



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

## PODPORA FYZIKÁLNÍ INTERAKCE HYALURONANU A VYBRANÝCH HYDROFOBNIČH SOLUTŮ

SUPPORT OF PHYSICAL INTERACTION BETWEEN HYALURONAN AND SELECTED  
HYDROPHOBIC SOLUTES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

PETRA MICHALICOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. MILOSLAV PEKAŘ, CSc.

BRNO 2011



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	<b>FCH-BAK0517/2010</b>	Akademický rok: <b>2010/2011</b>
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	<b>Petra Michalicová</b>	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806R002)	
Vedoucí práce	<b>prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.</b>	
Konzultanti:	Ing. Filip Mravec, Ph.D.	

### Název bakalářské práce:

Podpora fyzikální interakce hyaluronanu a vybraných hydrofobních solutů

### Zadání bakalářské práce:

1. Shromáždit literární poznatky o přímé interakci nativního hyaluronanu a hydrofobních látek. Uvážit možnosti podpory interakce na základě analogie s polymerními micelami.
2. Na základě rešerše vybrat metody a látky vhodné pro studium interakcí.
3. Navrhnout a provést základní experimenty po potvrzení nebo vyvrácení interakce mezi hydrofobními látkami a hyaluronanem.
4. Zhodnotit výsledky z hlediska využití nových postupů pro zvýšení využití hyaluronanu v kosmetice a farmacii.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 6.5.2011

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

-----  
Petra Michalicová  
Student(ka)

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

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

V Brně, dne 31.1.2011

-----  
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

Metodou fluorescenční spektroskopie byl zkoumán vliv způsobu přípravy systému hyaluronan-fluorescenční sonda na vzájemné interakce ve vodném prostředí. Bylo navrženo několik experimentů, pro které byly jako fluorescenční sondy vybrány pyren, prodan, perylen a difenylhexatrien (DPH). První skupina experimentů byla založena na ověření závěrů z práce T. Brownové a byla zaměřena na prostou interakci hyaluronanu a hydrofobní látky. Ve druhé řadě experimentů byl hyaluronan vysoušen za zvýšené teploty a poté k němu byla přidána fluorescenční sonda. Tato metoda měla rozrušit hydratační obal hyaluronanu a zpřístupnit tak hydrofobní části řetězce pro fluorofor. Ve třetí skupině experimentů byla interakce hyaluronanu a fluoroforu podpořena lyofilizací. Přestože v první skupině experimentů bylo zahrnuto široké spektrum koncentrací sondy, nepodařilo se prokázat interakce mezi látkami v systému. Stejně tak měření s předsušeným hyaluronanem nenaznačuje, že by v systému docházelo k interakcím. Naopak metoda lyofilizace se z hlediska interakce mezi hyaluronanem a hydrofobní látkou jeví jako účinná.

## **SUMMARY**

The method of fluorescence spectroscopy was applied for the studying of the way of the hyaluronan-fluorescence probe system's preparation on mutual interaction in water. Several experiments with fluorescence probes pyrene, prodan, perylene and diphenylhexatriene (DPH) had been submitted. The first part of the experiments deals with the verification of the results of T. Brown's work and it was focused on the study of simple interaction between hyaluronan and hydrophobic compounds. In the second part of the work hyaluronan was dried at higher temperature followed by adding of the fluorescence probe. The aim of this method was the distraction of hyaluronan's moisture packaging and the opening up the hydrophobic parts of the chain for the fluorophore. The interaction of hyaluronan and fluorophore was supported with the freeze-drying in the third group of the experiments. Although wide concentration ranges of fluorescence probes had been tested in the first experiments, the interactions hadn't been observed. The similar results were obtained in the second part of the experiments. On the other side the method of freeze-drying appeared to be effective.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

hyaluronan, fluorescenční spektroskopie, fluorescenční sondy, lyofilizace

## **KEYWORDS**

hyaluronan, fluorescence spectroscopy, fluorescence probes, freeze-drying

MICHALICOVÁ, P. *Podpora fyzikální interakce hyaluronanu a vybraných hydrofobních solutů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 35 s. Vedoucí bakalářské práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

## PROHLÁŠENÍ

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

.....  
podpis studenta

*Na tomto místě bych ráda poděkovala prof. Ing. Miloslavu Pekařovi, CSc. za odborný dohled a čas. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D. a Ing. Tereze Halasové za kreativní rady, zájem a energii, kterou mi při vypracování této práce věnovali. Zvláštní poděkování patří mým nejbližším za podporu během celého mého studia.*

## OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	6
<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	7
<b>2.1 Hyaluronan</b> .....	7
2.1.1 Struktura v roztoku .....	7
2.1.2 Hyaluronan v medicíně .....	8
<b>2.2 Fluorescence</b> .....	9
2.2.1 Zákony pro fluorescenci .....	10
2.2.2 Instrumentace .....	11
2.2.3 Fluorescenční sondy .....	12
<b>2.3 Lyofilizace</b> .....	12
2.3.1 Proces lyofilizace .....	13
2.3.2 Instrumentace .....	13
2.3.3 Využití ko-rozpouštědla .....	14
<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	15
<b>3.1 Materiály</b> .....	15
<b>3.2 Metody</b> .....	16
3.2.1 Příprava zásobních roztoků .....	16
3.2.2 Příprava vzorků pro ověření závěrů T. Brown .....	16
3.2.3 Příprava vzorků s předsušeným hyaluronanem .....	16
3.2.4 Příprava vzorků pro lyofilizaci .....	16
3.2.5 Měření vzorků na fluorimetru AMINCO Bowman series 2 .....	17
3.2.6 Měření vzorků na UV-VIS spektrometru Varian Cary 50 Probe .....	17
<b>3.3 Vyhodnocení dat</b> .....	17
<b>3.4 Korekce</b> .....	19
<b>VÝSLEDKY A DISKUSE</b> .....	21
<b>4.1 Ověření závěrů T. Brown</b> .....	21
<b>4.2 Interakce s předsušeným hyaluronanem</b> .....	25
<b>4.3 Podpora interakce lyofilizací</b> .....	27
<b>ZÁVĚR</b> .....	32
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	33
<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ</b> .....	35
<b>7.1 Seznam zkratk</b> .....	35
<b>7.2 Seznam symbolů</b> .....	35

## ÚVOD

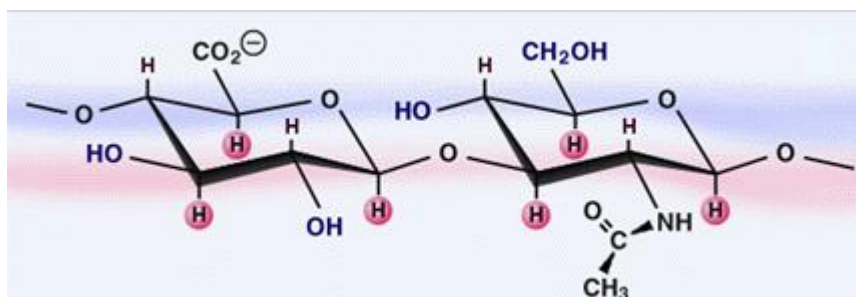
Hyaluronan je látka známá od poloviny 30. let. 20. století. Je to látka, která má v lidském těle mnoho důležitých rolí. Může jít o role kladné, jako hydratace pokožky, pohyblivost kloubů nebo dobrá průhlednost a lom očního sklivce, mívá ale i záporné role. Tumor, který se vytvoří v těle, má zvýšenou afinitu k hyaluronanu, obalí se vrstvou z této látky a pro imunitní systém se pak stává „neviditelným“. Na povrchu nádoru je štěpen enzymy na oligosacharidy, které navíc zhoubné bujení podporují. Jak už ale bývá ve vědě zvykem, i záporné vlastnosti lze využít ve svůj prospěch. Právě zvýšená afinita rakovinných buněk může být využita při vývoji takzvaných cílených nosičových systémů. Kombinace různých typů léčiv s hyaluronanem jsou zkoumány už dlouhou dobu. Hyaluronan v těchto systémech plní funkci nosiče, jenž aktivní látku dopraví k nádoru, kde se léčivo uvolní a může působit selektivně.

Jednou z látek, která efektivně působí na nádory je cisplatina. Je to ale látka, která je silně toxická také pro zdravou tkáň. *Cai a spol.* [1, 2] zkoumali konjugát hyaluronan-cisplatina a došli k závěru, že tento konjugát významně snižuje systémovou toxicitu, zvyšuje koncentraci cisplatinu přímo v tumoru a navíc je pak léčivo tělem lépe snášeno. Doxorubicin je hojně používané protinádorové antibiotikum. *Upadhyay a spol.* [3] jej rovněž zkombinovali v konjugátu s hyaluronanem. Výsledkem byla zvýšená koncentrace léčiva v nádorových buňkách. Mimo to se doxorubicin ze systému do těla uvolňoval více než týden, což podporuje rovnoměrnou distribuci látky k nádoru. Většina léčiv je narozdíl od hyaluronanu hydrofobního charakteru. Jako pomocná látka se do takových systému často přidávají tenzidy, jež v konjugátu tvoří polymerní micely. *Brownová* ve svém článku [4] uvádí, že hyaluronan je schopen solubilizovat hydrofobní látky a dělat s nimi komplexy.

Hlavním cílem této práce je navrhnout a provést experimenty, jež by potvrdily nebo vyvrátily existenci interakcí mezi nativním, nijak neupraveným hydrofilním hyaluronanem a hydrofobními látkami. První skupina experimentů je zaměřena na prostou interakci látek. Hyaluronan byl použitý ve velmi nízkých koncentracích. V závislosti na koncentraci hyaluronanu bylo nutné jít s koncentrací fluorescenčních sond k extrémně nízkým hodnotám. To bylo potřeba kvůli omezení rušivé fluorescence volných sond v roztoku. Některé ze sond se totiž přes svůj hydrofobní charakter částečně rozpouštějí ve vodě.

Hyaluronan jako silně hydrofilní látka je schopen kolem sebe vázat vodu, ať už se jedná o vlhkost ze vzduchu, vodu v roztoku, nebo jde o molekuly vody vázané velmi blízko řetězce. Tato nejbližší voda má pravděpodobně organizovaný charakter a brání hydrofobním látkám v navázání se k axiálním vodíkům na řetězci. Proto v další skupině experimentů byla interakce hyaluronanu a fluoroforu podpořena rozrušením hydratačního obalu polymeru. Hyaluronan byl za zvýšené teploty vysoušen, v dalším případě byl systém lyofilizován. Získání poznatků v této oblasti pak může přinést nové metody jak připravovat cílené nosičové systémy přímo z nativního hyaluronanu bez nutnosti chemické modifikace a omezit tak nežádoucí účinky léčby v oboru onkologie.

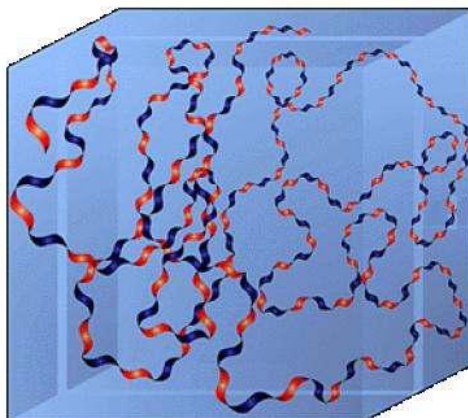




Obr. 2: Ekvatoriální a axiální polohy na molekule hyaluronanu, červeně jsou znázorněny nepolární oblasti a modře polární oblasti [11]

Řetězec hyaluronanu je v roztoku stabilizován několika způsoby. Nejpevnější jsou vazby v samotných cukerných kruzích, ty jsou poměrně neměnné a fixují tvar cukerných zbytků. Naproti tomu glykosidické vazby mezi těmito cukernými kruhy dávají možnost otáčení a jsou stabilizovány intramolekulárními vodíkovými můstky. Důležitou roli ve stabilizaci molekuly hraje i prostředí, tedy interakce s rozpouštědlem. V řetězci jsou pak disacharidové jednotky pootočený vždy o  $180^\circ$  vzhledem k následující jednotce. Tato struktura je označována jako dvakrát stočená šroubovice. Každou druhou otáčku se cukerné jednotky dostávají do původní orientace. Na řetězci hyaluronanu se tedy opakují hydrofobní a hydrofilní oblasti po zhruba stejně dlouhých úsecích [10].

Je-li hyaluronan takto stabilizován, tvoří doménové struktury, které by měli být schopny pojmout do sebe malé molekuly (Obr. 3). Protože je tato doména dynamická a neustále se pohybuje, mění se i velikost prostoru v doméně a tím i pravděpodobnost průniku různě velkých molekul do domény. Ve vodném prostředí se řetězec stočí tak, že hydrofilní ekvatoriální strana bude natočena do roztoku a hydrofobní axiální vodíky budou stočeny do domény [11]. Právě tyto vodíky by pak mohly interagovat s hydrofobními látkami, jako jsou fluorescenční sondy.



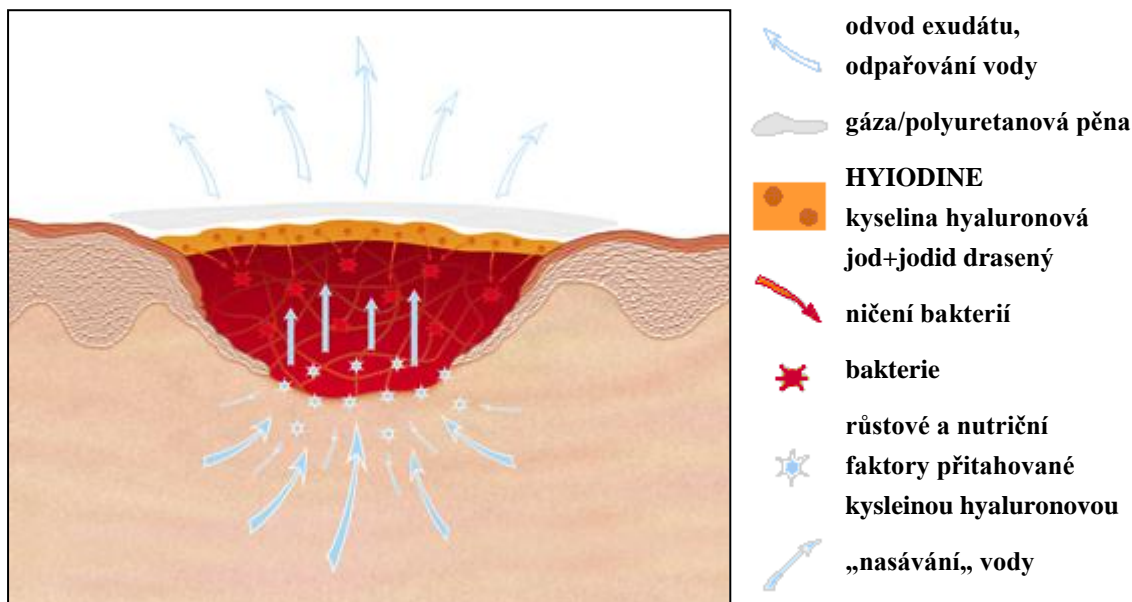
Obr. 3: Struktura hyaluronanu v roztoku [11]

### 2.1.2 Hyaluronan v medicíně

Protože je hyaluronan látka, která se v těle vyskytuje běžně, snaží se moderní medicína využívat jeho vlastností. Hyaluronan není cytotoxický, imunogenní ani teratogenní, naopak je biokompatibilní a biodegradabilní. Je přirozenou složkou ECM a interaguje s buňkami.

Využívá se například v oftalmologii, protože je přirozenou součástí očního sklivce. Při operaci šedého zákalu tak udržuje operativní prostor a navíc chrání ostatní tkáň oka. Nová čočka je tak bezpečně implantována [12]. Jeho lubrikační vlastnosti jsou uplatňovány při

léčbě kloubů a chrupavek, kde díky viskoelasticitě chrání povrch chrupavky a snižuje vnímání bolesti [13]. A jeho schopnost vázat velké množství vody se využívá v přípravcích na hojení ran (Obr. 4) a popálenin, vytváří vlhké prostředí a urychluje hojení (pooperační rány, diabetické defekty) [14].



Obr. 4: Princip hojení rány přípravkem Hyiodine [14]

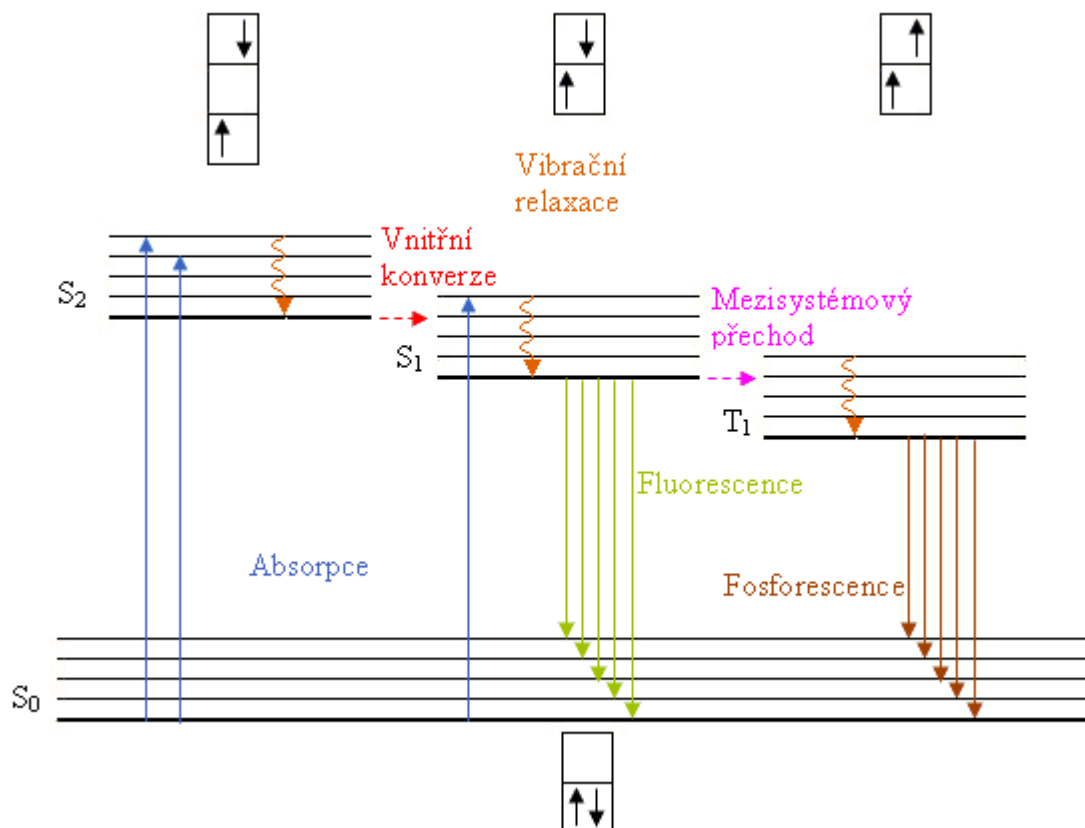
V poslední době se věnuje velká pozornost zkoumání nosičových systémů v oblasti léčby různých druhů rakoviny. Rakovinné buňky produkují určité množství hyaluronidáz, které štěpí řetězce hyaluronanu na oligosacharidy. Oligosacharidy mohou podporovat zhoubné bujení, čímž se zabezpečuje prostor pro rozrůstání nádoru. Nosičové systémy využívající hyaluronan pak mohou dopravit účinnou látku přímo k rakovinným buňkám a působit tak selektivně, zatímco rovnoměrná distribuce látek (například pomocí chemoterapie) ohrožuje i zdravou tkáň v těle [15].

## 2.2 Fluorescence

V molekule, která absorbuje kvantum světelné energie, dojde ke změně elektronové konfigurace. Ze základního stavu  $S_0^0$  se tak elektron dostane do nejbližšího volného orbitalu s vyšší energií v excitovaném stavu  $S_1^X$ . Ze stavu  $S_1^0$  pak může elektron přejít do tripletového stavu  $T_1^X$  mezisystémovým přechodem. V singletovém stavu mají elektrony opačný spin, zatímco u tripletového stavu jsou spiny elektronů paralelní. Singletový stav je z kvantově-mechanického hlediska pravděpodobnější. Takto vybuzené elektrony pak přirozeně přecházejí zpět do základních stavů různými procesy, což se nejčastěji znázorňuje pomocí Jablonského diagramu (Obr. 5).

Jde-li o nezářivé procesy (v diagramu znázorněny vlnovkou nebo přerušovanou šipkou), zvýší se tepelná energie systému. Tyto procesy jsou velmi rychlé, řádově se pohybují okolo  $10^{-12}$  sekund. U zářivých procesů (v diagramu znázorněny plnou šipkou) systém emituje světlo o konkrétní vlnové délce, která je pro daný systém charakteristická. Souhrnně se tyto procesy označují jako luminiscence a podle doby dosvitu se dělí na fluorescenci a fosforescenci.

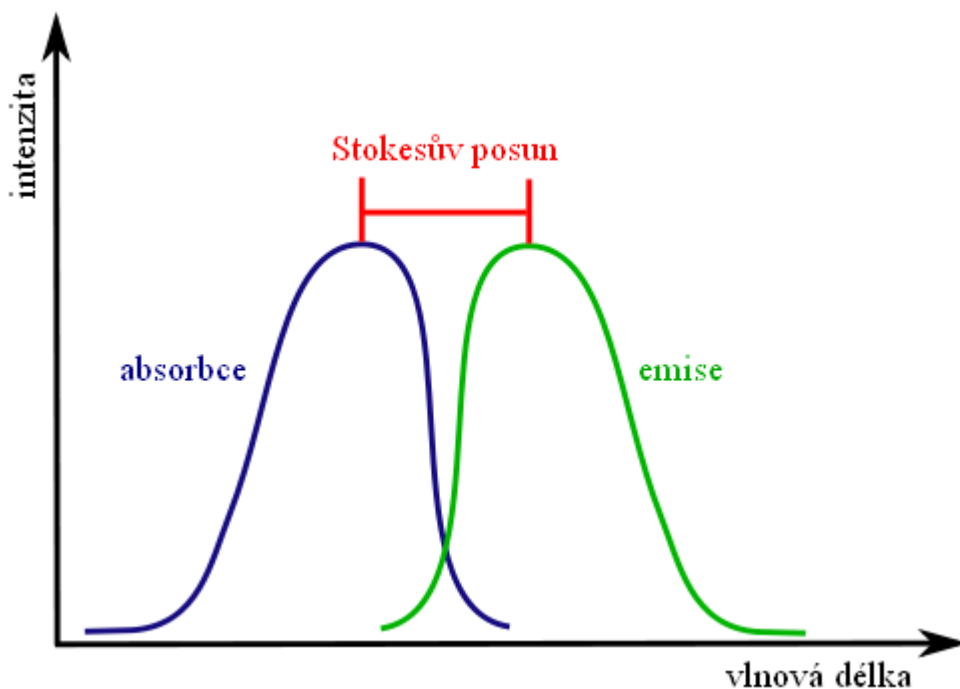
Fosforescence je v porovnání s fluorescencí proces pomalejší a řádově trvá  $10^{-4}$ – $10^2$  sekund. Delší doba dosvitu je způsobena tím, že v excitovaném stavu elektron dvakrát mění svůj spin. Poprvé při mezisystémovém přechodu z  $S_1^0$  do  $T_1^X$  a podruhé při samotné deexcitaci z  $T_1^0$  do  $S_0^X$ . Tyto mechanismy emise značně zpomalí. Naopak spinově povolený přechod z excitovaného stavu  $S_1^0$  do základního stavu  $S_0^X$  způsobuje oproti fosforescenci poměrně rychlou emisi. Antiparalelnímu spinu elektronu v excitovaném orbitalu nic nebrání v přechodu do orbitalu v základním stavu. Fluorescence tak trvá řádově  $10^{-9}$ – $10^{-6}$  sekund [16].



Obr. 5: Jablonského diagram

### 2.2.1 Zákony pro fluorescenci

Fluorescence se řídí několika pravidly a zákony. Prvním z nich je Stokesův zákon, podle kterého je vlnová délka emise při fotoluminiscenci větší nebo rovna vlnové délce excitačního světla. V praxi to znamená, že excitační světlo ztratí část své energie (obvykle právě nezáživými procesy), a tím se prodlouží vlnová délka světla emitovaného při deexcitaci. Z tohoto pravidla také vychází tzv. Stokesův posun (Obr. 6). U jednoduchých molekul fluoroforů je emisní sken oproti absorpci zrcadlově otočený a posunutý ke větším vlnovým délkám. U složitějších fluoroforů není emisní sken přesným zrcadlově otočeným obrazem, ale je více či méně odlišný. To je způsobeno mnoha procesy, které na molekule v průběhu absorpce a emise probíhají. Rozdíl mezi maximy absorpčního a emisního spektra se nazývá Stokesův posun.



Obr. 6: Stokesův posun mezi maximy absorpčního a emisního maxima

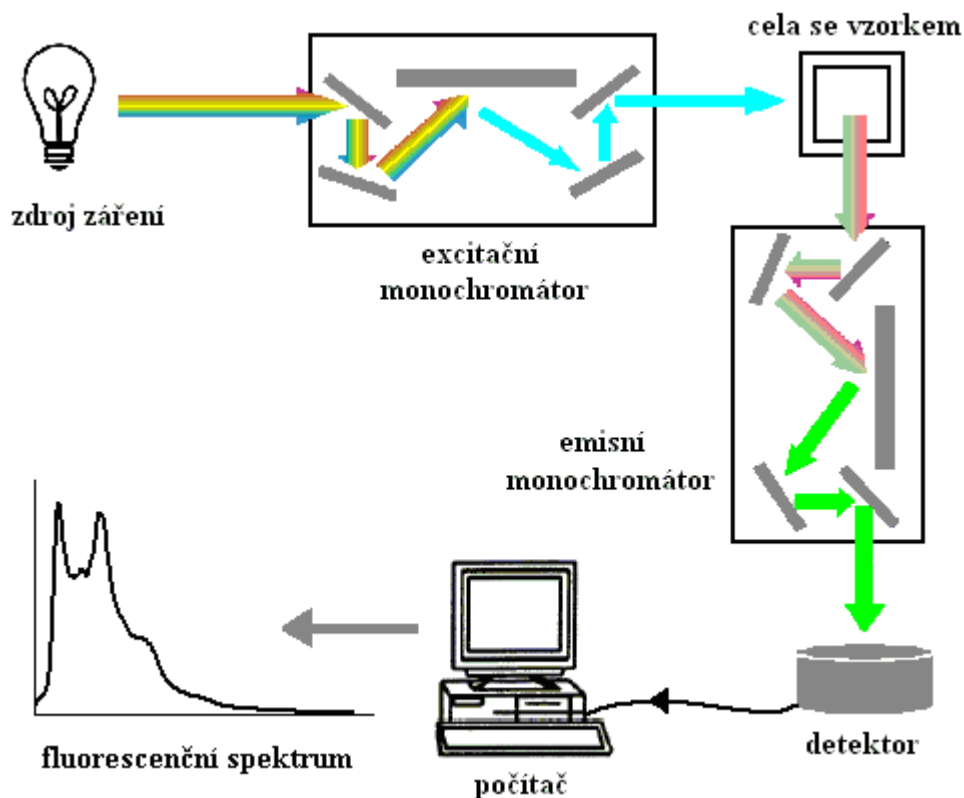
Dalším je Kashovo pravidlo, které říká, že před emisí fluorescenčního kvanta dochází k relaxaci vibrační energie a vnitřní konverzi, což má za následek, že fluorescenční přechod nastává z nejnižší vibrační hladiny prvního excitovaného stavu  $S_1^0$ . Je to způsobeno malým energetickým rozdílem mezi vyššími excitovanými stavy a základním vibračním stavem  $S_1^0$ .

Podle třetího, tzv. Vavilovova pravidla, kvantový výtěžek a doba života excitovaného stavu nezávisí na vlnové délce excitačního záření.

### 2.2.2 Instrumentace

Fluorescenční skeny jsou měřeny na spektrofluorimetru, který se skládá z několika hlavních součástí (Obr. 7). Jako zdroj světla se obvykle využívají xenonové výbojky, jejichž hlavní výhodou je velká intenzita při všech vlnových délkách a široký rozsah vlnových délek. Světelný paprsek pak prochází excitačním monochromátorem, což je zařízení složené ze soustavy zrcadel. Zde se podle natočení zrcadel vymeze konkrétní vlnová délka budícího záření, které dopadá na kyvetu se vzorkem umístěnou v cele. Emitované světlo dopadá do emisního monochromátoru, jenž je umístěn kolmo od vzorku vzhledem k excitačnímu monochromátoru. Ten obdobnou soustavou zrcadel vymezuje vlnovou délku záření, které dopadá na detektor. Pomocí programu v počítači se nastavují jednotlivé parametry pro měření a výsledkem je emisní nebo excitační sken.

Při měření vzorků, na kterých dochází k velkému rozptylu světla, je možné použít celu s polarizátory, které navíc ke vzorku a ze vzorku propustí jen lineárně polarizované světlo. Protože záření, které prochází polarizátorem ke vzorku, se rozptýlí ve stejné rovině a emitované záření se šíří všemi směry, je polarizátor za vzorkem pootočen o  $90^\circ$ . Tím je rozptyl světla potlačen, ale je také snížena intenzita detekované fluorescence.



Obr. 7: Schéma fluorimetru

### 2.2.3 Fluorescenční sondy

Fluorescenční sondy jsou organické látky, které absorbují budící světlo. Následná deexcitace pak poskytuje pro danou sondu charakteristický emisní sken. Obvykle jsou to aromatické uhlovodíky a uhlovodíky s konjugovanými dvojnými vazbami. Navíc fluorescenci podporují elektron-donorní skupiny ( $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{NH}(\text{CH}_3)$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{OCH}_3$ ), naopak elektron-akceptorní skupiny ( $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{CN}$ ,  $-\text{CHO}$ ,  $-\text{COOH}$ ) intenzitu fluorescence snižují.

Na fluorescenci má silný vliv několik fyzikálních vlastností (polarita, pH, viskozita, iontová síla, teplota, tlak nebo přítomnost zhášečů). Fluorofory jsou proto používány pro zkoumání fyzikálně-chemických a biochemických vlastností systémů. Volba fluorescenční sondy je klíčovou součástí experimentu ve fluorescenční spektroskopii, protože právě specifické vlastnosti a reakce sond poskytují potřebné informace.

### 2.3 Lyofilizace

Lyofilizace, nebo také sušení mrazem, je metoda, která se běžně používá ve farmacii a biotechnologickém průmyslu pro zlepšení stability produktů. Vzorky jsou zmrazeny, umístěny na lyofilizátor a zahřáty za velmi nízkého tlaku. Po odsublímování rozpouštědla vznikne porézní koláč s velmi nízkou vlhkostí, který může být dlouhodobě uchovávan [17].

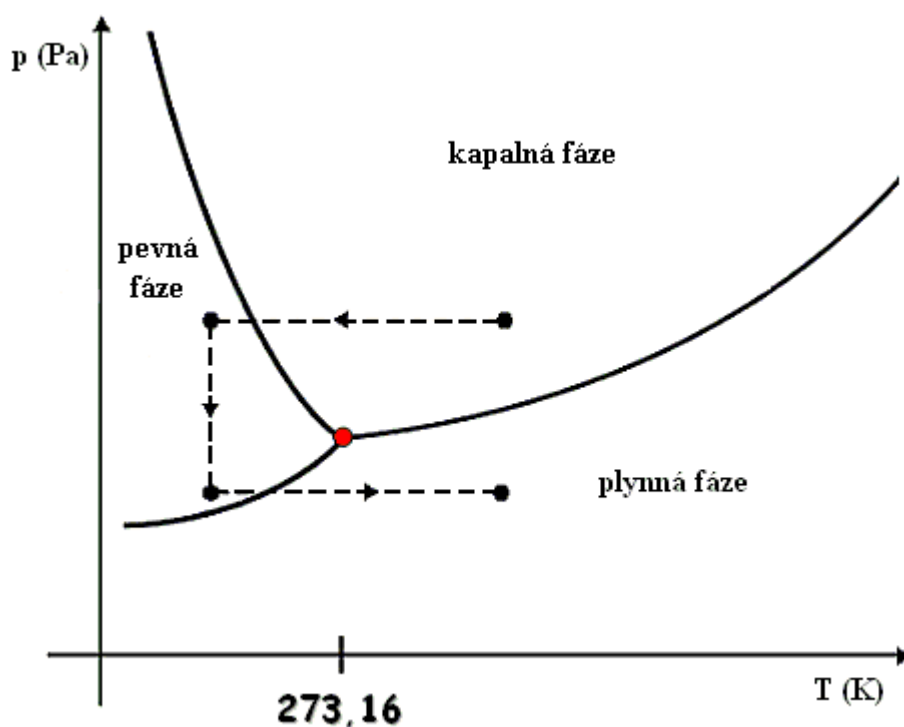
V této práci se vychází z předpokladu, že hyaluronan je v roztoku obklopen ochrannou vrstvou vody (pravděpodobně organizované), která brání průchodu hydrofobní látky do domény. Z tohoto důvodu je nutné odstranit ze vzorku co největší množství vody. Aby byl tento proces účinnější, volí se suchá cesta.

### 2.3.1 Proces lyofilizace

Průběh lyofilizace se dělí do tří kroků. Prvním je mrazení, během kterého je kapalný vzorek zchlazen. Postupně se tvoří krystaly rozpouštědla a tím se zvyšuje koncentrace zbývajících roztoku. Tento vysoce koncentrovaný a viskózní roztok následně také tuhne. Může být amorfního, krystalického, nebo kombinovaného charakteru.

Druhým krokem je tzv. primární sušení. V tomto kroku dochází za sníženého tlaku k sublimaci ledových krystalů rozpouštědla ze zmrazeného produktu. Vzniklé páry prochází sušenou částí produktu na povrch a dále pokračují komorou přístroje na kondenzátor. Ten je udržován při teplotě i méně než  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  a vzniklé páry zde kondenzují a mrznou. V nádobě se vzorkem tak vznikne porézní koláč. Póry odpovídají místům, která byly obsazeny ledovými krystaly.

Následuje sekundární sušení, kdy je ze vzorku odstraněna absorbovaná voda (v případě hyaluronanu ochranná vrstva vody), která během prvního kroku nebyla oddělena ve formě ledu a tedy neodesublimovala. Na Obr. 8 je na fázovém diagramu vody naznačen princip lyofilizace [18].



Obr. 8: Fázový diagram vody s naznačenou lyofilizační cestou

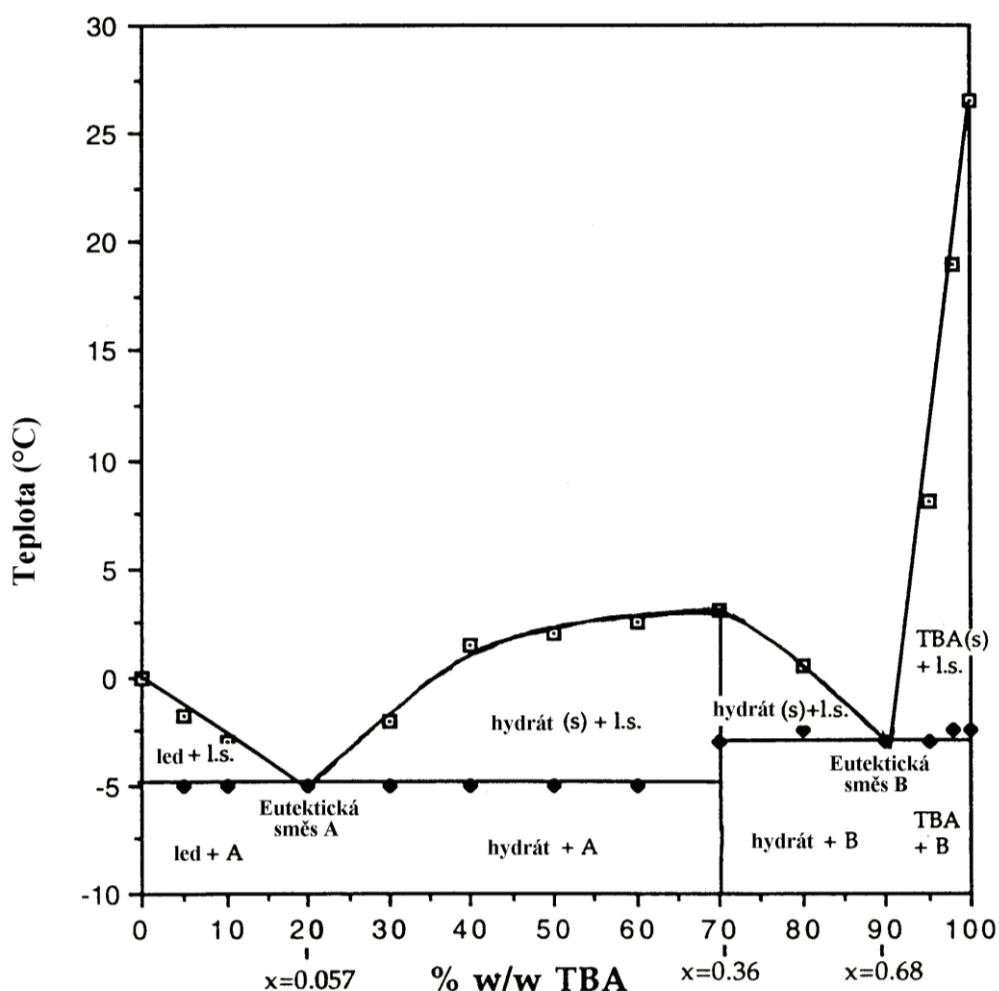
### 2.3.2 Instrumentace

Lyofilizátor se skládá ze sušící komory, kde jsou umístěny police pro nádoby se vzorky, které budou lyofilizovány. Police jsou opatřeny teplotními čidly. Na sušící komoru navazuje komora s kondenzátorem. Součástí lyofilizátoru je série vakuových pump dosahujících podtlak až v rozmezí  $4\text{--}40\text{ Pa}$  v závislosti na typu přístroje [18].

### 2.3.3 Využití ko-rozpouštědla

Ideální lyofilizační medium má vysoký tlak nasycených par, bod tání okolo pokojové teploty, vyšší viskozitu a nízkou toxicitu. Lyofilizace by vlivem rozpouštědla měla být rychlá a kompletní, tak aby vznikl kvalitní koláč.

Čistý terc-butanol (TBA) je díky svým vlastnostem vhodným médiem pro lyofilizaci. TBA tvoří jehlicovité krystaly, které jsou ve vzorku volně uloženy. Díky takovým krystalům vzniklé páry při sublimaci snáze opouštějí koláč, který je pak méně náchylný ke kolapsu. Sublimace čistého TBA je více než 2,5 krát rychlejší, přesto je TBA při lyofilizaci v čistém stavu užíván jen výjimečně. Mnohem častěji se TBA využívá ve směsi s vodou jako ko-rozpouštědlo [19, 20]. Pro tuto práci byla jako směs rozpouštědel vybrána voda a terc-butanol v poměru 4:1. Obr. 9 znázorňuje fázový diagram této binární směsi.

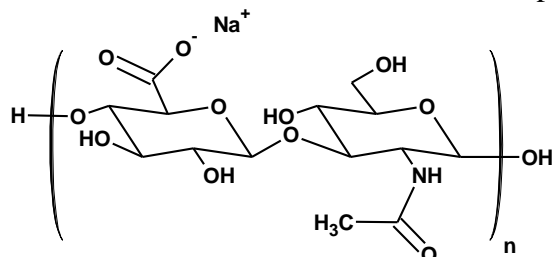


Obr. 9: Fázový diagram systému voda-tercbutanol [21]

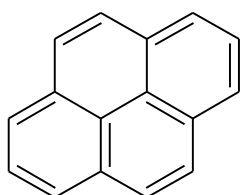
# EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 3.1 Materiály

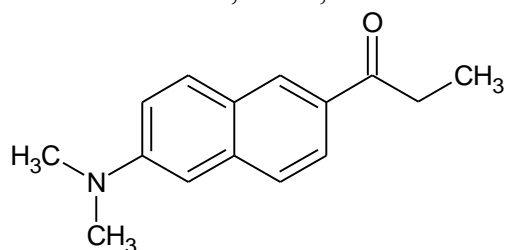
Hyaluronan  $M_w = 650$  kDa, CAS 9004-61-9, CPN spol. s r.o., č. šarže 280407-D1  
 $M_w = 1,46$  MDa, CAS 9004-61-9, CPN spol. s r.o., č. šarže 141008-E1



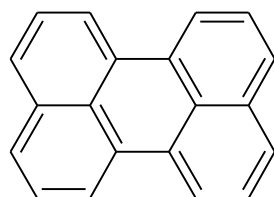
Pyren CAS 129-00-0, Fluka, puriss p.a. for fluorescence, č. šarže 430166/1



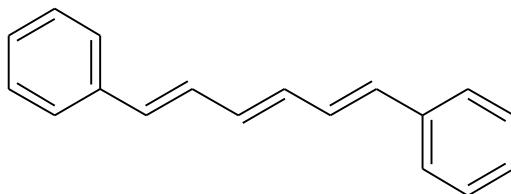
Prodan N,N-dimethyl-6-propionyl-2-naphylamin  
CAS 70504-01-7, Fluka, for fluorescence, č. šarže 445882/1



Perylen CAS 198-55-0, Fluka, puriss for fluorescence, č. šarže 1293653



DPH 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien  
CAS 1720-32-7, Fluka, for fluorescence, č. šarže 1054132



Ostatní **demineralizovaná voda:** Millipore Academic  
**aceton:** CAS 67-64-1, LachNer spol. s r.o.  
**methanol:** CAS 67-56-1, LachNer spol. s r.o.  
**terc-butanol:** CAS 75-65-0, LachNer spol. s r.o.

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Příprava zásobních roztoků

Zásobní roztoky fluorescenčních sond o různých koncentracích byly připraveny v těkavém rozpouštědle – aceton nebo methanol. Zásobní roztoky hyaluronanu byly připraveny ve vodě. Hyaluronan s vyšší molekulovou hmotností nebo roztok s vyšší koncentrací bylo nutné nechat rozpouštět déle, než hyaluronan s nízkou molekulovou hmotností a málo koncentrované roztoky. Vzorky byly uloženy v lednici při 4 °C.

### 3.2.2 Příprava vzorků pro ověření závěrů T. Brown

Do vialek bylo napipetováno takové množství fluoroforu v těkavém rozpouštědle, aby po odpaření rozpouštědla a doplnění na objem 4 ml (roztokem hyaluronanu, vodou) byla ve vialkách požadovaná koncentrace sondy. Odpařování probíhalo za laboratorní teploty a za sníženého tlaku. Hyaluronan použitý pro tuto řadu experimentů měl molekulovou hmotnost 650 kDa. Vialky poté byly ponechány na třepačce obvykle 24 hodin při laboratorní teplotě.

### 3.2.3 Příprava vzorků s předsušeným hyaluronanem

Navážka přibližně 0,02 g hyaluronanu ( $M_w = 1,46$  MDa) byla v kádinkách ponechána při 120 °C po dobu 1 hodiny v sušárně. Poté byly kádinky vloženy do exsikátoru a po vychladnutí byly navážky opět zváženy. Do kádinek bylo napipetováno takové množství fluoroforu v těkavém rozpouštědle, aby po odpaření rozpouštědla a doplnění vodou na objem 20 ml byla v kádinkách požadovaná koncentrace sondy. Po odpaření rozpouštědla za laboratorní teploty a sníženého tlaku byly vzorky dosušeny v sušárně při 120 °C po dobu 30 minut. Poté bylo ke vzorkům napipetováno 20 ml vody a po důkladném promíchání byly do tří vialek napipetovány 4 ml takto připraveného roztoku. Ke vzorkům byly připraveny vždy dva slepé vzorky ve vodě tak, aby koncentrace příslušné sondy byla stejná. Takto připravené vzorky byly ponechány na třepačce 24 hodin při laboratorní teplotě.

### 3.2.4 Příprava vzorků pro lyofilizaci

Do lyofilizačních nádobek bylo napipetováno takové množství fluorescenční sondy v těkavém rozpouštědle, aby po odpaření rozpouštědla a doplnění na objem 50 ml (10 ml TBA, 40 ml roztoku hyaluronanu) byla v nádobkách požadovaná koncentrace sondy. Odpařování probíhalo za laboratorní teploty a za sníženého tlaku. Hyaluronan použitý pro tuto řadu experimentů měl molekulovou hmotnost 650 kDa. Nádobky byly vloženy do nádoby s ethanolem o teplotě -20 °C, ve které rotovaly a po zamrznutí směsi na stěnách byly umístěny do mrazáku o teplotě -30 °C. Poté probíhala lyofilizace při teplotě -50 °C a tlaku menším než 13,3 Pa dokud nevysublimovala rozpouštědla (voda a TBA). Po ukončení lyofilizace byly vzorky zváženy a rozděleny na dvě stejné části. První část byla ihned rehydratována 10 ml vody a po rozpuštění vzorku byly do dvou vialek napipetovány 4 ml takto připraveného roztoku. Druhá část byla v sušárně dosušena při 60 °C po dobu 30 minut, poté byla znovu zvážena, rehydratována 10 ml vody a po rozpuštění vzorku byly do dvou vialek napipetovány 4 ml takto připraveného roztoku. Ke vzorkům byly připraveny vždy dva slepé vzorky ve vodě tak, aby koncentrace příslušné sondy byla stejná. Takto připravené vzorky byly ponechány na třepačce 24 hodin při laboratorní teplotě.

### 3.2.5 Měření vzorků na fluorimetru AMINCO Bowman series 2

Veškeré měření bylo prováděno při teplotě 20 °C.

Pro vzorky obsahující pyren byl emisní sken měřen v rozsahu 360–530 nm s krokem  $5 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$  a excitační sken v rozsahu 310–340 nm s krokem  $5 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$ , excitační monochromátor byl nastaven na 335 nm a emisní monochromátor na 392 nm. Monochromátory jsou během měření skenů nastavovány kvůli citlivosti přístroje. V emisním spektru byly sledovány intenzity prvního maxima ( $373 \pm 1 \text{ nm}$ ) a třetího maxima ( $383 \pm 1 \text{ nm}$ ) a byl zaznamenáván totální integrál pod křivkou emisního skenu. V excitačním spektru byly sledovány intenzity při 333 nm a 338 nm.

Pro vzorky obsahující prodan byl emisní sken měřen v rozsahu 380–650 nm s krokem  $5 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$ , excitační monochromátor byl nastaven na 360 nm a emisní monochromátor na 520 nm. Byla sledována intenzita a poloha maxima a byl zaznamenáván totální integrál pod křivkou emisního skenu.

Pro vzorky obsahující perylen byl emisní sken měřen v rozsahu 420–600 nm s krokem  $5 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$ , excitační monochromátor byl nastaven na 410 nm a emisní monochromátor na 440 nm. Byl zaznamenáván totální integrál pod křivkou emisního skenu.

Pro vzorky obsahující DPH byl emisní sken měřen v rozsahu 400–600 nm s krokem  $5 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$ , excitační monochromátor byl nastaven na 385 nm a emisní monochromátor na 426 nm. K měření byla použita cela s polarizátory (viz kapitola 2.2.2). Byl zaznamenáván totální integrál pod křivkou emisního skenu.

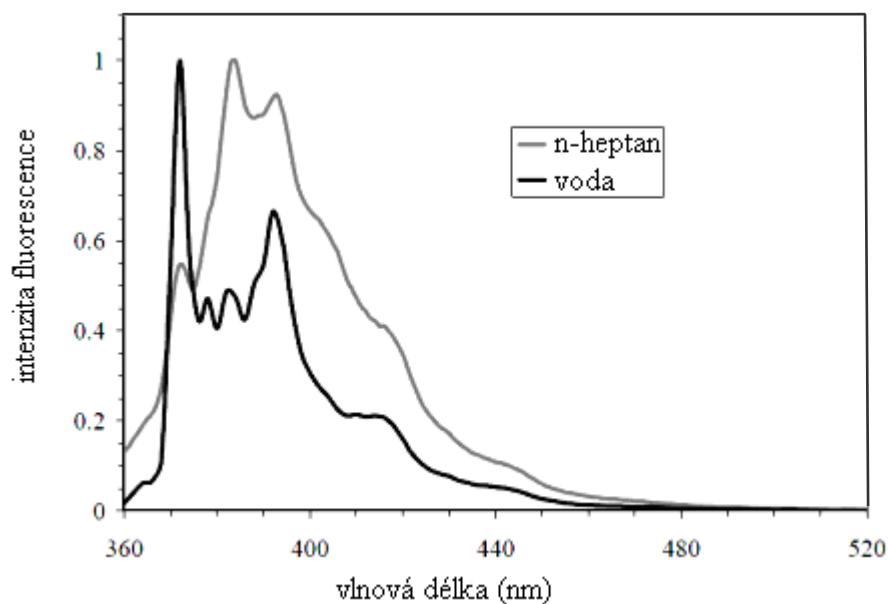
### 3.2.6 Měření vzorků na UV-VIS spektrometru Varian Cary 50 Probe

Vzorky, u kterých bylo třeba provést korekce, byly proměřeny na UV-VIS spektrometru v kyvetě o průměru 1 cm v rozsahu 200–600 nm.

## 3.3 Vyhodnocení dat

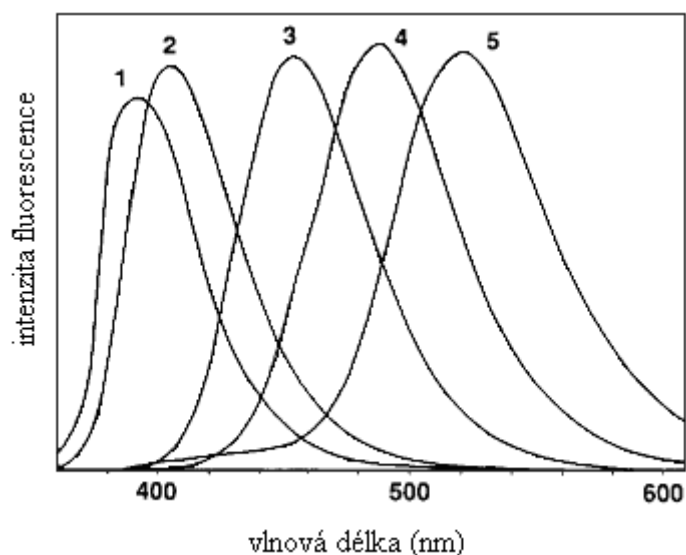
U všech sond byla pozorována intenzita fluorescence systému voda-hyaluronan-sonda v porovnání se slepým vzorkem. Fluorescenční sondy jsou hydrofobní látky a jsou tedy ve vodě nerozpustné (popř. jen málo), intenzita fluorescence je tedy velmi slabá. Naopak je-li fluorofor solubilizován v hydrofobním prostředí, intenzita fluorescence je vysoká. Vycházelo se tedy z předpokladu, že interakce hyaluronanu a těchto hydrofobních látek bude mít za následek zvýšení intenzity oproti slepému vzorku.

Pyren je fluorescenční sonda, která je schopna reagovat na změnu polaritativního prostředí. To se projeví na emisním i excitačním spektru. Proto byla u pyrenu kromě intenzity fluorescence pozorována i hodnota polaritativního indexu. Poměr přechodu 0-0 (při vlnové délce 373 nm) a přechodu 0-2 (při vlnové délce 383 nm) dosahuje v polárním prostředí hodnot asi 1,7, zatímco v nepolárním prostředí výška píku při 373 nm klesne a hodnota poměru se pohybuje okolo 0,5 (EmPI). To je znázorněno na Obr. 10. U excitačního skenu byl pak zjištěn poměr intenzit fluorescence při vlnových délkách 333 nm a 338 nm (ExPI).



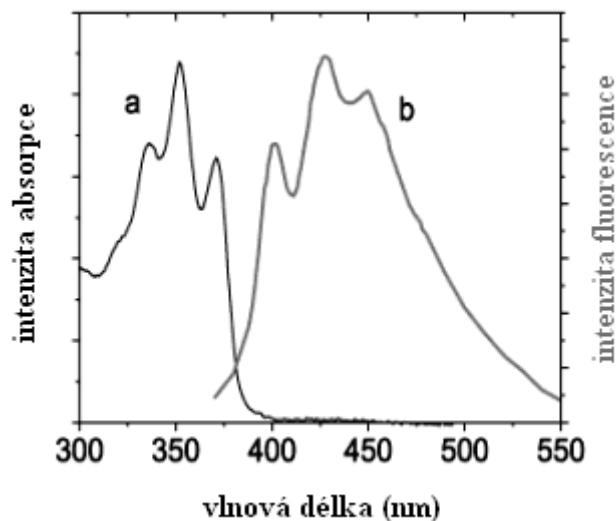
Obr 10: Emisní spektra pyrenu v roztoku n-heptanu a vody

Prodan je další sonda, která reaguje na polaritu prostředí. Na tento fluorofor má vliv relaxace rozpouštědla. Když je sonda obklopena viskózním polárním prostředím (např. hydrofilní polymer hyaluronan), dochází k „Red Edge Excitation Shift“ (REES) efektu. Jedná se o ne vazebnou interakci ovlivněnou disperzními silami. Obvykle je relaxace okolí velmi rychlá. Tyto síly ji ale zpomalují a ona je tak srovnatelná s dobou života fluoroforu. Zvyšujeme-li vlnovou délku excitace a zároveň dochází k batochromnímu posunu maxima fluorescence, dokázali jsme interakce mezi sondou a polymerem. Emisní maximum prodanu v polárním prostředí je 530 nm, zatímco v nepolárním prostředí je to asi 405 nm (Obr. 11) [16]. U prodanu tedy byla kromě intenzity fluorescence sledována i vlnová délka emisního maxima.

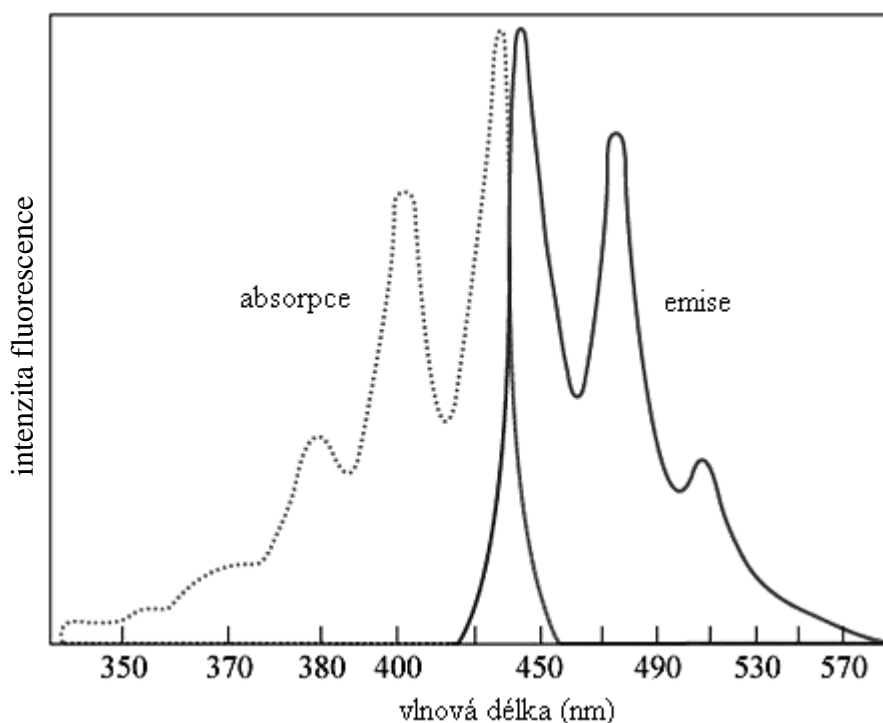


Obr. 11: Fluorescenční spektra prodanu v cyklohexanu (1), chlorbenzenu (2), dimethylformamidu (3), ethanolu (4) a ve vodě (5)

DPH (Obr. 12) a perylen (Obr. 13) nemají v polárních roztocích detekovatelnou fluorescenci. Jedná se o silně hydrofobní sondy v polárních rozpouštědlech téměř nerozpustné. U těchto fluoroforů tedy postačilo sledovat intenzitu fluorescence, respektive totální integrál pod křivkou.



Obr. 12: Absorpční (a) a fluorescenční (b) sken DPH v ethanolu



Obr. 13: Absorpční a fluorescenční sken perylenu

### 3.4 Korekce

Intenzita fluorescence může být značně zkreslena například u zakalených vzorků. Snížení fluorescence způsobuje také vnitřní filtrační efekt. Při excitaci je světlo absorbováno fluorofory, které pak emitují mimo detektor, jedná se o vnitřní filtrační efekt prvního druhu.

Při emisi může být světlo reabsorbováno fluorofory a ty jsou pak také vyexcitovány. Následně emitují mimo oblast detektoru a jde o tzv. vnitřní filtrační efekt druhého druhu.

Fluorescenční spektra je pak nutné korigovat podle vzorce [22]:

$$F_{\text{kor}} = F_{\text{poz}} \cdot 10^{0,5 \cdot (OD_{\text{ex}} + OD_{\text{em}})}, \quad (1)$$

kde  $F_{\text{kor}}$  je korigovaná intenzita fluorescence,  $F_{\text{poz}}$  je naměřená intenzita fluorescence,  $OD_{\text{ex}}$  je optická hustota při excitační vlnové délce a  $OD_{\text{em}}$  je optická hustota při emisní vlnové délce. Vztah pro optickou vlnovou délku je:

$$OD_{\lambda} = \frac{A}{l}, \quad (2)$$

kde  $A$  je absorbance a  $l$  je délka optické dráhy. A protože vzorky byly pro korekce měřeny na UV-VIS spektrometru v kyvetě o délce 1 cm, tak získáme vztah pro korigovanou fluorescenci:

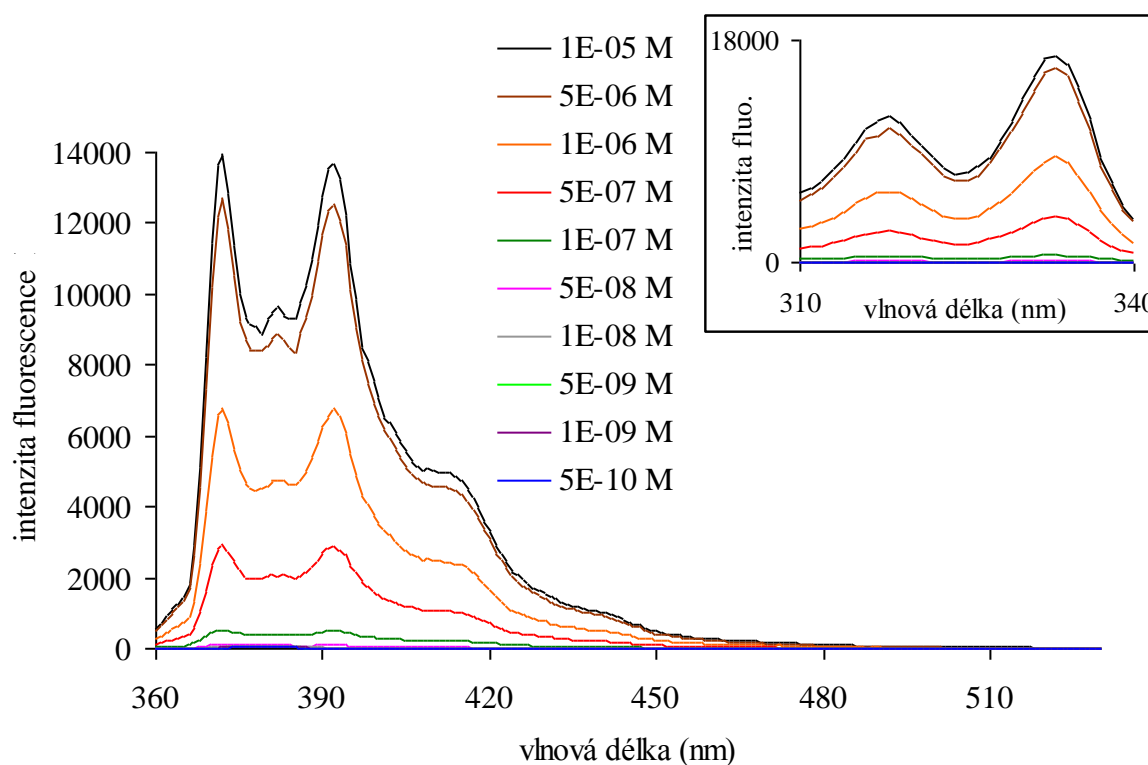
$$F_{\text{kor}} = F_{\text{poz}} \cdot 10^{0,5 \cdot (A_{\text{ex}} + A_{\text{em}})}. \quad (3)$$

## VÝSLEDKY A DISKUSE

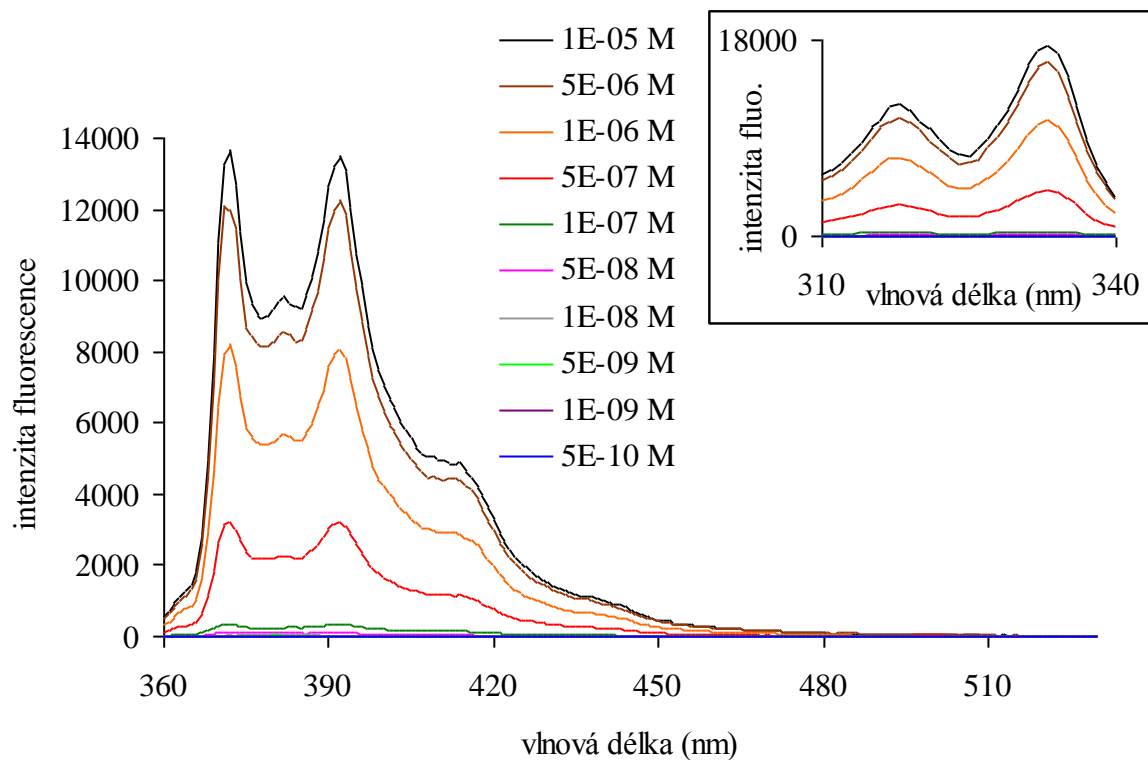
Cílem experimentální části bakalářské práce bylo prozkoumat vzájemné interakce systému hyaluronan-hydrofobní látka. Veškeré experimenty byly prováděny ve vodném prostředí. Hyaluronan používaný v této práci měl molekulovou hmotnost 650 kDa, popřípadě 1,46 MDa. Jako sondy pro fluorescenční spektrometrii byly použity pyren, prodan, perylen a DPH. Cílem těchto měření je získání informací o interakcích v systémech hyaluronanu a hydrofobních solutů s ohledem na využití těchto poznatků v oblasti cílených nosičů léčiv, jakožto alternativní a perspektivní léčby rakoviny.

### 4.1 Ověření závěrů T. Brown

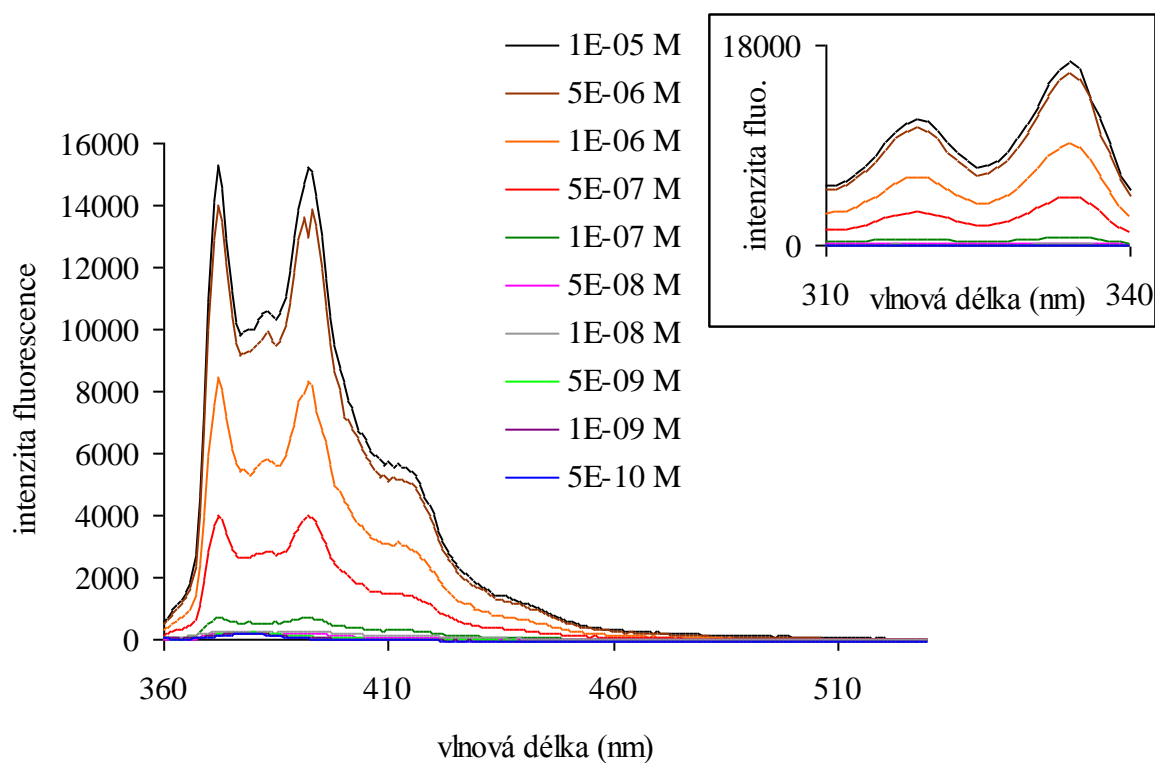
Byly připraveny koncentrační řady pyrenu a prodanu od  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  do  $5 \cdot 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Koncentrace hyaluronanu se pro různá měření lišila. Nejprve byly vzorky změřeny bez přítomnosti hyaluronanu. Poté byla provedena měření s hyaluronanem o koncentraci  $3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  a  $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  pro pyren ( $90 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  pro prodan).



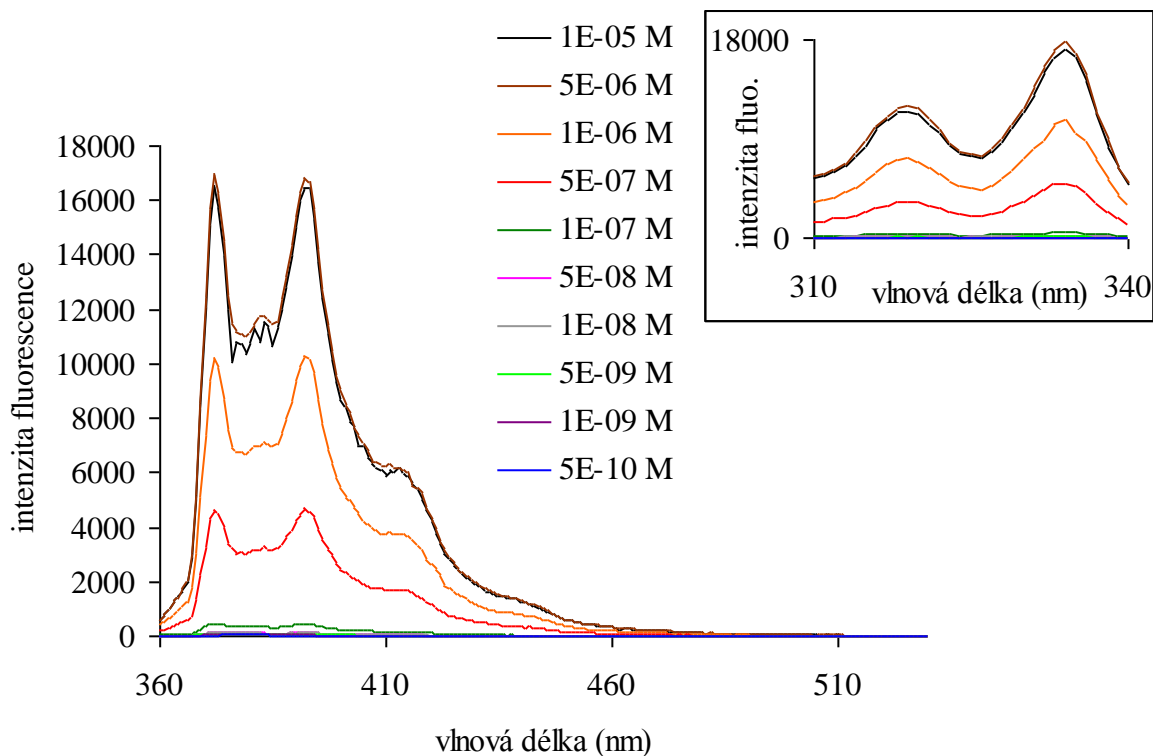
Obr. 14: Emisní a excitační (vložený graf) sken pyrenu o koncentracích sondy  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ – $5 \cdot 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  bez přídavku hyaluronanu



Obr. 15: Emisní a excitační (vložený graf) sken pyrenu o koncentracích sondy  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ – $5 \cdot 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a koncentraci hyaluronanu  $3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$



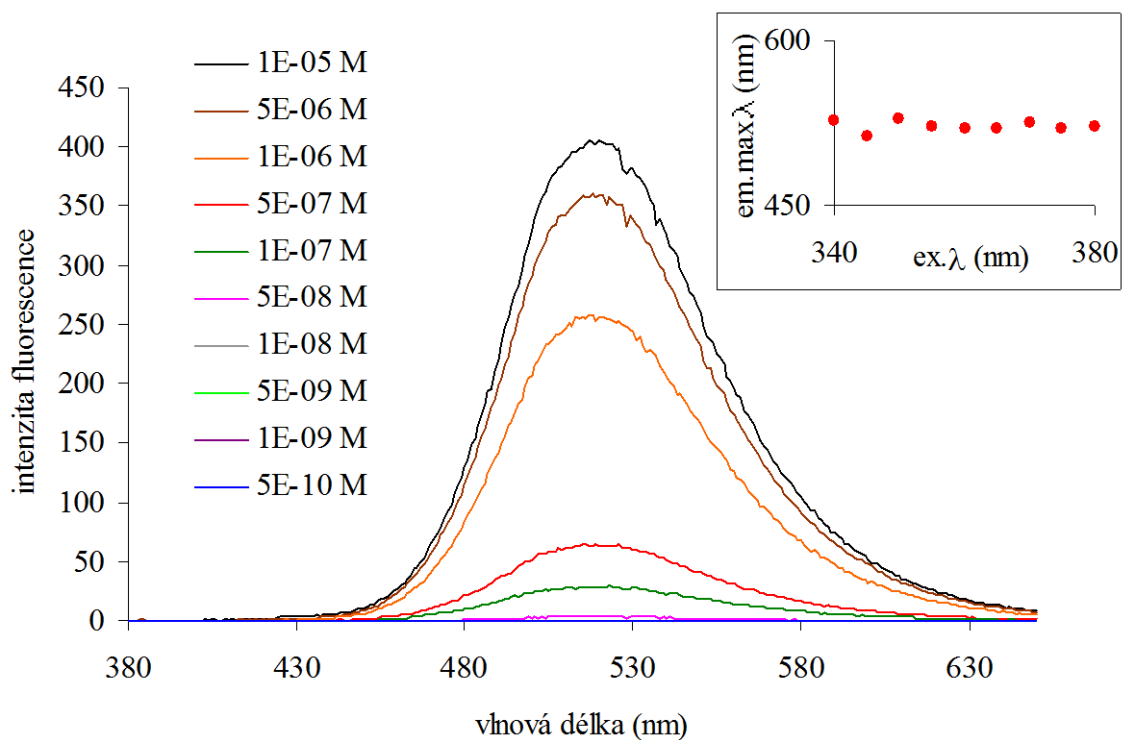
Obr. 16: Emisní a excitační (vložený graf) sken pyrenu o koncentracích sondy  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ – $5 \cdot 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a koncentraci hyaluronanu  $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$



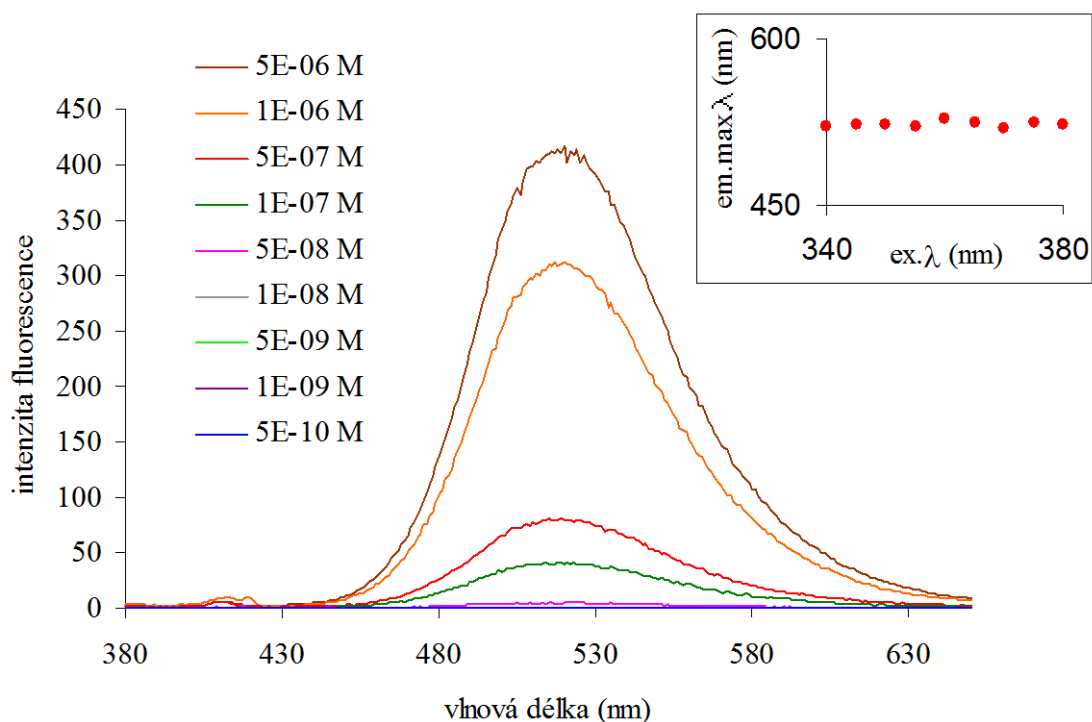
Obr. 17: Emisní a excitační (vložený graf) sken pyrenu o koncentracích sondy  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  –  $5 \cdot 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a koncentraci hyaluronanu  $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$

Na Obr. 14–17 jsou znázorněny jednotlivá spektra koncentračních řad pyrenu s různým přídavkem hyaluronanu. Jak je patrné, nižší koncentrace než  $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  již spektrometr nebyl schopen detekovat. Emisní skeny jsou si v podstatě velmi podobné pro všechny přídavky hyaluronanu. Na Obr. 16 a 17 je vidět malý nárůst intenzity fluorescence, což by mohlo naznačovat, že pyren je alespoň částečně solubilizován v hydrofobním prostředí. Po vyhodnocení EmPI, který ve všech případech dosahoval hodnot okolo 1,45, lze ale toto tvrzení zamítnout. Tyto hodnoty polaritních indexů jsou příliš vysoké na to, aby se jednalo o pyren fluoreskující z domén hyaluronanu.

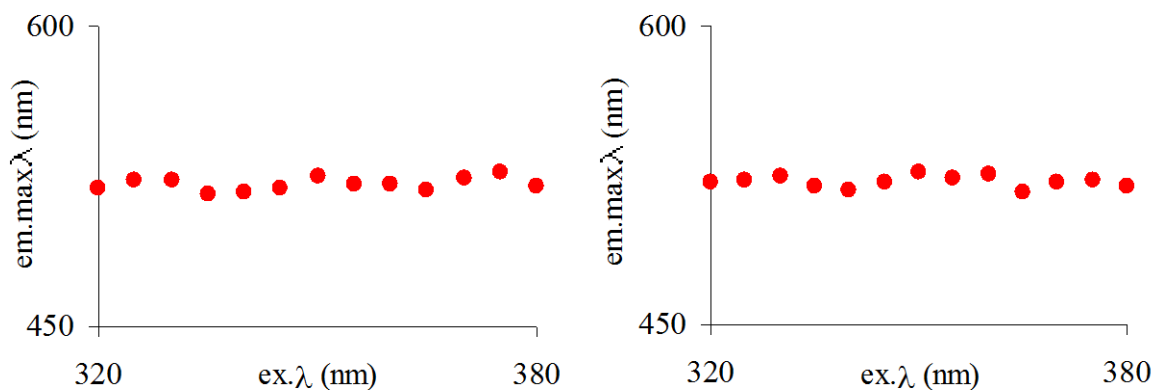
Vložené grafy pak znázorňují excitační skeny těchto systémů. Intenzita fluorescence v tomto případě nevzrostla ani po přídavku hyaluronanu o koncentraci  $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  a  $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . ExPI nabýval hodnot okolo 2,0. I tyto hodnoty polaritních indexů jsou typické pro pyren solubilizovaný v hydrofilním okolí. Veškerá naměřená data emisních a excitačních skenů a jejich polaritních indexů nenaznačují, že by v systému hyaluronan-pyren, který byl připraven pouhým smícháním složek ve vodném prostředí, docházelo k interakcím. Bylo tedy třeba navrhnout způsoby přípravy roztoků, které by podpořily interakce mezi látkami v systému.



Obr. 18: Emisní sken a závislost polohy emisního maxima na excitační vlnové délce (vložený graf) prodanu o koncentracích sondy  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ – $5 \cdot 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  bez přidavku hyaluronanu



Obr. 19: Emisní sken a závislost polohy emisního maxima na excitační vlnové délce (vložený graf) prodanu o koncentracích sondy  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ – $5 \cdot 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a koncentraci hyaluronanu  $3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$



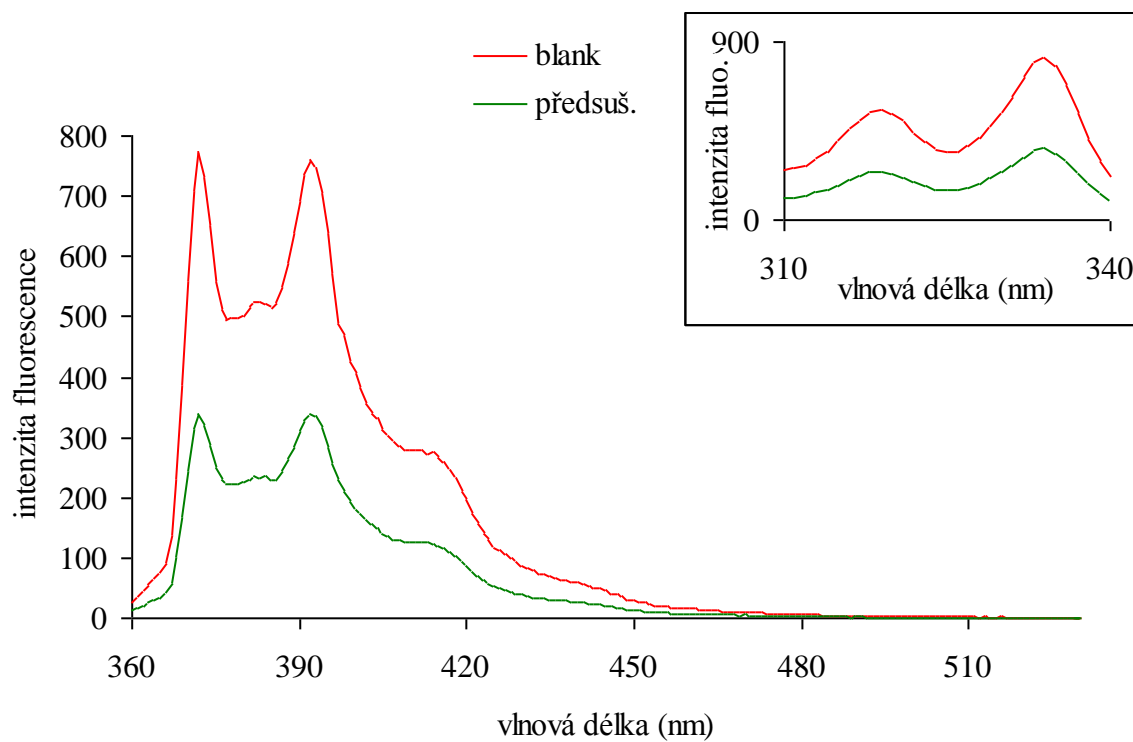
Obr. 20: Závislost polohy emisního maxima na excitační vlnové délce prodanu o koncentracích sondy  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ – $5 \cdot 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a koncentraci hyaluronanu  $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  (vlevo) a  $90 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  (vpravo)

Obr. 18 a 19 zobrazují emisní spektra koncentračních řad prodanu s různým přidavkem hyaluronanu. Jak je vidět, intenzity fluorescence jsou velmi podobné. Stejně jako u pyrenu koncentrace nižší než  $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  již spektrometr nebyl schopen detekovat. Polohy píků jsou v obou případech stejné a není znatelný žádný posun k nižším vlnovým délkám. Pro úplnost byly do těchto grafů vloženy závislosti vlnové délky emisního maxima na budící vlnové délce při fluorescenci. V případě solubilizace prodanu v hydrofobní oblasti hyaluronové domény se očekávalo, že křivka bude mít stoupající tendenci. S minimálními odchylkami však vlnové délky emisního maxima dosahovaly hodnot 520 nm, což jednoznačně ukazuje, že prodan byl solubilizován ve vodném prostředí.

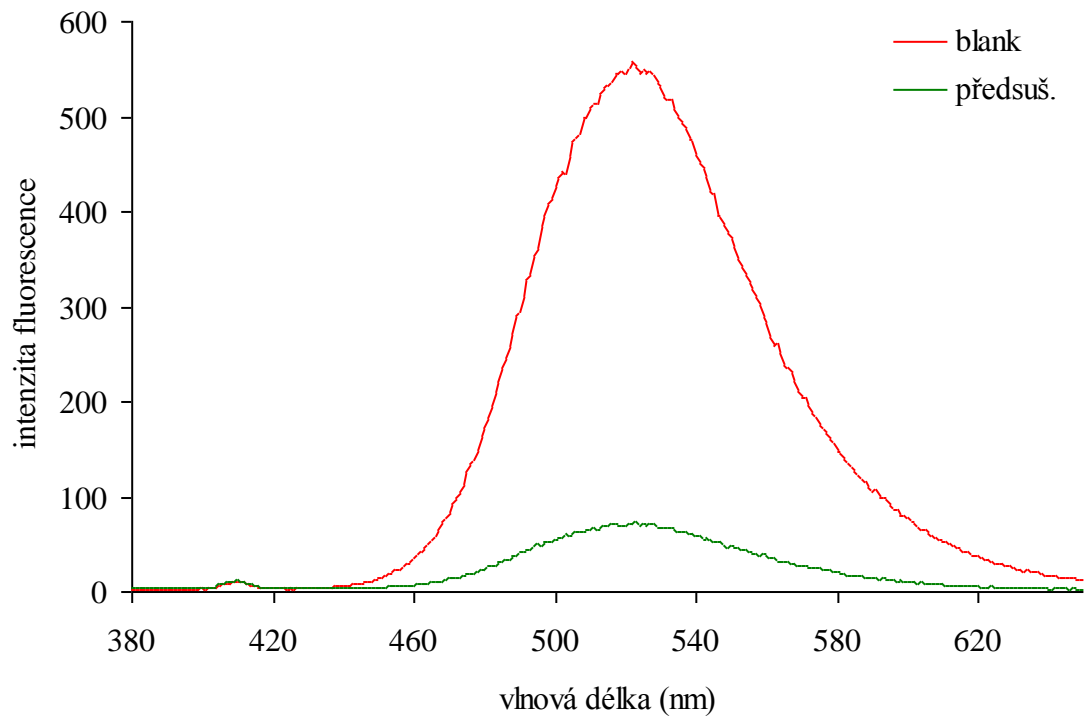
U experimentů s přidavkem hyaluronanu o koncentraci  $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  a  $90 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  již byla měřena pouze závislosti vlnové délky emisního maxima na budící vlnové délce (Obr. 20). Rozpětí budících vlnových délek bylo mírně rozšířeno. Ani v těchto grafech však nejsou závislosti rostoucí a vlnové délky emisních maxim se pohybují okolo 520 nm. Výsledky experimentů s prodanem tak potvrzují závěry experimentů s pyrenem. K interakcím v systému hyaluronan-hydrofobní látka nedochází.

#### 4.2 Interakce s předsušeným hyaluronanem

Jako první způsob podpory interakcí ve zkoumaném systému látek byly navrženy experimenty s předsušeným hyaluronanem. Vycházelo se z předpokladu, že hyaluronan je látka, která k sobě intenzivně váže vodu. Ve vodném roztoku jsou axiální vodíky pro fluorofor nepřístupné, protože jim v cestě stojí jak voda v okolí tak nejbližší voda na hyaluronovém řetězci. Byly připraveny experimenty se sondami (pyren, prodan) o koncentraci  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Hyaluronan měl ve vzorcích koncentraci  $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Vzorky s předsušeným hyaluronanem pak byly porovnávány se vzorky připravenými prostým smícháním fluoroforu s hyaluronanem bez předsušení.



Obr. 21: Emisní a excitační (vložený graf) sken pyrenu o koncentraci sondy  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a koncentraci hyaluronanu  $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$



Obr. 22: Emisní sken prodanu o koncentraci sondy  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a koncentraci hyaluronanu  $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$

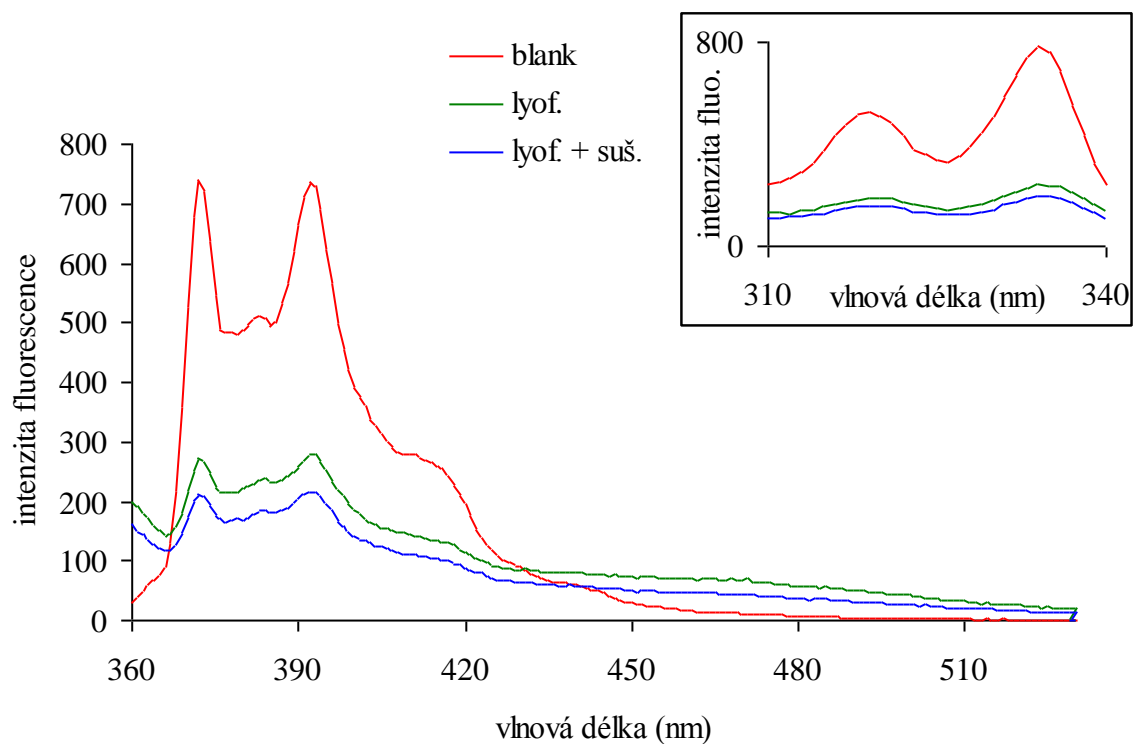
Na Obr. 21 je znázorněn emisní sken pyrenu o koncentraci sondy  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Červená křivka je spektrum slepého vzorku a zelené spektrum bylo získáno ze systému s předsušeným hyaluronanem o koncentraci  $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Intenzita záření slepého vzorku je vyšší než u vzorku s předsušeným hyaluronanem. Nedošlo-li k nárůstu intenzity, lze předpokládat, že k interakcím hyaluronové domény a fluoroforu nedochází. To že ale intenzita tak významně klesla, je v rozporu s očekáváním. Možným vysvětlením může být nedostatečné kvantitativní převádění vzorků mezi jednotlivými nádobami, protože příprava vzorků s předsušeným hyaluronanem byla složitější. Na intenzitu fluorescence proto nelze nahlížet jako na jednoznačný indikátor. Jako v předchozích případech proto byly vyhodnoceny EmPI, které dosahovaly hodnot 1,43 (pro slepý vzorek) a 1,42 (pro vzorek). Tyto hodnoty emisních polaritních indexů indikují pyren fluoreskující z vodného prostředí. Nedostatečné kvantitativní převádění roztoku by na EmPI nemělo mít vliv. Výsledky těchto experimentů tedy také nenaznačují, že by v systému docházelo k interakcím.

Ve vloženém grafu je znázorněn excitační sken těchto vzorků. ExPI nabývají hodnot 1,85 (pro slepý vzorek) a 1,81 (pro vzorek). Polaritní indexy v tomto experimentu také naznačují, že pyren byl přítomen v polárním prostředí. Pravděpodobně k interakcím nedošlo a pyren se do hydrofobních kavit hyaluronanu nenavázal.

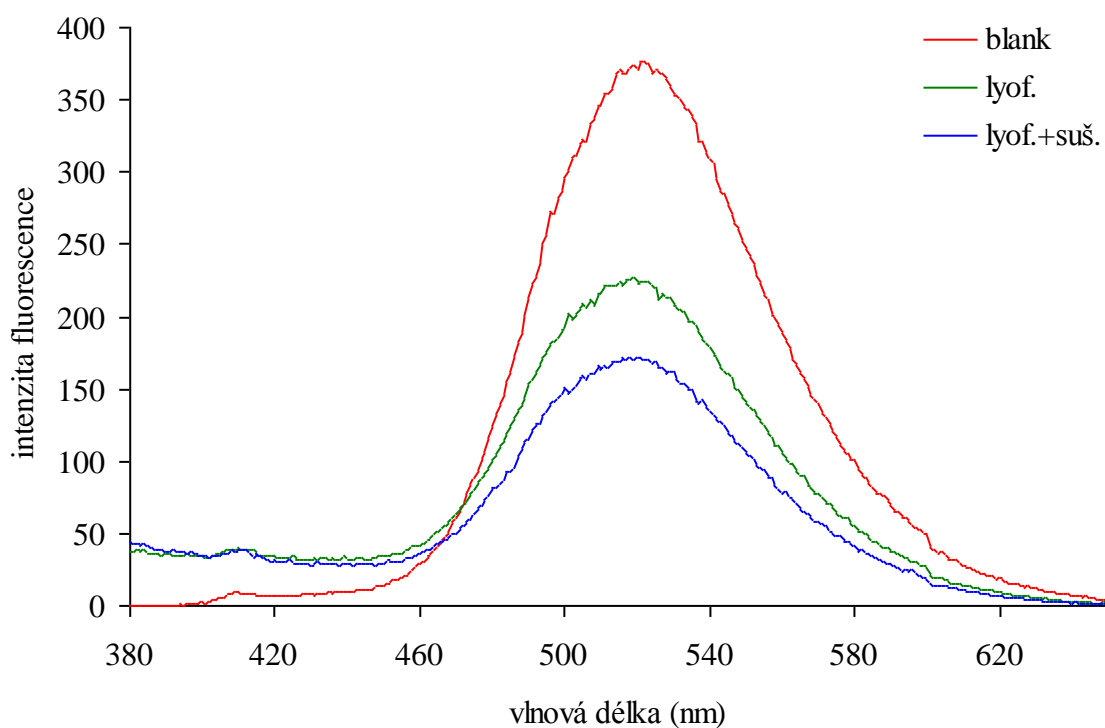
Obr. 22 zobrazuje emisní sken prodanu o koncentraci sondy  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Trend, který byl naměřen při experimentech s pyrenem, zůstává stejný. Intenzita fluorescence slepého vzorku, jenž je v grafu znázorněn červenou křivkou, je vyšší než u vzorku s předsušeným hyaluronanem. Vysvětlení těchto naměřených hodnot je totožné s předchozím experimentem. Vzhledem k tomu, že vlnové délky emisního maxima dosahovaly hodnot 520 nm, dá se předpokládat, že spolu hyaluronan a prodan pravděpodobně neinteragovaly.

### 4.3 Podpora interakce lyofilizací

Vzhledem k tomu, že podpora interakcí předsušením hyaluronanu nepřinesla kladné výsledky, byl navržen jiný způsob jak zpřístupnit hydrofobní vodíky na řetězci hyaluronanu fluorescenčním sondám. Další metodou, jak rozrušit hydratační obal hyaluronanu a zbavit ho nejbližší vázané vody, je lyofilizace. První sada měření byla provedena pro sondy (pyren, prodan) o koncentraci  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Hyaluronan měl ve vzorcích koncentraci  $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Lyofilizované vzorky byly porovnávány se vzorky připravenými prostým smícháním sondy s hyaluronanem.



Obr. 23: Emisní a excitační (vložený graf) sken pyrenu o koncentraci sondy  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a koncentraci hyaluronanu  $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$

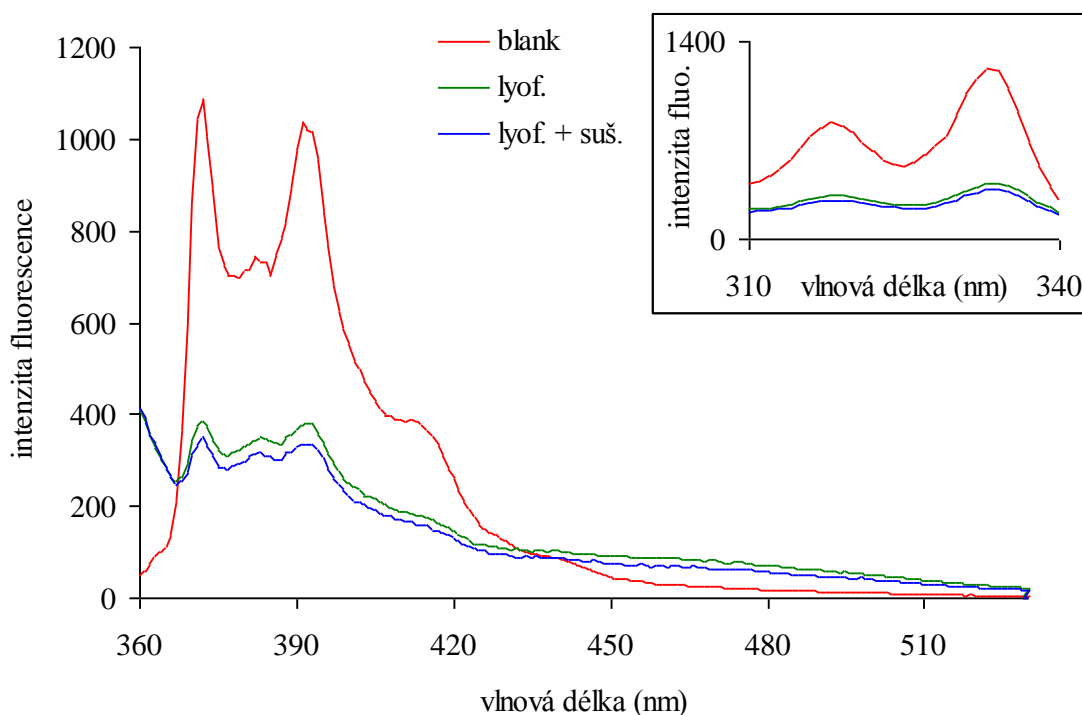


Obr. 24: Emisní sken prodanu o koncentraci sondy  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a koncentraci hyaluronanu  $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$

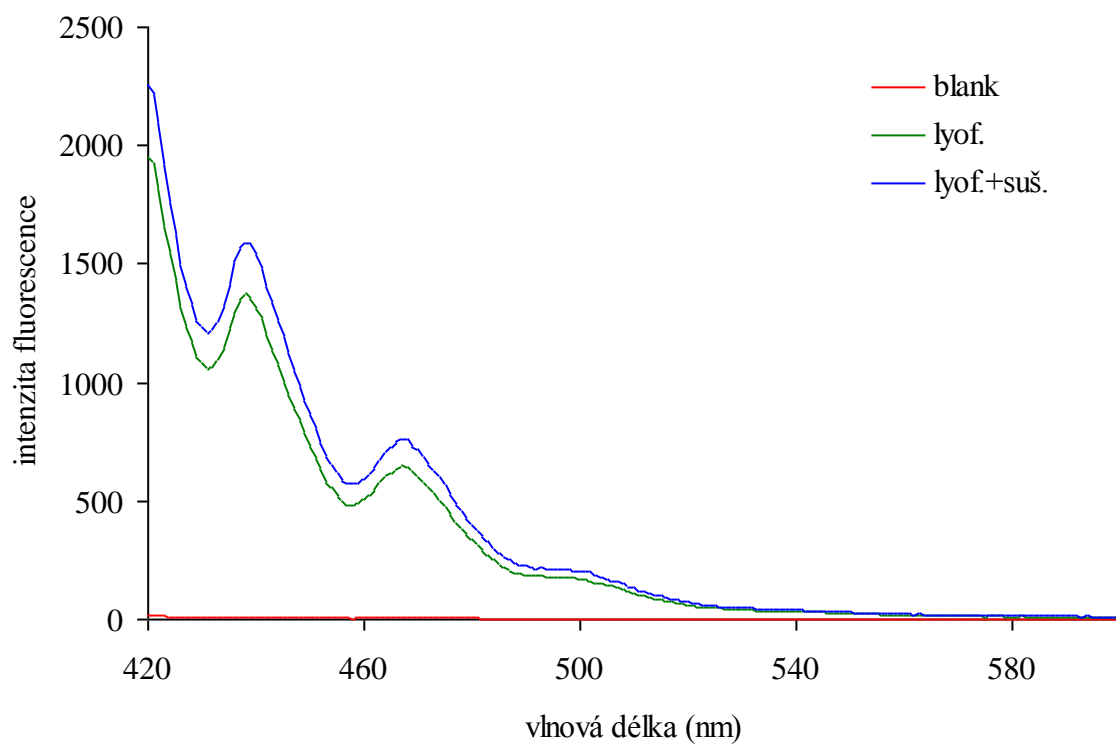
Obr. 23 znázorňuje, emisní sken pyrenu o koncentraci  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a koncentraci hyaluronanu  $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Červená křivka je sken slepého vzorku, který byl připraven smícháním hyaluronanu a sondy ve vodném prostředí. Zelené spektrum patří vzorku upravovanému lyofilizací a modrá křivka odpovídá vzorku, u kterého byl lyofilizační koláč navíc dosušován 30 minut při teplotě  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ . Jak je z grafu zřejmé, intenzita fluorescence slepého vzorku je oproti lyofilizovaným vzorkům vyšší. Důvod může být shodný s experimenty s předsušeným hyaluronanem, tedy nedostatečné kvantitativní převádění mezi jednotlivými kroky přípravy. Hodnota EmPI pro slepý vzorek byla 1,46, což dle předpokladu odpovídá pyrenu fluoreskujícímu z vodného prostředí. Ovšem EmPI pro lyofilizované vzorky klesly a měly hodnotu 1,20. Na počátku křivky obou vzorků je navíc znatelný rozptyl způsobený zákalem vzorků. Přestože byly prováděny korekce, nepodařilo se rozptyl zcela potlačit. Protože výsledná křivka je součtem emise pyrenu a rozptylu, dá se předpokládat, že intenzita prvního píku bude proporcionálně nižší. Je tedy pravděpodobné, že i EmPI bude nižší. Na vloženém grafu s excitačními skeny je rovněž viditelný pokles intenzity vzorků vzhledem k slepému vzorku. ExPI ale klesl z hodnoty 1,74 (pro slepý vzorek) na hodnotu 1,23 (pro vzorky). Poklesy polaritních indexů jsou významné, a je tedy pravděpodobné, že došlo k interakcím mezi fluorescenční sondou a hydrofobní částí řetězce hyaluronanu.

Na Obr. 24 je emisní sken prodanu o koncentraci  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a koncentraci hyaluronanu  $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Trend s intenzitou slepého vzorku a lyofilizovaných vzorků zůstává zachován. Posun vlnové délky emisního maxima je navíc velmi malý. Nelze proto jednoznačně říct, že k interakcím mezi hyaluronanem a sondou došlo. Získaná data odpovídají spíše sondě ve vodném prostředí.

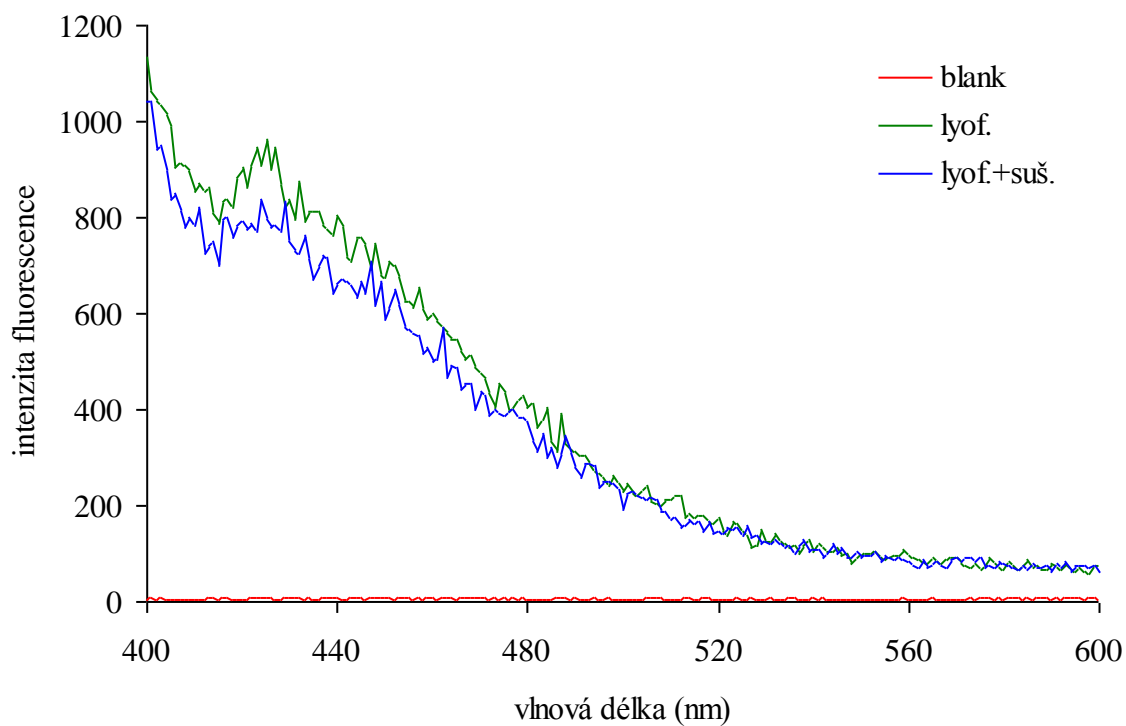
Ve druhé sadě měření byly jako sondy použity pyren, perylen a DPH o koncentraci  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Koncentrace hyaluronanu byla zvýšena na  $3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Lyofilizované vzorky byly porovnávány se vzorky připravenými prostým smícháním fluoroforu s hyaluronanem.



Obr. 25: Emisní a excitační (vložený graf) sken pyrenu o koncentraci sondy  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a koncentraci hyaluronanu  $3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$



Obr. 26: Emisní sken perylenu o koncentraci sondy  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a koncentraci hyaluronanu  $3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$



Obr. 27: Emisní sken DPH o koncentraci sondy  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a koncentraci hyaluronanu  $3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$

Obr. 25 zobrazuje emisní sken pyrenu o koncentraci sondy  $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a koncentraci hyaluronanu  $3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . V porovnání s experimentem, kde byla koncentrace hyaluronanu  $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ , je intenzita fluorescence u všech spekter vyšší. To je možné vysvětlit tím, že při vyšší koncentraci hyaluronanu se ve vzorku vytvoří větší množství domén. Do těchto domén se tedy vejde větší množství hydrofobní látky, která s doménou interaguje a při experimentu emituje. EmPI klesly z hodnoty 1,46 (pro slepý vzorek) na 1,10 (pro vzorky). Opět je zde navíc nutné počítat s rozptylem na počátku obou křivek pro vzorky. Na vloženém grafu jsou znázorněna excitační spektra těchto vzorků. ExPI slepého vzorku je 2,34 a u vzorků klesá na 1,50. Podporu interakcí lyofilizací je tedy u těchto experimentů možné pokládat za účinnou.

Na Obr. 26 je emisní sken perylenu. Perylen je velmi hydrofobní sonda, která je ve vodě nerozpustná. Tomu odpovídají i naměřená data. Křivka pro slepý vzorek jasně znázorňuje, že se sonda vůbec nerozpustila, a proto byl u slepého vzorku naměřen nulový signál. Naproti tomu intenzita emise u vzorků prudce vzrostla, což odpovídá perylenu solubilizovanému v hyaluronových doménách s nižší polaritou.

Obr. 27 znázorňuje emisní spektra vzorků s DPH. Tato sonda má stejně jako perylen silně hydrofobní charakter. Intenzita emise lyofilizovaných vzorků je v porovnání se slepým vzorkem velmi intenzivní. Ze slepého vzorku nebyla fluorescence detekována. Tedy i experimenty s touto sondou jednoznačně dokazují, že po lyofilizaci došlo k interakcím mezi hyaluronanem a hydrofobními látkami.

## ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na výzkum interakcí nativního hyaluronanu a hydrofobních látek. První část experimentů byla založena na ověření práce T. Brown. Protože ve svých člancích neuvedla, jak vzorky připravovala, byly experimenty voleny tak, aby bylo zahrnuto široké spektrum koncentrací sond. Přesto se nepodařilo prokázat interakce mezi fluorofory a hyaluronanem při přípravě roztoků pouhým smícháním těchto látek, resp. jejich roztoků... Předpokládalo se, že případná interakce mezi hyaluronanem a hydrofobními látkami by měla za následek zvýšení intenzity fluorescence, nebo snížení polaritních indexů při experimentech s pyrenem.

Ve druhé části práce byl hydratační obal hyaluronanu narušován pouhým vysoušením za zvýšené teploty. Tyto experimenty také nedokázaly interakci mezi fluorofory a hyaluronanem. Ani intenzita fluorescence, ani polaritní indexy neprokázaly přesun fluorescenčních sond do hydrofobních oblastí na řetězci hyaluronanu. Pravděpodobně je kinetika zpětné rehydratace rychlejší než interakce mezi těmito látkami, nebo vysoušení hyaluronanu bylo nedostatečné.

Třetí řada experimentů využila lyofilizace jako podpůrné metody, která by byla schopna rozrušit hydratační obal hyaluronanu. Tato metoda se z hlediska interakce mezi hyaluronanem a hydrofobními látkami jeví jako účinná. Tento závěr je podpořen snížením polaritních indexů u experimentů s pyrenem, nebo prudkým nárůstem intenzity fluorescence silně hydrofobních sond (perylene, DPH).

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Cai, S., Xie, Y., Bagby, T., Cohen, M., Forrest, M.: Intralymphatic chemotherapy using a hyaluronan-cisplatin conjugate. *Journal of surgical research*, 2008, roč. 147, č. 2, s. 247–252
- [2] Cai, S., Xie, Y., Davies, N., Cohen, M., Forrest, M.: Pharmacokinetics and disposition of a localized lymphatic polymeric hyaluronan conjugate of cisplatin in rodents. *Journal of pharmaceutical sciences*, 2010, roč. 99, č. 6, s. 2664–2671
- [3] Upadhyay, K., Bhatt, A., Mishra, A., Dwarakanath, B., a spol.: The intracellular drug delivery and anti tumor activity of doxorubicin loaded poly(g-benzyl L-glutamate)-b-hyaluronan polymersomes. *Biomaterials*, 2010, roč. 31, č. 10, s. 2882–2892
- [4] Brown, T.: The development of hyaluronan as a drug transporter and excipient for chemotherapeutic drugs. *Current pharmaceutical biotechnology*, 2008, roč. 9, č. 4, s. 253–260
- [5] Cowman, K. M., Matsuoka, S.: Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydrate research*, 2005, roč. 340, č. 5, s. 791–809
- [6] Vandamme, E., De Baets, S., Steinbüchel, A., *Biopolymers – Polysaccharides I*. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2002, 532 s., ISBN 3-527-30226-3
- [7] Weigel, P.: Bacterial hyaluronan synthases. *Glycoforum* [online], 2004, [cit. 23. 2. 2011], <http://www.glycoforum.gr.jp/>
- [8] Elias, H.: *Macromolecules. Volume 2: Industrial polymers and Syntheses*. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2007, 635 s., ISBN 978-3-527-31173-6
- [9] Day, A., Sheenan, J.: Hyaluronan: Polysaccharide chaos to protein organisation. *Current opinion in structural biology*, 2001, roč. 11, č. 5, s. 617–622
- [10] Scott, J.: Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solutions. Some Biological Consequences. *Glycoforum* [online], 1998, [cit. 27.2.2011], <http://www.glycoforum.gr.jp/>
- [11] Hascall, V., Laurent, T.: Hyaluronan: Structure and Physical Properties. *Glycoforum* [online], 1997, [cit. 27. 2. 2011], <http://www.glycoforum.gr.jp/>
- [12] ASARI, A., et al. Medical application of Hyaluronan. *Glycoforum* [online], 2000, [cit. 2009-11-20], <http://www.glycoforum.gr.jp/>
- [13] ASARI, A., a spol. Molecular weight-dependent effects of hyaluronate on the arthritic synovium. *Archive of Histology and Cytology*. 1998, roč. 61, č. 2, s. 125–35.
- [14] *Hyiodine* [online]. [cit. 3.3.2011], <http://www.hyiodine.cz/>
- [15] Girish, K., Kemparaju, K.: The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. *Live Sciences*, 2007, roč. 80, č. 21, s. 1921–1943
- [16] Valeur, B.: *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001, 381 s., ISBN 3-527-29919-X

- [17] Tsinontides, S., Rajniak, P., Pham, D., Hunke, W., Placek, J., Reynolds, S.: Freeze drying-principles and practice for successful scale-up to manufacturing. *International journal of pharmaceuticals*, 2004, roč. 280, č.1–2, s. 1–16
- [18] Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S., Fessi, H.: Freeze-drying on nanoparticles: Formulation, process and storage consideration. *Advanced drug delivery reviews*, 2006, roč. 58, č. 15, s. 1688–1713
- [19] Ni, N., Tesconi, M., Tabibi, E., Gupta, S., Yalkowsky, S.: Use of pure t-butanol as a solvent for freeze-drying: a case study. *International journal of pharmaceuticals*, 2001, roč. 266, č. 1–2, s. 39–46
- [20] Wittaya-Areekul, S., Nail, S.: Freeze-drying of tert-butyl alcohol/water cosolvent systems: effects of formulation and process variables on residual solvents. *Journal of pharmaceutical sciences*, 1998, roč. 87, č. 4, s. 491–495
- [21] Kasraian, K., DeLuca, P.: Thermal analysis of the tertiary butyl alcohol-water system and its implications on freeze-drying. *Pharmaceutical research*, 1995, roč. 12, č. 4, s. 484–490
- [22] Lakowicz, J.: *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd edition. Springer, 2006, 954 s. ISBN 0-387-31278-1

# SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

## 7.1 Seznam zkratek

Zkratka	Význam
ECM	extracelulární matrix
TBA	terc-butanol
DPH	difenylhexatrien
EmPI	emisní polaritní index
ExPI	excitační polaritní index

## 7.2 Seznam symbolů

Symbol	Význam
$M_w$	molární hmotnost
$S_0^0$	základní stav molekuly se základní vibrační hladinou
$S_0^X$	základní stav molekuly s vyšší vibrační hladinou
$S_1^0$	první excitovaný singletový stav molekuly se základní vibrační hladinou
$S_1^X$	první excitovaný singletový stav molekuly s vyšší vibrační hladinou
$T_1^0$	první excitovaný tripletový stav molekuly se základní vibrační hladinou
$T_1^X$	první excitovaný tripletový stav molekuly s vyšší vibrační hladinou
$F_{kor}$	korigovaná intenzita fluorescence
$F_{poz}$	naměřená intenzita fluorescence
$OD_\lambda$	optická hustota
$OD_{ex}$	optická hustota při excitační vlnové délce
$OD_{em}$	optická hustota při emisní vlnové délce
$A$	absorbance
$A_{ex}$	absorbance při excitační vlnové délce
$A_{em}$	absorbance při emisní vlnové délce
$l$	délka optické dráhy