



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

PŘÍPRAVA A STUDIUM NOSIČOVÝCH SYSTÉMŮ LÉČIV ZA POUŽITÍ PROGRAMOVĚ ŘÍZENÉ LYOFILIZACE

PREPARATION AND STUDY OF DRUG CARRIER SYSTEMS USING PROGRAM-CONTROLLED
LYOPHILIZATION

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Michaela Dufková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.

BRNO 2025

Zadání di lomové áce

Číslo práce: FCH-DIP2048/2024 Akademický rok: 2024/25
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Michaela Dufková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie bioaktivních látek
Vedoucí práce: **doc. Ing. Vojtěch Enev, Ph.D.**

Název di lomové áce:

Příprava a studium nosičových systémů léčiv za použití programově řízené lyofilizace

Zadání di lomové áce:

1. cílem této DP je připravit a otestovat nosičové systémy léčiv na bázi dextranu a vhodně zvolené sloučeniny reprezentující silně hydrofobní léčivo za použití programově řízené lyofilizace k zpřístupnění hydrofobních domén na řetězci tohoto polysacharidu;
2. bude provedena literární rešerše na možnosti využití programově řízené lyofilizace k přípravě nosičových systémů léčiv;
3. studentka se bude věnovat fyzikálně–chemické charakterizaci volného (nevázaného) léčiva tzn. kurkuminu;
4. budou připraveny nosičové systémy dextranu a kurkuminu za použití programově řízené lyofilizace;
5. nosičové systémy léčiv budou studovány pomocí termických a spektrometrických instrumentálních technik;
6. studentkou bude kvantifikován zbytkový obsah ko–rozpouštědla v připravených nosičových systémech.

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2025:

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

Bc. Michaela Dufková
studentka

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

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 3.2.2025

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Cílem této diplomové práce bylo připravit nosičové systémy léčiv na bázi dextranu a hydrofobního léčiva pomocí programově řízené lyofilizace ke zpřístupnění hydrofobních domén. Lyofilizace byla zvolena jako vhodná technologie umožňující vytvoření hydrofobního efektu mezi jednotlivými řetězci polysacharidu. Při přípravě byly využity dvě molekulové hmotnosti dextranu a terc-butylalkohol jako ko-rozpouštědlo, které napomáhá inkorporaci hydrofobního kurkuminu do polymerní sítě. Pro sledování změn ve struktuře polymeru a morfologii vzniklých systémů byly použity infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací a skenovací elektronová mikroskopie. 3D fluorescenční spektroskopie byla využita jako metoda pro sledování chování kurkuminu v různých rozpouštědlech. ATR-FTIR spektroskopie detekovala posuny absorpčních pásů indikující větší uspořádání polymeru, což souvisí s projevem hydrofobního efektu. SEM analýza ukázala, že vzorky zmrazené kapalným dusíkem tvoří jemně porézní vláknité struktury, které mohou zlepšit schopnost nosiče vázat hydrofobní látky. Fluorescenční analýza potvrdila, že chování kurkuminu je silně závislé na polaritě prostředí. Na závěr byla provedena kvantifikace kurkuminu a residuálního ko-rozpouštědla pomocí HPLC a plynové chromatografie. Pomocí HPLC byla potvrzena přítomnost kurkuminu v připravených systémech. HPLC a plynová chromatografie potvrdily pouze stopové množství terc-butylalkoholu ve výsledných systémech, a tedy je využití terc-butylalkoholu coby ko-rozpouštědla bezpečné pro případnou přípravu nosičových systémů. Tato diplomová práce ukázala, že nosičový systém na bázi nativního dextranu připravený pomocí lyofilizace je vhodným materiálem pro inkorporaci hydrofobních molekul. Tato práce může přispět k vývoji účinných a biokompatibilních nosičových systémů, na bázi polysacharidů, pro hydrofobní léčiva.

KLÍČOVÁ SLOVA

nativní dextran, nosičový systém, kurkumin, hydrofobní efekt, lyofilizace, terc-butylalkohol

ABSTRACT

The aim of this thesis was to develop drug carrier systems based on dextran and a hydrophobic active compound using program-controlled lyophilization in order to create accessible hydrophobic domains. Lyophilization was selected as a suitable technique enabling the formation of hydrophobic interactions between individual polysaccharide chains. Two molecular weights of dextran and tert-butyl alcohol as a co-solvent, facilitating the incorporation of hydrophobic curcumin into the polymer network, were used during the preparation. To monitor structural changes in the polymer and the morphology of the resulting systems, Fourier-transform infrared spectroscopy and scanning electron microscopy were used. 3D fluorescence spectroscopy served as a method to evaluate the behavior of curcumin in various solvents. ATR-FTIR spectroscopy detected shifts in absorption bands indicating increased polymer organization, which is associated with the expression of the hydrophobic effect. SEM analysis revealed that samples frozen with liquid nitrogen formed fine porous fibrous structures that may enhance the carrier's ability to bind hydrophobic compounds. Fluorescence analysis confirmed that the behavior of curcumin is strongly dependent on the polarity of the surrounding environment. Finally, the quantification of curcumin and residual co-solvent was performed using HPLC and gas chromatography. HPLC analysis confirmed the presence of curcumin in the prepared systems. Both HPLC and GC detected only trace amounts of tert-butyl alcohol in the final products, indicating that the use of this co-solvent is safe for potential carrier system development. This study demonstrated that a native dextran-based carrier systems prepared by lyophilization represent is a suitable material for the incorporation of hydrophobic molecules. This work may contribute to the development of effective and biocompatible polysaccharide-based drug delivery systems.

KEYWORDS

native dextran, carrier system, curcumin, hydrophobic effect, lyophilization, tert-butyl alcohol

DUFKOVÁ, Michaela. Příprava a studium nosičových systémů léčiv za použití programově řízené lyofilizace. Online, diplomová práce. Vojtěch ENEV (vedoucí práce). Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2025. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/162090>. [cit. 2025-05-03].

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla velice poděkovat svému vedoucímu práce doc. Ing. Vojtěchu Enevovi, Ph.D. za jeho trpělivost, ochotu, odborné vedení a věnovaný čas při psaní této práce. Poděkování patří také mému konzultantovi Ing. Marku Řihákovi za pomoc při měřeních a za cenné návrhy vedoucí k optimalizaci dat. Dále bych chtěla poděkovat za výpomoc při měření a zpracování naměřených dat Ing. Michalovi Kalinovi, Ph.D., Ing. Monice Trudičové, Ph.D., Ing. Paule Večeríkové a laborantce Leoně Kubíkové. Zároveň bych chtěla poděkovat za podporu mojí rodiny a přátel v průběhu celého studia.

OBSAH

1	ÚVOD	10
2	TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1	Dextran	11
2.1.1	Fyzikálně-chemické vlastnosti dextranu	11
2.1.2	Biosyntéza	12
2.1.3	Degradace	13
2.1.3.1	<i>Chemická degradace</i>	13
2.1.3.2	<i>Enzymatická degradace</i>	13
2.1.3.3	<i>Alternativní přístupy</i>	14
2.1.4	Biotechnologické metody výroby dextranu	14
2.1.5	Využití dextranu	15
2.2	Kurkumin	16
2.2.1	Chemická struktura	16
2.2.2	Fyzikálně-chemické vlastnosti	16
2.2.3	Biologické účinky a dostupnost	17
2.3	Nosičové systémy na bázi polysacharidu	17
2.3.1	Formy polysacharidových nosičů pro distribuci léčiv	18
2.3.1.1	<i>Micely</i>	18
2.3.1.2	<i>Nanočástice</i>	19
2.3.1.3	<i>Hydrogely</i>	19
2.3.1.4	<i>Nanogely</i>	20
2.3.1.5	<i>Hybridní a kompozitní systémy</i>	20
2.3.1.6	<i>Komplexy s liposomy</i>	20
2.3.2	Využití polysacharidových nosičů ve farmaceutickém průmyslu	20
2.3.3	Mechanismy navázání léčiva na polysacharidové nosiče	22
2.3.3.1	<i>Kovalentní navázání</i>	22
2.3.3.2	<i>Nekovalentní interakce</i>	23
2.4	Lyofilizace	26
2.4.1	Stabilita lyofilizovaných systémů	26
2.4.2	Použití ko-rozpouštědel a jejich vliv na strukturu a stabilitu systému	27
2.5	Současný stav řešené problematiky	27
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
3.1	Použité chemikálie	30

3.2	Použité přístroje, programy a pomůcky	30
3.3	Příprava vzorků	31
3.3.1	Příprava vzorků pro analýzu SEC-MALS-dRI.....	31
3.3.2	Příprava vzorků pro měření fluorescenčních spekter a UV/Vis	31
3.3.3	Příprava vzorků pro lyofilizaci	31
3.3.4	Příprava kalibrační řady pro UV-Vis stanovení kurkuminu.....	32
3.3.5	Příprava kalibrační řady pro plynovou chromatografii	32
3.3.6	Příprava kalibrační řady pro HPLC	32
3.4	Postup měření	33
3.4.1	Stanovení molekulové hmotnosti dextranu pomocí SEC-MALS-dRI	33
3.4.2	Nastavení průběhu sušení	34
3.4.3	Měření vlhkosti vzorků pomocí termogravimetrické analýzy.....	35
3.4.4	3D Fluorescenční spektrometrie.....	35
3.4.1	Měření vnitřního filtračního efektu	35
3.4.2	Měření na ATR-FTIR spektrometru.....	36
3.4.3	Měření na SEM.....	36
3.4.4	UV/Vis stanovení kurkuminu v nosičovém systému	37
3.4.5	Stanovení reziduí terc-butylalkoholu pomocí plynové chromatografie	37
3.4.6	Stanovení terc-butylalkoholu pomocí HPLC chromatografie	37
4	Výsledky a diskuze	38
4.1	Výsledná molekulová hmotnost dextranu	38
4.2	Termogravimetrická analýza	38
4.3	3D fluorescenční spektrometrie.....	39
4.3.1	Spektrum kurkuminu v ethanolu	39
4.3.2	Spektrum kurkuminu v chloroformu	39
4.3.3	Spektrum kurkuminu ve vodě.....	40
4.4	ATR-FTIR spektrometrie	41
4.4.1	HMW dextran	42
4.4.2	LMW dextran	43
4.5	UV/Vis.....	44
4.6	Stanovení obsahu kurkuminu ve vzorku pomocí HPLC	45
4.7	Stanovení reziduí terc-butylalkoholu pomocí GC a HPLC.....	46
4.8	SEM.....	47

4.8.1	Snímky SEM	48
4.8.2	Srovnání a diskuse morfologických rozdílů	50
5	Závěr.....	52
6	POUŽITÁ LITERATURA	54
7	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	63
7.1	Seznam zkratk.....	63
7.2	Seznam symbolů.....	63
8	Přílohy	65

1 ÚVOD

Nosičové systémy léčiv na bázi biopolymerů se v posledních letech staly předmětem intenzivního výzkumu díky jejich potenciálu zlepšit účinnost léčiv. Polysacharidy mohou být vhodnou skupinou materiálů pro vytvoření nosičových systémů díky jejich biokompatibilitě, biodegradabilitě a možnosti modifikace pro cílené doručování léčiv. Nosičové systémy na bázi polysacharidu mohou zvýšit stabilitu léčiva, prodloužit jeho biologickou dostupnost a snížit nežádoucí vedlejší účinky [1], [2].

Dextran má příznivé vlastnosti pro to, aby sloužil jako nosičový systém pro hydrofobní léčiva. Díky jeho struktuře tvořené D-glukózovými jednotkami spojenými $\alpha(1,6)$ -glykosidickými vazbami a s $\alpha(1,2)$, $\alpha(1,3)$ a $\alpha(1,4)$ větvením má dextran vlastnosti, díky kterým může mít široké využití ve farmacii a biomedicíně. Mezi jeho příznivé vlastnosti patří: vysoká rozpustnost ve vodě, nízká antigenicita, biologická kompatibilita a tepelná stabilita. Dextran může být také syntetizován v širokém rozmezí molekulových hmotností, což zvyšuje jeho možnosti využití. Struktura dextranu tvoří hydrofobní a hydrofilní část a ve vodném roztoku tak dokáže enkapsulovat hydrofobní látky, které jsou pak chráněny před rozpuštěním do okolního prostředí. Léčivo je tímto způsobem chráněno a je transportováno nosičovým systémem k místu účinku [3].

Kurkumin, přírodní polyfenol extrahovaný z kurkumy, je známý pro své antioxidační, protizánětlivé a protinádorové účinky. Jeho využití v medicíně je však omezeno jeho hydrofobní povahou a nízkou biologickou dostupností. Za účelem zlepšení jeho stability a zvýšení účinnosti při aplikaci v organismu je třeba najít vhodné nosičové systémy, které by umožnily efektivní dodání kurkuminu na místo účinku [4], [5], [6].

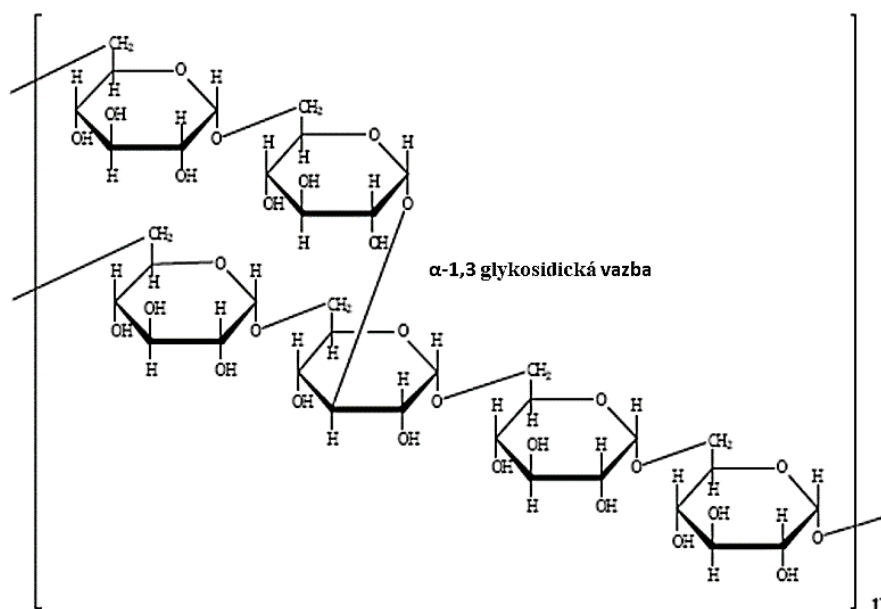
Cílem této diplomové práce bylo připravit nosičový systém na bázi nativního dextranu vhodný pro inkorporaci hydrofobního léčiva kurkuminu. Systém byl připraven metodou lyofilizace s cílem zpřístupnit hydrofobní domény dextranu a dosáhnout tak enkapsulace kurkuminu. Struktura výsledného nosiče a účinnost navázání léčiva byla analyzována pomocí Fourierovy transformované infračervené spektroskopie a skenovací elektronové mikroskopie. Fluorescenční vlastnosti kurkuminu v různých rozpouštědlech byly sledovány pomocí fluorescenční spektrometrie. Tyto metody umožnily potvrdit interakce mezi dextranem a kurkuminem. Dále byla provedena kvantifikace zbytkového ko-rozpouštědla v systému pomocí kapalinové a plynové chromatografie.

Výsledky této práce mohou přispět k rozvoji nových strategií v oblasti nosičových systémů na bázi polysacharidu pro hydrofobní léčiva, jako je kurkumin, a otevřít nové možnosti v oblasti jejich využití.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Dextran

Dextran je biodegradabilní polysacharid syntetizovaný enzymatickou aktivitou dextransacharázy, která využívá sacharózu jako jediný zdroj uhlíku. Je produkován řadou mléčných bakterií, konkrétně rodů *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Weisella*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Acetobacter* a *Leuconostoc* [7], [8], [9]. Dextran je komplexní rozvětvený glukán, skládající se z D-glukózových monomerních jednotek spojených především $\alpha(1,6)$ glykosidickými vazbami, přičemž boční řetězce jsou často připojeny $\alpha(1,3)$ vazbami a méně často $\alpha(1,2)$ nebo $\alpha(1,4)$ vazbami. Finální strukturní charakteristiky dextransacharázy jsou silně ovlivněny při biotechnologické výrobě typem mikroorganismu, složením kultivačního média, fermentačními podmínkami a specificitou produkované dextransacharázy [3].



Obr. 1: Struktura dextransacharázy [10].

2.1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti dextransacharázy

Dextran je biologicky degradovatelný exopolysacharid, jehož struktura je tvořena převážně D-glukózovými jednotkami spojenými $\alpha(1,6)$ -glykosidickými vazbami, přičemž se mohou vyskytovat i větvení typu $\alpha(1,2)$, $\alpha(1,3)$ a $\alpha(1,4)$. Tato struktura mu dává řadu příznivých fyzikálně-chemických vlastností, které umožňují jeho široké využití ve farmacii a biomedicíně. Mezi nejvýznamnější patří jeho vysoká rozpustnost ve vodě, nízká antigenicita, biologická kompatibilita a tepelná stabilita. Dextran také může být syntetizován v širokém rozmezí molekulových hmotností (obvykle od 20 do 2000 kDa) [3].

Zvláštní pozornost si zaslouží dextran produkovaný kmenem *Leuconostoc mesenteroides*, který obsahuje přibližně 95 % $\alpha(1,6)$ vazeb. Tento typ dextransacharázy je často používán ve farmacii, díky své nízké antigenicitě a vysoké rozpustnosti ve vodném prostředí. Kmen *L. mesenteroides* produkuje dextran s průměrnou molekulovou hmotností 1,4 MDa, který se dále vyznačuje

vysokou absorpční kapacitou pro vodu (361,8 %) a olej (212,0 %), dobrou emulgační aktivitou (58,3 %) a pseudoplastickým tokovým chováním s jemnými gelotvornými vlastnostmi [11], [12]. Tyto vlastnosti dextransu i jeho možnost chemické modifikace tvoří z dextransu ideální polymer pro vývoj nosičových systémů léčiv s řízeným uvolňováním.

2.1.2 Biosyntéza

Biosyntéza dextransu je přirozený enzymatický proces, při němž dochází k polymerizaci glukózových jednotek převážně přes $\alpha(1,6)$ glykosidické vazby, s vedlejšími řetězci tvořenými vazbami $\alpha(1,2)$, $\alpha(1,3)$ nebo $\alpha(1,4)$. Klíčovým katalyzátorem tohoto procesu je enzym dextransacharáza. Tento enzym je extracelulárně produkován některými bakteriemi mléčného kvašení, např. *Leuconostoc*, *Weissella*, *Lactobacillus*. Různé bakterie mléčného kvašení vykazují rozdílnou substrátovou specifitu a tvoří rozdílné struktury dextransu [13], [14].

Dextransacharáza využívá sacharózu jako substrát, odštěpuje z ní fruktózu a připojuje glukózovou jednotku k rostoucímu polysacharidovému řetězci. Tato polymerace probíhá na redukujícím konci dextransu. Enzym vykazuje vysokou procesivitu, což znamená, že více glukózových jednotek je postupně připojováno k jednomu řetězci bez jeho uvolnění z aktivního místa enzymu. Tato vlastnost hraje zásadní roli při řízení molekulové hmotnosti dextransu, čím nižší je koncentrace dextransacharázy, tím delší polymerní řetězce vznikají, protože je k dispozici méně aktivních míst a polymerace probíhá na menším počtu rostoucích řetězců [15], [16], [17].

Na výslednou molekulovou hmotnost a strukturu dextransu má dále vliv koncentrace sacharózy – vyšší koncentrace vede k vyšší molekulové hmotnosti výsledného produktu. Dále má na strukturu dextransu vliv teplota reakce – zvýšením teploty z 20 °C na 30 °C se zvyšuje výtěžnost i střední molekulová hmotnost dextransu. Také přítomnost akceptorových molekul (např. isomaltóza nebo maltóza) ovlivňuje výslednou strukturu dextransu. Akceptorové molekuly mohou kompetitivně inhibovat polymeraci, nebo naopak ovlivnit větvení vzniklého polymeru [16], [18].

V experimentech s kmenem *Leuconostoc mesenteroides* bylo syntetizováno 33 variant dextransů s molekulovými hmotnostmi od cca 20 kDa do 1,6 MDa. Při těchto experimentech bylo prokázáno, že řízením koncentrace enzymu, sacharózy a teploty lze efektivně ovlivnit molekulovou hmotnost výsledného polysacharidu [16].

Kromě klasické polymerace dextransu dochází i k transglykosylačním reakcím, kdy enzym přenáší glukózové jednotky na jiné sacharidy či dextransové řetězce. Tyto akceptorové reakce umožňují vznik specifických větvených struktur, což má význam zejména při navrhování nových funkcionalizovaných dextransů např. pro farmaceutické využití [15].

2.1.3 Degradace

Dextran vykazuje vysokou stabilitu vůči běžným fyzikálně-chemickým podmínkám. Přesto může podléhat různým degradačním mechanismům, a to jak chemickým, tak enzymatickým. Znalosti mechanismů degradace dextranu jsou zásadní pro jeho účinné využití v nosičových systémech léčiv, zejména z hlediska stability, řízeného uvolňování a bezpečnosti. K rozkladu tohoto polysacharidu může docházet jak během fermentace, kde je konzumován mikroorganismy, tak i enzymaticky či chemicky v technologických procesech. Dextran může být hydrolyzován na fragmenty s nižší molekulovou hmotností, které nacházejí specifické využití ve farmacii a biotechnologiích [9], [12].

2.1.3.1 Chemická degradace

Chemická degradace je popsána jako rychlý proces, který však vyžaduje použití silných kyselin, zásad, nebo oxidačních činidel, a to často za vysoké teploty. Tento postup vede k rozštěpení polysacharidového řetězce na oligomerní produkty, přičemž hlavní mechanismus zahrnuje hydrolýzu glykosidických vazeb za působení silné kyseliny a vysoké teploty. Výsledkem je poté směs oligosacharidů různé délky, které mohou následně být charakterizovány pomocí kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Výhodou chemické degradace je možnost snižovat molekulové hmotnosti u struktur, které jsou rezistentní vůči enzymům (např. dextran s $\alpha(1,3)$ a $\alpha(1,6)$ vazbami) [19], [20].

2.1.3.2 Enzymatická degradace

V lidském těle může být dextran degradován celou řadou mikroorganismů, zejména střevními bakteriemi, jako jsou *Bacteroides spp.* nebo *Veillonella rogosae*, které produkují dextranolytické enzymy rozkládající vysokomolekulární dextran na kratší oligosacharidy nebo dokonce na nízkomolekulární sloučeniny isomaltooligosacharidy, které následně slouží jako substrát pro fermentační procesy. Výsledkem fermentace mohou být krátkořetězcové mastné kyseliny, jako acetát, propionát a butyrát, které mají prokázaný prebiotický účinek [20], [21].

Enzymatická degradace dextranu je řízený, šetrný a ekologický proces, který se liší od chemických metod, a je používán zejména tehdy, je-li požadováno zachování biologicky aktivních produktů. Zásadní roli v degradaci dextranu hrají enzymy zvané dextranázy. Tyto enzymy hydrolyticky štěpí především $\alpha(1,6)$ vazby v hlavním řetězci dextranu. Na základě mechanismu účinku je lze rozdělit na exo-dextranázy, které působí na koncové vazby a uvolňují glukózu, nebo endo-dextranázy, které štěpí vnitřní vazby a vedou k rychlému rozpadu polysacharidu na směs kratších fragmentů [22].

Díky těmto vlastnostem jsou dextranázy široce využívány v technologické praxi např. pro zpracování cukrové třtiny a řepy, kde rozkládají nežádoucí dextran vznikající mikrobiální kontaminací, nebo na výrobu funkčních oligosacharidů v potravinářství, či pro léčebné účely [22]. Specifickou oblastí výzkumu je degradace větvených dextranů, které obsahují $\alpha(1,2)$ a $\alpha(1,3)$ glykosidické větve. Tyto struktury jsou odolné vůči běžné enzymatické hydrolýze, a jejich štěpení vyžaduje specializované enzymy. Některé bakterie střevního mikrobiomu, jako například *Bifidobacterium* nebo *Bacteroides spp.*, dokážou tyto větvené dextrany fermentovat na krátkořetězcové mastné kyseliny [20].

2.1.3.3 Alternativní přístupy

Kromě enzymatických a chemických mechanismů byly popsány i alternativní přístupy k degradaci dextransu, zejména ultrazvuková degradace. Ultrazvukové vlny působí prostřednictvím kavitačních jevů, které vytvářejí lokálně vysoké teploty a tlak, čímž dochází ke štěpení glykosidických vazeb. Studie ukázaly, že sonikace je účinná pro snižování molekulové hmotnosti i viskozity dextransu, přičemž nejúčinnější byla kombinace vysoké intenzity (672 W/cm²), dlouhého času ošetření (120 minut) a nízké koncentrace roztoku (3 % w/v). Tento přístup umožňuje přesně řízenou degradaci bez nutnosti chemických činidel. Ultrazvuková degradace se ukazuje jako vhodná alternativa tam, kde jsou enzymatické nebo chemické metody neefektivní nebo nevhodné. Například u dextransu, který obsahuje střídavé $\alpha(1,6)$ a $\alpha(1,3)$ vazby a enzymy a běžné hydrolázy tak nejsou schopny efektivně štěpit tento polymer. Navíc chemické metody vyžadují agresivní podmínky a mohou vést ke ztrátě biologické aktivity molekul [23].

2.1.4 Biotechnologické metody výroby dextransu

V přírodě dextrans syntetizují bakterie mléčného kvašení, zejména z rodů *Leuconostoc*, *Weissella*, *Lactobacillus* a *Streptococcus*. Nejvýznamnějším producentem pro průmyslové využití je kmen *Leuconostoc mesenteroides*, který je považován za bezpečný a stabilní pro biotechnologické aplikace. Klíčovým enzymem při jeho syntéze je dextransacharáza, která využívá sacharózu jako substrát. [3], [11], [17].

Produkce dextransu probíhá především fermentační metodou. Fermentace probíhá v médiu obsahujícím sacharózu jako hlavní zdroj uhlíku. Bakteriální enzym dextransacharáza lokalizovaný extracelulárně, hydrolyzuje sacharózu na fruktózu a glukózu. Glukóza je dále polymerizována na dextrans, zatímco fruktóza je metabolizována intracelulárně např. na D-laktát. Tento proces probíhá za kontrolovaných podmínek (20–30 °C, pH 6–7 a přívod kyslíku), přičemž výsledný dextrans se hromadí v kultivačním médiu jako viskózní extracelulární produkt. Používané fermentační médium obsahuje kromě sacharózy (10–20 %) i kvasnicový extrakt, maltózu, kasein, pepton a trypton, přičemž obvykle se přidávají také nízké koncentrace vápníku a fosfátů. Jako levná surovina pro produkci dextransu se ukazuje být vhodná melasa z cukrové třtiny. Tato melasa však musí být předupravená, a to tak, že se z ní odstraní inhibiční látky. Fermentační produkce dextransu je citlivá na různé faktory, jako jsou koncentrace cukrů, zdroje dusíku a fosfátů, velikost inokula, rychlost míchání a pH média [3], [11], [17]. Během fermentace pH klesá z neutrálních na kyselé hodnoty (~pH 5), což může vyžadovat stabilizaci systému pomocí neiontových detergentů. Přídavek iontů (např. Ca²⁺, PO₄³⁻) může stabilizovat aktivitu enzymu a ovlivnit strukturu výsledného polysacharidu. Fermentačně produkováný dextrans má často vysokou molekulovou hmotnost (až > 1000 kDa), a bývá následně zpracován pro získání požadované molární hmotnosti. Ve farmaceutickém průmyslu se nízkomolekulární dextrans často získává z vysokomolekulárního nativního dextransu z *Leuconostoc mesenteroides* kyselou hydrolýzou (např. kyselinou sírovou nebo chlorovodíkovou). Taková hydrolýza umožňuje kontrolu molekulových hmotností výsledných dextransů [11], [17].

Kromě fermentační cesty lze dextrans produkovat i enzymaticky pomocí purifikovaných nebo geneticky modifikovaných dextransacharáz. Glukózové jednotky jsou polymerizovány

v in vitro systému, kde je enzym přítomen bez buněk. Tato metoda nabízí výhody, jako je absence vedlejších metabolitů, možnost přesného ovlivnění struktury produktu (větvení, molekulová hmotnost) a snížení výrobních nákladů. Enzymatická metoda dokonce umožňuje získat zcela lineární dextransy. Nevýhodou bývá vyšší cena enzymu a nutnost čistého substrátu, ale v laboratorním měřítku je metoda velmi účinná [17].

Výsledná struktura a vlastnosti dextransu závisí nejen na použitém kmenu, nebo enzymu, ale i na podmínkách fermentace. Vyšší teploty (nad 25 °C) vedou ke zvýšenému větvení, zatímco nižší teploty podporují tvorbu dextransů s vyšší molekulovou hmotností. Koncentrace sacharózy rovněž ovlivňuje výtěžnost a míru větvení. Syntéza dextransu s vysokou čistotou a přesně definovanou strukturou je klíčová zejména pro medicínské aplikace [17].

2.1.5 Využití dextransu

Dextran je polysacharid, který nachází široké využití nejen ve farmacii, ale také například v potravinářství, kosmetice a laboratorní diagnostice. První průmyslově vyráběný dextran pochází z fermentace pomocí *Leuconostoc mesenteroides* a jeho uplatnění se rychle rozšířilo [24]. Význam dextransu spočívá především v jeho výborné rozpustnosti, nízké viskozitě i při vyšších koncentracích a kompatibilitě s biologickým prostředím [25].

Ve farmaceutickém průmyslu se dextran využívá v různých formách a molekulových hmotnostech. Nachází využití jako inertní materiál formulovaný s aktivní složkou léčiva pro dlouhodobou stabilizaci léčiva, ale také jako pomocná látka pro finální formulaci klinických léčivých přípravků, pro zdravotnické prostředky a pro výrobu roztoků používaných v injekcích. Z důvodu své chemické inertnosti se používá ke zvýšení hmotnosti pevných lékových forem, kde účinná látka tvoří jen malý podíl celkové hmotnosti [26]. Významné je také využití dextransu jako infuzní roztok, kde slouží jako objemové expansivum při ztrátě krve v důsledku traumatu nebo chirurgického zákroku. Dextran se v medicíně dále používá jako osmotikum, lubrikant krevní plazmy, antitrombotikum a plazmatická náhrada [18].

Dextran nachází uplatnění také jako základní složka systémů cíleného podávání léčiv, zejména ve formě nanonosičů, mikrokuliček, hydrogelů či micel, které chrání účinnou látku před enzymatickou, nebo chemickou degradací a současně umožňují její řízené uvolňování v místě účinku [27]. Byly vyvinuty například konjugáty inzulinu s dextranem pro orální podání, které zvyšují jeho stabilitu při průchodu gastrointestinálním traktem [28]. Podobně byly připraveny injekčně aplikovatelné hydrogely na bázi dextransu a stříbrných nanočástic, které vykazují protinádorovou aktivitu po aktivaci bílým světlem [29].

Díky své hydrofilní povaze a přítomnosti funkčních hydroxylových skupin lze dextran snadno chemicky modifikovat, což je výhodné při konjugaci bioaktivních molekul (enzymů, protilátek, hormonů nebo léčiv) [30]. V oblasti nanomedicíny se rovněž využívají superparamagnetické nanočástice oxidu železa potažené dextranem, které slouží jako kontrastní látky pro zobrazení magnetickou rezonancí, nebo pro diagnostiku lymfatických uzlin [31].

Dextran má svůj význam i v potravinářském průmyslu, kde se využívá jako zahušťovadlo, emulgátor a gelující činidlo. Jeho přítomnost pozitivně ovlivňuje texturu, viskozitu a stabilitu potravinářských produktů [17].

V analytické chemii je dextran využíván jako matrice pro gelovou permeační chromatografii. Jeho polymery lze snadno zesítovat a vytvářet tak porézní kuličky pro separaci biomolekul

a farmaceutických sloučenin [32]. Deriváty dextransu se také uplatňují v biosenzorech, kde tvoří mezivrstvu minimalizující nespecifickou adsorpci a zajišťující efektivní immobilizaci analytů na čípech [18].

2.2 Kurkumin

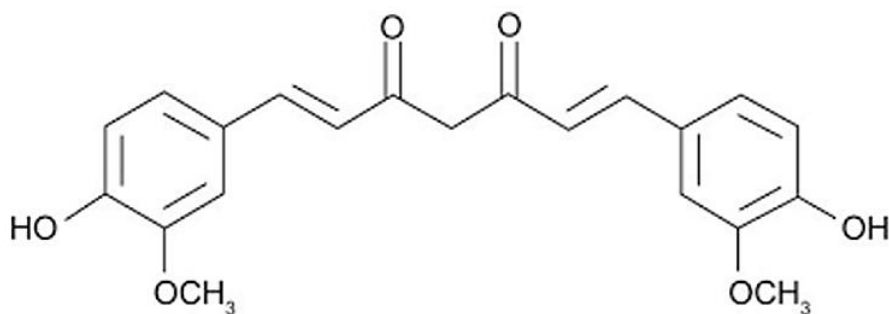
Kurkumin je přírodní polyfenolická sloučenina, která je hlavní bioaktivní složkou extraktu z oddenku kurkumy (*Curcuma longa*), rostliny patřící do čeledi *Zingiberaceae*. V tradiční indické a čínské medicíně je kurkuma využívána po tisíciletí, zejména při léčbě onemocnění spojených se záněty, trávicím traktem a jaterními funkcemi [4]. V moderní medicíně je považován za „záračnou“ látku díky svému širokému spektru biologických a farmakologických účinků. Kurkumin je známý především pro své výrazné protizánětlivé, antioxidační a antikarcinogenní účinky [4], [5], [6].

2.2.1 Chemická struktura

Kurkumin, známý také jako diferuloylmetan (1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-hepta-1,6-dien-3,5-dion), je zodpovědný za charakteristickou oranžovožlutou barvu kurkumy. Z chemického hlediska se jedná o symetrickou molekulu typu diarylheptanoid s molekulovým vzorcem $C_{21}H_{20}O_6$ a molární hmotností $368,39 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Struktura kurkuminu zahrnuje dvě aromatická jádra substituovaná methoxylovými a hydroxylovými skupinami, která jsou spojena heptadienovým můstkem obsahujícím keto-enolový systém. Kurkumin vykazuje tautomerii, kdy v kyselém prostředí převládá keto forma a v zásaditém prostředí enol forma [4], [5].

2.2.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Fyzikálně-chemické vlastnosti kurkuminu představují zásadní limitaci jeho farmaceutického využití. Jde o silně hydrofobní látku s velmi nízkou rozpustností ve vodě, což negativně ovlivňuje jeho biologickou dostupnost při perorálním podání. Kromě toho je kurkumin nestabilní v neutrálním a zásaditém prostředí, kde snadno degraduje [33]. Je rovněž nestabilní v přítomnosti světla a kyslíku, což podporuje vznik degradačních produktů s nižší bioaktivitou [6].



Obr. 2: Chemická struktura kurkuminu [5].

2.2.3 Biologické účinky a dostupnost

Biologické účinky kurkuminu jsou předmětem intenzivního výzkumu. Kurkumin vykazuje protizánětlivé, antioxidační, antimikrobiální, antivirové, hepatoprotektivní a antikarcinogenní účinky. Bylo prokázáno, že ovlivňuje řadu buněčných signálních drah, inhibuje proliferaci nádorových buněk, indukuje apoptózu a brání angiogenezi i metastázování [4], [34]. V preklinických studiích byly zaznamenány jeho pozitivní účinky v modelech ischemie, diabetu, ulcerózní kolitidy a neurodegenerativních onemocnění, jako je například Alzheimerova choroba [34]. Zároveň se vyznačuje nízkou toxicitou a dobrou snášenlivostí, což jej činí atraktivním kandidátem pro dlouhodobé terapeutické použití [5], [33].

Navzdory těmto pozitivním vlastnostem je klinické využití kurkuminu zásadně omezeno jeho nízkou orální biologickou dostupností. Například po perorálním podání dávky 2 g/kg u potkanů byla zaznamenána maximální plazmatická koncentrace pouze $1,35 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, zatímco u lidí byla po dávce 3,6 g okolo $0,006 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ [33]. Tato farmakokinetická omezení vedla k vývoji celé řady formulací, které mají za cíl zvýšit stabilitu, rozpustnost a biologickou dostupnost kurkuminu. [35], [36].

Mezi nejčastěji zkoumané nosičové systémy pro kurkumin patří nanočástice z PLGA a PEG-PLGA, liposomy, nanoemulze, polymerní micely a cyklodextrinové inkluzní komplexy. Tyto systémy nejenže zvyšují rozpustnost kurkuminu, ale rovněž prodlužují jeho biologický poločas a umožňují jeho cílené uvolňování ve specifickém prostředí, například v nádorech nebo zanícených tkáních [33], [37].

Kromě formulace do nosičových systémů je kurkumin také hojně využíván jako přírodní barvivo a aditivum ve výživě. Díky své nízké toxicitě je považován za bezpečný i při vyšších dávkách. V tomto kontextu je důležité upozornit, že navzdory rozsáhlému výzkumu jeho terapeutického potenciálu nebyl kurkumin schválen americkou agenturou FDA (Food and Drug Administration) jako léčivo pro léčbu rakoviny či jiného onemocnění. V současnosti je v USA dostupný pouze jako doplněk stravy, přičemž tato kategorie podléhá odlišnému regulačnímu režimu než léčiva [38]. Přestože jeho účinnost v klinických studiích dosud nebyla jednoznačně potvrzena, vývoj nových formulací a technologií přináší nadějně výsledky pro budoucí farmaceutické využití této přírodní látky [39].

2.3 Nosičové systémy na bázi polysacharidu

Polysacharidy představují významnou a široce využívanou skupinu materiálů pro vývoj nosičových systémů léčiv, díky své biokompatibilitě, biodegradabilitě, nízké toxicitě a možnosti chemické modifikace [1], [2].

Rozpustnost polysacharidů ve vodě je jejich další důležitou vlastností pro využití v klinické praxi. Polysacharidy se vyznačují přítomností funkčních skupin, zejména hydroxylových, které podmiňují jejich dobrou rozpustnost ve vodném prostředí. Tuto vlastnost lze cíleně ovlivnit chemickou úpravou monomerních jednotek. Příklad je chitosan, vznikající deacetylací chitinu, jehož rozpustnost v kyselém prostředí lze řídit stupněm deacetylace [40].

Díky přítomnosti reaktivních funkčních skupin, jako jsou hydroxylové, karboxylové či aminové skupiny, lze strukturu těchto polymerů upravovat tak, aby vyhovovaly specifickým požadavkům na distribuci léčiv, včetně cílení na konkrétní orgány nebo patologické struktury [1]. Polysacharidové nosiče se vyznačují schopností vázat nebo enkapsulovat jak hydrofobní,

tak hydrofilní léčiva, a to prostřednictvím nekovalentních interakcí i formou kovalentní konjugace. Tato vlastnost umožňuje cílení léčiv do určitého orgánu nebo tkáně. Mezi klíčové výhody těchto systémů patří zvýšení stability léčiv, jejich ochrana před degradačními procesy, zlepšení rozpustnosti a zvýšení biologické dostupnosti [41].

Polysacharidové nosiče se vyskytují ve formě nanočástic, micel, mikrokapslí, hydrogelů, nanogelů, tenkých filmů, liposomálních a vrstvených systémů. Tyto systémy jsou schopny reagovat na vnější i vnitřní stimuly, jako jsou změny pH, přítomnost enzymů nebo oxidační prostředí, což umožňuje cílené a kontrolované uvolňování léčiv v požadovaném místě [40], [42], [43].

Výhodou přírodních polysacharidů oproti syntetickým polymerům je jejich ekologická šetrnost a imunologická neutralita, protože jsou tělu přirozené a zpravidla nevyvolávají imunitní reakce. Některé z nich, jako je chitosan, hyaluronan či alginát, navíc vykazují vlastní bioaktivní účinky, například protizánětlivé, antioxidační nebo imunomodulační, což dále zvyšuje jejich terapeutický potenciál [41]. Mezi nejčastěji využívané polysacharidy pro vývoj nosičových systémů patří chitosan, alginát, hyaluronan a dextran, které slouží jako základní matrice pro přípravu různých lékových forem určených k orálnímu, transdermálnímu i lokálnímu podání [1], [40].

2.3.1 Formy polysacharidových nosičů pro distribuci léčiv

Polysacharidové materiály mohou být zpracovány do širokého spektra morfologicky odlišných systémů pro distribuci léčiv. Výběr konkrétní formy nosiče se odvíjí od požadavků na stabilitu, typu účinné látky, cílové tkáně a mechanismu uvolňování. Mezi nejvýznamnější formy patří micely, liposomy, nanočástice, nanogely, hydrogely a hybridní nanostruktury. Tyto systémy jsou navrhovány s ohledem na konkrétní terapeutické potřeby a cílové místo účinku – například pH-citlivé systémy nebo reaktivní systémy pro nádory. Významným trendem je vývoj hybridních struktur, které kombinují výhody různých typů materiálů, např. polysacharid-kovové nanočástice, s cílem dosáhnout maximální účinnosti léčby [42], [43].

2.3.1.1 Micely

Micely představují nanostruktury tvořené amfifilními deriváty polysacharidů s hydrofobním jádrem a hydrofilním obalem, které se samovolně sestavují ve vodném prostředí. Tyto systémy vznikají chemickou modifikací polysacharidů navázáním hydrofobních skupin. Výsledná struktura umožňuje efektivní enkapsulaci hydrofobních léčiv a jejich stabilizaci v biologických tekutinách. Micely zlepšují rozpustnost léčiva díky svému hydrofilnímu obalu. U micel je možné upravovat jejich velikosti, díky čemuž mohou být léky směřovány do tkání, kde je zvýšená permeabilita, zejména do nádorové a zánětlivé tkáně. Micely zvyšují stabilitu léčiv, prodlužují jejich cirkulační dobu a snižují nežádoucí vedlejší účinky léčiv díky nižší distribuci do zdravých tkání. Micely lze modifikovat pomocí funkčních molekul schopných rozpoznat specifické molekulární znaky patologických tkání, tato schopnost umožňuje zvýšení jejich tkáňové specificity [40]. Nevýhodou micel je jejich omezená stabilita ve fyziologickém prostředí, která může vést k disociaci systému a předčasnému uvolnění zapouzdřeného léčiva. Tento jev snižuje účinnost dodání léčiva do cílové tkáně a zároveň může zvyšovat riziko systémové toxicity [44].

2.3.1.2 Nanočástice

Polysacharidové nanočástice (např. z chitosanu, alginátu, škrobu, hyaluronanu) představují vysoce efektivní nosiče léčiv pro různé cesty podání (perorální, parenterální, nazální i transdermální). Díky své velikosti jsou schopny procházet biologickými membránami, akumulovat se v cílových tkáních a chránit zapouzdřenou látku před enzymatickou degradací. [41], [43].

Mezi hlavní výhody nanočástic patří vysoká stabilita a specifita, schopnost enkapsulace hydrofilních i hydrofobních léčiv, kontrolované uvolňování, nízká toxicita a možnost cílené úpravy povrchu. Nanostruktury umožňují modifikaci částic pro aktivní i pasivní cílení (např. na nádorové buňky), a díky své velikosti mohou efektivně dosahovat cílových tkání. Dále poskytují vysokou nosnou kapacitu bez potřeby chemických reakcí s účinnou látkou, což zachovává její biologickou aktivitu. Polysacharidové nanočástice jsou často biodegradabilní a biokompatibilní, čímž minimalizují riziko kumulace v organismu a podporují bezpečný metabolický rozklad [45].

Na druhé straně mají nanočástice i své nevýhody. Patří mezi ně například tendence k agregaci v důsledku vysokého poměru povrchu k objemu, což může komplikovat jejich stabilitu při skladování. Dále je u velmi malých částic omezená nosná kapacita a může docházet k nežádoucímu náhlému uvolnění léčiva. Při nevhodném návrhu mohou také vyvolat nežádoucí biologické reakce, včetně cytotoxicity nebo zánětlivé odpovědi. Proto je nezbytné pečlivě optimalizovat jejich velikost, povrchový náboj a složení [45].

2.3.1.3 Hydrogely

Hydrogely jsou trojrozměrné, síťované hydrofilní polymerní struktury, které mají schopnost absorbovat a zadržovat velké množství vody nebo biologických tekutin, aniž by došlo k jejich rozpadu. Tato schopnost je dána přítomností hydrofilních funkčních skupin (např. $-OH$, $-COOH$, $-NH_2$) ve struktuře polymerního řetězce. Polysacharidové hydrogely, založené například na chitosanu, alginátu nebo škrobu, jsou velmi využívány v klinické praxi díky své biokompatibilitě, biologické odbouratelnosti a netoxicitě [46].

Fyzikální a chemické vlastnosti hydrogelů je možné přizpůsobit požadavkům konkrétní aplikace podle typu použitého polysacharidu a zvoleného způsobu zesíťování. Hydrogely mohou být síťovány fyzikálně (např. iontovými interakcemi) nebo chemicky (kovalentními vazbami), přičemž volba metody ovlivňuje jejich mechanickou pevnost, bobtnací chování a uvolňovací profil. Ve farmaceutických aplikacích hydrogely slouží jako formy nosičů léčiv vhodné především pro lokální podání, např. ve formě náplastí, gelových implantátů či injekcí [1], [42].

Ačkoli polysacharidové hydrogely vykazují řadu výhodných vlastností, jejich praktické využití je spojeno i s určitými omezeními. Mezi hlavní nevýhody patří zejména nízká mechanická pevnost, která může omezit jejich stabilitu v náročnějším fyziologickém prostředí. Dále je nevýhodná vysoká citlivost na změny pH, jež může vést k nežádoucímu předčasnému uvolnění účinné látky, zejména při perorálním podání. Výzvou je také obtížná kontrola rychlosti uvolňování léčiva a omezená schopnost enkapsulovat některé specifické molekuly (např. hydrofobní látky) [46].

2.3.1.4 Nanogely

Nanogely jsou nanoskopické síťované polymerní struktury schopné absorbovat velké množství vody a vázat bioaktivní látky. Jsou tvořeny polysacharidy jako například chitosan, hyaluronan nebo heparin. Mají podobné vlastnosti jako hydrogely a vykazují vysokou bioadhezivitu, citlivost na pH, nebo redoxní podmínky a umožňují cílené a kontrolované uvolňování léčiv. Tyto systémy jsou vhodné pro transport proteinů, peptidů, vakcín a genetického materiálu a nacházejí uplatnění např. v onkoterapii nebo při léčbě zánětlivých onemocnění [40], [47].

Nanogely se vyznačují dobrou rozpustností, umožňují přesné dodání léčiva do nádorových tkání a snadněji překonávají biologické bariéry. Povrch nanogelových systémů může být upraven pomocí ligandů (např. folátu, peptidů nebo protilátek), čímž se výrazně zvyšuje selektivní akumulace léčiva v nádorové tkáni [48].

Nevýhodou může být, že malé molekuly se z nanogelů uvolňují příliš rychle, což snižuje účinnost léčby, a některé kationtové nosiče mohou být pro organismus mírně toxické. Určité formulace mohou být rovněž méně vhodné pro perorální aplikaci, pokud není zajištěna jejich stabilita v gastrointestinálním prostředí [48].

2.3.1.5 Hybridní a kompozitní systémy

Hybridní a kompozitní systémy představují pokročilý přístup v návrhu nosičových struktur na bázi polysacharidů, které vznikají kombinací dvou nebo více polymerních komponent (přírodních i syntetických) s cílem optimalizovat jejich fyzikálně-chemické, mechanické a biologické vlastnosti. Takové systémy mohou být navrženy buď jako multipolymerní hydrogely, nebo jako interpenetrující polymerní sítě, přičemž každý z těchto přístupů nabízí specifické výhody. Kombinací polysacharidů s jinými polymery lze zlepšit bobtnací chování, mechanickou pevnost, biokompatibilitu i stabilitu vůči degradaci, což je zásadní pro aplikace v řízené distribuci léčiv, hojení ran nebo v tkáňovém inženýrství [49].

2.3.1.6 Komplexy s liposomy

Liposomy jsou vezikulární systémy tvořené fosfolipidovou dvojvrstvou, které mohou být stabilizovány nebo funkčně upraveny pomocí polysacharidů, jako je hyaluronan nebo dextran. Umožňují enkapsulaci hydrofobních i hydrofilních léčiv a jejich biokompatibilní povrch zajišťuje sníženou imunitní odpověď. Kombinací fosfolipidů s polysacharidy lze docílit zvýšení stability liposomů a cíleného doručení do specifických buněčných receptorů, což nachází uplatnění v onkologii [50].

Závěrem lze říci, že polysacharidové nosiče představují mimořádný význam pro farmaceutický průmysl. Volba formy, ať už micely, nanočástice či gelu, závisí na konkrétních fyziologických podmínkách. Pro každé terapeutické využití, může být nejvhodnější jiná forma.

2.3.2 Využití polysacharidových nosičů ve farmaceutickém průmyslu

Polysacharidy tvoří velmi perspektivní třídu biomateriálů pro vývoj moderních léčiv a terapeutických systémů, a to především díky své biokompatibilitě, biodegradabilitě, nízké toxicitě a možnosti chemické modifikace. Mezi nejčastěji využívané polysacharidy ve farmaceutickém výzkumu a vývoji patří chitosan, alginát, dextran, kyselina hyaluronová

a škrob, přičemž každý z těchto polymerů nabízí specifické funkční charakteristiky, které umožňují jejich využití v různých aplikačních formách [2].

Zvláštní pozornost je v posledních letech věnována systémům založeným na kombinaci chitosanu a alginátu. Obě tyto látky se vyznačují nejen výše zmíněnými biologickými výhodami, ale také vysokou schopností enkapsulace zejména hydrofobních léčiv. Obě látky jsou široce využívány ve farmaceutickém průmyslu jako transportní systémy pro hydrofobní léčiva [51]. Chitosan je přírodní derivát chitinu získávaný deacetylací. Jeho klíčovým parametrem je stupeň deacetylace, který ovlivňuje jeho rozpustnost a schopnost tvořit komplexní struktury s jinými látkami. Díky přítomnosti aminoskupin je schopen tvořit iontové zesítnění a vytvářet stabilní nanokompozity [52]. Alginát je lineární polysacharid složený z kyseliny guluronové a manuronové a tvoří v přítomnosti vápenatých iontů ionotropní gely, které jsou velmi vhodné pro zapouzdření bioaktivních látek [53]. Systémy založené na kombinaci těchto dvou polysacharidů umožňují tvorbu stabilních polyelektrolytových komplexů s řízeným uvolňováním účinné látky [54]. Bylo prokázáno, že chitosan–alginátové nosiče zlepšují rozpustnost např. kurkuminu ve vodném prostředí a umožňují jeho postupné uvolňování podmíněně změnou pH. Tato zlepšení byla potvrzena např. v práci od Chegeni a kol., kde byly připraveny nanokompozity na bázi alginátu a uhlíkových nanotrubic modifikovaných glukózou. Bylo zjištěno, že uvolňování kurkuminu bylo výrazně vyšší v alkalickém prostředí než v prostředí kyselém, což poukazuje na potenciál pro cílený transport léčiva v trávicím traktu [55].

Polysacharidové nanočástice a mikročástice, tvořené např. z chitosanu, alginátu, škrobu nebo dextranu, jsou široce využívány pro enkapsulaci hydrofilních i hydrofobních léčiv. Kombinace chitosanu a alginátu se osvědčila zejména díky výborné mukoadhezivitě, pH-dependentnímu rozpouštění a schopnosti chránit zapouzdřené látky před účinky kyselého žaludečního prostředí. Tyto systémy byly úspěšně testovány pro transport látek, jako jsou omega-3 mastné kyseliny nebo kurkumin [53].

Ve specifických terapeutických oblastech, jako je onkologie, nacházejí polysacharidové nosiče uplatnění především díky možnosti jejich funkční modifikace a cílení na určitá místa v těle. Například chitosanové micely modifikované folátem vykazují zvýšený příjem nádorovými buňkami a lepší terapeutický efekt u léčiv, jako je například doxorubicin [40], [56]. Obdobně jsou využívány nanogely a micely na bázi chitosanu, hyaluronanu či derivátů celulózy pro transmukosální a perorální podání peptidů, proteinů nebo nukleových kyselin [57].

Také v oblasti fotodynamické terapie byly vyvinuty nosiče na bázi heparinu nebo chitosanu konjugovaného s fotosenzibilizátory. Tyto systémy se samy organizují do nanostruktur a zajišťují zvýšenou akumulaci léčiva v nádorové tkáni a aktivují se působením světla, čímž umožňují cílenou a lokalizovanou terapeutickou odpověď [58].

Polysacharidy nacházejí uplatnění i mimo tradiční způsoby podávání léčiv. V současnosti se uplatňují i v oblasti dodávání vakcín, genové terapie a tkáňového inženýrství. Například samouspořádané nanostruktury z pullulanu, dextranu nebo mananu mohou být cíleně upraveny za účelem zajištění imunitní podpory nebo pro transmukosální dopravu antigenů [59], [60].

2.3.3 Mechanismy navázání léčiva na polysacharidové nosiče

Polysacharidové nosiče léčiv umožňují jak kovalentní, tak nekovalentní navázání farmakologicky aktivních látek. Oba přístupy mohou zlepšit vlastnosti léčiva. Kovalentní vazba často zvyšuje rozpustnost ve vodě a umožňuje kontrolované uvolňování (kurkumin se uvolní až po rozštěpení vazby nebo degradaci nosiče), zatímco nekovalentní enkapsulace kurkumin fyzicky chrání a zvyšuje jeho stabilitu v biologickém prostředí. Volba typu interakce mezi nosičem a léčivem významně ovlivňuje stabilitu výsledného systému, kinetiku uvolňování, cílenou distribuci i biologickou dostupnost účinné látky. Výhodou polysacharidů je jejich strukturální flexibilita a přítomnost různých funkčních skupin, které umožňují široké spektrum možných interakcí s navázaným léčivem [61], [62], [64].

2.3.3.1 Kovalentní navázání

Kovalentní vazba mezi léčivem a polysacharidovým nosičem spočívá ve vytvoření stabilní chemické vazby mezi účinnou látkou a polysacharidovým řetězcem. Výsledkem kovalentních vazeb je vznik stabilních systémů, ve kterých je léčivo pevně vázáno na nosičovou matici. K nejčastěji využívaným polysacharidům pro kovalentní konjugaci patří chitosan, kyselina hyaluronová, dextran nebo alginát. Tento přístup je výhodný zejména tehdy, pokud je cílem zvýšit stabilitu léčiva během transportu organismem, omezit jeho předčasné uvolnění a zajistit cílené uvolnění až v místě účinku. Zároveň umožňuje navrhnout systémy citlivé na fyziologické spouštěče, jako je změna pH, přítomnost enzymů nebo oxidační prostředí [61], [62].

K vytvoření kovalentní vazby se běžně využívají funkční skupiny přítomné na polysacharidovém řetězci, zejména hydroxylové, karboxylové, aminové či aldehydové. Tyto skupiny lze upravit pomocí reakcí, jako je sulfatace, karboxymethylace nebo derivatizace aktivovanými estery [61].

Na rozdíl od nekovalentních interakcí, kde je léčivo fyzikálně zachyceno v matici (např. hydrofobními silami nebo vodíkovými vazbami), kovalentní vazba vytváří trvalé spojení mezi léčivem a polymerem, čímž vzniká tzv. komplex polymer–léčivo. Tento přístup je výhodný zejména tam, kde je požadováno precizně řízené uvolňování, které nastane až po hydrolýze vazby nebo degradaci nosiče. V literatuře jsou uváděny příklady použití esterových nebo hydrazonových vazeb, které jsou specificky štěpitelné v kyselém prostředí nádoru nebo za přítomnosti lysozomálních enzymů, a jsou tak vhodné pro cílenou protinádorovou terapii [61].

Konkrétní aplikace této vazby jsou řešeny i v nedávných studiích. Například Kexin Meng a kol. chemicky navázali kurkumin pomocí sukcinanhydridu, čímž vznikl konjugát enkapsulovaný do nanostruktur s mannosylovaným chitosanem. Tento systém zvýšil rozpustnost a zlepšil biologickou dostupnost a zvýšil účinnost ve srovnání s volným kurkuminem [63]. Podobně Tong Yin a kol. popsali vytvoření ochranné vrstvy z oligochitosanu, která enkapsulovala komplex kurkuminu s hydrolyzátem proteinu *Zein* prostřednictvím kovalentní vazby. Výsledná formulace prokázala vyšší odolnost vůči působení trávicích enzymů a vedla k prodloužené retenci kurkuminu v trávicím traktu, což významně zvýšilo jeho biologickou dostupnost [36].

2.3.3.2 *Nekovalentní interakce*

Nekovalentní interakce představují zásadní mechanismus pro vazbu léčiv na polysacharidové a polymerní nosiče, zejména v případech, kdy není žádoucí chemicky modifikovat léčivo ani nosič. Tento typ vazby je založen na slabších a reverzibilních fyzikálně-chemických silách, které zahrnují především hydrofobní efekt, vodíkové vazby, elektrostatické interakce a Van der Waalsovy síly [64].

V polysacharidových systémech hrají tyto interakce důležitou roli, jak v roztocích, tak v pevných formách, ovlivňují jejich konformaci, stabilitu, rozpustnost a interakce s biologickým prostředím. Jsou často kooperativní, což znamená, že v jednom systému se může nacházet kombinace několika typů nekovalentních sil, ty společně určují výsledné chování systému v závislosti na pH, iontové síle, teplotě či přítomnosti jiných biologicky aktivních látek [62], [64].

Výhodou nekovalentního navázání je jednoduchost přípravy, reverzibilita interakce a možnost řízeného uvolnění léčiva podle aktuálních fyziologických podmínek, např. změna pH v trávicím traktu, nebo rozdíly v iontové síle v různých částech organismu [64], [65].

Nekovalentní interakce jsou také klíčové při samouspořádání nanostruktur, jako jsou polymerní micely nebo amfifilní systémy s hydrofobním jádrem, do něhož se zapouzdřují špatně rozpustná léčiva (např. kurkumin, paclitaxel). Dále se například uplatňují v cyklodextrinových inkluzních komplexech, kde hostitelská molekula (např. β -cyklodextrin) vytváří dutinu, do níž se vkládá léčivo bez nutnosti kovalentní vazby. Typickým příkladem je enkapsulace camptothecinu, u něž β -cyklodextrin zlepšil stabilitu při intravenózním podání a přispěl k prodloužení účinku léčiva u pacientů [61], [64].

Celkově lze říci, že nekovalentní interakce jsou nenáročnou cestou pro stabilizaci, enkapsulaci a distribuci léčiv, zejména u látek s nízkou rozpustností ve vodě nebo citlivostí k enzymatické degradaci [62], [65].

Mezi nejvýznamnější typy těchto interakcí patří: Vodíkové vazby představují jeden z klíčových typů nekovalentních interakcí, které sehrávají významnou roli při navázání léčiv na polymerní nosiče a stabilizaci jejich trojrozměrné struktury. Tyto interakce jsou zásadní nejen pro molekulární rozpoznávání a vazbu léčiva na cílové místo, ale rovněž významně ovlivňují fyzikálně-chemické vlastnosti léčiv, jako je rozpustnost, propustnost biologickými membránami (permeabilita) a distribuce ve vodném prostředí organismu [66]. Vodíkové vazby vznikají mezi donorem a akceptorem, tedy mezi atomem vodíku vázaným na elektronegativním atomu (nejčastěji kyslík, dusík nebo síru) a skupinou schopnou vodíkovou vazbu přijmout. V kontextu léčiv to bývají nejčastěji hydroxylové ($-OH$), amidové ($-NH$), aminoskupiny ($-NH_2$) a v menší míře také thiolové ($-SH$) skupiny. Síla vodíkové vazby je dána zejména polaritním charakterem donorové a akceptorové skupiny. Skupiny s vyšší vodíkovou kyselostí, jako jsou hydroxylové a karboxylové funkční skupiny, vykazují výraznější schopnost tvořit stabilní vodíkové interakce [66]. V systému léčivo–nosič se tyto vazby uplatňují například mezi hydroxylovými či karbonylovými skupinami léčiva a hydroxylovými skupinami polysacharidu. Taková vazba může významně přispět ke stabilitě komplexu bez nutnosti chemické modifikace léčiva. To je zvláště důležité u látek, které nejsou výrazně hydrofobní, ale obsahují funkční skupiny schopné tvořit vodíkové můstky. Tyto interakce pak pomáhají udržet léčivo v polymerní matici a řídit jeho postupné uvolňování [65]. Typickými příklady

polysacharidových nosičů, u nichž vodíkové vazby sehrávají zásadní roli při formování stabilních struktur, jsou xanthan, gellan a hyaluronan. Tyto materiály vytvářejí helikální a gelové struktury, jejichž vlastnosti jsou citlivé na změny pH, teploty a iontového složení prostředí. Vodíkové vazby v tomto kontextu přispívají k mechanické stabilitě a k viskózním a elastickým vlastnostem výsledných roztoků a gelů [64].

Elektrostatické interakce jsou založeny na přitažlivosti mezi opačně nabitými skupinami, typicky mezi kationtovými aminovými skupinami a aniontovými karboxylovými skupinami [65]. V případě polyelektrolytů, jako je chitosan (kationtový) a alginát (aniontový), umožňují tyto interakce vznik polyelektrolytových komplexů a samouspořádaných struktur, které jsou široce využívány ve farmacii, např. pro enkapsulaci léčiv, jako mukoadhezivní systémy nebo jako nosiče s řízeným uvolňováním [64]. Podobný princip se uplatňuje i u komplexů protein–polysacharid, kdy například β -laktoglobulin jako kladně nabitý protein interaguje se záporně nabitým alginátem sodným. Přitažlivost mezi bazickými aminokyselinami proteinu a karboxylovými skupinami polysacharidu vede k tvorbě rozpustných, nebo nerozpustných nanokomplexů, které mohou sloužit jako stabilní nosiče bioaktivních látek [67]. Stabilita a vlastnosti těchto komplexů jsou citlivé na různé fyzikálně-chemické parametry, zejména pH prostředí (k nejúčinnější interakci dochází při pH blízkém izoelektrickému bodu proteinu), iontovou sílu, poměr polymer/protein, molekulovou hmotnost, hustotu náboje, koncentraci biopolymerů a způsob úpravy pH při formulaci [67]. Elektrostatické interakce se rovněž uplatňují u polymerů obsahujících ionizované funkční skupiny, jako jsou karboxylové (např. u alginátu, hyaluronanu) nebo aminové (např. u chitosanu). Tyto skupiny mohou interagovat s ionizovanými léčivy, čímž umožňují stabilní fixaci i těch látek, které nejsou vhodné pro klasickou hydrofobní enkapsulaci. Výhodou tohoto mechanismu je také možnost pH-senzitivního uvolňování, jelikož ionizační stav obou komponentů závisí na prostředí, např. v různých částech trávicího traktu nebo v nádorové tkáni [65]. Z funkčního hlediska tyto komplexy poskytují výbornou ochranu bioaktivních látek (např. folátu, β -karotenu, kurkuminu) před degradací, zajišťují zlepšenou rozpustnost, brání agregaci a umožňují postupné a cílené uvolňování účinných látek podle změn fyziologického prostředí [67].

Van der Waalsovy interakce představují jednu ze základních forem nekovalentních sil. I když jsou tyto interakce slabší než předchozí typy, jejich kumulativní účinek může hrát významnou roli v celkové stabilitě systému, zejména v kombinaci s ostatními interakcemi. Tyto interakce vznikají na základě krátkodosahových přitažlivých sil mezi dočasně nebo trvale polarizovanými oblastmi molekul. V polymerech s vyšší mírou stereoregularity (například amylopektin) mohou van der Waalsovy síly podporovat agregaci a krystalizaci řetězců, což se odráží ve zvýšené mechanické pevnosti a strukturální stabilitě výsledných materiálů [64]. Význam těchto interakcí při navázání léčiva na polymerní nosič dokládá i studie od De Luci a kol., ve které pomocí molekulárních simulací analyzovali vazbu mezi proteinem (lysozymem) a polyanionickým polymerem. Autoři prokázali, že při snižování pH dochází k titraci karboxylových skupin, a tím ke ztrátě elektrostatického náboje na polymeru. Přesto zůstává protein k polymeru navázán. Tato stabilita byla přisuzována právě van der Waalsovým interakcím a vodíkovým můstkům, které nadále udržovaly molekulární kontakt mezi nosičem a proteinem. Autoři ukazují, že při velmi kyselém pH dochází ke změně vazebného motivu a interakce mezi polymerem a proteinem jsou v této situaci primárně řízeny slabšími

nekovalentními silami, přičemž i tak nedochází k uvolnění vázaného proteinu. Tato zjištění mají zásadní význam pro návrh nosičových systémů, jelikož potvrzují, že celková stabilita komplexu není výsledkem jediné dominantní interakce, ale spíše součinností více vazebných mechanismů [68].

Hydrofobní efekt představuje jeden z nejdůležitějších typů nekovalentních vazeb, který se výrazně uplatňuje při konstrukci nosičových systémů pro hydrofobní léčiva. Tyto interakce jsou typické zejména pro amfifilní deriváty polysacharidů, tedy molekuly, které obsahují hydrofilní i hydrofobní oblasti řetězce. Ve vodném prostředí dochází k jejich samouspořádání, přičemž hydrofobní části se shlukují a vytvářejí hydrofobní domény, zatímco hydrofilní části zajišťují interakci s okolním prostředím [40], [64]. Tento mechanismus má zásadní význam například při tvorbě polymerních micel, které jsou nejčastěji využívaným typem nanonosiče pro zapouzdření hydrofobních léčiv. Micely se skládají z hydrofobního jádra, kde je účinná látka uložena, a hydrofilního obalu, který zajišťuje stabilitu systému, chrání léčivo před enzymatickou degradací a imunitní detekcí, čímž prodlužuje jeho cirkulační poločas v organismu [62], [65]. Hydrofobní segmenty polymerních řetězců hrají klíčovou roli také při tvorbě reverzibilních fyzikálních gelů. Tento jev byl pozorován např. u methylcelulózy a alkylovaných chitosanů. U methylcelulózy dochází ke gelaci při zvýšení teploty, kdy se hydrofobní efekt mezi řetězci zesiluje, po ochlazení gel opět zkapalní. U alkylovaných chitosanů se gelace objevuje již při nízkých koncentracích a je výrazně ovlivněna délkou alkylového řetězce a složením média. Tento princip se využívá při vývoji stimuli-responzivních systémů, které reagují na změnu teploty nebo složení okolního prostředí [64]. Hydrofobní efekt rovněž umožňuje efektivní inkorporaci hydrofobních léčiv do polymerní matrice, čímž zvyšuje jejich rozpustnost, biologickou stabilitu a terapeutický potenciál. Bylo například prokázáno, že alkylované chitosany dokážou vázat molekuly vitamínu B₂ nebo taxolu a fungovat jako nosiče léčiv pro řízené uvolňování [64]. Hydrofobní efekt je reverzibilní a často snadno připravitelný vazebný mechanismus, který je však méně stabilní ve fyziologických podmínkách ve srovnání s kovalentními vazbami. Proto je nezbytné optimalizovat složení polymeru a podmínky prostředí, aby se minimalizovalo předčasné uvolnění účinné látky [64]. Kompatibilita mezi polymerem a léčivem může být dále zvýšena strukturální úpravou polymeru, například prodloužením hydrofobního řetězce nebo zavedením aromatických skupin do polymerní kostry. Takové úpravy mohou vést ke snížení kritické micelární koncentrace a ke zvýšení fyzikální stability výsledného systému [65]. Díky těmto vlastnostem se hydrofobní efekt stal jednou z nejvíce používaných metod nekovalentního zapouzdření hydrofobních léčiv, přičemž zvyšuje jejich biologickou dostupnost a terapeutickou účinnost a chrání před degradací [62], [64].

Zatímco kovalentní konjugace zajišťuje stabilitu a cílené uvolňování, nekovalentní vazby umožňují flexibilitu, jednoduchost přípravy a přirozenější interakce s biologickým prostředím. Výběr konkrétního typu interakce mezi polymerním nosičem a léčivem je klíčový pro výsledné chování systému v biologickém prostředí. Hydrofobní efekt je nejčastěji využíván díky své jednoduchosti a univerzálnosti, ale vodíkové a iontové vazby mohou výrazně přispět ke stabilitě a řízenému uvolňování. Kovalentní vazby pak poskytují maximální kontrolu nad uvolněním léčiva, ačkoliv je chemicky i technologicky náročnější. Ideální systém často kombinuje více typů interakcí pro dosažení optimální terapeutické účinnosti [65].

2.4 Lyofilizace

Lyofilizace je technologie sušení, při níž je materiál nejprve zmrazen a následně je z něj za sníženého tlaku odstraněna voda sublimací. Touto technologií je tedy možno vynechat kapalnou fázi vzorku. Díky tomu a díky nízkým teplotám procesu si sušený vzorek zachovává původní vlastnosti v mnohem větší míře než při konvenčním tepelném sušení. Primární využití lyofilizace je v potravinářství a farmacii, kde dokáže stabilizovat biologické materiály, např. vakcíny, bakterie, buňky a léčiva. Stabilizuje především látky s nízkou stabilitou ve vodném prostředí [69].

Proces zahrnuje tři klíčové fáze: zmrazování, primární sušení (sublimaci ledu) a sekundární sušení (odstranění zbývající vody). Při správně nastavených podmínkách dochází ke vzniku porézní pevné struktury s velmi nízkým obsahem vody. Za normálních podmínek dokáže být taková struktura stabilní po dlouhou dobu [70].

Při první fázi se za atmosférického tlaku zmrazí rozpouštědlo. Tím vznikne pevná fáze. Ve fázi primárního sušení probíhá sublimace ledu za sníženého tlaku a mírně zvýšené teploty. Rozpouštědlo ve formě ledu přechází přímo v páru a je odváděno do kondenzátoru. Tato fáze odstraní většinu volné vody. Při sekundárním sušení se odstraňuje zbývající „vázaná“ voda z materiálu zvýšením teploty při sníženém tlaku [69].

2.4.1 Stabilita lyofilizovaných systémů

Lyofilizace slouží hlavně k zajištění dlouhodobé fyzikálně-chemické stability produktů, jako jsou polymerní nanočástice nebo liposomy [71].

Výsledná struktura lyofilizátu závisí na přesně řízené teplotě zmrazování. Překročení T_c (teploty kolapsu) může vést ke zborcení struktury a ztrátě požadovaných vlastností [72]. Dále je také důležitá teplota skelného přechodu zmrazené matrix (T_g), pokud teplota během sušení přesáhne T_g , přechází z pevného stavu do viskózního stavu, což vede ke zhroucení pórovité struktury lyofilizátu [69]. Zhroucení struktury lze zabránit přidáním krystalických objemových činidel, jako je glycin nebo mannitol [71].

Fyzikální a chemická stabilita lyofilizovaných systémů je také ovlivněna vlastnostmi samotného účinného léčiva a nosiče i pomocnými látkami. Během procesu však mohou nastat nežádoucí jevy, jako je agregace částic, změny velikosti nebo ztráta účinné látky. Pro jejich omezení se využívají kryoprotektivní a lyoprotektivní látky, nejčastěji na bázi cukrů jako například glukóza, sacharóza, trehalóza a mannitol. Tyto látky stabilizují strukturu pomocí vytváření viskózní amorfnní matrice, nahrazují vodu v systému a minimalizují pohyb částic [72], [73].

Po lyofilizaci je nezbytné minimalizovat přítomnost zbytků případných organických rozpouštědel. Tato rozpouštědla mohou nepříznivě ovlivnit stabilitu, například snížením teploty skelného přechodu, což vede k degradaci nebo změnám struktury. Navíc nadlimitní obsah rozpouštědel představuje toxikologické riziko pro pacienty, a proto jsou regulacemi stanoveny maximální přijatelné hodnoty zbytků rozpouštědel. Z tohoto důvodu je nutné při lyofilizaci s ko-rozpouštědly optimalizovat proces tak, aby byla většina organické fáze odstraněna během sušení. Například u terc-butylalkoholu bylo zjištěno, že pokud dostatečně zkrystalizuje během mražení, lze jej odstranit téměř beze zbytku [74].

V lyofilizovaném produktu, může jeho stabilitu narušovat také obsah zbytkové vlhkosti. Čím vyšší je obsah zbytkové vody, tím rychleji může produkt degradovat. Proto pro zachování dlouhodobé stability je také nutné zabránit přístupu vzdušné vlhkosti během skladování [75].

2.4.2 Použití ko-rozpouštědel a jejich vliv na strukturu a stabilitu systému

Voda je nejčastěji používaným rozpouštědlem při lyofilizaci, ale některé účinné látky jsou špatně rozpustné ve vodě. Při lyofilizaci se často využívají ko-rozpouštědla pro zvýšení rozpustnosti hydrofobních látek a zrychlení primárního sušení. Například terc-butylalkohol díky své těkavosti a schopnosti snadno sublimovat, přispívá k vytvoření homogennější porézní struktury sušeného materiálu, která může zlepšit rehydratační vlastnosti a mechanickou stabilitu lyofilizátu [76]. Přítomnost terc-butylalkoholu ovlivňuje způsob a teplotu krystalizace směsi, což může změnit podmínky optimálního zmrazování. Přítomnost TBA může také vést ke fázové separaci, což se projevuje vznikem dvouvrstvého koláče a vyšším obsahem zbytkového TBA [74].

DMSO se v některých případech také ukázalo jako vhodné ko-rozpouštědlo, ale některé jeho vlastnosti, jako jeho vysoký bod varu a nízký tlak nasycených par, ztěžují jeho odstranění během lyofilizace [76].

Při špatně navrženém procesu může dojít k fázové separaci, agregaci nanočástic či zhoršení vzhledu finálního produktu. Z tohoto důvodu je nutné před aplikací těchto ko-rozpouštědel provést detailní termální charakterizaci systému a optimalizovat celý lyofilizační cyklus [76].

U organických rozpouštědel je nutné dávat pozor na jejich zbytkové množství v lyofilizátu, protože mohou narušit výslednou strukturu a ve vyšším množství představují riziko, pro pacienty, užívající takovýto přípravek [74].

2.5 Současný stav řešené problematiky

Lyofilizace v kontextu nosičových systémů léčiv představuje širokou a dynamicky se rozvíjející oblast výzkumu. V posledních letech se intenzivně vyvíjejí nové metody a technologie zaměřené na optimalizaci vlastností lyofilizovaných nosičových systémů léčiv. Charakter těchto systémů se odvíjí od specifických vlastností nosičového materiálu a enkapsulované léčivé látky. Klíčovým cílem těchto studií je zvýšení biologické aktivity, stability a minimalizace degradačních procesů během lyofilizace.

Jedním z léčiv, jehož vlastnosti lze pomocí lyofilizace výrazně optimalizovat, je kurkumin. Kurkumin je přírodní polyfenol známý svými protizánětlivými, antioxidačními a protinádorovými účinky. Navzdory svému značnému terapeutickému potenciálu se kurkumin vyznačuje nízkou rozpustností ve vodě, nestabilitou v biologickém prostředí a omezenou biologickou dostupností [4], [33]. Právě nosičové systémy připravené lyofilizací, představují způsob, jak tyto farmakokinetické nedostatky překonat. Umožňují zlepšit jeho rozpustnost, chrání jej před degradačními procesy a zajistí efektivní uvolňování v cílových tkáních [34], [37], [39].

Ve studii Petry Michalicové a kol. byla zkoumána role lyofilizace jako podpůrného procesu při interakci mezi hyaluronanem a hydrofobními molekulami. Autoři využili fluorescenční spektroskopii k hodnocení interakcí mezi hyaluronanem a pyrenem jako modelovou hydrofobní

látkou. Výsledky ukázaly, že proces lyofilizace významně podporuje zpřístupnění hydrofobních domén v polymerní matici a tím usnadňuje interakci s hydrofobními látkami. Studie tím naznačuje, že lyofilizace může být využita ke částečné konformaci polymerního řetězce v 3D prostoru, čímž dochází k posílení jeho schopnosti inkorporovat a stabilizovat hydrofobní bioaktivní molekuly. Tato práce je významná pro tuto diplomovou práci, neboť naznačuje, že lyofilizace může být důležitá nejen při stabilizaci formulací, ale i při podpoře interakce mezi hydrofobní bioaktivní látkou, jako je kurkumin, a polysacharidovým nosičem, jako je dextran [77].

Také v diplomové práci Kristíny Waczulíkové byla řešena problematika přípravy nosičového systému na bázi nativního hyaluronanu a hydrofobních molekul s využitím programově řízené lyofilizace. Cílem studie bylo ověřit, zda lze touto metodou účinně podporovat interakce mezi hydrofilním polysacharidem a hydrofobními sloučeninami. Autorka se zaměřila na optimalizaci parametrů lyofilizačního procesu u systémů s hyaluronanem o dvou molekulových hmotnostech (13 kDa a 1,91 MDa), přičemž jako modelové hydrofobní látky byly využity fluorescenční sondy. Při přípravě systému byla použita směs vody a terc-butylalkoholu, jejíž vlastnosti umožnily dosažení efektivního sušení mrazem. Zjištění Waczulíkové poskytují cenné informace o vlivu rozpouštědel, procesních podmínkách lyofilizace a vhodných metodách hodnocení interakcí, které lze aplikovat i při vývoji dextranových nosičů [78].

V publikaci Yingying Ma a kol. byl vyhodnocen inovativní nosičový systém pro distribuci léčiv, jako je kurkumin pomocí technologie hybridních nanokrystalů určené pro suché práškové inhalátory. Při této studii autoři porovnali výsledný systém, který byl připraven pomocí lyofilizace a pomocí spray-drying metody. Hybridní nanokrystal ciprofloxacinu a N-acetylcysteinu doplněné o L-leucin byly použity ke zpevnění nanosuspenzí kurkuminu s cílem zlepšit disperzi prášku pro suchou inhalaci (DPI). Analýzou TEM a SEM bylo zjištěno, že disperze, uniformita a tekutost nanosuspenzí sušeným rozprašováním je lepší než u lyofilizovaných DPI. Tento systém podávání léků má potenciál být použit při klinické léčbě plicních infekcí ke zlepšení účinku léčby a kvality života pacientů [79].

Zatímco předchozí studie se soustředila na inhalovatelné formy, Xinli Wang a kol. se zabývali optimalizací biologické dostupnosti kurkuminu prostřednictvím nanokrystalických Pickeringových emulzí pro orální podání. Autoři v studii popisují úspěšné vytvoření a charakterizování nanokrystalického Pickeringova emulzního systému (Cur-NSSPE) pomocí vysokotlaké homogenizace a následné lyofilizace (Cur-NSSPE-FDP). Výsledky ukázaly, že Cur-NSSPE-FDP by mohl zlepšit kumulativní uvolňování kurkuminu in vitro, zvýšit vychytávání buněk RAW264.7 a Caco-2, podpořit transport kurkuminu přes buňky Caco-2 a významně zvýšit orální biologickou dostupnost [80].

V práci od Matheuse A. Chavese a kol. byl výzkum věnován obohacení běžného surového materiálu (kukuřičného škrobu) o kurkumin a vitamín D3 pomocí mokré aglomerace za vysokého smykového napětí. Před samotnou aglomerací byly tyto látky enkapsulovány do liposomálních disperzí, které následně prošly lyofilizací. Výsledky prokázaly, že tímto postupem lze úspěšně připravit pseudo-ternární směsi složené z kukuřičného škrobu, maltodextrinu a lyofilizovaných liposomů s obsahem kurkuminu a vitamínu D3 [81].

Další článek od Hanyun Jiang a kol. se zaměřuje na vliv čtyř oligosacharidů (frukto-oligosacharidů, laktózy, inulinu a sacharózy) na fyzikálně-chemické vlastnosti,

strukturní stabilitu a chování nanoliposomů s kurkuminem při in vitro trávení před a po lyofilizaci. Výsledky ukázaly, že přidání oligosacharidů inhibovalo změny velikosti částic a snížilo únik kurkuminu z lyofilizovaných nanoliposomů. Oligosacharidy výrazně zlepšily fyzickou stabilitu lyofilizovaných nanoliposomů a zpomalily uvolňování kurkuminu během in vitro trávení. Navíc oligosacharidy snížily hydrofobicitu membrány liposomů a těsnost uspořádání fosfolipidových molekul, což vedlo k nárůstu mikropolarity a tekutosti dvouvrstvých membrán. Tyto výsledky naznačují, že frukto-oligosacharidy, laktóza a inulin mohou být účinné lyoprotektanty pro lyofilizované nanoliposomy [82].

Studie od Yongkai Yuan a kol. řeší zlepšení stability, biologické dostupnosti a aplikovatelnosti kurkuminu prostřednictvím enkapsulace. Jako obalový materiál byl použit šelak. Díky své pH-dependentní deprotonaci a amfifilní povaze umožňuje tvorbu nanočástic. Pomocí enkapsulace byla zvýšena chemická stabilita. Kromě toho se zlepšila biologická dostupnost kurkuminu na 75,95 %, což je přičítáno pH-dependentní deprotonaci šelaku (při nižším pH zůstává nerozpustný), která hraje zásadní roli v jeho chování jako obalového materiálu. Kurkumin s šelakem má tedy široký komerční aplikační potenciál [83].

Výzkum lyofilizace v oblasti nosičových systémů léčiv potvrzuje její potenciál pro zlepšení stability, biologické dostupnosti a účinnosti terapeutických látek, včetně kurkuminu. Vědecké studie se zabývají použitím různých forem polysacharidových nosičových systémů pro enkapsulaci hydrofobních molekul. Tyto technologie řeší farmakokinetická omezení kurkuminu a umožňují jeho efektivní transport a uvolňování v cílových tkáních. Další vývoj těchto technologií by mohl významně přispět ke klinickému využití kurkuminu a zlepšení terapeutických výsledků.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

- nízkomolekulární nativní dextran získaný z bakterie *Leuconostoc mesenteroides*, střední molekulová hmotnost 6 kDa, CAS: 9004-54-0, výrobce Sigma Aldrich (USA);
- vysokomolekulární nativní dextran získaný z bakterie *Leuconostoc mesenteroides*, střední molekulová hmotnost 1500–2800 kDa, CAS: 9004-54-0, výrobce Sigma Aldrich (USA);
- kurkumin pro syntézu, CAS: 458-37-7, výrobce Sigma Aldrich (USA)
- deionizovaná voda; Přístroj PureLab Flex;
- chloroform stabilní s amylenem, CAS: 67-66-3;
- ethanol absolutní pro UV, CAS: 64-17-5;
- terc-butylalkohol (bezvodý $\geq 99,5\%$), CAS: 75-65-0, výrobce Penta (ČR);
- methanol pro UV, CAS: 67-56-1;
- n-hexan (95%) p.a., CAS:110-54-3.

3.2 Použité přístroje, programy a pomůcky

- PureLab® Classic, deionizovaná voda, výrobce ELGA LabWater (UK);
- analytická váha Denver, dílek 0,001 g, výrobce Denver Instrument (Německo);
- termogravimetrický analyzátor Q5000 (TA Instruments, New Castle, Delaware, USA);
- program TA univerzal analysis pro vyhodnocení TGA;
- míchačka magnetická Cimarec i Poly, výrobce Thermo Scientific;
- chromatograf SEC-MALS-dRI; 0.6 ml/min 0.1 M NaNO₃, objem nástřiku 100 ml, kolona: PL aquagel-OH MIXED-M 8 μm 300 x 7.5 mm;
- lyofilizátor Gregor L4-110 PRO, výrobce ThermoFisher Scientific;
- Thermo Scientific™ Nicolet™ iS™ 50 FTIR Spektrometr, výrobce ThermoFisher Scientific (USA);
- program OMNIC 9, vyhodnocování spekter z FTIR spektrometru;
- HORIBA Fluorolog-QM, Horiba Scientific;
- software FluorEssence V3.5, vyhodnocování měření z fluorescenčního spektrometru;
- U-3900H spektrometr, Hitachi High-Tech (Japan);
- Quorum/Polaron SC7640 Auto/Manual High Resolution Sputter Coater, výrobce Quorum Technologies (UK);
- skenovací elektronový mikroskop SEM ZEISS EVO® LS10, výrobce CARL ZEISS AG (Německo);
- zobrazování SEM: Software ZEISS SmartSem, program SmartSEM User Interface;
- software Microsoft Office Excel 2016, zpracování dat;
- program Origin 2019b 64Bit;
- EPP MiniSpin plus centrifuga, výrobce Eppendorf;
- Varian Cary 50 Probe UV-Visible spektrofotometer, výrobce Varian Analytical Instruments;
- software Cary WinUV, vyhodnocování měření z UV/Vis spektrofotometru.
- HPLC Ultimate 3000 s RI detektorem, výrobce ThermoFisher Scientific.
- plynový chromatograf Trace 1300, výrobce ThermoFisher Scientific.

3.3 Příprava vzorků

3.3.1 Příprava vzorků pro analýzu SEC-MALS-dRI

Pro měření bylo potřeba připravit roztoky vysokomolekulárního (1 500 kDa) a nízkomolekulárního (6 kDa) nativního dextranu. U vysokomolekulárního dextranu bylo do 5 ml odměrné baňky naváženo 5 mg zakoupeného nativního dextranu a poté byla odměrná baňka doplněna po rysku 0,1 M roztokem NaNO₃. Výsledná koncentrace tohoto roztoku tedy činila 1 mg·ml⁻¹. U nízkomolekulárního dextranu byl použit stejný postup, avšak naváženo bylo 25 mg a výsledná koncentrace činila 5 mg·ml⁻¹.

3.3.2 Příprava vzorků pro měření fluorescenčních spekter a UV/Vis

Byly připraveny roztoky kurkuminu v rozpouštědlech: chloroformu, ethanolu a v deionizované vodě. Nejprve byly připraveny zásobní roztoky kurkuminu ve všech rozpouštědlech o koncentraci 1·10⁻⁴ g·mol⁻¹. Do tří odměrných baněk bylo naváženo 1,84 mg kurkuminu. Každá baňka byla poté doplněna po rysku příslušným rozpouštědlem. Do baněk byla přidána magnetická míchátko a roztoky byly 3 dny míchány na magnetické míchačce. Po ukončení míchání byly připraveny roztoky o koncentraci 2·10⁻⁶ mol·l⁻¹. Pomocí skleněné pipety bylo z každého zásobního roztoku přepipetováno 0,2 ml do 10 ml skleněné vialky, která byla následně doplněna 9,8 ml odpovídajícího rozpouštědla. U deionizované vody bylo malé množství roztoku nasáto do plastové stříkačky a na stříkačku byl nasazen filtr, přes filtr bylo do vialky převedeno 0,2 ml roztoku kurkuminu v deionizované vodě. Poté bylo pomocí skleněné pipety přepipetováno 9,8 ml deionizované vody. Připravené roztoky byly překryty víčkem a parafilmem a vloženy do ledničky do doby měření.

3.3.3 Příprava vzorků pro lyofilizaci

Byly připraveny zásobní roztoky vysokomolekulárního a nízkomolekulárního dextranu v deionizované vodě o koncentraci 0,5 %. Do dvou odměrných baněk o objemu 100 ml bylo naváženo vypočítané množství dextranu. Vzhledem k přítomnosti zbytkové vlhkosti v materiálu byly navážky upraveny dle předchozího stanovení vlhkosti. Pro vysokomolekulární dextran činila navážka 0,5379 g a pro nízkomolekulární 0,5255 g. Navážky byly kvantitativně převedeny do odměrných baněk a baňky byly doplněny po rysku deionizovanou vodou. Do baněk byly vloženy magnetická míchátko a baňky byly uzavřeny víčkem a parafilmem. Roztoky byly míchány na magnetické míchačce 5 dní. Dále bylo potřeba připravit roztok kurkuminu v terc-butylalkoholu o koncentraci 1·10⁻⁵ M. Nejdříve byl připraven zásobní roztok o koncentraci 1·10⁻⁴ M. Do 50 ml odměrné baňky bylo naváženo a kvantitativně převedeno 1,84 mg, baňka byla poté doplněna po rysku bezvodým 99,5% terc-butylalkoholem. Baňka byla uzavřena a protřepána a poté z ní bylo přepipetováno 5 ml do čisté odměrné baňky o objemu 50 ml. Tato baňka byla poté doplněna po rysku bezvodým 99,5% terc-butylalkoholem. Byl tak vytvořen roztok o koncentraci 1·10⁻⁵ M. Z důvodu, že terc-butylalkohol krystalizuje již při 25,5 °C, bylo nutné mít zásobní roztok o koncentraci 1·10⁻⁴ M ponořený v kádince s teplou vodou. Baňka byla uzavřena víčkem a parafilmem a poté byla protřepána a vložena do ledničky.

Těsně před lyofilizací byly smíchány zásobní roztoky dextranů (HMW a LMW) a kurkuminu v terc-butylalkoholu v poměru 4:1 do dvou plastových vialek o objemu 50 ml. Každý z připravených roztoků byl rozdělen do 5 plastových vialek po objemu 10 ml. Do dvou plastových vialek byly nachystány vzorky, které obsahovali pouze 50 ml roztoku dextranu v deionizované vodě. Vzorky byly v jedné sérii zmrazeny v mrazáku, vialky byly uzavřeny buničinou upevněnou gumovým kroužkem a vloženy do lyofilizátoru. V druhé sérii byly připraveny pouze vzorky dextranů s kurkuminem v poměru 4:1 a tyto vzorky byly zmrazeny pomocí kapalného dusíku, uzavřeny buničinou upevněnou gumovým kroužkem a vloženy do lyofilizátoru.

3.3.4 Příprava kalibrační řady pro UV-Vis stanovení kurkuminu.

Nejdříve bylo nutné pro vytvoření kalibrační přímky připravit roztoky kurkuminu v terc-butylalkoholu o různých koncentracích. Zvolené koncentrace byly: $1 \cdot 10^{-5}$; $5 \cdot 10^{-6}$; $2,5 \cdot 10^{-6}$; $1,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Nejprve byl připraven zásobní roztok kurkuminu v terc-butylalkoholu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Tento roztok byl postupně ředěn na jednotlivé koncentrace. Dále bylo zvlášť rozpuštěno 43 mg vzorku v 5 ml deionizované vody a 5 ml terc-butylalkoholu.

Stejným způsobem byla vytvořena kalibrační řada pro kurkumin rozpuštěný v ethanolu pro optimalizaci měření pro UV/Vis analýzu. Zvolené koncentrace pro kurkumin v ethanolu byly: $4 \cdot 10^{-6}$; $2 \cdot 10^{-6}$; $3,2 \cdot 10^{-6}$; $1,6 \cdot 10^{-6}$; $1,28 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Pro přípravu roztoku vzorku bylo rozpuštěno 21,7 mg kurkuminu v 5 ml ethanolu. Rozpuštěn byl vzorek lyofilizovaného dextranu s kurkuminem zmrazeným pomocí dusíku.

3.3.5 Příprava kalibrační řady pro plynovou chromatografii

Pro vytvoření kalibrační řady byl rozpouštěn TBA v hexanu. Pro toto měření byla připravena kalibrační řada o koncentracích: 10 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 120 ppm, 200 ppm. Nejdříve byl připraven zásobní roztok, kdy bylo prepipetováno 24,2 μl terc-butylalkoholu do 25 ml odměrné baňky a ta byla poté doplněna po rysku hexanem. Tento roztok byl postupně ředěn na jednotlivé koncentrace. Roztoky vzorku byly připraveny rozpuštěním 10 mg vzorku v 1 ml hexanu v plastových vialkách s uzávěrem. Rozpuštěny byly vzorky lyofilizovaného dextranu s kurkuminem zmrazeným pomocí dusíku (HMW 1.série, HMW 2.série, LMW 1.série, LMW 2.série). Takto připravené roztoky byly centrifugovány, pro odstranění nerozpuštěného polymeru a supernatant byl převeden do malé vialky. Roztoky byly ponechány do měření v mrazáku. Vzorky byly před analýzou přefiltrovány.

3.3.6 Příprava kalibrační řady pro HPLC

Pro vytvoření kalibrační řady kurkuminu v methanolu byly vytvořeny roztoky o koncentraci: $5 \cdot 10^{-6}$; $3 \cdot 10^{-6}$; $2 \cdot 10^{-6}$; $1 \cdot 10^{-6}$; $0,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Nejdříve byl připraven zásobní roztok o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ o objemu 5 ml, ze kterého bylo odebíráno určité množství do HPLC nádobek a ty byly poté doplněny na objem 1 ml methanolem. Dále byly připraveny roztoky vzorků, kdy byl v plastových vialkách s uzávěrem rozpuštěn 1 mg vzorku v 1 ml methanolu. Rozpuštěny byly vzorky lyofilizovaného dextranu s kurkuminem zmrazeným pomocí dusíku

(HMW 1.série, HMW 2.série, LMW 1.série, LMW 2.série). Takto připravené roztoky byly centrifugovány, pro odstranění nerozpuštěného polymeru a supernatant byl převeden do malé vialky. Roztoky byly ponechány do měření v mrazáku. Vzorky byly před analýzou přefiltrovány.

Pro vytvoření kalibrační řady terc-butylalkoholu v deionizované vodě byly vytvořeny roztoky o koncentraci: 10 ppm; 50 ppm; 100 ppm; 120 ppm; 200 ppm. Nejdříve byl připraven zásobní roztok přepipetováním 32,5 μ l terc-butylalkoholu do 25 ml odměrné baňky, která byla doplněna po rysku deionizovanou vodou. Byl tak připraven roztok o koncentraci 1 000 ppm. Ze zásobního roztoku bylo odebíráno určité množství do HPLC nádobek a ty byly poté doplněny na objem 1,5 ml deionizovanou vodou. Dále byly připraveny roztoky vzorků, kdy bylo v plastových vialkách s uzávěrem rozpuštěno 10 mg vzorku v 1 ml deionizované vody. Rozpuštěny byly vzorky lyofilizovaného dextransu s kurkuminem zmrazeným pomocí dusíku (HMW 1.série, HMW 2.série, LMW 1.série, LMW 2.série). Takto připravené roztoky byly převedeny do malé vialky. Roztoky byly ponechány do měření v mrazáku. Vzorky byly před analýzou přefiltrovány.

3.4 Postup měření

Nejdříve byla změřena přesná molekulová hmotnost zakoupených dextranů 1 500 kDa a 6 kDa pomocí vylučovací chromatografie (SEC-MALS-dRI). Ještě před lyofilizací mohlo proběhnout měření fluorescenčních spekter na fluorologu. 3D spektra byla změřena pro roztoky kurkuminu v ethanolu, chloroformu a deionizované vodě. Připravené zásobní roztoky dextranů v deionizované vodě byly smíchány s roztokem kurkuminu v terc-butylalkoholu v poměru 4:1. Takto smíchané roztoky byly zmrazeny v jedné sérii v mrazáku a v druhé sérii pomocí kapalného dusíku a poté byly lyofilizovány. Poté probíhala veškerá měření pro zjištění účinnosti procesu sušení mrazem a stanovení zbytkového množství terc-butylalkoholu. Série vzorků byla později připravena po třetí a zmrazena dusíkem a zlyofilizována. Byla provedena ATR-FTIR spektrometrie, fluorescenční spektrometrie a skenovací elektronová mikroskopie. FTIR spektrometrie byla rovněž použita ke charakterizaci nelyofilizovaných vzorků dextransu. Pro stanovení zbytkového množství terc-butylalkoholu v připraveném nosiči byla použita plynová a kapalinová chromatografie. Dále bylo analyzováno množství kurkuminu v nosiči pomocí UV/Vis a HPLC.

3.4.1 Stanovení molekulové hmotnosti dextransu pomocí SEC-MALS-dRI

Pro stanovení přesné molekulové hmotnosti zakoupených dextranů bylo provedeno měření na chromatografu SEC-MALS-dRI. Jedná se o vylučovací chromatografii ve spojení s víceúhlovým statickým rozptylem světla a diferenciální refraktometrií. Vylučovací chromatografie (SEC) je technika, která se používá pro separaci makromolekul podle jejich velikosti v roztoku. Molekulová hmotnost je odvozována z elučního objemu vzorku na základě srovnání s kalibračními standardy. Víceúhlový rozptyl světla (MALS) představuje absolutní metodu stanovení molekulové hmotnosti, protože je založen na přímém měření podílu intenzity světla rozptýleného analytem do více úhlů vzhledem k dopadajícímu laserovému paprsku. Ze základních fyzikálních rovnic lze při znalosti koncentrace a optických parametrů vypočítat

hmotnostní průměrnou molekulovou hmotnost (M_w). Při této metodě je použit detektor dRI (diferenciální refraktometr), který je citlivý na změnu indexu lomu roztoku způsobenou přítomností rozpuštěné látky. dRI je univerzální koncentrační detektor, vhodný zejména pro látky jako jsou polysacharidy, které neabsorbují UV záření. Díky kombinaci SEC-MALS-dRI je metoda vhodná pro charakterizaci polymerních systémů jako jsou dextransy, bez nutnosti kalibrace vůči standardům [84], [85].

Měření bylo provedeno při dvou objemech nástřiku: 100 μ l. Měření bylo pro oba dextransy opakováno třikrát.

3.4.2 Nastavení průběhu sušení

Lyofilizátor byl nastaven na parametry uvedeny v Tab. 1.

Tab. 1: Nastavené parametry procesu lyofilizace.

Krok	T polic [°C]	Nastavený tlak [hPa]	Limitní tlak [hPa]	Délka kroku [min]
1	-20	1,5	5,0	600
2	-15	1,0	5,0	600
3	-10	0,5	1,5	450
4	-5	0,5	1,5	300
5	0	0,0	1,5	300
6	5	0,0	1,5	600
7	20	0,0	1,5	300
8	30	0,0	1,5	600

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



Obr. 3: Vzorky vložené v lyofilizátoru.

3.4.3 Měření vlhkosti vzorků pomocí termogravimetrické analýzy

Do platinového držáku vzorku bylo naváženo malé množství lyofilizovaných i nelyofilizovaných vzorků dextranu. Následně byly tyto vzorky zahřívány až do teploty 198 °C. Během ohřevu byl pomocí přístroje zaznamenáván úbytek hmotnosti až do dosažení konstantní hodnoty. Naměřené údaje byly zaznamenány a zpracovány v softwaru TA Instruments Trios, verze 5.6.0.75. Zjištěný úbytek hmotnosti odpovídá obsahu zbytkové vlhkosti ve vzorcích.

3.4.4 3D Fluorescenční spektrometrie

Fluorescenční spektra byla získána pomocí excitačně-emisní matrice (EEM). Tato metoda měří, jak intenzivně látka fluoreskuje při různých kombinacích excitačních a emisních vlnových délek. EEM je 3D sken, jehož výsledkem je obrysový graf závislosti tří veličin: excitační vlnové délky, emisní vlnové délky a intenzity fluorescence, který se používá k analýze fluorescenčního chování látek. Přístroj Fluorolog se skládá z xenonové výbojky jako světelného zdroje, dvou monochromátorů, které rozptylují světlo na vlnové délky, optiky, která odstraňuje interferenci, a detektoru [86].

Naměřená fluorescenční spektra může zkreslovat vnitřního filtračního efekt, který vzniká v důsledku absorpce, ke které dochází při vyšších koncentracích vzorku. Vzorek částečně absorbuje vlastní emitovanou fluorescenci. Tento efekt se dá korigovat sekundárním měřením na UV/Vis spektrofotometru a následné úpravy naměřeného fluorescenčního signálu [87].

Byla naměřena fluorescenční spektra připravených roztoků kurkuminu v rozpouštědlech. Roztok byl nalit do křemenné kyvety a byl vložen do přístroje. Na přístroji byly nastaveny vlnové délky excitace a emise na základě rešerše pro jednotlivé rozpouštědla a bylo spuštěno měření. Hodnoty pro ethanol byly: Excitace v rozmezí od 270–480 nm s krokem měření 5,0 nm, emise: v rozmezí 440–650 nm s krokem měření 5,0 nm. Dále byly nastaveny velikosti štěrbin na 4 nm u excitace i emise. Detektor byl nastaven na T1c/R1c, tak aby byly korigována neidealita budícího (excitačního) záření.

Hodnoty pro chloroform: Excitace v rozmezí 300–490 nm s krokem měření 5,0 nm, emise: v rozmezí 430–650 nm s krokem měření 5,0 nm. Dále byly nastaveny velikosti štěrbin na 4 nm u excitace i emise. Detektor byl nastaven na T1c/R1c.

Hodnoty pro deionizovanou vodu: Excitace v rozmezí od 300–490 nm s krokem měření 5,0 nm, emise: v rozmezí 250–500 nm s krokem měření 5,0 nm. Dále byly nastaveny velikosti štěrbin na 4 nm u excitace i emise. Detektor byl nastaven na T1c/R1c.

3.4.1 Měření vnitřního filtračního efektu

UV/Vis je technika, která měří množství vlnových délek UV nebo viditelného světla, které jsou absorbovány nebo prostupovány vzorkem. Měření probíhá tak, že vzorek je ozářen světlem a detekuje se, kolik záření bylo absorbováno při různých vlnových délkách. Přístroj je složen ze zdroje světla, monochromátoru, který propouští jen určitou vlnovou délku, a detektor [88].

Na měření byl použit zakoupený kurkumin rozpuštěný v rozpouštědlech chloroformu a ethanolu o koncentraci $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Vzorky byly přeneseny do křemenné kyvety a ty byly

vloženy do spektrometru. Byly nastaveny parametry měření pro vzorek s chloroformem: Vlnočer 300–650 nm. Pro ethanol: Vlnočer 270–650 nm.

Toto měření je důležité pro eliminaci vnitřního filtračního efektu. Naměřené hodnoty z měření fluorescenčního spektra a UV/Vis se vloží do rovnice (1). Za F_n se dosadí naměřená hodnota fluorescence a za $A_{excitace}$ a A_{emise} se dosadí naměřené hodnoty absorbance pomocí UV/Vis. Výsledek F_h je upravená hodnota fluorescence.

$$F_h = F_n \cdot 10^{\left(\frac{A_{excitace} + A_{emise}}{2}\right)} \quad (1)$$

3.4.2 Měření na ATR-FTIR spektrometru

ATR-FTIR je infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací a režimem utlumené celkové odrazivosti. Tato metoda analyzuje chemické vazby a funkční skupiny přítomné ve vzorku. Lze tak získat informace o molekulární struktuře a složení vzorku. ATR-FTIR měří absorpce infračerveného světla vzorkem, který je umístěn na opticky hustém krystalu s vysokým indexem lomu. Infračervené světlo svítí na vzorek na rozhraní krystal-vzorek, což způsobuje, že část světla je absorbována a část je odražena zpět. Tato metoda tak analyzuje rotačně-vibrační energetické stavy v závislosti na změnách dipólového momentu molekuly, ke kterým dochází při kontaktu infračerveného paprsku se vzorkem [89], [90].

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

3.4.3 Měření na SEM

Skenovací elektronová mikroskopie je spektroskopická technika, která skenuje testovaný vzorek fokusovaným elektronovým paprskem. Tento paprsek vytváří obraz jeho povrchu s vysokým rozlišením. Vzorek je umístěn do vakuové komory, aby proud elektronů dopadal pouze na vzorek, protože jakékoliv jiné molekuly mohou zkreslovat obraz. Elektronový paprsek se odráží od vzorku a generuje dva typy elektronů: zpětně odražené elektrony a sekundární elektrony. Oba typy se používají k vytvoření konečného obrazu. Zpětně odražené elektrony se odrážejí směrem k počátku paprsku a jsou zaznamenávány zpětně rozptýleným elektronovým detektorem. Sekundární elektrony se odrážejí od povrchu vzorku všech směrů a jsou zaznamenány detektorem sekundárních elektronů [91].

Pro měření byly použity lyofilizované vzorky a referenční vzorek zakoupeného nelyofilizovaného dextranu. Malé množství vzorku bylo nanášeno na kovový držák opatřený uhlíkovou páskou. Před samotným měřením byly držáky se vzorky vloženy do naprašovací jednotky Quorum/Polaron SC7640, kde došlo k pokování vzorků zlatem. Pokovené vzorky

byly následně přeneseny do elektronového mikroskopu. Snímkování bylo provedeno při zvětšení 100×, 1 000× a 5 000× a získané snímky byly dále zpracovány v softwaru SmartSEM.

3.4.4 UV/Vis stanovení kurkuminu v nosičovém systému

Pro stanovení množství kurkuminu ve vzorku byla použita UV/Vis spektrofotometrie. Jako první krok byla do přístroje vložena křemenná kyveta s deionizovanou vodou, která byla změřena jako pozadí (blank). Roztoky kalibrační řady a vzorku byly nality do křemenné kyvety a ta byla vložena do přístroje. Byly nastaveny hodnoty vlnové délky od 600 nm do 300 nm a bylo spuštěno měření. Změřené hodnoty se zobrazovaly v programu UV Solutions.

U měření kurkuminu v ethanolu byl jako slepý vzorek použit ethanol. Postup měření byl stejný jako u měření kurkuminu v terc-butylalkoholu. Naměřená data byla zobrazena v programu Varian Scan.

3.4.5 Stanovení reziduí terc-butylalkoholu pomocí plynové chromatografie

Pro analýzu zbytkového množství ko-rozpouštědla v lyofilizovaných vzorcích byla použita plynová chromatografie (GC). Plynová chromatografie odděluje těkavé složky ve směsi. Rozpuštěný vzorek se zahřívá a jeho páry nese nosný plyn do kolony, kde jsou jednotlivé složky směsi separovány na základě interakce se stacionární fází kolony. Různé látky procházejí kolonou rozdílnou rychlostí [92].

Nastavení chromatografu se odkazuje na postup z práce od K. Samuela Barnabas a kol. (2018). Pro tuto analýzu byla použita kolona Lion GC (30 m). Jako nosný plyn bylo použito helium o průtoku 3,5 ml·min⁻¹. Teplota byla nastavena na 220 °C. Rychlost zvyšování teploty byla postupně zvyšována: Z 40 °C do 70 °C byla rychlost 5 °C·min⁻¹, poté do 170 °C byla rychlost 15 °C·min⁻¹ a poté do 220 °C byla rychlost 40 °C·min⁻¹. Celková doba chromatografie byla nastavena na 30 minut [93].

3.4.6 Stanovení terc-butylalkoholu pomocí HPLC chromatografie

Pro stanovení zbytkového množství ko-rozpouštědla v lyofilizovaných vzorcích byla použita také vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC). Tato technika se používá k separaci a stanovení jednotlivých složek směsi. Kapalný vzorek je unášen mobilní fází kolonou, která je naplněna stacionární fází a jednotlivé složky se separují na základě interakce se stacionární fází. Separované složky jsou pak stanoveny v detektoru [94].

Nastavení procesu pro stanovení kurkuminu se odkazuje na postup z diplomové práce od Bc. Ivana Kováčová (2016). Zvolená kolona byla Kinetex 5u C18 (4,6 x 150 mm). Kolona byla v termostatu zahřívána na 30 °C a průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml·min⁻¹. Objemu nástřiku vzorku byl nastaven na 20 µl a detekce látek probíhala v detektoru při vlnové délce 420 nm [95].

Nastavení procesu pro stanovení terc-butylalkoholu se odkazuje na postup z diplomové práce od Bc. Zuzana Strapcová (2019). Zvolená kolona byla Rezex ROA-Organic Acid H+. Jako mobilní fáze byla zvolen roztok 5 mmol·l⁻¹ H₂SO₄. Kolona byla v termostatu zahřívána na 60 °C a průtok mobilní fáze byl nastaven na 6 ml·min⁻¹. Objem nástřiku vzorku byl nastaven na 10 µl [96].

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Výsledná molekulová hmotnost dextranu

Měření pomocí SEC-MALS-dRI stanovilo přesnou molekulovou hmotnost nízkomolekulárního dextranu na $6,03 \pm 0,21$ kDa a vysokomolekulárního dextranu na $1630,4 \pm 9$ kDa. Tyto molekulové hmotnosti přibližně odpovídají hmotnostem uváděných prodejcem.

4.2 Termogravimetrická analýza

Pomocí TGA byly naměřeny poklesy hmotnosti, které se rovnají procentuální vlhkosti ve vzorku. Výsledky byly zaznamenány v hmotnostních procentech a jsou uvedeny v Tab. 2, Tab. 4. a Tab. 4.

Tab. 2: Naměřené hodnoty vlhkosti dextranů před lyofilizací pomocí TGA.

Vzorek	Vlhkost [hm.%]
6,03 kDa	5,10
1630,4 kDa	7,59

Tab. 3: Naměřené hodnoty vlhkosti vzorků dextranu bez kurkuminu po lyofilizaci pomocí TGA.

Vzorek	Vlhkost [hm.%]
6,03 kDa	5,44
1630,4 kDa	6,92

Tab. 4: Naměřené hodnoty vlhkosti vzorků dextranu s kurkuminem po lyofilizaci pomocí TGA.

Vzorek	Vlhkost [hm.%]	Průměrná vlhkost [hm.%]
6,03 kDa	7,99	7,69
	7,74	
	7,88	
	7,16	
	7,69	
1630,4 kDa	8,82	8,79
	9,15	
	9,15	
	8,85	
	8,62	

Vyšší hodnota průměrné vlhkosti u HMW dextranu je pravděpodobně způsobena vyšší hygroskopičností a větším specifickým povrchem, který umožňuje vyšší sorpci atmosférické vlhkosti. Vyšší hodnoty vlhkosti u vzorků po lyofilizaci mohou být způsobeny absorpcí vzdušné vlhkosti při manipulaci se vzorky. Dále lze pozorovat, že lyofilizované vzorky dextranů (viz Tab. 4) vykazovaly vyšší procentuální obsah vlhkosti ve srovnání

s nelyofilizovanými vzorky (viz Tab. 2). Tento jev lze vysvětlit tím, že během lyofilizace vzniká pórovitá struktura s velmi vysokým specifickým povrchem, do které se může vázat větší množství vzdušné vlhkosti než u nativního dextranu. U vzorků dextranu bez kurkuminu (viz Tab. 3) je však i přes to, že prošly procesem lyofilizace vlhkost velmi podobná nativnímu dextranu. Tyto hodnoty lze vysvětlit tím, že tyto dané vzorky byly zamrazeny v mrazáku, a ne pomocí kapalného dusíku. Metodou SEM je možné pozorovat, že struktura u vzorků zamražených v mrazáku není tolik pórovitá jako vzorky, které byly zmrazeny v kapalném dusíku, a tedy do takové struktury se nenaváže tolik vody. Podíváme-li se dále na procentuální rozdíl mezi systémy s modelovým léčivem a bez něj, je možno si povšimnout, že u obou molekulových hmotností dochází k procentuálnímu zvýšení množství vody přibližně o dvě procenta. Je tedy možno konstatovat, že i samotná přítomnost kurkuminu má vliv na rehydrataci systému.

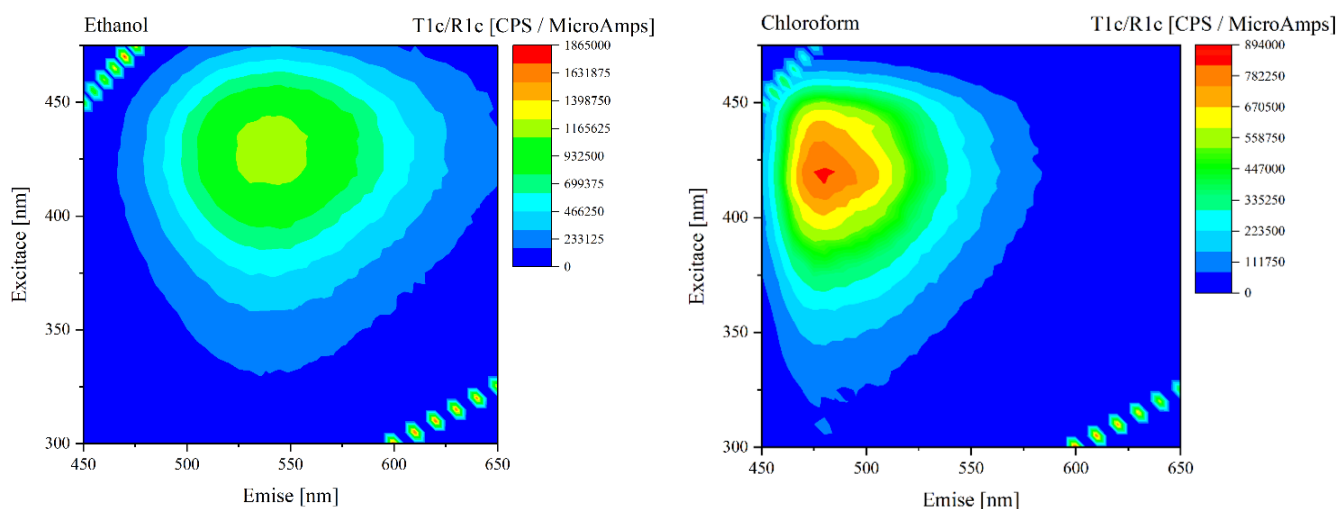
4.3 3D fluorescenční spektrometrie

Fluorescenční vlastnosti kurkuminu byly hodnoceny pomocí 3D fluorescenční spektroskopie. Cílem bylo porovnat chování kurkuminu v prostředích s rozdílnou polaritou: ethanolu, chloroformu a deionizované vodě. Účelem tohoto měření bylo lepší pochopení interakčního chování kurkuminu v různých matricích. Výsledná data prezentovaná na Obr. 4 a Obr. 5 již zahrnují korekci na vnitřní filtrační efekt, která byla provedena na základě doplňkového měření pomocí UV/Vis spektroskopie.

4.3.1 Spektrum kurkuminu v ethanolu

Na základě spektra (Obr. 4) bylo pozorováno intenzivní fluorescenční maximum v oblasti excitačních vlnových délek cca 410–440 nm s emisí v rozmezí 510–550 nm. Ethanol jako polární protické rozpouštědlo podporuje stabilní fluorescenční odezvu kurkuminu, přičemž dochází k posunu fluorescenčního maxima směrem k delším vlnovým délkám (nižší energii), což je typické pro interakci s polárním prostředím.

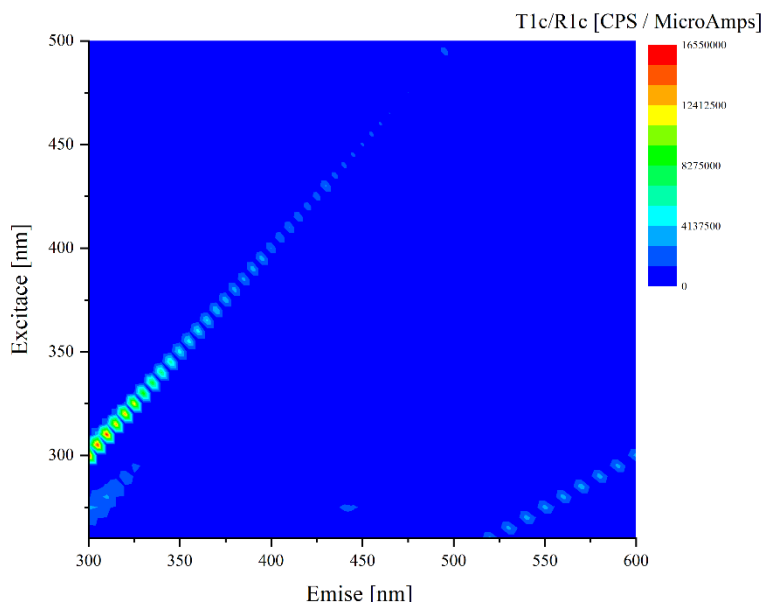
4.3.2 Spektrum kurkuminu v chloroformu



Obr. 4: Fluorescenční 3D spektra kurkuminu v ethanolu a v chloroformu.

Chloroform je málo polární aprotické rozpouštědlo. Spektrum kurkuminu rozpuštěného v chloroformu (Obr. 4) vykazovalo fluorescenční maximum v excitačním pásmu okolo 400–430 nm a v emisním pásmu kolem 460–500 nm. Fluorescenční intenzita je menší jak u ethanolu a fluorescenční maximum je pozorováno při kratších emisních vlnových délkách než v ethanolu.

4.3.3 Spektrum kurkuminu ve vodě



Obr. 5: Fluorescenční 3D spektrum kurkuminu v deionizované vodě.

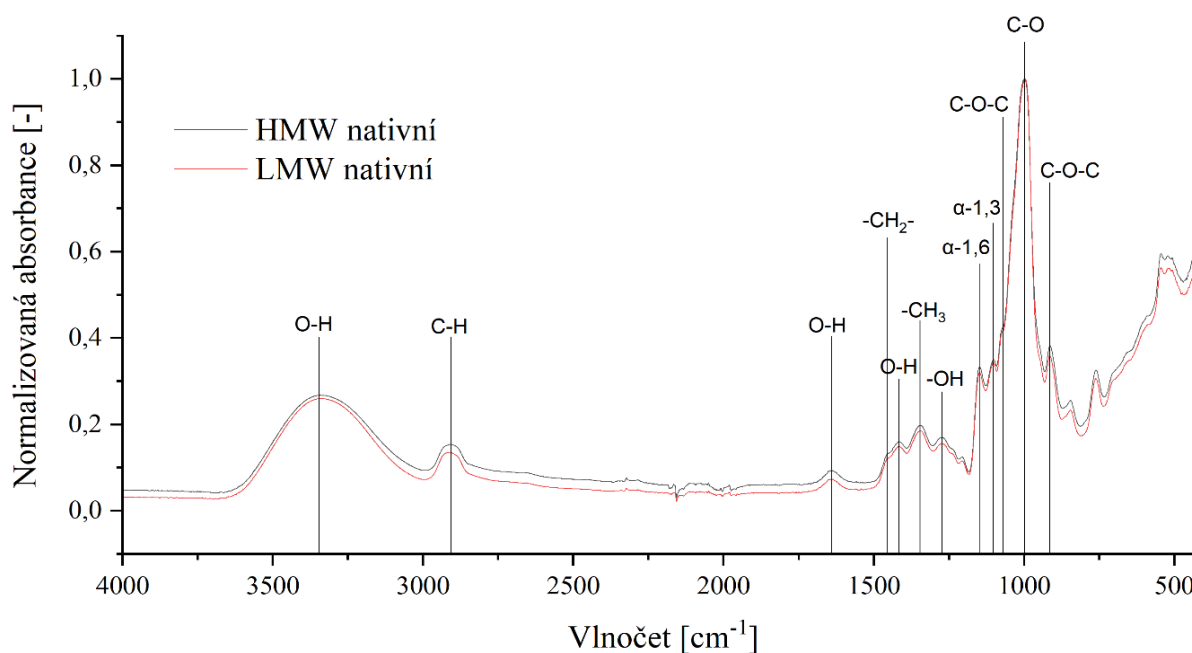
Na rozdíl od předchozích rozpouštědel byla u vodného roztoku kurkuminu (Obr. 5) fluorescenční intenzita velmi nízká, což potvrzuje chování, které bylo dříve popsáno ve studii od Priyadarsini et al. (2009), fluorescenční intenzita kurkuminu je v přítomnosti vody výrazně snížena ve srovnání s organickými rozpouštědly. Důvodem nízkých hodnot fluorescence může být nízká rozpustnost kurkuminu ve vodě a jeho tendence agregovat, čímž dochází k významnému zhášení fluorescence. Pozorované signály odpovídají Rayleighovu rozptylu [97].

Výsledky fluorescenční analýzy potvrdily významný vliv prostředí na optické vlastnosti kurkuminu. Nejvyšší fluorescenční intenzita byla pozorována v ethanolu, což potvrzuje jeho vhodnost jako rozpouštědla při spektroskopickém sledování kurkuminu. Ethanol je velmi podobný terc-butylalkoholu, a tedy i terc-butylalkohol může být vhodné ko-rozpouštědlo pro vytvoření nosičových systémů pro hydrofobní léčiva pomocí lyofilizace. Kurkumin tedy fluoreskuje pouze v omezeném rozsahu rozpouštědel a ve vodě téměř nefluoreskuje, proto se kurkumin nedá považovat za fluorescenční sondu.

I když 3D fluorescenční spektroskopie slouží k analýze fluorescenčních vlastností kurkuminu, tato metoda není dostatečná pro přímé potvrzení navázání kurkuminu na nosičový systém. Nosičové systémy byly připraveny ve vodném prostředí (80 % voda a 20 % terc-butylalkohol), kde tedy může docházet k agregaci, což vede k výraznému zhášení fluorescence a nemusela by být naměřena téměř žádná fluorescence, což se také potvrdilo při snaze seznámit se s fluorescenčními vlastnostmi lyofilizovaných systémů.

4.4 ATR-FTIR spektrometrie

ATR-FTIR spektroskopie byla využita k sledování změn v molekulové struktuře dextransu. Změny molekulové struktury mohou potvrdit vznik hydrofobních domén a navázání hydrofobního kurkuminu do struktury dextransu. Vzorky byly připraveny z vysokomolekulárního (HMW) a nízkomolekulárního (LMW) dextransu, a to v nativní podobě, po lyofilizaci bez kurkuminu (označený jako „čistý“) a po inkorporaci kurkuminu. Veškeré grafy zobrazují závislost normalizované absorpce na vlnočtu a byly vytvořeny v programu Origin 2019b.



Obr. 6: Závislost normalizované absorpce na vlnočtu HMW a LMW nativního dextransu se zaznamenanými funkčními skupinami.

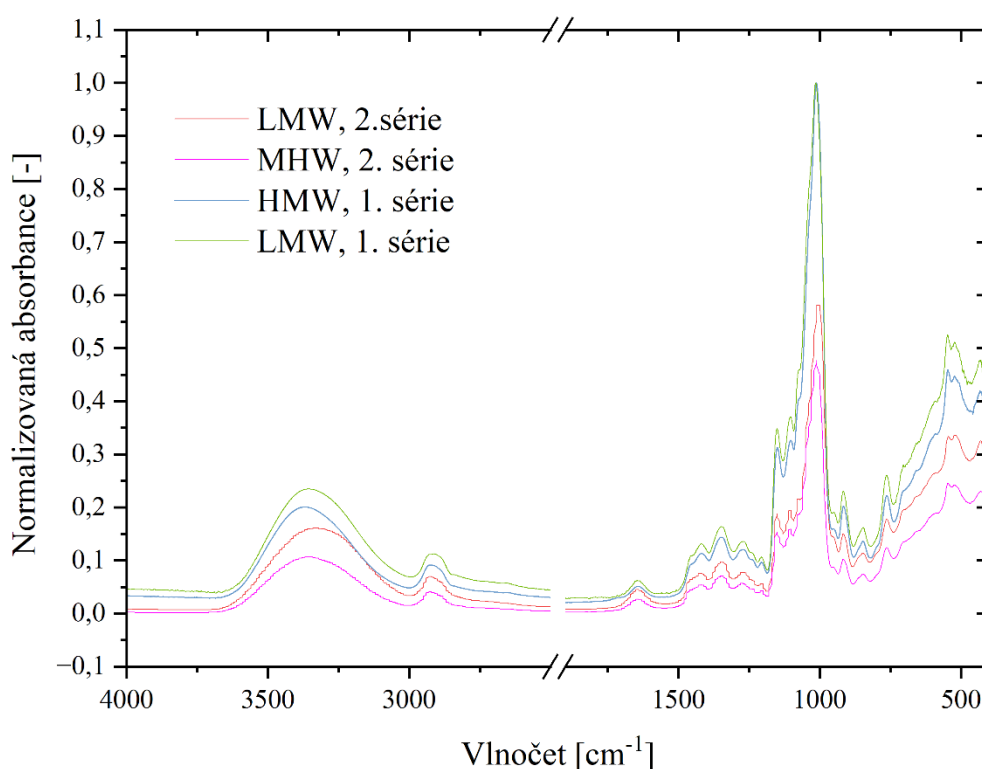
Na Obr. 6 je znázorněno FTIR spektrum HMW a LMW nativního dextransu v rozsahu 4000–400 cm^{-1} . V grafu jsou znázorněny charakteristické absorpční pásy odpovídající skupinám přítomným ve struktuře dextransu.

Pro přiřazení funkčních skupin se vycházelo z bakalářské práce [98]. Široké absorpční pásmo pozorované v oblasti 3000–3500 cm^{-1} lze přiřadit valenčním vibracím O–H skupin, které jsou přítomné jak v alkoholových funkcích molekul, tak ve vodě adsorbované ze vzdušné vlhkosti. Absorpční pás v okolí 2900 cm^{-1} odpovídá valenčním vibracím C–H vazeb v methylenových skupin. Pás při 1643 cm^{-1} je spojován s valenční vibrací O–H skupin molekul sorbované vody. Slabší pás zaznamenaný při 1455 cm^{-1} lze interpretovat jako deformační vibrace $-\text{CH}_2-$ skupin. Další pás, nacházející se při 1420 cm^{-1} , odpovídá vibraci hydroxylových skupin přítomných v polysacharidové matici. Při 1345 cm^{-1} se nachází absorpční pás spojený s deformačními vibracemi methylenových skupin. Pás detekovaný při 1270 cm^{-1} souvisí s vibracemi primárních a sekundárních alkoholů, případně může souviset s vibracemi etherových skupin, přítomných v cyklické struktuře polysacharidu. Oblast mezi 1000–1150 cm^{-1} je charakteristická pro polysacharidy, neboť zde dochází k absorpci spojené s vibracemi glykosidických vazeb. Konkrétně, pás při 1145 cm^{-1} je připisován vibraci

α -1,6-glykosidické vazby a signál v oblasti 1103 cm^{-1} je připisován vibraci $\alpha(1,3)$ glykosidické vazby. Pás lokalizovaný kolem 1075 cm^{-1} se vztahuje k asymetrickým vibracím v C–O–C etherových skupinách, zatímco pás při 912 cm^{-1} odpovídá symetrickým vibracím těchto vazeb.

Nejvýraznější signál byl pozorován v oblasti 1000 cm^{-1} , který odpovídá valenční vibraci C–O vazby v OH skupinách v alkoholu. Změna posunu tohoto píku naznačuje možnou interakci mezi dextransem a kurkuminem. Při navázání léčiva dochází často ke změně tvaru, intenzity nebo posunu tohoto pásu, např. v důsledku vodíkových vazeb nebo esterifikace.

Lyofilizace vzorků dextransu s navázaným kurkuminem byla provedena ve dvou sériích za identických podmínek mražení v kapalném dusíku a následného sušení. Lyofilizované vzorky z obou sérií byly studovány pomocí FTIR spektrometrie. Při porovnání spekter obou sérií (viz Obr. 7) lze pozorovat vysokou míru shody, což potvrzuje reprodukovatelnost a konzistenci postupu přípravy.



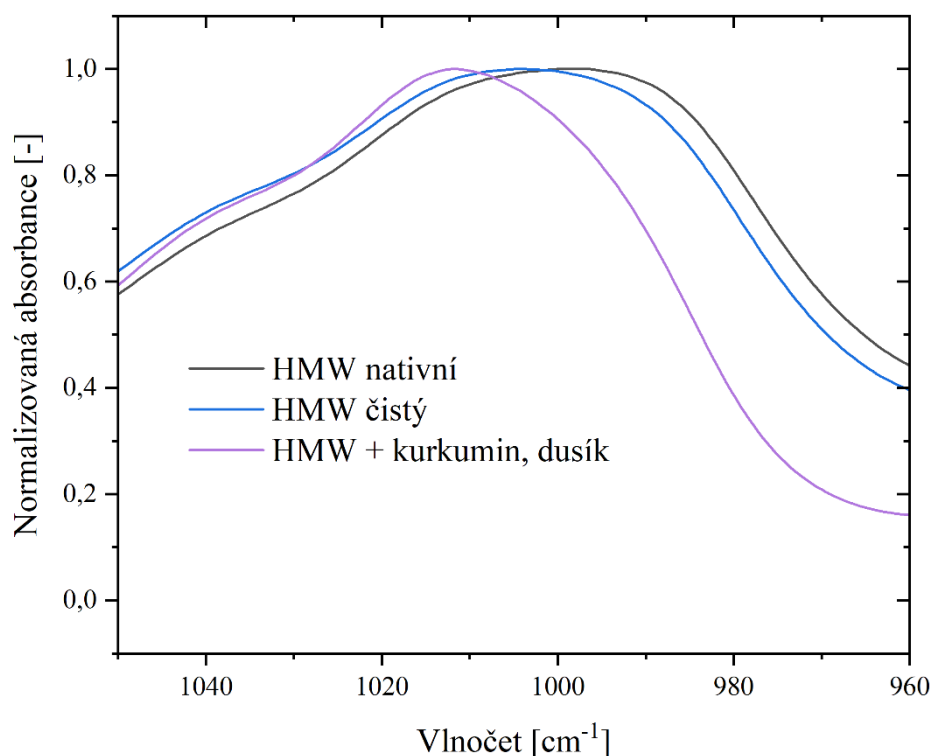
Obr. 7: Závislost normalizované absorpce na vlnětu dvou sérií lyofilizovaných vzorků LMW a HMW dextransu s kurkuminem zmraženým pomocí kapalného dusíku.

4.4.1 HMW dextran

U FTIR spekter nativního HMW dextransu, lyofilizovaného dextransu bez přídavku léčiva a vzorku obsahujícího kurkumin (Obr. 8) lze pozorovat zřetelný posun absorpčního maxima v oblasti kolem $996\text{--}1011\text{ cm}^{-1}$ směrem k vyššímu vlnětu. Tento absorpční pás je typicky spojován s valenčními vibracemi C–O vazeb v hydroxylových skupinách, které jsou citlivé na změny prostředí a interakce v molekule. U nativního dextransu se maximum vyskytuje při nižších hodnotách vlnětu, což naznačuje relativně delší a slabší C–O vazby, to naznačuje

méně uspořádanou strukturu. Po lyofilizaci dochází k mírnému posunu pásu, což lze vysvětlit zkrácením vazeb. Tento jev poukazuje na vytvoření hydrofobních domén.

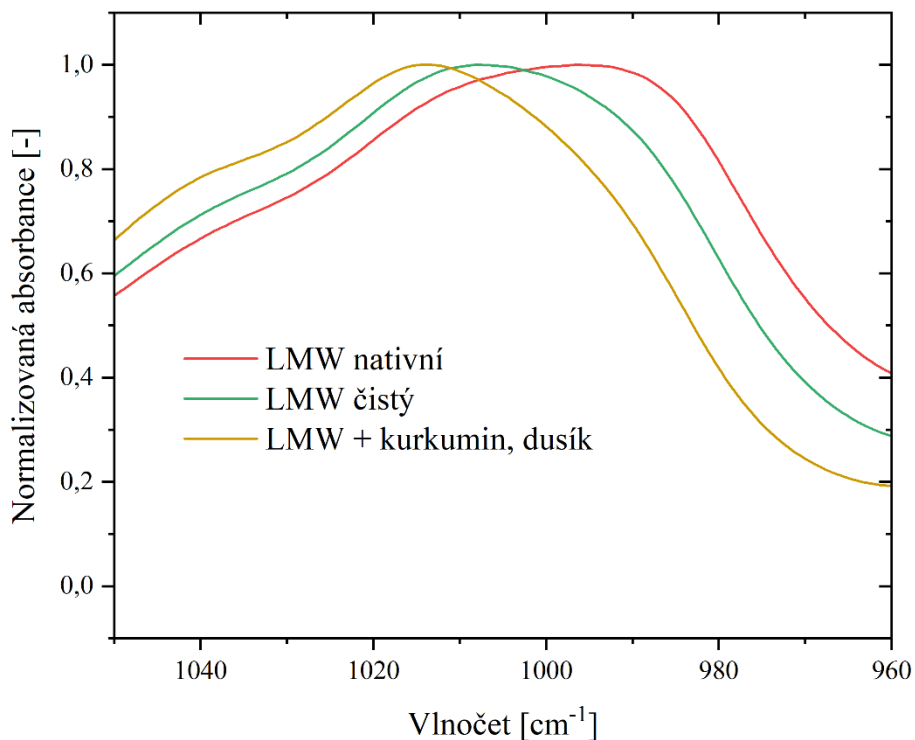
Nejvýraznější posun k vyššímu vlnočtu je však pozorován u vzorku obsahujícího kurkumin. Tento vyšší posun může být důsledkem toho, že hydrofobní kurkumin zkracuje vazby a zmenšuje vibrace C–O vazeb. Kurkumin tedy také podporuje hydrofobní efekt. Nejen samotný proces sušení, ale také inkorporace hydrofobního léčiva do polymerní matrice významně ovlivňuje strukturní uspořádání nosičového systému. Kurkumin zde nefunguje pouze jako náplň nosiče, ale aktivně modifikuje systém.



Obr. 8: Závislost normalizované absorbance na vlnočtu pro HMW vzorky. Rozlišení od 1 150 cm⁻¹ do 960 cm⁻¹.

4.4.2 LMW dextran

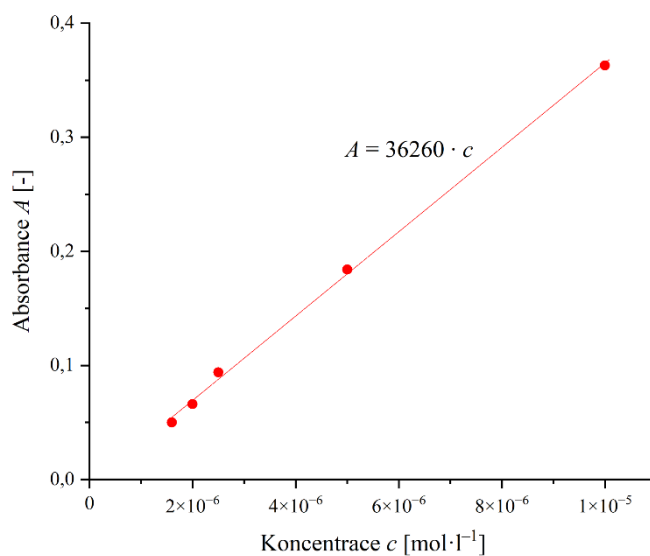
Podobný trend byl pozorován také u LMW dextranu, kde také dochází k posunu absorpčního pásu odpovídajícího valenční vibraci C–O vazeb směrem k vyšším vlnočtům (viz Obr. 9). Zaznamenané posuny naznačují zkrácení C–O vazeb, což lze přičíst jak efektu sušení, tak interakci s hydrofobním léčivem. V případě LMW dextranu je však posun absorpčního maxima přibližně o 2 cm⁻¹ větší než u HMW vzorků.



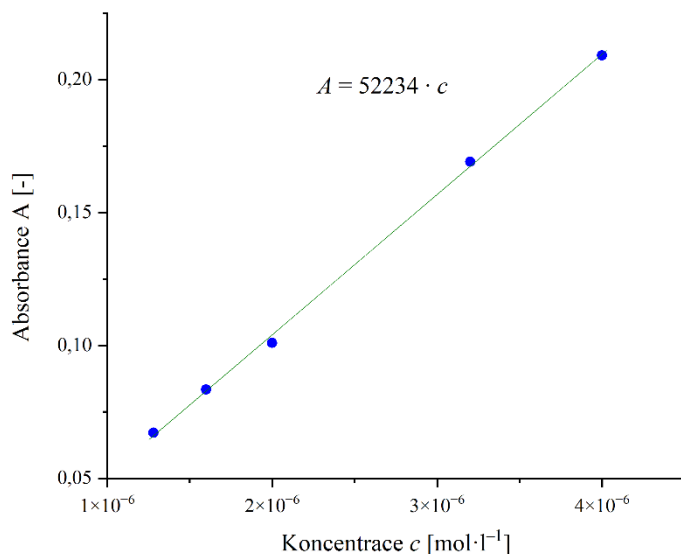
Obr. 9: Závislost normalizované absorbance na vlnočtu pro LMW vzorky. Rozlišení od 1150 cm⁻¹ do 960 cm⁻¹.

4.5 UV/Vis

Pro měření UV-Vis byly vytvořeny kalibrační rovnice pro kurkumin v terc-butylalkoholu a v ethanolu. Poté byl změřen rozpuštěný vzorek. Naměřené hodnoty absorbance pro kalibrační řady v terc-butylalkoholu a ethanolu jsou zobrazeny na Obr. 10 a Obr. 11. Ani u měření kurkuminu v tercbutylalkoholu ani v ethanolu se nepodařilo naměřit absorbanci kurkuminu.



Obr. 10: Závislost absorbance na koncentraci pro kalibrační řadu v tercbutylalkoholu.



Obr. 11: Závislost absorbance na koncentraci pro kalibrační řadu v ethanolu.

Žádná absorbance kurkuminu ve vzorcích může naznačovat, že veškerý kurkumin zůstal navázaný na polysacharid a neuvolnil se do rozpouštědla. Dextran mohl malou koncentraci kurkuminu obalit natolik, že se nemohl znovu uvolnit do rozpouštědla. Také mohlo nastat, že kurkumin degradoval na menší molekuly, které nemají dané vlastnosti. Nulová absorbance je velmi překvapivá vzhledem k tomu, že stejná koncentrace čistého kurkuminu rozpuštěná v ethanolu je běžně měřitelná. V průběhu lyofilizace tak pravděpodobně dochází k interakci kurkuminu s polysacharidem nebo ko-rozpouštědlem, což způsobuje při dané koncentraci ztrátu schopnosti vystupovat v roztoku coby chromofor. Přestože chromatografické metody nepotvrdily degradaci kurkuminu ve smyslu rozpadu na menší molekuly, lze předpokládat, že keto-enol funkční skupina podlehla chemické přeměně, čímž byla zapříčiněna schopnost absorbovat viditelné světlo. Zda k této změně došlo pouze lyofilizací, nebo se jedná o dopad interakce s dextranem, není v tuto chvíli známo.

4.6 Stanovení obsahu kurkuminu ve vzorku pomocí HPLC

Obsah kurkuminu v lyofilizovaných vzorcích byl kvantifikován pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Byly analyzovány čtyři varianty vzorků (LMW 1.série a 2.série, HMW 1.série a 2.série), přičemž koncentrace kurkuminu byla vyhodnocena na základě plochy píku v chromatogramu. Nejprve byla na základě kalibrační řady vytvořena kalibrační rovnice (2). Do *Plochy* byly dosazeny hodnoty z HPLC.

$$\mathbf{Plocha = 624750,96 \cdot x} \quad (2)$$

Tab. 5: Výsledky stanovení kurkuminu ve vzorku pomocí HPLC.

Vzorek	Plocha [mAU·min]	Koncentrace kurkuminu [mol·l ⁻¹]
LMW 1.série	1,170	3,4·10 ⁻⁷
LMW 2.série	0,215	2,9·10 ⁻⁶
HMW 1.série	1,985	1,9·10 ⁻⁶
HMW 2.série	1,806	3,2·10 ⁻⁶

Metoda HPLC oproti metodě UV/Vis dokázala stanovit obsah kurkuminu ve vzorku. Tato metoda je tedy vhodná pro použití při přípravě nosičových systémů. Z výsledků (viz Tab. 5) lze pozorovat, že hodnoty obsahu kurkuminu mají poměrně vysoký rozptyl, což naznačuje, že kurkumin je v nosiči heterogenně rozložen. To může souviset s agregací kurkuminu ve vodném prostředí. Je však nutno poznamenat, že heterogenní distribuce kurkuminu může být také zapříčiněna různým rozložením míst, do nichž je kurkumin schopen se inkorporovat. Koncentrace kurkuminu u vysokomolekulárního dextranu (HMW 1.série a HMW 2.série) také téměř odpovídá vypočítané teoretické hodnotě koncentrace kurkuminu, kterou by měl vzorek obsahovat 2,0·10⁻⁶ mol·l⁻¹, z čehož je možno předpokládat úspěšnost celého procesu.

4.7 Stanovení reziduí terc-butylalkoholu pomocí GC a HPLC

Pro kvantifikaci zbytkového rozpouštědla (terc-butylalkoholu) byly aplikovány dvě chromatografické metody – plynová chromatografie (GC) a HPLC s refraktometrickou detekcí. Byly analyzovány čtyři varianty vzorků (LMW 1.série a 2.série, HMW 1.série a 2.série).

U plynové chromatografie byla nejprve na základě kalibrační řady vytvořena kalibrační rovnice (3). Do *Plochy* byly dosazeny hodnoty z GC a obsah terc-butylalkoholu byl vyhodnocen na základě plochy píku v chromatogramu. Naměřené plochy vzorků měly vyšší hodnotu než u koncentrační řady, kde byla nejvyšší koncentrace 200 ppm. Tyto výsledky poukazují na větší množství terc-butylalkoholu ve vzorku. Všechny vzorky vykazovaly výrazně vyšší hodnoty než běžně udávaný obsah reziduí (literatura uvádí, že v ideálním případě by se hm. % terc-butylalkoholu ve vzorku měli pohybovat kolem 0,01 hm. %) [99]. Vyšší hodnoty mohou být způsobeny například tím, že je ve vzorku přítomna jiná čtyřuhlíkatá látka.

$$Plocha = 34,552 \cdot x \quad (3)$$

Tab. 6: Výsledky stanovení terc-butylalkoholu ve vzorku pomocí GC.

Vzorek	Plocha [pA·min]	Koncentrace terc-butylalkoholu [ppm]	Obsah terc-butylalkoholu [hm. %]
LMW 1.série	0,031	929,03	93·10 ⁻³
LMW 2.série	0,032	882,73	88·10 ⁻³
HMW 1.série	0,031	902,99	90·10 ⁻³
HMW 2.série	0,006	164,97	17·10 ⁻³

U kapalinové chromatografie byl obsah terc-butylalkoholu stanoven stejným způsobem jako u GC. Na základě kalibrační řady byla vytvořena kalibrační rovnice (4). Výsledky ukázaly nízké koncentrace TBA, pohybující se v rozmezí 0,78–18,1 ppm. Nejvyšší koncentrace byla zjištěna u vzorku LMW 2.série, nejnižší pak u HMW 2.série. Hodnota obsahu

terc-butylalkoholu u vzorku HMW 2.série byla výrazně nižší než u jiných vzorků. Naměřené hodnoty HPLC se výrazně liší od hodnot naměřených pomocí GC. Tento rozdíl může být způsoben tím, že HPLC má vyšší detekční limity, nebo separace u metod mohly proběhnout různě úspěšně stejně jako rozpuštění vzorku. Obě metody však podaly významné výsledky a jsou tak vhodné pro stanovení reziduí ko-rozpouštědel v připraveném nosičovém systému.

$$Plocha = 1790,4 \cdot x \quad (4)$$

Tab. 7: Výsledky stanovení terc-butylalkoholu ve vzorku pomocí HPLC.

Vzorek	Plocha [μ RIU·min]	Koncentrace terc-butylalkoholu [ppm]	Obsah terc-butylalkoholu [hm. %]
LMW 1.série	0,0324	18,10	$181 \cdot 10^{-5}$
LMW 2.série	0,1197	66,86	$669 \cdot 10^{-5}$
HMW 1.série	0,0462	25,80	$258 \cdot 10^{-5}$
HMW 2.série	0,0014	0,78	$8 \cdot 10^{-5}$

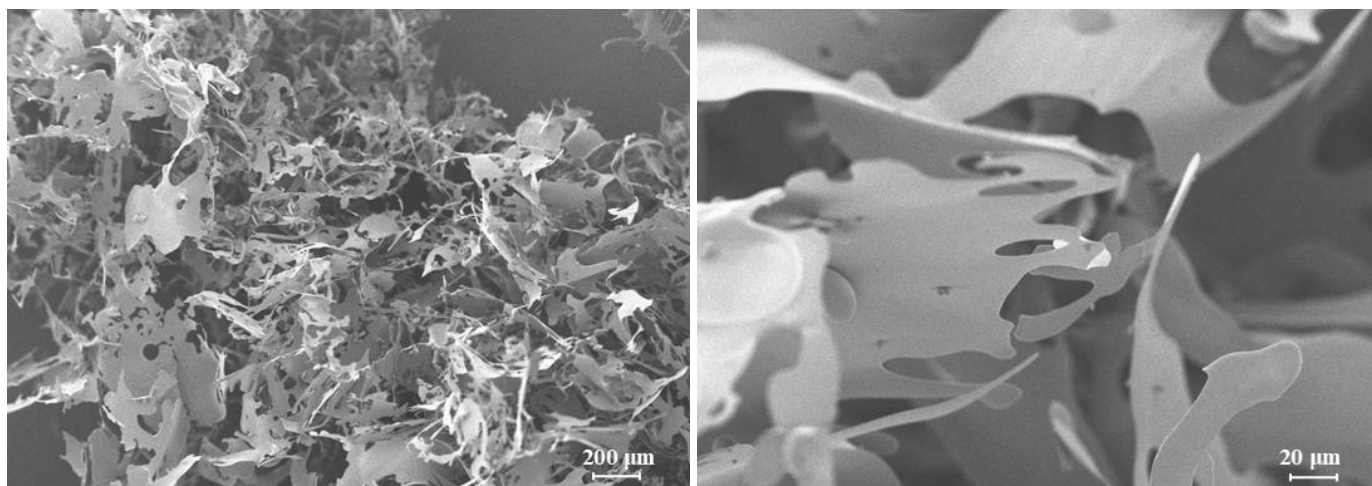
4.8 SEM

Byly analyzovány všechny připravené vzorky (8 variant), a to při zvětšení 100 \times a 1000 \times . U vzorků zmražených v kapalném dusíku (vzorky 5 a 6) byla provedena pozorování při zvětšení 1000 \times a 5000 \times . Přehled vzorků je uveden v Tab. 8.

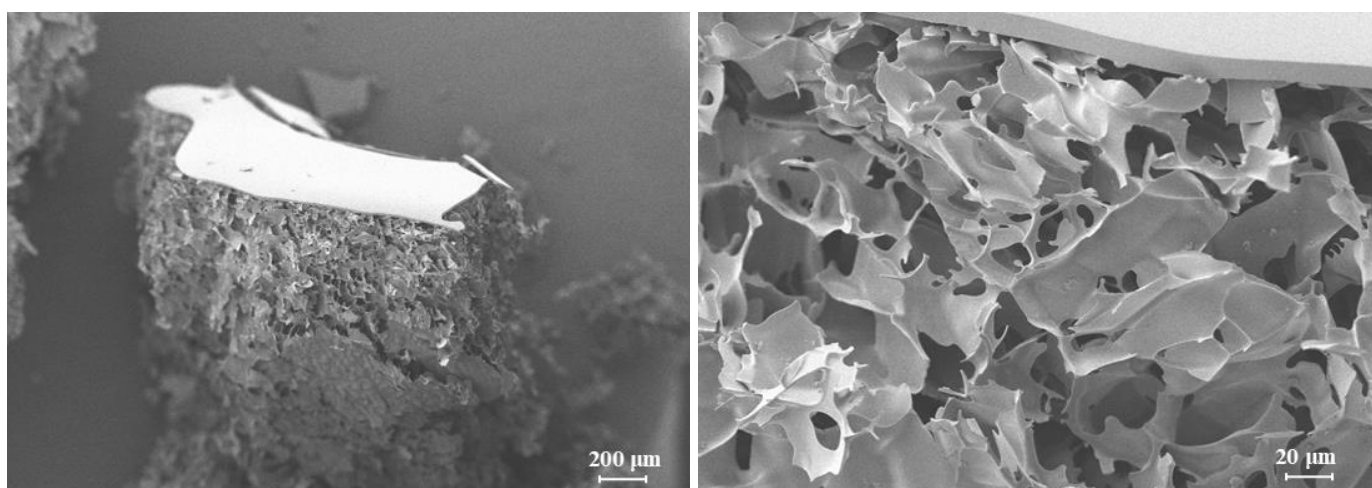
Tab. 8: Seznam vzorků analyzovaných pomocí SEM.

Č. vzorku	Typ vzorku
1	HMW bez kurkuminu, mrazák
2	LMW bez kurkuminu, mrazák
3	HMW + kurkumin, mrazák
4	LMW + kurkumin, mrazák
5	HMW + kurkumin, dusík
6	LMW + kurkumin, dusík
7	HMW nelyofilizovaný
8	LMW nelyofilizovaný

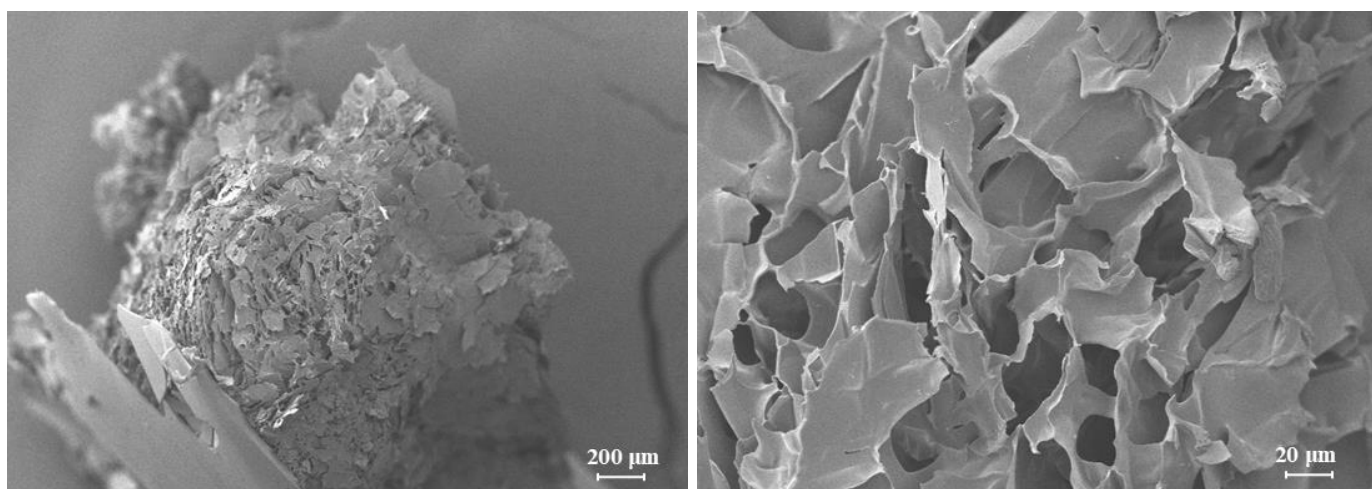
4.8.1 Snímky SEM



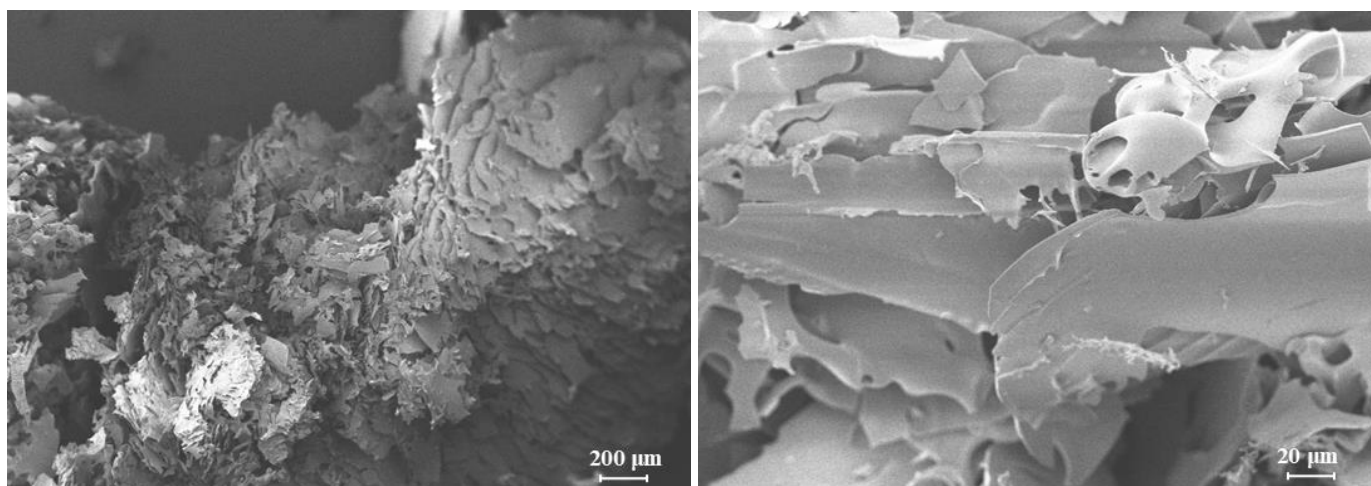
Obr. 12: SEM snímek vzorku č. 1, přiblížení 100× a 1 000×.



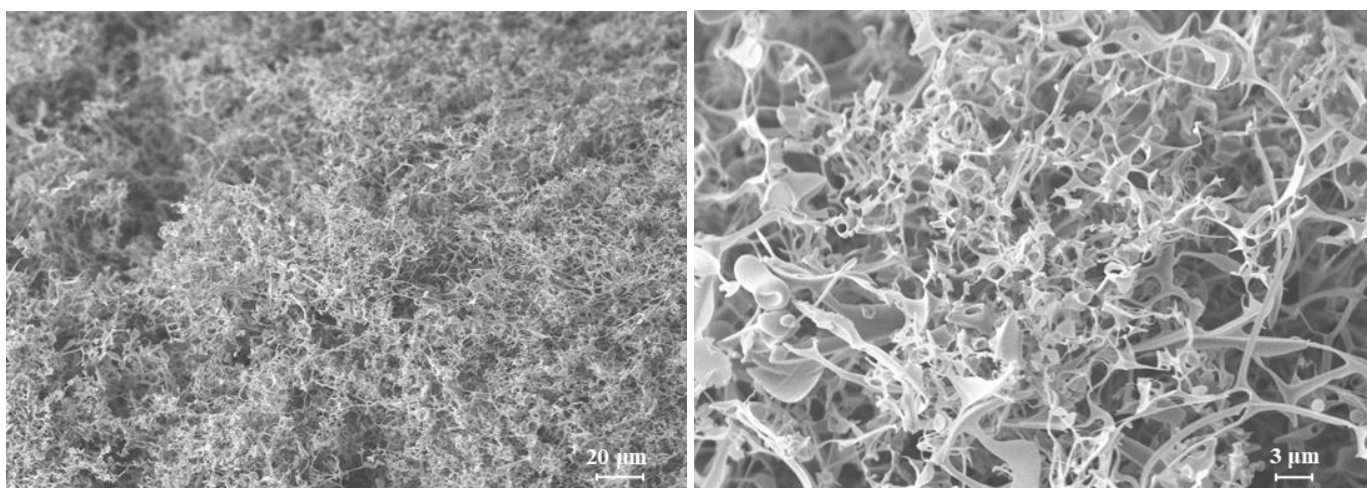
Obr. 14: SEM snímek vzorku č. 2, přiblížení 100× a 1 000×.



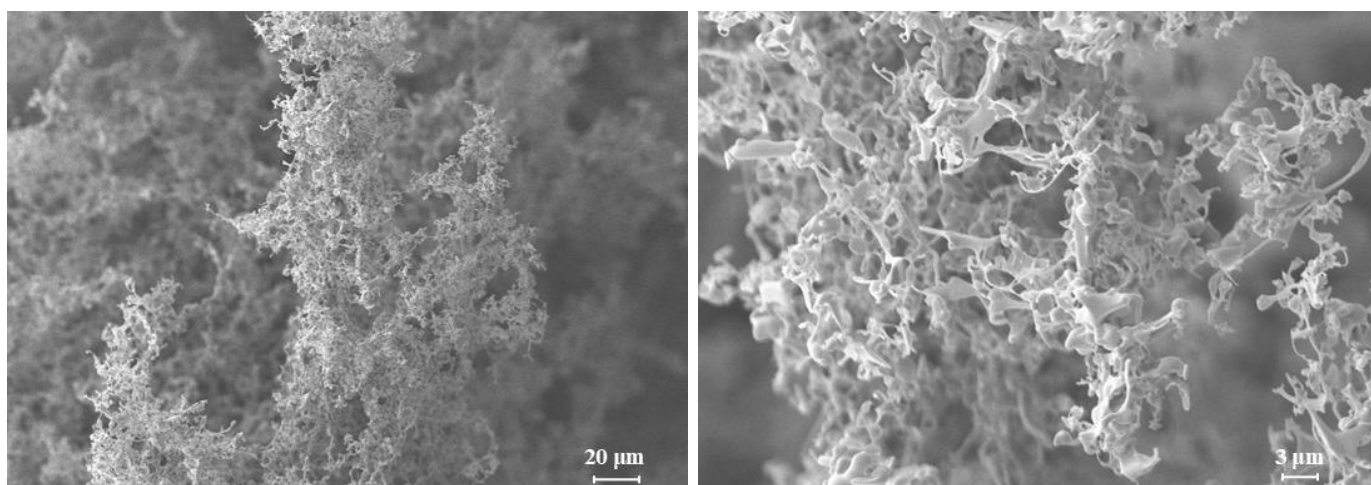
Obr. 13: SEM snímek vzorku č. 3, přiblížení 100× a 1 000×.



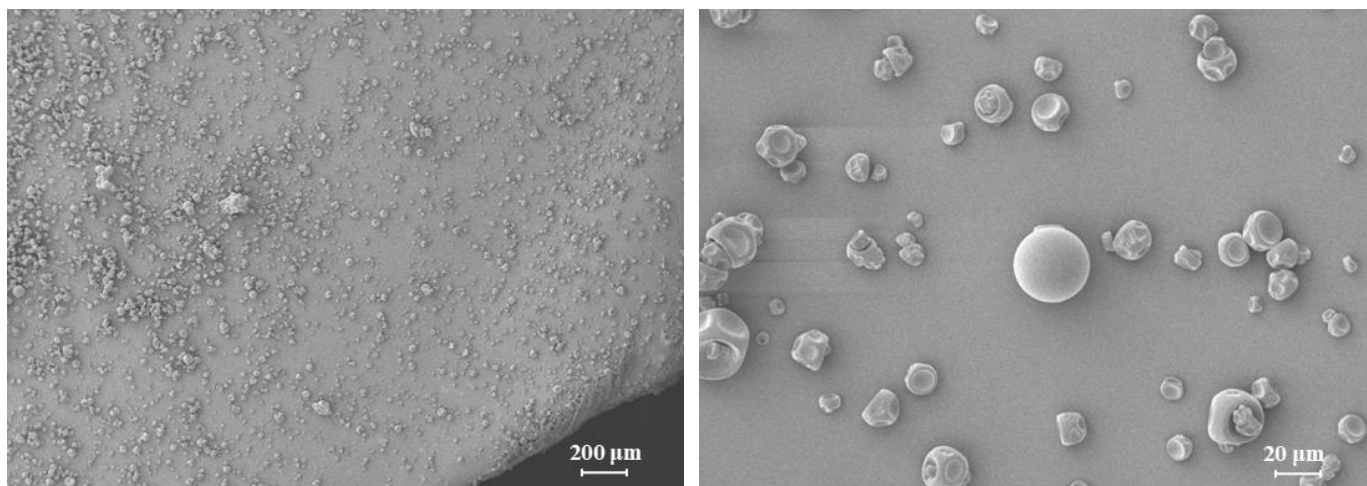
Obr. 17: SEM snímek vzorku č. 4, přiblížení 100× a 1 000×.



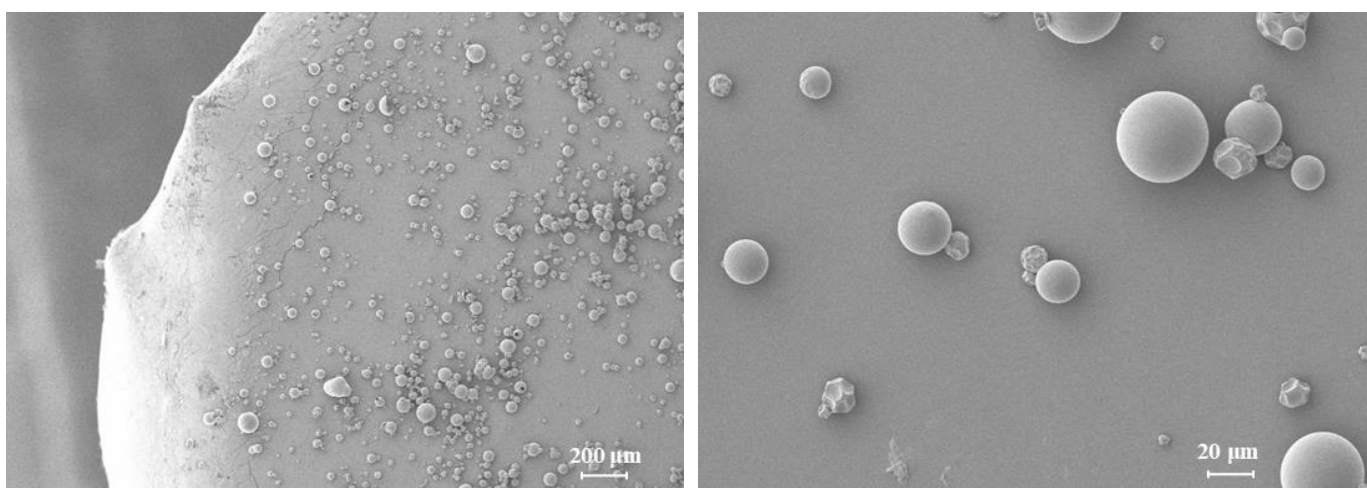
Obr. 16: SEM snímek vzorku č. 5, přiblížení 1 000× a 5 000×.



Obr. 15: SEM snímek vzorku č. 6, přiblížení 1 000× a 5 000×.



Obr. 19: SEM snímek vzorku č. 7, přiblížení 100× a 1 000×.



Obr. 18: SEM snímek vzorku č. 8, přiblížení 100× a 1 000×.

4.8.2 Srovnání a diskuse morfologických rozdílů

Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) odhalila významné rozdíly v morfologii jednotlivých vzorků v závislosti na molekulové hmotnosti dextranu a způsobu zmrazování. SEM snímky u vzorku č. 1 (viz Obr. 12) ukazují hrubou, vrstvenou strukturu, tvořenou deskovitými útvary. Povrch je relativně kompaktní, s vysokým výskytem pórů. Morfologie LMW dextranu je velmi podobná jako u HMW dextranu. Srovnáním SEM snímků vzorků čistého HMW a LMW dextranu pořízených při stejném zvětšení (100×) lze pozorovat rozdíl ve velikosti vzniklých útvarů a u LMW jsou menší póry. U HMW lze pozorovat menší deskovité útvary ale větší póry.

Vzorky, které byly zamrazeny v mrazáku sloužili jako reference, protože došlo poté při lyofilizaci k oddělení fází. Struktura LMW s kurkuminem (viz Obr. 17) je velmi podobná jako u HMW vzorku s kurkuminem (viz. Obr. 13), ale u LMW mají deskovité útvary větší velikost a jsou těsněji seskládané. Struktura vzorků, které byly zmrazeny pomocí kapalného dusíku je výrazně odlišná (viz Obr. 16 a Obr. 15). Struktura je vysoce porézní s vláknitými útvary. Rychlé zmrazení dusíkem zjevně vedlo k mikrostrukturní expanzi systému, a to vedlo k vytvoření velkých pórů. Na vlákních se v malém množství nachází malé kulovité tvary. Ve struktuře

vzorku č. 6 (viz Obr. 15) se nachází více kulovitých tvarů. Nelyofilizovaný dextran má podobu malých kulovitých částic s hladkým až mírně texturovaným povrchem, které jsou většinou slepené. U vzorku č. 8 (viz Obr. 18) je morfologie obdobná jako u vzorku č. 7. (viz Obr. 19), ale kuličky nejsou tolik slepené.

Vliv typu dextranu (HMW vs. LMW): Mezi vzorky zmrazenými pomocí mrazáku a pomocí kapalného dusíku lze pozorovat výrazné rozdíly. Vzorky zmrazené v mrazáku mají deskovitý tvar a jsou méně pórovité oproti vzorkům, které byly zmrazeny pomocí kapalného dusíku. Vzorky zmrazené kapalným dusíkem vytvářejí jemnější tenká vlákna a struktura je více porézní. Tato jemně členěná struktura má větší celkový povrch. Tento jev může být způsoben tím, že při velmi rychlém zmrazení pomocí kapalného dusíku dochází k rychlé tvorbě ledových krystalů a zachycení prostorového uspořádání polymeru ve velmi jemné podobě. U vzorků zamrazených kapalným dusíkem lze vidět také rozdíl mezi HMW a LMW vzorkem. LMW dextran má hutnější vlákna a obsahuje více kuliček. Dá se tedy říct, že zmrazení pomocí dusíku podporuje vznik amorfních porézních struktur a zvyšuje celkový povrch. S větším specifickým povrchem roste i počet hydrofobních domén, což může zlepšit schopnost nosiče vázat hydrofobní látky. Nelyofilizované vzorky jsou homogenní kuličky, které nevytvářejí žádné pórovité struktury. Pomocí lyofilizace se vytvoří pórovité struktury. Lyofilizace je tedy efektivní metoda pro vytvoření matrice, kam se může navázat léčivo.

5 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo připravit nosičový systém na bázi nativního dextransu pro inkorporaci silně hydrofobního léčiva kurkuminu pomocí programově řízené lyofilizace. Tato metoda byla zvolena pro svůj potenciál vytvořit hydrofobní domény v polysacharidu odstraněním rozpouštědla během sublimace a následné desorpce. U připraveného nosičového systému byla analyzována jeho chemická struktura, chování účinné látky a obsah zbytkového ko-rozpouštědla.

Motivací této diplomové práce byla snaha přispět k vývoji účinných a biokompatibilních nosičových systémů, na bázi polysacharidů, pro hydrofobní léčiva. V současné době se hledají šetrné a účinné strategie pro zvýšení biodostupnosti obtížně rozpustných látek. Použití nativního dextransu jako nosiče může přispět k výzkumu této oblasti. Pomocí programově řízené lyofilizace lze vytvořit strukturu s hydrofobními doménami pro inkorporaci a stabilizaci hydrofobních látek, jako je kurkumin.

Byly připraveny série vzorků s použitím vysokomolekulárního (HMW) a nízkomolekulárního (LMW) dextransu. Při přípravě bylo nutné optimalizovat způsob postupu, protože při zmrazení vzorků v mrazáku před lyofilizací došlo k oddělení fází, a tedy tyto vzorky sloužily pouze jako referenční. Poté byly připraveny dvě série vzorků, které byly zmrazeny pomocí kapalného dusíku. K charakterizaci vzniklých nosičů byly využity analytické techniky, především ATR-FTIR spektroskopie a skenovací elektronová mikroskopie (SEM). Tyto metody umožnily sledovat změny ve struktuře dextransu po lyofilizaci.

ATR-FTIR spektroskopie potvrdila možné hydrofobní interakce v lyofilizovaném dextransu a úspěšnou inkorporaci kurkuminu. Ve srovnání s nelyofilizovaným dextransem došlo po lyofilizaci k charakteristickým posunům pásma valenčních vibrací C–O (zejména v oblasti 980–1020 cm^{-1}). Tyto posuny poukazují na strukturní změny v polymerním řetězci. Po lyofilizaci došlo ke zkrácení vazeb a většímu uspořádání polymeru, což souvisí s projevem hydrofobního efektu, jehož se stal polymerní řetězec součástí. Významný posun byl pozorován především u vzorků obsahujících kurkumin a dá se tedy říct, že přítomnost hydrofobního kurkuminu má také vliv na zkracování vazeb a tvorbu hydrofobního efektu.

Skenovací elektronová mikroskopie umožnila detailní morfologickou analýzu vzniklých struktur. Pomocí snímků bylo potvrzeno, že lyofilizace vede ke vzniku vláknitých, vysoce porézních struktur s větším specifickým povrchem, které mohou usnadnit zachycení hydrofobních látek. Byly porovnávány vzorky zmrazené v mrazáku a pomocí kapalného dusíku. Vzorky zmrazené v mrazáku vykazovaly kompaktnější, deskovité struktury s menší pórovitostí. Naopak vzorky zmrazené pomocí dusíku vytvářejí jemnější tenká vlákna a struktura je více porézní, a tedy mají větší specifický povrch. S větším specifickým povrchem roste i počet hydrofobních domén, což může zlepšit schopnost nosiče vázat hydrofobní látky.

3D fluorescenční spektroskopie byla využita jako podpůrná metoda k charakterizaci chování kurkuminu v různých prostředích. Analýza excitačně-emisních spekter kurkuminu v různých prostředích potvrdila jeho závislost fluorescenčního chování na polaritě rozpouštědla. Kurkumin fluoreskoval v ethanolu a chloroformu, ale nikoliv ve vodě, což omezuje využití této metody pro detekci kurkuminu ve vodných roztocích. 3D fluorescenční spektroskopie tedy v tomto postupu není vhodná metoda pro přímé potvrzení navázání kurkuminu na nosičový systém.

U stanovení obsahu kurkuminu ve vzorku byla nejdříve použita metoda UV/Vis, ta však nedokázala naměřit žádné hodnoty absorbance, a tak nebyla pro stanovení takovýchto malých koncentrací ve vzorku dostatečná. Proto bylo provedeno stanovení obsahu kurkuminu metodou HPLC. Naměřené hodnoty obsahu kurkuminu měly vysoký rozptyl, to naznačuje, že kurkumin je v nosiči heterogenně rozložen. Zároveň byly hodnoty obsahu kurkuminu ve vzorcích HMW dextranu vyšší než v LMW. To naznačuje, že HMW dextran vytváří prostorově vhodnější strukturu pro inkorporaci léčiva. Metoda HPLC se ukázala být vhodná pro kvantifikaci kurkuminu v nosičovém systému.

Stanovení reziduí terc-butylalkoholu pomocí GC a HPLC poskytlo rozdílné výsledky. GC detekovala vyšší koncentrace terc-butylalkoholu než HPLC, což může být způsobeno například vyšší citlivostí, nebo možnou interferencí s jinými čtyřuhlíkatými těkavými látkami. Tento rozdíl může být také způsoben tím, že u metod mohly separace proběhnout různě úspěšně stejně jako rozpuštění vzorku. Obě metody dokázaly kvantifikovat zbytkový obsah ko-rozpouštědla, ale plynová chromatografie se ukázala být vhodnější co se týče limitů detekce. Obě chromatografické metody potvrdily pouze stopové množství terc-butylalkoholu ve výsledných systémech, čímž bylo potvrzeno, že využití terc-butylalkoholu coby ko-rozpouštědla je bezpečné pro případnou přípravu nosičových systémů. Přestože se naměřené hodnoty obou metod liší, je možné, že při jejich optimalizaci by se mohlo jednat o způsoby detekce residuálního terc-butyl alkoholu s vyšší přesností, než je tomu v případě head-space mikroextrakce na pevné vrstvě používané v diplomové práci od Ing. Marek Řihák, ve které byly stanoveny residua terc-butylalkoholu touto metodou [100].

Tato diplomová práce ukázala, že nosičový systém na bázi nativního dextranu připravený pomocí lyofilizace je vhodným materiálem pro inkorporaci hydrofobních molekul. Z metodického hlediska bylo potvrzeno, že kombinace FTIR a SEM je zvláště přínosná pro sledování strukturních změn v polymerní matici, zatímco HPLC je účinným nástrojem pro kvantifikaci jak účinné látky, tak zbytkového rozpouštědla. Přestože na základě získaných výsledků není jednoznačně možno potvrdit přítomnost hydrofobních domén na řetězci dextranu a následnou inkorporaci kurkuminu do těchto míst, je vysoce pravděpodobné, že během lyofilizace dochází ke změně konformace polymerního řetězce ve prospěch preferovaných interakcí s hydrofobním léčivem.

Na základě výsledků této práce lze konstatovat, že nativní vysokomolekulární (HMW) i nízkomolekulární (LMW) dextran je vhodný pro tvorbu nosičových systémů pro hydrofobní léčivo kurkumin. Z výsledků HPLC stanovení obsahu kurkuminu by se však dalo usuzovat, že HMW dextran dokáže inkorporovat větší množství kurkuminu. Z praktického hlediska se ale s LMW dextranem lépe manipulovalo, ve vodě se rozpouští rychleji, a tak se lépe převáděl do odměrných baněk, což usnadňuje přípravu roztoků a reprodukovatelnost experimentu.

Mezi hlavní přínosy této práce pro budoucí výzkum patří návrh a použití dvou chromatografických metod, které umožňují stanovit, kolik léčiva je navázáno na nosiči, a určit zbytkové množství ko-rozpouštědla (terc-butylalkoholu). Budoucí výzkum by se mohl věnovat optimalizaci koncentrace kurkuminu při přípravě nosičových systémů, pro zjednodušení analytického stanovení jeho obsahu. Vyšší koncentrace by se případně mohli stanovit pomocí UV/Vis metody. Vhodná úprava koncentrace kurkuminu v nosiči by mohla také přispět k vytvoření stabilnějších systémů.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] VISAN, Anita Ioana a CRISTESCU, Rodica. Polysaccharide-Based Coatings as Drug Delivery Systems. Online. *Pharmaceutics*. Roč. 15, č. 9. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15092227>. [cit. 2025-05-04].
- [2] MIAO, Tianxin; WANG, Junqing; ZENG, Yun; LIU, Gang a CHEN, Xiaoyuan. Polysaccharide-Based Controlled Release Systems for Therapeutics Delivery and Tissue Engineering: From Bench to Bedside. Online. *Advanced Science*. 2018, roč. 5, č. 4. ISSN 2198-3844. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/advs.201700513>. [cit. 2025-05-04].
- [3] RAHMAN, Sameeha Syed Abdul; PASUPATHI, Saroja a KARUPPIAH, Sugumaran. Conventional optimization and characterization of microbial dextran using treated sugarcane molasses. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. Roč. 220, s. 775-787. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.08.094>. [cit. -05-04].
- [4] SHARIFI-RAD, Javad; RAYESS, Youssef El; RIZK, Alain Abi; SADAKA, Carmen; ZGHEIB, Raviella et al. Turmeric and Its Major Compound Curcumin on Health: Bioactive Effects and Safety Profiles for Food, Pharmaceutical, Biotechnological and Medicinal Applications. Online. *Frontiers in Pharmacology*. Roč. 11. ISSN 1663-9812. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01021>. [cit. -05-04].
- [5] MALEKI DIZAJ, Solmaz; SHARIFI, Simin; SHAHI, Shahriar; MONTAZERSAHEB, Soheila a ALI GHAVIMI, Mohammad. The most important consideration in clinical usage of curcumin. Online. *Eurasian Chemical Communications*. 2022. Roč. 4, č. 2, s. 124-136. Dostupné z: <https://doi.org/10.22034/ecc.2022.319668.1278>. [cit. 2025-05-04].
- [6] KOTHA, Raghavendhar R. a LUTHRIA, Devanand L. Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects. Online. *Molecules*. 2019, roč. 24, č. 16. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules24162930>. [cit. 2025-05-04].
- [7] GASPAR, Vítor M., André F. MOREIRA, Elisabete C. COSTA, João A. QUEIROZ, Fani SOUSA, Chantal PICHON a Ilídio J. CORREIA. Chapter 6 - Multifunctional nanocarriers for codelivery of nucleic acids and chemotherapeutics to cancer cells. 8. In: *Nanobiomaterials in Medical Imaging: Applications of Nanobiomaterials*. 2016, s. 163-207. ISBN 9780323417365. Dostupné z: [doi:10.1016/B978-0-323-41736-5.00006-6](https://doi.org/10.1016/B978-0-323-41736-5.00006-6).
- [8] Dextran. Online. Merck. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/protocol/protein-biology/protein-pulldown/dextran>. [cit. 2025-01-04].
- [9] What is dextran? Online. TdB Labs. Dostupné z: <https://tdblabs.se/applications/what-is-dextran/>. [cit. 2025-01-04].
- [10] REZA KASAAI, Mohammad. A comparative study of molecular structure, solution properties and food application for three branched polysaccharides: Amylopectin, glycogen, and dextran. Online. *Current Trends in Polymer Science*. 2012, roč. 16. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/303312764_A_comparative_study_of_molecular_structure_solution_properties_and_food_application_for_three_branched_polysaccharides_Amylopectin_glycogen_and_dextran. [cit. 2025-01-04].
- [11] YÁÑEZ-FERNÁNDEZ, Jorge; HERRERA OVANDO, Mirna Griselda; PATLÁN RAMÍREZ, Larissa; RAMÍREZ-SOTELO, Guadalupe; GUARIN, Cesar A. et al. Factorial Design to Optimize Dextran Production by the Native Strain *Leuconostoc mesenteroides* SF3. Online. *ACS Omega*. 2021, roč. 6, č. 46, s. 31203-31210. ISSN 2470-1343. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c04856>. [cit. 2025-05-04].
- [12] VUILLEMIN, Marlène; GRIMAUD, Florent; CLAVERIE, Marion; ROLLAND-SABATÉ, Agnès; GARNIER, Catherine et al. A dextran with unique rheological properties produced by the dextranase from *Oenococcus oeni* DSM 17330.

- Online. *Carbohydrate Polymers*. 2018, roč. 179, s. 10-18. ISSN 01448617. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.056>. [cit. 2025-05-04].
- [13] PETROVICI, Anca Roxana; PINTEALA, Mariana a SIMIONESCU, Natalia. Dextran Formulations as Effective Delivery Systems of Therapeutic Agents. Online. *Molecules*. 2023, roč. 28, č. 3. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules28031086>. [cit. 2025-05-04].
- [14] DE LA CRUZ-NORIEGA, Magaly; ROJAS-FLORES, Segundo; BENITES, Santiago M.; QUEZADA ÁLVAREZ, M.A.; OTINIANO GARCÍA, N. M. et al. Use of *Leuconostoc Mesenteroides* to Produce a Dextran Bioflocculant. Online. *Environmental Research, Engineering and Management*. 2022, roč. 78, č. 1, s. 38-45. ISSN 2029-2139. Dostupné z: <https://doi.org/10.5755/j01.arem.78.1.29591>. [cit. 2025-05-04].
- [15] ROBYT, John F.; YOON, Seung-Heon a MUKERJEA, Rupendra. Dextranase and the mechanism for dextran biosynthesis. Online. *Carbohydrate Research*. 2008, roč. 343, č. 18, s. 3039-3048. ISSN 00086215. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.09.012>. [cit. 2025-05-04].
- [16] FALCONER, Daniel J.; MUKERJEA, Rupendra a ROBYT, John F. Biosynthesis of dextrans with different molecular weights by selecting the concentration of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC dextranase, the sucrose concentration, and the temperature. Online. *Carbohydrate Research*. 2011, roč. 346, č. 2, s. 280-284. ISSN 00086215. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.10.024>. [cit. 2025-05-04].
- [17] DÍAZ-MONTES, Elsa. Dextran: Sources, Structures, and Properties. Online. *Polysaccharides*. 2021, roč. 2, č. 3, s. 554-565. ISSN 2673-4176. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polysaccharides2030033>. [cit. 2025-05-04].
- [18] DAHIYA, Divakar a NIGAM, Poonam Singh. Dextran Used in Blood Transfusion, Hematology, and Pharmaceuticals: Biosynthesis of Diverse Molecular-Specification-Dextrans in Enzyme-Catalyzed Reactions. Online. *Frontiers in Bioscience-Elite*. 2024, roč. 16, č. 2. ISSN 1945-0494. Dostupné z: <https://doi.org/10.31083/j.fbe1602017>. [cit. 2025-05-04].
- [19] IQBAL, Samina; MARCHETTI, Roberta; AMAN, Afsheen; SILIPO, Alba; QADER, Shah Ali Ul et al. Enzymatic and acidic degradation of high molecular weight dextran into low molecular weight and its characterizations using novel Diffusion-ordered NMR spectroscopy. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017, roč. 103, s. 744-750. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.073>. [cit. 2025-05-04].
- [20] NAKAMURA, Shuntaro; KURATA, Rikuya; TONOZUKA, Takashi; FUNANE, Kazumi; PARK, Enoch Y. et al. Bacteroidota polysaccharide utilization system for branched dextran exopolysaccharides from lactic acid bacteria. Online. *Journal of Biological Chemistry*. 2023, roč. 299, č. 7. ISSN 00219258. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.104885>. [cit. 2025-05-04].
- [21] KIM, Jin Kyoung; SHIN, So-Yeon; MOON, Jin Seok; LI, Ling; CHO, Seung Kee et al. Isolation of dextran-hydrolyzing intestinal bacteria and characterization of their dextranolytic activities. Online. *Biopolymers*. 2015, roč. 103, č. 6, s. 321-327. ISSN 0006-3525. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/bip.22615>. [cit. 2025-05-04].
- [22] HU, Xue-Qin; XIA, Bing-Bing; RU, Wei-Juan; ZHANG, Yu-Xin; YANG, Jing-Wen et al. Research progress on structure and catalytic mechanism of dextranase. Online. *EFood*. 2023, roč. 4, č. 1. ISSN 2666-3066. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/efd2.60>. [cit. 2025-05-04].
- [23] ZHANG, Huanxin; LIU, Feifan; WU, Ping; LI, Cheng; CHEN, Qiangju et al. Degradation of (1→3)(1→6)- α -D-dextran by ultrasound: Molecular weight, viscosity and kinetics. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024, roč. 283. ISSN

01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.137446>. [cit. 2025-05-04].
- [24] HAN, Jin; HANG, Feng; GUO, Benheng; LIU, Zhenmin; YOU, Chunpin et al. Dextran synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* BD1710 in tomato juice supplemented with sucrose. Online. *Carbohydrate Polymers*. 2014, roč. 112, s. 556-562. ISSN 01448617. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.06.035>. [cit. 2025-05-04].
- [25] DÍAZ-MONTES, Elsa. Dextran: Sources, Structures, and Properties. Online. *Polysaccharides*. 2021, roč. 2, č. 3, s. 554-565. ISSN 2673-4176. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polysaccharides2030033>. [cit. 2025-05-04].
- [26] KIM, Sang Woon; LEE, Yong Seung; IM, Young Jae a HAN, Sang Won. New bulking agent for the treatment of vesicoureteral reflux: Polymethylmethacrylate/dextranomer. Online. *Investigative and Clinical Urology*. 2018, roč. 59, č. 3. ISSN 2466-0493. Dostupné z: <https://doi.org/10.4111/icu.2018.59.3.206>. [cit. 2025-05-04].
- [27] MAITY, Siddhartha; SAHA, Sudipta; SARKAR, Srimanta; KUMAR, Pranesh; GAUTAM, Anurag Kumar et al. Dextran-based nanomaterials in drug delivery applications. Online. *Biopolymer-Based Nanomaterials in Drug Delivery and Biomedical Applications*. 2021, s. 293-312. ISBN 9780128208748. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820874-8.00019-1>. [cit. 2025-05-04].
- [28] ALIBOLANDI, Mona; ALABDOLLAH, Fatemeh; SADEGHI, Fatemeh; MOHAMMADI, Marzieh; ABNOUS, Khalil et al. Dextran-b-poly(lactide-co-glycolide) polymersome for oral delivery of insulin: In vitro and in vivo evaluation. Online. *Journal of Controlled Release*. 2016, roč. 227, s. 58-70. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.02.031>. [cit. 2025-05-04].
- [29] BUNYATOVA, Ulviye; HAMMOUDA, Manel Ben a Y.ZHANG, Jennifer. Preparation of injectable hydrophilic dextran/AgNPs nanocomposite product: White light active biomolecules as an antitumor agent. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023, roč. 245. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125215>. [cit. 2025-05-04].
- [30] SILVA, S. S.; SILVA-CORREIA, J.; PINA, S. a FERNANDES, E. M. Polymers of biological origin. Online. In: *Comprehensive Biomaterials II*. 2. 2017, s. 228-252. ISBN 978-0-08-100692-4. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/referencework/9780081006924/comprehensive-biomaterials-ii>. [cit. 2025-05-04].
- [31] UTHAMAN, S.; MUTHIAH, M.; PARK, I-K. a CHO, C.-S. Fabrication and development of magnetic particles for gene therapy. Online. *Polymers and Nanomaterials for Gene Therapy*. 2016, s. 215-230. ISBN 9780081005200. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100520-0.00009-6>. [cit. 2025-05-04].
- [32] CHEN, Fang; HUANG, Gangliang a HUANG, Hualiang. Preparation and application of dextran and its derivatives as carriers. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020, roč. 145, s. 827-834. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.151>. [cit. 2025-05-04].
- [33] PRASAD, Sahdeo; TYAGI, Amit K. a AGGARWAL, Bharat B. Recent Developments in Delivery, Bioavailability, Absorption and Metabolism of Curcumin: the Golden Pigment from Golden Spice. Online. *Cancer Research and Treatment*. 2014, roč. 46, č. 1, s. 2-18. ISSN 1598-2998. Dostupné z: <https://doi.org/10.4143/crt.2014.46.1.2>. [cit. 2025-05-04].

- [34] TOMEH, Mhd Anas; HADIANAMREI, Roja a ZHAO, Xiubo. A Review of Curcumin and Its Derivatives as Anticancer Agents. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, roč. 20, č. 5. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms20051033>. [cit. 2025-05-04].
- [35] LIU, Hang; LIU, Yikun; PENG, Shengfeng; ZHOU, Lei; MCCLEMENTS, David Julian et al. Colonic delivery and controlled release of curcumin encapsulated within plant-based extracellular vesicles loaded into hydrogel beads. Online. *Food Research International*. 2025, roč. 202. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.115540>. [cit. 2025-05-04].
- [36] YIN, Tong; JIANG, Yujun a SHI, Jia. Effects of alcalase hydrolysis combined with TGase-type glycosylation of self-assembled zein for curcumin delivery: Stability, bioavailability, and antioxidant properties. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2025, roč. 303. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.140735>. [cit. 2025-05-04].
- [37] CHEN, Qing; DI, Xin; ZHAI, Yuge; ZHAO, Quanzhi a SONG, Xiaoyan. Influence of oil phases on the digestibility and curcumin delivery properties of Pickering emulsions. Online. *Food Chemistry: X*. 2025, roč. 26. ISSN 25901575. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2025.102270>. [cit. 2025-05-04].
- [38] Curcumin (Curcuma, Turmeric) and Cancer (PDQ®). Online. In: *PDQ Cancer Information Summaries*. 2024. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK578436/>. [cit. 2025-05-04].
- [39] KOTHA, Raghavendhar R. a LUTHRIA, Devanand L. Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects. Online. *Molecules*. 2019, roč. 24, č. 16. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules24162930>. [cit. 2025-05-04].
- [40] ZHANG, Nan; WARDWELL, Patricia a BADER, Rebecca. Polysaccharide-Based Micelles for Drug Delivery. Online. *Pharmaceutics*. 2013, roč. 5, č. 2, s. 329-352. ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics5020329>. [cit. 2025-05-04].
- [41] FORMICA, Maria; CALLES, Javier a PALMA, Santiago. Polysaccharide-Based Nanocarriers for Ocular Drug Delivery. Online. *Current Pharmaceutical Design*. 2015, roč. 21, č. 33, s. 4851-4868. ISSN 13816128. Dostupné z: <https://doi.org/10.2174/1381612821666150820101203>. [cit. 2025-05-04].
- [42] GARCÍA-GONZÁLEZ, C.A.; ALNAIEF, M. a SMIRNOVA, I. Polysaccharide-based aerogels—Promising biodegradable carriers for drug delivery systems. Online. *Carbohydrate Polymers*. 2011, roč. 86, č. 4, s. 1425-1438. ISSN 01448617. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.066>. [cit. 2025-05-04].
- [43] GUO, Jiabin; QIU, Yang; ZHANG, Jie; XUE, Chenxu a ZHU, Jiajin. A review on polysaccharide-based delivery systems for edible bioactives: pH responsive, controlled release, and emerging applications. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2025, roč. 291. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.139178>. [cit. 2025-05-04].
- [44] LU, Yang; ZHANG, Ershuai; YANG, Jianhai a CAO, Zhiqiang. Strategies to improve micelle stability for drug delivery. Online. *Nano Research*. 2018, roč. 11, č. 10, s. 4985-4998. ISSN 1998-0124. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12274-018-2152-3>. [cit. 2025-05-04].
- [45] S SANGAR, Omkar; C PATIL, Aishwarya a A PAYGHAN, Santosh. Nanoparticles: As a Nano based Drug Delivery System. Online. *International Journal of Science and Research (IJSR)*. 2021, roč. 10, č. 3, s. 1120-1124. ISSN 23197064. Dostupné z: <https://doi.org/10.21275/SR21309132854>. [cit. 2025-05-04].

- [46] ZHANG, Xinyao; LIANG, Yi; LUO, Dongmei; LI, Peiwen; CHEN, Yurou et al. Advantages and disadvantages of various hydrogel scaffold types: A research to improve the clinical conversion rate of loaded MSCs-Exos hydrogel scaffolds. Online. 2024, roč. 179. ISSN 07533322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.117386>. [cit. 2025-05-04].
- [47] DEBELE, Tilahun Ayane; MEKURIA, Shewaye Lakew a TSAI, Hsieh-Chih. Polysaccharide based nanogels in the drug delivery system: Application as the carrier of pharmaceutical agents. Online. *Materials Science and Engineering: C*. 2016, roč. 68, s. 964-981. ISSN 09284931. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.121>. [cit. 2025-05-04].
- [48] VINOGRADOV, Serguei V a SENANAYAKE, Thulani. Nanogel–Drug Conjugates: A Step Towards Increasing The Chemotherapeutic Efficacy. Online. *Nanomedicine*. 2013, roč. 8, č. 8, s. 1229-1232. ISSN 1743-5889. Dostupné z: <https://doi.org/10.2217/nnm.13.107>. [cit. 2025-05-04].
- [49] THANG, Nguyen Hoc; CHIEN, Truong Bach a CUONG, Dang Xuan. Polymer-Based Hydrogels Applied in Drug Delivery: An Overview. Online. *Gels*. 2023, roč. 9, č. 7. ISSN 2310-2861. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/gels9070523>. [cit. 2025-05-04].
- [50] PENG, Peichun; CHEN, Zeshan; WANG, Miaodong; WEN, Bin a DENG, Xin. Polysaccharide-modified liposomes and their application in cancer research. Online. 2023, roč. 101, č. 4, s. 998-1011. ISSN 1747-0277. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/cbdd.14201>. [cit. 2025-05-05].
- [51] HAMED, Said F.; HASHIM, Ayat F.; ABDEL HAMID, Hoda A.; ABD-ELSALAM, Kamel A.; GOLONKA, Iwona et al. Edible alginate/chitosan-based nanocomposite microspheres as delivery vehicles of omega-3 rich oils. Online. *Carbohydrate Polymers*. 2020, roč. 239. ISSN 01448617. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116201>. [cit. 2025-05-04].
- [52] HARUGADE, Anuja; SHERJE, Atul P. a PETHE, Anil. Chitosan: A review on properties, biological activities and recent progress in biomedical applications. Online. *Reactive and Functional Polymers*. 2023, roč. 191. ISSN 13815148. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2023.105634>. [cit. 2025-05-04].
- [53] MESKELIS, Ludmilla; F. AGONDI, Raquel; DUARTE, Larissa G.R.; DE CARVALHO, Matheus D.; SATO, Ana Carla K. et al. New approaches for modulation of alginate-chitosan delivery properties. Online. *Food Research International*. 2024, roč. 175. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113737>. [cit. 2025-05-04].
- [54] CIARLANTINI, Clarissa; FRANCOLINI, Iolanda; SILVESTRO, Ilaria; MARIANO, Alessia; SCOTTO D'ABUSCO, Anna et al. Design of bioactive and biomimetic scaffolds based on chitosan-alginate polyelectrolyte complexes for tissue engineering. Online. *Carbohydrate Polymers*. 2024, roč. 327. ISSN 01448617. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121684>. [cit. 2025-05-04].
- [55] CHEGENI, Mahdieh; ROZBAHANI, Zahra Shokri; GHASEMIAN, Motaleb a MEHRI, Mozghan. Synthesis and application of the calcium alginate/SWCNT-GI as a bio-nanocomposite for the curcumin delivery. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020, roč. 156, s. 504-513. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.068>. [cit. 2025-05-04].
- [56] KURCZEWSKA, Joanna. Recent Reports on Polysaccharide-Based Materials for Drug Delivery. Online. *Polymers*. 2022, roč. 14, č. 19. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym14194189>. [cit. 2025-05-04].

- [57] LIU, Xin; WANG, Yumei; WU, Han; WANG, Dayang; YAO, Huanchen et al. Natural polysaccharide hydrogel delivery system remodeling tumor microenvironment to promote postoperative tumor therapy. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2025, roč. 291. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.139137>. [cit. 2025-05-04].
- [58] XU, Yongqi; HU, Jingyin; BI, De; SU, Wei; HU, Liqing et al. A bioactive xyloglucan polysaccharide hydrogel mechanically enhanced by Pluronic F127 micelles for promoting chronic wound healing. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024, roč. 277. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134102>. [cit. 2025-05-04].
- [59] VERMA, Nitin; ARORA, Vimal; AWASTHI, Rajendra; CHAN, Yinghan; JHA, Niraj Kumar et al. Recent developments, challenges and future prospects in advanced drug delivery systems in the management of tuberculosis. Online. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2022, roč. 75. ISSN 17732247. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103690>. [cit. 2025-05-04].
- [60] WANG, Qian; LIU, Yaoqin; MA, Ying; LU, Yu; HUANG, Linjuan et al. The composition, microstructure, interaction with polysaccharides of casein micelles and their potential application as drug delivery-a review. Online. *Food Bioscience*. 2025, roč. 65. ISSN 22124292. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2025.106068>. [cit. 2025-05-04].
- [61] BASU, Arijit; KUNDURU, Konda Reddy; ABTEW, Ester a DOMB, Abraham J. Polysaccharide-Based Conjugates for Biomedical Applications. Online. *Bioconjugate Chemistry*. 2015, roč. 26, č. 8, s. 1396-1412. ISSN 1043-1802. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00242>. [cit. 2025-05-04].
- [62] YADAV, Neena; FRANCIS, Arul Prakash; PRIYA, Veeraraghavan Vishnu; PATIL, Shankargouda; MUSTAQ, Shazia et al. Polysaccharide-Drug Conjugates: A Tool for Enhanced Cancer Therapy. Online. *Polymers*. 2022, roč. 14, č. 5. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym14050950>. [cit. 2025-05-04].
- [63] MENG, Kexin; TU, Xinzhuo; SUN, Feixia; HOU, Lingmi; SHAO, Zhouxiang et al. Carbohydrate polymer-based nanoparticles in curcumin delivery for cancer therapy. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2025, roč. 304. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.140441>. [cit. 2025-05-04].
- [64] RINAUDO, Marguerite. Non-Covalent Interactions in Polysaccharide Systems. Online. *Macromolecular Bioscience*. 2006, roč. 6, č. 8, s. 590-610. ISSN 1616-5187. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/mabi.200600053>. [cit. 2025-05-04].
- [65] KE, Xiyu; NG, Victor Wee Lin; ONO, Robert J.; CHAN, Julian M.W.; KRISHNAMURTHY, Sangeetha et al. Role of non-covalent and covalent interactions in cargo loading capacity and stability of polymeric micelles. Online. *Journal of Controlled Release*. 2014, roč. 193, s. 9-26. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.061>. [cit. 2025-05-04].
- [66] KENNY, Peter W. Hydrogen-Bond Donors in Drug Design. Online. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2022, roč. 65, č. 21, s. 14261-14275. ISSN 0022-2623. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c01147>. [cit. 2025-05-04].
- [67] HOSSEINI, Seyed Mohammad Hashem; EMAM-DJOMEH, Zahra; SABATINO, Paolo a VAN DER MEEREN, Paul. Nanocomplexes arising from protein-polysaccharide electrostatic interaction as a promising carrier for nutraceutical compounds. Online. *Food Hydrocolloids*. 2015, roč. 50, s. 16-26. ISSN 0268005X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.04.006>. [cit. 2025-05-04].

- [68] DE LUCA, Sergio; CHEN, Fan; SEAL, Prasenjit; STENZEL, Martina H. a SMITH, Sean C. Binding and Release between Polymeric Carrier and Protein Drug: pH-Mediated Interplay of Coulomb Forces, Hydrogen Bonding, van der Waals Interactions, and Entropy. Online. *Biomacromolecules*. 2017, roč. 18, č. 11, s. 3665-3677. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00657>. [cit. 2025-05-04].
- [69] NOWAK, Dorota a JAKUBCZYK, Ewa. The Freeze-Drying of Foods—The Characteristic of the Process Course and the Effect of Its Parameters on the Physical Properties of Food Materials. Online. *Foods*. 2020, roč. 9, č. 10. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods9101488>. [cit. 2025-05-04].
- [70] TSINONTIDES, S.C; RAJNIAK, P; PHAM, D; HUNKE, W.A; PLACEK, J et al. Freeze drying—principles and practice for successful scale-up to manufacturing. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004, roč. 280, č. 1-2, s. 1-16. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.04.018>. [cit. 2025-05-04].
- [71] KASPER, Julia Christina; WINTER, Gerhard a FRIESS, Wolfgang. Recent advances and further challenges in lyophilization. Online. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2013, roč. 85, č. 2, s. 162-169. ISSN 09396411. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.05.019>. [cit. 2025-05-04].
- [72] ABDELWAHED, W; DEGOBERT, G; STAINMESSE, S a FESSI, H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations☆. Online. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2006, roč. 58, č. 15, s. 1688-1713. ISSN 0169409X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.017>. [cit. 2025-05-04].
- [73] ANDREANA, Ilaria; BINCOLETTI, Valeria; MANZOLI, Maela; RODÀ, Francesca; GIARRAPUTO, Vita et al. Freeze Drying of Polymer Nanoparticles and Liposomes Exploiting Different Saccharide-Based Approaches. Online. *Materials*. 2023, roč. 16, č. 3. ISSN 1996-1944. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ma16031212>. [cit. 2025-05-04].
- [74] WITTAYA-AREEKUL, Sakchai; NEEDHAM, Gregory F.; MILTON, Nathaniel; ROY, Michael L. a NAIL, Steven L. Freeze-Drying of tert-Butanol/Water Cosolvent Systems: A Case Report on Formation of a Friable Freeze-Dried Powder of Tobramycin Sulfate. Online. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2002, roč. 91, č. 4, s. 1147-1155. ISSN 00223549. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jps.10113>. [cit. 2025-05-04].
- [75] BREEN, E. D.; CURLEY, J. G.; OVERCASHIER, D. E.; HSU, C. C. a SHIRE, S. J. Effect of moisture on the stability of a lyophilized humanized monoclonal antibody formulation. Online. *Pharmaceutical Research*. 2001, roč. 18, č. 9, s. 1345-1353. ISSN 07248741. Dostupné z: <https://doi.org/10.1023/A:1013054431517>. [cit. 2025-05-04].
- [76] JAKUBOWSKA, Emilia; BIELEJEWSKI, Michał; MILANOWSKI, Bartłomiej a LULEK, Janina. Freeze-drying of drug nanosuspension— study of formulation and processing factors for the optimization and characterization of redispersible cilostazol nanocrystals. Online. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2022, roč. 74. ISSN 17732247. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103528>. [cit. 2025-05-04].
- [77] MICHALICOVÁ, Petra; MRAVEC, Filip; PEKAŘ, Miloslav a XU, Bing. Fluorescence study of freeze-drying as a method for support the interactions between hyaluronan and hydrophobic species. Online. *PLOS ONE*. 2017, roč. 12, č. 9. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184558>. [cit. 2025-05-04].
- [78] WACZULÍKOVÁ, Kristína. *Kristína Programově řízená lyofilizace k přípravě nosičového systému nativního hyaluronanu a hydrofobních molekul*. Online, Diplomová práce, vedoucí doc. Ing. Vojtěch Enev, Ph.D. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie, 2022. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/139184>. [cit. 2025-05-04].

- [79] MA, Yingying; CONG, Zhufeng; WANG, Yancai a GAO, Peng. A novel multi-drugs ciprofloxacin-curcumin-N-acetylcysteine co-delivery system based on hybrid nanocrystals for dry powder inhalations. Online. *Next Nanotechnology*. 2024, roč. 6. ISSN 29498295. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.nxnano.2024.100084>. [cit. 2025-05-04].
- [80] WANG, Xinli; LIAO, Zhenggen; ZHAO, Guowei; DONG, Wei; HUANG, Xiaoying et al. Curcumin nanocrystals self-stabilized Pickering emulsion freeze-dried powder: Development, characterization, and suppression of airway inflammation. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023, roč. 245. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125493>. [cit. 2025-05-04].
- [81] CHAVES, Matheus A.; DACANAL, Gustavo C. a PINHO, Samantha C. High-shear wet agglomeration process for enriching cornstarch with curcumin and vitamin D3 co-loaded lyophilized liposomes. Online. *Food Research International*. 2023, roč. 169. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112809>. [cit. 2025-05-04].
- [82] JIANG, Hanyun; WANG, Yanping; XU, Xiankang; DENG, Leiyu; FENG, Lifang et al. Effect of oligosaccharides as lyoprotectants on the stability of curcumin-loaded nanoliposomes during lyophilization. Online. *Food Chemistry*. 2023, roč. 410. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135436>. [cit. 2025-05-04].
- [83] YUAN, Yongkai; ZHANG, Shuaizhong; MA, Mengjie; XU, Ying a WANG, Dongfeng. Delivery of curcumin by shellac encapsulation: Stability, bioaccessibility, freeze-dried redispersibility, and solubilization. Online. *Food Chemistry: X*. 2022, roč. 15. ISSN 25901575. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100431>. [cit. 2025-05-04].
- [84] STRIEGEL, André M. a SINHA, Pritish. Absolute molar mass determination in mixed solvents. 1. Solving for the SEC/MALS/DRI “trivial” case. Online. *Analytica Chimica Acta*. 2019, roč. 1053, s. 186-195. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.11.051>. [cit. 2025-05-04].
- [85] SOME, Daniel; AMARTELY, Hadar; TSADOK, Ayala a LEBENDIKER, Mario. Characterization of Proteins by Size-Exclusion Chromatography Coupled to Multi-Angle Light Scattering (SEC-MALS). Online. *Journal of Visualized Experiments*. 2019, č. 148. ISSN 1940-087X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3791/59615>. [cit. 2025-05-04].
- [86] M. COHEN, Stephen. Modular Spectrofluorometer: The Fluorolog®-3. Online. *HORIBA Technical Reports*. Č. 7, s. 66–72. Dostupné z: https://static.horiba.com/fileadmin/Horiba/Company/About_HORIBA/Readout/R07E/RE07-14-066.pdf. [cit. 2025-05-04].
- [87] *What is an Excitation Emission Matrix (EEM)?* Online. HORIBA Scientific and Analytical Instruments. Dostupné z: <https://www.horiba.com/int/scientific/technologies/fluorescence-spectroscopy/what-is-an-excitation-emission-matrix-eem/>. [cit. 2025-05-04].
- [88] *UV-Vis Spectroscopy: Principle, Strengths and Limitations and Applications*. Online. Technology Networks. 2023. Dostupné z: <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/uv-vis-spectroscopy-principle-strengths-and-limitations-and-applications-349865>. [cit. 2025-05-04].
- [89] *Everything You Need to Know About ATR-FTIR Spectroscopy*. Online. Specac. Dostupné z: <https://specac.com/everything-you-need-to-know-about-atr-ftir-spectroscopy/>. [cit. 2025-05-04].
- [90] *ATR-FTIR Spectroscopy*. Online. Agilent. Dostupné z: <https://www.agilent.com/en/product/molecular-spectroscopy/ftir-spectroscopy/atr-ftir-spectroscopy>. [cit. 2025-05-04].

- [91] ANTONIS, Nanakoudis. *What is SEM? Scanning Electron Microscopy Explained*. Online. ThermoFisher Scientific. 2019. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/blog/materials/what-is-sem-scanning-electron-microscopy-explained/>. [cit. 2025-05-04].
- [92] *How does GC-MS work?* Online. E.L Science. United Kingdom. Dostupné z: <https://elscience.co.uk/our-lab/gcms-work/>. [cit. 2025-05-04].
- [93] . BARNABAS, K. Samuel; BALAJI, N.; NIRANJANI, S.; MUTHUKUMARAN, M.; SIVAKUMAR, V. et al. Trace level determination of t-butyl alcohol and t-butyl chloride by GC in dolasetron mesylate. Online. *Journal of Indian Chemical Society*. 2019, roč. 96, s. 171–175. Dostupné z: <https://doi.org/10.5281/zenodo.5653505>. [cit. 2025-05-04].
- [94] *HPLC Basics*. Online. ThermoFisher Scientific. 2006. Dostupné z: https://www.thermofisher.com/cz/en/home/industrial/chromatography/chromatography-learning-center/liquid-chromatography-information/hplc-basics.html?erpType=Global_E1. [cit. 2025-05-04].
- [95] KOVÁČOVÁ, Ivana. *Stanovení biologicky aktivních látek ve vybraných přírodních rostlinných extraktech*. Online, Diplomová práce, vedoucí Ing. Andrea Hároniková, Ph.D. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016.
- [96] STRAPCOVÁ, Zuzana. *Chemická a senzorická charakterizace ciderů vyrobených z odrůd jablek charakteristických pro ČR*. Diplomová práce, vedoucí Ing. Jaromír Pořízka, Ph.D. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií, 2019.
- [97] PRIYADARSINI, K. Indira. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. Online. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 2009, roč. 10, č. 2, s. 81-95. ISSN 13895567. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2009.05.001>. [cit. 2025-05-04].
- [98] DUFKOVÁ, Michaela. *Programově řízená lyofilizace pro přípravu nosičových systémů na bázi polysacharidu a hydrofobních molekul*. Bakalářská práce. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie., 2023.
- [99] WITTAYA-AREEKUL, Sakchai a NAIL, Steven L. Freeze-Drying of tert-Butyl Alcohol/Water Cosolvent Systems: Effects of Formulation and Process Variables on Residual Solvents. Online. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1998, roč. 87, č. 4, s. 491-495. ISSN 00223549. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/js9702832>. [cit. 2025-05-04].
- [100] ŘIHÁK, Marek. *Programově řízená lyofilizace pro přípravu nosičových systémů na bázi hyaluronanu a konkrétních léčiv*. Diplomová práce, vedoucí doc. Ing. Vojtěch Enev, Ph.D. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie, 2023.

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

7.1 Seznam zkratek

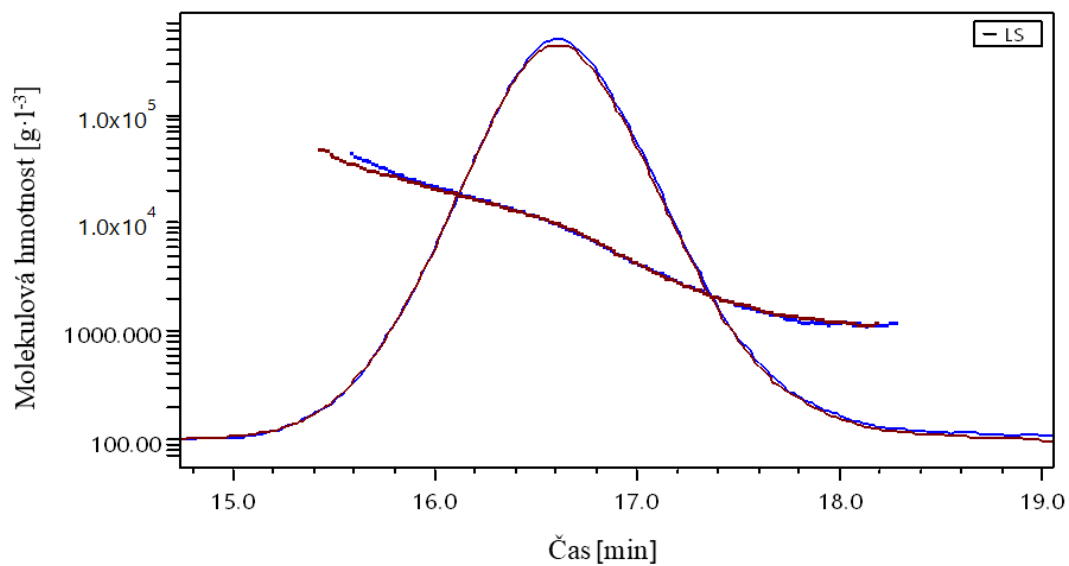
Zkratka	Význam
DPI	suché práškové inhalátory
TGA	termogravimetrická analýza
TBA	terc-butylalkohol
SEC-MALS-dRI	vylučovací chromatograf s více úhlovým statickým rozptylem světla
ATR-FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (zeslabená celková odrazivost)
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
Cur	kurkumin
pH	potenciál vodíku
T	teplota
Lyo.	lyofilizovaný
T1c/R1c	typ detektoru
3D	trojrozměrný
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
GC	plynová chromatografie
PLGA	kopolymer kyseliny mléčné a glykolové
PEG-PLGA	kopolymer polyethylenglykolu a PLGA
FDA	Food and Drug Administration
T _c	teplota kolapsu
T _g	teplota skelného přechodu
DMSO	dimethyl sulfoxid
DPI	inhalační zařízení pro léčiva ve formě suchého prášku
UV/Vis	ultrafialová a viditelná spektroskopie
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
M _w	molekulová hmotnost
HMW	vysoká molekulová hmotnost
LMW	nízká molekulová hmotnost
EEM	excitačně-emisní matice

7.2 Seznam symbolů

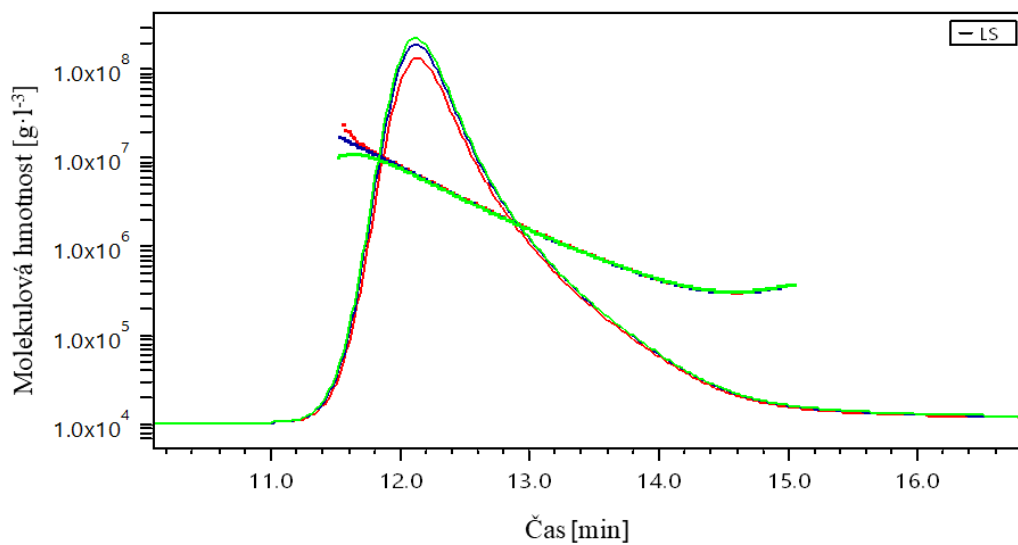
Symbol	Název veličiny
nm	nanometry
min	minuty
cm ⁻¹	centimetr na mínus první
°C	stupeň Celsia
W	watt

kDa	kilodalton
MDa	megadalton
μl	mikrolitr
%	procenta
Pa	pascal
W/cm^2	watt na centimetr čtvereční
% w/v	hmotnostně objemová procenta
$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	gram na mol
$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	mikrogram na mililitr
g	gram
mg	miligram
$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	miligram na mililitr
ml	mililitr
g/kg	gram na kilogram
$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	mol na litr
M	molární koncentrace
ppm	jedna miliontina (parts per million)
hPa	hektopascal
$^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$	stupeň Celsia za minutu
$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	milimol na litr
$\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$	mililitr za minutu
hm.%	hmotnostní procento
mAU·min	miliabsorpční jednotky krát minuty
pA·min	pikoampér krát minuta
$\mu\text{RIU}\cdot\text{min}$	mikro-refraktivní jednotky krát minuty

8 PŘÍLOHY



Obr. 21: SEC-MALS-dRI chromatogram pro LMW dextran.



Obr. 20: SEC-MALS-dRI chromatogram pro HMW dextran.