



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

PŘÍPRAVA A STUDIUM NOSIČOVÝCH SYSTÉMU LÉČIV VYUŽÍVAJÍCÍCH KOVALENTNÍCH VAZEB MEZI LÉČIVEM A BIOPOLYMEREM

PREPARATION AND STUDY OF DRUG CARRIER SYSTEMS USING COVALENT BONDS BETWEEN DRUG
AND BIOPOLYMER

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Petr Charvát

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.

BRNO 2025

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK2061/2024 Akademický rok: 2024/25
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Petr Charvát**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Příprava a studium nosičových systému léčiv využívajících kovalentních vazeb mezi léčivem a biopolymerem

Zadání bakalářské práce:

1. cílem této BP je připravit nosiče léčiv na bázi vhodně zvoleného polysacharidu a silně hydrofobního léčiva;
2. bude použit hyaluronan sodný, a to ve dvou molekulových hmotnostech, a jako hydrofobní sloučenina byl vybrán kurkumin;
3. bude připravena bohatá literární rešerše na téma využití hyaluronanu, jako vhodného nosičového média v oblastech medicíny a farmakologie;
4. dále se student bude zabývat možnostmi vazeb či interakcí mezi potencionálními léčivy a nosným biopolymerem;
5. student se bude zabývat syntézou nosičových systémů s využitím kovalentních vazeb mezi hyaluronanem a kurkuminem;
6. fyzikálně–chemické vlastnosti a úspěšnost vytvoření kovalentních vazeb budou charakterizovány pomocí termických a spektrometrických metod;
7. bude využita i programově řízená lyofilizace.

Termín odevzdání bakalářské práce: 26.5.2025:

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

Petr Charvát
student

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

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 3.2.2025

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce byla zaměřena na přípravu nosičového systému využívajícího kovalentní vazby mezi hyaluronanem a kurkuminem. Nejprve byl komerčně dostupný hyaluronan sodný transformován na kyselou formu, kyselinu hyaluronovou. Úspěšná protonace byla potvrzena infračervenou spektrometrií s Fourierovou transformací. Termogravimetrická analýza ukázala rozdílné hygroskopické vlastnosti mezi nativním hyaluronanem sodným a naprotonovanou kyselinou hyaluronovou. Syntéza kovalentní vazby mezi hyaluronanem a kurkuminem byla provedena v přítomnosti katalyzátorů DCC a HOBt ve směsi vody a dimethylsulfoxidu 1:1. K získání produktu v suché formě byla využita programově řízená lyofilizace. Nažloutlý produkt podobající se bavlně byl charakterizován infračervenou spektrometrií s Fourierovou transformací, kterou, vlivem širokého absorpčního pásu jiných skupin, nebylo možné vazbu prokázat. Esterovou vazbu prokázala dekonvoluce absorpčního pásu o vlnočtu 1731 cm^{-1} . Výsledný produkt byl dobře rozpustný ve vodě a absorboval záření při stejné vlnové délce jako nativní kurkumin.

ABSTRACT

This bachelor's thesis focused on the preparation of a carrier system utilizing covalent bonds between hyaluronan and curcumin. First, commercially available sodium hyaluronate was transformed into its acidic form, hyaluronic acid. Successful protonation was confirmed by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR). Thermogravimetric analysis revealed different hygroscopic properties between the native sodium hyaluronate and the protonated hyaluronic acid. The synthesis of the covalent bond between hyaluronan and curcumin was carried out in the presence of DCC and HOBt catalysts in a 1:1 mixture of water and dimethyl sulfoxide. Programmable freeze-drying was used to obtain the product in dry form. The yellowish, cotton-like product was characterized using FTIR spectroscopy. Due to overlapping absorption bands of other functional groups, the presence of the covalent bond could not be directly confirmed. However, deconvolution of the absorption band at 1731 cm^{-1} demonstrated the formation of an ester bond. The final product was well soluble in water and absorbed radiation at the same wavelength as native curcumin.

KLÍČOVÁ SLOVA

nosičové systémy léčiv, hyaluronan, kurkumin, kovalentní vazba

KEYWORDS

drug carrier systems, hyaluronan, curcumin, covalent bond

CHARVÁT, Petr. Příprava a studium nosičových systému léčiv využívajících kovalentních vazeb mezi léčivem a biopolymerem. Online, bakalářská práce. Vojtěch ENEV (vedoucí práce). Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2025. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/162093>.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

Petr Charvát

Na tomto místě děkuji panu doc. Ing. Vojtěchu Enevovi, Ph.D. za profesionální vedení mé bakalářské práce, vstřícnost a nekonečnou trpělivost. Dále děkuji Ing. Marku Řihákovi za cenné rady a přátelský přístup. Obrovské díky patří také mé rodině, přítelkyni a kamarádům, bez kterých by studium bylo jen těžko proveditelné.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Hyaluronan	9
2.1.1	Chemická struktura hyaluroanu.....	9
2.1.2	Biosyntéza a degradace hyaluronanu	10
2.1.3	Výroba hyaluronanu.....	11
2.2	Hyaluronan v medicíně.....	13
2.2.1	Hyaluronan v léčbě onkologických onemocnění.....	13
2.2.2	Hyaluronan ve tkáňovém inženýrství.....	14
2.2.3	Hyaluronan v estetické medicíně	14
2.3	Slabé vazebné interakce.....	16
2.3.1	Vodíkové vazby	16
2.3.2	Van der Waalsovy interakce	17
2.3.3	Hydrofobní interakce.....	17
2.4	Kovalentní vazby.....	18
2.5	Hydratace.....	18
2.6	Receptory.....	19
2.6.1	Iontové kanály	19
2.6.2	Receptory pro hyaluronan	20
2.7	Nosičové systémy léčiv	20
2.7.1	Polymerní nanočástice.....	21
2.7.2	Lipozomy	22
2.7.3	Micely	22
2.7.4	Dendrimery	23
2.7.5	Hydrogely.....	24
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	25
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
4.1	Úvod do experimentální části	27
4.2	Použité chemikálie.....	27
4.3	Použité laboratorní přístroje	27
4.4	Použité programy.....	27
4.5	Zjištění rozpustnosti hyaluronanu a kurkuminu	28
4.5.1	Vyhodnocení rozpustnosti hyaluronanu a kurkuminu	28
4.6	Termogravimetrická analýza.....	28
4.7	Syntéza kovalentní vazby mezi hyaluronanem a kurkuminem.....	28
4.8	Lyofilizace	29
4.9	FTIR-ATR spektrometrie.....	29
4.10	UV/Vis spektrometrie	29
4.11	Excitačně-emisní spektra	30
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	31
5.1	Termogravimetrická analýza.....	31
5.2	Lyofilizace	32
5.3	Srovnání rozpustnosti produktu a nativního kurkuminu ve vodě	34

5.4	FTIR-ATR spektrometrie.....	35
5.4.1	Dekonvoluce píků kyseliny hyaluronové a konjugátu.....	37
5.5	UV/Vis spektrometrie	39
5.6	Excitačně-emisní spektra.....	40
6	ZÁVĚR.....	42
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	43

1 ÚVOD

V současné době roste zájem o přírodní látky, které mohou přispět k prevenci a léčbě různých zdravotních onemocnění. Jako ideální látky na poli medicíny a farmacie se jeví takové, které mají na lidský organismus pozitivní účinky, nespouští imunitní odpověď a zároveň nejsou ihned metabolizovány a vyloučeny z těla. Nejvhodnějšími látkami, které by splňovaly taková kritéria se ukázaly být látky tělu vlastní. Jedna z takových látek je hyaluronan, který je hlavní složkou mezibuněčné hmoty, součástí některých tkání a také se nachází mimo jiné v očním sklivci a synoviální tekutině. Již použití samotného hyaluronanu je klinicky možné a využíváno. Pro plné využití potenciálu hyaluronanu je však dobrým řešením kombinace s jinou léčivou látkou, pro kterou bude hyaluronan fungovat jako nosič a podpůrná látka. Léčivá látka může být přírodního původu nebo syntetická. Syntetická léčiva mají přesně definované složení, rychlý účinek a snadnou masovou výrobu. Jsou však zátěží pro játra a ledviny, mohou se u nich projevit vedlejší účinky a v případě antibiotik může vzniknout rezistence. Přírodní léčiva jsou, v porovnání se syntetickými, šetrnější k organismu, mají ryze přírodní složení a pojí se s nimi také tradice. Mohou však mít proměnlivé složení a zpravidla mají slabší a pomalejší účinek. Jedním ze zástupců přírodních léčiv je kurkumin, přírodní polyfenol, který je získáván z oddenku rostliny *Curcuma longa*, také známé jako indický šafrán. Kurkumin se již po staletí používá v potravinářství jako koření či barvivo a také v tradičním lékařství jako stomachikum nebo při zevním použití jako zásyp na kožní poranění. V nedávné minulosti byly zkoumány především jeho protizánětlivé, antioxidační, antibakteriální a protirakovinné účinky, které byly zjištěny hlavně v laboratorních podmínkách. Největší nevýhodou kurkuminu je jeho velmi nízká biologická dostupnost, která je nejvíce způsobena nepolárním charakterem molekuly, a tedy špatnou rozpustností ve vodě. Do krevního oběhu se tedy dostane jen velmi malá část. I malá, vstřebaná část je ve střevech či játrech velmi rychle metabolizována na neaktivní metabolity. Pro lepší využití potenciálu kurkuminu jsou využívány nosičové systémy ve formě liposomů, micel či nanočástic, které mají za cíl zlepšit právě rozpustnost a biologickou dostupnost. Tato bakalářská práce je zaměřena na problematiku využití kurkuminu jako přírodního léčiva a hyaluronanu jako jeho nosiče, přičemž je nejvíce pozornosti věnováno tvorbě kovalentní vazby mezi těmito látkami. Úspěšnost tvorby vazby je následně zkoumána infračervenou spektrometrií s Fourierovou transformací na ATR krystalu. Chování produktu ve vodném prostředí je pozorováno pomocí UV-Vis spektrometrie.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Hyaluronan

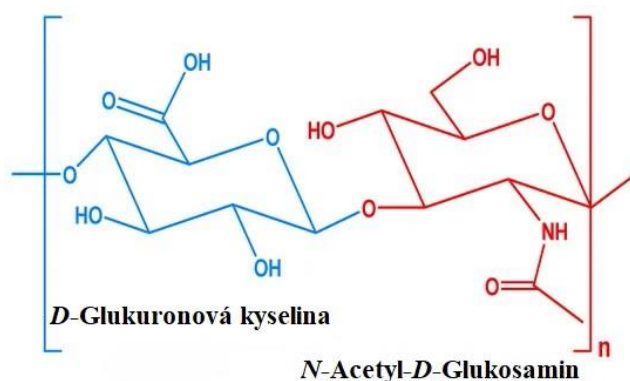
Hyaluronan je nesulfatovaný glykosaminoglykan, který je přítomen v různých tkáních a orgánech lidského těla. Má širokou škálu biologických aktivit, ovlivněných jeho molární hmotností. Hyaluronan s vysokou molární hmotností má protizánětlivé, imunosupresivní a antiangiogenní účinky, zatímco hyaluronan s nízkou molární hmotností disponuje zpravidla opačnými účinky. Pro zlepšení stability a zefektivnění využití byl hyaluronan podroben už mnoha chemickým modifikacím. V dnešní době má tedy hojně využití v oftalmologii, otorinolaryngologii, hojení ran, kosmetice a distribuci léků v těle [1]

Hyaluronan byl objeven v roce 1934, když Karl Meyer, z Oftalmologické kliniky Vysoké školy lékařů a chirurgů v Kolumbii, zkoumal lysozym přítomný v slzách a chtěl identifikovat jeho fyziologický substrát. Vyšetření sklivce oka jako potenciálního zdroje substrátu rychle vedlo k objevení hyaluronanu a článek byl publikován v časopise *Journal of Biological Chemistry* [2].

Meyer a jeho asistent John Palmer izolovali nový polysacharid s vysokou molekulární hmotností a oznámili, že je složen z kyseliny uronové, aminosacharidu a možná i pentózy (to bylo vyvráceno). Pro pohodlí navrhli název kyselina hyaluronová (hyaloid + kyselina uronová). Trvalo téměř 25 let než byla stanovena struktura opakujícího se disacharidu, který je základní jednotkou hyaluronanu. Disacharid má systematický název (2-acetamido-2-deoxy-D-gluko)-D-glukuronoglykan [2].

2.1.1 Chemická struktura hyaluroanu

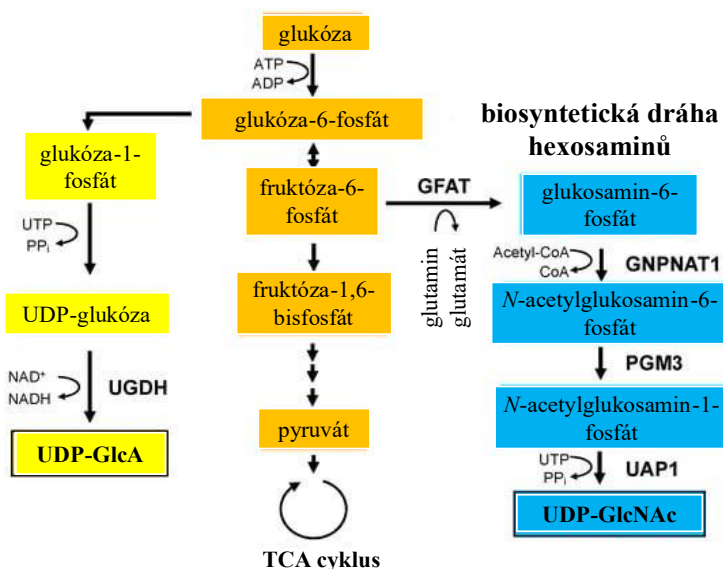
Hyaluronan, také kyselina hyaluronová, je lineární, nerozvětvený polymer disacharidu, skládajícího se z *D*-glukuronové kyseliny a *N*-acetyl-*D*-glukosaminu. Tyto dva sacharidy jsou spojeny střídajícími se $\beta(1-3)$ a $\beta(1-4)$ glykosidickými vazbami. Oproti ostatním molekulám ze skupiny glykosaminoglykanů je hyaluronan unikátní molekula z důvodu její relativně větší molekulové hmotnosti. Stabilizaci řetězce provádí intermolekulární a intramolekulární vodíkové můstky, vznikající mezi skupinami dvou jednotek v ekvatoriální rovině. Vodíkové můstky také způsobují značnou viskoelasticitu koncentrovaných vodných roztoků. Hyaluronan je syntetizován jako lineární polymer bez proteinového jádra a jeho molekulová hmotnost se může pohybovat od 2×10^5 do 10^7 kDa, což z něj dělá jednu z největších molekul v tělech teplokrevných živočichů. Od většiny ostatních glykosaminoglykanů se liší také tím, že molekula není sulfatovaná. To způsobuje její nepříliš záporné nabití a zapříčiňuje větší hydrofilitu a menší afinitu k proteinům. Hyaluronan lze nalézt v různých tkáních a tělesných tekutinách obratlovců, včetně lidí. Je hlavní složkou extracelulárního matrixu a také je přítomen v synoviální tekutině, sklivci a pupeční šňůře [3],[4].



Obrázek 1: Struktura hyaluronanu, přeloženo [3]

2.1.2 Biosyntéza a degradace hyaluronanu

Biosyntéza hyaluronanu se značně liší od ostatních glykosaminoglykanů. U obratlovců byly identifikovány tři izomery hyaluronansyntázy (HAS), jejichž aminokyselinové sekvence jsou konzervované napříč druhy. Analýza primární struktury odhalila, že všechny enzymy HAS obsahují mnohonásobné shluky hydrofobních aminokyselin na amino i karboxylovém konci, což ukazuje, že jsou vloženy do lipidové dvojvrstvy. Centrální část molekuly enzymu HAS se skládá z hydrofilních aminokyselin a obsahuje katalytická místa nezbytná pro přenos substrátů UDP-GlcNAc a UDP-GlcA, ze kterých se hyaluronan skládá. Každá izoforma HAS se liší z hlediska aktivity, rychlosti prodloužení produktu a stability. Délka syntetizovaného hyaluronanu *in vivo* a *in vitro* se každým použitým enzymem také liší. Předpokládaným vysvětlením pro existenci tří izoform HAS je to, že více enzymů majících různé vlastnosti se vzájemně funkčně doplňují. Biosyntéza hyaluronanu je regulována jednak v několika fázích regulací exprese tří izoform HAS a jednak buněčnou dostupností UDP-GlcNAc a UDP-GlcA, donorů nukleotidových cukrů. Například 7-hydroxy-4-methylkumarin inhibuje syntézu hyaluronanu vyčerpáním cytoplazmatického UDP-GlcA. Podobně nedostatek UDP-GlcNAc působením manózy snižuje syntézu hyaluronanu v epidermálních keratinocytech. Klíčovým metabolitem k syntéze všech glykosaminoglykanů je UDP-GlcA, který je syntetizován z glukózy-6-fosfátu přes syntézu glukózy-1-fosfátu a UDP-glukózy za pomoci UDP-glukóza dehydrogenázy. Metabolit UDP-GlcNAc je syntetizován pomocí syntetické dráhy glukosaminoglykanů. Glutamin-fruktóza-6-fosfát transamináza použije glutamin jako donor aminu k vytvoření glukosamin-6-fosfátu z fruktózy-6-fosfátu a poté je acetyl-CoA přenesen na vzniklý glukosamin-6-fosfát za pomoci glukosamin-fosfát N-acyltransferázy 1. Vzniklý N-acetylglukosamin-6-fosfát je převeden na N-acetylglukosamin-1-fosfát fosfoglukomutázou 3. V posledním kroku je uridin-5'-trifosfát (UTP) navázán na N-acetylglukosamin-1-fosfát pomocí UDP-GlcNAc pyrofosforylázy za vzniku finálního produktu UDP-GlcNAc. Syntéza hyaluronanu spotřebovává velké množství donorových substrátů, čímž spojuje syntézu hyaluronanu s metabolismem glukózy [4].



Obrázek 2: Biosyntéza prekurzorů hyaluronanu UDP-GlcA a UDP-GlcNAc, přeloženo [4]

Hyaluronan je běžně depolymerizován specifickou endoglykosidázou, pojmenovanou hyaluronidáza, nebo také nespecificky degradován oxidací způsobenou reaktivními formami kyslíku. Savčí hyaluronidázy hydrolyzují β -1,4-glykosidickou vazbu mezi jednotkami GlcA a GlcNAc hyaluronanu. U člověka bylo identifikováno několik enzymů spadajících do hyaluronidáz, u některých však bylo zjištěno, že se na degradaci hyaluronanu vůbec nepodílejí. Na depolymerizaci se tak podílejí především hyaluronidázy HYAL1 a HYAL2. V nedávné době také byly mezi savci objeveny dvě nové molekuly zapojené do mimobuněčné degradace hyaluronanu. První, protein indukující migraci buněk a vázající hyaluronan (CEMIP), je protein, který nevykazuje podobnost s proteiny hyaluronidáz a za pomoci váčku z klathrinu je schopen intracelulárně depolymerizovat hyaluronan. Druhý, transmembránový protein druhého typu (TMEM 2), je protein, který dokáže rozštěpit vysokomolekulární hyaluronan extracelulárně na fragmenty o hmotnosti zhruba 5000 Da v neutrálním pH způsobem závislým na iontech Ca^{2+} . Fragmenty hyaluronanu, zbylé po depolymerizaci HYAL2 nebo CEMIP, jsou následně dopraveny do lysozomů a rozštěpeny na menší oligosacharidy hyaluronidázou HYAL1 a dále na monosacharidy exoglykosidázami. V případě depolymerizace pomocí CEMIP mohou být fragmenty hyaluronanu v klathrinových váčkách i extracelulárně uvolněny bez intracytoplazmatické akumulace [4].

2.1.3 Výroba hyaluronanu

V poslední době začíná být mezi lidmi o hyaluronan větší a větší zájem. Kvůli jeho protizánětlivým, léčebným a imunosupresivním účinkům a jedinečným biologickým a fyzikálně-chemickým vlastnostem jeho popularita v různých oborech roste téměř exponenciálně. Proto je velký zájem o optimalizaci výrobních procesů tak aby produkty naplňovaly vysoké výrobní standardy, měly vysoké výtěžky, a přitom byly finančně dostupné. Zdroj i purifikační proces při výrobě hyaluronanu se promítají na čistotě, molekulové hmotnosti, výtěžku i ceně. Optimalizace výroby proto představuje jednu z největších výzev v oblasti aplikovaného výzkumu hyaluronanu [5].

První průmyslová výroba hyaluronanu spočívala v jeho extrakci ze živočišných zdrojů, jako byli hovězí sklivec a kohoutí hřebeny. Navzdory toho že se postupem let technologie vyvíjela, byl zisk hyaluronanu ze živočišných zdrojů bráněn technickými limitacemi, které vedly k produkci vysoce polydispergovaného hyaluronanu o molekulární hmotnosti větší než 10^6 Da a malým výtěžkem. To bylo způsobeno vnitřní polydisperzitou hyaluronanu, jeho nízkou koncentrací ve tkáních, jeho nekontrolovatelnou degradací způsobenou endogenní hyaluronidázou a drsnými izolačními podmínkami. Dalšími nevýhodami hyaluronanu extrahovaného z těl zvířat bylo riziko biologické kontaminace proteiny, nukleovými kyselinami nebo viry a vysoká cena purifikace. Proto byly vyvinuty alternativní metody k průmyslovému získávání hyaluronanu [5].

V dnešní době je komerční hyaluronan vyráběn především biotechnologicky-mikrobiální fermentací. Hyaluronan pocházející z mikroorganismů je biokompatibilní i s lidským tělem, jelikož struktura hyaluronanu je mezi různými živočišnými druhy velmi podobná. Prvními použitými bakteriemi k výrobě hyaluronanu byly kmeny streptokoků A a C. Dnes je také hodně komerčních produktů získáváno pomocí bakterie *Streptococcus equi*. Ideální podmínky bakteriálních kultur pro získávání hyaluronanu o molekulové hmotnosti $3,5\text{--}3,9 \times 10^6$ Da byly stanoveny na 37°C , pH 7 a přítomnost laktózy nebo sacharózy. Výtěžek byl optimalizován na $6\text{--}7\text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, což je vyšší technický limit z důvodu omezení přenosu hmoty způsobené vysokou viskozitou fermentačního bujónu. Protože rody streptokoků zahrnují několik lidských patogenů, je nezbytná přesná a nákladná purifikace produkovaného hyaluronanu. V zájmu snižování nákladů byly a jsou zkoumány jiné mikroorganismy, vhodné pro jeho produkci. Ideální mikroorganismus pro syntézu hyaluronanu by měl být obecně považován za bezpečný, neměl by vylučovat žádné toxiny a měl by být schopný produkovat hyaluronan o molekulové hmotnosti alespoň 10^6 Da, jelikož materiálová a obchodní hodnota stoupá s jeho čistotou a molekulové hmotností. Tyto faktory také ovlivňují reologické a biologické vlastnosti a určují vhodné aplikace. Vzhledem k tomu že přírodní mikroorganismy schopné produkce hyaluronanu jsou zvěšiny patogenní, metabolické inženýrství představuje v současnosti zajímavou příležitost k získání hyaluronanu z nepatogenních organismů GRAS (obecně považovaných za bezpečné). Hyaluronan bez endotoxinů již byl syntetizován rekombinantními hostiteli jako *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* a *Corynebacterium glutamicum*. Totéž se povedlo i s eukaryotickými organismy mezi zástupci kvasínek nebo kultur rostlinných buněk. Nicméně, doposud nebyl nalezen jediný heterologní bakteriální hostitel, který by produkoval tolik hyaluronanu jako hostitel přírodní [5].

Nakonec byly pro získání hyaluronanu o předem dané molekulové hmotnosti a úzké polydisperzitě použity i jiné metody. Jednou z nich je chromoenzymatická metoda, která byla použita k produkci monodisperzních oligosacharidů hyaluronanu. Metoda byla úspěšně komercializována a produkty jsou charakteristické nízkým indexem polydisperzity. Kromě toho další studie ukázaly, že je možné připravit monodisperzní fragmenty hyaluronanu kontrolovanou degradací hyaluronanu s vysokou molekulovou hmotností pomocí různých metod, zahrnujících kyselou, zásaditou, ultrasonickou a termickou degradaci [5].

2.2 Hyaluronan v medicíně

Od svého objevení hyaluronan stále zůstává jednou z neanalyzovanějších, nejstudovanějších a funkčně modifikovaných látek. Je tomu tak díky jeho unikátním vlastnostem jako hydrofilita, viskoelasticita, biokompatibilita a rozložitelnost. Deriváty hyaluronanu jsou v současné době používány v léčbě artritidy, oftalmologii, tkáňovém inženýrství a hojení ran. V neposlední řadě je také testován pro použití v efektivnějších systémech pro podání léků v pokročilých formách jako hydrogely, nanočástice a mnoho dalšího. Navzdory nepřetržitým posunům ve vědě dokáže molekula vždy překvapat dalšími potenciálními využitími [6].

2.2.1 Hyaluronan v léčbě onkologických onemocnění

Proléčiva jsou vyvíjena tak, aby byla aktivována časově, prostorově nebo způsobem řízení dávky, což umožňuje přizpůsobitelnost a sníženou nespecifickou toxicitu pro normální buňky. Dlouhodobě známé výhody proléčiv jsou dobrá biologická dostupnost, dlouhá setrvání v těle, řízené uvolňování a schopnost retence léčiva. Kromě toho schopnost zapouzdření léčiva může zefektivnit terapeutický účinek a zmírnit vedlejší účinky spojené s pomocnými látkami [7].

Bylo zjištěno, že hyaluronan je nadměrně produkován v mikroprostředí nádorů. Jako primární receptor pro hyaluronan byl identifikován antigen CD44, buněčný povrchový glykoprotein. Interakce mezi hyaluronanem a CD44 se podílí na různých biologických procesech jako morfogenezi, hojení ran, zánětu a rakovině. Konkrétně, CD44 je přemnožen na povrchu buňky při různých primárních nádorech jako je rakovina prsu, slinivky, vaječnicků, plic a mozku. Na vývoj funkčních nosičových systémů, zejména na bázi hyaluronanu, pro zacílení na CD44, bylo vynaloženo velké úsilí a byla navržena různá nanoproléčiva, fungující na odlišných principech [8].

Pokročilá nanoproléčiva jsou navržena pomocí chemické modifikace léčiv s malou molekulou tak, aby splňovala zlepšenou biologickou dostupnost spojenou s kontrolou aktivace a uvolňování léčiva v cílových místech za specifických podmínek stimulu. Při navrhování nanoproléčiv pro léčbu nádorů se využívají různé stimuly, které lze rozdělit na vnitřní a vnější. Mezi vnitřní stimuly, vycházející z vlastností nádorového mikroprostředí, patří například nízké pH, zvýšená hladina glutathionu (antioxidantu), přítomnost reaktivních forem kyslíku, nadměrná exprese enzymů a hypoxie (nedostatek kyslíku). Naopak vnější stimuly jsou aplikovány zvenčí a zahrnují například světlo, ultrazvuk nebo magnetické pole. [8].

Kyselé mikroprostředí nádorových tkání (pH 6,5-6,8), endozomů nádorových buněk (pH 5-6,5) a lysozomů (pH 4,5-5), představuje vysoce významný vnitřní stimul nádoru díky nadměrné produkci kyseliny mléčné během rychlé glykolýzy. Důležité je, že nanoproléčiva většinou vstupují do nádorových buněk endocytózou a procházejí intracelulárními lysozomy a endozomy. Proto bylo vyvinuto velké množství nanoproléčiv, štěpitelných při nízkém pH, které fungují právě díky kyselému mikroprostředí nádorů. Protože nanoproléčiva na bázi hyaluronanu mají dobrou schopnost cílení na nádor, jejich modifikace s linkery citlivými na nízké pH mohou usnadnit, aby taková nanoproléčiva dorazila specificky do míst nádoru a uvolnila funkční léky pro léčbu [8].

Prostřednictvím regulace různých transkripčních faktorů vykazuje silné protinádorové účinky kurkumin. Takto působí hlavně proti rakovině děložního čípku, rakovině prsu, rakovině slinivky břišní a kolorektálnímu karcinomu. Navíc může kurkumin regulovat různé signální dráhy a molekulární cíle za nízkou cenu z širokých zdrojů a nízkými vedlejšími účinky. Nicméně se kurkumin potýká s omezeními, která limitují jeho klinické použití v rámci terapie rakoviny. Těmito omezeními jsou rychlé metabolizování, nízká rozpustnost ve vodě, špatná biologická dostupnost a nestabilita [9].

2.2.2 Hyaluronan ve tkáňovém inženýrství

Hyaluronan nachází také široké využití při výrobě matric pro ošetření chrupavek. Jakožto přirozená složka extracelulárního matrixu interaguje s povrchovými receptory na chondrocytech, buňkách chrupavky, které pozitivně ovlivňují mnoho buněčných drah, včetně těch, které se podílejí na proliferaci chondrocytů, sekreci extracelulárního matrixu a regulaci fenotypu. Nicméně je známo, že hyaluronan musí být chemicky modifikován (derivatizován nebo zesíťován) pro použití ve tkáňovém inženýrství. Žádoucí jsou však primárně nízké stupně modifikací hyaluronanu, protože minimálně modifikované hyaluronové scaffoldy jsou velmi podobné strukturám v přirozeném buněčném prostředí, a proto pravděpodobně vyvolají vhodnou biologickou odpověď. Dosud navržené scaffoldy na bázi hyaluronanu pro ošetření chrupavek zahrnují komerčně dostupné benzylestery hyaluronanu nebo methakrylátové a thiolované deriváty, které podléhají fotopolymerizaci a oxidaci, aby vytvořili síť. Několik studií upřednostňovalo vysoký stupeň substituce karboxylátových skupin hyluronanu v rozmezí 25–100 %. Přestože bylo dosaženo zajímavých výsledků, stále je zapotřebí zlepšení, aby byla zajištěna co nejlepší biokompatibilita [10].

2.2.3 Hyaluronan v estetické medicíně

Nástup gelových derivátů zesíťovaného hyaluronanu znamenal novou éru na poli biomedicíny a přinesl nové terapeutické aplikace v oblasti chirurgie, regenerativní medicíny a farmakologie. V posledním desetiletí nejvyšší růst zaznamenalo využití hydrokoloidních dermálních výplní na bázi hyaluronanu v estetické medicíně. To v roce 2022 dosáhlo nejvyššího podílu na celosvětovém kosmetickém trhu [11].

Během 20. století pokročila evoluce kosmetických přípravků přes parafín prostřednictvím dalších suboptimálních aloplastických sloučenin, zejména tekutého silikonu v 50. letech, až po ustálení na homologních, biokompatibilních materiálech jako je kolagen (80. léta) a hyaluronan (21. století). Tyto látky, i přes omezenou životnost, nabízely bezkonkurenční bezpečnostní profil a nízký výskyt nežádoucích reakcí nebo komplikací. Se schválením první kosmetické dermální výplně na bázi hyaluronanu Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv v roce 2002 a následným rozkvětem estetických injekčních přípravků upevnil hyaluronan svou pozici předního kosmetického materiálu nového tisíciletí [12].

Během dvou desetiletí od zavedení hyaluronových injekčních gelů zaznamenaly dermální výplně prudký nárůst popularity. Prodej mezi lety 2005 a 2020 vzrostl o 700 %. Jen ve Spojených státech se ročně provádí asi 3,4 milionu dermálních výplní, přičemž hyaluronové výplně tvoří téměř 80 % produktů. Zvýšená poptávka po kosmetických injekčních látkách je

důsledkem rostoucí tolerance postupů plastické chirurgie napříč všemi věkovými skupinami, zvýšené dostupnosti a uvádění na trh i snížených cen produktů, což vytváří stále více konkurenční trh [11].

Moderní dermální výplně se skládají z molekul vysokomolekulárního hyaluronanu, zesíťovaných 1,4-butandiol diglycidyletherem, které jsou suspendovány v různém množství nosného roztoku nezesíťovaného hyaluronanu. Přestože se vlastnosti každého gelu liší podle použitých síťovacích technologií daného výrobce, všechny vykazují stupeň modifikace od 1 do 10 %, molekulovou hmotnost 100–600 kDa a koncentraci hyaluronanu v nosném roztoku v rozmezí od 15 do 24 mg·cm⁻³. Relativně vysoký obsah zesíťovaného hyaluronanu s dlouhým řetězcem udává produktům viskoelastické pevné chování, což jim umožňuje odolávat smykové a tlakové deformaci *in vivo*. Mírné úpravy stupně modifikace a koncentrace nosného roztoku umožňují výrobcům tvořit výplně s různými moduly pružnosti ve smyku a různými dynamickými pevnostmi a životnostmi. To zvyšuje vhodnost produktu při povrchových nebo hlubokých injekcích [13].

Na základě způsobu zesíťování se hyaluronové dermální výplně klasifikují jako monofázové nebo dvoufázové. Monofázové výplně obsahují směs vysokomolekulárního a nízkomolekulárního hyaluronanu, zatímco bifázové jsou směsí zesíťovaných částic hyaluronanu o selektivní velikosti a nezesíťované hyaluronové matrice. Strukturálně nezesíťovaný hyaluronan dvoufázového plniva slouží jako nosič, který umožňuje snazší aplikaci výplně do měkké tkáně. U jednofázových výplní vytváří homogenní gelová hmota soudržnou síť, která může zajistit delší trvanlivost a menší migraci po injekci [14].

Viskoelastické vlastnosti hyaluronových hydrogelů, i přes jejich prospěšnost při vyplňování vrásek, představují jedinečné výzvy při intravaskulárním zavedení. Několik reologických vlastností hydrogelů potenciálně ovlivňuje jejich chování v cévách. Konkrétně schopnost gelu absorbovat vodu, známá jako faktor bobtnání, může přímo ovlivnit objem gelových částic, protože se částice hydratují intraluminálně. Současná plniva vykazují faktory bobtnání v rozmezí 100 a 700 % objemu, což zvyšuje jejich okluzivní potenciál. Navíc soudržnost nebo schopnost gelu odolávat fragmentaci a dispergaci může mít význam v intravaskulárním chování dermálních výplní a jejich reakci na reverzní činidla. Monofázové gely jsou díky své nečásticové povaze kohezivnější a méně náchylné k rozpadu v pufrovaných roztocích nebo při vystavení hyaluronidáze, než gely dvoufázové. Soudržnost produktu může ovlivnit jeho tendenci fragmentovat se, mikroembolizovat a odolávat rychlé degradaci pomocí reverzních činidel. Modul pružnosti ve smyku, který charakterizuje tuhost gelu a schopnost odolávat smykové deformaci, může ovlivnit tendenci produktu uzavírat nebo stlačovat cévu. Výplně s vysokým modulem pružnosti ve smyku mohou bránit průtoku krve účinněji než měkčí gely s nízkým modulem. Tužší gely navíc mohou mít větší schopnost stlačovat cévy externě, a tak dále snižovat průtok krve. Tyto reologické vlastnosti však mohou být snadno narušeny extruzí přes zařízení s malým průměrem, jako je jehla. Vlastnosti výplní intravaskulárně se tedy mohou lišit od vlastností výplně ve stříkačce [15],[16],[17].

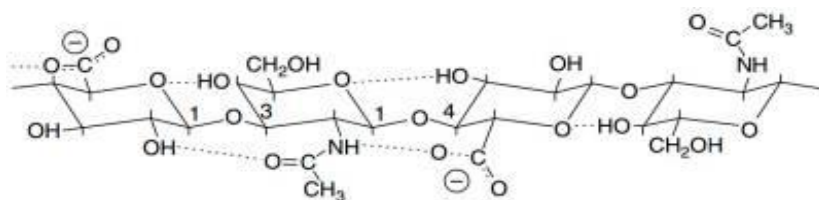
2.3 Slabé vazebné interakce

Slabé vazebné interakce se oproti kovalentním vazbám liší v tom, že při nich nedochází ke sdílení elektronů, ale zahrnují variace elektromagnetických interakcí mezi molekulami nebo uvnitř molekuly [18]. Jsou základem všech biologických dějů, jejichž podstatou je vznik nadmolekulových útvarů. Mezi slabé vazebné interakce se řadí elektrostatické (coulombické) interakce, vodíkové vazby, Van der Waalsovy interakce a hydrofobní interakce. Ačkoliv jsou jednotlivé slabé vazebné interakce individuálně relativně slabé, jejich výhodou je, že se mohou libovolně kombinovat a energie vazeb se v hrubé aproximaci sčítají. V literatuře lze dnes najít pojmenování slabých vazebných interakcí pomocí slov: „vazby“, „interakce“ a také „síly“, a to „nekovalentní“, „nevazebné“ i „slabé“. V každém případě se jedná o totéž, a sice nesdílení páru elektronů dvěma atomy, jako je tomu u kovalentních vazeb [19].

2.3.1 Vodíkové vazby

U vodíkových vazeb hrají dominantní roli elektrostatické interakce. Ty však nejsou jediné slabé nekovalentní interakce, které tvoří vodíkové vazby. U klasického modelu interaguje slabě kyselé donor D—H prostřednictvím atomu vodíku s volným elektronovým párem akceptoru A. Výsledné uspořádání je D—H···A, které obvykle bývá lineární, avšak zdaleka nemusí jít o rigidní strukturu. Vodíková vazba má délku 0,2 až 0,3 nm a energii 10 až 30 kJ·mol⁻¹. Pro srovnání má jednoduchá vazba C—C délku zhruba 0,15 nm a střední hodnota energie vazby C—H v methanu je 416 kJ·mol⁻¹. Nejdůležitějšími atomy, které jsou schopny podílet se na vodíkové vazbě jsou O, N a S. Díky svým volným elektronovým pářům mohou hrát roli akceptorů. Ty samé atomy však také vytvářejí funkční skupiny, které vystupují jako donory [19].

V hyaluronanu se tvoří vodíkové vazby mezi kyslíkem v pyranovém cyklu a hydroxylovou skupinou, mezi kyslíkem na karbonylu a hydroxylovou skupinou a také mezi kyslíkem karboxylové skupiny a sekundárním amidem. Vazby mohou být intermolekulární nebo intramolekulární, tedy mohou se tvořit v rámci jedné molekuly disacharidu nebo mezi sousedními molekulami (Obrázek 3). Na jednu stranu mohou molekulu stabilizovat, na druhé straně však způsobují v polymerním systému rigiditu, která v konečném důsledku specifikuje vlastnosti roztoků. Primární struktura a vodíkové vazby pomáhají vytvářet sekundární a terciární struktury [20].



Obrázek 3: Znárodnění tvorby vodíkových vazeb v molekule hyaluronanu [20]

2.3.2 Van der Waalsovy interakce

Jako tomu je u coulombických a vodíkových vazeb, Van der Waalsovy interakce mají taktéž elektrickou podstatu a jsou rozděleny na 3–4 typy interakcí [19].

Nejsilnější z nich jsou interakce permanentní dipól–permanentní dipól. Mnohé molekuly mají, v důsledku rozdílných elektronegativit atomů, dipolární charakter. U permanentního dipólu je v jedné části molekuly parciální kladný náboj, který je v opačné části kompenzován parciálním záporným nábojem o stejné velikosti. Při setkání dvou dipólů mají tendenci orientovat se k sobě opačně nabitými konci. Se vzrůstající vzdáleností mezi dipóly však klesá energie interakce velmi rapidně, a tak se jedná o interakci velmi krátkého dosahu. V biomolekulách se předpokládá četný výskyt těchto interakcí. Nejdůležitější jsou interakce dipólů v jejich vnitřku, kde nejsou v kontaktu s rozpouštědlem a v důsledku toho se zesilují. Kupříkladu dvě karbonylové skupiny, které jsou orientovány opačně k sobě a jsou od sebe vzdáleny 0,5 nm, mají mezi sebou přitažlivou energii o velikosti $9,3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ [19].

Interakce permanentní dipól–indukovaný dipól jsou podstatně slabší. Molekula dipolárního charakteru indukuje dipól v molekule jiné. Zde hraje velkou roli polarizovatelnost molekuly, což je míra schopnosti dané molekuly vytvořit dipól. Permanentní dipól ve druhé molekule vyvolá vždy dipól správně orientovaný. Příkladem může být karbonylová skupina, která záporným nábojem na kyslíku indukuje dipól v methylové skupině a vzniká tak převaha kladného náboje na vodících a záporného náboje na atomu uhlíku [19].

Třetím typem interakcí jsou Londonovy disperzní interakce. Ty nastávají i tehdy, když žádná z molekul není permanentním dipólem. V atomech prvků dochází k fluktuaci hustoty elektronů kvantové povahy, čímž dochází ke vzniku přechodného dipólu na velmi krátkou dobu. Tento přechodný dipól vybudí v sousedním atomu opačně orientovaný dipól. Jedná se o velmi slabé a zcela nespecifické interakce. Při těsném přiblížení biomolekul, ke kterému velmi často dochází, může každý atom takto interagovat s nejbližšími sousedy, se kterými není spojen kovalentní vazbou. Četnost takových interakcí je obrovská a vliv na stabilitu struktury biomolekul je, i přes nikterak vysokou energii, nezanedbatelný [19].

Zvláštním typem těsných interakcí, které se taktéž mohou zařadit mezi Van der Waalsovy interakce, jsou π – π interakce. Jedná se o vzájemnou interakci π –elektronových systémů, které se nachází nad a pod aromatickými kruhy. Dominantně se uplatňují při stabilizaci dvoušroubovice DNA i některých úseků RNA [19].

2.3.3 Hydrofobní interakce

Hydrofobní interakce popisují sklon hydrofobních molekul shlukovat se a odpuzovat molekuly vody v polárním prostředí. Při zavedení hydrofobní látky do vody jsou vodíkové vazby ve vodě přerušeny, aby se vytvořilo místo pro hydrofobní látku. Voda však s hydrofobní látkou nereaguje. To je považováno za endotermickou reakci, protože při přerušení vazeb jejich vazebná energie zvýší energii systému. Molekuly vody, které jsou v důsledku přítomnosti hydrofobní látky přesunuty, vytvoří nové vodíkové vazby a kolem hydrofobní látky vytvoří klecovou strukturu. Tato orientace učiní hydrofobní systém strukturovanější a celková entropie

systemu rapidně poklesne. Změna entalpie systému může být záporná, nulová nebo kladná, protože nové vodíkové vazby mohou částečně, úplně nebo nadměru kompenzovat vazby zaniklé vstupem nepolární látky. Změna entalpie však hraje zanedbatelnou roli, protože změna entropie je vysoká. Vysoká záporná změna entropie znamená vysoký přírůstek Gibbsovy energie, což naznačuje, že mísení vody a hydrofobní látky není spontánní [21].

Interakce mezi hydrofobní látkou samotnou, oproti mísení látky a vody, však spontánní jsou. Jakmile spolu přijde hydrofobní látka do kontaktu a začne spolu interagovat, entalpie vzroste. Některé vodíkové vazby, které tvořily klecovou strukturu, totiž zaniknou. Porušení části klecovité struktury způsobí nárůst entropie, protože jejím formováním se entropie snižuje. Výsledkem je tedy záporná změna Gibbsovy energie a hydrofobní interakce jsou proto spontánní [21].

Oproti ostatním slabým vazebným interakcím jsou hydrofobní interakce relativně silnější. Síla hydrofobních interakcí závisí na teplotě, počtu uhlíků hydrofobní látky a také jejím tvaru. Se zvyšující teplotou se síla hydrofobních interakcí zvyšuje. Čím více má molekula uhlíku, tím vyšší sílu mají hydrofobní interakce mezi molekulami. Kvůli sterickému bránění působí na molekuly s méně rozvětveným řetězcem interakce vyšší silou [21].

2.4 Kovalentní vazby

V kovalentní vazbě jsou zapojené atomy schopny sdílet jeden nebo více valenčních elektronů s ostatními atomy, a získat tak stabilnější konfiguraci. Vazba se vytvoří tehdy, když má prvek téměř celou valenční vrstvu zaplněnou a potřebuje elektrony dalšího atomu k její úplnosti. Atom pak sdílí jeden nebo více svých valenčních elektronů s ostatním atomem, čímž oba atomy dosáhnou stability. Pokud atomy sdílejí jeden elektron, je vytvořena jednoduchá kovalentní vazba. Při sdílení dvou elektronů vzniká dvojná kovalentní vazba a sdílí-li tři elektrony, je vytvořena trojná kovalentní vazba. Kromě toho mohou být kovalentní vazby vytvořeny mezi různými atomy. V těchto případech, kvůli rozdílu elektronegativit atomů ve vazbě, jsou sdílené elektrony přitahovány blíže k atomu s vyšší elektronegativitou, což má za následek vytvoření dipólu [22].

Atom také může tvořit více kovalentních vazeb najednou. Například protože má uhlík čtyři valenční elektrony, může vytvořit až čtyři kovalentní vazby k dosažení stabilnější konfigurace. To je případ polymerů, tvořených převážně atomy vázanými v dlouhé řetězce kovalentními vazbami s laterálními vazbami na atomy vodíku, kyslíku a dusíku. Kovalentní vazby jsou směrové a elektrony jsou drženy na místě. Materiály tvořené kovalentní vazbou tedy jsou obecně špatnými vodiči elektřiny a tepla [22].

2.5 Hydratace

K hydrataci dochází v každém vodném roztoku elektrolytu. Jedná se o interakci mezi ionty elektrolytu a vodou, při které se ionty vodou obklopují. Voda se orientuje podle náboje konkrétního iontu opačným znaménkem. Z pozorování vyplynulo, že hydratace kationtů stoupá s rostoucím nábojem a klesající hmotností a anionty jsou zpravidla hydratovány méně než kationty. Anionty totiž interagují s vodou prostřednictvím vodíkových vazeb, kdežto

kationty přímo s volnými elektronovými páry molekul vody. V obou případech vede přítomnost iontů ke vzniku klastrů, které dále komunikují se vzdálenějšími molekulami vody [19].

Hydratace se rovněž uplatňuje u podstatně větších částic, než jsou prosté ionty, tedy u biopolymerů. Zde je popis hydratace složitější, protože u biopolymerů jsou v kontaktu s rozpouštědlem nabitě funkční skupiny i nenabitě struktury. Různé části povrchu biopolymeru tedy budou hydratovány odlišně. Vždy však existuje hydratační obal, což je primární obal kolem molekuly biopolymeru, který je na molekulu vázán mimořádně pevně a odstranit ho lze jen velmi složitě. Další podíl vody již bývá vázán méně pevně, ale stále má všechna vázaná voda, nehledě na pevnost, některé charakteristiky, jimiž se liší od čistého rozpouštědla. Výstižné je považovat vodu kolem molekuly za dvojrozměrnou síť, propojenou vodíkovými vazbami, která biopolymer obepíná. Vodíkové vazby v této síti jsou pevnější a mají delší životnost než vazby ve vzdálenějším okolí. Výměna molekul s okolními probíhá pomaleji než v normální vodě. Právě hydratační obal je velmi významný pro biologickou funkci většiny biopolymerů [19].

2.6 Receptory

V mnohobuněčných organismech spolu buňky potřebují komunikovat, aby mohly koordinovat růst, migraci a diferenciaci. Mohou tak činit bezprostředním kontaktem nebo sekrecí molekul, které se vážou na receptory uvnitř či vně cílových buněk. Prostřednictvím receptorů mohou takové molekuly stimulovat samotnou produkční buňku, buňky v bezprostřední blízkosti nebo i buňky ve vzdálených orgánech. Indukovaná signalizace v cílových buňkách je důležitá jak u embryonálního vývoje, tak u dospělých, kde mimo jiné řídí i odpověď buňky na infekci a homeostatické mechanismy organismu [23].

Mnoho receptorů na povrchu buňky obsahuje extracelulární oblast vázající ligand, jeden transmembránový segment a intracelulární efektorovou oblast, která může a nemusí mít asociovanou enzymovou aktivitu. Některé receptory obsahují více podjednotek, které společně vytváří vazebné místo pro signální molekulu (ligand). Jiné se skládají z polypeptidu, který sedmkrát přechází přes buněčnou membránu. Nakonec existují receptory, které jsou umístěny uvnitř buňky a aktivují je ligandy, které musí projít buněčnou membránou. Příkladem takových ligandů jsou steroidní hormony [23].

2.6.1 Iontové kanály

Výsledné změny místních koncentrací iontů a elektrického pole hrají stěžejní roli ve fyziologických procesech. Anorganické ionty jako Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- a H^+ se účastní fyziologických procesů v buňce. Zprostředkovávají mnoho rozmanitých procesů jako nervový vzruch, svalovou kontrakci a buněčné dělení. Klíčovým aspektem všech těchto procesů je pohyb iontů mezi extracelulárním matrixem a cytoplazmou, který ovlivňuje fyziologii buňky buď změnou membránového potenciálu nebo střídáním místních koncentrací iontů v buňce. Plazmatická membrána, která odděluje extracelulární matrix a vnitřek buňky, je složena z fosfolipidů, které jsou nepropustné pro nabitě ionty. Tento problém je vyřešen přítomností dvou integrovaných membránových proteinů, iontových kanálů, které fungují na principu

pasivního transportu a iontových pump, které pro transport iontů přes membránu spotřebovávají energii [24].

Iontové kanály se skládají z jednoho proteinu s opakující se strukturou, anebo častěji z více podjednotek, organizovaných tak aby přes rovinu membrány vytvořily pór naplněný vodou. Tyto stavební bloky jsou obecně označovány jako α podjednotky, pokud se jedná o primární podjednotky tvořící pór a β nebo γ podjednotky, pokud jsou sekundární, pomocné. Každá podjednotka se skládá ze 100–2000 aminokyselin a její molekulová hmotnost je 10–250 kDa. Podjednotky bývají posttranslačně modifikovány glykosylací, fosforylací nebo jsou spojeny disulfidickými můstky. Hydrofobní části podjednotek překlenují membránu a nazývají se transmembránové domény. Transmembránové domény interagují s hydrofobními částmi membrány, a tím tvoří jádro iontového kanálu [24].

2.6.2 Receptory pro hyaluronan

Kromě jedinečných fyzikálně–chemických vlastností disponuje hyaluronan i jedinečnými fyziologickými funkcemi, kterých je dosaženo především schopností vázat se na různé receptorové proteiny. Tyto receptorové proteiny se značně liší v úrovních exprese, typech buněk, specifické vazbě, afinitě a fyziologických funkcích. Receptory spojené s hyaluronanem zahrnují zejména receptor CD44, hyaluronanem zprostředkovaný receptor motility (RHAMM), endoteliální hyaluronový receptor lymfatických cév (LYVE1), hyaluronový receptor endocytózy (HARE), Toll–like receptory 2 a 4 (TLR2,4) a layilin. S poločasem rozpadu v těle okolo 24 hodin působí hyaluronan v nepřetržitém obnovovacím cyklu. Během transportu hyaluronanu podporují matrixové metaloproteinázy a meziprodukty reaktivních forem kyslíku její sekreci z tkání, čímž ji transportují do lymfatických cest. Po dosažení drenáže lymfatických uzlin je část hyaluronanu degradována na fragmenty, které jsou vazbou na HARE vychytávány a vstupem do portálního oběhu metabolizovány játry. Hladina hyaluronanu v těle je udržována na homeostáze prostřednictvím zmíněného degradačního cyklu. Receptory související s hyaluronanem jsou distribuovány hlavně v orgánech jako játra, klouby, oči a kůže, a regulují procesy jako fagocytóza hyaluronanu, degradace, proliferace, migrace a diferenciací. Nejvíce studovaný receptor, CD44, je exprimován v různých buňkách. Po navázání hyaluronanu vykonává funkce jako podpora proliferace, diferenciací, adheze a migrace. RHAMM se účastní buněčného cyklu a udržuje metabolickou stabilitu. LYVE1 a HARE přímo souvisí s receptorem zprostředkovanou endocytózou a degradací hyaluronanu. TLR2 a TLR4 se podílí na aktivaci vrozených a získaných imunitních reakcí. Nakonec, layilin hraje roli v buněčné morfologii, adhezi, pohybu buněk, homeostáze a přenosu signálů [25].

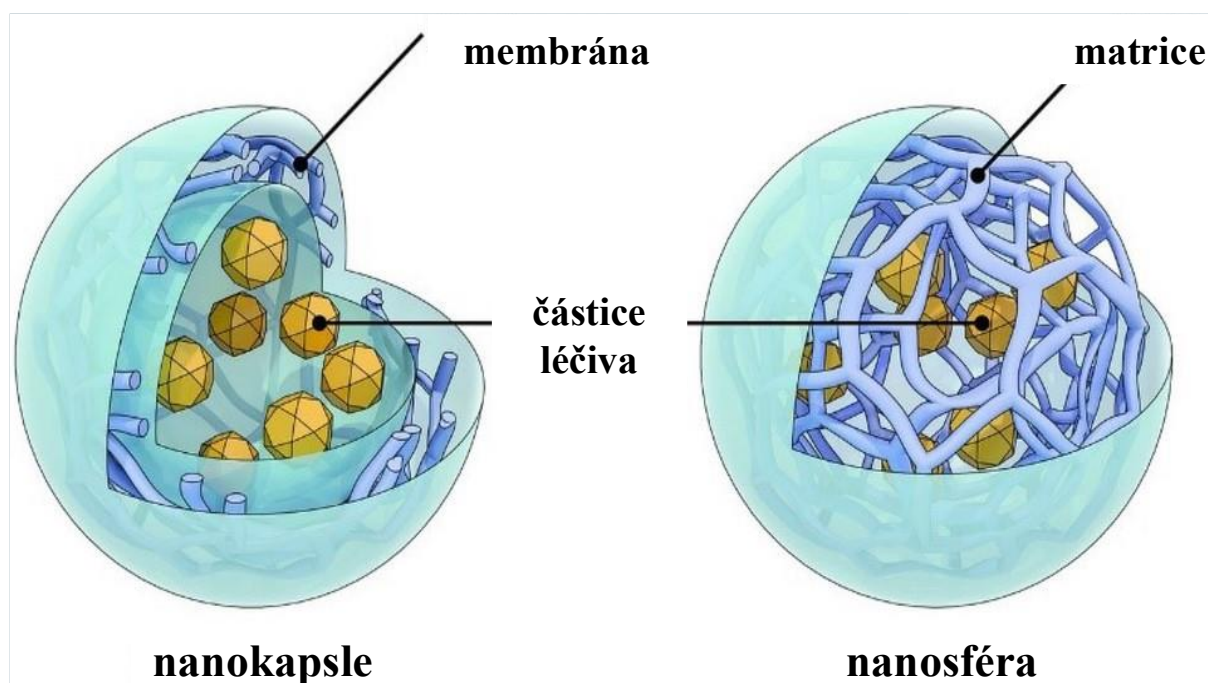
2.7 Nosičové systémy léčiv

Nosičové systémy léčiv jsou biokompatibilní nástroje pro transport molekul ve farmacii, kosmetice a nutraceutice. Poprvé byl termín nosič léčiv použit k definování systému, který má schopnost začlenit přesné množství molekul pro zvýšení jejich selektivity, biologické dostupnosti a účinnosti. Účinnost nosiče při dodávání léčiv spočívá v bariéře, kterou tvoří sám nosič. Tato bariéra může přidat odolnost vůči toku hmoty a difúzi léčiva z vnitřního jádra do vnějšího objemu. Důležitým příspěvkem k charakteru nosiče je chování hmoty, kterou může

být voda, gel nebo médium podobné krvi. Podle viskozity média má uvolňování léčiva různý kinetický tvar a rychlost. Hlavní výhodou použití nosičů léčiv je schopnost chránit léky po celou dobu podávání a uzavírat je do různých typů bariér, čímž se snižují ztráty účinných látek a omezují se případné vedlejší účinky. Systémy jsou obecně navrženy na nanometrické a mikrometrické úrovni, aby kombinovaly různé vlastnosti se specifickými cíli, jako je specifická místa, životnost nebo citlivost na vnější podněty. Specifická vyžaduje schopnost nosiče léčiva rozpoznat cílovou tkáň, kam má být lék adresován. Životnost souvisí se schopností nosiče s léčivem dosáhnout požadované tkáně, aniž by byl fagocytován mononukleárním fagocytárním systémem před dosažením místa uvolnění. Nosičové systémy jsou podle odlišné morfologie rozděleny na nanokapsle, nanosféry, lipozomy, pěny, uhlíkové nanotrubičky, dendrimery, niozomy a hydrogely [26].

2.7.1 Polymerní nanočástice

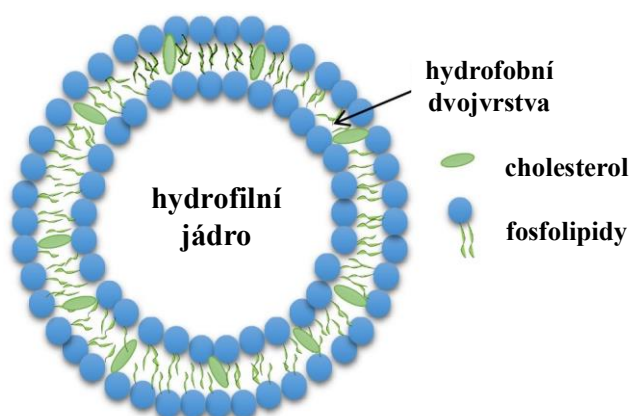
Polymerní nanočástice jsou koloidní částice, skládající se z biodegradabilního polymeru, který může existovat ve formě nanosfér nebo nanokapslí. Nanokapsle se připravují rozpouštěním nebo dispergováním léčiva v kapalném jádře (olej nebo voda), které je zapouzdřeno polymerní membránou. Nanosféra se připravuje zachycením léčiva v polymerní matici [27]. Velikostí jsou polymerní nanočástice velmi malé (1–1000 nm). Oddělením léčiva od prostředí tkání polymerním obalem je zamezeno degradaci nebo náhlému uvolnění léčiva, které by mohly nastat vlivem pH, teploty, enzymů a dalších faktorů. Díky tomu může být polymerní obal funkcionalizován molekulami, které jsou schopné interagovat s cílenými buňkami a umožnit tak cílené podání léčiva [28].



Obrázek 4: Znárodnění struktury nanokapslí a nanosfér, přeloženo [29]

2.7.2 Lipozomy

Lipozomy jsou kulovité lipidové vezikuly o velikosti 50–500 nm, složené z jedné nebo více lipidických dvojvrstev. Jsou výsledkem emulgace přírodních nebo syntetických lipidů ve vodném prostředí. Podle struktury jsou lipozomy rozděleny do čtyř kategorií na základě velikosti a počtu dvojvrstev na malé unilamelární vezikuly, velké unilamelární vezikuly, multilamelární vezikuly a multivezikulární vezikuly. V případě unilamelární struktury mají lipozomy pouze jednu lipidovou dvojvrstvu, zatímco u multilamelární struktury jsou dvojvrstvy vrstveny na sebe podobně jako v cibuli. Multivezikulární struktura obsahuje v jedné větší vezikule několik menších unilamelárních vezikul. Účinnost enkapsulace hydrofilních sloučenin do lipozomů roste s jejich velikostí a klesá s počtem dvojvrstev. Velikost vezikul je důležitý faktor, který řídí poločas rozpadu cirkulujících lipozomů. Při dodávání léčiva pomocí lipozomů mají totiž požadované vezikuly velikost od 50 nm do 150 nm. Interakce lipozomů s buněčnou membránou jsou různé: specifická nebo nespecifická endocytóza, adheze, fagocytóza a absorpce do buněčné membrány. Jsou ovlivňovány faktory jako složení a průměr lipozomů, povrchový náboj, cílený ligand na povrchu lipozomů a biologické prostředí [30].

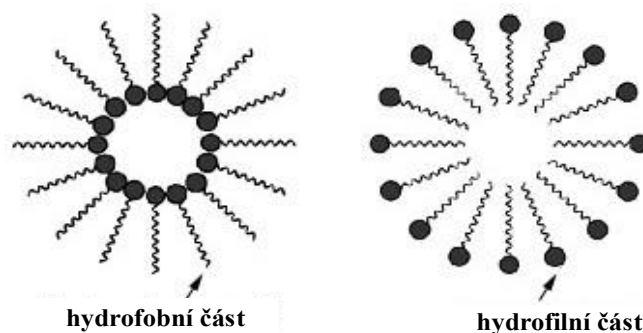


Obrázek 5: Znárodnění struktury unilamelárního lipozomu, přeloženo [30]

2.7.3 Micely

Micely jsou shluky amfifilních molekul dispergovaných v kapalném médiu. Vznikají samoskládáním amfifilních polymerů při kritické micelární koncentraci. Jejich vznik je možný díky obojetnému charakteru polymeru, jehož jedna část je hydrofilní a druhá lipofilní. V závislosti na hydrofilních a hydrofobních segmentech a podmínkách rozpouštědla mají micely různou morfologii. Tvar micel může být kulovitý, válcovitý i laminární. Segmenty polymerů se orientují podle charakteru prostředí, a tak v nepolárním prostředí vznikají inverzní micely, které jsou orientovány polárními částmi doprostřed. Micely se připravují různými metodami jako ředění, lyofilizace, odpařování rozpouštědla a dialýza [31].

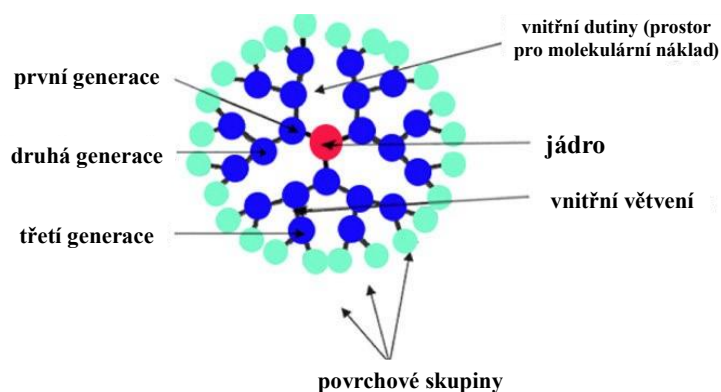
Micely představují nový typ nosiče léčiv, jehož přednostmi je snížení vedlejších účinků léků, selektivní cílení, stabilní skladování a stabilita vůči ředění. V nanoměřítku mají micely navíc úzkou distribuci a díky své struktuře jádra a obalu mohou chránit léčiva před oxidací [31].



Obrázek 6: Organizace micel podle charakteru prostředí, přeloženo [32]

2.7.4 Dendrimery

Dendrimery jsou velmi rozvětvené makromolekuly, které jsou charakteristické rozsáhlými možnostmi funkcionalizace koncových skupin a kompaktní molekulární strukturou. Skládají se z molekuly centrálního jádra, odkud se začínají větvit, což vede k hierarchické a dobře definované architektuře. Větve se skládají z opakovaných jednotek nebo monomerů, které jsou spolu v přesném pořadí spojeny. Dendrimery vykazují mnoho výjimečných vlastností podobných vlastnostem biomolekul, zejména proteinů. Například mohou být syntetizovány jako monodisperzní materiály, čímž získají uniformní distribuci molekulární hmotnosti. Jejich velikost se pohybuje v řádech několika nanometrů. Mají globulární tvar, vyplývající z vysoce rozvětvené a symetrické struktury, který je rozhodující pro interakce s jinými molekulami. Jejich povrch umožňuje přesnou funkcionalizaci širokou škálou molekul, čímž lze zlepšit aktivní cílení. Kulovitý tvar vytváří ve struktuře dutiny, které mohou pojmout jiné molekuly, léky nebo funkční skupiny, čímž pro ně poskytují kontrolované a chráněné prostředí. Unikátní vlastnosti dendrimerů otevřely mnoho možností v oblastech nanotechnologií, medicíny, katalýzy a materiálových věd. V posledních letech byly zkoumány nejběžnější dendrimery jako poly(amidoamin), poly(propylen imin), polylysin a dendrimery polyesteru [33].

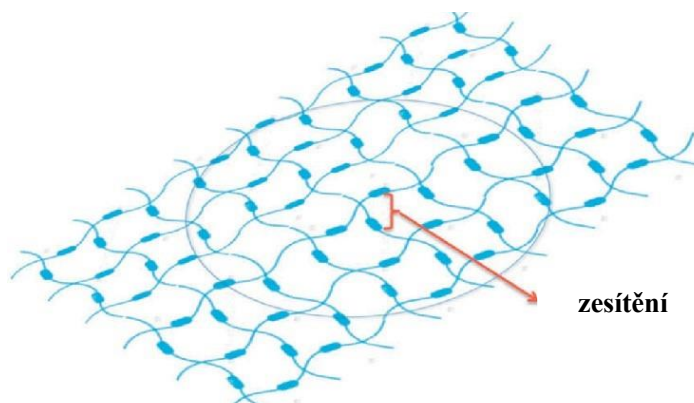


Obrázek 7: Znázornění struktury dendrimeru, přeloženo [34]

2.7.5 Hydrogely

Hydrogely představují trojrozměrnou síť, která může absorbovat velké množství vody a bobtnat ve vodě díky obsahu hydrofilních skupin jako: $-NH_2$, $-COOH$, $-OH$, $-CONH_2$, $-CONH$ a $-SO_3H$. Síť hydrogelu obvykle tvoří zesíťované polymerní řetězce, někdy však může být tvořena zesíťovanými koloidními shluky. Schopnost absorbovat velké množství vody také dává hydrogelům jedinečnou pružnost a měkkost. Díky tomu se hydrogely velmi podobají živé tkáni. Mohou být klasifikovány podle zdroje, složení, zesíťování, vlastností, konfigurace a náboje. Zdroje hydrogelů lze rozdělit na přírodní, syntetické nebo polosyntetické. V rámci zdroje polymeru mohou být označovány jako přírodní, syntetické nebo semi-polymerní. Mezi přírodní zdroje hydrogelů patří celulóza, chitosan, kolagen, alginát, agaróza, hyaluronan, želatina a fibrin. Jsou biokompatibilní, bioaktivní a biodegradabilní, avšak poměrně nestabilní a nepříliš pevné. Ačkoliv pro většinu populace jsou hydrogely bezpečné, některé materiály přírodních hydrogelů jsou ve vzácných případech alergeny. Pokud jsou tedy použity při léčbě citlivých jedinců, mají potenciální imunologická rizika. Syntetické hydrogely se vyrábí ze syntetických polymerů. Mezi syntetické polymerní zdroje hydrogelů patří například polyvinylalkohol, polyethylenglykol, polyakrylamid a další. Pouze málo z nich je biokompatibilních, avšak jsou stabilní a mají vyšší mechanickou odolnost. Polosyntetické hydrogely jsou chemicky modifikované zesíťované biopolymery nebo kombinace přírodních a syntetických polymerů jako materiál pro přípravu semi-hydrogelů. Takové hydrogely mají nejen vlastnosti bioaktivity přírodních hydrogelů, ale mají také velký prostor pro modifikace díky svým různorodým chemickým parametrům [35].

Hydrogely si také získaly značnou pozornost jako nosič cílených terapeutických činidel. Vlastnosti a struktura umožňují kontrolované uvolňování a snadnou modifikaci. Porézní povaha hydrogelů usnadňuje umístění léčiva do gelové matrice a uvolňuje léčivo způsobem závislým na difúzním koeficientu makromolekul nebo malých molekul skrz gelovou síť. Léčivo dodávané pomocí hydrogelu udržuje vysokou koncentraci v cílové a okolní tkáni pro podstatnou dobu, a proto je hydrogel dobrá volba pro cílené systémové dodávání terapeutických a bioaktivních látek [36].



Obrázek 8: Znárodnění struktury hydrogelu, přeloženo [37]

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

V roce 2011 publikovali S. Manju a K. Sreenivasan článek v časopise *Journal of Colloid and Interface Science*. Jejich výzkum se zabýval zlepšením stability a rozpustnosti kurkuminu pomocí jeho konjugace na hyaluronan. Kurkumin byl na hyaluronan navázán pomocí N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu a 4-Dimethylaminopyridinu v dimethylsulfoxidu. Úspěšná konjugace kurkuminu na hyaluronan byla prokázána infračervenou spektroskopií a nukleární magnetickou rezonancí. Rozpustnost konjugátů byla oproti samotnému kurkuminu několikanásobně vyšší. Ve vodné fázi byla zjištěna tvorba micel, která zajistila léčivu lepší stabilitu při fyziologickém pH. Test cytotoxicity prokázal, že zablokování jedné fenolické skupiny kurkuminu, kterou byl navázán na hyaluronan, nikterak neovlivní jeho biologickou aktivitu [38].

J. Li a kolektiv se v roce 2015 zabývali podobnou problematikou, kdy modifikovali hyaluronan kurkuminem pomocí N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu a hydroxybenzotriazolu v rozpouštědle dimethylsulfoxidu. Tato metoda M. Konga, X. Chena a X. Chenga byla v roce 2013 patentována. Konjugáty ve vodě tvořily micely o velikosti kolem 100 nm a nízkým indexem polydisperzity (<0,3). Rozpustnost konjugátů oproti samotnému kurkuminu se zvýšila více než 1100krát. Transmisní elektronová mikroskopie potvrdila enkapsulaci kurkuminu, sférický tvar micel a jejich podobnou velikost. Také byl proveden test antioxidační aktivity konjugátů, jehož výsledky ukázaly, že antioxidační aktivita byla výrazně zvýšena [39].

V roce 2017 připravili M. Sharma a kolektiv konjugát hyaluronanu a kurkuminu stejným způsobem jako S. Manju a K. Sreenivasan v roce 2011. Ve studii byla zkoumána účinnost konjugátu při hojení ran na jejich *in vitro* a *in vivo* modelech. Také byl studován efekt konjugátu na buněčnou proliferaci a migraci a antioxidační účinnost na lidských keratinocytech. Nakonec byl studován antimikrobiální potenciál konjugátu na meticilin-rezistentním zlatém stafylokoku ve tmě a po vystavení modrému světlu. Zkoumání proliferace, antioxidační aktivity a hojení ran ukázalo, že léčba konjugátem kurkuminu a hyaluronanu zlepšila buněčnou proliferaci, zmírnila poškození oxidativním stresem, a také pomohla migraci buněk v ránách oproti léčbě nativním kurkuminem. Konjugát vykazoval na meticilin-rezistentního zlatého stafylokokka baktericidní účinky ve tmě a fototoxicitu při ozařování modrým světlem. Studium účinnosti hojení ran u myši prokázalo, že aplikace konjugátu na rány vedla k lepšímu hojení, než při aplikaci nativního kurkuminu nebo samotného hyaluronanu [40].

V roce 2019 zkoumali D. Yu a kolektiv vliv konjugátu hyaluronanu a kurkuminu na potlačení myofibroblastů v kloubní kontraktuře. Kurkumin byl na hyaluronan navázán patentovanou metodou z roku 2013. Výsledky ukázaly, že konjugát výrazně snížil migraci myofibroblastů a mohl nejen inhibovat proliferaci, ale také potlačit migraci aktivovaných myofibroblastů. Toho bylo docíleno díky tomu, že konjugát hyaluronanu a kurkuminu zvýšil expresi prostaglandinového receptoru PTGER2, který je schopen inhibovat funkce myofibroblastů, a projevil ochranné účinky proti kontraktuře kloubu. Konjugát také inhiboval expresi cytokinů TGF- β , čímž alespoň částečně omezil další funkce myofibroblastů v kontraktuře kloubu. Studie poskytla mechanismus pro léčbu kloubní kontraktury a také molekulární cíl PTGER2 pro terapii během patogeneze kloubní kontraktury [41].

H. Lai a kolektiv v roce 2021 navrhli nanonosiče na bázi hyaluronanu pro cílené dodání kurkuminu do místa nádoru. V tomto návrhu byl vyvinut hydrazonový linker reagující na kyselinu pro připojení hydrofobního kurkuminu (přes adipický dihydrazidový můstek) na hydrofilní hyaluronan pro vytvoření konjugátu hyaluronan-můstek-kurkumin, který měl velmi dobrou samouspořádací schopnost produkovat nanočástice ve vodě s rychlostí uvolňování 73,5 % při pH 5 v podmínkách *in vitro*. Dále byly nanočástice úspěšně internalizovány rakovinnými buňkami přes receptor CD44 a rychle uvolnily molekuly léčiva (kurkuminu) pro chemoterapii. Protinádorové výzkumy *in vivo* ukázaly, že nanočástice léčiva mají lepší schopnost cílení na nádor než volné léčivo a dosáhly vynikající protinádorové terapeutické účinnosti [42].

V. Verdoliva a kolektiv vyvinuli v roce 2024 novou metodu pro přípravu konjugátů hyaluronanu a kurkuminu bez rozpouštědla. V metodě je při 80 °C použito mikrovlnné záření na rozemletou a zamíchanou směs hyaluronanu a kurkuminu. Hyaluronan musí být nejprve aktivován sloučeninou N,N'-Diisopropylkarbodiimidem taktéž za účasti mikrovlnného záření. Vzniklá struktura konjugátu hyaluronanu a kurkuminu byla potvrzena nukleární magnetickou rezonancí, infračervenou spektroskopií, UV–VIS spektroskopií a fluorescenční spektroskopií. Test biokompatibility výsledného konjugátu neprokázal žádné značné snížení životaschopnosti lidských fibroblastů. Navíc byla u ošetřených fibroblastů zaznamenána vyšší exprese faktoru, inhibujícího tvorbu cytokinů, interleukinu 10. Nová vyvinutá metoda je efektivní, rychlá a ekologická z hlediska nepoužití toxických organických bází a rozpouštědel [43].

Taktéž v roce 2024 S. Wu a kolektiv vyvinuli nanočástice kurkuminu s měďnatými ionty, které byly obaleny hyaluronanem. Nanočástice byly navrženy tak, aby usnadnily proces hojení ran. Zjištění ukázala, že syntetizované nanočástice byly účinné při zvyšování biologické dostupnosti kurkuminu a zlepšování řízeného uvolňování léčiva místě zánětu. Kromě toho hodnocení *in vivo* a *in vitro* ověřila schopnost nanočástic inhibovat růst bakterií a odstraňovat přebytečné reaktivní formy kyslíku a zánětlivé mediátory, čímž významně podporoval hojení ran u myší. Na základě těchto zjištění se předpokládá, že multifunkční nanočástice kurkuminu s měďnatými ionty, enkapsulovanými v hyaluronanu, mají obrovský potenciál v léčbě ran [44].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Úvod do experimentální části

Experimentální část se zabývala syntézou kovalentní vazby mezi karboxylovou skupinou hyaluronanu a hydroxylovou skupinou na kurkuminu. Nejprve byl hyaluronan sodný pomocí kyseliny chlorovodíkové transformován na jeho kyselou formu, kyselinu hyaluronovou. Následovala dialýza pro odstranění sodných iontů a lyofilizace roztoku pro získání kyseliny hyaluronové v pevném stavu. Produkt byl podroben termogravimetrické analýze pro zjištění jeho vlhkosti a úspěšnost jeho protonace byla zkoumána na FTIR spektrometru. Syntéza nosičového systému na bázi hyaluronanu a kurkuminu byla provedena ve směsi rozpouštědel DMSO a deionizované vody za pomoci katalyzátorů N,N'-dicyklohexylkarbodiimidu a 1-hydroxybenzotriazolu. Produkt syntézy byl následně dialyzován a lyofilizován. Charakterizace produktu byla provedena na FTIR spektrometru a UV-Vis spektrometru. Zamýšlena byla i Ramanova spektrometrie, která však nebyla proveditelná z důvodu fluorescence produktu, která je 10^3 – 10^6 krát intenzivnější. Změřena byla i excitačně-emisní spektra kurkuminu, která měla sloužit jako reference pro excitačně-emisní spektra produktu. Ta však nebyla z technických důvodů změřena.

4.2 Použité chemikálie

- Hyaluronan sodný ($M_w = 8$ – 15 kDa), Contipro a.s., č. šarže: 224-67981;
- Kyselina chlorovodíková 37%, VWR chemicals;
- Dimethylsulfoxid, CARL ROTH;
- Ethanol absolutní pro UV, Penta s.r.o.;
- 1-hydroxybenzotriazol (HOBt), Sigma Aldrich;
- N,N'-dicyklohexylkarbodiimid (DCC), Sigma Aldrich;
- Kurkumin, Sigma Aldrich;
- Deionizovaná voda.

4.3 Použité laboratorní přístroje

- Termogravimetr (TGA Q5500, TA instruments);
- Analytické váhy (224A, Denver Instrument);
- Fluorolog (HORIBA Jobin Yvon);
- FTIR spektrometr (Nicolet iS50, Thermo Fisher Scientific);
- Lyofilizátor (L10-55 PRO, Gregor Instruments);
- Centrifuga (Rotina 420R, Hettich);
- Spektrofotometr (UH5300, Hitachi);
- Fluorolog (HORIBA Jobin Yvon).

4.4 Použité programy

- OMNIC 9, program pro vyhodnocování dat získaných z FTIR spektrometru;
- Origin 2019b 64bit.

4.5 Zjištění rozpustnosti hyaluronanu a kurkuminu

Pro optimalizaci syntézy kovalentní vazby mezi hyaluronanem a kurkuminem bylo potřeba zjistit jejich rozpustnost v použitých rozpouštědlech dimethylsulfoxidu a vodě. Proto bylo připraveno pět vialek, z čehož do čtyřech bylo napipetováno 5 ml směsi dimethylsulfoxidu a deionizované vody v poměru 1:1 a do páté 5 ml samotného dimethylsulfoxidu. Do čtyřech vialek se směsí dimethylsulfoxidu a vody byl vpraven hyaluronan sodný o hmotnosti 50 mg, připravená kyselina hyaluronová o hmotnosti 50 mg a kurkumin o hmotnosti 5 mg a 1 mg. Do vialky s čistým dimethylsulfoxidem byla umístěna připravená kyselina hyaluronová o hmotnosti 50 mg. Vialky se směsmi byly několik hodin ponechány na magnetické míchače.

4.5.1 Vyhodnocení rozpustnosti hyaluronanu a kurkuminu

Bylo zjištěno, že směs dimethylsulfoxidu a vody v poměru 1:1 rozpustila 50 mg hyaluronanu sodného, 50 mg kyseliny hyaluronové i 1 mg kurkuminu. Zcela však nerozpustila 5 mg kurkuminu. Čistý dimethylsulfoxid nerozpustil 50 mg kyseliny hyaluronové vůbec.

Pozorování ukázala, že je pro syntézu vhodné použít směs dimethylsulfoxidu a vody v poměru 1:1 a hmotnost kurkuminu udržovat na nižších hodnotách.

4.6 Termogravimetrická analýza

Termogravimetrická analýza je analytická technika, která měří změny hmotnosti vzorku v závislosti na teplotě. Vzorek je při ní umístěn na velmi citlivou váhu, která při zahřívání monitoruje hmotnost, respektive její změnu.

Analýza byla použita pro zjištění hygroskopických vlastností a určení hmotnosti vázané vody v připravených vzorcích nativního hyaluronanu sodného a kyseliny hyaluronové. Zjištěná hmotnost vázané vody byla následně uvedena v procentech z původní celkové hmotnosti vzorků.

Vzorek byl nanesen na platinovou pánvičku, vložen do pece analyzátoru a v přítomnosti vzduchu byl z laboratorní teploty zahříván na finální teplotu 600 °C s rychlostí ohřevu 10 °C·min⁻¹.

4.7 Syntéza kovalentní vazby mezi hyaluronanem a kurkuminem

Připravená kyselina hyaluronová byla nejprve promyta 100% ethanolem pro odstranění potenciálních nečistot. Po rozptýlení v ethanolu byla odstředěna na centrifuze a supernatant byl slit. Promytá kyselina hyaluronová byla rozpuštěna v 50 ml směsi dimethylsulfoxidu a deionizované vody v poměru 1:1. Do roztoku byly následně přidány katalyzátory DCC a HOBt v takovém množství, aby byl molární poměr HYA:DCC:HOBt udržen na 1:1,5:1,5. Roztok byl chvíli ponechán míchat a zatím byl připraven roztok 4 mg kurkuminu v 50 ml dimethylsulfoxidu. Po rozpuštění kurkuminu byl celý objem roztoku s kyselinou hyaluronovou a katalyzátory pomocí Pasteurovy pipety přikapán do roztoku kurkuminu v dimethylsulfoxidu a směs byla ponechána na magnetické míchače po dobu 2 hodin. Pro zabránění fotodegradace kurkuminu byla reakční baňka zabalena do alobalu.

Po 2 hodinách byla směs umístěna do dialyzačního střeva pro odstranění nezreagovaných zbytků a proti destilované vodě byla dialyzována po dobu 3 dnů. Voda v dialýze byla měněna minimálně třikrát za jeden den.

4.8 Lyofilizace

Lyofilizace je metoda sušení materiálů, při které voda přechází při nízkém tlaku a teplotě z pevné látky přímo na plyn, tedy sublimuje. Probíhá ve třech fázích. První fází je zmrazení, při kterém je materiál v celém svém objemu převeden na pevnou látku. Následuje fáze primárního sušení, kdy je tlak vzduchu v lyofilizátoru snižen na několik stovek Pa a je dodáno takové množství tepla, aby mohla voda začít sublimovat. Sušení může trvat až několik dní. Poslední fází je sekundární sušení, které spočívá v desorpci zbývající vody postupným zvyšováním teploty mírně nad teplotu počáteční.

Lyofilizace byla použita za účelem šetrného odpaření rozpouštědla a obdržení suchého systému hyaluronan–kurkumin, který mohl být ihned po dokončení lyofilizace podroben dalším analytickým metodám.

Produkt syntézy byl po dokončení dialýzy nalit do lyofilizačního kelímku a opatrně zmrazen tekutým dusíkem. Jakmile byl produkt v celém svém objemu převeden do pevného skupenství, byl umístěn do lyofilizátoru. Samotný proces trval 3 dny a po skončení byla obdržena nažloutlá látka podobající se bavlně. Proces lyofilizace probíhal obdobně pro naprotonovanou kyselinu hyaluronovou.

4.9 FTIR-ATR spektrometrie

Infračervená spektrometrie je analytická technika sloužící k identifikaci struktury chemických látek. Technika funguje na principu nanesení vzorku na ATR krystal, na který je přiveden paprsek záření o vlnové délce nejčastěji $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$. Na rozhraní krystalu a vzorku je paprsek úplně odražen, avšak v odraženém paprsku chybí záření absorbované vzorkem. Odražený paprsek dopadá na detektor. Aplikací Fourierovy transformace na obdržená data je získáno spektrum, ze kterého lze charakterizovat zastoupené funkční skupiny ve vzorku.

Technika byla použita pro ověření protonace nativního hyaluronanu sodného a ověření tvorby kovalentní vazby mezi hyaluronanem a kurkuminem.

Vzorek byl v malém množství nanesen na diamantový ATR krystal spektrometru a jeho analýza byla provedena v rozmezí vlnové délky $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ při rozlišení 4 cm^{-1} . Před měřením bylo změřeno spektrum samotného diamantového krystalu, které bylo od získaného spektra vzorku automaticky odečítáno. Měření probíhalo pro každý vzorek stejně. Před začátkem každého měření byl ATR krystal pečlivě omyt ethanolem, aby se minimalizovalo riziko kontaminace vzorkem jiným.

4.10 UV/Vis spektrometrie

UV-Vis spektrometrie je analytická technika, která se používá pro měření absorbance nebo transmittance světla v oblasti ultrafialového ($200\text{--}400\text{ nm}$) a viditelného ($400\text{--}760\text{ nm}$) spektra

elektromagnetického záření. Funguje na principu umístění kapalného vzorku do kyvety o přesně definované optické tloušťce, kterou následně projde záření o určité vlnové délce. Vzorek může část záření absorbovat, což je zaznamenáno na detektoru. Pokud je absorbance vzorku zaznamenána pro celé spektrum od 200 do 760 nm, vznikne graf, který se nazývá absorpční spektrum. Absorpční spektrum je pro každou látku unikátní.

Technika byla použita pro ověření vzniku vazby mezi kurkuminem a hyaluronanem. Ve vodném roztoku nebyly viditelné žádné nerozpuštěné zbytky kurkuminu, které by v absorpčním spektru znamenaly šum a odporovaly by vzniku vazby.

Bylo rozpuštěno takové množství vzorku ve vodě, aby byla výsledná koncentrace $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Roztok vzorku byl umístěn do kyvety a proti vodě bylo změřeno jeho absorpční spektrum.

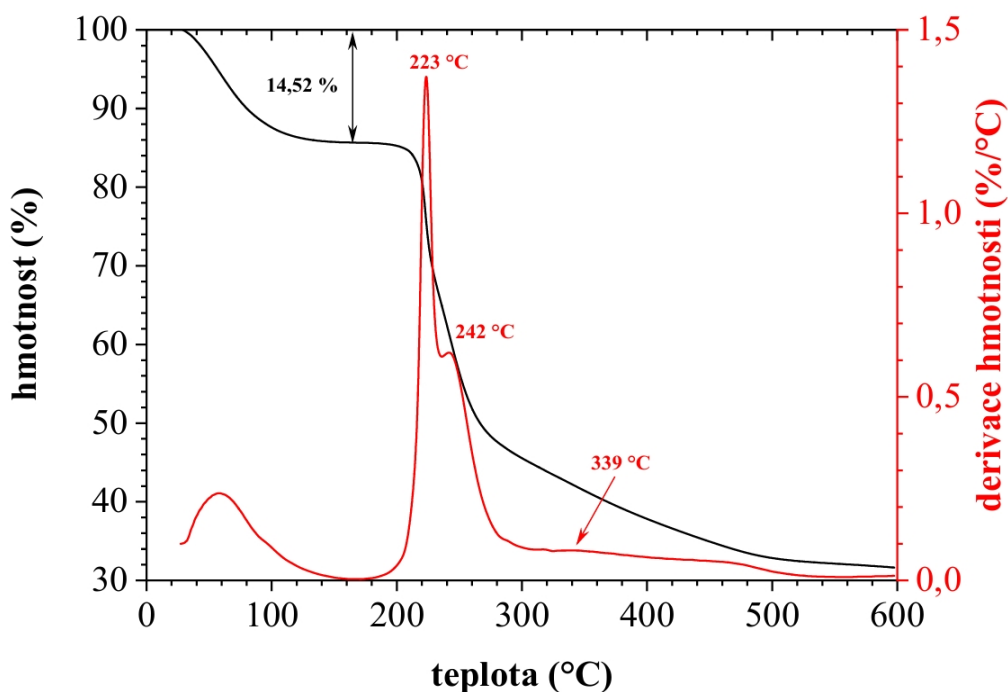
4.11 Excitačně-emisní spektra

Excitačně-emisní spektrum ukazuje při jakých vlnových délkách látka nejúčinněji absorbuje světlo a zároveň jaké světlo o vlnové délce vyzáří. K tomu je také monitorována intenzita fluorescence. Jedná se o 3D diagramy, kde se na ose y nachází excitační spektrum, na ose x emisní spektrum a barva určitého pole v diagramu určuje intenzitu fluorescence.

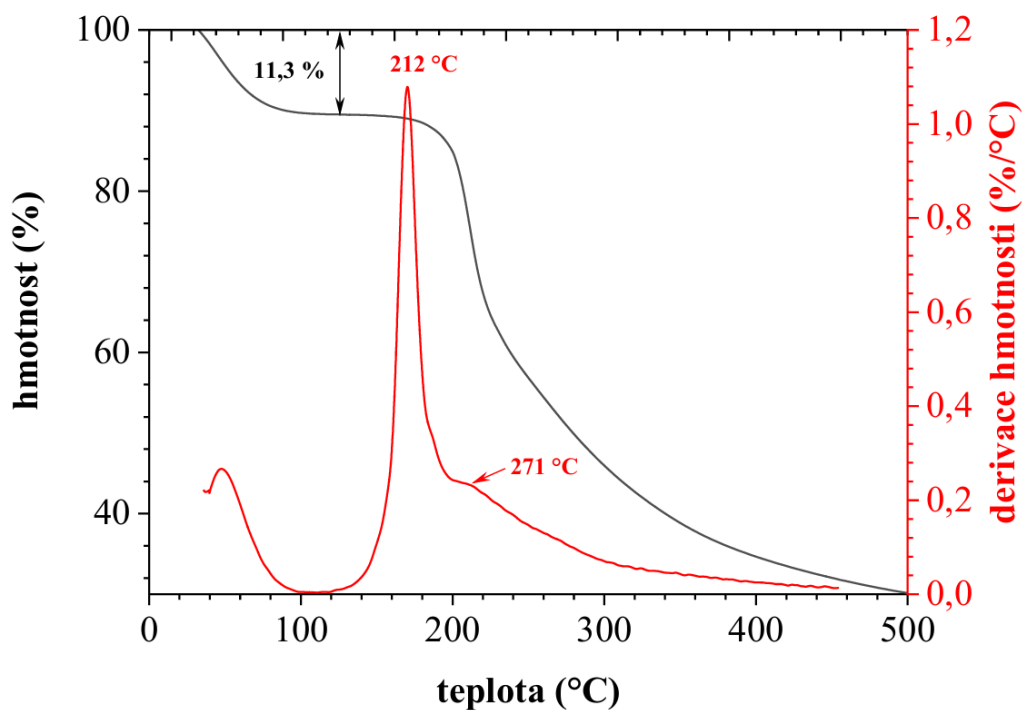
Vzorek kurkuminu byl rozpuštěn v ethanolu a v chloroformu. Poté byl umístěn do kyvety, která se vložila do přístroje Fluorolog. Intenzita záření musela být nejprve nastavena tak, aby nedošlo k poškození detektoru. Až poté mohlo být měřeno excitačně-emisní spektrum.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Termogravimetrická analýza



Obrázek 9: Graf průběhu termogravimetrické analýzy nativního hyaluronanu sodného



Obrázek 10: Graf průběhu termogravimetrické analýzy pro naprotonovanou kyselinu hyaluronovou

Na obrázku 9 a obrázku 10 se nachází graf průběhu termogravimetrické analýzy vzorků. Jedná se o závislost procentuální hmotnosti vzorku, respektive derivace hmotnosti na teplotě. Černá křivka ukazuje úbytek procentuální hmotnosti vzorku v závislosti na teplotě. Červená křivka derivaci hmotnosti, tedy čím více hmotnosti při dané teplotě ubude, tím vyšší bude maximum červené křivky. V případě prvotního úbytku hmotnosti se jedná o adsorbovanou vlhkost na vzorku, kde je rozdíl hmotností označen šipkou. U vzorku hyaluronanu sodného tedy 14,52 % jeho hmotnosti tvořila voda a v případě připravené kyseliny hyaluronové to bylo jen 11,3 %. Hyaluronan sodný dokáže totiž vzhledem k jeho záporně nabitě karboxylové skupině účinně přitahovat vodu ze svého okolí. V případě kyseliny hyaluronové není karboxylové skupina nabitá, a tedy kyselina hyaluronová nevlhne do takové míry. Naprotonovaná karboxylová skupina navíc vytváří intermolekulární a intramolekulární vodíkové vazby ke stabilizaci molekuly. Přesto více než jednu desetinu z hmotnosti kyseliny hyaluronové tvoří voda. Vzorky totiž mají tendenci na sebe adsorbovat vlhkost do určité termodynamické rovnováhy.

V oblasti termické degradace (200-500 °C) je termická stabilita obou vzorků velmi podobná. Hlavní maximum degradace při teplotě okolo 215 °C odpovídá degradaci etherových vazeb a hydroxylových skupin primárního alkoholu v hyaluronanu. Při porovnání vykazuje hyaluronan sodný vyšší teplotní stabilitu než naprotonovaná kyselina hyaluronová. U vzorku hyaluronanu sodného (obrázek 9) je ještě možné si povšimnout poměrně nevýrazného maxima při teplotě okolo 340 °C. Toto maximum může odpovídat vícekrokové degradaci celého polysacharidového řetězce.

5.2 Lyofilizace

Po lyofilizaci roztoků byly obdrženy vzorky v pevném skupenství, na kterých bylo možné okem pozorovat, že nastaly určité změny ve struktuře.



Obrázek 11: Nativní hyaluronan sodný



Obrázek 12: Naprotonovaná kyselina hyluronová po lyofilizaci

Při porovnání obrázků lze spatřit značný rozdíl ve struktuře nativního hyaluronanu sodného (obrázek 11) a naprotonované kyseliny hyaluronové (obrázek 12). Zatímco nativní hyaluronan sodný je spíše jemný prášek sypkého charakteru, naprotonovaná kyselina hyaluronová má poměrně kontinuální strukturu a na pohled i pohmat je velmi podobná bavlně.



Obrázek 13: Produkt konjugace kurkuminu na hyaluronan po lyofilizaci

Na obrázku 13 se nachází lyofilizovaný produkt konjugace kurkuminu na hyaluronan. Při srovnání se samotnou kyselinou hyaluronovou (obrázek 12) je struktura produktu také podobná bavlně, avšak oproti samotné kyselině hyaluronové má produkt navíc žlutou barvu, což může svědčit o úspěšné inkorporaci kurkuminu.

5.3 Srovnání rozpustnosti produktu a nativního kurkuminu ve vodě

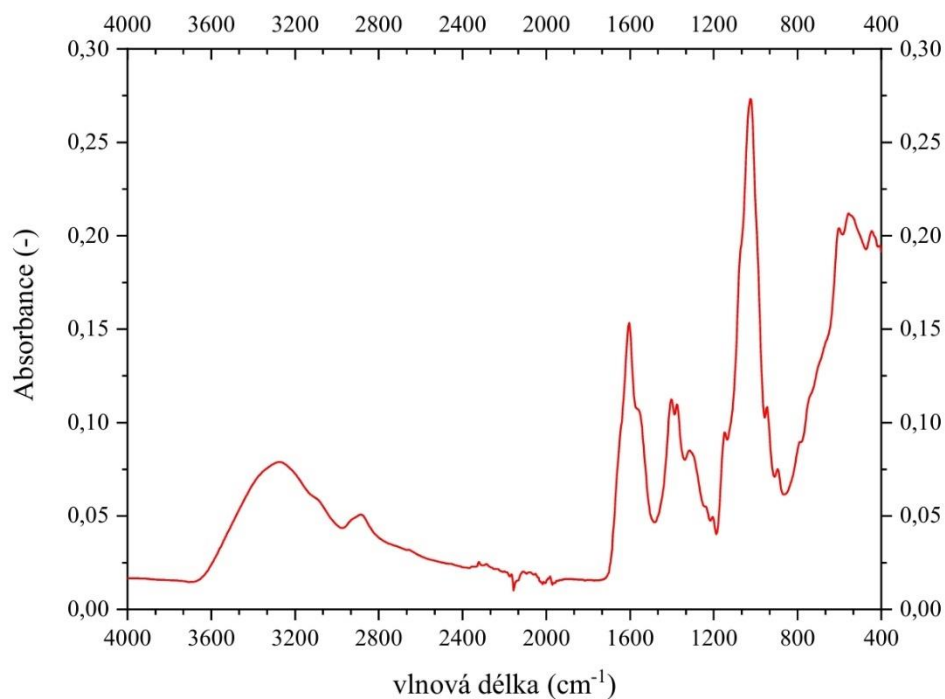
Na základě literární rešerše bylo zjištěno, že by měl být produkt dobře rozpustný ve vodě [38]. Proto byl proveden experiment, ve kterém byla srovnána rozpustnost připraveného produktu a nativního kurkuminu ve vodě.



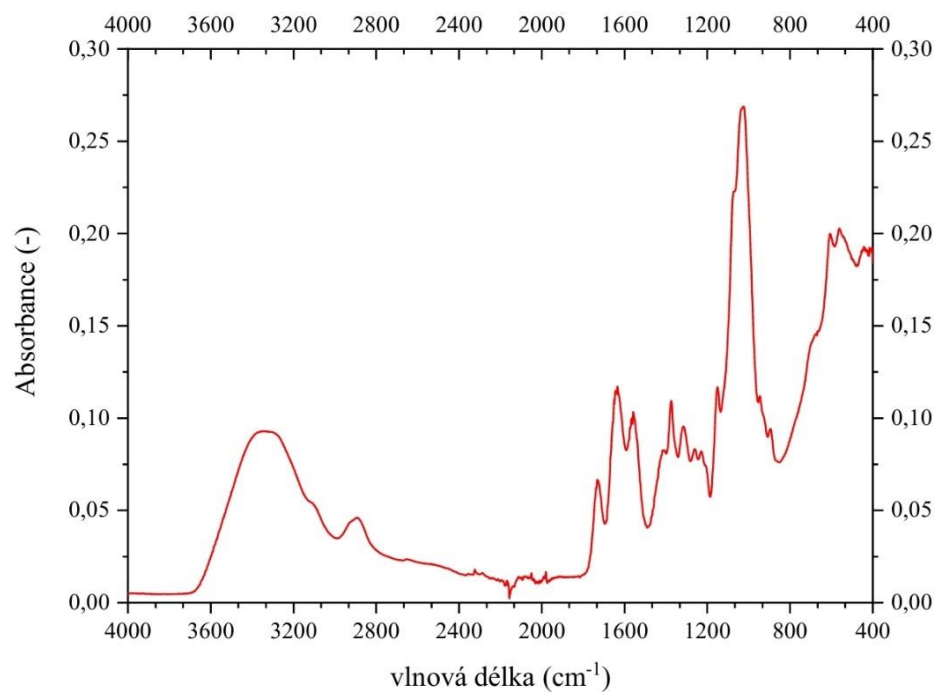
Obrázek 14: Nativní kurkumin ve vodě (vlevo) a produkt konjugace ve vodě (vpravo)

Na obrázku 14 se nachází srovnání rozpustnosti nativního kurkuminu ve vodě a produktu konjugace kurkuminu na hyaluronan ve vodě. Na levé straně obrázku lze spatřit, že nativní kurkumin ve vodě není rozpustný a hromadí se na hladině vody nebo sedimentuje na dno nádoby. Obsah vialky na pravé straně obrázku je patně čirý a lze tedy předpokládat, že je produkt ve vodě rozpustný. Výsledek nasvědčuje tvorbě vazby mezi hyaluronanem a kurkuminem. Pokud by totiž šlo o jejich pouhou směs, kyselina hyaluronová by se ve vodě rozpustila, avšak částice kurkuminu by ve vodě zůstaly patrné.

5.4 FTIR-ATR spektrometrie



Obrázek 15: Infračervené absorpční spektrum nativního hylauronanu sodného



Obrázek 16: Infračervené absorpční spektrum naprotonované kyseliny hyaluronové

Na obrázku 15 a obrázku 16 jsou uvedena infračervená spektra vzorků nativní a naprotonované kyseliny hyaluronové. V infračervených spektrech lze pozorovat intenzivní a široký absorpční pás při 3341-3276 cm^{-1} , který odpovídá valenční symetrické vibraci O-H vazeb v hydroxylových skupinách, přesněji primárním alkoholům, molekulám sorbované vody a v neposlední řadě i -OH skupinám naprotonovaných -COOH skupin. Ve spektru si lze také všimnout, že naprotonovaná kyselina hyaluronová má toto absorpční maximum posunuto do oblasti vyšších vlnočtů (modrý posuv), což odpovídá vyššímu počtu intramolekulárních a intermolekulárních vodíkových vazeb v řetězci tohoto polysacharidu. Struktura naprotonované kyseliny hyaluronové je tedy více stabilizována těmito slabými vazebnými interakcemi. Absorpce hydroxylových funkčních skupin se projevuje i v oblasti vlnočtů 1640 cm^{-1} .

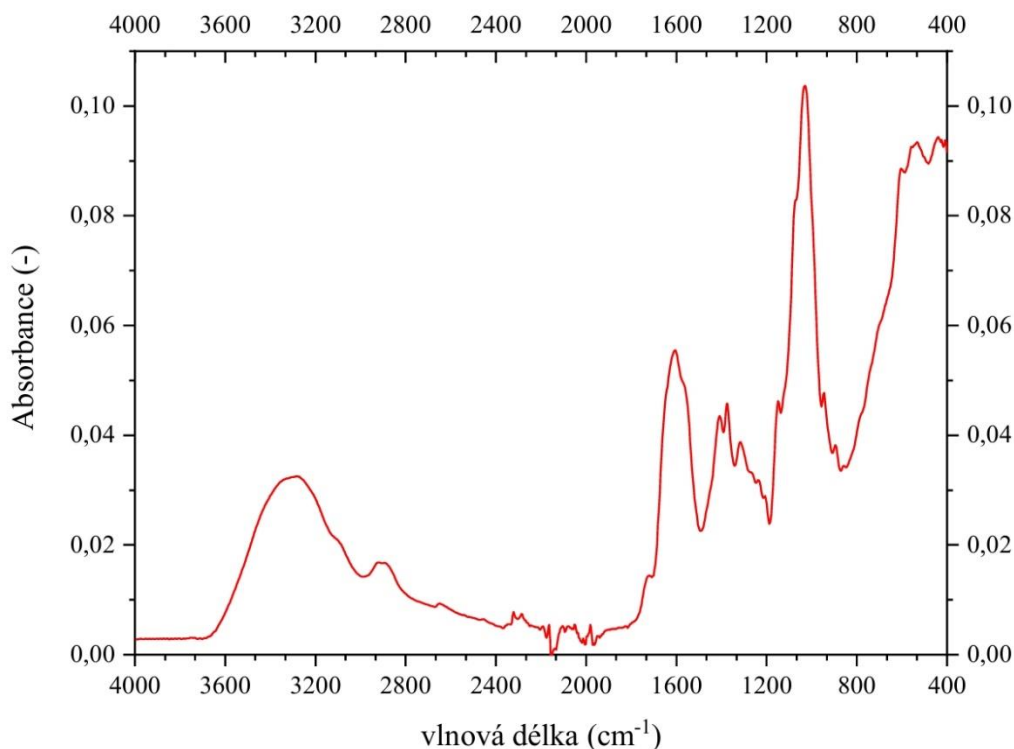
Ve spektru nativní kyseliny hyaluronové je možné zaznamenat ostrý a intenzivní absorpční pás při 1606 cm^{-1} , který odpovídá valenční symetrické vibraci C=O vazeb v COO⁻ skupinách. Hned vedle se nachází absorpční pás, který odpovídá valenční a deformační vibraci C-N a N-H vazeb v sekundárním amidu.

Absorpční pás při 2893 cm^{-1} odpovídá valenční asymetrické vibraci C-H vazeb v methylenových funkčních skupinách. Ostatní vibrační módy alifatických funkčních skupin jsou překryty absorpčními pásy, které odpovídají například karboxylovým funkčním skupinám a etherovým (glykosidickým) vazbám.

V infračervených spektrech je také viditelný ostrý absorpční pás při 1151 cm^{-1} , který odpovídá valenční asymetrické vibraci C-O-C vazeb v glykosidických vazbách hyaluronanu. Symetrická vibrace této vazby (funkční skupiny) se v případě tohoto polysacharidu projevuje jako méně výrazné rameno v oblasti vlnočtů 1075 cm^{-1} .

Úspěšnost transformace sodné soli kyseliny hyaluronové na její kyselou formu byla potvrzena absorpčními pásy, a to konkrétně v pozicích vlnočtů 1731 cm^{-1} , 1410 cm^{-1} a 1316 cm^{-1} . První absorpční pás odpovídá valenční symetrické vibraci C=O vazeb v karboxylových funkčních skupinách vázaných na alifatických řetězích polysacharidu. Druhý v pořadí odpovídá valenční asymetrické vibraci COO⁻ funkčních skupin. Při srovnání obou spekter si lze všimnout, že se intenzita tohoto absorpčního pásu po protonaci hyaluronanu snižuje. Naproti tomu se zvyšuje intenzita třetího zmíněného absorpčního pásu, který odpovídá deformační vibraci O-H vazeb v karboxylových funkčních skupinách.

Nejintenzivnějším absorpčním pásem je v případě tohoto polysacharidu pás při 1025 cm^{-1} , který odpovídá valenční symetrické vibraci C-O vazeb v primárních alkoholech.

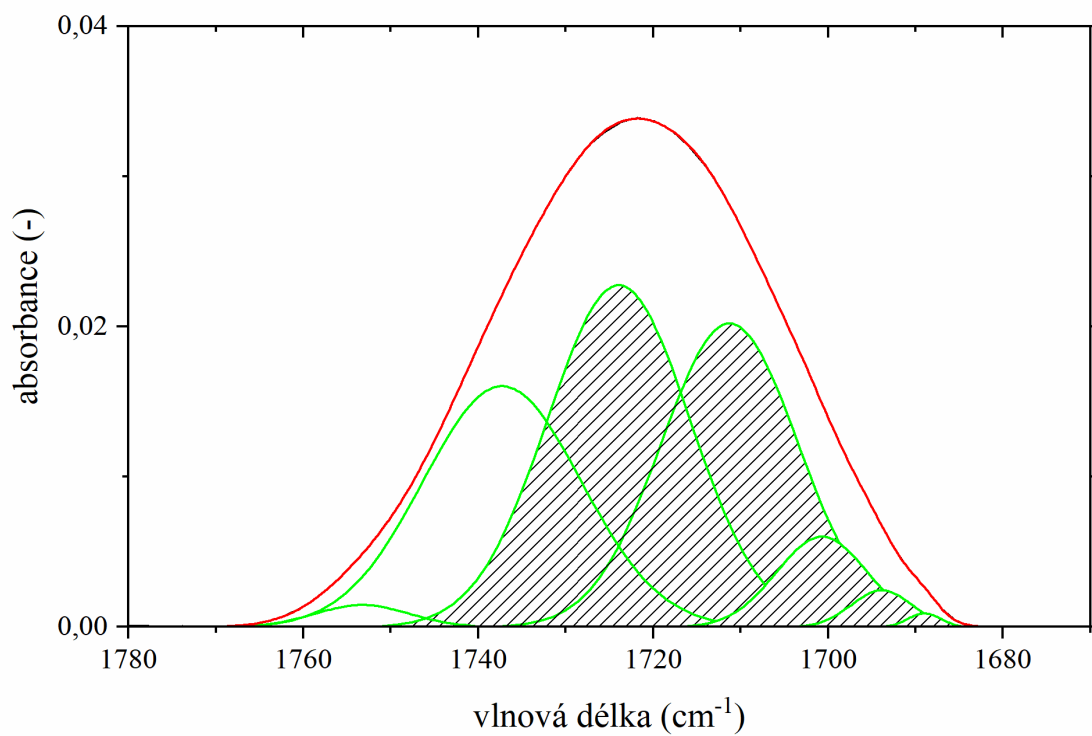


Obrázek 17: Infračervené absorpční spektrum konjugátu hyaluronanu a kurkuminu

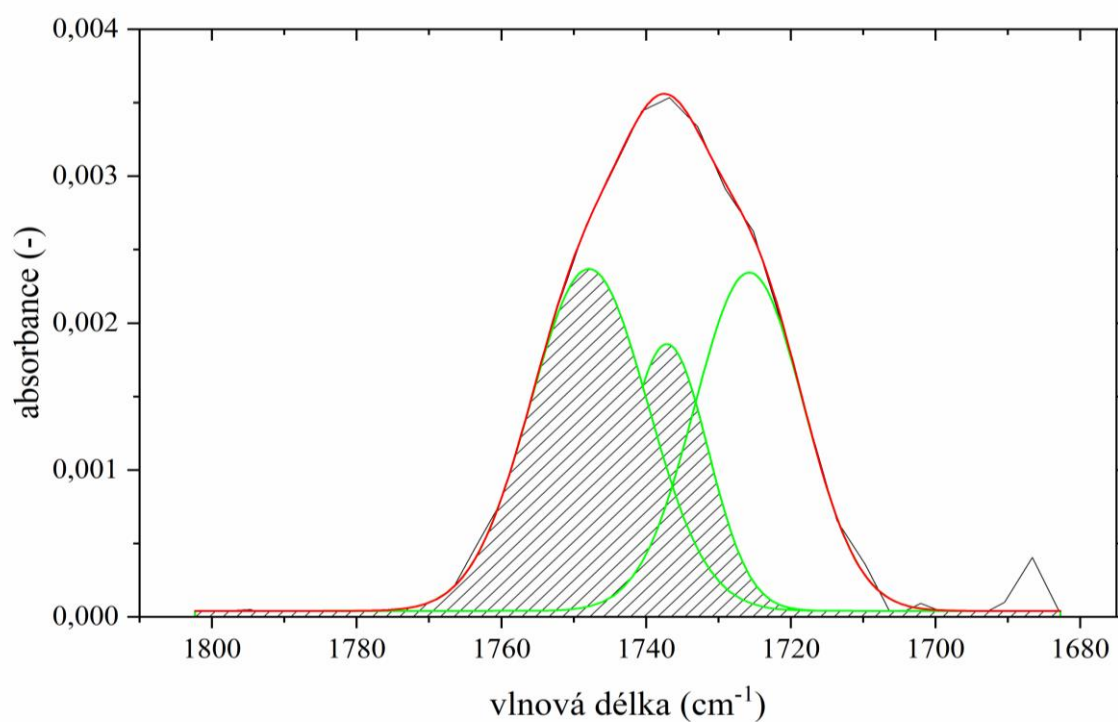
5.4.1 Dekonvoluce píků kyseliny hyaluronové a konjugátu

Při pohledu na infračervené spektrum vzorku nosičového systému (obrázek 17), a hledání syntetizované vazby mezi kurkuminem a kyselinou hyaluronovou, je potvrzení vzniku této kovalentní vazby velmi komplikované. Valenční a deformační vibrace esterových vazeb se totiž nacházejí v oblastech vlnočtů, které odpovídají vibračním funkčním skupin či strukturních motivů karboxylových a etherových funkčních skupin.

Proto byla použita metoda dekonvoluce absorpčního pásu v oblasti vlnočtů odpovídajícího valenční symetrické vibraci karbonylu v různých funkčních skupinách. Dekonvoluce tohoto absorpčních pásu vzorku naprotonované kyseliny hyaluronové a nosičového systému byla provedena v programu Origin.



Obrázek 18: Dekonvoluce absorpčního pásu naprotonované kyseliny hyaluronové



Obrázek 19: Dekonvoluce absorpčního pásu připraveného nosičového systému

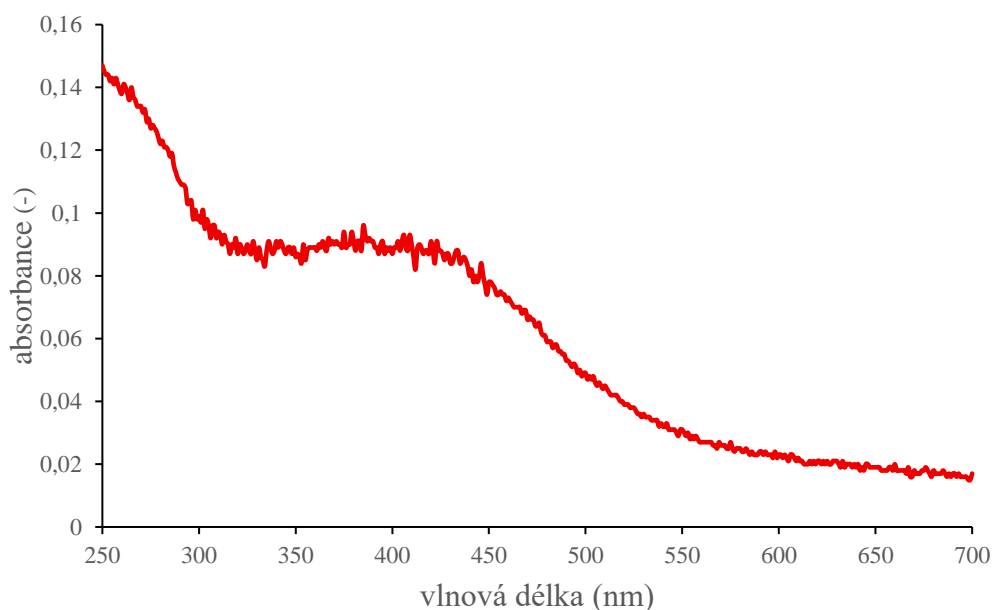
Tabulka 1: Plochy pod křivkou odpovídající funkčním skupinám

vzorek	vlnočet píku (cm^{-1})	funkční skupina	plocha (%)	celková plocha (%)
kyselina hyaluronová	1689	karboxylová	0,3	71,5
	1694		1,6	
	1701		5,8	
	1711		29,3	
	1724		34,5	
	1737	esterová	26,9	28,5
1753	1,6			
nosičový systém	1726	karboxylová	37,2	37,2
	1737	esterová	22,2	62,8
	1748		40,6	

V tabulce 1 jsou uvedeny jednotlivé dekonvoluované plochy pod křivkou, které odpovídají funkčním skupinám ve vzorcích.

Při součtu ploch dekonvoluovaných píků kyseliny hyaluronové (obrázek 18), které odpovídají valenční symetrické vibraci C=O vazeb v naprotonovaných karboxylových skupinách je obdržena celková plocha 71,5 %. Naproti tomu, součet ploch dekonvoluovaných absorpčních pásů nosičového systému (obrázek 19), které odpovídají rovněž valenční symetrické vibraci C=O vazeb, avšak vzniklé esterové vazbě, odpovídá celkové ploše 62,8 %. Zbylý absorpční pás při 1726 cm^{-1} odpovídá právě karboxylovým funkčním skupinám, kde nebyla kovalentní vazba syntetizována. Jedním z důvodů může být i to, že tyto nevyužité karboxylové funkční skupiny nebyly naprotonovány.

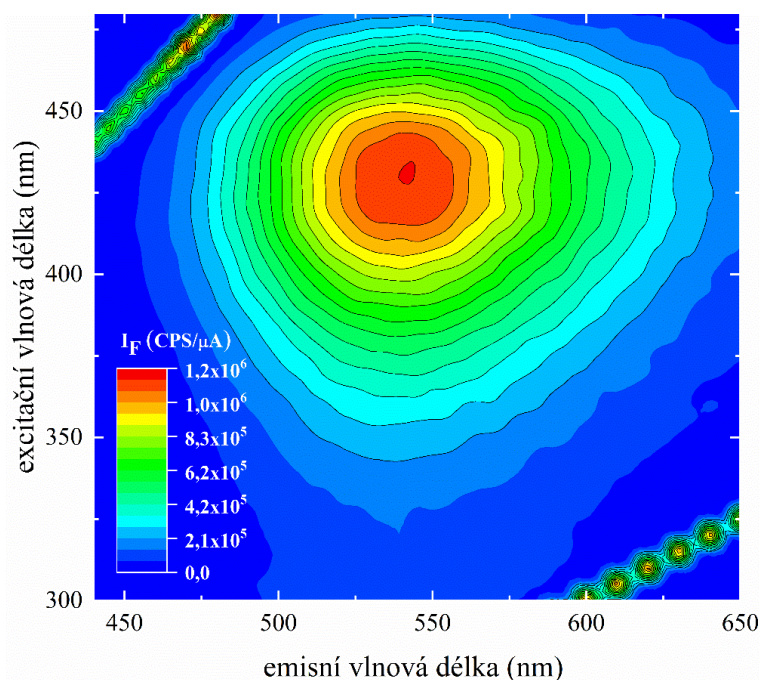
5.5 UV/Vis spektrometrie



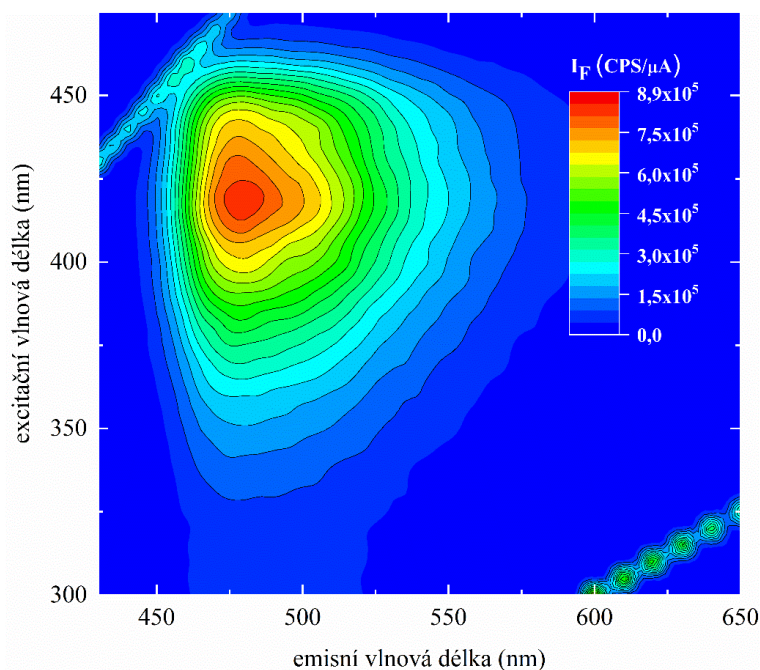
Obrázek 20: Absorpční spektrum konjugátu kurkuminu a hyaluronanu ve vodě

Na obrázku 20 se nachází absorpční spektrum konjugátu kurkuminu a hyaluronanu ve vodném prostředí. Kurkumin by měl mít absorpční maximum při 427 nm a rameno při 360 nm [45]. Při pohledu na absorpční spektrum konjugátu lze tyto předpoklady potvrdit a říci, že mezi kurkuminem a hyaluronanem vznikla vazba. Při absenci vazby by totiž v průběhu purifikace (dialýzy) produkt kurkumin prošel přes póry dialyzační membrány, což by ve výsledném produktu znamenalo absenci absorpce kurkuminu.

5.6 Excitačně-emisní spektra



Obrázek 21: Excitačně-emisní spektrum kurkuminu v ethanolu



Obrázek 22: Excitačně-emisní spektrum kurkuminu v chloroformu

Na obrázku 21 se nachází excitačně-emisní spektrum kurkuminu v ethanolu a na obrázku 22 excitačně-emisní spektrum kurkuminu v chloroformu. Z obrázků je patrné, že maximum excitační vlnové délky kurkuminu je v obou rozpouštědlech velmi podobné, tedy okolo 425 nm. Maximum emisní vlnové délky se však značně liší. Konkrétně v ethanolu (obrázek 21) je maximum emisní vlnové délky zhruba 540 nm. V chloroformu je však maximum kolem 480 nm. V literatuře jsou uvedena maxima excitačních spekter kurkuminu v ethanolu při 425 nm a maxima emisních spekter při 525 nm [45]. Pro kurkumin v chloroformu je uvedeno maximum excitačního spektra při 420 nm a maximum emisního spektra při 482 nm [46]. Hodnoty uvedené v literatuře se poměrně shodují s obdrženými výsledky až na emisní maximum ethanolu, které je v literatuře uvedeno mírně nižší. Rozdílné maximum emisní vlnové délky kurkuminu v ethanolu a chloroformu může najít vysvětlení v charakteru rozpouštědel. Ethanol je polárnější rozpouštědlo, a lze tedy předpokládat, že k němu má kurkumin menší afinitu. Proto část excitační energie může být disipována samotným kurkuminem na polární prostředí. To by vysvětlovalo vyšší emisní vlnovou délku, a tedy menší energii emitovaného záření. Chloroform je naopak značně méně polární. Proto má k němu kurkumin vyšší afinitu a emitované záření má tedy vyšší energii. S nižší polaritou rozpouštědla by tedy měla emitovaná vlnová délka kurkuminu vykazovat klesající trend.

Spektra vzorků byla po měření doplňkově upravena v programu Origin. Intenzita fluorescence tak byla zvýrazněna, jednotlivé intenzity byly ohraničeny a alespoň částečně byl eliminován Ramanův rozptyl vody v případě použití ethanolu a Rayleighův rozptyl, které jsou v rozích diagramů stále mírně patrné.

Excitačně-emisní spektrum konjugátu kurkuminu a hyaluronanu ve vodě se z technických důvodů nepodařilo změřit.

6 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce měla za cíl připravit nosičový systém využívající kovalentní vazby mezi kurkuminem a hyaluronanem. Úspěšnost tvorby vazby byla zkoumána infračervenou spektrometrií s Fourierovou transformací na ATR krystalu a UV/Vis spektrometrií. Hygroskopické vlastnosti hyaluronanu sodného a kyseliny hyaluronové byly charakterizovány pomocí termogravimetrické analýzy. Vlastnosti kurkuminu v prostředí s různou polaritou byly zkoumány na excitačně-emisních spektrech, která byla získána fluorescenčním spektrometrem.

Nativní hyaluronan sodný o molekulové hmotnosti 8–15 kDa byl nejprve transformován na kyselou formu, kyselinu hyaluronovou. Úspěšná protonace sodné soli kyseliny hyaluronové byla potvrzena absorpčními pásy v pozicích vlnočtů 1731 cm^{-1} , 1410 cm^{-1} a 1316 cm^{-1} , přičemž absorpční pás s vlnočtem 1410 cm^{-1} má po protonaci nižší intenzitu a absorpční pás s vlnočtem 1316 cm^{-1} intenzitu vyšší. Nativní hyaluronan sodný a připravená kyselina hyaluronová byly následně podrobeny termogravimetrické analýze, která ukázala, že nativní hyaluronan sodný má díky četným nabitým skupinám tendenci vázat na sebe více vody než hyaluronan v kyselé podobě, jehož naprotonovaná karboxylová skupina navíc vytváří intermolekulární a intramolekulární vodíkové vazby mezi řetězci tohoto polysacharidu. Tvorba kovalentní vazby mezi kurkuminem a hyaluronanem byla provedena za pomoci katalyzátorů DCC a HOBt ve směsi voda a dimethylsulfoxid v poměru 1:1. Po syntéze následovala dialýza k odstranění reziduí a lyofilizace k obdržení produktu v suché formě.

Lyofilizací byla získána nažloutlá látka podobající se bavlně, která byla následně zkoumána infračervenou spektrometrií na ATR krystalu. Z důvodu překrytí absorpčního pásu esterové vazby vibracemi karboxylových a etherových funkčních skupin bylo potvrzení vzniku kovalentní vazby velmi komplikované. Proto byla použita metoda dekonvoluce absorpčního pásu, která pás rozložila na tři menší. Pásky v oblastech vlnočtu 1737 cm^{-1} a 1748 cm^{-1} odpovídají vibraci C=O vazeb v esterové funkční skupině. Pás v oblasti 1726 cm^{-1} odpovídá vibraci C=O vazby v karboxylové skupině, kde nebyla esterová vazba syntetizována. Celková plocha pásů odpovídajících esterovým vazbám byla 62,8 % a tedy na více než polovině karboxylových skupin byla vytvořena esterová vazba na kurkumin. Při umístění do vodného prostředí byl konjugát kurkuminu a hyaluronanu po chvíli rozpuštěn, čímž byly potvrzeny literární předpoklady o zlepšení rozpustnosti kurkuminu. UV/Vis spektrometrie ukázala, že produkt absorbuje záření při stejných vlnových délkách jako kurkumin, a tedy vazba mezi kurkuminem a hyaluronanem byla verifikována. V případě neexistence vazby by totiž v průběhu dialýzy kurkumin prošel skrze dialyzační membránu a výsledný produkt by nemohl absorbovat záření při stejné vlnové délce. Jen doplňkovým měřením se stalo měření fluorescence kurkuminu, ze kterého byly obdrženy excitačně-emisní spektra. Kurkumin v ethanolu byl excitován podobnou vlnovou délkou jako kurkumin v chloroformu, avšak emitoval záření o vyšší vlnové délce než kurkumin v chloroformu. Toto zjištění souvisí s polárním charakterem prostředí, který disipuje energii emitovaného záření a do jisté míry zhasí fluorescenci. Z technických důvodů nebylo možné provést měření excitačně-emisních spekter konjugátu ve vodném prostředí, která by této práci přinesla další poznatky k charakteru připraveného konjugátu kurkuminu a hyaluronanu.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] VALACHOVÁ, Katarína; HASSAN, Mohamed E. a ŠOLTÉS, Ladislav. Hyaluronan: Sources, Structure, Features and Applications. Online. *Molecules*. 2024, roč. 29, č. 3. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules29030739>.
- [2] SIMONI, Robert D.; HILL, Robert L.; VAUGHAN, Martha a HASCALL, Vincent. The Discovery of Hyaluronan by Karl Meyer: Sources, Structure, Features and Applications. Online. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, roč. 277, č. 39, s. e1-e2. ISSN 00219258. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)36679-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)36679-1).
- [3] ABDEL-RAHMAN, Rasha. M.; ABDEL-MOHSEN, A. M.; VAUGHAN, Martha a HASCALL, Vincent. Marine Biomaterials: Hyaluronan. Online. *Marine Drugs*. 2023, roč. 21, č. 8, s. e1-e2. ISSN 1660-3397. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/md21080426>.
- [4] KOBAYASHI, Takashi; CHANMEE, Theerawut; ITANO, Naoki a HASCALL, Vincent. Hyaluronan: Metabolism and Function. Online. *Biomolecules*. 2020, roč. 10, č. 11, s. e1-e2. ISSN 2218-273X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/biom10111525>.
- [5] FALLACARA, Arianna; BALDINI, Erika; MANFREDINI, Stefano a VERTUANI, Silvia. Hyaluronic Acid in the Third Millennium: Metabolism and Function. Online. *Polymers*. 2018, roč. 10, č. 7, s. e1-e2. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym10070701>.
- [6] LIEROVA, Anna; KASPAROVA, Jitka; FILIPOVA, Alzbeta; CIZKOVA, Jana; PEKAROVA, Lenka et al. Hyaluronic Acid: Known for Almost a Century, but Still in Vogue. Online. *Pharmaceutics*. 2022, roč. 14, č. 4, s. e1-e2. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040838>.
- [7] ZHAO, Haibo; YU, Jing; ZHANG, Renshuai; CHEN, Pengwei; JIANG, Hongfei et al. Doxorubicin prodrug-based nanomedicines for the treatment of cancer: Known for Almost a Century, but Still in Vogue. Online. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2023, roč. 258, č. 4, s. e1-e2. ISSN 02235234. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115612>.
- [8] ZHANG, Renshuai; ZHAO, Xiaohua; JIA, Ang; WANG, Chao; JIANG, Hongfei et al. Hyaluronic acid-based prodrug nanomedicines for enhanced tumor targeting and therapy: A review. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023, roč. 249, č. 4, s. e1-e2. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125993>.
- [9] DYTRYCH, Petr; KEJÍK, Zdeněk; HAJDUCH, Jan; KAPLÁNEK, Robert; VESELÁ, Kateřina et al. Therapeutic potential and limitations of curcumin as antimetastatic agent: A review. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023, roč. 163, č. 4, s. e1-e2. ISSN 07533322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114758>.
- [10] LA GATTA, Annalisa; RICCI, Giulia; STELLAVATO, Antonietta; CAMMAROTA, Marcella; FILOSA, Rosanna et al. Hyaluronan hydrogels with a low degree of modification as scaffolds for cartilage engineering: A review. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017, roč. 103, č. 4, s. 978-989. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.091>.
- [11] SANZ-RAMOS, Marcos; BLADÉ, Ernest; SILVA-CANCINO, Nathalia; SALAZAR, Fernando; LÓPEZ-GÓMEZ, David et al. A Probabilistic Approach for Off-Stream

- Reservoir Failure Flood Hazard Assessment: A review. Online. *Water*. 2023, roč. 15, č. 12, s. 978-989. ISSN 2073-4441. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/w15122202>.
- [12] KIM, Ji-Eon; SYKES, Jonathan; SILVA-CANCINO, Nathalia; SALAZAR, Fernando; LÓPEZ-GÓMEZ, David et al. Hyaluronic Acid Fillers: History and Overview. Online. *Facial Plastic Surgery*. 2011, roč. 27, č. 06, s. 523-528. ISSN 0736-6825. Dostupné z: <https://doi.org/10.1055/s-0031-1298785>.
- [13] FAIVRE, Jimmy; GALLET, Mélanie; TREMBLAIS, Elodie; TRÉVIDIC, Patrick; BOURDON, François et al. Advanced Concepts in Rheology for the Evaluation of Hyaluronic Acid-Based Soft Tissue Fillers: History and Overview. Online. *Dermatologic Surgery*. 2021, roč. 47, č. 5, s. e159-e167. ISSN 1076-0512. Dostupné z: <https://doi.org/10.1097/DSS.0000000000002916>.
- [14] HUANG, Yiwen; ZHANG, Yibin; FEI, Xiaojing; FAN, Qi; MAO, Jie et al. Monophasic and Biphasic Hyaluronic Acid Fillers for Esthetic Correction of Nasolabial Folds: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. Online. *Aesthetic Plastic Surgery*. 2022, roč. 46, č. 3, s. 1407-1422. ISSN 0364-216X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00266-021-02729-y>.
- [15] HEE, Christopher K.; SHUMATE, Garrett T.; NARURKAR, Vic; BERNARDIN, Aude; MESSINA, Darin J. et al. Rheological Properties and In Vivo Performance Characteristics of Soft Tissue Fillers: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. Online. *Dermatologic Surgery*. 2015, roč. 41, č. Supplement 1, s. S373-S381. ISSN 1076-0512. Dostupné z: <https://doi.org/10.1097/DSS.0000000000000536>.
- [16] EDSMAN, Katarina L.M. a ÖHRLUND, Åke. Cohesion of Hyaluronic Acid Fillers: Correlation Between Cohesion and Other Physicochemical Properties. Online. *Dermatologic Surgery*. 2018, roč. 44, č. 4, s. 557-562. ISSN 1076-0512. Dostupné z: <https://doi.org/10.1097/DSS.0000000000001370>.
- [17] LEE, Won; OH, Wook; MOON, Hyung-Jin; KOH, Ik-Soo a YANG, Eun-Jung. Soft Tissue Filler Properties Can Be Altered by a Small-Diameter Needle: Correlation Between Cohesion and Other Physicochemical Properties. Online. *Dermatologic Surgery*. 2020, roč. 46, č. 9, s. 1155-1162. ISSN 1076-0512. Dostupné z: <https://doi.org/10.1097/DSS.0000000000002220>.
- [18] Lodish, Harvey F. *Molecular cell biology*. 6th ed. New York: Macmillan, 2008.
- [19] KODÍČEK, Milan a KARPENKO, Vladimír. *Biofyzikální chemie*. Vyd. 3., opr. a rozš. Praha: Academia, 2013. ISBN 978-80-200-2241-7.
- [20] SNETKOV, Petr; ZAKHAROVA, Kseniia; MOROZKINA, Svetlana; OLEKHNOVICH, Roman a USPENSKAYA, Mayya. Hyaluronic Acid: The Influence of Molecular Weight on Structural, Physical, Physico-Chemical, and Degradable Properties of Biopolymer. Online. *Polymers*. 2020, roč. 12, č. 8, s. 1155-1162. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym12081800>.
- [21] ATKINS, Peter William, et al. *Physical chemistry for the life sciences*. Oxford University Press, 2023.
- [22] TANZI, Maria Cristina; FARÈ, Silvia; CANDIANI, Gabriele. *Foundations of biomaterials engineering*. Academic Press, 2019.
- [23] HELDIN, Carl-Henrik; LU, Benson; EVANS, Ron; GUTKIND, J. Silvio a USPENSKAYA, Mayya. Signals and Receptors: The Influence of Molecular Weight on

- Structural, Physical, Physico-Chemical, and Degradable Properties of Biopolymer. Online. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2016, roč. 8, č. 4, s. 1155-1162. ISSN 1943-0264. Dostupné z: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005900>.
- [24] KEW, James NC; DAVIES, Ceri H. (ed.). *Ion channels: from structure to function*. Oxford University Press, 2010.
- [25] OUYANG, Qiuhong; ZHAO, Ying; XU, Kunyao; HE, Yuechen a QIN, Meng. Hyaluronic Acid Receptor-Mediated Nanomedicines and Targeted Therapy: The Influence of Molecular Weight on Structural, Physical, Physico-Chemical, and Degradable Properties of Biopolymer. Online. *Small Methods*. 2016, roč. 8, č. 4, s. 1155-1162. ISSN 2366-9608. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/smt.202400513>.
- [26] TRUCILLO, Paolo; ZHAO, Ying; XU, Kunyao; HE, Yuechen a QIN, Meng. Drug Carriers: Classification, Administration, Release Profiles, and Industrial Approach. Online. *Processes*. 2021, roč. 9, č. 3, s. 1155-1162. ISSN 2227-9717. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pr9030470>.
- [27] SULTANA, Afreen; ZARE, Mina; THOMAS, Vinoy; KUMAR, T.S. Sampath a RAMAKRISHNA, Seeram. Nano-based drug delivery systems: Conventional drug delivery routes, recent developments and future prospects. Online. *Medicine in Drug Discovery*. 2022, roč. 15, č. 3, s. 1155-1162. ISSN 25900986. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2022.100134>.
- [28] ANSARI, Mojabir Hussen a YADAV, Sonam S. Nanotechnology: Reviewing the New Concept of Drug Delivery. Online. 2023, roč. 13, č. 01, s. 01-08. ISSN 22312188. Dostupné z: <https://doi.org/10.31782/IJMPS.2023.13101>.
- [29] RAMBARAN, Theresa F. a YADAV, Sonam S. Nanopolyphenols: a review of their encapsulation and anti-diabetic effects. Online. *SN Applied Sciences*. 2020, roč. 2, č. 8, s. 01-08. ISSN 2523-3963. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s42452-020-3110-8>.
- [30] NSAIRAT, Hamdi; KHATER, Dima; SAYED, Usama; ODEH, Fadwa; AL BAWAB, Abeer et al. Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. Online. *Heliyon*. 2022, roč. 8, č. 5, s. 01-08. ISSN 24058440. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09394>.
- [31] PERUMAL, Suguna; ATCHUDAN, Raji; LEE, Wonmok; ODEH, Fadwa; AL BAWAB, Abeer et al. A Review of Polymeric Micelles and Their Applications: structure, composition, types, and clinical applications. Online. *Polymers*. 2022, roč. 14, č. 12, s. 01-08. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym14122510>.
- [32] BARUWATI, Babita; RANA, Rohit Kumar; MANORAMA, Sunkara V.; ODEH, Fadwa; AL BAWAB, Abeer et al. Further insights in the conductivity behavior of nanocrystalline NiFe₂O₄: structure, composition, types, and clinical applications. Online. *Journal of Applied Physics*. 2007, roč. 101, č. 1, s. 01-08. ISSN 0021-8979. Dostupné z: <https://doi.org/10.1063/1.2404772>.
- [33] PÉREZ-FERREIRO, María; M. ABELAIRAS, Adrián; CRIADO, Alejandro; GÓMEZ, I. Jéniffer; MOSQUERA, Jesús et al. Dendrimers: Exploring Their Wide Structural Variety and Applications. Online. *Polymers*. 2023, roč. 15, č. 22, s. 01-08. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym15224369>.

- [34] JAIN, Keerti; KESHARWANI, Prashant; GUPTA, Umesh; JAIN, N.K.; MOSQUERA, Jesús et al. Dendrimer toxicity: Let's meet the challenge. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010, roč. 394, č. 1-2, s. 122-142. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.04.027>.
- [35] HO, Tzu-Chuan; CHANG, Chin-Chuan; CHAN, Hung-Pin; CHUNG, Tze-Wen; SHU, Chih-Wen et al. Hydrogels: Properties and Applications in Biomedicine. Online. *Molecules*. 2022, roč. 27, č. 9, s. 122-142. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules27092902>.
- [36] KESHARWANI, Payal; BISHT, Akansha; ALEXANDER, Amit; DAVE, Vivek; SHARMA, Swapnil et al. Biomedical applications of hydrogels in drug delivery system: An update. Online. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2021, roč. 66, č. 9, s. 122-142. ISSN 17732247. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102914>.
- [37] KASAI, R. Deepak; RADHIKA, Devi; ARCHANA, S.; SHANAVAZ, H.; KOUTAVARAPU, Ravindranadh et al. A review on hydrogels classification and recent developments in biomedical applications: An update. Online. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 2023, roč. 72, č. 13, s. 1059-1069. ISSN 0091-4037. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/00914037.2022.2075872>.
- [38] MANJU, S.; SREENIVASAN, K.; ARCHANA, S.; SHANAVAZ, H.; KOUTAVARAPU, Ravindranadh et al. Conjugation of curcumin onto hyaluronic acid enhances its aqueous solubility and stability: An update. Online. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2011, roč. 359, č. 1, s. 318-325. ISSN 00219797. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.03.071>.
- [39] LI, Jinglei; SHIN, Gye Hwa; CHEN, Xiguang; PARK, Hyun Jin; KOUTAVARAPU, Ravindranadh et al. Modified curcumin with hyaluronic acid: Combination of pro-drug and nano-micelle strategy to address the curcumin challenge. Online. *Food Research International*. 2015, roč. 69, č. 1, s. 202-208. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.045>.
- [40] SHARMA, Mrinalini; SAHU, Khageswar; SINGH, Surya Prakash; JAIN, Beena; KOUTAVARAPU, Ravindranadh et al. Wound healing activity of curcumin conjugated to hyaluronic acid: in vitro and in vivo evaluation: Combination of pro-drug and nano-micelle strategy to address the curcumin challenge. Online. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2018, roč. 46, č. 5, s. 1009-1017. ISSN 2169-1401. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1358731>.
- [41] YU, Dongjie; ZHUANG, Ze; REN, Jianhua; HU, Xuefeng; WANG, Zhe et al. Hyaluronic acid-curcumin conjugate suppresses the fibrotic functions of myofibroblasts from contractive joint by the PTGER2 demethylation: Combination of pro-drug and nano-micelle strategy to address the curcumin challenge. Online. *Regenerative Biomaterials*. 2019, roč. 6, č. 5, s. 269-277. ISSN 2056-3418. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/rb/rbz016>.
- [42] LAI, Hualu; DING, Xin; YE, Junxian; DENG, Jie; CUI, Shengmiao et al. PH-responsive hyaluronic acid-based nanoparticles for targeted curcumin delivery and enhanced cancer therapy: Combination of pro-drug and nano-micelle strategy to address the curcumin

- challenge. Online. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2021, roč. 198, č. 5, s. 269-277. ISSN 09277765. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111455>.
- [43] VERDOLIVA, Valentina; MUZIO, Giuliana; AUTELLI, Riccardo; SAVIANO, Michele; BEDINI, Emiliano et al. Microwave-Assisted, Solid-State Procedure to Covalently Conjugate Hyaluronic Acid to Curcumin: Validation of a Green Synthetic Protocol. Online. *ACS Polymers Au*. 2024, roč. 4, č. 3, s. 214-221. ISSN 2694-2453. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acspolymersau.3c00047>.
- [44] WU, Shuai; ZHU, Li; NI, Sheng; ZHONG, Yuan; QU, Kai et al. Hyaluronic acid-decorated curcumin-based coordination nanomedicine for enhancing the infected diabetic wound healing: Validation of a Green Synthetic Protocol. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024, roč. 263, č. 3, s. 214-221. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130249>.
- [45] MONDAL, Satyajit; GHOSH, Soumen a MOULIK, Satya P. Stability of curcumin in different solvent and solution media: UV–visible and steady-state fluorescence spectral study. Online. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2016, roč. 158, s. 212-218. ISSN 10111344. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.03.004>.
- [46] MOHAMMED, Fatima; RASHID-DOUBELL, Fiza; CASSIDY, Seamas a HENARI, Fryad. A comparative study of the spectral, fluorometric properties and photostability of natural curcumin, iron- and boron- complexed curcumin: UV–visible and steady-state fluorescence spectral study. Online. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2017, roč. 183, s. 439-450. ISSN 13861425. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.04.027>.