



# 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

# NATIVNÍ HYALURONAN JAKO NOSIČ HYDROFOBNIÍCH LÉČIV

NATIVE HYALURONAN AS A DELIVERY SYSTEM FOR HYDROPHOBIC DRUGS

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Eva Černá

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

BRNO 2018

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1193/2017  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Eva Černá**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.**  
Akademický rok: 2017/18

### Název bakalářské práce:

Nativní hyaluronan jako nosič hydrofobních léčiv

### Zadání bakalářské práce:

1. Seznámit se s problematikou nosičů léčiv s důrazem na hydrofobní léčiva.
2. Seznámit se s využitím hyaluronanu v nosičových systémech léčiv, zaměřit se zejména na využití hyaluronanu v nemodifikované formě a dosavadní výsledky získané na FCH v této oblasti.
3. Na základě poznatků získaných v předchozích bodech navrhnout jednoduché nosičové systémy na bázi nativního hyaluronanu a provést ověřovací experimenty s modelovými hydrofobními látkami (barvivy).
4. Zhodnotit výsledky experimentů a navrhnout další postup.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 21.5.2018

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

-----  
Eva Černá  
student(ka)

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

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

V Brně dne 31.1.2018

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## ABSTRAKT

Cílem této bakalářské práce je zjistit, zda by bylo možné využít nativní formu kyseliny hyaluronové jako nosič hydrofobních léčiv pro cílenou distribuci v organismu. Svou strukturou je kyselina hyaluronová lineární vysokomolekulární biopolysacharid, který nacházíme ve většině živých organismů. V lidském těle se vyskytuje ve většině tkání, jeho vysokou koncentraci nacházíme zejména v pokožce a očním sklivci. Podílí se na mnoha fyziologických procesech a pro fungování celého organismu je hyaluronan nezbytný. Jeho vysoká koncentrace je také pozorována u rakovinných buněk, které obsahují několik receptorů pro hyaluronan. Mezi tyto receptory řadíme CD44 a RHAMM. Právě interakce nosičového systému kyseliny hyaluronové a hydrofobního léčiva s těmito receptory by mohla zajistit volný průchod pro léčivo do postižené tkáně, kde po uvolnění léčiva dojde k usmrcení postižených buněk. Léčivo by bylo tedy přímo cílené na poškozenou tkáň a nezatěžovalo by zbytek organismu, jak tomu v současné době bývá při léčbě cytostatiky. Jako nosič byla v této práci vybrána právě nativní forma kyseliny hyaluronové, kterou běžně najdeme v lidském organismu. Svými vlastnosti nevyčníká nad ostatními nosičovými systémy, ale svou biokompatibilitou a biodegradabilitou v organismu je vysoce přesahuje. Jako nosič byla v práci využita vysokomolekulární kyselina hyaluronová a místo hydrofobního léčiva byla použita látka podobných vlastností, hydrofobní barvivo sudan red G.

## ABSTRACT

The aim of this paper is to discover whether it is possible to use the native form of hyaluronic acid as a hydrophobic drug carrier for a targeted distribution in the body. In its structure, hyaluronic acid is a linear high molecular weight biopolysaccharide which is found in most living organisms. Hyaluronan is involved in many physiological processes and therefore is essential for the functionality of the human body. It is in most tissues of the human body, high concentration is in the skin, the vitreous body and is also observed in cancer cells that contain several receptors for hyaluronan. These receptors include CD44 and RHAMM. The interaction of the hyaluronic acid delivery system and the hydrophobic medicinal with these receptors could ensure a free passage for drugs to the affected tissue, where the release of the drug would destroy the affected cells. The drug would directly target the damaged tissue and did not burden the rest of the body like the cytotoxic agents do. In this paper the native form of hyaluronic acid, which we normally find in the human organism, was chosen as the carrier. Its properties do not stand above other carrier systems, but its biocompatibility and biodegradability in the body greatly exceed them. High molecular weight hyaluronic acid was used as a carrier and the hydrophobic dye sudan red G, a substance of similar properties, was used instead of a hydrophobic drug.

## KLÍČOVÁ SLOVA

kyselina hyaluronová, nativní, hyaluronan, hydrofobní léčivo, cílená distribuce léčiv, nosič léčiv, CD44, RHAMM, receptor, rakovina, sudan red G, mikroskopie, UV-VIS spektroskopie, distribuce velikosti částic

## KEYWORDS

hyaluronic acid, native, hyaluronan, hydrophobic drug, targeting drug delivery, drug carrier, CD44, RHAMM, receptor, cancer, sudan red G, microscopy, UV-VIS spectroscopy, dynamic light scattering

ČERNÁ, E. *Nativní hyaluronan jako nosič hydrofobních léčiv*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 42 s. Vedoucí bakalářské práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc..

#### PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová 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.

.....

podpis studenta

#### PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala vedoucímu své bakalářské práce prof. Ing. Miloslavu Pekařovi, CSc. za všechny rady týkající se bakalářské práce a za veškerý čas, který mi věnoval během psaní bakalářské práce. Dále bych s vděčností chtěla poděkovat své rodině, která mě po celou dobu studia neustále podporovala.

## OBSAH

1. Úvod .....	7
2. Teoretická část .....	8
2.1. Kyselina hyaluronová .....	8
2.1.1. Historie .....	8
2.1.2. Glykosaminoglykany .....	9
2.1.3. Chemická struktura a struktura v roztoku .....	9
2.1.4. Viskozita, molekulová hmotnost a koncentrace .....	11
2.1.5. Zdroje a výskyt .....	12
2.1.6. syntéza degradace .....	12
2.1.7. Lékařské využití hyaluronanu .....	14
2.1.8. Nosič hydrofobních léčiv .....	14
2.1.9. Využití hyaluronanu při karcinogenních procesech .....	15
2.1.10. Receptory hyaluronanu .....	16
2.2. UV-VIS spektroskopie .....	17
2.3. Dynamický rozptyl světla .....	19
3. Praktická část .....	20
3.1. Materiály .....	20
3.2. Přístroje .....	21
3.3. Příprava vzorků .....	21
3.4. Měření .....	21
3.4.1. Vizuální pozorování .....	21
3.4.2. Výpočet rychlosti sedimentace částic sudanu red G .....	22
3.4.3. Pozorování částic sudanu red G, hyaluronanu a jejich směs v práškové formě a jako film prostřednictvím mikroskopie .....	23
3.4.4. Měření vzorků na spektrofotometru Hitachi U3900H .....	23
3.4.5. Měření velikosti částic vzorků na Zetasizeru Nano ZS .....	24
4. Výsledky a diskuse .....	25
4.1. Vizuální pozorování .....	25
4.2. Výpočet rychlosti sedimentace částic sudanu red G .....	29
4.3. Vyhodnocení tvaru částic sudanu red G, hyaluronanu a jejich směsi v práškové formě a ve formě filmů prostřednictvím mikroskopie .....	30
4.4. Vyhodnocení dat na spektrofotometru Hitachi U3900H .....	35
4.5. Vyhodnocení dat velikosti částic vzorků na Zetasizeru Nano ZS .....	38
5. závěr .....	39

6. citace .....40

## 1. ÚVOD

V dnešním uspěchaném světě, který žene dopředu rychlý vývoj, můžeme pozorovat viditelné pokroky, které mají v lékařském odvětví velký vliv na léčbu rakovinného bujení. Tato bakalářská práce je zaměřena na zkoumání vlastností nativní formy kyseliny hyaluronové a posouzení, zda by byla vhodná jako nosič pro cílenou distribuci hydrofobních léčiv v lidském organismu. K léčbě rakoviny se v současné době používají zejména cytostatika, která jsou nespecificky distribuována v těle, dochází tedy ke zbytečné zátěži celého organismu, které je intoxikováno. Za odrazový můstek pro efektivnější a šetrnější léčbu jsou v současnosti považovány nosiče, které jsou díky svým vlastnostem schopny dopravit léčivo přímo do místa působení, cílí tedy na pouze maligní tkáň. Vzhledem ke svým vlastnostem se jeví, že by se v této oblasti dalo využít právě kyseliny hyaluronové, kterou nacházíme ve většině tkání. Organismus by bez ní nebyl schopen fungovat, podílí se totiž na mnoha fyziologických procesech. Vysokou koncentraci hyaluronanu nacházíme v pokožce, synoviální tekutině, či očním sklivci. Z hlediska léčby rakovinného bujení je významný jeho hojný výskyt v okolí maligní tkáně. Přítomnost hyaluronanu je tam zejména způsobena přítomností receptorů, které jsou schopny hyaluronan specificky navázat a poté transportovat do tkáně. Receptory schopné interakce s hyaluronanem nazýváme CD44 a RHAMM. V principu by mělo docházet k tomu, že se do struktury hyaluronanu naváže hydrofobní léčivo, které je pomocí specifické interakce s receptory cíleně dopraveno do maligní tkáně, kde dochází k uvolnění léčiva, které následně usmrtí postiženou buňku. Využití nativního hyaluronanu v oblasti cílené distribuce léčiv tkví zejména v jeho biokompatibilitě a biodegradabilitě v organismu. Je známo, že se k cílené distribuci léčiv využívají i jiné látky. Jednou z těchto látek, které mají obrovský potenciál, je modifikovaná forma kyseliny hyaluronové, která oproti nativní formě obsahuje větší množství hydrofobních skupin schopných navázat hydrofobní léčivo. Dalšími nosiči můžou být liposomy, micely, či hydrogely nebo nanočástice. Pro distribuci léčiv se jedná o látky vhodné, zejména svým hydrofobním charakterem a stabilitou. Oproti hyaluronanu se ale nejedná o látky tělu vlastní, proto je tato práce zaměřena právě na hyaluronan, s jehož pomocí by mělo docházet k mnohem šetrnější léčbě rakoviny.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. KYSELINA HYALURONOVÁ

Kyselina hyaluronová by se obecně dala charakterizovat jako vysokomolekulární polysacharid, který je tvořen dvěma pravidelně se opakujícími podjednotkami. Jedná se o sloučeninu, která se svou strukturou velmi podobá sacharidům a skupina do které ji řadíme, je nazývána glykosaminoglykany. Dříve byla známa pod jménem mukopolysacharidy. Kyselinu hyaluronovou lze zkráceně označit jako HA, což odpovídá její zkratce z anglického názvu hyaluronic acid. Ve většině případů ji nacházíme v živých organismech, kde se ale nevyskytuje ve své základní formě, jako kyselina. V organismech ji nejčastěji nacházíme ve formě soli, sodné. Její další formou je draselná sůl. Tuto sůl obecně nazýváme hyaluronát. Setkáváme se tedy buď s hyaluronátem sodným nebo draselným. Zkráceně je tato forma označována jako „hyaluronan“. Právě hyaluronan, který byl objeven poměrně nedávno, je neodmyslitelnou součástí všech živých organismů, kde vykonává mnoho důležitých biologických funkcí. Přirozeně ho najdeme skoro ve všech tkáních. Jeho vysokou koncentraci nacházíme v očním sklivci nebo pupeční šňůře. V menší míře je také obsažen v pojivové tkáni či mezibuněčné hmotě. Co se jeho základní struktury týče, jedná se o nerozvětvený polymerní řetězec, který je tvořen disacharidovou jednotkou. Tato podjednotka tvořena dvěma sacharidy, kterými je kyselina D-glukuronová a N-acetyl-D-glukosamin. Řetězce hyaluronanu mohou být velice dlouhé. Z toho lze usoudit, že se jedná o vysokomolekulární látku. V závislosti na délce řetězce lze získat látku s obrovskou molekulovou hmotností, která se pohybuje až v řádu několika miliónů Dalton. V lidském organismu se vyskytují vysokomolekulární řetězce hyaluronanu s molekulovou hmotností až do 5 MDa. Délka řetězce odpovídající této molekulové hmotnosti může dosahovat až 10  $\mu\text{m}$  [1, 2].

#### 2.1.1. HISTORIE

Kyselina hyaluronová byla poprvé objevena a izolována v průběhu 30. let 20. století. Přesně řečeno byla popsána v roce 1934 Karlem Mayerem a jeho asistentem Johnem Palmerem. Tato dříve neznámá sloučenina byla zmíněnými vědci izolována z očního sklivce hovězího dobytka. Z výsledků svého výzkumu vyvodili, že látka, kterou izolovali, tvoří dvě sacharidové podjednotky. Jednu z těchto molekul se jim podařilo identifikovat jako uronovou kyselinu. Tento objev dal za vznik názvu této sloučeniny. Vznikl spojením názvu objevené kyseliny uronové a slova hyaloid, což lze překládat jako „čočka“. Kombinací těchto slov nám vznikne kyselina hyaluronová. Tohle pojmenování se od objevu dobře uchytilo a je stále používáno. Je důležité podotknout, že Karl Mayer a John Palmer v roce 1934 sice hyaluronan jako první izolovali a dali mu jeho název, bohužel nebyli schopni úplně popsat jeho strukturu. Ta byla plně objasněna až v pozdějších letech, přesněji v 50. letech 20. století. Vědec, který odhalil celou strukturu studovaného polysacharidu, nebyl nikdo jiný, než její objevitel Karl Palmer, spolu se svými spolupracovníky. Co se dalšího objasňování struktury kyseliny hyaluronové týče, v roce 1986 bylo zjištěno, že se v organismu hyaluronan prakticky nikdy nenachází ve formě kyseliny. Naopak ho nacházíme ve formě solí sodné a nebo draselné, které jsou pro lidské tělo mnohem výhodnější z toho důvodu, že mají fyziologické pH. Struktura byla během let plně objevena a prostudována, ale i v dnešní době stále nalézáme nové možnosti využití hyaluronanu v mnoha odvětvích průmyslu. Už pár let po objevení byl hyaluronan průmyslově využit. K prvnímu většímu komerčnímu využití došlo v roce 1942, kdy byla kyselina hyaluronová patentována pro využití v pekařském průmyslu. Její využití spočívalo v náhradě vaječných bílků hyaluronanem. Kyselina hyaluronová měla již od svého objevu potenciál

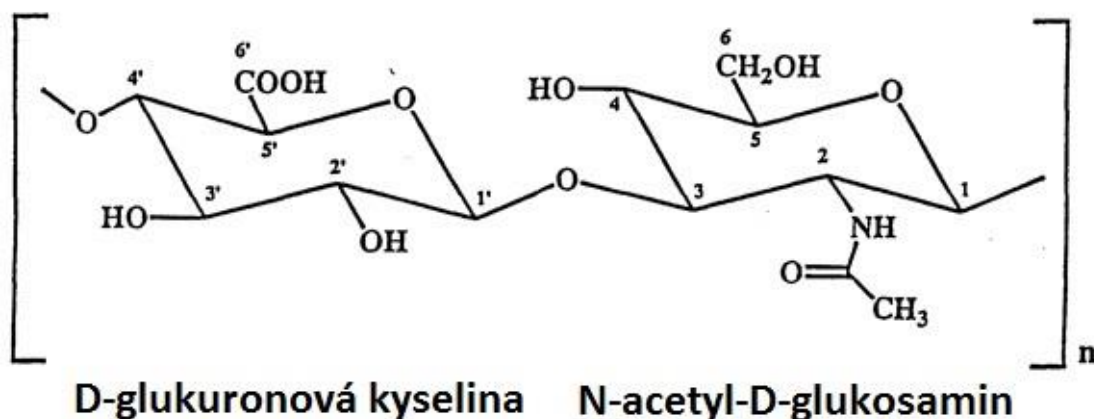
být velice prospěšnou látkou. V dalších letech stále nabývala na důležitosti, a to díky jejímu dalšímu prostudování a odkryvání jedinečných vlastností. K prvnímu lékařskému využití hyaluronanu došlo v 50. letech. Byla tedy poprvé využita pro medicínské účely, kde sloužila jako náhrada očního sklivce při operacích očí [1][3].

### 2.1.2. GLYKOSAMINOGLYKANY

Kyselina hyaluronová je dle své struktury a složení zařazována do skupiny analogické k sacharidům. Tato skupina nese označení „glykosaminoglykany“, dříve byly známy pod názvem jiným názvem, „mucopolysacharidy“. Kromě kyseliny hyaluronové v této skupině nacházíme mnoho dalších polysacharidů, které byly podobně jako hyaluronan pojmenované podle místa jejich objevení. Jedním z důležitých glykosaminoglykanů je chondroitinsulfát, který byl poprvé objeven v chrupavce. Dalším zástupcem je keratansulfát izolovaný z rohovky, nebo dermatansulfát, který byl poprvé izolován z kůže neboli dermis. Aby byla molekula polysacharidu řazena mezi glykosaminoglykany, musí splňovat určité požadavky, které jsou pro všechny zástupce této skupiny charakteristické. Polysacharidy řazené do této skupiny jsou vždy přítomné ve formě nerozvětveného polymerního řetězce složeného z dvou opakujících se disacharidových jednotek. První podjednotku tvoří glykosaminoglykan který je aminosacharidem. Druhá sacharidová složka obvykle obsahuje uronovou kyselinou, která je zdrojem záporného náboje. Dle typu molekul jsou záporně nabitě skupiny buď karboxylové, nebo sulfátové. Výjimkou je keratansulfát, ten ve své struktuře nahrazuje uronovou kyselinu galaktózou. Všechny sloučeniny glykosaminoglykanů mají v lidském organismu důležitou úlohu. Některá místa jejich působení lze lehce odvodit z jejich názvu. Glykosaminoglykany mají různou strukturu a paradoxně se za nejjednodušší polysacharid nacházející se v této skupině považuje kyselina hylauronová. Tato skutečnost je dána tím, že na rozdíl od všech ostatních polysacharidů této skupiny, které obsahují sulfátovou skupinu, obsahuje hyaluronan karboxylovou skupinu. Obvyklá molekulová hmotnost glykosaminoglykanů se pohybuje v rozmezí 15 – 20 kDa. Tento fakt ovšem nemůžeme potvrdit u kyseliny hyaluronové, která má velkou škálu molekulových hmotností. Jedná se o další význačný rozdíl, který je třeba vzít v potaz, protože hyaluronan nacházíme i v molekulových hmotnostech v řádu milionů Dalton [1].

### 2.1.3. CHEMICKÁ STRUKTURA A STRUKTURA V ROZTOKU

Základní struktura kyseliny hyaluronové je ve formě nevětveného lineárního polysacharidu, který je tvořen jednou disacharidovou podjednotkou, která se ve struktuře pravidelně opakuje. Tato podjednotka je tvořena uronovou kyselinou a aminosacharidem. Celý název těchto sloučenin je D-glukuronová kyselina a N-acetyl-D-glukosamin. Tyto dvě základní složky se navzájem propojují pomocí glykosidických vazeb  $\beta$ -1,4 a  $\beta$ -1,3, které jsou kovalentního charakteru. Glukuronová kyselina a N-acetylglukosamin jsou spojeny  $\beta$ -1,3 vazbou. Naopak N-acetylglukosamin se na glukuronovou kyselinu navazuje  $\beta$ -1,4 vazbou. Právě díky tomuto pravidelnému střídání glykosidických vazeb  $\beta$ -1,4 a  $\beta$ -1,3 se kyselina hyaluronová nachází v lineární formě bez možnosti vzniku postranních řetězců [1, 2]. Struktura kyseliny hyaluronové je znázorněna na obrázku č. 1, kde lze vidět jednotlivé vazby  $\beta$ -1,3 a  $\beta$ -1,4.



Obrázek 1: kyselina hyaluronová [6]

Glykosidické vazby nejsou ale jediný druh vazeb, který se v řetězci nachází. Každá glykosidická vazba je navíc stabilizována díky přítomnosti vodíkových můstků, které tuto strukturu upevňují. Přítomnost  $\beta$  konfigurace zajišťuje dostatečně stabilní strukturu disacharidu, která je pro daný systém energeticky nejvýhodnější. K tomuto jevu dochází díky přítomnosti různých skupin na podjednotkách disacharidu. Zahrnujeme mezi ně všechny objemné skupiny, mezi které řadíme skupiny hydroxylové a karboxylové, jež nacházíme na stericky příznivých ekvatoriálních pozicích. Naopak pokud se podíváme na méně objemné skupiny, mezi které u hyaluronanu řadíme vodíkové atomy, pozorujeme, že se nachází v pozicích axiálních, které jsou stericky méně výhodné. Celý tento jev prostorového uspořádání je dán tím, že se na již zmíněných výhodných ekvatoriálních polohách v řetězci nachází polární hydrofilní část, a na vodíkových atomech v axiální poloze vzniká takzvaný „hydrophobic patch“, jehož charakter je nepolární. Z tohoto uspořádání vzniká charakteristická struktura, která je pojmenovaná podle svého tvaru, která připomíná stočenou stuhu. Tato struktura vzniká tak, že jednotky sacharidů, které jsou mezi sebou vázány kyslíkem, mají tu schopnost, že dokážou rotovat kolem své osy o  $360^\circ$ , i když nemají ve svém pohybu naprostou volnost, vzhledem k jednotlivým konfiguračním vazeb v molekule. Přesněji dochází k tomu, že je každá disacharidová jednotka vůči každé následující přetočena o  $180^\circ$ . Dochází tedy k tomu, že se s každou dvojicí disacharidů dostaneme na původní orientaci. Tím se vytvoří šroubovice, která se všeobecně označuje jako dvakrát stočená šroubovice. V této struktuře se pravidelně střídají hydrofobní a hydrofilní oblasti. V hydrofobních oblastech kyseliny hyaluronové můžeme pozorovat růst agregátů, ke kterému dochází díky agregaci antiparalelních řetězců hyaluronanu po obou stranách. Je všeobecně známo, že má hyaluronan velice dobré hydrofilní vlastnosti a dokáže na sebe navázat mnohonásobně větší množství vody, než je její vlastní hmotnost. Schopnost pojmout obrovské množství vody se pohybuje až v řádu tisíců z její původní hmotnosti. Nejčastěji se s kyselinou hyaluronovou setkáváme ve formě vodného roztoku, kde se vyskytuje jako polyaniont. Pokud se hyaluronan nachází ve vodném roztoku, dochází k tomu, že se hydrofobní části řetězce přibližují a seskupují tak, aby co nejvíce zabránili kontaktu s vodným prostředím, a nachází se tedy v axiální poloze, která je pro něj v rámci energetických možností nejvýhodnější. S vědomím, že se na hyaluronanu nachází jak výrazné hydrofilní oblasti, tak i oblasti hydrofobní, můžeme jej zařadit mezi látky, které mají amfifilní charakter. Důležitou roli na vlastnostech hyaluronanu v roztoku udává vodné

prostředí, ve kterém se nachází. Nejen v závislosti na pH, ale i ze závislostí na molekulové hmotnosti nebo koncentraci získáváme různě viskózní roztoky [1, 3, 4, 5].

#### 2.1.4. VISKOZITA, MOLEKULOVÁ HMOTNOST A KONCENTRACE

Primární struktura kyseliny hyaluronové je vždy stejná, opakující se disacharidová jednotka. V závislosti na zdroji, ze kterého se hyaluronan izoluje lze pozorovat značné rozdíly, které jsou v první řadě důsledkem velice pestré škály molekulových hmotností, se kterými je neoddělitelně spojena různá délka samotného řetězce. Dalším faktorem ovlivňující vlastnosti a funkci hyaluronanu je stupeň polymerizace, který je rozdílný u různých zdrojů, kterými jsou nejen lidské tkáně. V případě lidského organismu nacházíme hyaluronan skoro ve všech tkáních, v nichž se vyskytuje v odlišných molekulových hmotnostech, které mají vliv na finální funkci hyaluronanu. Pokud pracujeme s delšími řetězci o větší molekulové hmotnosti, může být daný hyaluronan použit jako lubrikant kloubů či organizátor tkáně, jelikož drží tvar. Vysokomolekulární hyaluronan je též hojně využíván v případech bezjizvého hojení. Na druhou stranu pokud je molekulová hmotnost menší až střední, je využití kyseliny hyaluronové naprosto jiné. Funkce těchto molekul spočívá ve využití v procesech informačních, migračních či regulačních. Dále se tyto nízké až středně dlouhé řetězce podílí na genové expresi makrofágů, endotelových či epitelových buňkách. Z různých zdrojů se získává hyaluronan s molekulovými hmotnostmi lišícími se i v několika řádech. V očním sklivci lze izolovat hyaluronan o poměrně nízké molekulové hmotnosti, která se nachází v rozsahu  $10^4 - 10^5$  Da. Naopak ze streptokokové struktury lze získat hyaluronan s molekulární hmotností pohybující se okolo  $10^5 - 10^6$  Da. Ještě větší molekulovou hmotnost HA lze najít v hřebínku kohoutů, kde hmotnost dosahuje velikosti  $10^6 - 10^7$  Da. Na molekulové hmotnosti je kromě délky řetězce vysoce závislá i viskozita. Nízkomolekulární hyaluronan má nižší viskozitu, naopak vysokomolekulární roztoky hyaluronanu jsou vysoce viskózní. S koncentrací je úzce spojeno i síťování hyaluronanu, a to již při nižších koncentracích. U vysokomolekulárního hyaluronanu dochází k velmi intenzivnímu síťování, které se projevuje u všech molekul. U nízkomolekulárních roztoků vznikají oddělené oblasti tvořící síť. Tyto interakce jsou hojně využívány při interakci hyaluronanu s cizími látkami, bílkovinného nebo lipidického charakteru. V tabulce č. 1 můžeme vidět výskyt různých molekulových hmotností hyaluronanu z různých živočišných zdrojů [1, 4, 5].

Tabulka č. 1: výskyt kyseliny hyaluronové v různých tkáních a živočišných druzích [7]

tkáň nebo tělní tekutina	koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ]
<b>lidské tělo</b>	
pupeční šňůra	4100
synoviální tekutina	1400-3600
sklivec	140-340
dermis	200-500
epidermis	100
hrudní míza	0,2-50
moč	0,1-0,3
krevní sérum	0,01-0,1
<b>ostatní živočichové</b>	
kohoutí hřebínek	7500
králičí mozek	65
králičí srdce	27

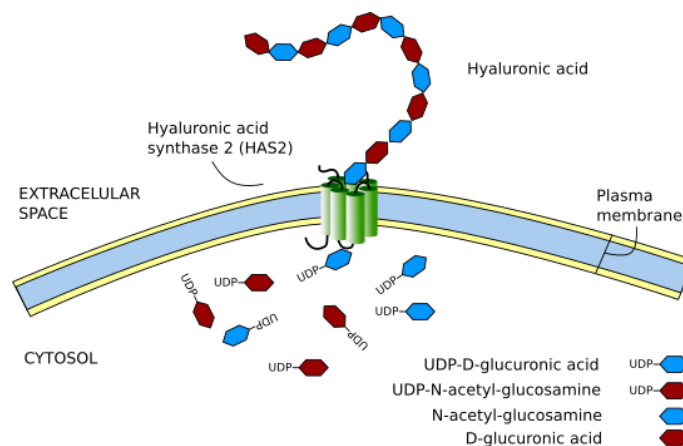
### 2.1.5. ZDROJE A VÝSKYT

Je všeobecně známo, že se hyaluronan přirozeně nachází ve všech organismech, ze kterých může být následně také izolován. U všech organismů se nachází ve většině tkání v různých molekulových hmotnostech. Například v tělech savců ji lze najít v očním sklivci, pokožce, mezibuněčné hmotě, synoviální tekutině. Pokud u lidí vezmeme v potaz celkové množství hyaluronanu v jednotlivých tkáních, tak je její největší zastoupení v pokožce. Kde je obsažena až polovina veškerého množství, ta se nachází jak v dermis, tak i epidermis s průměrnou hmotností 7 – 8 g na dospělého člověka. V menším množství se také nachází v plicích, ledvinách, mozku, svalech a dalších pojivových tkáních. Nejmenší koncentrace hyaluronanu byla nalezena v krevním séru. Celkové množství kyseliny hyaluronové se v lidském těle u dospělých jedinců pohybuje na hmotnosti okolo 20 g. V počátcích bádání kyseliny hyaluronové byla jedním z významných zdrojů pupeční šňůra. Důvodem bylo, že se jedná o tkáň, která je považována u savců za tkáň s její nejvyšší koncentrací. Naneštěstí tento zdroj nebyl pro praktické využití výhodný a zdaleka nestačil na pokrytí veškeré produkce. Z toho důvodu se hledaly vhodné alternativy. Vhodnou náhradou se staly zvířecí tkáně, ve kterých byla hojně zastoupena kyselina hyaluronová, byly jí kohoutí hřebínky a kravský oční sklivec. Ovšem i tyto zdroje mají své omezení. Jak z hlediska množství, tak i izolace a čistoty produktu. V současnosti se tedy jako zdroj kyseliny hyaluronové využívají zejména fermentační bakterie, které jsou schopny produkovat hyaluronan vysoké čistoty bez cizorodých proteinů. Fermentační bakterie využívané pro výrobu kyseliny hyaluronové jsou zástupci rodu *Streptococcus*. Jedná se o bakterie *Streptococcus equi* a *Streptococcus zooepidemicus*, které jsou schopné produkovat hyaluronan ve velkém měřítku v porovnání s ostatními extrakčními metodami. Každá z těchto bakterií je schopna syntetizovat hyaluronan v různých molekulových hmotnostech. Pokud tedy využíváme kyselinu hyaluronovou izolovanou z bakterie *Streptococcus equi* získáme jako produkt hyaluronan s nižší molekulovou hmotností, než z bakterie *Streptococcus zooepidemicus*, u které se molekulová hmotnost pohybuje v řádu 1,8 – 2 MDa [1, 5, 8].

### 2.1.6. SYNTÉZA DEGRADACE

U metabolismu, tedy syntézy a degradace je důležité, aby byla hladina koncentrace hyaluronanu v jednotlivých tkáních stálá. V lidském těle lze pozorovat velice dynamický proces, při kterém jsou tyto opačné metabolismy v rovnováze. V závislosti na druhu tkáně většinou převažuje jeden z těchto procesů a závisí na ni i doba životnosti hyaluronanu. Mezi tkáně, ve kterých převažuje syntéza, řadíme dermis, je tomu tak z toho důvodu, že velké množství hyaluronanu, které je zde syntetizováno odchází z tkáně pryč. Extrémně krátkou životnost má hyaluronan v krvi, kde se nachází pouze pár minut, než je degradován. Dalším příkladem jsou keratinocyty, které nacházíme v epidermis, jejich životnost velice malá, často to bývá méně než jeden den, dochází zde k velice aktivní, jak syntéze, tak i degradaci hyaluronanu. Delší dobu životnosti má hyaluronan nacházející se v chrupkách, má zde průměrnou délku metabolismu 2 – 3 týdny [1, 4, 9]. Je důležité zdůraznit, že v praxi se setkáváme se dvěma základními mechanismy, při kterých dochází k syntéze kyseliny hyaluronové. První z nich probíhá v savčích buňkách a bakteriích patřících do rodu *Streptococcus*, druhý způsob je využíván bakteriemi rodu *Pasteurella*. V obou případech se jedná o vysoce kontrolovaný proces. U savčích buněk a bakterií *Streptococcus* je hyaluronan syntetizován na cytoplazmatické membráně.

Právě místo syntézy je jedním z rozdílů, kterými se kyselina hyaluronová odlišuje od ostatních glykosaminoglykanů, které se nejčastěji syntetizují v Golgiho aparátu. Tato syntéza byla poprvé demonstrována roku 1959 na membráně bakterie *Streptococcus*. Pro syntézu hyaluronanu je u této bakterie potřeba jediný protein, který je schopen využívat oba dva substráty sacharidů, které ji tvoří. Enzymem, který je zodpovědný za syntézu hyaluronanu je hyaluronan syntáza, zkráceně HAS. Tento enzym vyžaduje pouze  $Mg^{2+}$  a dva UDP monosacharidové substráty (GlcUA-UDP a GlcNAc-UDP), ze kterých syntetizuje nový řetězec. U savčích buněk se nachází více hyaluronan syntáz (HAS1, HAS2 a HAS3), které vykonávají svou funkci na různých místech v určitý čas růstu řetězce, stárnutí, či léčení ran. Během syntézy dochází k elongaci řetězce na redukujícím konci, kde není nutná přítomnost primeru pro zahájení syntézy. K iniciaci biosyntézy je vyžadována pouze přítomnost UDP monosacharidových substrátů. Každý syntetizovaný sacharid se poté stává substrátem pro další nasedající sacharid. Aby mohlo docházet k růstu řetězce, je potřeba, aby byla syntetizovaná část postupně vytlačována přes membránu do extracelulární matrix. Proces elongace řetězce na membráně, je názorně popsán v obrázku č. 2. Díky tomuto procesu můžeme získat hyaluronan o velké molekulové hmotnosti, kterou bychom nikdy nemohli získat, kdyby byl hyaluronan syntetizován v Golgiho aparátu, jako ostatní glykosaminoglykany [9, 10].



Obrázek 2: syntéza kyseliny hyaluronové [11]

Degradace je proces opačný syntéze, při kterém dochází ke štěpení hyaluronového řetězce na menší úseky. Tyto úseky neboli fragmenty jsou využívány v mnoha dějích, které probíhají na buněčné úrovni. U savců je degradace zprostředkována třemi typy enzymů, které v organismu nacházíme v různých formách intracelulárně a v séru. Mezi tyto enzymy řadíme; hyaluronidázu,  $\beta$ -D-glukuronidázu a  $\beta$ -N-acetyl-hexosaminidázu. Každý z těchto enzymů má v procesu degradace hyaluronanu různou úlohu. Hyaluronidáza je odpovědná za štěpení vysokomolekulárního hyaluronanu na menší fragmenty, oligosacharidy. Úkolem  $\beta$ -D-glukuronidázy a  $\beta$ -N-acetyl-hexosaminidázy je následná degradace vzniklých oligosacharidových fragmentů odštěpením neredukujících terminálních cukrů. Produkty vzniklé degradací jsou charakteristické velice nízkou molekulovou hmotností a pro angiogenní účinky. Jedním z důsledků snížení molekulové hmotnosti štěpením hyaluronidázou, je s ním spojené snížení viskozity hyaluronanu, které se projeví zvýšením permeability tkání [3].

### 2.1.7. LÉKAŘSKÉ VYUŽITÍ HYALURONANU

Kyselina hyaluronová je sloučenina, která si během let vybudovala významné postavení v mnoha odvětvích lékařského průmyslu. Hlavním důvodem jeho využití v tomto odvětví jsou jeho vlastnosti, mezi kterými je nutno zdůraznit schopnost biodegradability a biokompatibility. Taky se nesmí opomenout, že se jedná o látku, která je tělu vlastní a je neodmyslitelnou součástí mnoha fyziologických procesů probíhajících v lidském organismu. Jelikož se jedná o látku tělu vlastní, bývá léčba pomocí kyseliny hyaluronové pro tělo často nenásilná a velice efektivní. Jedním z důležitých využití hyaluronanu nalezneme v oftamologii, neboli očním lékařství. K využití hyaluronanu v této oblasti došlo už v počátcích jejího výzkumu v 50. letech 20. století, využití v této oblasti podporuje i to tvrzení, že právě z očního sklivce byla tato látka poprvé izolována a nachází se v něm v poměrně velkém množství. Hlavní použití hyaluronanu se zde uplatnilo v léčení při operaci šedého zákalu. Ten je zde používán jako ochranná tekutina, která během operace snižuje riziko zranění a chrání okolní tkáň. K tomuto účelu se využívá hyaluronan s menší molekulovou hmotností, a to z toho důvodu, že vysokomolekulární roztoky jsou moc viskózní, a tedy nevhodné. Dále se s ním v očním lékařství setkáme v přípravcích pro péči o oči, zejména u přípravků pro kontaktní čočky [1, 3]. Dalším příkladem je využití hyaluronanu v léčbě kloubních onemocnění. Tohle užití vychází z toho, že synoviální tekutina kolem kloubů je místo jeho přirozeného výskytu, kde má funkci lubrikace a mechanické podpory. Právě tyto poznatky vedly k tomu, že se začal využívat k jejich léčbě. Jedním z onemocnění, které se hyaluronanem dají léčit, je osteoartróza, ta má za následek postupné zničení kloubní chrupavky a mění její mechanické vlastnosti. V nejhorších případech dochází k úplnému zničení chrupavky. Tato nemoc postihuje zejména kolenní a kyčelní klouby. Samotný hyaluronan se do postižené oblasti vpravuje injekční podobou, a to po dobu 3 – 5 týdnů v týdenních intervalech. Tato léčba má za následek zlepšení vlastností synoviální tekutiny, ochrany povrchu chrupavky a potlačuje samotné ničení chrupavky [1]. Je známo, že kyselina hyaluronová podporuje bezjizvé hojení ran díky vysoké hydrofilitě. Právě tato vlastnost se hojně využívá u pooperační adheze, kdy HA vytvoří bariéru mezi povrchy poškozených tkání, které k sobě po operaci těsně přiléhají. Sníží se tak možnost poškození tkáně, tvorbu infekce, srůstů nebo jizev při hojení rány. Naopak se zvýší rychlost a efektivita hojení. Pro větší účinnost je většina produktů v této oblasti modifikována tak, aby se prodloužil čas působení, protože se jedná o časově náročný proces. V tomto odvětví se využívá jak při hojení ran, tak i u popálenin kůže a diabetických defektů [1]. Důležitou roli také získala v kosmetickém a dermatologickém průmyslu. Zde je využívána jako látka sloužící k regeneraci a hydrataci pokožky. Je to způsobeno tím, že kyselina hyaluronová, je silně hydrofilní látka. Hojně se používá v injekční formě, kdy je hyaluronan přímo aplikován do kůže. Významné použití je ve vyhlazení vrásek a zvyšuje pružnost pokožky [1].

### 2.1.8. NOSIČ HYDROFOBNIÍCH LÉČIV

Pro využití hyaluronanu jako nosiče hydrofobních léčiv musíme vzít v potaz výskyt hydrofobních oblastí, které se na molekule vyskytují v pravidelných intervalech na obou stranách dvojité stočené šroubovice, ve které se hyaluronan nachází v rozpouštědle. Tyto hydrofobní oblasti, které nazýváme „hydrophobic patch“ nacházíme v intervalech osmi CH jednotek, které přibližně odpovídají velikosti kyseliny kaprylové (oktanové). I přesto, že má kyselina hyaluronová především hydrofilní charakter, můžeme díky přítomným hydrofobním oblastem označovat hyaluronan jako amfifilní molekulu. Ve vodných roztocích lze velice dobře sledovat oba charakter, kterými se hyaluronan

vyznačuje. Hydrofilní oblasti jsou natočeny směrem do rozpouštědla, kterým bývá voda. Naopak hydrofobní oblasti jsou v takovém uspořádání, že tvoří shluky tak, aby co nejvíce zamezily kontaktu s vodným prostředím. Tento mechanismus nenacházíme pouze u hyaluronanu, další molekulou s podobným chováním, která využívá stability dvojitě stočené helix je molekula DNA. Zde popsané interakce nazýváme hydrofobní vazby. Jedná se o druh vazeb mezi hydrofobními konci na přítomných molekulách, u kterých se netvoří pevná chemická vazba. Právě díky přítomnosti těchto vazeb pozorujeme u hyaluronanu unikátní vlastnosti, kterými řada polymerních molekul nedisponuje. S tvorbou hydrophobic patches je úzce spjata koncentrace, ve které se roztok hyaluronanu nachází v roztoku. Čím je roztok koncentrovanější, tím více má hyaluronan tendenci síťovat se a tvořit agregáty. Vysokomolekulární hyaluronan tvoří velice husté sítě, kde v podstatě každá molekula interaguje s hydrofobními oblastmi všech ostatních molekul. Nízkomolekulární také tvoří agregáty, ale ne tak intenzivně. Právě těchto vlastností se využívá při navázání látek hydrofobního charakteru do struktury hyaluronanu. Jedná se o to, že se daná hydrofobní látka, v našem případě se jedná o hydrofobní léčivo, naváže pomocí hydrophobic patches do struktury hyaluronanu v hydrofobních oblastech, které jsou ve vodném roztoku chráněny uvnitř vytvořených sítí [4, 5].

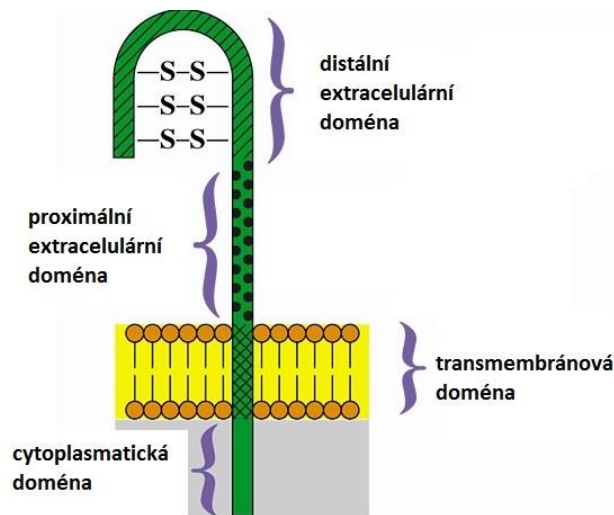
#### 2.1.9. VYUŽITÍ HYALURONANU PŘI KARCINOGENNÍCH PROCESECH

Pro využití kyseliny hyaluronové jako nosiče léčiv při léčbě rakovinných nádorů nalézáme v současné době mnoho důvodů. Všeobecně se rakovina léčí pomocí léčiv zvaných cytostatika, které jsou nespecificky vpravovány do organismu, kde mají za funkci usmrcení tumorových buněk. Jedná se o léčiva velice účinná, ale jejich velkou nevýhodou je právě ona zmíněná nespecifita, která má za následek, že léčivo napadá nejen postižené buňky, ale i zdravé buňky, u kterých zastavuje buněčné dělení. Celkově léčbu cytostatiky doprovází mnoho problémů a vedlejších efektů, kterými jsou: ztráta vlasů, nevolnost a obvykle i orgánová toxicita ve zdravých tkáních. Dále je zde problém s nedostatečnou koncentrací léčiva v nádorové tkáni, a velice úzkým spektrem terapeutického indexu. Kvůli těmto negativním dopadům na organismus se začalo zkoumat, jaké látky by mohly léčbu pomocí chemoterapie nahradit, či najít nějaké vhodné látky, které by léčivo transportovaly přímo na místo působení bez poškození okolní zdravé tkáně. Vývojem nosičů, které by vedly k cílenému transportu léčiv, se zabývalo v posledních 30 letech mnoho vědců a jako nosiče byla vyzkoušena řada látek, mezi které můžeme zařadit konjugáty liposomů, mikročástice, protilátky či nanočástice. Je zde i několik makromolekulárních nosičů, jedním z nich je právě kyselina hyaluronová, ta se ukázala jako vhodná látka vzhledem ke své afinitě k tumoru a na absorpci hyaluronanu zprostředkovanou receptory tumorových buněk. Cílem využití hyaluronanu v léčbě rakoviny je navázání léčiva hydrofobního charakteru do struktury nativního hyaluronanu, který pak systematicky dopraví účinnou látku do tumoru, kde postupně uvolní léčivo. Hyaluronan specificky interaguje s receptory, které se ve značné míře vyskytují na rakovinových buňkách. Kyselina hyaluronová se všeobecně nachází skoro ve všech tkáních těla, kde má významný vliv na fungování a chování buňky. Mezi tyto tkáně se zařazuje i maligní tkáň, ve které je výskyt kyseliny hyaluronové velice hojný. Jeho velké množství nacházíme také v extracelulární matrix, v okolí buněk. Výskyt hyaluronanu je především spjat s receptory, které jsou nedílnou součástí membrány rakovinných buněk. Tyto receptory se jmenují CD44 a RHAMM a jsou zodpovědné především za migraci a růst buněk. Hyaluronan, který se díky těmto receptorům dostává do buňky má za následek již zmíněný růst a migraci. Dále se díky hyaluronanu dokáže lépe skrývat před imunitním systémem, je to dáno tím, že hyaluronan se v těle

normálně vyskytuje, tím pádem se dle imunitního systému nejedná o možnou hrozbu a buňku tedy neodstraní [12, 13, 14].

#### 2.1.10. RECEPTORY HYALURONANU

Stěžejní roli v transportu hyaluronanu jako nosiče k cíleným tumorovým buňkám mají integrální receptory CD44 a RHAMM. Tyto receptory proteinového charakteru se staly velkým předmětem výzkumu pro svou přítomnost v metastázích. Oba receptory řadíme do heterogenní skupiny receptorů, které jsou schopné vázat hyaluronan. Dělíme je dle jejich extracelulární a buněčné distribuci, a sekvencí, na které váží hyaluronan. CD44 i RHAMM řadíme mezi buněčné proteiny, které se liší svým umístěním v buňce. Glykoprotein CD44 je všeobecně nejrozšířenější a nejlépe prostudovaný receptor vázající hyaluronan, který se nachází ve většině buněk. Charakterizujeme jej jako transmembránový glykoprotein hyaluronanu. Z důvodu značného výskytu ve většině typů buněk ho označujeme jako hlavní receptor hyaluronanu. Mnoho funkcí, které probíhají na receptoru CD44 jsou způsobeny právě přítomností ligandů hyaluronanu. Samotný receptor se nachází v několika izoformách, které jsou pro samotnou molekulu hyaluronanu nespecifické, jsou tedy schopné vázat i jiné molekuly než je hyaluronan. Stejně jako mnoho jiných glykoproteinových receptorů je i CD44 schopen podstupovat rozsáhlé posttranslační modifikace, které zahrnují glykosylaci, či fosforylaci. Tím pádem je možné, že se CD44 nachází v izoformě, která není schopna vázat hyaluronan. Z funkcí, které CD44 vykonává, jsou význačné především; buněčná migrace během morfogeneze, angiogeneze a pro nás nejvýznamnější tumorová invaze a metastáze. Dále zajišťuje udržení, organizaci a endocytózu v extracelulární matrix, ve které je v hojné míře přítomný hyaluronan, zprostředkovává adhezi lymfocytů a koordinuje signály v matrix, které se podílí na životnosti buněk. Z přehledu veškerých funkcí a vlastností CD44 lze vyvodit, že z jednoho proteinu můžeme získat širokou škálu využití pomocí malých změn ve struktuře nebo expresi. V praxi se receptor CD44 využívá především pro svou schopnost vázat hyaluronan na povrchu rakovinových buněk a poté jej endocytózou dostat dovnitř buňky. Dochází k tomu tak, že se hyaluronan naváže na jednu ze čtyř domén, kterou receptor CD44 obsahuje. Jednou z nich je distální doména, právě ta je primárně odpovědná za navázání hyaluronanu na receptor. Ostatní tři domény mají jiné funkce, například doména proximální odpovídá za izoformy, ve kterých se daný receptor nachází, dochází zde též k připojení glykosaminoglykanů jako bočních řetězců. Transmembránová doména je jednoduchý transmembránový glykoprotein, který pouští látky pouze jedním směrem. Poslední doména se nachází uvnitř buňky a nazýváme ji cytoplasmatická. Pokud v celém receptoru správně fungují všechny domény, dochází k efektivnímu přesunu molekul a signalizaci v obou směrech [3, 16, 17, 18]. Receptor CD44 je vidět i s popisem domén na obrázku č. 3.

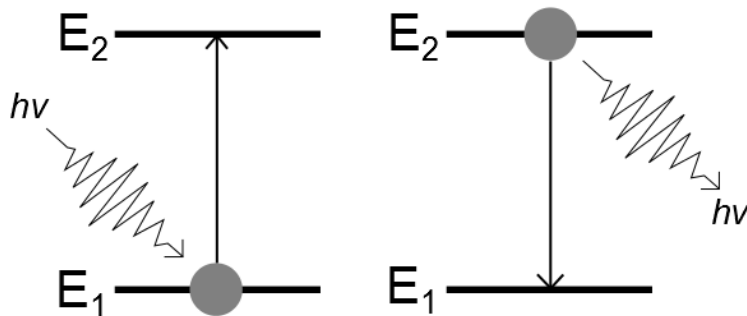


Obrázek 3: receptor CD44 [21]

Dalším receptorem podílejícím se na interakci a transportu hyaluronanu do rakovinových buněk je RHAMM receptor. Jedná se o receptor, který není integrální, jeho výskyt je rozličný, nachází se jak na povrchu buňky, tak i intracelulárně. Jeho přítomnost byla zaznamenána v cytosolu a jádře buněk. Vyskytuje se v mnoha formách jak uvnitř, tak i na povrchu buňky, jeho funkce jsou v závislosti na místě působení odlišné. Intracelulárně ho nacházíme v rozpustné formě v centrosomu, kde je odpovědný za dělení buněk a regulaci buněčného cyklu. Membránová forma, neboli umístění na povrchu buňky zajišťuje buněčnou migraci a fokální adhezi, jak v normálních, tak i tumorových buňkách [3, 19, 20].

## 2.2. UV-VIS SPEKTROSKOPIE

UV-VIS spektroskopie, celým názvem spektroskopie v ultrafialové a viditelné oblasti, je analytická metoda zabývající se kvantitativní a kvalitativní analýzou anorganických, organických a biologických látek. Tato metoda využívá principu molekulové absorpce, která je založena na měření elektromagnetického záření v rozsahu vlnových délek 200 – 800 nm [20, 21]. Princip této metody je v tom, že dochází k absorpci energie sledovanou látkou. Při tomto ději dochází k výměně energie mezi částicemi a hmotou tak, že při absorpci dochází k excitaci valenčních elektronů, které se přesouvají do vyšší energetické hladiny. Tímto přesunem dochází ke změně rotačně vibračních energetických stavů, které má molekula v základním stavu. Všeobecně se při základních podmínkách, které se v laboratoři vyskytují, nachází molekuly v základním elektronovém i vibračním stavu. Ozáření vzorku ze zdroje, dochází k pohlcení fotonu a následuje excitace molekuly do vyššího excitačního stavu, která se zde nachází po velmi krátkou dobu v řádech nanosekund. Po této době následuje proces deexcitace, kdy se molekula vrací do základního stavu [22, 23]. Stručný proces excitace a deexcitace neboli emise záření je popsán v obrázku č 4.



Obrázek 4: excitace a deexcitace molekul [24]

Pokud chceme měřit absorpci molekul pomocí UV-VIS spektroskopie, je nezbytné charakterizovat si základní veličiny. Pro charakterizaci velikosti absorpce využíváme veličiny nazývající se absorpance  $A$  a transmitance  $T$ . Jedná se o veličiny, které lze popsat tak, že jsou vůči sobě inverzní. Je důležité dodat, že jak u transmitance, tak i u absorpance měříme intenzitu paprsku světla, který prochází měřeným vzorkem. Rozdíl je v tom, že u absorpance měříme, kolik světla bylo pohlceno měřeným vzorkem. Naopak v případě transmitance měříme, kolik světla z původní intenzity paprsku prošlo, čili nebylo vzorkem absorbováno. Při měření můžeme využívat obě dvě veličiny, nejčastěji se však pracuje s absorpancí. Důležité je také zmínit, že absorpance je bezrozměrná veličina. Měření absorpance vychází ze základního vztahu, který je popsán Lambert-Beerovým zákonem. Jeho matematické vyjádření udává závislost absorpce elektromagnetického záření vzorkem. Pro výpočet je nutné znát určité parametry měřeného vzorku a také cely, ve které se nachází. Těmito parametry jsou koncentrace vzorku v roztoku  $c [mol \cdot l^{-1}]$ , molární absorpční koeficient  $\varepsilon [l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}]$  a tloušťku kyvety  $l [cm]$  [22, 23].

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = c \cdot \varepsilon \cdot l$$

V praxi dochází k tomu, že máme měřicí celou, ve které se nachází látka schopná absorpce. Do této cely kolmo na povrch září paprsek charakteristického monochromatického světla, který má určitou vlnovou délku a počáteční energii  $P_0$ . Při průchodu paprsku celou, která má vždy přesně danou délku  $l$ , dochází k tomu, že částice schopné absorpce (atomy, ionty, molekuly) absorbují energii tohoto paprsku a tím jeho intenzitu snižují. To vede k tomu, že paprsek světla vycházející z cely má menší energii než původní a označujeme ho jak  $P$ . [22] Pro měření je nutno vzít v potaz skupenství látky schopné absorpce, která se nejčastěji nachází ve formě vodného roztoku. Aby se dosáhlo vysoké přesnosti vlastního měření, je vhodné používat zředěné roztoky. Využívá se toho z toho důvodu, že při měření koncentrovaných roztoků dochází k velmi intenzivní absorpci, která se odráží ve výsledné velikosti absorpance, která by neměla překračovat hodnotu 1, což v případě koncentrovaných roztoků není možné. V průběhu měření se roztok nachází v průhledné nádobě, kterou může procházet světlo. U spektrofotometrů se využívá kyvet, které mají vždy definovanou tloušťku  $l$ , která je nezbytná pro výpočet absorpance. Materiálů, ze kterých jsou vyráběny kyvety, je mnoho. Často se při měření setkáváme s plastovými kyvetami, které jsou určeny na jednorázové použití. Setkáváme se ale i se skleněnými nebo křemennými kyvetami, které jsou kvalitnější. Výběr kyvety je vysoce

závislý na rozsahu vlnových délek, které jsou měřeny. Pro měření v ultrafialové oblasti jsou využívány kyvety křemenné [22, 23].

### 2.3. DYNAMICKÝ ROZPTYL SVĚTLA

Dynamický rozptyl světla, zkráceně nazýván DLS označuje metodu, kterou se dá velice efektivně pozorovat a měřit velikost částic látek, které difundují ve svém rozpouštědle. Jedná se o metodu neinvazivní, která nijak nedegraduje vzorek, není potřebné velké množství vzorku a samotné měření je velice rychlé, obvykle v řádu sekund až minut. Měřené částice často nacházíme ve formě koloidních roztoků, emulzí, micel, liposomů nebo i pigmentů. Jejich velikost lze určit pomocí pohybu, který vykonávají. Tento pohyb nazýváme Brownův a jedná se o náhodný pohyb, který můžeme pozorovat u takových částic, jejichž velikost se nachází v mikronové oblasti. Jedná se o tepelný pohyb, při kterém se částice přítomné v roztoku neustále srážejí, jejich směr a síla jsou náhodné. Při měření dopadá na částice monochromatický paprsek laseru, který je částicemi rozptýlen ve všech směrech a tím dochází k interakci s dalšími částicemi v měřeném roztoku. Z důvodu neustálého pohybu částic nelze označovat intenzitu interakcí mezi měřenými částicemi jako konstantní. V různých časech se částice nachází na odlišných místech, tím se mění jejich vzdálenost a intenzita rozptýleného světla. Dochází tedy k fluktuaci intenzity rozptýleného světla, které může být zeslabováno nebo naopak zesilováno. Dle fluktuace můžeme posoudit, jak se částice pohybují. K pomalému pohybu a tedy i malé fluktuaci dochází, pokud měříme velké částice. V případě malých částic dochází k pohybu rychlejšímu a velikost fluktuace je větší, čím je částice menší, tím se pohybuje rychleji [25, 26, 27]. V průběhu měření svítí paprsek laseru na vzorek a záření interaguje s měřenými částicemi. Toto záření je monochromatické a díky schopnosti částic vykonávat Brownův pohyb dochází k Dopplerově posuvu po dopadu paprsku laseru na částici. Dochází pak ke změně vlnové délky dopadajícího záření. Velikost částic, jejichž velikost je závislá na rychlosti pohybu lze spočítat pomocí vztahu, který nazýváme *Stokes-Einsteinova rovnice*, která má tvar:

$$D = \frac{k_B \cdot T_k}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot d_H}$$

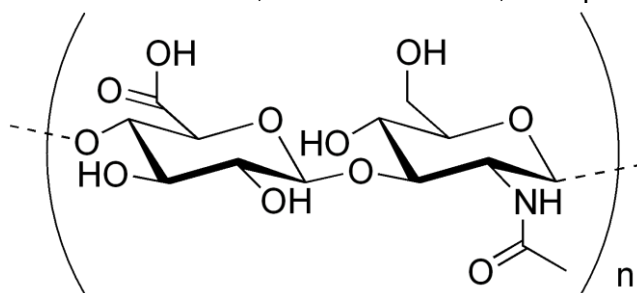
ve kterém značí  $k_B$  Boltzmannovu konstantu,  $T_k$  teplotu měření,  $\eta$  dynamickou viskozitu,  $d_H$  hydrodynamický poloměr a  $D$  značící difuzní koeficient. Výstupem této metody bývá intenzita distribuce částic, která se často převádí na objemovou distribuci [25, 26].

### 3. PRAKTICKÁ ČÁST

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit, zda je možné využít nativní formu kyseliny hyaluronové pro cílenou distribuci léčiv, kde hyaluronan slouží jako nosičový systém pro hydrofobní léčiva. Pokud by tento postup přípravy nosičového systému hydrofobních látek fungoval, jednalo by se o velice lehce připravitelný efektivní nosičový systém. Pro potvrzení, zda je hyaluronan pro tohle využití vhodný, či nikoli, byly provedeny experimenty, které měly základ v nepublikované bakalářské práci bývalého studenta FCH. Jeho práce byla založena na interakci hydrofobního barviva sudanu red G s hyaluronanem ve vodném roztoku. Využívalo se zde faktu, že polymerní řetězec hyaluronanu obsahuje hydrofobní oblasti, označované jako hydrophobic patches, které by měly být schopné navázat hydrofobní molekuly do své struktury. K práci byla využita nativní forma kyseliny hyaluronové bez jakýchkoliv úprav. Tato forma byla využita z důvodu přirozeného výskytu v lidském organismu. Všechny experimenty byly provedeny dvěma postupy, které jsou v této bakalářské práci podrobněji prostudovány. Prvním z nich bylo rozpuštění práškového barviva sudanu red G hydrofobního charakteru a hyaluronanu. Obě látky byly před zalitím rozpouštědlem smísány. Tento postup se nezdál být velice efektivní, proto se rozhodl pro jiné řešení, kdy nechal vysušit připravený roztok, z něhož vznikl film, který byl následně znovu rozpuštěn ve stejném objemu vody. Zda je reálně možné solubilizovat sudan red G v hyaluronanu potvrdoval různými metodami, vizuálně a spektrofotometricky. V této práci byly oba tyto postupy ověřeny a také byla využita metoda tvorby filmů směsi hyaluronanu a sudanu, která také navazuje na práci bývalého studenta. Vzniklé filmy byly následně rozpuštěny v původním objemu vody, poté experimentálně měřeny. Nejednalo se o jediné použité metody. Během experimentů byly všechny roztoky vizuálně pozorovány a hodnoceny, dále se pomocí spektrofotometrie potvrdila přítomnost rozpuštěných látek v roztoku. Pro zjištění velikosti přítomných látek byla využita metoda měření velikosti částic, zkráceně DLS. Nakonec pro vizualizaci práškových forem chemikálií a vzniklých filmů byla využita optická a elektronová mikroskopie.

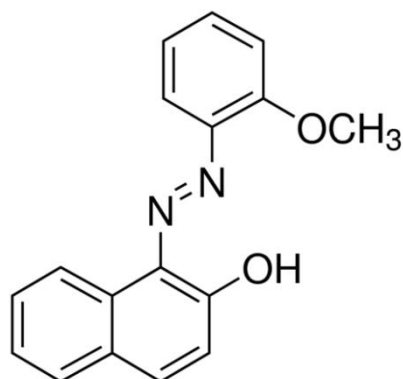
#### 3.1. MATERIÁLY

- Kyselina hyaluronová: 1400-1600 kDa, č.š. 181214-4-D1, Contipro a.s., Dolní Obrouč



Obrázek 5: struktura kyseliny hyaluronové [28]

- Sudan red G: 278,31 g/mol, č.š. 1229-55-6, Sigma-Aldrich



Obrázek 6: struktura sudanu red G [29]

### 3.2. PŘÍSTROJE

- Hitachi U3900H (Hitachi High Technologies America, Inc)
- Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments)
- Mikroskop optický
- Mikroskop elektronový

### 3.3. PŘÍPRAVA VZORKŮ

Příprava jednotlivých vzorků probíhala tak, že se práškový hyaluronan navážil na analytických vahách. Navážka kyseliny hyaluronové činila množství 0,01 g. Poté došlo ke smíchání naváženého hyaluronanu s malým množstvím sudanu red G. K smíchání těchto dvou látek docházelo v suchém prostředí, protože v kontaktu s vodou hyaluronan okamžitě začne síťovat, nebylo by teda možné obě složky smísit. Po homogenizaci sypkých látek byla směs umístěna do zkumavky. V ní byla zalita 10 ml destilované vody. Celý roztok byl poté pečlivě protřepán. Výsledný roztok byl vysoce viskózní a nechal se stát do druhého dne, aby došlo k rozptýlení a rozpuštění částecek sudanu red G. Po rozptýlení částic v roztoku došlo k různým postupům úpravy vzorků, které byly následně aplikovány na jednotlivé metody. V prvním případě se dané roztoky hned použily na měření nebo se roztoky nechaly několik dní stát, poté došlo k měření. V druhém případě se po rovnoměrném rozptýlení částic v roztoku nechal roztok na Petriho misce, kde došlo k odpaření vody, a vznikl film, který byl následně rozpuštěn stejným objemem vody, po rozpuštění a homogenizaci roztoku došlo k měření.

### 3.4. MĚŘENÍ

#### 3.4.1. VIZUÁLNÍ POZOROVÁNÍ

Prvním a nejjednodušším způsobem hodnocením vzhledu a chování roztoku, bylo optometrické pozorování. Tento způsob vyhodnocení probíhal během celého roku, protože před všemi měřeními bylo jasně vidět, v jakém stavu se daný roztok nachází. Během pozorování chování a vzhledu roztoku se bralo v potaz mnoho faktorů. Již z letného pohledu se dalo zhodnotit, jakou barvu vlastní roztok má. Barva jednotlivých roztoků byla hodnocena již od mírně narůžovělých až průhledných, po sytě růžové roztoky. Roztoky se nacházely ve skleněných zkumavkách, které jsou průhledné, díky tomuto materiálu se dalo zhodnotit, zda jsou roztoky průhledné, či nikoli. S růžovou barvou se pojí sudan red G, který je odpovědný za toto zbarvení. Naneštěstí se díky svým vlastnostem veškerý sudan red G nikdy plně nerozptýlil, ani nerozpustil. Z toho důvodu byly v roztoku pozorovány velikosti částic jednotlivých

nerozpuštěných zrněk sudanu red G, které měly tendence tvořit větší shluky barviva. Tento faktor byl vysoce závislý na způsobu homogenizace samotných prášků před jejich zalití vodou a vzniku roztoku. Nějaký čas po vzniku roztoku se hodnotilo, zda vzniklý roztok vypadá homogenně, či nikoli, což se pojí s většími částicemi sudanu red G. Vzhled většiny roztoků byl hodnocen po zalití rozpouštědlem, následně po rozpuštění a rozptýlení sudanu red G, které bylo v rámci 1-2 dnů. V delším časovém intervalu byla pozorována postupná sedimentace nerozpuštěných částic sudanu red G, která byla závislá na velikosti jednotlivých částic či shluků. Hodnotily se samozřejmě i nesedimentující částice přítomné v roztoku. Dále se hodnotil vzhled roztoku po přefiltrování filtrem o velikosti pórů  $0,45 \mu m$  všemi výše zmíněnými postupy. U některých roztoků docházelo vysušením k tvorbě filmu. Vzhled vzniklých filmů byl taktéž optometricky hodnocen obdobnými kritérii. Mezi které řadíme barvu vzniklého filmu, velikost a četnost nerozpuštěných částic hyaluronanu a jeho průhlednost. Po následném rozpuštění filmu rozpouštědlem se vzniklý roztok hodnotil stejně jako výše popsání roztoky.

### 3.4.2. VÝPOČET RYCHLOSTI SEDIMENTACE ČÁSTIC SUDANU RED G

Na výpočet rychlosti sedimentace jednotlivých částic sudanu red G byla použita rovnice pro výpočet sedimentační rychlosti v gravitačním poli. V ideálním stavu by částice sudanu red G měly být tak malé, že by na ně v podstatě neměla působit gravitační síla. Jediné síly, které by se v ideálním případě vyskytovaly, jsou tepelný pohyb molekul, který je označován všeobecně jako Brownův pohyb. Ovšem částice, které se v roztoku hyaluronanu nachází, nejsou dostatečně malé, nepodléhají tedy Brownovu pohybu, ale působí na ně gravitační síla a dochází k jejich postupné sedimentaci. Rychlost sedimentace sudanu red G je závislá na velikosti přítomných částic. Dalšími nezbytnými parametry, na kterých je sedimentace závislá, jsou hustota a viskozita rozpouštědla, ve kterém se sedimentující částice nachází. Musí se též vzít v potaz viskozita vodného roztoku hyaluronanu. Viskozita roztoku je vysoká, a to díky použití vysokomolekulárního hyaluronanu, který je charakteristický pro svou schopnost síťovat. Obecně platí, že v gravitačním poli působí na částice hmoty, značené  $m$ , gravitační zrychlení  $g$ . Pokud pracujeme s disperzním systémem, je nutno brát v úvahu i vztakovou sílu. Pokud pracujeme s částicemi kulovitého tvaru nacházejícími se v disperzním prostředí, využíváme k výpočtu rychlosti sedimentace vzorec označovaný jako *Stokesova rovnice*:

$$v = \frac{2}{9} \cdot \frac{(\rho - \rho_0)}{\mu_0} \cdot r^2 \cdot g$$

kde  $\mu_0$  značí viskozitu prostředí, ve kterém se kulovité částice nacházejí. Rozdíl hustot  $(\rho - \rho_0)$  sedimentujících částic a disperzního prostředí. Poloměr kulových částic  $r$  a gravitační zrychlení  $g$ . [30] Z rychlosti sedimentace se následně spočítá čas, za který dané částice urazí určitou vzdálenost. V našem případě se jedná o vzdálenost 1 cm, která byla pozorována ve zkumavce s roztokem hyaluronanu a sudanu red G. Jelikož se jedná o ustálený stav, je rychlost sedimentace konstantní a lze pro výpočet použít vzorec:

$$s = v \cdot t$$

kde  $s$  značí výšku,  $v$  spočtenou rychlost a  $t$  čas, za který částice sedimentuje [30]. Pro výpočet byly využity různé hodnoty velikosti viskozit a velikosti částic.

Jelikož se jedná o teoretický výpočet rychlosti sedimentace. Hodnoty viskozit byly určeny na velikost 15000; 1000; 7000 a 1000  $mPa \cdot s$ . Velikost částic byla počítána s poloměry 10000; 5000; 1000 a 500  $nm$ .

### 3.4.3. POZOROVÁNÍ ČÁSTIC SUDANU RED G, HYALURONANU A JEJICH SMĚS V PRÁŠKOVÉ FORMĚ A JAKO FILM PROSTŘEDNICTVÍM MIKROSKOPIE

Pojmem mikroskopie rozumíme optické metody využívající se k pozorování objektů, které jsou neviditelné pro lidské oko. Z optometrického měření je lidské oko schopno rozeznat objekty, které jsou od sebe vzdálené nanejvýš 0,2  $mm$ . Pro rozlišení struktur menších rozměrů je nutno využívat právě mikroskopy, které lze dále dělit dle způsobu měření, či rozlišení. Základní a nejčastěji využívaný mikroskop nazýváme optický. Tento typ mikroskopu využívá světelných paprsků, proto je často nazýván světelný. Jednou z hlavních částí tvoří optická soustava, která se skládá z objektivu a okuláru obsahující soustavy čoček. Další částí mikroskopu je osvětlovací soustava se zdrojem záření. Jeho rozlišovací schopnost je omezená vlnovou délkou světla, z toho důvodu můžeme pozorovat částice do velikosti přibližně 0,25  $\mu m$ , což v praxi znamená, že získáme rozlišení až 1000 krát větší, než je rozlišovací schopnost lidského oka. Při měření sypké formy sudanu red G, jeho směsi s hyaluronanem a filmů jejich roztoku byl použit optický mikroskop Axio Observer Z1M. Vzorky byly postupně měřeny s rozlišením 2,5 – 20 krát větším než postřehne lidské oko [31].

Dalším typem mikroskopu, který je ve větší míře využíván pro pozorování mikroskopických předmětů, je elektronový mikroskop. Pracuje na tom principu, že místo světelných paprsků využívá elektrony jako zdroj záření a místo optických čoček obsahuje elektromagnetické čočky. Z toho důvodu má mnohem vyšší rozlišovací schopnost, která je dána mnohonásobně menší vlnovou délkou elektronu v porovnání se světelnými paprsky. V elektronové mikroskopii se využívá dvou typů mikroskopů, mezi které řadíme transmisní neboli prozařovací elektronový mikroskop (TEM), který vzorkem prochází. Druhým typem je skenovací neboli rastrovací elektronový mikroskop (SEM), který je využíván pouze k pozorování povrchu vzorku. K pozorování vzorků byl využit právě rastrovací elektronový mikroskop, který je schopen zobrazit povrch pozorovaných objektů s vysokým rozlišením a objekty jsou zobrazeny trojtrozměrně. V laboratoři se pracovalo s rastrovacím elektronovým mikroskopem; Zeiss EVO LS10. Elektronové mikroskopy pracují ve vakuu, proto je nutno využívat nejlépe bezvodé látky a prášky. V práškové podobě byly na SEM mikroskopu pozorovány prášky sudanu red G, hyaluronanu a jejich směsi. Tyto sloučeniny byly před měřením nanесeny na holder, na kterém byl prášek zachycen na přilepenou pásku. Dále se pozorovaly vzorky roztoku, které byly ve formě filmu. Tyto filmy vznikly přímo na holderech, které zachycují vzorek. Všechny tyto vzorky byly následně pozlaceny, čímž získaly šedou barvu, zlacení probíhalo ve vakuu po dobu 60 s proudem 13  $mA$ . Poté, byly vzorky umístěny do mikroskopu. Měření neprobíhalo hned, jelikož je pro měření vyžadováno vakuum s tlakem zhruba  $10^{-2}$   $Pa$ . Po dostatečném snížení tlaku probíhalo pozorování všech vzorků s různým rozlišením ve velkém rozsahu od 500 krát až po 20000 krát zvětšený vzorek [32].

### 3.4.4. MĚŘENÍ VZORKŮ NA SPEKTROFOTOMETRU HITACHI U3900H

Využitím spektrofotometrie byla zjišťována přítomnost rozpuštěných látek v měřeném roztoku. Pokud se v roztoku nachází rozpuštěná látka, lze ji pozorovat v absorpčním spektru píky odpovídající maximální intenzitě absorbance dané látky, které jsou známé. Při měření bylo zjišťováno, zda se v roztoku nachází sudan red G

v rozpuštěné nebo pouze rozptýlené formě. Pro měření byl využit spektrofotometr Hitachi U3900. Jako cela pro vzorek sloužila křemenná kyveta, která byla určena pro malý objem vzorku, čehož se využívalo především při filtrování vzorku. Křemenná kyveta byla použita z důvodu měření v ultrafialové oblasti. Celé měření probíhalo v rozsahu od 800 *nm* do 200 *nm*, jedná se tedy o celou viditelnou a ultrafialovou oblast. Toto široké spektrum bylo měřeno z důvodu rozdílných vlnových délek maxim absorpce sudanu red G i hyaluronanu. Absorpční maximum hyaluronanu se nachází v ultrafialové oblasti při 220 *nm*. Naopak sudan red G má maximum ve viditelné oblasti okolo 500 *nm*. Jako baseline zde sloužilo rozpouštědlo roztoku sudanu s hyaluronanem, kterým byla voda.

#### 3.4.5. MĚŘENÍ VELIKOSTI ČÁSTIC VZORKŮ NA ZETASIZERU NANO ZS

Pro měření distribuce velikosti částic v roztoku byl využit přístroj Zetasizer Nano ZS. Všechny měření probíhaly v plastových kyvetách, které jsou vhodné na jednorázové použití. Před každým měřením je nutno navolit teplotu, při které se měří. Pro základní podmínky, které panují v laboratoři, byla z důvodu rychlejší kalibrace zvolena teplota 25 °C. Měření všech roztoků probíhalo ve třech opakováních, z toho každé opakování obsahovalo 15 běhů, z nichž každé trvalo 10 sekund. Z jednotlivých měření byla získána průměrná distribuce velikosti částic v roztoku. Tyto údaje jsou obvykle zpracovávány do grafů, ze kterých je získána závislost intenzity na objemové distribuci částic v roztoku. Samotný přístroj byl schopný měřit velikost částic v jeho maximálním rozsahu, který je do velikosti 6  $\mu\text{m}$ . S velkou chybou se daly naměřit částice s velikostí až 10  $\mu\text{m}$ .

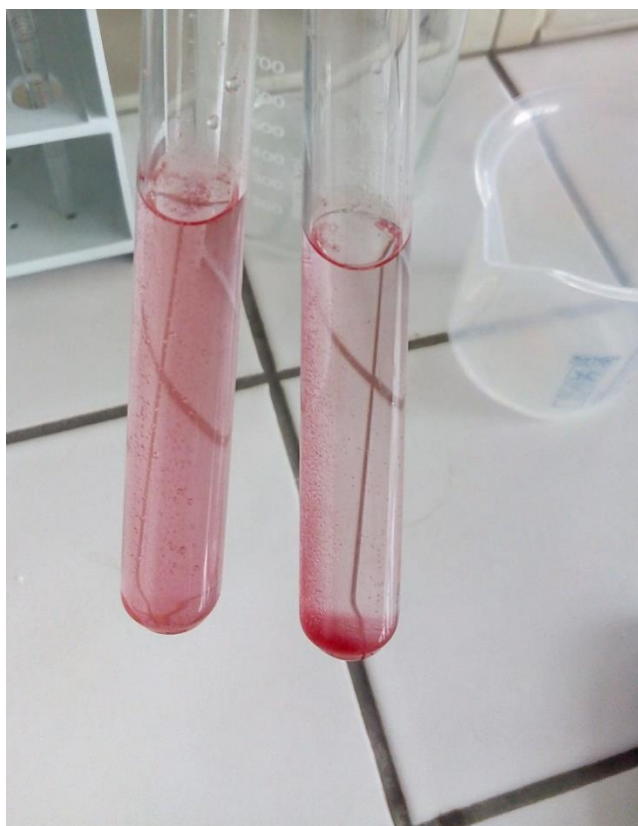
## 4. VÝSLEDKY A DISKUSE

### 4.1. VIZUÁLNÍ POZOROVÁNÍ

Pozorování vodných roztoků hyaluronanu se sudanem red G bylo možné hned po jejich vzniku. Po zalití homogenizované směsi hyaluronanu a sudanu red G vodou bylo možné pozorovat chování jednotlivých roztoků. Vzhledem k silně hydrofilním vlastnostem hyaluronanu došlo k rychlému nárůstu viskozity roztoku, který byl pozorován u všech vzorků. Ovšem další vlastnosti a barva jednotlivých roztoků bylo odlišné. Rozdílné chování lze pozorovat na obrázku č. 7. V levé zkumavce je roztok hyaluronanu a sudanu red G, pozorujeme, že ihned po vzniku nedošlo k úplnému rozptýlení částic sudanu red G do celého objemu roztoku. V pravé zkumavce je roztok, který byl tvořen pouze sudanem red G rozptýleným ve vodě, který byl připraven pro porovnání obou roztoků. Ve zkumavkách se směsí hyaluronanu a sudanu red G vznikaly poměrně velké shluky sudanu red G, které byly obaleny hyaluronanem. Bubliny v roztocích byly přítomné v důsledku protřepávání roztoku pro lepší homogenizaci roztoku. K rozpuštění těchto shluků docházelo během několika dnů, ale obvykle už druhý den byla většina částic sudanu red G rozptýlena. Intenzita zbarvení jednotlivých roztoků se lišila, samozřejmě záleželo na množství přidaného sudanu red G, ale také na homogenizaci směsi a rozptýlení malých částic do roztoku. Barvy roztoků se pohybovaly od skoro až průhledných, po sytě růžové. Průběh rozptylování částic sudanu red G a jejich postupná sedimentace lze pozorovat na obrázku č. 8. Kde se v levé zkumavce zachází roztok sudanu red G s hyaluronanem a v pravé pouze sudan red G. Lze pozorovat, že roztok obsahující hyaluronan je celý růžový a to v celém objemu. K tomu dochází díky přítomnosti hyaluronanu a jeho viskozitě, jímž vlivem jsou částice sudanu red G zadržovány a rozptýleny v celém objemu roztoku, roztok se tedy jeví jako homogenní směs. V pravé zkumavce obsahující pouze samotný sudanu red G lze vidět, že většina částic rychle sedimentovala vlivem nízké viskozity vody.

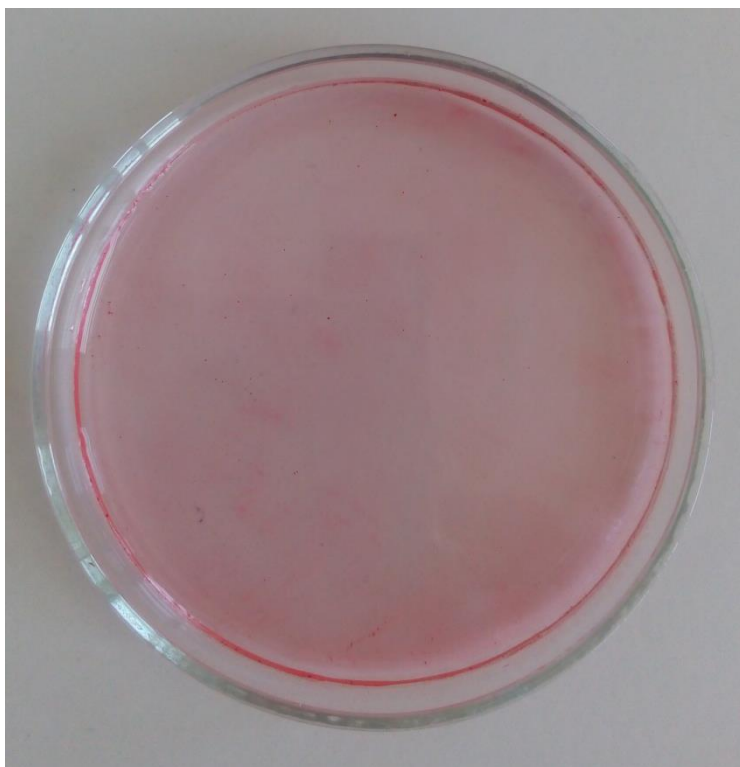


Obrázek 7: roztoky po smíchání: levá zkumavka – hyaluronan se sudanem red G, pravá zkumavka – sudan red G



Obrázek 8: roztoky po odstátí: levá zkumavka – hyaluronan se sudanem red G, pravá zkumavka – sudan red G

U roztoků samotného sudanu red G a vody docházelo k sedimentaci veškerého sudanu red G v časovém rámci cca jednoho týdne. U roztoků obsahujících sudan red G i hyaluronan bylo toto časové období delší. K sedimentaci většiny viditelných částic došlo během několika týdnů, roztoky byly poté naprosto čiré. Čiré roztoky byly pozorovány také po přefiltrování roztoků přes filtr s velikostí pórů  $0,45 \mu m$ . Růžové zbarvení roztoku zmizelo i při velmi intenzivním zbarvení vzorků před přefiltrováním. V nepublikované bakalářské práci, na kterou tato práce navazuje, se jevílo, že by bylo možné alespoň částečně solubilizovat sudan red G s hyaluronanem. Tohle tvrzení bylo vyvráceno výsledky pozorování, ze kterých vyšel ten závěr, že částice sudanu byly ve vzorcích pouze rozptýlené. Tyto částice postupem času sedimentovaly. Samotná sedimentace probíhala velice pomalu vzhledem k viskozitě vodného roztoku hyaluronanu, který zmenšoval rychlost sedimentace a potlačil tak i sedimentaci u nejmenších částic. U filmů bylo pozorováno odlišné chování. Intenzita zbarvení jednotlivých roztoků zůstávala bez větších odlišností. Jak po vzniku filmů, tak i po opětovném zalití rozpouštědlem. Sudan red G byl mnohem lépe rozptýlen v roztoku v porovnání se stavem před vznikem filmu. Sedimentace prakticky nebyla pozorována, kromě minima přítomných větších částic, takže se i v delším časovém intervalu nepozorovala výrazná změna zbarvení roztoku. Vzniklý film můžeme vidět na obrázku č. 9, kde je přítomno charakteristické růžové zbarvení. Toto zbarvení se po rozpuštění filmu zásadně nezměnilo. Ovšem, ihned po rozpuštění filmů nedocházelo ke vzniku homogenního roztoku, ale byla pozorována přítomnost narůžovělých kousků vláken, pravděpodobně se jedná o vlákna obarveného hyaluronanu sudanem red G. Tyto vlákna byla pozorovatelná ve většině případů i po průchodu filtrem s velikostí pórů  $0,45 \mu m$ . Z toho lze usuzovat, že velikost těchto částic byla menší, než jsou póry ve filtru. Vzniklé obarvené vlákna vidíme na obrázku č. 10. Roztok prošlý filtrem je čirý, kromě narůžovělých vláken. Před filtrováním byl roztok obvykle v celém objemu narůžovělý, filtrem prošly pouze narůžovělá vlákna hylarunanu o velmi malých rozměrech. Celý experiment byl založen na nezveřejněné práci studenta této fakulty, který při měření také získal roztok obsahující hydrofobní barvivo, tedy sudan red G navázaný do struktury hyaluronanu pomocí tvorby filmů. Lze tedy říci, že se po znovu rozpuštění filmů, které vznikly z roztoků obsahující hyaluronan a sudan red G dá získat, i když ve velice malém množství, solubilizovaný sudan red G.



**Obrázek 9: film roztoku hyaluronanu a sudanu red G**



**Obrázek 10: přefiltrovaný rozpuštěný film**

#### 4.2. VÝPOČET RYCHLOSTI SEDIMENTACE ČÁSTIC SUDANU RED G

Pro přiblížení, jakou rychlostí mohly prakticky sedimentovat rozptýlené částice sudanu red G byl použit empirický výpočet pro rychlost sedimentace kulových částic v gravitačním poli.

$$v = \frac{2}{9} \cdot \frac{(\rho - \rho_0)}{\mu_0} \cdot r^2 \cdot g$$

Ze spočtené rychlosti byl poté spočítán čas, za který urazí určitou vzdálenost, v našem případě pro názornost byla použita vzdálenost 1 cm. Jelikož byla přesná velikost částic sudanu a viskozity neznámá, byly provedeny výpočty pro více možných velikostí částic i viskozity. Hodnoty viskozit, které byly k výpočtu použity se pohybovaly v rozsahu od 1000 do 15000 mPa·s. Tyto hodnoty zhruba odpovídají viskozitě hyaluronanu použité molekulové hmotnosti, která byla 1400 – 1600 kDa [33]. Výsledky časů sedimentace částic různých velikostí v roztocích odlišných viskozit můžeme vidět v tabulce č. 2. Pro hustotu roztoku byla použita hodnota 1 g/cm<sup>3</sup> a hustota sudanu red G byla 1,19 g/cm<sup>3</sup> [34].

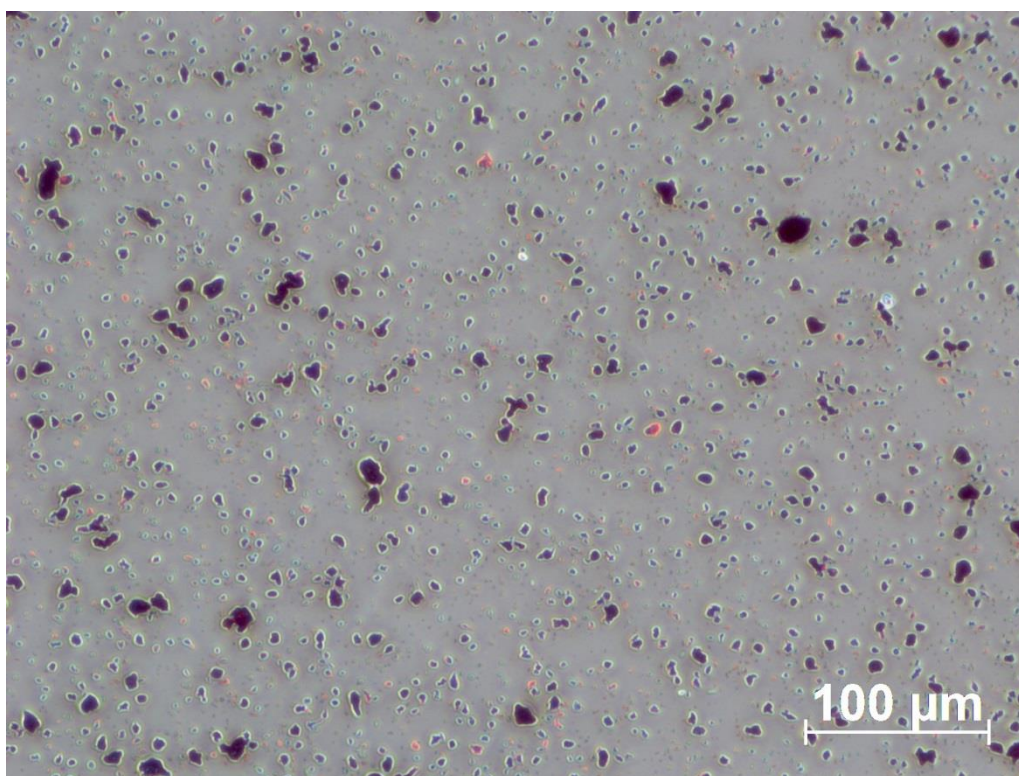
Tabulka č. 2: doba sedimentace částic sudanu red G

$\eta$ [mPa·s]	d [nm]	v [m/s]	t [dny]	t [týdny]
15000	500	$6,903 \cdot 10^{-12}$	16765,92	2395,13
	1000	$2,761 \cdot 10^{-11}$	4191,48	598,78
	5000	$6,903 \cdot 10^{-10}$	167,66	23,95
	10000	$2,761 \cdot 10^{-9}$	41,91	5,99
10000	500	$1,036 \cdot 10^{-11}$	11177,28	1596,75
	1000	$4,142 \cdot 10^{-11}$	2794,32	399,19
	5000	$1,036 \cdot 10^{-9}$	111,77	15,97
	10000	$4,142 \cdot 10^{-9}$	27,94	3,99
7000	500	$1,479 \cdot 10^{-11}$	7824,10	1117,73
	1000	$5,917 \cdot 10^{-11}$	1956,02	279,43
	5000	$1,479 \cdot 10^{-9}$	78,24	11,18
	10000	$5,917 \cdot 10^{-9}$	19,56	2,79
1000	500	$1,036 \cdot 10^{-10}$	1117,73	159,68
	1000	$4,142 \cdot 10^{-10}$	279,43	39,92
	5000	$1,036 \cdot 10^{-8}$	11,18	1,60
	10000	$4,142 \cdot 10^{-8}$	2,79	0,40

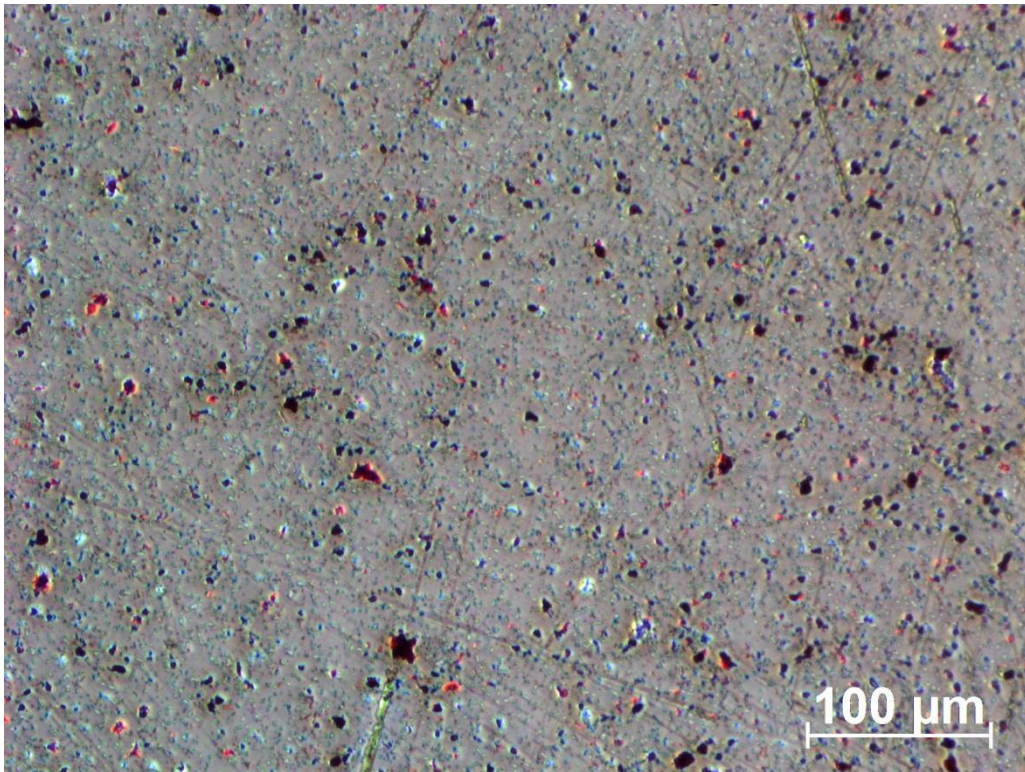
Z výpočtů je patrné, že u částic menších velikostí klesá rychlost sedimentace. U viskozity dochází k tomu jevu, že s nárůstem viskozity také klesá rychlost sedimentace. Nejrychleji tedy sedimentují velké částice v roztoku s malou viskozitou. Tento trend byl pozorován i ve všech vzorcích roztoků sudanu red G a hyaluronanu. Roztoky měly koncentraci hyaluronanu pohybující se v hodnotách okolo 0,1%. Ve zkumavkách s připravenými roztoky částice sedimentovaly v časovém intervalu kolem tří týdnů. Což se v porovnání s většinou vypočtených hodnot v tabulce liší, jelikož rychlost sedimentace vzorků byla rychlejší.

#### 4.3. VYHODNOCENÍ TVARU ČÁSTIC SUDANU RED G, HYALURONANU A JEJICH SMĚSI V PRÁŠKOVÉ FORMĚ A VE FORMĚ FILMŮ PROSTŘEDNICTVÍM MIKROSKOPIE

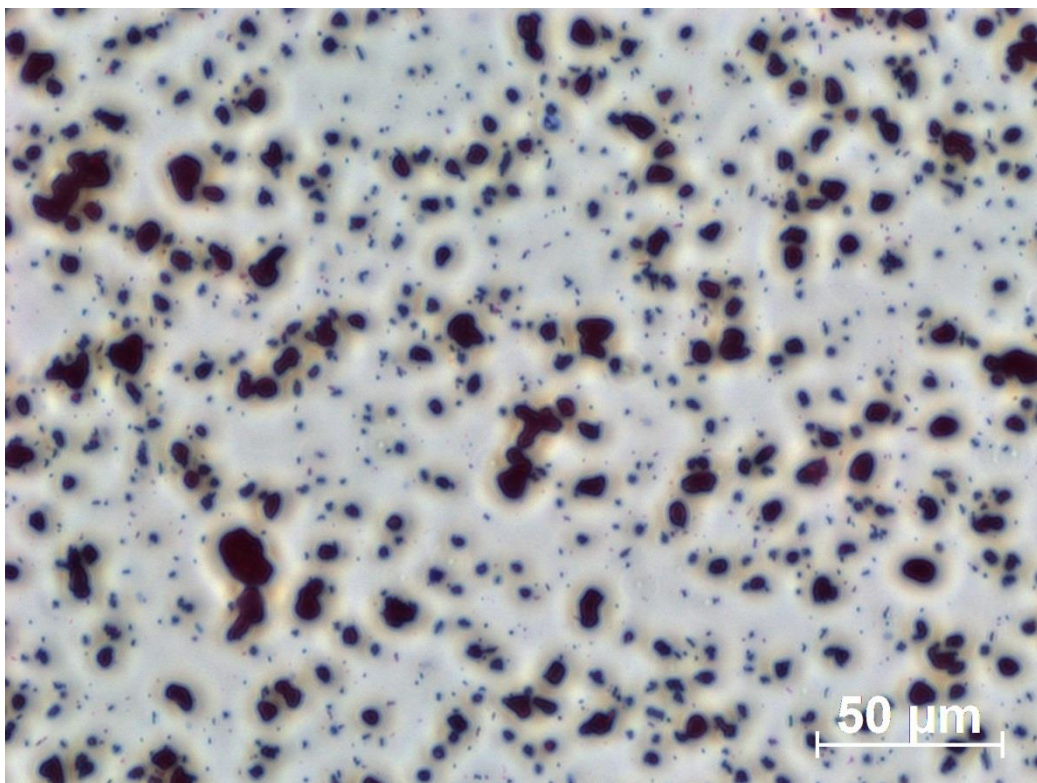
Pro bližší pozorování struktury roztoku hyaluronanu se sudanem red G byla využita metoda mikroskopování. Bylo této metody využito z toho důvodu, že při optometrickém pozorování nelze určit, zda se částice sudanu red G v roztoku pouze rozptýlí nebo i rozpustí. Pro bližší posouzení struktury v práškové podobě i ve formě filmu byla využita optická a elektronová mikroskopie. Jak u optické, tak i elektronové mikroskopie byly především pozorovány filmy, které byly připravené rozpuštěním nových roztoků hyaluronanu se sudanem red G. Byly ale použity i roztoky, kde byl film již jednou vysušen a poté byl opět rozpuštěn. Poté se znovu vysušil na film. Pro porovnání vidíme na obrázcích č. 11 a č. 12, desetkrát zvětšené filmy. Na snímcích u znovu rozpuštěného filmu na obrázku č. 12 vidíme, že některé přítomné částice sudanu red G, které mají černou nebo načervenalou barvu, mají menší velikost, než je to mu na obrázku č. 11. Každopádně lze pozorovat, že přítomný sudan red G není rozpuštěn, ale pouze rozptýlen. U většího zvětšení vidíme pouze částice sudanu red G, které mají kolem sebe v důsledku lomu světla červené zbarvení. Opět pouze potvrzujeme, že sudan red G je pouze rozptýlen nikoli rozpuštěn. Jak lze vidět na obrázku č. 13. U znovu rozpuštěného filmu je to obdobné, jsou některé pozorované částice sudanu red G menších rozměrů. Stejně jako na předchozích snímcích č. 11 a 12.



Obrázek 11: film z roztoku hyaluronanu a sudanu red G



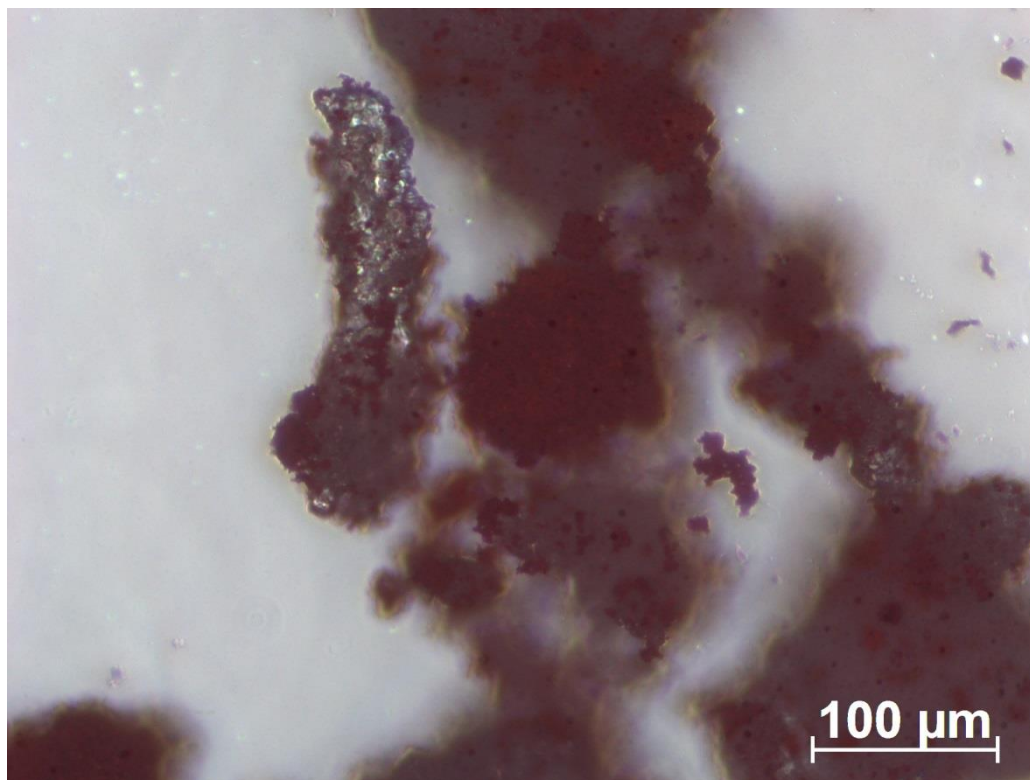
Obrázek 12: znovu rozpuštěný film z roztoku hyaluronanu a sudanu red G



Obrázek 13: film z roztoku hyaluronanu a sudanu red G

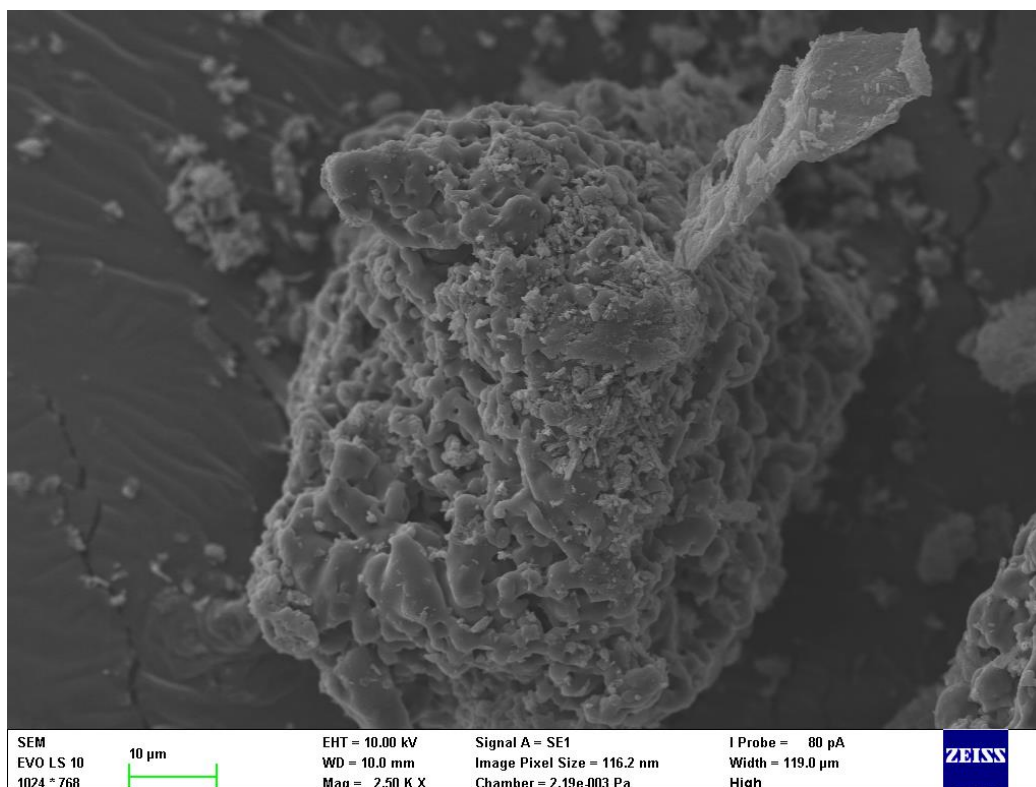
Pro názornost byly také mikroskopovány práškové směsi hyaluronanu se sudanem red G. U 10 krát zvětšeného snímku vzorku práškové směsi lze vidět na obrázku č. 14, že je hyaluronan naprosto obalen částicemi sudanu red G, které představují tmavé části

na snímku, hyaluronan je pravděpodobně světlá část. Lze zde vidět porovnání s filmy, které mají naprosto jinou strukturu, která je způsobena vysušením vodného roztoku.



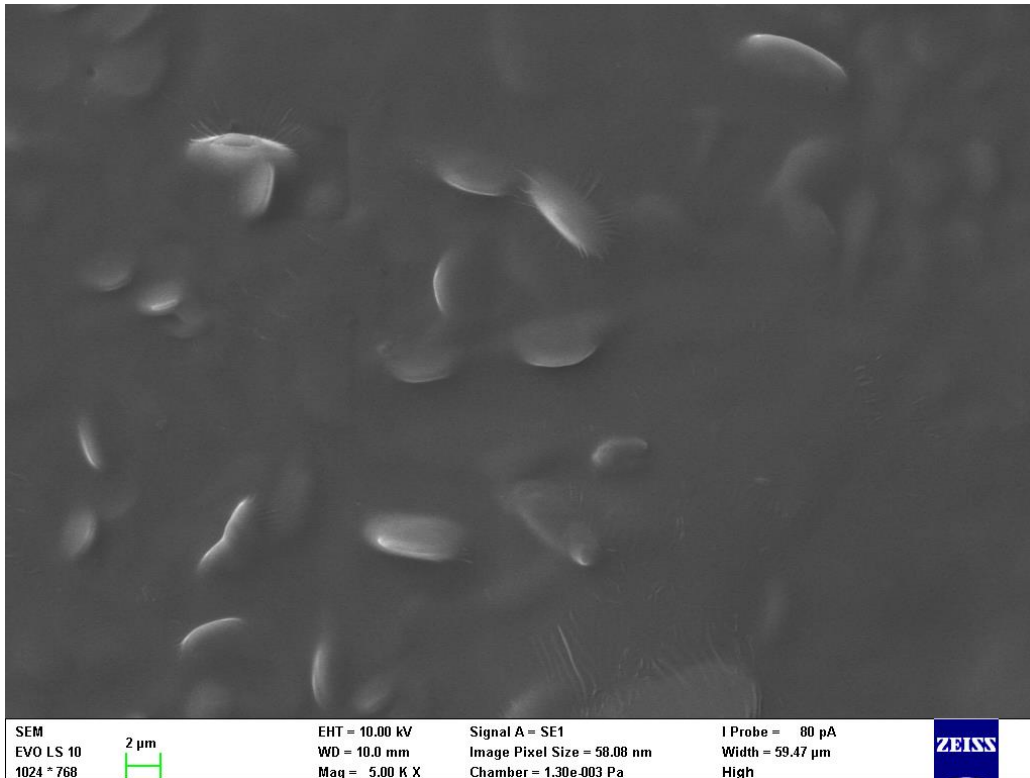
**Obrázek 14: prášková směs hyaluronanu a sudanu red G**

Poté byly vzorky mikroskopovány pomocí elektronové mikroskopie, kde byly opět využity, jak filmy, tak i práškové formy hyaluronanu a sudanu red G. Při mikroskopování práškové směsi pozorujeme, že větší částice hyaluronanu jsou obalené malými částčkami sudanu red G. Tuto skutečnost vidíme na obrázku č. 15. Tohle měření probíhalo, protože z optického mikroskopu nebyl takový snímek, ze kterého by bylo zřejmé, jak jsou na sebe navázány částice sudanu red G a hyaluronanu v práškové formě.

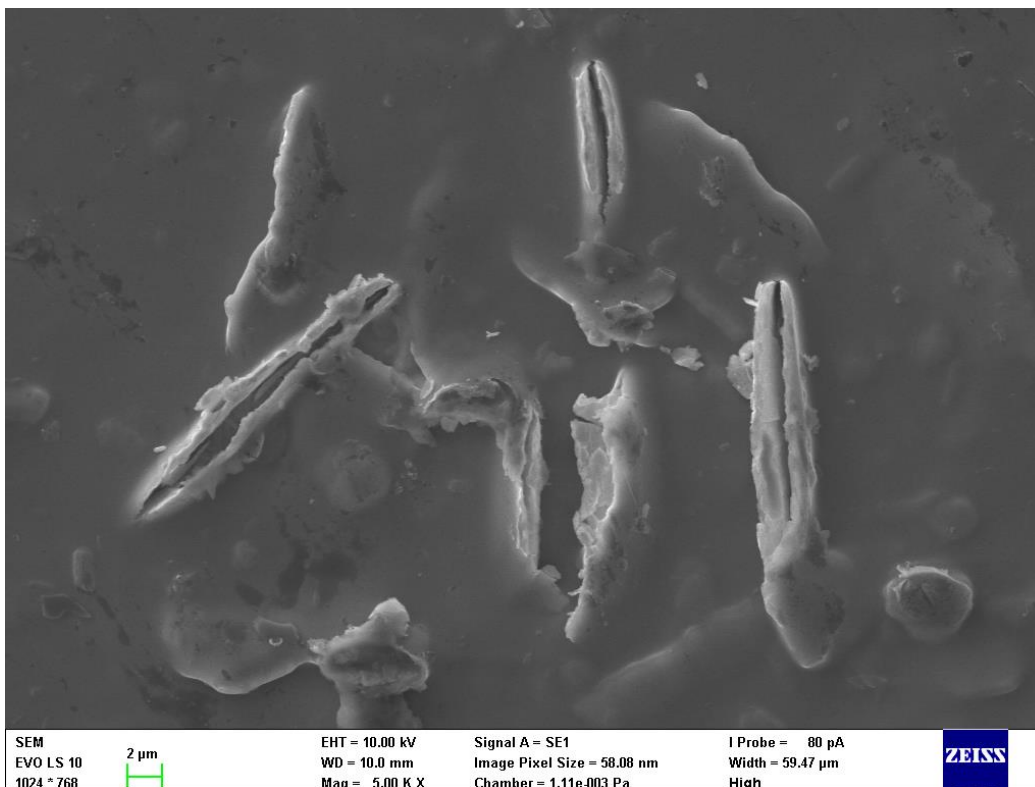


Obrázek 15: prášková směs hyaluronanu a sudanu red G

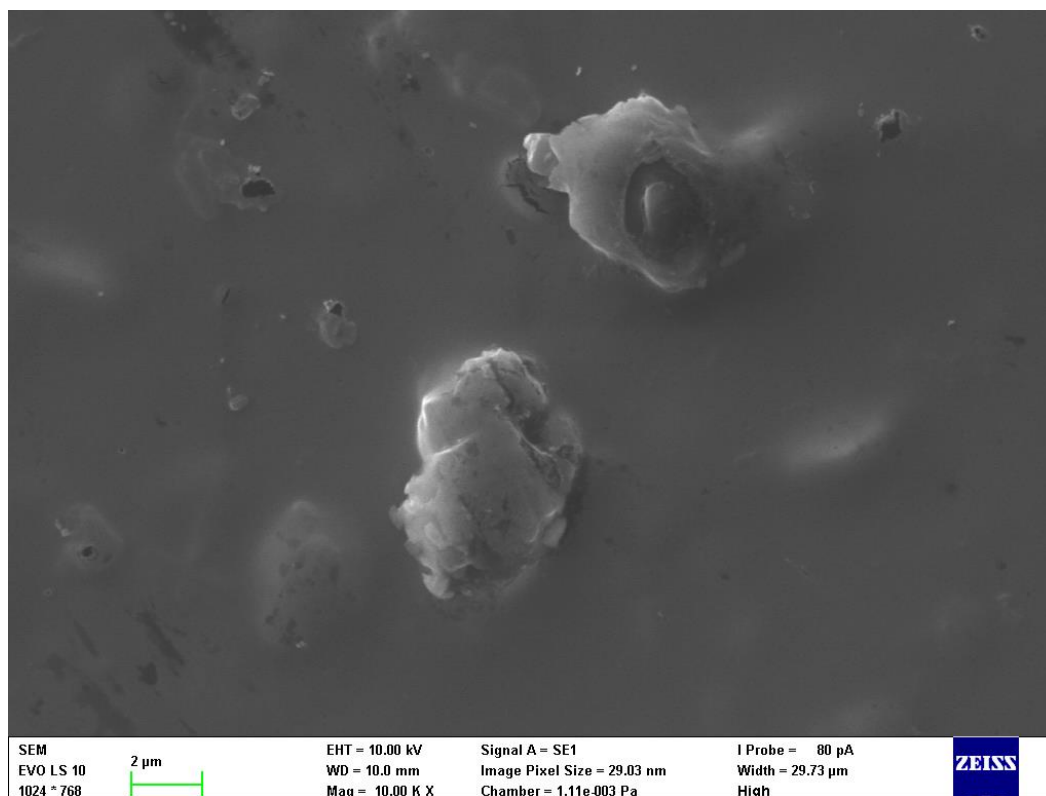
Filmy byly také mikroskopovány, výsledky můžeme vidět na obrázcích č. 16 a 17. Na nich je patrné, že znovu rozpuštěný film, který byl starší a déle vysychal má částice hyaluronanu, které jsou přítomné na povrchu značně poškozené. Částice sudanu red G zde nejsou moc vidět. Je tomu tak z toho důvodu, že se jedná o skenovací mikroskopii a skenuje se pouze povrch filmu. Částice sudanu red G jsou zde pravděpodobně rozptýlené v nižší vrstvě filmu, která je skenovacímu elektronovému mikroskopu nedostupná. Z pozorování snímků lze usoudit, že je zde i možnost, že by se mohly navázat na hyaluronan, pouze ale v minimálním množství, pokud vezmeme v potaz pozorování narůžovělých vláken z rozpuštěných filmů. U obrázku č. 16 nevidíme žádné částičky sudanu red G, je to pravděpodobně dáno výše zmíněným skenováním povrchu, navíc na to má vliv to, že se nejednalo o roztok s vyšší koncentrací sudanu red G. Lze pouze vidět částice hyaluronanu, které jsou ve formě „šupinek“. Naopak na obrázku č. 17 pozorujeme částice sudanu red G, které se v roztoku nachází jako tmavší části v kontrastu s hyaluronanem. V tomto roztoku se nacházela vyšší koncentrace sudanu red G, proto ho lze na snímcích pozorovat. Velkou nevýhodou je stáří roztoku, které se podepsalo na stavu jednotlivých částic hyaluronanu, které jsou značně potřhané. Záběr na částici sudanu red G vidíme na obrázku č. 18, kde se s velkou pravděpodobností dá tvrdit, že se malá částička sudanu red G do hyaluronanu navázala.



Obrázek 16: film z roztoku hyaluronanu a sudanu red G



Obrázek 17: znovu rozpuštěný film z roztoku hyaluronanu a sudanu red G

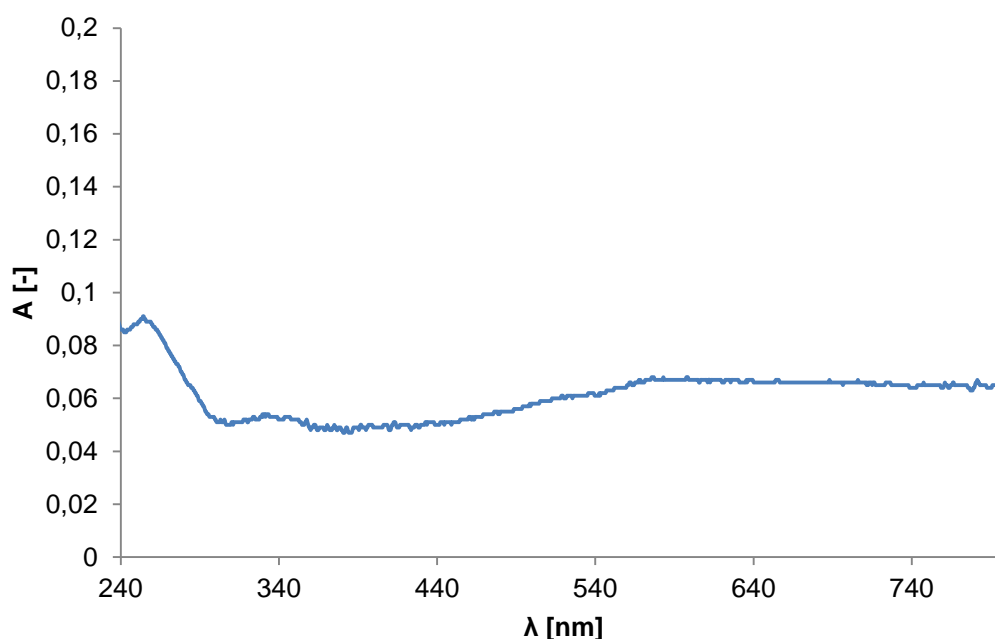


Obrázek 18: znovu rozpuštěný film z roztoku hyaluronanu a sudanu red G záběr na částici sudanu

#### 4.4. VYHODNOCENÍ DAT NA SPEKTROFOTOMETRU HITACHI U3900H

Měření na spektrofotometru bylo zjišťováno, zda se použité látky nachází ve vodném roztoku rozpuštěné nebo pouze rozptýlené. Pokud se daná látka nacházela ve vzorku rozpuštěná, bylo získáno spektrum, kde byla příslušná látka, v našem případě kyselina hyaluronová a sudan red G, rozpoznána díky přítomnosti píku v oblasti, kde dochází k maximální absorpci dané látky. Všechna měření probíhala v celé ultrafialové a viditelné oblasti vlnových délek. Celé spektrum se měřilo z toho důvodu, že použité látky mají velmi vzdálené absorpční maxima. Přítomnost rozpuštěných látek byla dokazována u všech vzorků. Jako první byly proměřovány roztoky hyaluronanu a sudanu red G bez jakékoliv úpravy. Tyto roztoky byly proměřovány i po zfiltrování. V grafu na obrázku č. 19 lze pozorovat, že se v měřeném vzorku nenachází výrazný pík v oblasti, kde by měl být přítomen rozpuštěný sudan G. Ten má maximální absorpci v oblasti vlnových délek kolem 500 nm. Lze ovšem pozorovat, že hodnota absorpce není nulová. Správně by se absorpční maximum ve formě píku mělo vyskytovat pouze u vlnové délky absorpce sudanu red G, popřípadě hyaluronanu při 220 nm. U ostatních vlnových délek spektra by měla být absorpce nulová. V grafu ale můžeme pozorovat, že nulová hodnota se nenachází v žádném bodě spektra, i když se jedná o hodnoty absorpce velice malé. Tento jev je pravděpodobně způsoben tím, že se v roztoku nacházely nerozpuštěné částičky sudanu red G, které odrážely a rozptylovaly paprsek světelného zdroje jinými směry, než je směr paprsku k detektoru. Je zde velká pravděpodobnost, že tomuto jevu podléhaly i makromolekuly hyaluronanu, které byly také schopny rozptylovat procházející světlo. Intenzita detekovaného paprsku byla tedy menší než původní a hodnota absorpce tedy nebyla měřicím přístrojem vyhodnocena na nulovou hodnotu. Je důležité zdůraznit, že byl ve všech měřených vzorcích viditelný pík hyaluronanu, který byl v roztoku rozpuštěn. Není v grafech uveden vzhledem k jeho vysoké absorpci způsobené vysokou koncentrací hyaluronanu v roztoku.

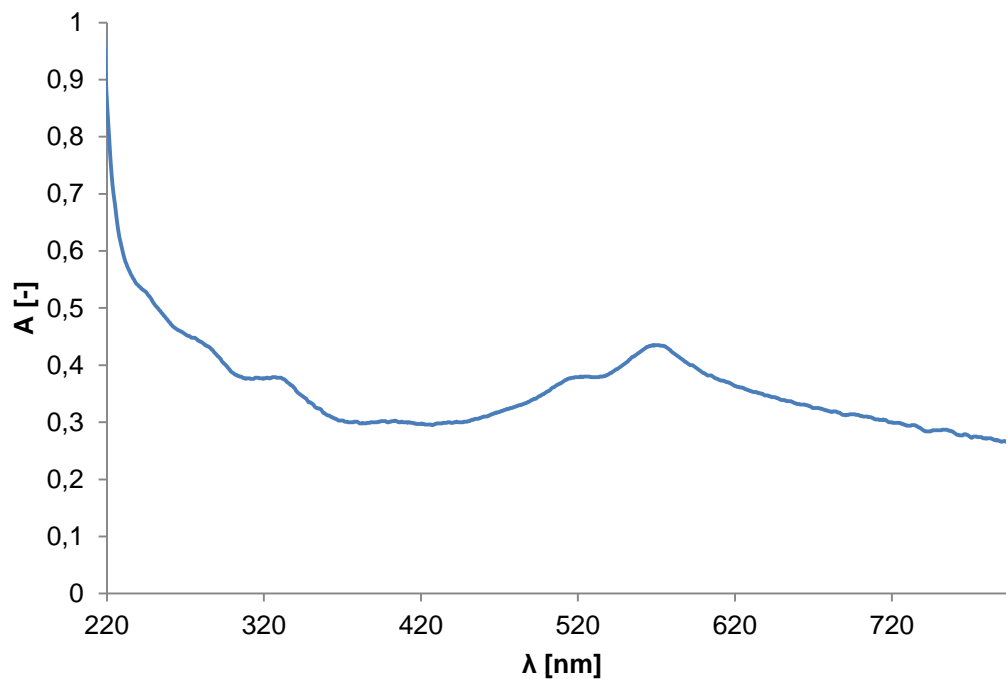
Absorpce hyaluronanu se ve všech roztocích v jeho absorpčním maximu pohybovala mezi hodnotami 3,5 – 4. Vzhledem k nepřítomnosti rozpuštěného sudanu red G již u nepřefiltrovaných vzorků se po přefiltrování ve vzorcích rozpuštěný sudan red G nenacházel. Z měření lze tedy usuzovat, že se sudan red G po vzniku vodního roztoku s hyaluronanem nijak nerozpustí, pouze se přítomné částice rozptýlí v celém objemu roztoku. Roztok tedy vypadá homogenně, ale částice jsou pouze zadržovány vlivem viskozity hyaluronanu. Z výsledků nepublikované bakalářské práce, na kterou navazují a znovu opakují již provedené experimenty bylo potvrzeno, že pokus o navázání hydrofobní látky do struktury hyaluronanu je neúčinný. Dle návaznosti na nepublikovanou práci se pokračovalo v experimentech, ale odlišnou metodou, pomocí filmů.



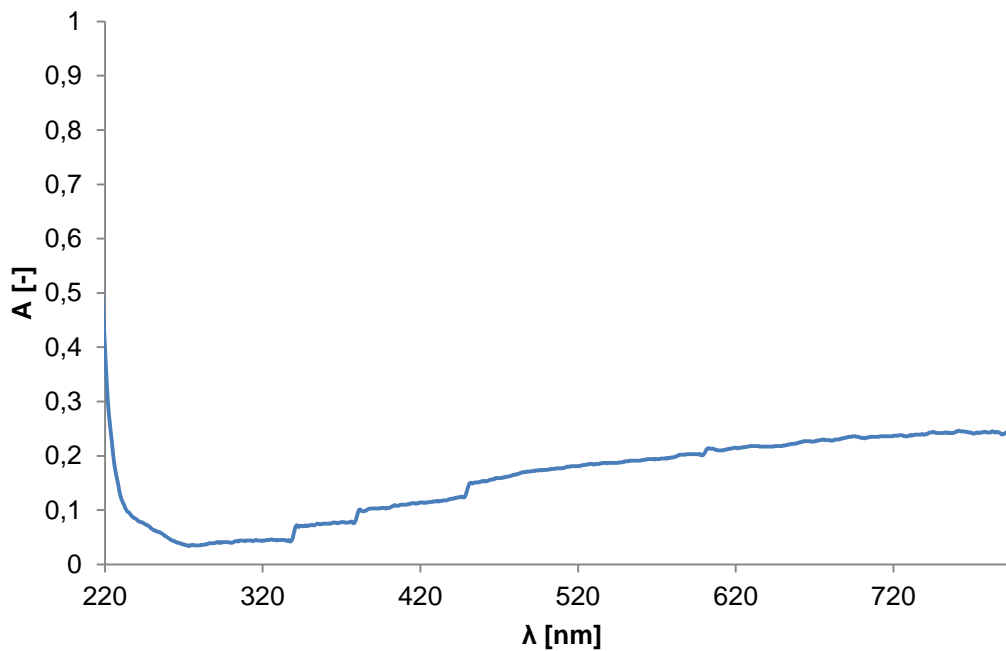
Obrázek 19: závislost absorpce na vlnové délce roztoku hyaluronanu a sudanu red G

Další měření bylo prováděno se vzorky vzniklými metodou filmu. Docházelo k tomu, že byly připravené roztoky vysušeny, vznikl tedy film, který byl následně znovu rozpuštěn v daném objemu rozpouštědla, vody. K měření byly využity vzorky jak nepřefiltrované, tak i následně přefiltrované. V grafu na obrázku č. 20 lze pozorovat, že hodnota absorpce není v oblasti absorpce sudanu red G nulová, i když se pohybuje na mnohem menší hodnotě absorpce než je absorpce u hyaluronanu. Z toho můžeme usuzovat, že je zde alespoň malá pravděpodobnost, že se část sudanu red G opravdu rozpustila v hyaluronanu. Toto tvrzení podporuje i to, že se v roztoku nacházely narůžovělá vlákna hyaluronanu, v jejichž struktuře byl pravděpodobně sudan red G navázán. Dále je tohle tvrzení podpořeno následným měřením přefiltrovaného vzorku přes filtr s velikostí pórů  $0,45 \mu\text{m}$ , kde se absorpce sudanu red G stále nenachází na nulové hodnotě, jak lze vidět v grafu na obrázku č. 21. Pokud se tedy porovnají roztoky vzniklé metodou filmu a ty bez ní, lze vidět značný posun v možnosti navázání sudanu red G do struktury hyaluronanu. V obou spektrech lze zase pozorovat viditelný trend nenulové hodnoty absorpce v celém měřeném spektru, který byl pravděpodobně způsoben difrakcí světla nerozpuštěnými částicemi sudanu red G, který byl v roztoku přítomný. Tím pádem byla absorpce vyhodnocena na jinou hodnotu, než je nula. Tímto experimentem se potvrdily výsledky

nezveřejněné práce, na kterou navazují, kde byly též získány vyšší hodnoty absorpce sudanu red G.



Obrázek 20: závislost absorpance na vlnové délce roztoku hyaluronanu a sudanu red G z rozpuštěného filmu



Obrázek 21: závislost absorpance na vlnové délce roztoku hyaluronanu a sudanu red G z přefiltrovaného rozpuštěného filmu

#### 4.5. VYHODNOCENÍ DAT VELIKOSTI ČÁSTIC VZORKŮ NA ZETASIZERU NANO ZS

Vzhledem k výsledkům získaným ze spektrofotometrie byly vzorky podrobeny technice dynamického rozptylu světla, při které bylo zjišťováno, jaká je distribuce velikosti částic přítomných v roztoku. Při měření se získala objemová distribuce velikosti částic, ze které bylo možné posoudit, jak velké částice se ve vzorcích nacházejí. Použitý přístroj Zetasizer Nano ZS byl schopen měřit částice až do velikosti 6000 nm, s velkými nepřesnostmi bylo možné měřit velikost částic až do 10000 nm. Při měření vzorků vodných roztoků byly ovšem naměřeny velikosti částic mnohem větších rozměrů, než je měřicí rozsah přístroje. Nelze tedy s jakoukoli přesností určit, jak velké částice ve skutečnosti jsou. Při pokusu určit, jak velké částice se v roztoku nachází, by byly získány hodnoty zatížené obrovskou chybou. Přístroj byl u všech vzorků schopen určit průměrnou velikost částic, které byly ve vzorcích přítomny. Většina těchto hodnot se nacházela daleko od hodnot měřitelného rozsahu použitého měřicího přístroje, nebo v oblastech blízkých horní hranici jeho maximálního rozsahu. Nejedná se tedy o hodnoty, se kterými by se v důsledku velké nepřesnosti měření dalo dále pracovat. Z toho důvodu, nebylo pomocí této metody možno zjistit, zda se v roztoku nachází rozpuštěný sudan red G. Přítomnost velkých částic byla způsobena přítomným nerozpuštěným sudanem red G. Díky jeho přítomnosti nebylo schopné získat reprodukovatelné výsledky pro potřeby bakalářské práce, proto se od této metody upustilo.

## 5. ZÁVĚR

Úkolem této bakalářské práce bylo důkladně prověřit poznatky a zjištění z předchozí práce zaměřené na tohle téma, které se zabývá problematikou, zda je prakticky možné využít nativní formu kyseliny hyaluronové jako nosič pro distribuci hydrofobních léčiv. Bylo provedeno více experimentálních měření, které podporují to tvrzení, že díky svým vlastnostem není nativní hyaluronan pro využití jako nosič léčiv vhodný. Provedené experimenty toto tvrzení pouze podporují. Hydrofobní látky, v našem případě použité hydrofobní barvivo sudan red G není ve většině případů schopné solubilizovat s nativním hyaluronanem. Dochází pouze k rozptýlení malých částic sudanu red G v celém objemu vzorku. Tyto částice jsou ve vzorku zadržovány vlivem vysoké viskozity vodného roztoku hyaluronanu. Rychlost sedimentace jednotlivých částic byla závislá na jejich velikosti, ale v časovém rámci nakonec sedimentovala většina částic, toto vizuální tvrzení je podpořeno výpočtem rychlosti sedimentace, kde některé vypočtené odpovídají časům sedimentace částic. Dalším důkazem přítomnosti rozptýleného sudanu red G, nikoliv solubilizovaného, byla filtrace, při které docházelo ve většině případů k naprostému pročištění roztoku, ve kterém se již nenacházel žádný sudan red G. Mikroskopie tohle tvrzení též podporuje. A to z toho důvodu, že lze ve vzorcích pozorovat jednotlivé částice sudanu red G, které jsou v roztoku rovnoměrně rozptýleny. V delším časovém měřítku bylo pozorováno, že dochází k celkové sedimentaci sudanu red G. Pokud ale roztok sudanu red G protřepeme, dochází opět k dispergaci částic v roztoku. Z měření bylo ovšem zjištěno, že by bylo možné částečně hydrofobní barvivo navázat do struktury hyaluronanu. Pokud se využívá látka, která obsahuje částice velmi malých rozměrů, ty lze získat například mletím, zvýší se tím jeho schopnost rozpustnosti v hyaluronanu. Přítomností malých částic podporuje dispergaci částic, ty jsou roztoku taky více zadržovány a celkově se zvýší stabilita disperze. Přítomnost rozpuštěného sudanu red G ve struktuře hyaluronanu byl pozorován u vzorků, které vznikly metodou filmu. U nich při vysoušení pravděpodobně docházelo k navázání malých částic do struktury hyaluronanu. Vizuálně byla pozorována přítomnost narůžovělých vláken hyaluronanu, které byly viditelné po rozpuštění filmu i jejich následné filtraci. Z provedených měření lze říci, že se s největší pravděpodobností nemůže nativní forma kyseliny hyaluronové jako nosiče pro hydrofobní léčiva využít. Pro tyto systémy jsou z hlediska vlastností a interakcí s léčivem vhodné jiné látky nebo i například modifikované formy kyseliny hyaluronové, které mají ve své struktuře zabudovaných více skupin vhodných pro hydrofobní interakce. Nativní hyaluronan byl v této práci zvolen především z hlediska svého přirozeného výskytu v lidském organismu, oproti ostatním možným látkám které se v současné době využívají.

## 6. CITACE

- [1] KUO, J. W. *Practical Aspects of Hyaluronan Based Medical Products*. 1. Boca Raton: CRC Press, 2006. ISBN 978-0-8493-3324-8.
- [2] FRASER, J. R. E., T. C. LARURENT a U. B. G. LAURENT. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine*. 1997, (262), 23-33.
- [3] NECAS, J., L. BARTOSIKOVA, P. BRAUNER a J. KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *VETERINARNI MEDICINA*. 2008, **53**(8), 397-411.
- [4] Hascall, V., Laurent, T.: Hyaluronan: Structure and physical properties. Glycoforum [online], 1997, [cit. 13.3.2018], <http://www.glycoforum.gr.jp/>
- [5] Scott, J.: Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solutions. Some biological consequences. Glycoforum [online], 1998, [cit. 13.3.2018], <http://www.glycoforum.gr.jp/>
- [6] Functionalized derivatives of hyaluronic acid. In: *Google* [online]. [cit. 2017-05-03]. Dostupné z: <https://www.google.ch/patents/WO1995015168A1?cl=en>
- [7] KOGAN, G., L. ŠOLTÉS, R. STERN a P. GEMEINER. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol Lett*. 2007, **29**, 17-25.
- [8] WEIGEL, P. H. Bacterial Hyaluronan Synthases. *Glycoforum* [online]. 2004, [cit. 2017-05-03]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/>
- [9] WEIGEL, P. H., V. C. HASCALL a M. TAMMI. Hyaluronan Synthases. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 1997, **22**(272), 13997-14000.
- [10] WEIGEL, P. H. Hyaluronan Synthase: The Mechanism of Initiation at the Reducing End and a Pendulum Model for Polysaccharide Translocation to the Cell Exterior. *International Journal of Cell Biology*. **2015**, 15 pages.
- [11] Hyaluronic acid. In: *Atlas of Plant and Animal Histology* [online]. Spain: University of Vigo [cit. 2018-03-18]. Dostupné z: <https://mmegias.webs.uvigo.es/02-english/5-celulas/ampliaciones/2-hialuronico.php>
- [12] PETRAK, K. Essential properties of drug-targeting delivery systems. *DRUG DISCOVERY TODAY*. 2005, **10**(23/24), 1667-1673.
- [13] JIN, Yu-Jin, U. TERMSARASAB a Dae-Kun KIM. *Hyaluronic Acid in Drug Delivery Systems*. 2010, (40), 33-43.
- [14] TRIPODO, G., A TRAPANI, M. L. TORRE, G. GIAMMONA, G. TRAPANI a D. MANDRACCHIA. Hyaluronic acid and its derivatives in drug delivery and imaging: Recent advances and challenges. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2015, (97), 400-416.
- [15] BROWN, T. J. The Development of Hyaluronan as a Drug Transporter and Excipient for Chemotherapeutic Drugs. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2008, (9), 253-260.

- [16] HAMILTON, Sara R., Shireen F. FARD, Frouz F. PAIWAND, et al. The Hyaluronan Receptors CD44 and Rhamm (CD168) Form Complexes with ERK1,2 That Sustain High Basal Motility in Breast Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2007, **282**(22), 16667-16680. DOI: 10.1074/jbc.M702078200. ISSN 0021-9258. Dostupné také z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M702078200>
- [17] SLEVIN, Mark, Jurek KRUPINSKI, John GAFFNEY, et al. Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: Uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry*. 2007, **282**(22), 16667-16680. DOI: 10.1016/j.matbio.2006.08.261. ISBN 10.1016/j.matbio.2006.08.261. ISSN 0021-9258. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0945053X06003519>
- [18] Knudson, W., Knudson, Ch.: The hyaluronan receptor, CD44. *Glycoforum* [online], 1999, [cit. 2.4.2018], <http://www.glycoforum.gr.jp/>
- [19] Knudson, W., Knudson, Ch.: The hyaluronan receptor, CD44 - an update. *Glycoforum* [online], 2004, [cit. 2.4.2018], <http://www.glycoforum.gr.jp/>
- [20] Turley, E., Harrison, R.: RHAMM, a member of the hyaladherins. *Glycoforum* [online], 1999, [cit. 2.4.2018], <http://www.glycoforum.gr.jp/>
- [21] Model for the structure of CD44. In: *Glycoforum* [online]. [cit. 2018-04-15]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA08/images/fig1.gif> SKOOG, Douglas A., F. James.
- [22] HOLLER a Stanley R. CROUCH. *Principles of instrumental analysis*. 6th ed. / Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole, c2007. ISBN 978-0495012016.
- [23] NOVOTNÁ, R., ŠILHA, T., TRÁVNÍČEK, Z. *Spektrální metody studia chemických látek*. Olomouc, 2011.
- [24] Absorption or emmission spectroscopy. In: *Wikimedia commons* [online]. Wikimedia foundantion, 2004 [cit. 2018-04-15]. Dostupné z: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f2/Absorption\\_or\\_emission\\_spectroscopy.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f2/Absorption_or_emission_spectroscopy.png)
- [25] XU, R. *Particle characterization: light scattering methods*. Dordrecht; Kluwer Academic, 2000. Powder technology series, v.13. ISBN 07-923-6300-0.
- [26] ŠEVČÍKOVÁ, P., V. KAŠPÁRKOVÁ, J. KREJČÍ a P. VLTAVSKÁ. DYNAMICKÝ ROZPTYL SVĚTLA V ANALÝZE KOLOIDNÍCH SYSTÉMŮ. *Chemické listy*. 2014, (108), 479-482.
- [27] Oddělení strukturní analýzy, katedra fyziky kondenzovaných látek MFF UK: Dynamický rozptyl světla. [Http://www.xray.cz/](http://www.xray.cz/). 2008 [cit. 2016-11-11]. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/dls.htm>
- [28] Insider's Guide to Hyaluronic Acid Skincare. In: *Naked Actives Skin Care* [online]. [cit. 2018-05-07]. Dostupné z: <http://nakedactives.com/blog/hyaluronic-acid.html>

[29] Sudan red G. In: *Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2018-05-07]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/sudanredg27831122955611?lang=en&ion=CZ>

[30] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 2. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 80-708-0422-X.

[31] KYMPLOVÁ, Jaroslava. *Katalog metod v biofyzice* [online]. [cit. 2018-04-17]. <http://portal.lf1.cuni.cz/clanek-793-katalog-metod-v-biofyzice>

[32] WATT, Ian M. *The principles and practice of electron microscopy*. 2nd ed. New York: Cambridge University Press, 1997. ISBN 05-214-3456-4.

[33] Bilerova H., Rheology of hyaluronan solutions, Brno, 2012, 109 p. The thesis on faculty of chemistry, Brno University of Technology, Institute of Physical and Applied Chemistry. The

head of the thesis Prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

[34] KARGEROVÁ, A. a M. PEKAŘ. Densitometry and ultrasound velocimetry of hyaluronan solutions in water and in sodium chloride solution. *Carbohydrate Polymers*. 2014, (106), 453-459. ISSN 0144-8617.