mnohými připravena (např. literatura⁴⁹). Námí

vyvíjené tkáňové nosiče se stanou unikátními až prostřednictvím funkcionalizace cyklohextriny. Jsou známy mnohá vodivá vlákna⁴⁴ a mnohá vlákna funkcionalizovaná CD^{50, 51, 52} dokonce i ty polykaprolaktanová⁵³, nicméně neexistuje podle všeho jediný článek pojednávající o CD funkcionalizovaných vodivých vláknech. Právě CD však mohou být posledním chybějícím dílkem do skládky vysoce sofistikovaných tkáňových nosičů, které se svými vlastnostmi natolik přiblíží přirozené struktuře ECM, že už buňky nepoznají rozdíl a rády se na takovém povrchu uchyť a hojně rozmnoží. Hned vysvětlím důvod.

Přirozené ECM se skládají z gelu polysacharidů a fibrilárních proteinů, hlavně kolagenu a elastinu. Kromě těchto základních stavebních látek je tu ještě navíc přítomen glykoprotein fibronectin, kterýžto právě zprostředkovává vazbu buněk na extracelulární matici a následnou migraci po jejím povrchu prostřednictvím tzv. integrinů. Zda se adheze na vlákno uskuteční, závisí na tom, jestli integriny naleznou a následně nasednou na specifické aminokyselinové sekvence ECM. V případě uměle vytvořených vláken, které mají být použity jako tkáňové nosiče, však takovéto úseky k nalezení nejsou.

Problém lze vyřešit právě pomocí CD komplexací peptidů se správnými sekvencemi (obr. 7). Aby se supramolekulární útvar vytvořil, stačí na jeden z konců řetězce biomolekuly napojit aromatickou (hydrofobní) sloučeninu (substituované benzeny patří mezi hosty, kteří s CD tvoří jedny z nejsilnějších inkluzních komplexů). Pokud je sledovaná organická molekula dostatečně lipofilní sama o sobě, nemusí se potom k aromatické substituci vůbec přistupovat.



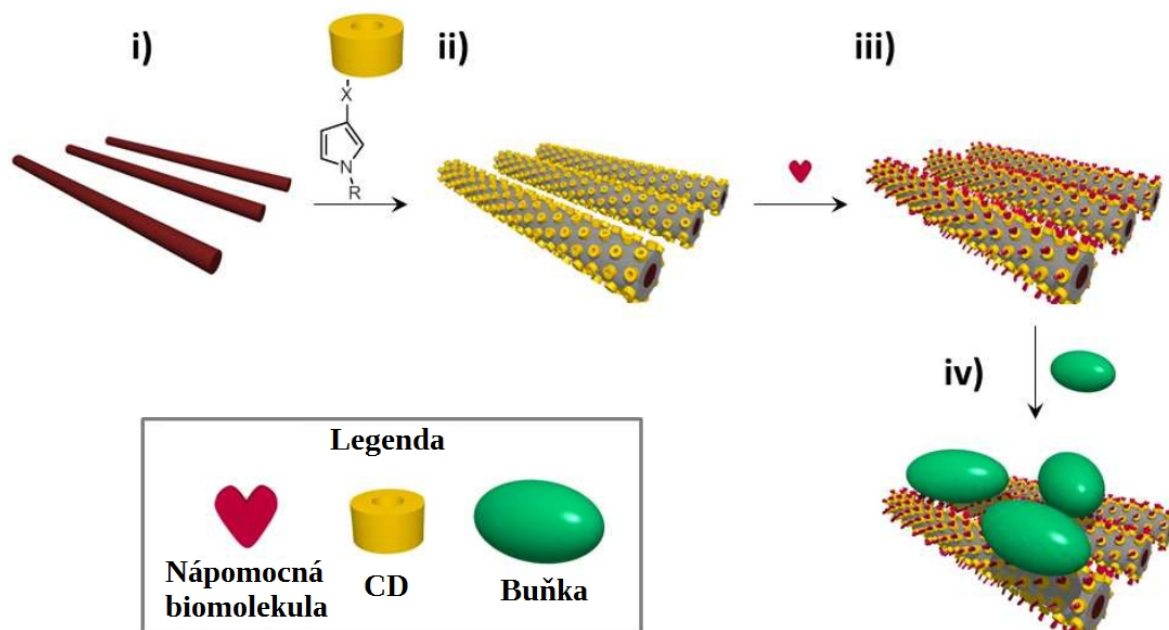
Obr. 7: Komplexace biomolekuly

(X_1 zprostředkuje vazbu mezi PPy a CD; X_2 je libovolně orientovaný benzenový substituent; $AK_{1,2,\dots,n}$ jsou konkrétní aminokyseliny tvořící sekvenci).

Podobným způsobem lze na kavitu CD sekundárně vázat a tím do blízkosti umělého ECM dopravovat libovolné další látky (signální molekuly, růstové faktory...), jež buňkám pomohou v různých fázích životního cyklu. Jinými slovy se tedy zapojením CD otevře možnost relativně jednoduchým způsobem zasahovat do intimního chemicko-fyzikálního prostředí těchto elementárních stavebních jednotek živých systémů.

Pro lepší porozumění a získání nadhledu nad celým projektem bych závěrem řešeršní části veškeré naše počínání shrnul do čtyř bodů a doplnil je názornou ilustrací (viz obr. 8):

- i.) Budou vytvořena vysoce orientovaná vlákna s různým průměrem.
- ii.) Následně bude provedena polymerizační reakce, prostřednictvím níž se vlákna funkcionalizují CD a zároveň se stanou vodivými.
- iii.) Do kavity CD budou komplexovány nápomocné biomolekuly.
- iv.) Nakonec bude přistoupeno k osázení tkáňového nosiče buňkami.



Obr. 8: Modifikace vláken – tvorba tkáňového nosiče.

3 Experimentální část

Byla použita rozpouštědla zakoupená od firmy Ing. Petr Švec – Penta, s.r.o. a Lach – Ner, s.r.o. Chemická činidla a výchozí látky byly dodány od firmy Sigma – Aldrich.

Zdařilost reakcí byla kontrolována pomocí TLC, pro kterou posloužily hliníkové destičky se silikagelem 60 F₂₅₄ (Merck, Německo) a po jejich vyvinutí ve vhodném eluentu byly namáčené do 50 % kyseliny sírové a karbonizovány horkovzdušnou pistolí. Pro sloupcovou chromatografii posloužil silikagel o velikosti částic 40 - 63 μm od firmy ZEOprep®. Jako iontoměnič byl použit Dowex® 50WX2 v H⁺ cyklu. Hmotnostní spektra byla naměřena na přístroji AB SCIEX 3200 Q TRAP LC/MS/MS System. Ramanova spektra byla měřena na mikroskopu DXR (Nicolet, Thermofisher, USA), laser 532 nm, výkon laseru 7 mW, apertura 25 μm pinhole, čas expozice 2 s, počet expozic 100, objektiv 10x, s použitím korekce na fluorescenci - polynomu 6 stupně. Infračervená spektra byla měřena na přístroji Nicolet iZ10 (Nicolet, Thermofisher, USA), technika ATR - Ge krystal, spektrální rozsah 4000 - 700 cm⁻¹, rozlišení 4 cm⁻¹, 16 skenů vzorku, 32 skenů pozadí, korekce na atmosféru a základní linii. ¹H a ¹³C (APT) experimenty byly měřeny na přístroji Agilent 400-MR DDR2 s pracovní frekvencí 399,94 MHz pro ¹H NMR a 100,58 MHz pro ¹³C NMR.

3.1 Příprava per-O-acetyl-6^A-O-propargyl-β-cyklodextrinu

Byl odvážen β-CD (10 g, 8,81 mmol) v práškové podobě na analytických vahách a provedeno rozpuštění v roztoku NaOH (18 g, 450 mmol). Roztok byl poté zchlazen na 0 °C a byl do něj přidán propargyl bromid (1,5 ml, 80% roztok v toluenu, 13,20 mmol). Směs byla ponechána míchat 23 hodin při laboratorní teplotě. Produkt byl neutralizován 96 % H₂SO₄ a vysrážen acetonem (2,3 l). Produkt byl zfiltrován na fritě S4. Pevná fáze byla extrahována zahřátím v 50 % MeOH ve vodě (250 ml) k varu a znovu filtrována. Následně byla provedena TLC. Jako mobilní fáze byla použita směs rozpouštědel *n*-PrOH : H₂O : EtOAc : NH₄OH v poměru 6 : 3 : 1 : 1. Po ponoření do kyseliny sírové a karbonizaci byly ve směsi odhaleny čtyři látky, z čehož jedna odpovídala nezreagovanému β-CD a další tři po řadě mono-, di- a trisubstituovanému produktu. Filtrát byl odpařen na RVO a dosušen destilací s *n*-PrOH. Produkt byl adsorbován na silikagelu (30 g) a byla provedena sloupcová chromatografie na 300 g silikagelu (stacionární fáze) za

použití mobilní fáze n -PrOH : H₂O : NH₄OH v poměru 7 : 3 : 1. Jímaná frakce monosubstituovaných derivátů byla odpařena na RVO a dosušena destilací s n -PrOH. Celkem bylo získáno 2,504 g (2,13 mmol) monosubstituovaného produktu ve formě bílé krystalické látky, který byl dále acetylován přidavkem acetanhydridu (12,5 ml, 132 mmol) a triethylaminu (12,5 ml, 89,62 mmol). Tato směs byla ponechána míchat na 1 h při 130 °C a poté na 17 h při 80 °C. Reakční produkt se stal tmavě červeným až hnědým. Produkt byl vytřepán s roztokem CH₃Cl : HCl (5%) v množství 250 ml : 250 ml. Spodní (hnědá) fáze byla jímána a odpařena na RVO. Následně byla provedena kontrolní TLC (eluent CHCl₃ : MeOH v poměru 20 : 1), která poukázala na přítomnost tří izomerů ve směsi. Bylo tedy přistoupeno k chromatografii na 255 g silikagelu při použití mobilní fáze CHCl₃ : MeOH v poměru 100 : 1. Protože došlo pouze k oddělení nečistot, nikoli samotných izomerů, byla chromatografie zopakována ještě jednou. Po odpaření čistých frakcí byl produkt zvážen na analytických vahách. Výsledkem byl zisk per-*O*-acetyl-6^A-*O*-propargyl-β-cyklodextrinu (bílé krystalické látky) v množství 2,3 g (výtěžek 13 %). Spektrální data se shodují s publikovanými⁶⁸.

3.2 Příprava 6^A-*O*-propargyl-β-cyklodextrinu

Nejprve byl připraven roztok NaOMe v MeOH (10,7 ml, 0.1 M), ke kterému byl následně přidán per-*O*-acetyl-6^A-*O*-propargyl-β-cyklodextrin (412 mg, 0,2 mmol) a směs byla ponechána míchat při laboratorní teplotě 1,5 hodiny. Reakce byla ukončena přidavkem H₂O (7 ml). Byl odvážen ionex (5 g) a přidán do 50 % MeOH ve vodě (20 ml). Nabotnalým ionexem byla naplněna kolona, přes kterou byl produkt ponechán protéct za použití 50 % MeOH ve vodě jako eluentu. Jímané frakce byly odpařeny na RVO. Výsledně byl získán 6^A-*O*-propargyl-β-cyklodextrin (bílý krystalický produkt) v množství 214 mg (výtěžek 89 %).

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD/D₂O): δ = 5,03 – 4,99 (m, 7 H, 7 × H-1), 4,29 (dd, J = 15,9, 2,4 Hz, 1 H, -CH₂-C≡), 4,21 (dd, J = 15,9, 2,4 Hz, 1 H, -CH₂-C≡), 3,94 – 3,48 (m, 42 H, 7 × H-2, 7 × H-3, 7 × H-4, 7 × H-5, 14 × H-6), 2,93 (t, J = 2,4 Hz, 1 H, -C≡CH) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 102,6 – 102,1 (7 × C-1), 82,1 – 70,6 (7 × C-2, 7 × C-3, 7 × C-4, 7 × C-5), 81,8 (-C≡), 77,2 (≡CH), 70,6 (C-6^A), 60,3 – 60,1 (6 × C-6), 58,1 (-CH₂-C≡) ppm. IR (ATR): ν = 3333, 2928, 1154, 1079 cm⁻¹. MS (ESI): m/z pro C₄₅H₇₂O₃₅Na vypočteno [M + Na]⁺ 1195,4; nalezeno 1195,0.

4 Výsledky a diskuse

Syntéze 6^A-*O*-propargyl- β -cyklodextrinu se zatím nikdo nevěnoval. Existuje sice jedna studie⁷⁴ věnovaná immobilizaci CD na chitosan, v jejímž rámci autoři uvádí reakční schéma, ve kterém je 6^A-*O*-propargyl- β -cyklodextrin uveden jako produkt reakce, ale po bližším seznámení s tímto článkem, mi jistě dáte za pravdu, že je to studie ledabylá a její výsledky tudíž nedůvěryhodné. Podívejme se tedy na tento článek pod drobnohledem.

V úvodu je představena reakční cesta zvolená pro syntézu 6^A-*O*-propargyl- β -cyklodextrinu, kterým poté roubojí chitosan za pomoci Huisgenovy mědi katalyzované azid – alkynové cykloadice. Poněvadž tedy slibují navázat cyklodextrin na chitosan přes propargyl na primární hydroxylové (6-OH) skupině, očekával bych, že se budou syntéze této látky věnovat v experimentální sekci. V té však připravovanou látku nazývají „(2-propargyl)-amino-deoxo- β -cyklodextrin“, což je zarážející už jen z toho hlediska, že za uvedených podmínek rozhodně aminoskupina vznikat nemohla. To však pro nás není tak podstatné, jako skutečnost, že i kdyby se snažili připravit 6-*O*-derivát, uvedeným postupem získají jen směs mnoha látek. Kromě požadovaného 6-*O*-derivátu se v ní bude vyskytovat i značné množství 2-*O*- a určitý podíl 3-*O*-derivátu. A to jenom pokud jde o monosubstituované produkty, velké množství izomerů s sebou nesou produkty vícesubstituované. Autoři však od sebe jednotlivé látky nijak neoddělovali, což bude nejspíš důvodem, proč ke své práci nepřiložili NMR spektra, která by odhalila jejich nedůkladnost. Další nedostatek představuje chybějící charakterizace produktu na hmotnostním spektrometru, který by jasně ukázal, zdali vznikaly pouze produkty monosubstituované (jak nám autoři tvrdí) nebo i produkty vícesubstituované.

Naproti tomu mnou provedená syntéza, inspirovaná metodou přípravy 6^A-*O*-propargyl- β -cyklodextrinu⁷⁵, zahrnovala mnoho chromatografických kroků, při kterých se čisté chemické individuuum získat podařilo, což potvrdila rozsáhlá a kvalitní charakterizace.

Nejprve byla provedena pilotní studie, při které jsem pracoval s pětikrát menším množstvím výchozí látky resp. veškerých dalších chemických činidel použitých v průběhu syntézy. Výtěžek získaný na konci této prvotní studie byl procentuálně nižší, což mohlo být způsobeno ztrátou části produktu při opakované extrakci 50 % MeOH ve vodě po reakci

s propargylbromidem, prováděné za účelem odstranění síranu sodného. Dalším důvodem úbytku výtěžku byl větší podíl 2-*O*- a 3-*O*-derivátů ve směsi, než při opakování syntézy ve velkém, což poukazuje na možné nedostatečné množství hydroxidu sodného v reakční násadě pilotní studie. Díky přítomnosti nezanedbatelného množství per-*O*-acetyl-3^A-*O*-propargyl-β-cyklodextrinu ve směsi, bylo přistoupeno k chromatografii, za účelem jeho separace. Oddělení se ale bohužel nezdařilo. 2^A-*O*-propargyl-β-cyklodextrin je znám v acetylované i deacetylované formě, od jeho separace bylo tedy ustoupeno.

Při opakování syntézy za použití většího množství výchozí látky byla extrakce za účelem oddělení síranu sodného prováděna pouze jednou, aby se předešlo případným ztrátám. Následně bylo přistoupeno k chromatografii, pomocí níž se napoprvé podařilo oddělit jen trisubstituované a malé množství disubstituovaných derivátů β-CD. Zbytek směsných frakcí byl odpařen, znovu adsorbován na silikagel. Druhá chromatografie přinesla jistý zisk monosubstituovaných produktů, ale pro zvýšení výtěžku byla opakována ještě napotřetí se zbylými směsnými frakcemi, čímž se podařilo získat téměř veškeré přítomné množství kýžené látky.

Monosubstituované produkty bylo následně třeba acetylovat, aby bylo možno od sebe rozdělit jednotlivé izomery. Při nasazení reakce nebyl do zahřívané olejové lázně umístěn teploměr regulující výkon vařiče, takže došlo k dočasnému přehřátí soustavy. Po cca hodině bylo však nedopatření napraveno a reakce zbylých 17 hodin běžela při požadovaných 80 °C. Jediný pozorovaný efekt přehřátí reakční směsi byl nárůst množství tmavé olejovité hmoty (při pilotní studii produkt acetylací nabral načervenalé barvy; při přehřátí reakční směs spíše až zhnědla). Takto vzniklé nečistoty se podařilo oddělit při první chromatografii. Samotný per-*O*-acetyl-6^A-*O*-propargyl-β-cyklodextrin se podařilo separovat až po chromatografii druhé, při které byla koncentrace eluentu gradientem zvyšována ze 100 : 1 na 20 : 1 (CHCl₃ : MeOH). Další dvě izolované frakce byly tvořeny směsí 2-*O*- a 6-*O*-izomerů (865 mg, a1) resp. směsí 3-*O* a 6-*O*-izomerů (175 mg, a2).

Vzorek ze směsných frakcí a1. byl odeslán na ¹H NMR analýzu. Přes integrální intenzity píků ve spektru bylo poté možno odhadnout poměr přítomných 2-*O*- a 6-*O*-derivátů (1 : 4). Kdyby se tedy teoreticky podařilo zcela oddělit tyto dvě frakce, bylo by navíc získáno

688 mg per-*O*-acetyl-6^A-*O*-propargyl-β-cyklodextrinu a celkový výtěžek by byl vyšší o 4 %. Výtěžek per-*O*-acetyl-6^A-*O*-propargyl-β-cyklodextrinu byl však po prvních dvou chromatografiích dostatečný (shodoval se z literaturou udávaným výtěžkem⁶⁸) a směs a1. tedy nebyla rozdělována.

Naopak co se směsi a2. týče, bylo projeveno velké úsilí oddělit od sebe 3-*O*- a 6-*O*-deriváty, aby bylo následně možno provést deacetylaci s 3-*O*-derivátem za zisku literaturou necharakterizované látky. Bohužel i po mnohokrát opakované chromatografii prováděné s různým poměrem složek eluentu (CHCl₃ : MeOH), bylo odděleno pouze malé množství 6-*O*-derivátu (50 mg), který drobně zvýšil celkový výtěžek, avšak 3-*O*-derivát z kolony nadále vytékal ve směsi s 6-*O*-derivátem. Po týdenní snaze navíc kvůli dlouhodobému vystavování CD kyselému prostředí (CHCl₃) začal produkt degradovat (pravděpodobně začaly na náhodných pozicích kruhu odpadávat acetylové zbytky a možná došlo i k rozpadu cyklu). Snaha byla tedy na základě nepříznivých výsledků, na které poukázala TCL, ukončena. Nezdařilá separace tohoto vedlejšího produktu nejspíš souvisela s jeho nízkou koncentrací ve směsi oproti 6-*O*-derivátu, což je svým způsobem pozitivní skutečnost, protože primárně vyžadovaný byl právě 6-*O*-derivát.

Chromatografie celkově byla dosti časově náročná, jak v případě oddělování produktů s různým stupněm substituce, tak i jednotlivých monosubstituovaných izomerů. Zvláště ty bylo pochopitelně těžké oddělit, vzhledem k jejich nepříliš rozdílné afinitě k eluentu i silikagelu. Kvůli tomu musela být zvolena pomalu nesoucí mobilní fáze, které bylo přes kolonu prolito v řádu desítek litrů a produkt musel prostupovat přes velké množství stacionární fáze, tj. silikagelu, aby se stačil oddělit. Čistý per-*O*-acetyl-6^A-*O*-propargyl-β-cyklodextrin se podařilo získat až pátý den souvisle trvající práce.

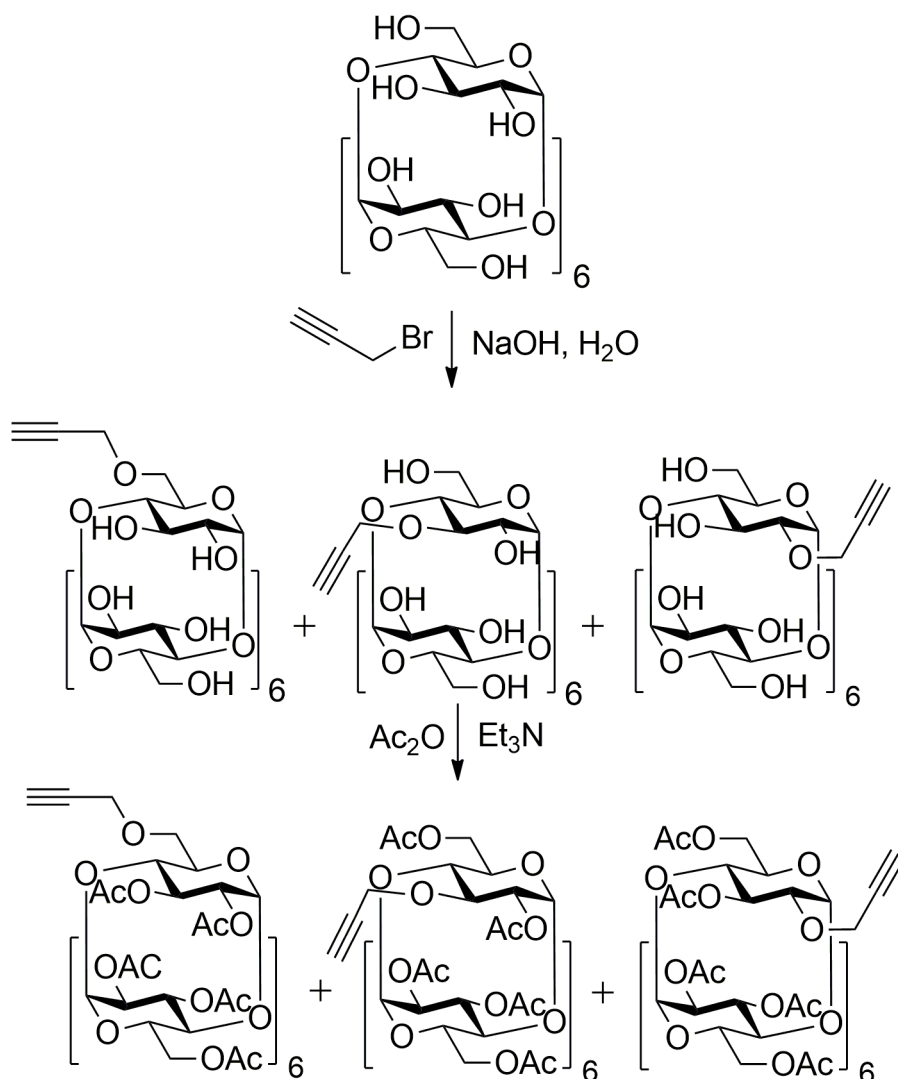


Schéma 7: Postup přípravy per-*O*-acetyl-6^A-*O*-propargyl-β-cyklodextrinu.

S částí této látky byla poté provedena tzv. Zemplénova deacetylace za zisku 6^A-*O*-propargyl-β-cyklodextrinu. K deacetylaci bylo přistoupeno kvůli špatné komplexační schopnosti acetylované formy CD. Vzhledem k nejistotě, zdali nebude výhodnější k deacetylaci přistoupit až po provedení click reakce s pyrrolovým derivátem nebo dokonce až po navázání na vlákna, byla deacetylována jen část látky, aby bylo možno v budoucnu vyzkoušet i další z možností.

Reakce poskytla produkt s deprotonovanými hydroxylovými skupinami, které byly protonovány ionexem. Protože první výsledky ¹H NMR spektroskopie poukázaly na určité množství octanu sodného, byl produkt ještě jednou ponechán katexem protéct, aby se octan

sodný převedl na octovou kyselinu, kterou lze odpařit. Nakonec byl produkt vysušen na olejové pumpě s využitím kapalného dusíku.

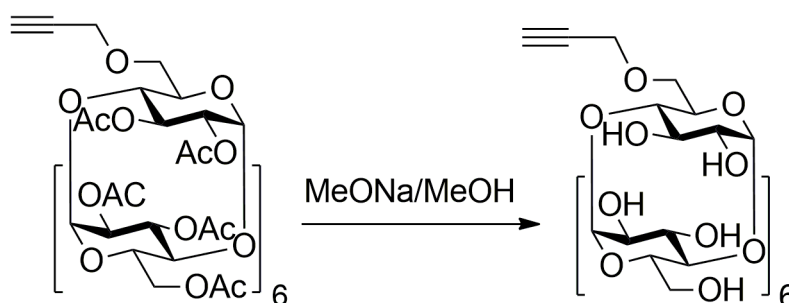


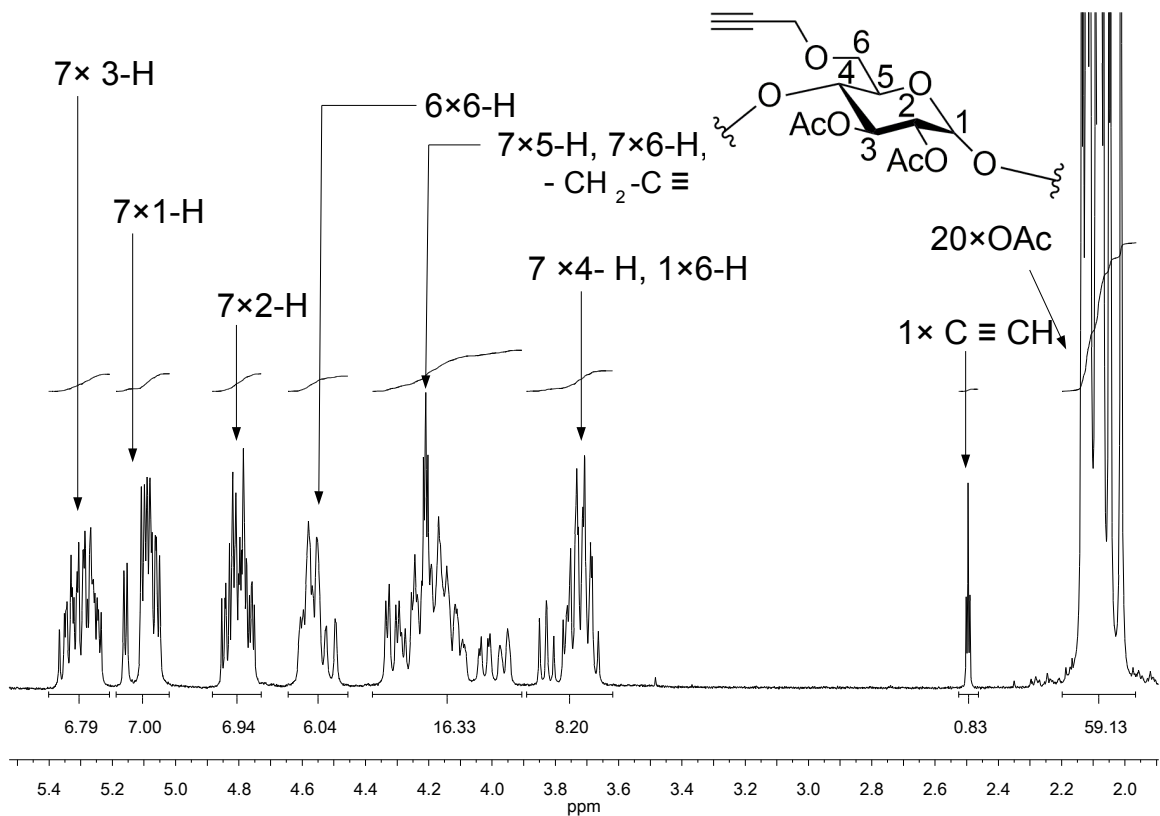
Schéma 8: Postup přípravy 6^A-O-propargyl-β-cyklodextrinu.

Produkty byly charakterizovány pomocí ¹H NMR a ¹³C NMR. Na ¹H NMR spektru per-O-acetyl-6^A-O-propargyl-β-cyklodextrinu (obr. 9) lze vidět, že se látku podařilo získat ve velice čisté formě, jelikož veškeré přítomné píky odpovídají signálům vodíků na připravené sloučenině. Výhodou peracetylovaných forem monosubstituovaných CD je snazší interpretovatelnost signálů a snadná identifikace izomerů pouze na základě ¹H NMR spekter, bez nutnosti použití 2D NMR techniky. Pro CD monosubstituované skupinami obsahujícími dvojnou nebo trojnou vazbu totiž platí následující skutečnosti:

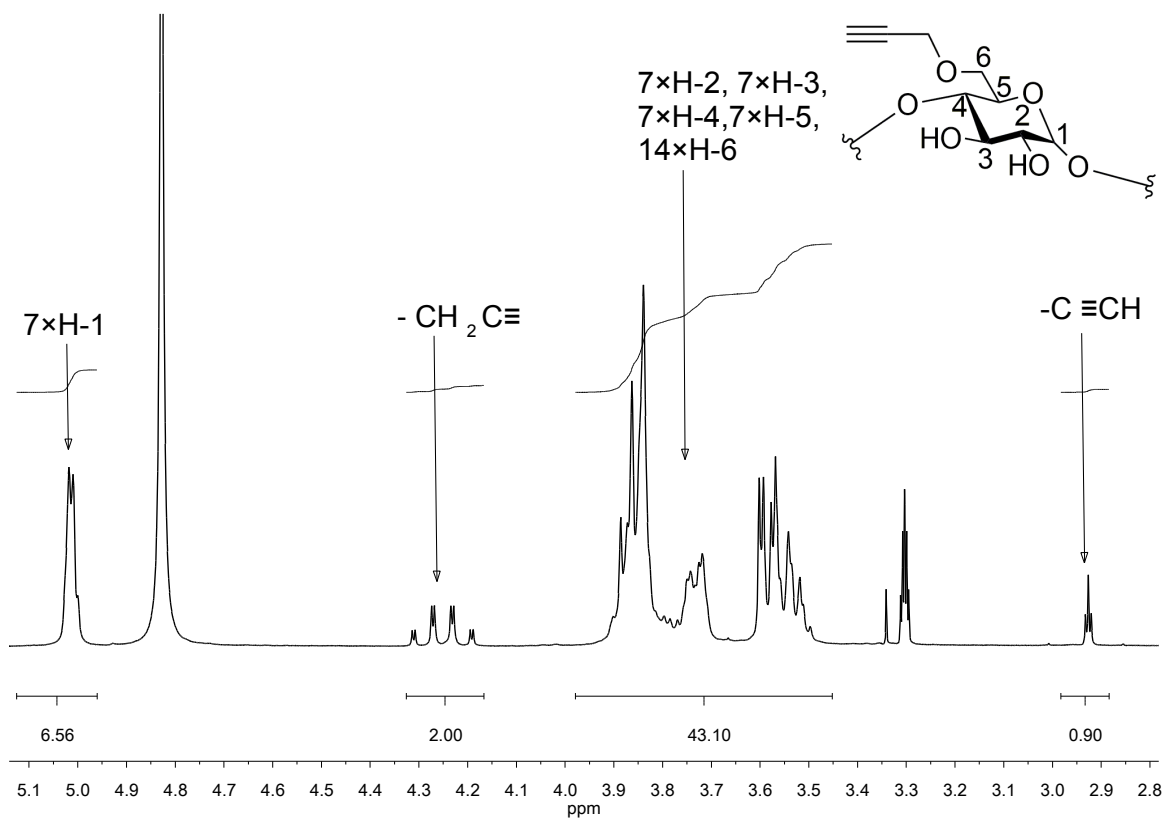
- Jestliže je signál vodíku 2^A posunut z obvyklých 4,8 ppm o 1,5 na 3,3 ppm, jedná se o 2^A-O-izomer. Charakteristický signál (dublet dubletu) lze pak pozorovat mimo region signálů vodíků acetylových skupin.
- Pakliže se chemický posun signálu vodíku 3^A sníží o cca 1,5 ppm, jedná se o 3^A-O-izomer. Dále dojde ke snížení integrální intenzity tohoto vodíku o 1 (v případě β-CD ze 7 na 6).
- Pokud nedojde k žádné z výše uvedených změn, jedná se o 6^A-O-derivát.

Další charakterizace:

- Hmotnostním spektrometrem byla experimentálně potvrzena vypočtená hodnota molekulové hmotnosti 6^A-O-propargyl-β-cyklodextrinu.
- Přítomnost trojné vazby v 6^A-O-propargyl-β-cyklodextrinu byla potvrzena též pomocí Ramanovy spektroskopie (signál 2117 cm⁻¹).



Obr. 9: ¹H NMR spektrum per-O-acetyl-6^A-O-propargyl-β-cyklodextrinu.



Obr. 10: ¹H NMR spektrum 6^A-O-propargyl-β-cyklodextrinu (měřeno v MeOD/D₂O).

5 Závěr

Teoretická část bakalářské práce zprvu uvádí do problematiky chemie CD a jejich derivátů. Pokračuje oddílem o možných způsobech funkcionalizace vláken CD a dále pak kapitolou o bioaplikacích cyklodextrinů. Zvláště poslední kapitola je psána s interdisciplinárním nadhledem a důrazem na souvislosti, avšak bez ústupků faktické správnosti. Umožňuje tak rozsáhlý a ucelený vhled do problematiky tkáňového inženýrství a především konstrukce tkáňových nosičů nové generace.

Experimentální část práce se věnuje zejména syntéze a charakterizaci derivátů cyklodextrinů vhodných k modifikaci nanovláken. Jednalo se o per-*O*-acetyl-6^A-*O*-propargyl-β-cyklodextrin a 6^A-*O*-propargyl-β-cyklodextrin. Výtěžek první látky se shodoval s tím literaturou uváděným. Druhou látku zatím nikdo neizoloval a necharakterizoval.

Struktura a čistota produktů byla ověřována ¹H NMR, ¹³C NMR, FTIR, Ramanovou a hmotnostní spektroskopií.

S připravenými produkty bude v rámci pokračování prací na projektu uskutečněna click reakce s pyrrolovým derivátem. Následně bude přistoupeno k modifikaci vláken CD-pyrrolovým derivátem a budou hledány vhodné biomolekuly, jež by se komplexací sekundárně navázaly na kavitu CD a pomohly buňkám při adhezi. Nakonec bude funkčnost takového nově vytvořeného, vysoce sofistikovaného tkáňové nosiče testována.

Seznam literatury

- (1) Villiers, A. *Bull. Soc. Chim. Paris* **1891**, 45, 468.
- (2) Schardinger, F. *Z. Unters. Nahr. Genussm.* **1903**, 6, 865.
- (3) Strohecker, R. *Chem.-Ztg.* **1920**, 120, 744.
- (4) Schardinger, F. *Wien. Klin. Wochenschr.* **1904**, 17, 207.
- (5) Schardinger, F. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskrankh. Hyg., Abt. 2* **1911**, 29, 188.
- (6) Pringsheim, H. *Science* **1928**, 68, 603.
- (7) Freudenberg, K.; Jacobi, R. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1935**, 518, 102.
- (8) Freudenberg, K.; Cramer, F. *Z. Naturforsch.* **1948**, 3b, 464.
- (9) Freudenberg, K.; Cramer, F.; Plieninger, H. Ger. Patent 895,769, **1953**.
- (10) French, D. *Adv. Carbohydr. Chem.* **1957**, 12, 189.
- (11) Szejtli, J. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1743.
- (12) Crini, G. *Chem. Rev.* **2014**, 114, 10940.
- (13) Nakagawa T., Ueno K., Kashiwa M., Watanabe J. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 1921.
- (14) Frank H. Herbstein *Oxford University Press* **2005** Crystalline Molecular Complexes and Compounds: Structures and Principles, svazek 1 str. 123.
- (15) Biwer, A.; Antranikian, G.; Heinzle, E. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, 59, 609.
- (16) Rather, M.Y.; Ara, K.Z.G.; Nordberg Karlsson, E.; Adlercreutz, P. *Process Biochem.* **2015**, 50, 722.
- (17) Lee, J.-H.; Choi, K.-H.; Choi, J.-Y.; Lee, Y.-S.; Kwon, I.-B.; Yu, J.-H. *Enzyme and Microbial Technology* **1992**, 14, 1017.
- (18) Melzer, S.; Sonnendecker, C.; Föllner, C.; Zimmermann, W. *FEBS Open Bio* **2015**, 5, 528.
- (19) Kurkov, S.V.; Loftsson, T. *International Journal of Pharmaceutics* **2013**, 453, 167.
- (20) 18th International Cyclodextrin Symposium **2016**, <https://www.ics18.com>.
- (21) Murthy, C.N.; Geckeler, K.E. *Chem. Commun.* **2001**,13, 1194.
- (22) Wen, X.; Tan, F.; Jing, Z.; Liu, Z. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2004**, 34, 517.
- (23) Liu, Y.; Chen, G.-S.; Zhang, H.-Y.; Song, H.-B.; Ding, F. *Carbohydr. Res.* **2004**, 339, 1649.
- (24) Liu, L.; Guo, Q.-X. *Journal of Inclusion Phenomena* **2002**, 42, 1.

- (25) Liu, L., Guo; Q.-X. *Chin. J. Chem.* **2001**, *19*, 670.
- (26) Astray, G.; Gonzalez-Barreiro, C.; Mejuto, J.C.; Rial-Otero, R.; Simal-Gándara, J. *Food Hydrocolloids* **2009**, *23*, 1631.
- (27) Sakurai, M.; Kitagawa, M.; Hoshi, H.; Inoue, Y.; Chûjô, R. *Carbohydrate Research* **1990**, *198*, 181–191.
- (28) Li, X.-S.; Liu, L.; Mu, T.-W.; Guo, Q.-X. *Monatshefte fuer Chemie* **2000**, *131*, 849.
- (29) Loftsson, T.; Duchêne, D. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, *329*, 1.
- (30) Tiwari, G.; Tiwari, R.; Rai, A.K. *J Pharm Bioallied Sci* **2010**, *2*, 72.
- (31) Radu, C.-D.; Parteni, O.; Ochiuz, L. *J. of Controlled Release* **2016**, *224*, 146.
- (32) Singh, M.; Sharma, R.; Banerjee, U.C. *Biotechnology Advances* **2002**, *20*, 341.
- (33) Alsbaiee, A.; Smith, B.J.; Xiao, L.; Ling, Y.; Helbling, D.E.; Dichtel, W.R. *Nature* **2016**, *529*, 190.
- (34) Fifere, A.; Marangoci, N.; Maier, S.; Coroaba, A.; Maftei, D.; Pinteala, M. *Beilstein J Org Chem* **2012**, *8*, 2191.
- (35) Hedges, A.R. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2035.
- (36) Li, S.; Purdy, W.C. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1457.
- (37) Irie, T.; Uekama, K. *J Pharm Sci* **1997**, *86*, 147.
- (38) Buschmann, H.-J.; Schollmeyer, E.; *J Cosmet Sci* **2002**, *53*, 185.
- (39) Del Valle, E.M.M. *Process Biochemistry* **2004**, *39*, 1033.
- (40) Xu, Q.; Wei, C.; Liu, R.; Gu, S.; Xu, J. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2015**, *146*, 313.
- (41) Breslow, R. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 146.
- (42) Langer, R.; Vacanti, J. *Science* **1993**, *260*, 920.
- (43) Vasita, R.; Katti, D.S. *Int J Nanomedicine* **2006**, *1*, 15.
- (44) Balint, R.; Cassidy, N.J.; Cartmell, S.H. *Acta Biomaterialia* **2014**, *10*, 2341–2353.
- (45) Corey, J.M.; Lin, D.Y.; Mycek, K.B.; Chen, Q.; Samuel, S.; Feldman, E.L.; Martin, D.C. *J Biomed Mater Res A* **2007**, *83*, 636.
- (46) Wang, L.-X.; Li, X.-G.; Yang, Y.-L. *Reactive and Functional Polymers* **2001**, *47*, 125.
- (47) Guimard, N.K.; Gomez, N.; Schmidt, C.E.; *Progress in Polymer Science, Polymers in Biomedical Applications* **2007**, *32*, 876.
- (48) Sangian, D.; Zheng, W.; Spinks, G. M. *Synth. Met.* **2014**, *189*, 53.

- (49) Durgam, H.; Sapp, S.; Deister, C.; Khaing, Z.; Chang, E.; Luebben, S.; Schmidt, C.E. *J Biomater Sci Polym Ed* **2010**, *21*, 1265.
- (50) Lemma, S.M.; Scampicchio, M.; Mahon, P.J.; Sbarski, I.; Wang, J.; Kingshott, P. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 3481.
- (51) Celebioglu, A.; Demirci, S.; Uyar, T. *Applied Surface Science* **2014**, *305*, 581.
- (52) Li, R.; Dou, J.; Jiang, Q.; Li, J.; Xie, Z.; Liang, J.; Ren, X. *Chemical Engineering Journal* **2014**, *248*, 264.
- (53) Zhan, J.; Singh, A.; Zhang, Z.; Huang, L.; Elisseeff, J.H. *Biomatter* **2012**, *2*, 202.
- (54) Law, H.; Benito, J. M.; García Fernández, J. M.; Jicsinszky, L.; Crouzy, S.; Defaye, J. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 7524.
- (55) Loukou, C.; Changenet-Barret, P.; Rager, M.-N.; Plaza, P.; Martin, M. M.; Mallet, J.-M. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 2209.
- (56) Khan, A.R.; Forgo, P.; Stine, K.J.; D'Souza, V.T. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1977.
- (57) Wang, L.; Liu, S.; Peng, J.; He, Y. *Sci. China Chem.* **2010**, *53*, 1358.
- (58) Melton, L.D.; Slessor, K.N. *Carbohydrate Research* **1971**, *18*, 29.
- (59) Hanessian, S.; Benalil, A.; Laferriere, C. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 4786.
- (60) Tang, W.; Ng, S.-C. *Nat. Protocols*, **2008**, *3*, 691.
- (61) Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V.V.; Noodleman, L.; Sharpless, K.B.; Fokin, V.V. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 210.
- (62) Boren, B.C.; Narayan, S.; Rasmussen, L.K.; Zhang, L.; Zhao, H.; Lin, Z.; Jia, G.; Fokin, V.V. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8923.
- (63) Chmurski, K.; Stepniak, P.; Jurczak, J. *Synth.-Stuttg.* **2015**, *47*, 1838.
- (64) Casas-Solvas, J. M.; Ortiz-Salmeron, E.; Fernandez, I.; Garcia-Fuentes, L.; Santoyo-Gonzalez, F.; Vargas-Berenguel, A. *Chem.-Eur. J.* **2009**, *15*, 8146.
- (65) Casas-Solvas, J. M.; Vargas-Berenguel, A. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 6778.
- (66) Wang, T.; Wang, M.; Ding, C.; Fu, J. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 12469.
- (67) Wang, T.; Sun, G.; Wang, M.; Zhou, B.; Fu, J. *Acs Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 21295.
- (68) Zhou, Y.; Marinescu, L.; Pedersen, C. M.; Bols, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012*, 6383.
- (69) Bláhová, M.; Bednářová, E.; Řezanka, M.; Jindřich, J. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 697.
- (70) Wenz, G.; Han, B.-H.; Müller, A. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 782.

- (71) Srinivasachari, S.; Reineke, T.M. *Biomaterials* **2009**, *30*, 928.
- (72) Faugeras, P.-A.; Boëns, B.; Elchinger, P.-H.; Brouillette, F.; Montplaisir, D.; Zerrouki, R.; Lucas, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012*, 4087.
- (73) Huisgen, R. *Angew. Chem. Int. Edit.* **1963**, *75*, 604.
- (74) Chen, Y.; Ye, Y.; Li, R.; Guo, Y.; Tan, H. *Fibers Polym* **2013**, *14*, 1058.
- (75) Bláhová, M.; Bednářová, E.; Řezanka, M.; Jindřich, J. *J. Org. Chem.* **2013**, *78* (2), 697.