

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA

CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

Obor: Farmakochemie a medicínální materiály

Využití amfifilních polysacharidů (na základě kyseliny hyaluronové a karboxymethylcelulózy) na léčbu suchého oka

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Tereza Machová

2022

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Tereza Machová**
Osobní číslo: **C18357**
Studijní program: **B2830 Farmakochemie a medicínální materiály**
Studijní obor: **Farmakochemie a medicínální materiály**
Téma práce: **Využití amfifilních polysacharidů (na základě kyseliny hyaluronové a karboxymethylcelulózy) na léčbu suchého oka**
Téma práce anglicky: **Amphiphilic Polysaccharides (Hyaluronic acid and Carboxymethyl Cellulose) used to treat dry eye disease**
Zadávající katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

Zásady pro vypracování

1. Literární rešerše zaměřená na přípravu a vlastnosti kyseliny hyaluronové a karboxymethylcelulózy.
2. Literární rešerše zaměřená na medicínální aplikace kyseliny hyaluronové a karboxymethylcelulózy.
3. Studium rychlosti reakce pro aktivaci kyseliny hyaluronové, karboxymethylcelulózy a kyseliny laurové.
4. Výsledky zpracujte formou závěrečné zprávy.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Veškerá dostupná odborná literatura.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Marek Bouška, Ph.D.**
Katedra polygrafie a fotofyziky

Datum zadání bakalářské práce: **26. února 2021**
Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji,

že práci s názvem *Využití amfifilních polysacharidů (na základě kyseliny hyaluronové a karboxymethylcelulózy) na léčbu suchého oka* jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 24. 6. 2022

Tereza Machová v. r.

Poděkování

Děkuji vedoucímu bakalářské práce doc. Ing. Marku Bouškovi, Ph.D., za odborné vedení práce a cenná doporučení při jejím zpracování. Stejně tak děkuji spol. Contipro za umožnění realizace výzkumu v jejích laboratořích a ve spolupráci s tamními pracovníky, stejně jako za využití odborných interních materiálů spol. Contipro.

ANOTACE

Bakalářská práce se v teoretické rovině zaměřuje na syndrom suchého oka a zejména na to, jaké jsou možnosti zvyšování vlhkosti očí pomocí očních kapek. Jejich základní součástí je pak klasicky kyselina hyaluronová, jejíž výroba je však časově i finančně poměrně náročná. Proto je cílem bakalářská práce v experimentální části zjistit, zda lze zvýšit viskozitu hyaluronanu pomocí derivátů kyseliny laurové snížením obsahu HA a CMC, což je zároveň i hlavní výzkumnou otázkou. Za účelem naplnění cíle byla zvolena metoda NMR a IČ spektrometrie.

KLÍČOVÁ SLOVA

Amfifilní polysacharidy, kyselina hyaluronová, NMR a IČ spektrometrie, oční kapky, suché oko

TITLE

Amphiphilic Polysaccharides (Hyaluronic acid and Carboxymethyl Cellulose) used to treat dry eye disease

ANNOTATION

The bachelor's thesis is theoretically focused on dry eye syndrome and especially on the possibilities of increasing eye moisture with the help of eye drops. Their basic component is classically hyaluronic acid, the production of which, however, is relatively time-consuming and financially demanding. Therefore, the aim of the bachelor's thesis in the experimental part is to determine whether the viscosity of hyaluronan can be increased by lauric acid derivatives by reducing the content of HA and CMC, which is also the main research question. The NMR and IR spectrometry methods were chosen to meet the target.

KEYWORDS

Amphiphilic polysaccharides, hyaluronic acid, NMR and IR spectrometry, eye drops, dry eye

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	8
ÚVOD.....	9
TEORETICKÁ ČÁST	
1 SYNDROM SUCHÉHO OKA.....	12
1. 1 SLZNÝ FILM	12
1. 1. 1 <i>Struktura slzného filmu.....</i>	<i>13</i>
1. 2 MOŽNOSTI LÉČBY SUCHÉHO OKA.....	15
2 AMFIFILNÍ POLYSACHARIDY A JEJICH VYUŽITÍ PŘI LÉČBĚ SUCHÉHO OKA	16
2. 1 KYSELINA HYALURONOVÁ	16
2. 1. 1 <i>Chemická charakteristika a výroba.....</i>	<i>16</i>
2. 1. 2 <i>Biologické vlastnosti.....</i>	<i>18</i>
2. 1. 3 <i>Využití v medicínálních aplikacích.....</i>	<i>18</i>
2. 2 KARBOXYMETHYLCELULÓZA	19
2. 2. 1 <i>Chemická charakteristika a výroba.....</i>	<i>20</i>
2. 2. 2 <i>Biologické vlastnosti.....</i>	<i>20</i>
2. 2. 3 <i>Využití v medicínálních aplikacích.....</i>	<i>21</i>
2. 3 LÉČBA SUCHÉHO OKA PŘÍPRAVKY S OBSAHEM HA A CMC	22
2. 3. 1 <i>Umělé slzy.....</i>	<i>22</i>
PRAKTICKÁ ČÁST	
3 MOŽNOSTI ZVYŠOVÁNÍ VIZKOZITY HYALURONANU	26
3. 1 METODIKA – POUŽITÉ EXPERIMENTÁLNÍ METODY	26
3. 1. 1 <i>NMR spektrometrie.....</i>	<i>27</i>
3. 1. 2 <i>Infračervená spektrometrie</i>	<i>27</i>
3. 1. 3 <i>Použité chemikálie.....</i>	<i>28</i>
3. 2 PŘÍPRAVA VZORKŮ K ANALÝZE	29
3. 3 VYHODNOCENÍ DAT	39
ZÁVĚR	44
LITERATURA A ZDROJE.....	46
SEZNAM OBRÁZKŮ, GRAFŮ A TABULEK	49

Seznam zkratek

HA	hyaluronová kyselina
CMC	karboxymethylcelulóza
NMR	nukleární magnetická rezonance
IČ	infračervená spektrometrie
BC	benzoylchlorid
THF	tetrahydrofuran
TEA	triethylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
IPA	izopropylalkohol
NaCl	chlorid sodný
DS	Degree of substitution (stupeň substituce)

ÚVOD

Zrak je jedním ze základních smyslů, bez něhož si většina z nás nedokáže představit běžné fungování. Přesto se v životě celá řada lidí potýká s různými očními problémy, a to včetně tzv. suchého oka, jehož příznaky někdy pocítil pravděpodobně každý. Není tedy divu, že až čtvrtina populace potřebuje alespoň občas užívat zvlhčující oční kapky. To pak platí i pro případy tzv. syndromu suchého oka, což je již závažný (a také poměrně vzácný) stav obvykle související s jinými typy onemocnění. Ovšem i ten se (vedle hledání primární příčiny) klasicky léčí pomocí očních kapek, mastí či gelů.

Ačkoliv příčin syndromu suchého oka může být celá řada a je jen důsledkem jiných zdravotních obtíží, pocit suchosti oka lze pocíťovat i např. v souvislosti s delším pobytem v uměle osvětlených (a příp. také klimatizovaných) místnostech, kvůli dlouhému vystavení očí digitálním zdrojům (především monitorům počítačů). Vedle toho mohou suché oči trápit také uživatele kontaktních čoček – a to jsou vše faktory, které se týkají poměrně značné části populace. Zvlhčování očí je tedy důležitou součástí života mnoha lidí, i tehdy ale platí, že zvolený přípravek by měl svým složením reflektovat konkrétní potřeby uživatele. Složek, které jsou přítomny v očních kapkách, resp. umělých slzách, je samozřejmě celá řada. Jelikož základním účinkem by ale mělo být zvlhčení, klíčové jsou složky, jež hydratují, potažmo zvyšují viskozitu. Těmi pak jsou mj. kyselina hyaluronová (HA) a karboxymethylcelulóza (CMC), na které se bakalářská práce blíže zaměřuje.

Výběr výše zmíněných látek byl zároveň podřízen stáži autorky práce v české společnosti Contipro, která patří mezi přední světové výrobce kyseliny hyaluronové. Cílem bakalářská práce pak je posouzení možností zvýšení viskozity hyaluronanu (a to i při zohlednění odlišnosti viskozity kyseliny hyaluronové a celulózy ve srovnání s viskozitou očních kapek) a zodpovězení související výzkumné otázky: *Lze zvýšit viskozitu hyaluronanu pomocí derivátů kyseliny laurové snížením obsahu HA a CMC?* Za účelem naplnění cíle byla zvolena metoda NMR a IČ spektrometrie.

Bakalářská práce je klasicky rozdělena na části teoretickou a praktickou. První kapitola se zaměří na syndrom suchého oka, především pak na slzný film a jeho strukturu – právě kvůli narušení slzného filmu totiž k pocitu suchosti oka dochází. Opominuty

nebudou ani možnosti léčby suchého oka, které však budou zmíněny jen ve stručnosti. Druhá kapitola již specificky pojedná o amfifilních polysacharidech a jejich využití při léčbě suchého oka. Nejprve bude představena kyselina hyaluronová, její chemické charakteristiky a způsoby výroby. Dále text pojedná o jejích biologických vlastnostech a využití v medicíně aplikacích – tentýž postup pak bude užit i v případě karboxymethylcelulózy. Závěr druhé kapitoly bude věnován problematice léčby suchého oka pomocí přípravků s obsahem kyseliny hyaluronové (HA) a karboxymethylcelulózy (CMC).

Praktická (experimentální) část práce se pak zaměří na možnosti zvýšení viskozity hyaluronanu, za tímto účelem bude pracováno s různě modifikovanými roztoky HA a CMC. Adekvátně připravené vzorky budou následně podrobeny dvojici již zmiňovaných strukturních analýz: NMR spektrometrii a IČ spektrometrii.

TEORETICKÁ ČÁST

1 Syndrom suchého oka

Již riziko suchého oka je diagnózou definovanou jako „*náchylnost k nepohodlí [mírné bolesti] oka nebo poškození rohovky a spojivky z důvodu snížení množství či kvality slzného filmu potřebného k navlhčení oka, což může ohrozit zdraví*“ [1, s. 451]. Syndrom suchého oka pak v praktické rovině znamená celou řadu nespecifických potíží, především ve smyslu pálení a řezání, může být přitom např. vyvolán i pobytem v suchém a horkém prostředí či prostředí s vyšším prouděním vzduchu, zároveň se jedná o jeden z nejčastějších problémů, jimiž lidé v souvislosti s očima trpí [2].

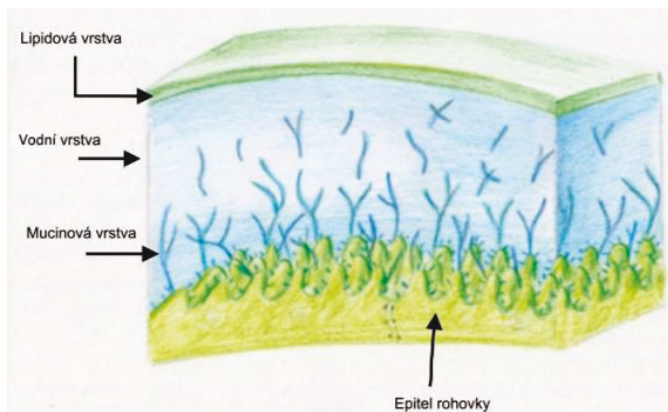
V rámci lékařského diskursu bývá pro syndrom suchého oka užíváno také označení xeroftalmie (z řeckého *xeros* – suchý a *oftalmos* – oko). Jedná se o onemocnění, jež je ovlivněno řadou činitelů, a projevuje se dyskomfortem, různými obtížemi s viděním, poruchami slzného filmu, zároveň může vyústit až v poškození očního povrchu [2]. Přitom právě nestabilita (či hypersmolarita) tzv. slzného filmu je považována za hlavní příčinu změny očního povrchu a dalších očních symptomů, jež jsou jako „syndrom suchého oka“ souhrnně označovány.

1. 1 Slzný film

Základní funkcí slzného filmu je lubrikace očního povrchu, kromě toho slzný film chrání rohovku a působí také antibakteriálně. Jak doplňuje Kuchynka a kol. [3, s. 196], „*slzný film udržuje povrchovou homoestázu a zabezpečuje malé množství výživy pro rohovkový epitel.*“ Produkci slzného filmu obstarávají hlavní slzná žláza a také přídatné slzné žlázy spojivky a víček. Následně jsou slzy díky pohybu víček (cca 5–12krát za minutu) dále rozprostřeny na povrchu rohovky a spojivky a odváděny prostřednictvím slzných bodů nejprve do slzných kanálek a poté směřují skrze nosní slzovod do nosu. Vlastní odtékání slz také stimuluje mrkání [3]. Slzný film (potažmo slzy) je tedy pro zdraví oka klíčový. Jak mj. upřesňuje Palos [2, s. 694] „*nedostatek slz nebo jejich zvýšené odpařování s následnou zvýšenou osmolaritou slzného filmu vede k zánětlivé reakci v oblasti interpalpebrální štěrbině.*“

1. 1. 1 Struktura slzného filmu

Aby bylo dále možné soustředit se na řešení problémů se suchým okem, potažmo na to, jak nestabilní slzný film (či slzný film se zvýšenou osmolaritou) substituovat, je třeba zaměřit se na jeho strukturu. Ta je tvořena trojicí složek – mukózní, vodnou a lipidovou [4], viz obrázek 1.

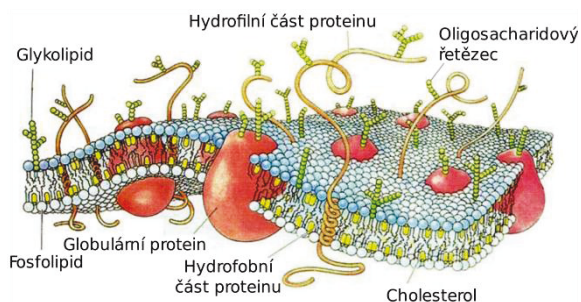


Obrázek 1: Schéma slzného filmu

Zdroj: [4, s. 62]

- **Mukózní (mucinová) složka**

Jedná se o vnitřní – velmi tenkou, cca 0,02–0,07 μm – vrstvu, jež je v bezprostředním kontaktu s povrchem oka, přiléhá na rohovku a zajišťuje rovnoměrnou distribuci slzné kapaliny. Tato vrstva slzného filmu, jež zároveň přispívá k přilnutí k rohovce a spojivce, je tvořena komplexem mukózního glykoproteinu, proteinovými elektrolyty a buněčným materiálem [3]. V mucinové složce jsou pak obsaženy amfifilní látky. Jedná se o sloučeniny, jejichž molekuly obsahují ve své struktuře části, které jsou jak ve vodě rozpustné (hydrofilní), tak i nerozpustné (hydrofobní), v obecné rovině pak vše zachycuje obrázek 2 znázorňující biologickou membránu.



Obrázek 2: Biologická membrána – lipidová dvojvrstva

Zdroj: [5, s. 18]

Jak doplňují Synek a Skorkovská [5, s. 39], „*glykoproteinová část je povrchově aktivní a tvoří hydrofobní povlak, který tuto vrstvu váže na mikrořasy hydrofobního epitelu a umožňuje navázání další hydrofilní složky slzného filmu.*“ Část hydrofobní směřuje k rohovce, zatímco část hydrofilní naopak od ní. Mucin je pak utvářen v pohárkových buňkách nacházejících se v epitelu spojivky [5].

- **Vodná složka**

Hlavním úkolem vodné složky (či tzv. střední vodné vrstvy) je omývání oka a lubrikace očního povrchu [3]. Jedná se o složku (o tloušťce cca 6–10 μm), jež utváří voda a také soli, které jsou v ní rozpuštěny. Konkrétně pak tato složka obsahuje Na^+ (145 mg/ml), K^+ (20 mg/ml), Cl^- (136 mg/ml) a také ureu, glukózu, kyslík a proteiny, tedy albumin, laktoreffin, lysozym a také imunoglobuliny [5, s. 39].

- **Lipidová složka**

Tato složka o tloušťce cca 0,1 μm tvoří svrchní vrstvu slzného filmu a je dominantně tvořena estery cholesterolu – obsahuje volné mastné kyseliny, cholesterol, triglyceridy a sterolové estery. K sekreci této vrstvy dochází v Meibomských žlázách a Zeissových a apokrinních Mollových žlázách [3].

Jak potom dodávají Synek a Skorkovská [5, s. 39], „*v poslední době se zjistilo, že rozhraní mezi mucinovou a vodní složkou slzného filmu netvoří přísnou linii a mucin plynule přechází v tekutou složku, kde se navázáním lipidové složky snižuje povrchové napětí.*“

1. 2 Možnosti léčby suchého oka

Jelikož xeroftalmie může mít souvislost s množstvím rozličných lokálních či systémových onemocnění, důležitá je nejen včasná diagnóza, ale také léčba příp. základního onemocnění. Vlastní léčba suchého oka pak obvykle spočívá v substituci slz slzami umělými, které mohou mít jak podobu kapek, tak i masti či gelu [2]. „*Umělé slzy mají za cíl vytvořit stejnoměrnou stabilní vrstvu slzného filmu a zabránit vysychání a dráždění povrchu oka*“ [4, s. 64]. Zatímco v méně závažných případech lze při substituci slz užívat jakoukoliv jejich dostupnou variantu, je-li onemocnění pokročilejší, doporučovány jsou slzy bez konzervačních látek (podrobněji viz dále). Ty sice zajišťují delší trvanlivost produktu, na druhou stranu však mohou způsobovat nežádoucí alergické reakce [4]. Substitute slz pak zlepšuje kvalitu života pacientů a zároveň také minimalizuje riziko vzniku dalších obtíží, jež by mohly ovlivnit kvalitu zraku [2].

2 Amfifilní polysacharidy a jejich využití při léčbě suchého oka

Jak již bylo naznačeno v závěru předchozí kapitoly, v případě léčby suchého oka, potažmo při substituci slzného filmu, jsou nejčastěji užívány umělé slzy, které jsou na trhu jak ve formě kapek, tak i mastí či gelů, jejichž složení je samozřejmě různé. Vzhledem k tomu, že samotný výběr tématu této bakalářské práce vyšel ze z faktu, že autorka byla na stáži ve společnosti Contipro specializující se na výrobu kyseliny hyaluronové, byl výběr konkrétních složek, jimž byla věnována v dané souvislosti detailnější pozornost, tomuto faktu podřízen. Proto se následující text zaměří specificky na kyselinu hyaluronovou a karboxymethylcelulózu a jejich využití při léčbě suchého oka.

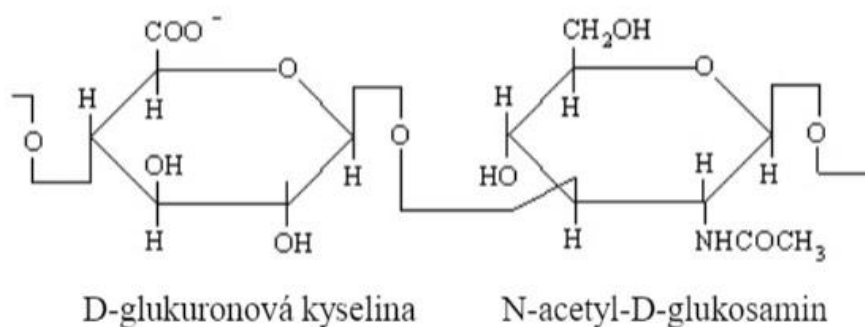
2. 1 Kyselina hyaluronová

Samotný název kyseliny hyaluronové vychází ze spojení slov *hyalos* (řecky sklo) a *uronic acid* (anglicky uronová kyselina) – na „sklo“ pak odkazuje proto, že tuto chemickou látku, jež dříve nebyla známa, objevili vědci v roce 1934 v očním sklivci hovězího dobytka. Právě v očním sklivci pak kyselina hyaluronová sehrává důležitou roli – ovlivňuje totiž jeho viskozitu [5]. Kyselina hyaluronová je však přirozeně přítomna v tělech všech obratlovců (příp. může tvořit také obaly vajíček některých živočichů) a samozřejmě i v těle člověka, a to nejen ve sklivci oka, ale např. i v synoviální kloubní tekutině a dominantně pak v kožních/pojivových tkáních. Kromě toho může být kyselina hyaluronová přítomna také v pupeční šňůře [6].

2. 1. 1 Chemická charakteristika a výroba

Z hlediska chemického je kyselina hyaluronová, jejíž struktura je uvedena na obrázku 3 na následující straně, „*nesulfátovaný glykosaminoglykan, polymer disacharidových jednotek složených z N-acetyl-D-glukosaminu a kyseliny D-glukuronové, který se nachází v řadě tkání, ale zvláště ve tkáních pojivových*“ [7, s. 360]. Jelikož v přírodě/fyziologicky se kyselina hyaluronová vyskytuje v podobě soli, a ne kyseliny, je v tomto kontextu hojně užíván také termín hyaluronan [8]. Ten byl zaveden proto, aby koreloval s mezinárodní terminologií užívanou pro polysacharidy, a zahrnuje i

různé formy molekuly včetně kyseliny hyaluronové či sodné soli kyseliny hyaluronové [6].



Obrázek 3: Chemická struktura kyseliny hyaluronové

Zdroj: [6, s. 399]

Ačkoliv je v těle kyselina hyaluronová (resp. hyaluronan) přítomna, vzhledem k řadě jejích příznivých vlastností a možností medicínského využití (a také k faktu, že s věkem tvorba této látky v těle klesá) je samozřejmě tato látka také průmyslově vyráběna. Za účelem výroby hyaluronanu již bylo vytvořeno několik různých technologických postupů, přičemž v průmyslové rovině lze hovořit o dvou základních, tedy o metodě extrakce z živočišných tkání, např. kohoutích hřebínků, hovězí synoviální tekutiny, sklivce skotu či lidské pupeční šňůry (což je metoda starší, od níž se již v dnešní době víceméně ustupuje), a metodě mikrobiální fermentace. Ačkoliv oběma těmito způsoby je možné vytvořit polydisperzní hyaluronan o vysoké molekulové hmotnosti, tedy hyaluronan, který je možné využít jak v medicínské, tak i kosmetické praxi, právě druhá zmiňovaná metoda aktuálně platí za nejrozšířenější [9].

Vzhledem k tomu, že biotechnologická společnost Contipro, v níž byla autorka práce na stáži, se věnuje výrobě hyaluronanu/kyseliny hyaluronové pro farmaceutický a kosmetický průmysl právě prostřednictvím mikrobiální fermentace, resp. fermentace bakteriálního kmene *streptococcus zooepidemicus*, bude tato metoda, jež je považována za jednu z nejrychlejších, stručně představena. Bakteriální kmen *streptococcus zooepidemicus* je přirozeným producentem kyseliny hyaluronové, ta přitom v případě tohoto kmene platí za jeden z klíčových virulentních faktorů. Jmenovaný kmen kyselinu hyaluronovou produkuje v podobě kapsule, jež pokrývá kompletní povrch bakterie, díky čemuž je kyselina hyaluronová zároveň ukryta před imunitními buňkami napadeného

organismu [10]. Vlastní průmyslová fermentace pak probíhá v bioreaktoru, kdy je v komplexním médiu přítomen kvasniční extrakt, fosforečnan draselný, glukóza, síran hořečnatý, chlorid sodný a L-glutamát. Po fermentaci dochází k procesu čištění (filtrace, membránová ultrafiltrace). Endotoxiny, vysokomolekulární proteiny a nukleové kyseliny jsou vyvázány na adsorbenty, které jsou následně odfiltrovány. Výsledkem je vysokomolekulární biokompatibilní kyselina hyaluronová [11].

2. 1. 2 Biologické vlastnosti

Díky unikátní struktuře podobné složenému listu spleteného do tvaru cívky na sebe kyselina hyaluronová dokáže vázat velké množství vody, v důsledky tak nabývá ojedinělé reologické, hygroskopické a také viskoelastické vlastnosti. V lidském těle se pak kyselina hyaluronová podílí na celé řadě funkcí, přičemž jí jsou přiřítány biologické účinky v rovině regulační, zánětlivé, imunosupresivní a také antiproliferační [12]. Titíž autoři pak [12, s. 223] klasifikují biologické účinky kyseliny hyaluronové následovně:

- *modulace tkáňové hydratace a osmotické rovnováhy* (plyne z hygroskopických vlastností KH, přičemž hyaluronan významně souvisí s hydratací a fyzikálními vlastnostmi extracelulární matrix);
- *chondroprotektivní účinky, remodelace kostí* (KH stimuluje tvorbu inhibitorů tkáňových matrixových metaloproteinů v chondrocytech a inhibuje degradaci chrupavky ad.);
- *zánětlivé, protizánětlivé, imunosupresivní a antiproliferační účinky* (KH mj. mění chování imunitních buněk, vysokomolekulární hyaluronan pak funguje protizánětlivě a imunosupresivně – naopak nízkomolekulární hyaluronan má účinky prozánětlivé);
- *přenos signálu, migrace a diferenciacie buněk* (kromě toho hyaluronan také může interagovat s množstvím receptorů a podpořit aktivaci signalizačních kaskád ovlivňujících buněčnou migraci, proliferaci a expresi genů).

2. 1. 3 Využití v medicínálních aplikacích

Kyselina hyaluronová se díky svým vlastnostem stala hojně využívanou v celé řadě oborů. Z hlediska vlastních účinků však důležitou roli sehrává molekulová hmotnost kyseliny hyaluronové, Švihovec a kol. [13] pak přímo hovoří o tom, že je možné

klasifikovat ji na kyselinu hyaluronovou o nižší (500–730 000 Da), střední (cca 800 000 až 1 500 000 Da) nebo vysoké (až do 8 000 000 Da) molekulové hmotnosti. „*Externě podávaná kyselina hyaluronová má nejen lokální bariérové funkce, ale i vlastní farmakologickou účinnost, což bylo prokázáno především o KH o menší molekulové hmotnosti, KH o větší molekulové hmotnosti mají především bariérovou funkci*“ [13, s. 623].

Z hlediska terapeutického využití lze zmínit celou řadu oborů, kdy velké uplatnění našla kyselina hyaluronová např. v ortopedii. „*Hyaluronová kyselina má důležitou roli v biomechanice, kdy je částečně zodpovědná za lubrikaci a viskoelasticitu. Její koncentrace a molekulová hmotnost ale klesají s progresí osteoartrózy a stárnutí*“ [14, s. 89]. Proto je tedy kyselina hyaluronová již více jak čtyři desetiletí užívána právě k léčbě osteoartrózy, a to nejen v případě lidí, ale třeba také koní či psů [14].

Opomenout nelze ani obory další, jako jsou kardiologie, kdy kyselina hyaluronová slouží ke zvýšení biokompatibility kardiovaskulárních implantátů, dermatologie, tehdy kyselina hyaluronová podporuje regeneraci a augmentaci kůže, urychluje hojení ran ad., onkologie, v jejímž případě jsou klíčové nanočástice vázající kyselinu hyaluronovou, která pak slouží jako nosič specifických léků, a samozřejmě také oftalmologie [12]. „*Kyselina hyaluronová je zvláště užitečná jako oční prostorová matrice, proto se intraokulární injekce KH během chirurgického zákroku používá k udržení tvaru přední komory. Navíc roztoky KH slouží jako složka očních kapek zvyšující viskozitu a jako adjuvans při reparaci očních tkání*“ [12, s. 224]. Odehnal a Malec [4, s. 65] zároveň doplňují, že kyselina hyaluronová „*podporuje tvorbu hemidesmozomů v rohovkovém epitelu a podporuje integritu povrchu rohovky prostřednictvím tvorby specifických ligandů účinných zvláště při zánětu rohovky,*“ což je také jedna z možných příčin vzniku syndromu suchého oka.

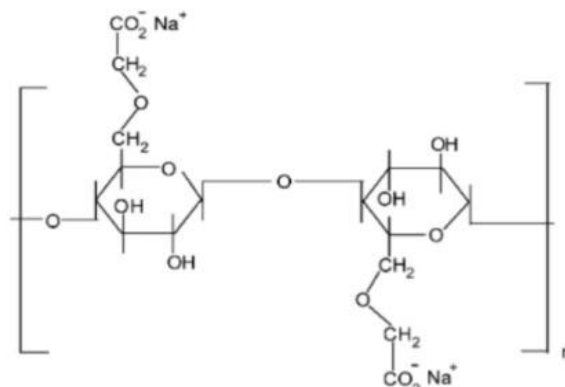
2. 2 Karboxymethylcelulóza

Karboxymethylcelulóza od doby, kdy byla na počátku 20. století (konkrétně v roce 1921) patentována její výroba, našla celou řadu využití v nespočtu oborů. Na rozdíl od kyseliny hyaluronové se však v lidském těle (těle živočichů) přirozeně nevyskytuje a tato látka je získávána chemickou modifikací přírodní celulózy. Nejrozšířenější

užívanou formou karboxymethylcelulózy je sodná sůl, jež bývá označována jako celulózová guma, sodný celulózový glykolát, carboxymethocel nebo collocel [15].

2. 2. 1 Chemická charakteristika a výroba

Karboxymethylcelulóza, jejíž struktura je znázorněna na obrázku 4, je derivátem celulózy a jedná se o ve vodě rozpustný polysacharid, jenž vzniká chemickou modifikací celulózy, tedy nejrozšířenějšího přírodního polysacharidu [15].



Obrázek 4: Struktura karboxymethylcelulózy

Zdroj: [15, s. 165]

Samotná výroba karboxymethylcelulózy pak může probíhat různě, nejužívanější metodou je však ta popsaná níže. „*Karboxymethylcelulóza (CMC) je éter celulózy připravovaný např. karboxymethylací alkalizované celulózy kyselinou chloroctovou*“ [16, s. 18–19]. V základu je tento derivát tedy vyráběn tak, že celulóza je rozpuštěna ve směsi etanolu, acetonu a vody a následně dochází k jejímu vysrážení za užití hydroxidu sodného. Výsledná látka poté reaguje s kyselinou chloroctovou a vzniká kýžený derivát [17].

Nejčastěji je karboxymethylcelulóza užívána ve formě své sodné soli (NaCMC), ovšem vyskytuje se také jako sůl vápenatá či jako méně známá kyselá forma (HCMC) [16]. „*Sodnou sůl karboxymethylcelulózy lze v závislosti na molekulové hmotnosti a míře substituce připravit jako práškový produkt poskytující viskózní roztoky s tixotropním chováním nebo pseudoplastické roztoky z CMC s vyšší mírou substituce*“ [16, s. 15].

2. 2. 2 Biologické vlastnosti

To, jaké konkrétní vlastnosti a účinky CMC vykazuje, souvisí s mírou substituce ve struktuře celulózy, ale také s průměrnou délkou polymerových řetězců a v neposlední

řadě i s tím, nakolik se shlukují karboxymethylové substituenty. Hydrofobní CMC s nižší substitucí mají vlastnosti thixotropní, rozvětvenější CMC s vyšší substitucí pak vlastnosti pseudoplastické [18]. Faktem ale je, že klíčovou vlastností CMC je její schopnost utvářet viskózní koloidní roztoky s neutrálním či zásaditým pH. I proto je tedy CMC využívána k „regulaci“ viskozity (nedochází však k tvorbě gelu). Právě díky zmiňované viskozitě a faktu, že její míru je možné určovat, je CMC často využívána jako zahušťovadlo či stabilizátor. Vedle toho je CMC netoxická a nezpůsobuje alergie, díky čemuž ji lze využívat i v potravinářském průmyslu [18].

2. 2. 3 Využití v medicíně a aplikacích

CMC je nejčastěji využívaným etherem celulózy a její užití se zdaleka neomezuje jen na oblast medicíny, naopak je hojně (a to i vzhledem ke snadné výrobě a nízké ceně) využívána v celé řadě průmyslových odvětví. CMC slouží jako modifikátor viskozity, zahušťovadlo, stabilizátor emulze a také činidlo zadržující vodu. Z toho důvodu CMC našla své uplatnění v textilním, chemickém, ropném, keramickém či papírenském průmyslu a nachází se v celém spektru produktů od dietních tablet až po čisticí přípravky apod. Opomenout ale nelze ani již zmíněné využití v potravinářství, kde je CMC využívána jako zahušťovadlo a stabilizátor emulzí pod označením E466 [19].

Vzhledem k tomu, že CMC je také vysoce biokompatibilní, biologicky rozložitelná a vykazuje nízkou imunogenitu, své místo nalezla i v průmyslu kosmetickém a farmaceutickém, kdy slouží např. jako matrice pro léky s řízeným uvolňováním, využívána je jako pojivo a rozvolňovadlo v tabletách, příp. slouží ke zvýšení viskozity. Uplatňována je tedy v léčivech perorálních, kožních, vaginálních i očních, v posledním zmiňovaném případě pak jako součást očních kapek, umělých slz [17]. CMC je také častou složkou v drogistickém zboží (zubní pasty, lubrikanty) a opomenout nelze ani obor medicíny. *„Karboxymethylcelulóza si našla na rozdíl od oxidované celulózy rozsáhlé uplatnění jako pomocná látka ve farmacii a složka implantabilních materiálů pro chirurgii“* [16, s. 18]. CMC je také důležitou složkou v prostředcích určených ke krytí ran [16].

2. 3 Léčba suchého oka přípravky s obsahem HA a CMC

Ačkoliv v případě léčby syndromu suchého oka je třeba přistupovat k problému komplexně a zaměřit se zejména na hledání jeho příčiny (může se jednat např. o deformaci očních víček, chronický zánět okrajů víček apod.), zároveň je nutné poskytnout pacientovi průběžnou léčbu suchého oka, která obvykle spočívá v podávání umělých slz [20]. Jak při prevenci, tak i léčbě očních onemocnění, a to včetně syndromu suchého oka, jsou obvykle užívány klasické lékové formy, tedy především oční kapky a masti. „*Oční kapky jsou sterilní vodné, případně olejové roztoky, emulze nebo suspenze (...). Kromě léčivé látky obsahují řadu pomocných látek k úpravě osmotických vlastností, viskozity, hodnoty pH, chránících před účinkem kyslíku a mikrobiální kontaminací*“ [21, s. 25]. V případě disperzních soustav je kromě toho třeba přidat látky, jež slouží ke stabilizaci disperzního stavu (viskozni přísady, tenzidy) [21]. Jak dodává Štrofová [20], při medikamentózní léčbě suchého oka jsou užívána lubrikancia, tedy umělé slzy, případně také stimulatory tvorby slz. V krajním případě pak léčiva, jejichž účinek je protizánětlivý (kortikoidy, cytostatika).

Konkrétně lubrikancia (ať už v podobě kapek, mastí či gelů) je třeba vybírat s přihlédnutím k individuálním potížím pacientů. Na trhu je dostupná celá řada rozličných přípravků, kdy klíčovou roli při výběru může sehrát např. i ne/přítomnost konzervačních látek, jež mohou být v souvislosti se syndromem suchého oka nežádoucí [20]. Ačkoliv ne/výhody jednotlivých přípravků se různí, specificky ty na bázi derivátu celulózy vykazují ve srovnání s polyvinylpyrolidonem (PVP) a polyvinylalkoholem (PVA) prodlouženou odolnost v slzném filmu [3].

2. 3. 1 Umělé slzy

Jak uvádí Kuchynka a kol. [3, s. 200], „*umělé slzy jsou deriváty celulózy (preparáty Lacrisyn, Tears Naturelle II, Refresh, Artelac AC, Hypromelóza P), polyvinylpyrolidonu (preparáty Arufil, HypoTears Plus, HypoTears Plus SDU) a polyvinylalkoholu (preparát Siccaprotect)*.“ Štrofová [20] doplňuje, že umělé slzy by měly obsahovat také draselné ionty, bikarbonát a polyethylenglykol či propylenglykol, přičemž deriváty celulózy „*mají prodlouženou odolnost v slzném filmu a jsou výborným lubrikanciem*“ [20, s. 37], je však nutné dbát na pravidelnost aplikace. Stejně tak je důležitou složkou umělých slz kyselina hyaluronová, která „*má cytoprotektivní účinky,*

podporuje tvorbu hemidesmozomů v rohovkovém epitelu a podporuje integritu povrchu rohovky tvorbou specifických ligandů účinných zvláště při zánětu rohovky“ [20, s. 37].

Vzhledem k tomu, že suché oko, popř. syndrom suchého oka souvisí s narušením slzného filmu, je třeba výběr konkrétního léčiva přizpůsobit také tomu, která jeho vrstva je narušena, resp. s jakou jeho vrstvou má pacient obtíže.

- **Narušená lipidová vrstva**

V případě, že je narušena tuková vrstva slzného filmu, pacienti pociťují obtíže ihned po ránu. „*Porucha tukové složky slzného filmu obvykle znamená nepříjemné pocity 'cizího tělesa' hned po probuzení, oči se otevírají s bolestivým trhnutím a po nakapání zvlhčujících očních kapek problém během dne odeznívá“ [22, s. 28]. Konkrétně tento problém postihuje především starší populaci (a častěji ženy), jedná se totiž obvykle o důsledek změn vývodu Meibonských žláz, jež souvisí s přibývajícím věkem. Kromě toho ale na lipidovou vrstvu mohou negativně působit také vnější faktory, např. užívání digitálních médií, resp. z toho plynoucí snížená četnost mrkání, či užívání kontaktních čoček [3]. V tomto případě jsou tedy vhodné oční kapky s obsahem fosfolipidů a minerálních olejů.*

- **Narušená vodná a mucinová vrstva**

Pokud se pocit suchého oka zhoršuje v průběhu dne (např. v souvislosti s pobytem v uměle klimatizované či osvětlené místnosti apod.), pravděpodobnou příčinou je narušení vodné či mukózní složky slzného filmu, resp. nedostatek slz. Tento problém se pak týká i populace mladší, a to v důsledku životního stylu [22].

Je-li narušena vodná vrstva, samozřejmě je třeba provést externí zvlhčení – a za tímto účelem jsou hojně využívány právě přípravky obsahující kyselinu hyaluronovou, tedy „*mukopolysacharidový komplex, který zajišťuje stabilní vrstvy slzného filmu,*“ [3, s. 200]. Molekuly kyseliny hyaluronové jsou schopné vázat na sebe velké množství vody a zajišťují tak nutnou viskozitu. Její míra se však samozřejmě odvíjí od toho, v jaké koncentraci je kyselina hyaluronová obsažena. Čím více hyaluronátu je užito, tím vyšší je viskozita, kdy např. oční kapky s 0,1 % hyaluronátu jsou určeny spíše pro méně závažné případy (tedy mírně až středně suché oči), zatímco ty s koncentrací 0,2 % hyaluronátu již vykazují vyšší viskozitu, na povrchu oka zůstávají delší dobu a jsou vhodné i pro léčbu těžších forem suchého oka [23]. Kyselina hyaluronová pak bývá

v kapkách doplňována karboxymethylcelulózou, čímž je zvlhčující účinek ještě více podpořen, příp. jsou umělé slzy se zvlhčujícím účinkem utvářeny na bázi CMC a glycerinu [22].

Jelikož je ale slzný film tvořen trojicí vrstev, samozřejmě by nejvhodnějším léčivem byly kapky takové, které by dokázaly komplexně obnovit fyziologii celého slzného filmu. A právě na takovém přípravku již pracují i čeští vědci ve spolupráci s již zmiňovanou společností Contipro. Snaží se tedy společně vyvinout jediný polymer, který by dokázal nahradit všechny vlastnosti slzného filmu, přičemž tento polymer je utvořen právě na bázi kyseliny hyaluronové. „*Vyvíjený derivát kyseliny hyaluronové bude navíc schopen lépe vázat mucin, protein, který zabraňuje osychání povrchu oka,*“ shrnula pak výzkumná pracovnice Contipro [24].

PRAKTICKÁ ČÁST

3 Možnosti zvyšování viskozity hyaluronanu

Viskozita je jednou z klíčových vlastností hyaluronanu a také zásadním aspektem pro léčbu suchého oka. Právě viskozita také úzce souvisí s mírou účinku konkrétního očního přípravku. Platí také, že čím vyšší viskozitu oční přípravek vykazuje, tím delší dobu dokáže ulpět na rohovce a pozitivně na ni působit. Jelikož užití vysokomolekulární kyseliny hyaluronové je ale relativně nákladné, je žádoucí zaměřit se na alternativní způsoby zvyšování viskozity hyaluronanu a snižování koncentrace kyseliny hyaluronové tak, aby vznikla nízkomolekulární kyselina hyaluronová, která je levnější a pro výrobu očních kapek de facto efektivnější.

Praktická část práce se proto zaměřila na možnosti zvýšení viskozity hyaluronanu, a to na příkladu různě modifikovaných roztoků CMC a HA, kdy bylo zjišťováno, jak se tyto látky vážou na kyselinu laurovou. Pro měření stupně disociace byla využita dvojice tzv. strukturních analýz, tedy NMR spektrometrie a IČ spektrometrie. Záměrem pak bylo také zodpovědět výzkumnou otázku, zda lze zvýšit viskozitu hyaluronanu pomocí derivátů kyseliny laurové snížením obsahu HA a CMC.

3. 1 Metodika – použité experimentální metody

Aby bylo možné provést specializovaná měření vzorků, bylo třeba tyto vzorky náležitě připravit. Tento proces přípravy zachycuje experimentální část (viz dále). K vlastnímu měření toho, zda vzorky po různých typech úprav vykazaly vyšší viskozitu, pak posloužila dvojice metod, a to nukleární magnetická rezonance (NMR) a infračervená spektrometrie (IČ).

Měřené vzorky CMC a HA byly připraveny v laboratořích firmy Contipro, kde autorka práce v roce 2020 během července a srpna absolvovala letní stáž. Celá spolupráce probíhala na pracovišti vývojové skupiny nano nosičů, a to pod vedením Glorie Huerty Angeles, PhD. Ve společnosti Contipro pak proběhlo také měření NMR, přičemž pracovníci Contipro kromě možnosti využití jejich laboratoří a přístrojů, navíc poskytli i své interní materiály, které byly v rámci praktické části bakalářské práce také využity. Měření IČ bylo po domluvě a vzhledem k modernějšímu vybavení realizováno v laboratořích univerzity Pardubice pod vedením doc. Boušky.

3. 1. 1 NMR spektrometrie

Nukleární magnetická rezonance je spektroskopická metoda zaměřující se na energetické přechody atomových jader nacházejících se v molekulách, kdy lze díky sledování absorpce radiofrekvenčního záření inkriminovaným vzorkem, který je umístěn do silného magnetického pole, zachytit informace o struktuře látky, jež je zkoumána. NMR spektrometrie je tedy zaměřena na chování atomového jádra umístěného v magnetickém poli.

V souvislosti s atomovým jádrem je však třeba říci, že ne každé je pro NMR spektrometrii vhodné – to, zda je možné tuto metodu aplikovat, pak vychází ze skutečnosti, jaká je hodnota tzv. jaderného spinu. Ta je tvořena součtem spinů všech částic, které jádro obsahuje (kdy v základu se jedná o kladně nabitě protony a neutrální neutrony, přičemž každá z těchto částí má svůj vlastní směr rotačního pohybu, tedy právě spin, jehož hodnota může činit $+1/2$ nebo $-1/2$). Aby bylo měření proveditelné, jsou tedy nejvhodnější jádra, jejichž spin se pohybuje na hodnotě $1/2$ [25].

Samotná měření metodou NMR jsou pak prováděna tak, že „*vzorek studované látky se vloží do homogenního magnetického pole o známé konstantní indukci. V kolmém směru se nechá procházet radiofrekvenční záření, které svou energií odpovídá spinovým přechodům jader a jehož frekvence je plynule měněna, a hledá se taková frekvence, při níž dochází k absorpci*“ [25, s. 77]. Metoda je využívána nejen ke sledování průběhů různých reakcí, ověřování struktury produktů, ke studiu tkání a orgánů, ale samozřejmě také k určování struktury sloučenin.

V případě bakalářské práce byla NMR spektra studovaných sloučenin měřena v deuterovaném benzenu a chloroformu při laboratorní teplotě na přístroji Bruker Avance 500 vybaveném 5mm širokopásmovou sondou se Z-gradientem v pulzním módu s využitím Fourierovy transformace. ^1H NMR spektra byla měřena při frekvenci 500,13 MHz. Hodnoty ^1H chemických posunů byly vztaženy ke standardu Me_4Si ($\delta = 0,00$ ppm).

3. 1. 2 Infračervená spektrometrie

Metody infračervené spektrometrie jsou užívány v organické i anorganické chemii k analýze (např. z hlediska složení) koncentrace složek, ke zjištění stavu polymeračního stupně apod., tedy k zachycení informací o molekulární struktuře látky. Prostřednictvím

infračervené spektrometrie je tak možné určit např. koncentraci a obsah vlhkosti, aditiv, nečistot apod. [26]. Podstatou metody je „interakce mikročástic (molekul) tvořících makroskopický vzorek s infračerveným zářením“ [26, s. 84].

Infračervená spektroskopie je pak klasifikována s ohledem na vlnové délky záření (kdy infračerveným zářením je elektromagnetické záření s rozsahem vlnočtů od $12\,500\text{ cm}^{-1}$ do 10 cm^{-1} při vlnových délkách od 800 nm do 0,5 mm), a to do trojice kategorií: daleké (FIM), střední (MIR) a blízké (NIR). V případě určování chemických struktur je pak dominantně užívána střední infračervená oblast s vlnočtem přibližně v hodnotách od 4000 cm^{-1} do 400 cm^{-1} a s vlnovou délkou od 2,2 μm do 25 μm).

Co se samotného principu metody týká, pracuje s absorpcí infračerveného záření během průchodu vzorkem – v rámci tohoto procesu totiž dochází ke změně rotačně vibračního energetického stavu molekul vzhledem k tomu, jak se změní jejich dipólový moment [27]. „Odpovídá-li vlnová délka infračerveného záření charakteristické energii konkrétní vazby v molekulách vzorku, je toto záření molekulami vzorku absorbováno. Množství absorbovaného záření je úměrné množství absorbující látky a je definováno jako dekadický logaritmus podílu intenzity záření vycházejícího ze zdroje a intenzity záření, které prošlo vzorkem“ [27, s. 30]. Podobným způsobem je pak možné zachycovat také míru záření, jež absorbováno nebylo (a tehdy se jedná o tzv. transmitanci). Zjištěné infračervené spektrum tak zachycuje závislost absorpance nebo transmitance na vlnočtem stanovené energii infračerveného záření [27].

IČ spektra studovaných sloučenin byla měřena na zařízení Vertex V70 s ATR nástavcem ve spektrálním rozsahu $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ s rozlišením 4 cm^{-1} . Před tím, než bylo provedeno samostatné NMR a IČ měření, bylo třeba vzorky k vlastní analýze připravit.

3. 1. 3 Použité chemikálie

V rámci experimentální části práce byla využita řada chemikálií, jejich přehled včetně užitých šarží poskytuje Tabulka 1 na následující straně.

Tabulka 1: Přehled užitých chemikálií a jejich šarží

Látka	Šarže
HA	HY SILK 030317 E1
CMC	MKBN 8635 V
Kyselina laurová	S 757 9633 829
TEA	2202 1608 16 Z
DMAP	S 6946 999 449
BC	S 688 9704 429
THF	2401 180 119
NaCl	-

Zdroj: vlastní

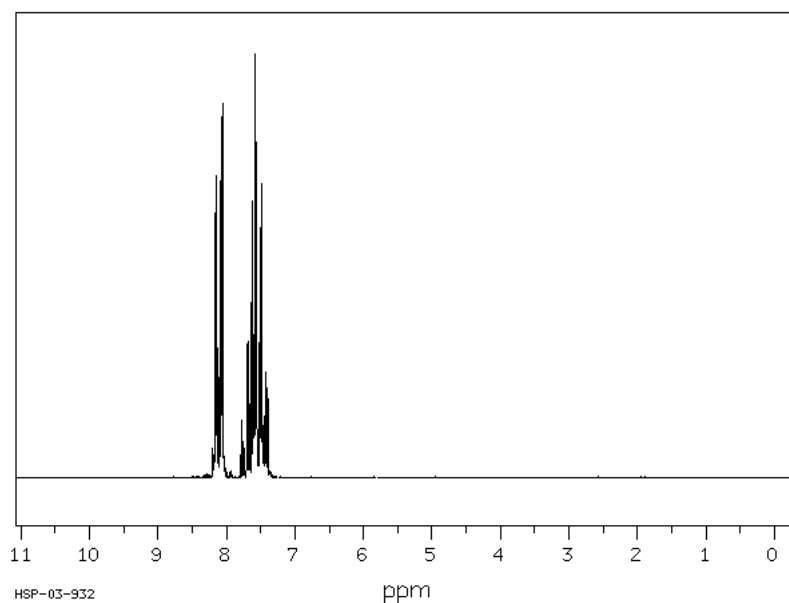
3. 2 Příprava vzorků k analýze

Příprava vzorků k analýze byla zahájena aktivací kyseliny laurové, potažmo zjišťováním, které činidlo je pro tento proces nejvhodnější. Následně byly připraveny roztoky.

- *Aktivace kyseliny laurové*

Aby bylo možné měřit případné zvýšení viskozity připravených vzorků, bylo v prvním kroku třeba aktivovat kyselinu laurovou, a to jejím rozpuštěním v činidlech – za účelem zajištění jejího rozpuštění co nejrychleji a nejefektivněji byla testována rozpouštědla 1,1'-karbonyldiimidazol (CDI) a benzoylchlorid (BC). Pomocí NMR spektrometrie bylo tedy zjišťováno, které ze zvolených rozpouštědel bude pro aktivaci kyseliny laurové nejvhodnější.

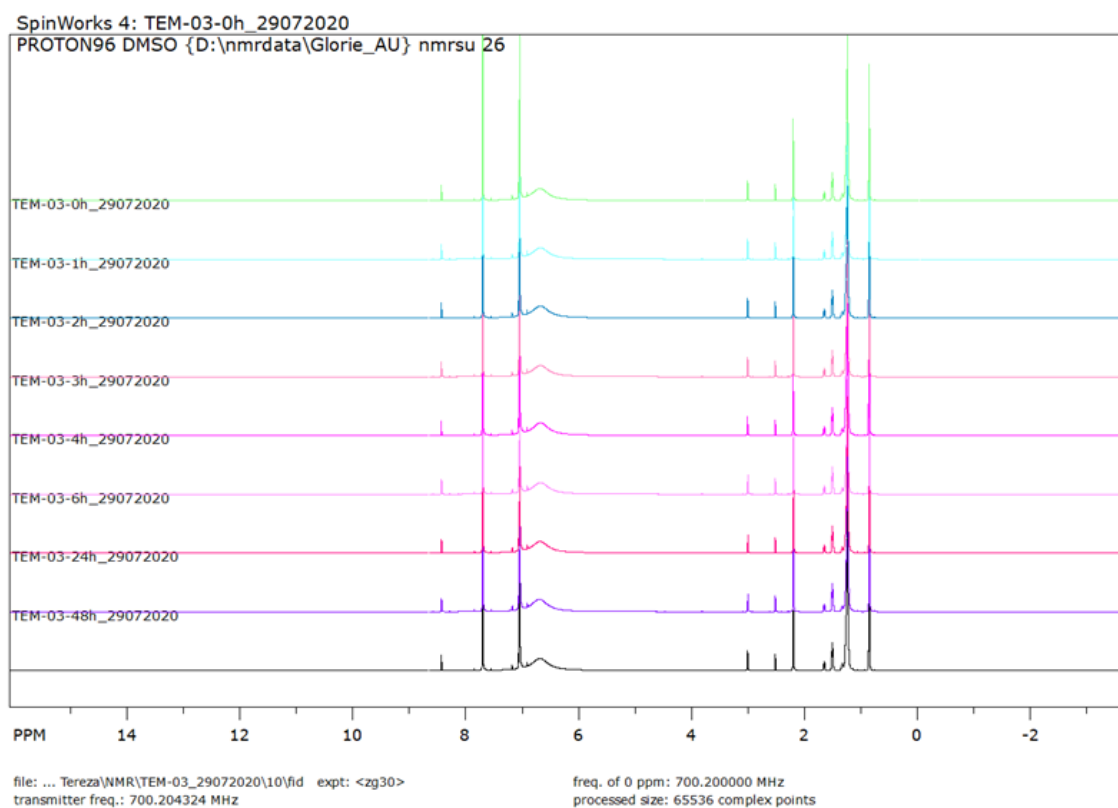
Pracováno bylo také s tím, jak podobu NMR spektra pro BC uvádějí i některé odborné publikace, to, s nímž pracují v Contipro, je znázorněno na následujícím Obrázku 5. Aktivace kyseliny byla pro jistotu přesnosti prováděna několikrát, a to po 1 h, po 2, 3, 4, 6, 24 a 48 hodinách.



Obrázek 5: NMR BC

Zdroj: Interní materiály Contipro

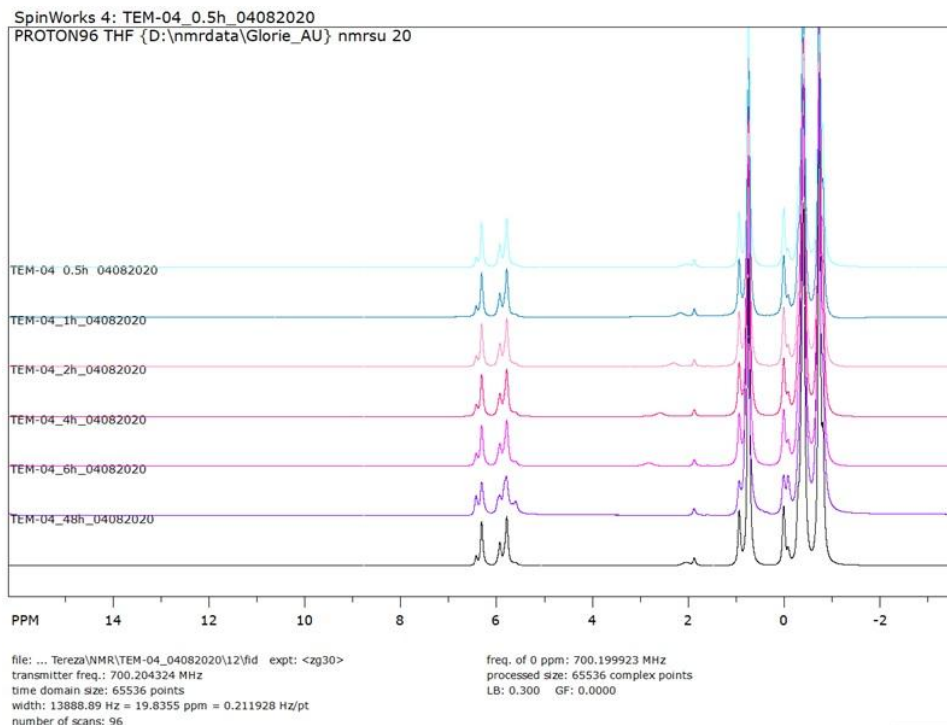
Jak potom naznačuje následující Obrázek 6, BC se ukázalo jako vhodné činidlo, jehož rozmezí peaků odpovídá i obrázku předešlému, s nímž pracují v Contipro.



Obrázek 6: Vzorek TEM – 03, NMR spektrometrie, činidlo BC

Zdroj: Vlastní šetření/Contipro

Naopak aktivační činidlo CDI se (ačkoliv aktivace kyseliny proběhla) v rámci měření ukázalo jako neefektivní, a proto nebyly v časových intervalech pozorovány žádné změny, což je patrné na Obrázku 7 zachycujícím vzorek TEM – 04.



Obrázek 7: Vzorek TEM – 04, NMR spektrometrie, činidlo CDI

Zdroj: Vlastní šetření/Contipro

V průběhu aktivace kyseliny laurové byly paralelně připravovány také roztoky CMC a HA. Následně byly smícháním vytvořeny roztoky kyseliny laurové a CMC a také kyseliny laurové a HA a vytvořeny příslušné vzorky. Aktivace těchto vzorků již byla prováděna pouze pomocí činidla BC.

Poté, co bylo zvoleno nejvhodnější činidlo, bylo přistoupeno k přípravě roztoků (jak CMC, tak i HA), aktivaci kyseliny laurové za užití BC a nakonec byly připraveny roztoky CMC a kyseliny laurové a HA a kyseliny laurové – postupy byly totožné.

- **Příprava roztoků CMC a HA**

A1) Příprava roztoku CMC

V případě práce s roztokem CMC byl v 50ml destilační baňce rozpuštěn 1 g CMC ve 20 ml demi vody. Do roztoku bylo přidáno 10 ml THF, 1,730 ml TEA a 25 mg DMAP

(rozpuštěno v 0,5 ml demi H₂O v mikrozkušavce). Roztok CMC byl míchán během aktivace kyseliny laurové na magnetické míchače s magnetickým míchadlem.

A2) Aktivace kyseliny laurové (s činidlem BC)

Za účelem aktivace kyseliny bylo ve 25ml destilační baňce v 10 ml THF rozpuštěno 828 mg kyseliny laurové. Následně bylo do roztoku přidáno 1,730 ml TEA a nakonec 0,480 ml BC. Aktivace roztoku kyseliny laurové pomocí BC pak trvala 30 min při RT.

A3) Příprava roztoku CMC a kyseliny laurové

Roztok aktivované kyseliny laurové byl následně přimísen do roztoku CMC (a proveden výplach nádoby pomocí 1 ml THF). Vlastní reakce probíhala při RT. Během reakce byly provedeny 4 odběry (po 1,5 h, 3 h, 5 h a 24 h) 10 ml reakční směsi, z níž byly jednotlivě izolovány a purifikovány produkty (viz dále).

Tabulka 2: Látky užití k přípravě roztoku CMC a aktivované kyseliny laurové

TEM – 07	Chemikálie	m [g]	n [mmol]	M [g.mol ⁻¹]	V [ml]	Ekv.	ρ [g.cm ⁻³]
	CMC 250 kDa	1	4,1	242		1	
	Lauric acid	0,828	4,13	200,32		1	
	TEA	1,25	12,4	101,2	1,728	3	0,726
		1,25	12,4	101,2	1,728	3	0,726
	DMAP	0,025	0,21	122,2		0,05	
	BC	0,58	4,13	140,57	0,480	1	1,21
	THF			72,11	10,0		0,889
					10,0		
	H ₂ O reakce			18,0	20		
	NaCl	1,21	20,7	58,44		5	

Zdroj: Contipro

B1) Příprava roztoku HA

Postup v případě HA byl obdobný jako u CMC. V 50ml destilační baňce byl tedy rozpuštěn 1 g HA ve 20 ml demi vody. Do roztoku bylo přidáno 10 ml THF, 1,045 ml TEA a 15 mg DMAP (rozpuštěno v 0,5 ml demi H₂O v malé mikrozkušavce). Roztok HA byl míchán během aktivace kyseliny na magnetické míchače s magnetickým míchadlem.

B2) Aktivace kyseliny laurové (s činidlem BC)

Aktivace kyseliny byla provedena tak, že ve 25ml destilační baňce bylo v 10 ml THF rozpuštěno 501 mg kyseliny laurové. Následně bylo do roztoku přidáno 1,045 ml TEA a nakonec 0,290 ml BC. Celý proces aktivace roztoku trval 30 min při RT.

B3) Příprava roztoku HA a kyseliny laurové

Roztok aktivované kyseliny byl přimísen do roztoku HA (výplach nádoby 1 ml THF). Reakce probíhala při RT a během ní byly provedeny 4 odběry (po 1,5 h, 3 h, 5 h a 24 h) 10 ml reakční směsi, z nichž byly jednotlivě izolovány a purifikovány produkty (viz dále).

Tabulka 3: Látky užití k přípravě roztoku HA a aktivované kyseliny laurové

TEM – 08	Chemikálie	m [g]	n [mmol]	M [g.mol ⁻¹]	V [ml]	Ekv.	ρ [g.cm ⁻³]
	HA 270kDa	1	2,5	400		1	
	Lauric acid	0,501	2,50	200,32		1	
	TEA	0,76	7,5	101,2	1,045	3	0,726
		0,76	7,5	101,2	1,045	3	0,726
	DMAP	0,015	0,13	122,2		0,05	
	BC	0,35	2,50	140,57	0,290	1	1,21
	THF			72,11	10,0 10,0		0,889
	H ₂ O reakce			18,0	20		
	NaCl	0,73	12,5	58,44		5	

Zdroj: Contipro

- **Optimalizace reakčních podmínek**

Jelikož s vyšším ekvivalentem kyseliny laurové klesá její rozpustnost, čímž dochází ke snižování viskozity, byla pozornost zaměřena na sledování jejích ekvivalentů, jež byly měněny (stejně jako navážka BC). Zkoumáno bylo, k čemu dojde, je-li prostředí změněno, a to s cílem zjistit vhodný stupeň substituce CMC či HA kyselinou laurovou. Za účelem určení vhodného stupně substituce byly tedy sledovány vhodné ekvivalenty kyseliny laurové.

1. Roztok CMC

V 50ml destilační baňce byla rozpuštěna CMC v demi vodě za pomoci magnetického míchadla o velikosti 2 cm. Do roztoku CMC bylo dále přidáno: THF, TEA a nakonec DMAP (předem rozpuštěn v eppendorfci v 0,5 ml demi vody). Roztok CMC byl míchán během aktivace kyseliny laurové.

Kyselina byla aktivována tak, že ve 25ml destilační baňce byla rozpuštěna kyselina laurová v THF. Následně bylo do roztoku přidáno TEA a BC, vlastní aktivace probíhala 30 min při RT. Roztok aktivované kyseliny byl přimísen do roztoku CMC a reakce probíhala 1,5 h při RT. Tabulky 4, 5, 6 a 7 pak ukazují, jak byl změněn ekvivalentní podíl kyseliny laurové a zachycují výchozí situaci pro jednotlivá NMR měření, která byla po každé změně ekvivalentního množství kyseliny laurové provedena tak, aby byla zjištěna příslušná míra navázání CMC a HA.

Tabulka 3 zachycuje výchozí situaci pro NMR měření vzorku s ekvivalentním množstvím kyseliny laurové o hodnotě 0,5.

Tabulka 4: Optimalizace reakčních podmínek změnou ekvivalentu kyseliny laurové; 0,5

Chemikálie	m [g]	n [mmol]	M [g.mol ⁻¹]	V [ml]	Ekv.	ρ [g.cm ⁻³]
CMC 250 kDa	1	4,1	242		1	
Lauric acid	0,415	2,07	200,32		0,5	
TEA	1,25	12,4	101,2	1,728	3	0,726
	1,25	12,4	101,2	1,728	3	0,726
DMAP	0,025	0,21	122,2		0,05	
BC	0,29	2,07	140,57	0,240	0,5	1,21
THF			72,11	10,0		0,889
				10,0		
H ₂ O reakce			18,0	20		
NaCl	1,21	20,7	58,44		5	

Zdroj: Vlastní výzkum/Contipro

V případě NMR měření za těchto podmínek bylo navázání CMC a HA zjištěno, stejně jako v případě NMR měření za situace (tu zachycuje následující Tabulka 5), kdy ekvivalentní množství kyseliny laurové mělo hodnotu 0,75.

Tabulka 5: Optimalizace reakčních podmínek změnou ekvivalentu kyseliny laurové; 0,75

Chemikálie	m [g]	n [mmol]	M [g.mol ⁻¹]	V [ml]	Ekv.	ρ [g.cm ⁻³]
CMC 250 kDa	1	4,1	242		1	
Lauric acid	0,621	3,10	200,32		0,75	
TEA	1,25	12,4	101,2	1,728	3	0,726
	1,25	12,4	101,2	1,728	3	0,726
DMAP	0,025	0,21	122,2		0,05	
BC	0,44	3,10	140,57	0,360	0,75	1,21
THF			72,11	10,0		0,889
				10,0		
H ₂ O reakce			18,0	20		
NaCl	1,21	20,7	58,44		5	

Zdroj: Vlastní výzkum/Contipro

V případě, kdy byl ekvivalent kyseliny laurové navýšen na hodnotu 1, což zachycuje Tabulka 6, již dle provedeného NMR měření navázání HA, resp. CMC, probíhalo hůře.

Tabulka 6: Optimalizace reakčních podmínek změnou ekvivalentu kyseliny laurové; 1

Chemikálie	m [g]	n [mmol]	M [g.mol ⁻¹]	V [ml]	Ekv.	ρ [g.cm ⁻³]
CMC 250 kDa	1	4,1	242		1	
Lauric acid	0,828	4,13	200,32		1	
TEA	1,25	12,4	101,2	1,728	3	0,726
	1,25	12,4	101,2	1,728	3	0,726
DMAP	0,025	0,21	122,2		0,05	
BC	0,58	4,13	140,57	0,480	1	1,21
THF			72,11	10,0		0,889
				10,0		
H ₂ O reakce			18,0	20		
NaCl	1,21	20,7	58,44		5	

Zdroj: Vlastní výzkum/Contipro

Tabulka 7 pak ukazuje změnu ekvivalentu na nejvyšší možnou hodnotu, a to hodnotu 2, v tomto případě však již nebylo navázání CMC a HA na kyselinu laurovou nijak patrné.

Tabulka 7: Optimalizace reakčních podmínek změnou ekvivalentu kyseliny laurové; 2

Chemikálie	m [g]	n [mmol]	M [g.mol ⁻¹]	V [ml]	Ekv.	ρ [g.cm ⁻³]
CMC 250 kDa	1	4,1	242		1	
Lauric acid	1,655	8,26	200,32		2	
TEA	1,25	12,4	101,2	1,728	3	0,726
	1,25	12,4	101,2	1,728	3	0,726
DMAP	0,025	0,21	122,2		0,05	
BC	1,16	8,26	140,57	0,960	2	1,21
THF			72,11	10,0		0,889
				10,0		
H ₂ O reakce			18,0	20		
NaCl	1,21	20,7	58,44		5	

Zdroj: Vlastní výzkum/Contipro

Po provedené optimalizaci reakčních podmínek lze shrnout, že nejlepším ekvivalentním množstvím kyseliny laurové bylo 0,5. Zkoumáním bylo zjištěno, že navázání HA resp. CMC na kyselinu laurovou s ekvivalentem 2 neprobíhalo už takřka vůbec. Bylo by tak možné tvrdit, že změna ekvivalentu měla vzhledem k navázání CMC a HA lineární průběh, kdy nejlepší výsledky vykázal vzorek s ekvivalentem kyseliny laurové o hodnotě 0,5, zatímco navázání CMC a HA v případě ekvivalentu kyseliny laurové s hodnotou 2 již nebylo vůbec patrné.

Jelikož byly připravené vzorky příliš vlhké na další měření NMR, následovala izolace produktu, tedy srážení/purifikace a sušení/lyofilizace.

- ***Izolace produktu***

Za účelem izolace CMC a HA byla nejprve zvolena metoda srážení (tzv. purifikace). V tomto případě bylo postupováno v souladu s metodikou užívanou společností Contipro. Ta pracuje s trojicí kroků:

- 1) Několikanásobné proplachování pomocí 100% IPA, kdy jsou vzorky zbavovány vody.
- 2) Užití IPA s 85% koncentrací za účelem čištění produktu od nečistot.

V rámci obou těchto kroků dochází také ke kombinování postupu s centrifugací, tedy oddělování suspenze od vody.

- 3) Sušení v horkovzdušné sušárně při 40° C s cílem odstranit IPA (Contipro, interní materiály).

Vlastní srážení produktu pak probíhalo v případě CMC pomocí předem připraveného roztoku 0,36 g NaCl v 1,5 ml demí vody a 100 ml 100% IPA za vzniku kalného roztoku, kde se vysrážela CMC. V případě HA byla situace tatáž, přičemž v kalném roztoku se vysrážela HA.

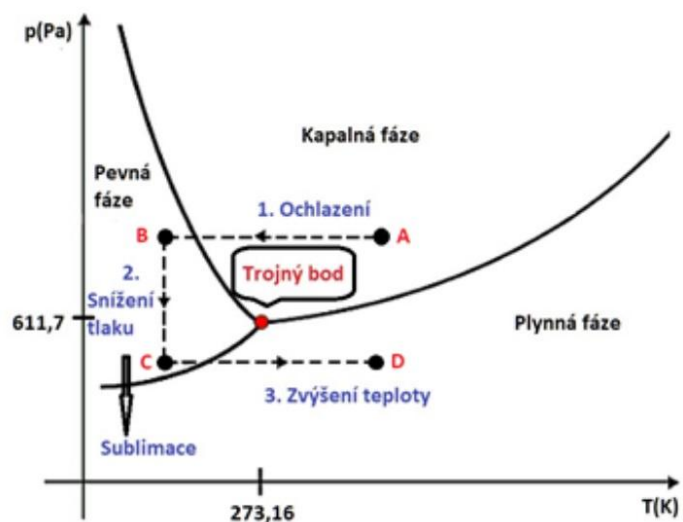


Obrázek 8: Užívané centrifugační zkumavky

Zdroj: Vlastní šetření

Purifikace produktu probíhala v několika krocích, kdy docházelo k opakovanému promývání různě koncentrovaným isopropanolem, a to buď 100% nebo 85% (užíváno bylo zařízení Turrax). K tomuto bylo přistoupeno kvůli oddělení suspenze od vody (tj. aby vzorky byly před vlastním sušením zbaveny co největšího množství vody). Nejdříve bylo promýváno 85% roztokem ve čtyřech po sobě jdoucích krocích a následně, na dosušení, třikrát 100% isopropanolem. Objemy roztoků se neměnily, vždy bylo použito 100 ml. Samotné sušení výsledného produktu probíhalo v horkovzdušné sušárně při teplotě 40 °C. Bohužel tento způsob byl nedostatečný, a tak následovala lyofilizace vzorků.

Lyofilizace je velmi vhodnou metodou k izolaci produktu, jež je využívána k sušení vlhkých materiálů, základní princip pak pracuje s vakuovým sublimačním sušením. Lyofilizace je „procesem odvodňování preparátů v zamrzlém stavu, kdy led uvnitř kapilár a pórů materiálu sublimuje do g-gáze při T a p nižším, než jsou podmínky odpovídající tzv. trojnému bodu vody“ [28, s. 3]. Samotná lyofilizace pak probíhá ve třech na sobě navazujících krocích (vše zachycuje Obrázek 9, Fázový diagram vody), v první fázi dochází k zamrazení a tvorbě pevné fáze, ve fázi druhé probíhá sušení, kdy je zároveň snížen tlak a probíhá sublimace ledu, tedy odstranění nevázané vody, a to více jak jejích 95 %. Poslední – třetí – fáze pak čítá finální sušení zahrnující zahřívání, další snížení tlaku, desorpci vázané vody a odstranění celkové vody až z 99,9 % [29].



Obrázek 9: Fázový diagram vody
Zdroj: [29]

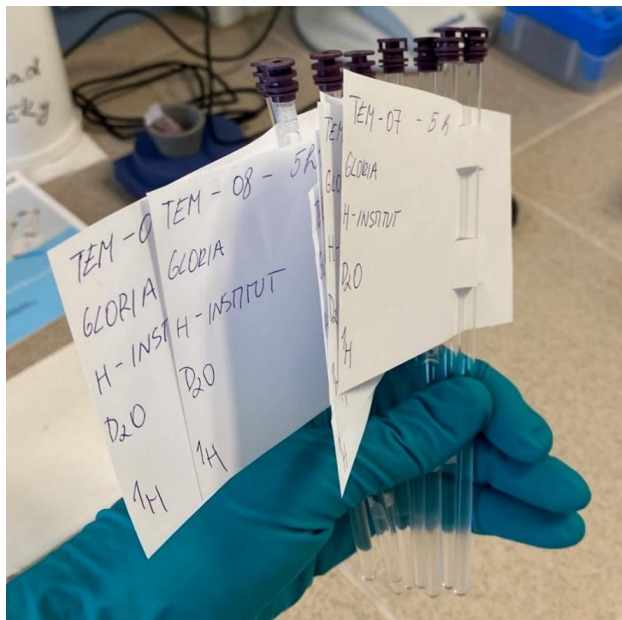
Po vysušení produktu v sušárně bylo tedy ze vzorku odebráno přibližně 100 mg a následně rozpuštěno ve 20 ml demi vody v lékovce s uzávěrem. Po rozmíchání byl roztok převeden na Petriho misku a zamražen po dobu 24 hod. Poté už následovala samotná lyofilizace na lyofilizátoru, a tak došlo k zbavení se všech zbytkových rozpouštědel. Vzorky po lyofilizaci zachycuje Obrázek 10.



Obrázek 10: Vzorky po lyofilizaci
Zdroj: Vlastní šetření

- **Příprava roztoků a vzorků pro měření NMR**

Na NMR měření bylo použito 5–7 mg vzorku (po usušení v sušárně nebo po lyofilizaci) a smícháno s 800 μ l D_2O , což zachycuje následující Obrázek 11.



Obrázek 11: Používané kyvety pro NMR měření

Zdroj: Vlastní šetření

- **Příprava roztoků a vzorků pro měření IČ**

Pro měření IČ byl roztok CMC a HA připraven stejně jako na měření NMR.

3.3 Vyhodnocení dat

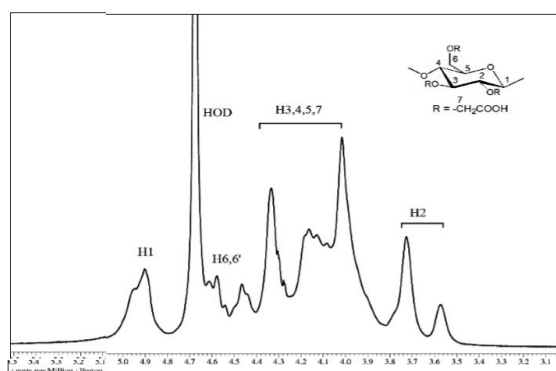
V rámci měření NMR a IČ bylo cílem zjistit, jestli ve sledovaných modifikovaných vzorcích jsou amfifilní deriváty kyseliny laurové, tedy CMC a HA, obsaženy ve vyšší míře než v případě samotné CMC a HA.

V rámci experimentální části práce byly tedy připraveny amfifilní deriváty kyseliny laurové (CMC a HA). Na těchto derivátech byl zjišťován stupeň substituce (DS) kyseliny laurové do hyaluronové a karboxymethylcelulózy, který byl zjišťován pomocí 1H NMR spektrometrie a pomocí IČ spektrometrie.

Se zvyšujícím se podílem navazované sloučeniny vzrůstal i stupeň navázání, a to lineárně. Bylo také zjištěno, že optimalizací reakčních podmínek vykazuje nejlepší výsledek vzorek s 0,5 ekvivalentem kyseliny laurové.

- **NMR spektrometrie – výsledky**

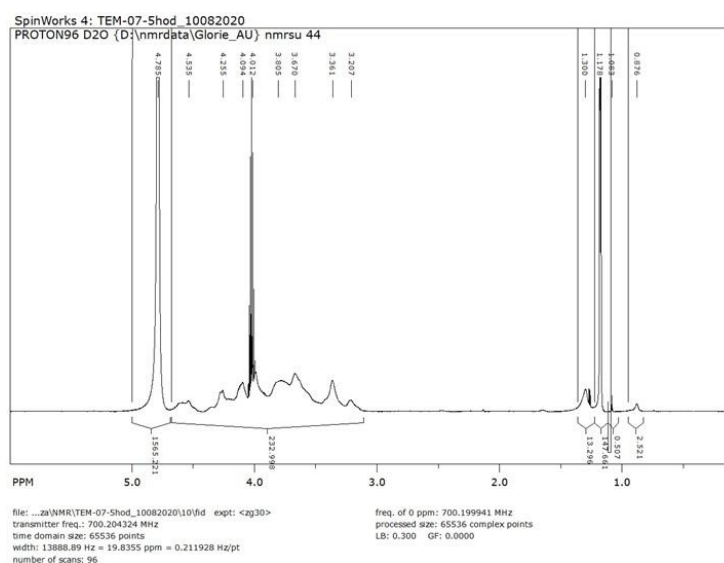
Jako výchozí pro zhodnocení výsledků bylo využito znázornění části NMR spektra kyseliny hyaluronové bez aditiv, které zachycuje Obrázek 12.



Obrázek 12: NMR spektrum pro HA

Zdroj: Contipro

V připravených a měřených vzorcích se peak sice zobrazuje, ale vzhledem k širokým signálům ostatních funkčních skupin je poměrně zanedbatelný. Obrázek 13 pak zachycuje NMR pro HA v D₂O – a je patrné, že HA se ve vzorku nachází (platí i pro všechny ostatní NMR spektra)



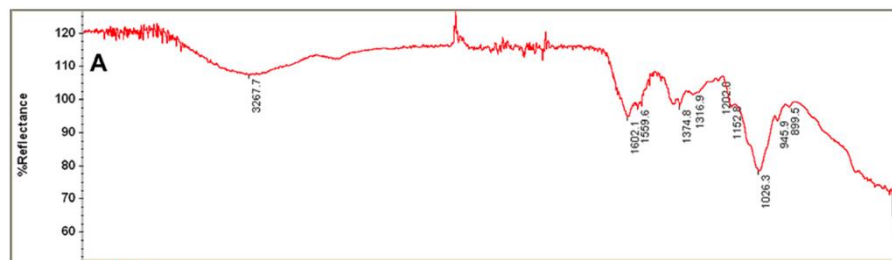
Obrázek 13: NMR pro HA v D₂O

Zdroj: Vlastní šetření

NMR měření probíhalo opakovaně ve sledu několika hodin (v intervalech 1,5; 3; 5; 7 a 24 hodin), a to z toho důvodu, aby případně chybné měření nemělo vliv na další průběh zkoumání, a také proto, aby bylo možné provést vzájemná srovnání. Ačkoliv byly v NMR spektrech široké signály, přítomnost látek HA a CMC se ve vzorcích (ač v minimální míře) projevila.

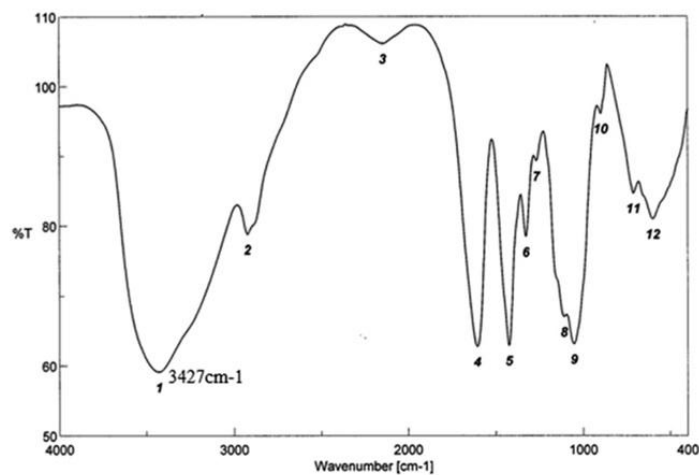
- **IČ výsledky**

Cílem měření infračervených spekter bylo zjistit, zda připravené vzorky obsahují HA, respektive CMC. Naměřená spektra byla porovnávána se spektry nalezenými v odborné literatuře, tedy následujícímu Obrázku 14 (pro HA) a 15 (pro CMC)



Obrázek 14: IČ spektrum HA

Zdroj: [30, s. 320]



Obrázek 15: IČ spektrum CMC

Zdroj: [31, s. 103039]

Měření vlastních vzorků pak zachycují obrázky následující. Obrázek 16 se vztahuje ke vzorku obsahujícímu HA. Infračervená spektra byla měřena na ATR nástavci a

zobrazují závislost absorbance na vlnočtu (což platí i pro obrázek týkající se CMC). V případě zkoumaného vzorku je patrné, že se HA ve vzorku objevuje.



Obrázek 16: IČ, modifikovaná HA

Zdroj: Vlastní šetření

Ve druhém případě byl IČ spektrometrii podroben vzorek CMC, kdy v IČ spektru byly nalezeny charakteristické pásy CMC.



Obrázek 17: IČ, modifikovaná CMC

Zdroj: Vlastní šetření

Samotná modifikace HA a CMC však není příliš patrná.

- **Stupe substituce (DS)**

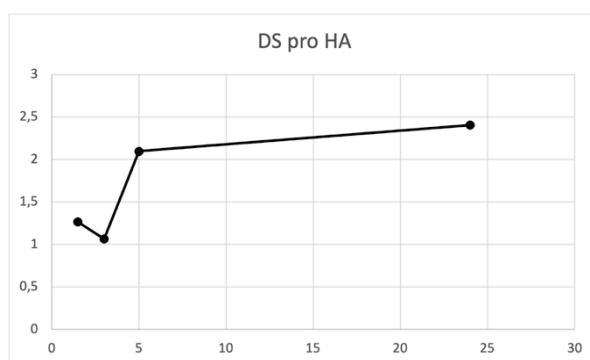
Jak je zřejmé z Tabulky 8, u HA došlo po 3 hod. k chybě stanovení, a proto při prováděném měření nedošlo k lineárnímu průběhu stupně substituce za současného vzrůstu času. U CMC došlo pro změnu k chybě po 5. hodině, kdy nedocházelo k snížení DS lineárně, jak by tomu správně mělo být.

Tabulka 8: Stupeň substituce CMC a HA

Vzorky po lyofilizaci	CMC - DS% (TEM - 07)	HA - DS% (TEM - 08)
1,5 hod	2,906	1,265
3 hod	1,793	1,063
5 hod	2,228	2,096
24 hod	1,156	2,402

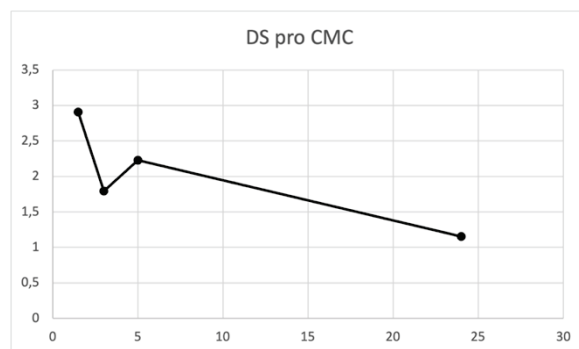
Zdroj: Vlastní šetření/Contipro

Výše řečené pak zachycuje také dvojice následujících grafů, z nichž je patrné, že ani u HA a ani u CMC nedocházelo k lineárnímu vzestupu a sestupu.



Graf 1: DS pro HA

Zdroj: Vlastní šetření



Graf 2: DS pro CMC

Zdroj: Vlastní šetření

Navázání HA a CMC do kyseliny laurové nelze považovat za zcela úspěšné, jak je patrné z obou grafů výše, nedocházelo k lineárnímu průběhu substituce, v určité chvíli došlo k chybě měření.

ZÁVĚR

Protože obtíže týkající se zraku jsou vzhledem k dnešní době a životnímu stylu (práce na PC, užívání mobilních telefonů apod.) čím dál více rozšířené, není divu, že medicínský výzkum se soustředí na to, jak očím ulevit. A jelikož řešením únavy očí a také tzv. syndromu suchého oka je jeho zvlhčování za užití očních kapek, zaměřila se bakalářská práce na možnosti zvyšování jejich viskozity, resp. zvyšování viskozity hyaluronanu, který je při výrobě očních kapek využíván, a naopak snížení koncentrace kyseliny hyaluronové, jejíž výroba je mj. také poměrně nákladná. Cílem práce pak bylo zodpovědět výzkumnou otázku: *Lze zvýšit viskozitu hyaluronanu pomocí derivátů kyseliny laurové tím, že snížíme obsah HA a CMC?*

Bakalářská práce byla standardně rozdělena na část teoretickou a praktickou. V rovině teoretické byla pozornost nejprve zaměřena na syndrom suchého oka, byla přiblížena problematika jeho vzniku, a to i s ohledem na slzný film a jeho strukturu. Opominuty pak nebyly ani možnosti léčby suchého oka. Druhá kapitola se již specificky věnovala amfifilním polysacharidům a jejich využití při léčbě suchého oka, přičemž konkrétně byl důraz kladen na kyselinu hyaluronovou (HA) a karboxymethylcelulózu (CMC), jejich chemické charakteristiky, výrobu, biologické vlastnosti a v neposlední řadě také na jejich využití v medicínálních aplikacích. Závěr kapitoly tedy pojednal o léčbě suchého oka právě za užití přípravků obsahujících kyselinu hyaluronovou a CMC.

Vzhledem k vytyčenému cíli se praktická část práce zaměřila na možnosti zvýšení viskozity hyaluronanu, a to na příkladu různě modifikovaných roztoků CMC a HA, kdy bylo zjišťováno, jak se tyto látky vážou na kyselinu laurovou. Hledány tak byly nejvhodnější metody, jak vytvořit levnější a ekonomicky výhodnější deriváty, které by ale splňovaly veškeré parametry jako samostatná kyselina hyaluronová. Strukturní charakterizace byla stanovována pomocí dvojice metod: za užití nukleární magnetické rezonance (NMR), díky níž bylo možné určit stupeň modifikace HA, a také prostřednictvím infračervené spektroskopie, díky které bylo možné stanovit typ nově vzniklé vazby při modifikaci HA.

Na základě měření bylo zjištěno, že NMR a IČ spektra neukazují vhodná data pro praktické využití derivátů hyaluronanu odvozeného od kyseliny laurové. I přesto, že v obou spektrech byly stopy HA a CMC zachyceny, jednalo se pouze o zanedbatelné

množství, což by pro medicínské využití bylo neakceptovatelné. Na výzkumnou otázku je pak tedy možné odpovědět, že viskozitu hyaluronanu pomocí derivátů kyseliny laurové snížením obsahu HA a CMC zvýšit lze, ovšem v rámci provedeného výzkumu byly kýžené změny minimální. Neznamená to však, že by v obecné rovině nebylo možné dosáhnout výsledků s lepšími hodnotami, jež by umožnily i následné medicínské využití.

Literatura a zdroje

- [1] HERDMAN, T. Heather a Shigemi KAMITSURU (eds.). (2020). *Ošetrovatelské diagnózy: definice & klasifikace 2018-2020*, 11. vyd. Praha: Grada. 520 s. ISBN 978-80-271-0710-0.
- [2] PALOS, Michalis (2014). Xeroftalmie. In LUKÁŠ, Karel, ŽÁK, Aleš a kol. *Chorobné znaky a příznaky: Diferenciální diagnostika*. Praha: Grada, s. 694-696. ISBN 978-80-247-5067-5.
- [3] KUCHYNKA, Pavel a kol. (2016). *Oční lékařství*, 2. přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 903 s. ISBN 978-80-247-5079-8.
- [4] ODEHNAL, Milan a Jiří MALEC. Problematika suchého oka. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2013;27(2):61-67.
- [5] SYNEK, Svatopluk a Šárka SKORKOVSKÁ (2014). *Fyziologie oka a vidění*, 2. dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada. 96 s. ISBN 978-80-247-3992-2.
- [6] NEČAS, Jiří, BARTOŠÍKOVÁ, Lenka, BRAUNER, Pavel a Josef KOLÁR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Vet. Med.* 2008;53(8):397-411.
- [7] PAVELKA, Karel a kol. (2005). *Farmakoterapie revmatických onemocnění*. Praha: Grada. 434 s. ISBN 80-247-0459-5.
- [8] SILCOCK, D. (2010). Collagen-based dressings as therapeutic agents for wound healing. In LEWIS, Andrew (ed.). *Drug-Device Combination Products – Delivery Technologies and Applications*. Woodhead Publishing. s. 283-284. ISBN 978-1-84569-470-8.
- [9] BOERIU, Carmen G.; SPRINGER, Jan; KOOY, Floor; BROEK, Lambertus, van den a Gerrit EGGINK. Production Methods for Hyaluronan. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*. 2013;14:1-14. DOI: 10.1155/2013/624967.
- [10] KRAHULEC, Ján a Jana KRAHULCOVÁ. Increase in hyaluronic acid production by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* strain deficient in β -glucuronidase in laboratory conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005;71(4):415- 422. DOI: 10.1007/s00253-005-0173-9.

- [11] CHOI, Sungchul a kol. Purification and biocompatibility of fermented hyaluronic acid for its applications to biomaterials. *Biomaterials Research*. 2014;18(6):1-10. DOI 10.1186/2055-7124-18-6.
- [12] KOTAŠKA, Jan a Tomáš TRČ. Kyselina hyaluronová – charakteristika, její význam a klinická aplikace. *Ortopedie*. 2018; 5:221-225.
- [13] ŠVIHOVEC, Jan a kol. (2018). *Farmakologie*. Praha: Grada. 962 s. ISBN 978-80-247-5558-8.
- [14] GUPTA, Ramesh a kol. Hyaluronic Acid: Molecular Mechanism and Therapeutic Trajectory. *Front. Vet. Sci.* 2019;6:192. DOI: 10.3389/fvets.2019.00192
- [15] BODVIK, Rasmus a kol. Aggregation and Network Formation of Aqueous Methylcellulose and Hydroxypropylmethylcellulose Solutions, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2010;354(1-3):162-171. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2009.09.040.
- [16] SOPUCH, Tomáš a kol. Celulóзовé materiály v ošetřování ran. *Hojení ran*. 2013; 7(2):14-20. ISSN 1802-6400.
- [17] VANDAMME, Erick, De BAETS, Sophie a Alexander STEINBÜCHEL (eds.) (2002). *Biopolymers – Volume 6. Polysaccharides II – Polysaccharides from Eukaryotes*. Weinheim: Wiley-VCH, 644 s. ISBN 978-3527302277.
- [18] BISWAL, Dibyajyoti a R. P. SINGH. Characterisation of carboxymethyl cellulose and polyacrylamide graft copolymer. *Carbohydrate polymers*. 2004;57(4):379-387. DOI: 10.1016/j.carbpol.2004.04.020.
- [19] AGUADO, Roberto a kol. Carboxymethyl celuloze (E466) from orange tree trimmings and rapeseed stalks. *ANQUE International Congress of Chemistry Foods and Beverages*. DOI 10.13140/RG.2.2.34092.51840.
- [20] ŠTROFOVÁ, Helena. Novinky v léčbě suchého oka. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2015;29(1):35-38.
- [21] LÁZNIČKA, Lukáš a Zdeňka ŠKLUBALOVÁ. Přehled očních lékových forem. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2019;33(1):25-27.

- [22] *Trendy v oční optice* [online]. S-presspublishing.cz, 2013, 35 s. [cit. 9. 2. 2022]. Dostupný na: <http://www.s-presspublishing.cz/archiv/trendy_2013.pdf>
- [23] BRAMBOROVÁ, Simona. *Jak účinně zvlhčit oči a nenarušit si vlastní slzný film* [online]. Kontaktnicocka.cz, 5. 9. 2017 [cit. 10. 2. 2022]. Dostupný na: <<https://www.kontakticocka.cz/clanky-rada-hylo-eye-care-pece.html>>
- [24] KADRNOŽKOVÁ, Tereza. *Pacientům se syndromem suchého oka by se mohlo ulevit* [online]. Universitas – Magazín vysokých škol, 3. 9. 2020 [cit. 9. 2. 2022]. Dostupný na: <<https://www.universitas.cz/aktuality/5764-pacientum-se-syndromem-sucheho-oka-by-se-mohlo-ulevit-na-vut-vylepsuji-umele-slzy>>
- [25] LÁZNIČKOVÁ, Alice a Vladimír KUBÍČEK (2014). *Základy fyzikální chemie: vybrané kapitoly pro posluchače Farmaceutické fakulty*. Praha: Karolinum, 168 s. ISBN 978-80-246-2791-5.
- [26] ZEMAN, Lubomír (2021). *Vstřikování plastů 2: teorie a praxe, simulace, analýzy, ostraňování vad, 3D tisk*. Praha: Grada, 447 s. ISBN 978-80-271-1294-4.
- [27] KOPECKÁ, Ivana a Eva SVOBODOVÁ (2019). *Metody průzkumu historických materiálů*. Praha: Grada, 95 s. ISBN 978-80-271-2240-0.
- [28] VALENTOVÁ, Emílie. *Lyofilizace* [online]. Docplayer.com, [cit. 5. 5. 2022]. Dostupný na: <<https://docplayer.cz/45086441-Lyofilizace-aplikace.html>>
- [29] PETRÁŠ, David. *Aplikační možnosti lyofilizace a příklady současné instrumentace* [online]. Pragolab.cz, 25. 1. 2021 [cit. 5. 5. 2022]. Dostupný na: <<https://www.pragolab.cz/aplikacni-moznosti-lyofilizace-a-priklady-soucasne-instrumentace>>
- [30] MANJU, S. a K. SREENIVASAN. *Conjugation of curcumin onto hyaluronic acid enhances its aqueous solubility and stability. Journal of Colloid and Interface Science*, 2011(359): 318-325. DOI: 10.1016/j.jcis.2011.03.071.
- [31] HEBEISH, Ali a S. SHARAF. *Novel nanocomposite hydrogel for wound dressing and other medical applications. RSC Adv.*, 2015(5):103036-103046, DOI: 10.1039/C5RA07076G.

Seznam obrázků, grafů a tabulek

Obrázek 1: Schéma slzného filmu	13
Obrázek 2: Biologická membrána – lipidová dvojvrstva	13
Obrázek 3: Chemická struktura kyseliny hyaluronové.....	17
Obrázek 4: Struktura karboxymethylcelulózy	20
Obrázek 5: NMR BC	30
Obrázek 6: Vzorek TEM – 03, NMR spektrometrie, činidlo BC	30
Obrázek 7: Vzorek TEM – 04, NMR spektrometrie, činidlo CDI	31
Obrázek 8: Užívané centrifugační zkumavky.....	37
Obrázek 9: Fázový diagram vody.....	38
Obrázek 10: Vzorky po lyofilizaci	38
Obrázek 11: Používané kyvety pro NMR měření.....	39
Obrázek 12: NMR spektrum pro HA	40
Obrázek 13: NMR pro HA v D ₂ O	40
Obrázek 14: IČ spektrum HA	41
Obrázek 15: IČ spektrum CMC.....	41
Obrázek 16: IČ, modifikovaná HA.....	42
Obrázek 17: IČ, modifikovaná CMC	42
Graf 1: DS pro HA	43
Graf 2: DS pro CMC.....	43
Tabulka 1: Přehled užitých chemikálií a jejich šarží.....	29
Tabulka 2: Látky užití k přípravě roztoku CMC a aktivované kyseliny laurové.....	32
Tabulka 3: Látky užití k přípravě roztoku HA a aktivované kyseliny laurové.....	33
Tabulka 4: Optimalizace reakčních podmínek změnou ekvivalentu kyseliny laurové; 0,5	34
Tabulka 5: Optimalizace reakčních podmínek změnou ekvivalentu kyseliny laurové; 0,75	35
Tabulka 6: Optimalizace reakčních podmínek změnou ekvivalentu kyseliny laurové; 1	35
Tabulka 7: Optimalizace reakčních podmínek změnou ekvivalentu kyseliny laurové; 2	35
Tabulka 8: Stupeň substituce CMC a HA	43