

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Příprava nanočástic z kyseliny hyaluronové a poly-lysinu
Diplomová práce

2023

Bc. Aneta Dvorníková

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Preparation of nanoparticles from hyaluronic acid and poly-lysine
Master thesis

2023

Bc. Aneta Dvorníková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Aneta Dvorníková**
Osobní číslo: **C21445**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Příprava nanočástic z kyseliny hyaluronové a poly-lysinu**
Téma práce anglicky: **Preparation Of Nanoparticles From Hyaluronic Acid And Poly-lysine**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

V rámci teoretické části se studentka zaměří na shrnutí informací, dostupných v odborné literatuře, o možnostech a metodách přípravy nanočástic z kyseliny hyaluronové. Popíše a porovná způsoby přípravy, zejména se zaměřením na přípravu nanočástic vhodných pro cílenou distribuci léčiv (drug delivery systems) nebo jako terapeutika, s uvedením konkrétních příkladů. V další části popíše možnosti přípravy nanočástic z kyseliny hyaluronové v kombinaci s poly-lysinem a využití takto modifikovaných nanočástic.

Experimentální část:

V rámci experimentální práce se zaměří na zavedení a optimalizaci metody přípravy nanočástic z kyseliny hyaluronové a poly-lysinu. Porovná možnost přímé syntézy z obou polymerů metodou intra- a intermolekulárních zesílení a také metodu post-syntetické modifikace nanočástic z kyseliny hyaluronové poly-lysinem. Po syntéze bude nanočástice charakterizovat vybranými metodami (DLS pro ověření jejich velikosti, měření zeta-potenciálu, ELFO apod.).

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Recentní odborná literatura dostupná v databázích WoS, Medline, Sciencedirect. Odborné monografie a další dle pokynů vedoucí diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Nikola Mannová**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **23. prosince 2022**
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Příprava nanočástic z kyseliny hyaluronové a poly-lysinu 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 5. 5. 2023

Bc. Aneta Dvorníková v.r.

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí své práce doc. RNDr. Lucii Korecké, PhD. za cenné rady při psaní a trpělivost při opravování této práce. Velké poděkování patří také Mgr. Nikole Mannové za pomoc při práci v laboratoři, za předání cenných zkušeností během konzultací a také za velmi přátelský přístup. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svým blízkým za velkou podporu nejen při psaní této práce, ale i během celého studia.

Anotace

Tato diplomová práce je zaměřena na zavedení a optimalizaci metody přípravy nanočástic z kyseliny hyaluronové a poly-lysinu. V popsaných postupech je využita primárně metoda chemického síťování s využitím karbodiimidu a dihydrazidu kyseliny adipové v prostředí acetonu. Příprava nanočástic spočívá ve vzájemném zesítnění obou polymerů a také ve vazbě poly-lysinu na povrch nanočástic z kyseliny hyaluronové připravených v prvním kroku.

Klíčová slova

Kyselina hyaluronová, hyaluronan, poly-L-lysin, nanočástice, nanogely, chemické zesítnění, fyzikální interakce, cílený transport léčiv

Title

Preparation of nanoparticles from hyaluronic acid and poly-lysine

Annotation

This Master thesis is focused on development and optimization of the method of the preparation of nanoparticles composed of hyaluronic acid in combination with poly-lysine. In described method, the chemical cross-linking using carbodiimide and adipic acid dihydrazide in an acetone environment is primarily used. The preparation of nanoparticles consists in common cross-linking of both polymers and also in the covalent binding of poly-lysine to the surface of independently prepared hyaluronic acid nanoparticles.

Key words

Hyaluronic acid, hyaluronan, poly-L-lysine, nanoparticles, nanogels, chemical cross-linking, physical interaction, targeted drug delivery

Obsah

Seznam obrázků	11
Seznam tabulek	12
Seznam grafů	14
Seznam zkratk	15
ÚVOD	17
1 TEORETICKÁ ČÁST	18
1.1 Kyselina hyaluronová	18
1.1.1 Struktura a vlastnosti hyaluronanu	18
1.1.2 Syntéza hyaluronanu	20
1.1.3 Interakce hyaluronanu se savčími buňkami	20
1.1.3.1 Receptor CD44	20
1.1.3.2 Receptor RHAMM	20
1.1.3.3 Receptor HARE	21
1.1.3.4 Receptor LYVE-1	21
1.1.4 Degradace hyaluronanu	21
1.1.4.1 Hyaluronidáza HYAL 1,2	22
1.1.4.2 Protein indukující migraci buněk CEMIP	22
1.1.4.3 Hyaluronidáza PH-20	23
1.1.4.4 Transmembránový protein TMEM 2	23
1.1.5 Funkce hyaluronanu v živých organismech	23
1.2 Lysin a poly-lysin	24
1.2.1 Struktura a vlastnosti lysinu	24
1.2.2 Metabolismus lysinu u savců	25
1.2.3 Struktura a vlastnosti poly-lysinu	26
1.2.4 Syntéza poly-lysinu	27
1.2.4.1 Ring-opening polymerace	27
1.2.4.2 Chemo-enzymatická polymerace	28
1.2.4.3 Syntéza na pevné fázi	28
1.2.4.4 Biosyntéza poly-lysinu	28
1.2.5 Biokompatibilita a toxicita poly-lysinu	28
1.3 (Nano)struktury z hyaluronanu a poly-lysinu	29
1.3.1 Hyaluronan/poly-lysinové nanogely a hydrogely	30

1.3.1.1	Výroba hyaluronanových nanogelů a hydrogelů	31
1.3.1.2	Výroba a vlastnosti hyaluronan/poly-lysinových nanogelů a nanočástic ..	32
1.3.2	Polyelektrolytové filmy a modifikace jiných nanostruktur	38
1.3.2.1	Výroba a charakterizace polyelektrolytových filmů a dvojvrstev	38
1.3.3	Hyaluronan/poly-lysinová nanovláknna.....	41
1.3.4	Biokompatibilita a toxicita hyaluronan/poly-lysinových nanostruktur	41
1.3.5	Degradace hyaluronan/poly-lysinových materiálů.....	42
1.4	Aplikace hyaluronan/poly-lysinových struktur v medicíně a biologii	43
1.4.1	Využití hyaluronanových nanomateriálů v medicíně.....	43
1.4.2	Přenos léčiv a nukleových kyselin pomocí hyaluronan/poly-lysinových struktur	44
1.4.3	Hojení ran pomocí hyaluronan/poly-lysinových hydrogelů.....	46
1.4.4	Kultivace buněk na hyaluronan/poly-lysinových materiálech	47
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	49
2.1	Přístrojové vybavení a pomůcky	49
2.2	Výroba nanočástic z kyseliny hyaluronové a poly-L-lysinu	50
2.2.1	Použité chemikálie a pomůcky	50
2.2.2	Použité roztoky a jejich příprava	50
2.2.3	Příprava 1: nanočástice z kyseliny hyaluronové připravené chemickým zesítním pomocí karbodiimidu a dihydrazidu kyseliny adipové.....	51
2.2.4	Příprava 2: nanočástice z kyseliny hyaluronové a poly-L-lysinu připravené chemickým zesítním pomocí karbodiimidu.....	51
2.2.5	Příprava 3: nanočástice z kyseliny hyaluronové a poly-L-lysinu připravené chemickým zesítním pomocí karbodiimidu.....	52
2.2.6	Příprava 4: nanočástice z kyseliny hyaluronové a poly-L-lysinu připravené chemickým zesítním pomocí karbodiimidu a dihydrazidu kyseliny adipové....	52
2.2.7	Příprava 5: vazba poly-L-lysinu na povrch nanočástic z kyseliny hyaluronové .	53
2.2.8	Příprava 6: nanočástice připravené chemickým zesítním poly-L-lysinu pomocí karbodiimidu a dihydrazidu kyseliny adipové	53
2.3	Metody charakterizace připravených nanočástic.....	54
2.3.1	Měření velikosti nanočástic pomocí dynamického rozptylu světla.....	54
2.3.2	Měření zeta potenciálu nanočástic.....	54
2.3.3	Polyakrylamidová gelová elektroforéza	55
2.3.4	Barvení gelu pomocí roztoku amoniakálního stříbra	58

2.3.5	Spektrofotometrie v UV-VIS oblasti.....	59
2.3.6	Stanovení koncentrace proteinů pomocí fluorimetru Quibit™ 2.0.....	60
3	VÝSLEDKY A DISKUZE	61
3.1	Příprava 1: nanočástice z kyseliny hyaluronové zesítné chemicky pomocí karbodiimidu a dihydrazidu kyseliny adipové.....	62
3.2	Příprava hyaluronan/ poly-L-lysinových nanočástic	64
3.2.1	Hyaluronan/poly-lysinové nanočástic připravené fyzikálním síťováním.....	64
3.2.2	Příprava 2: nanočástice z kyseliny hyaluronové a poly-L-lysinu zesítné chemicky pomocí karbodiimidu.....	66
3.2.3	Příprava 3: nanočástic z kyseliny hyaluronové a poly-L-lysinu zesítné chemicky pomocí karbodiimidu	70
3.2.4	Příprava 4: nanočástice z kyseliny hyaluronové a poly-L-lysinu zesítné chemicky pomocí karbodiimidu a dihydrazidu kyseliny adipové.....	72
3.2.5	Příprava 5: vazba poly-L-lysinu na povrch nanočástic z kyseliny hyaluronové .	75
3.3	Měření zeta potenciálu připravených nanočástic.....	78
3.4	UV – VIS spektrofotometrie.....	82
3.5	Stanovení koncentrace proteinů pomocí fluorimetru Quibit™ 2.0.....	85
3.6	Ověření vazby poly-L-lysinu pomocí elektroforetická separace	87
3.6.1	SDS-PAGE	87
3.6.2	Nativní elektroforéza v diskontinuálním uspořádání.....	88
3.6.3	Kombinace SDS-PAGE a nativní elektroforézy	89
3.7	Ověření stability nanočástic po lyofilizaci	91
	ZÁVĚR	93
	Seznam zdrojů:	94

Seznam obrázků

Obrázek 1 – Struktura kyseliny hyaluronové	18
Obrázek 2 – Intermolekulární vodíkové můstky při pH 2,5	19
Obrázek 3 – Struktura lysinu	24
Obrázek 4 – Konformace lysinu a poly-lysinu	26
Obrázek 5 – Velikost a zeta potenciál nanogelů vyrobených pomocí elektrospreje	33
Obrázek 6 – Struktura hyaluronanu (a) (měřítko 5 μ m), lysinu (b) (měřítko 5 μ m) a nanočástic (c) (měřítko 500 nm).....	34
Obrázek 7 – FT-IR spektrum hyaluronanu (a), lysinu (b) a nanočástic (c) (převzato z:	35
Obrázek 8 – Velikost nanočástic hyaluronanu s poly-lysinem a DNA	35
Obrázek 9 – Modifikace nanočástic oxidu křemičitého pomocí PLL/HA dvojvrstvy	40
Obrázek 10 – A) HA/PLL filmy na povrchu hyaluronanového jádra, B) duté HA/PLL mikrokapsle	41
Obrázek 11 – Vliv volného doxorubicinu a doxorubicinu v nanočásticích s HA/PLL filmem na velikost nádoru	46
Obrázek 12 – Fotografie roztoku: sraženiny při fyzikálním síťování nanočástic s poměrem HA:PLL 5:1 (w:w) (A) a 11:1 (w:w) (B).....	65
Obrázek 13 - Výsledek SDS-PAGE analýzy pro detekci volného PLL	88
Obrázek 14 – Výsledek separace PLL pomocí nativní elektroforézy	89
Obrázek 15 – Výsledek separace PLL pomocí kombinace SDS-PAGE a nativní elektroforézy (zaostřovací gel bez SDS)	90
Obrázek 16 – Výsledek separace PLL pomocí kombinace SDS-PAGE a nativní elektroforézy (zaostřovací i dělicí gel s SDS)	91

Seznam tabulek

Tabulka 1 – Roztoky a jejich objemy pro přípravu dělicího a zaostřovacího gelu pro jednotlivé typy elektroforézy	56
Tabulka 2 – Průměrné hodnoty hydrodynamických průměrů a PDI u HANPs připravených dle Přípravy 1	63
Tabulka 3 – Průměrné hodnoty hydrodynamických průměrů a PDI u HANPs připravených dle Přípravy 1	63
Tabulka 4 – Srovnání průměrných hodnot hydrodynamických průměrů a PDI u HA/PLL částic s rozdílným množstvím použitého PLL připravených dle Přípravy 2.....	68
Tabulka 5 – Průměrné hodnoty hydrodynamických průměrů a PDI u HA/PLL nanočástic se 100 µg PLL připravených dle Přípravy 2	69
Tabulka 6 – Průměrné hodnoty hydrodynamických průměrů a PDI u HA/PLL nanočástic se 100 µg PLL připravených dle Přípravy 3	70
Tabulka 7 – Průměrné hodnoty hydrodynamických průměrů a PDI u HA/PLL nanočástic s 25 µg PLL připravených dle Přípravy 3	72
Tabulka 8 – Průměrné hodnoty hydrodynamických průměrů a PDI u HA/PLL nanočástic se 100 µg PLL připravených dle Přípravy 4.....	73
Tabulka 9 – Průměrné hodnoty hydrodynamických průměrů a PDI u HA/PLL nanočástic s 25 µg PLL připravených dle Přípravy 4	75
Tabulka 10 – Srovnání hydrodynamických průměrů u HANPs a k nim příslušným HANPs/PLL připravených dle Přípravy 5	76
Tabulka 11 – Průměrné hodnoty hydrodynamických průměrů a PDI u HANPs/PLL 1 připravených dle Přípravy 5	77
Tabulka 12 – Průměrné hodnoty hydrodynamického průměru a PDI u HANPs/PLL 2,5 připravených dle Přípravy 5	77
Tabulka 13 – Průměrné hodnoty zeta potenciálu, konduktivity a elektroforetické pohyblivosti u HANPs a HA/PLL nanočástic připravených dle Přípravy 4.....	79
Tabulka 14 – Průměrné hodnoty zeta potenciálu, konduktivity a elektroforetické pohyblivosti u HANPs a HANPs/PLL připravených dle Přípravy 5	80
Tabulka 15 – Průměrné hodnoty zeta potenciálu, konduktivity a elektroforetické mobility u HA a PLL v ultračisté vodě a fyziologickém roztoku	81
Tabulka 16 – Srovnání absorbcí ($\lambda = 222 \text{ nm}$) HANPs a HA/PLL nanočástic se 100 µg PLL připravených dle Přípravy 4.....	84

Tabulka 17 – Srovnání absorbancí ($\lambda = 222$ nm) HANPs a HA/PLL nanočástic se 25 μ g PLL připravených dle Přípravy 4	84
Tabulka 18 – Porovnání absorbancí ($\lambda = 222$ nm) HANPs před vazbou PLL a nanočástic HANPs/PLL připravených dle Přípravy 5	84
Tabulka 19 – Porovnání vypočítané koncentrace PLL a naměřené koncentrace proteinů pomocí fluorimetru Quibit™ 2.0 u HANPs a HA/PLL nanočástic se 100 μ g PLL připravených dle Přípravy 4	85
Tabulka 20 – Porovnání vypočítané koncentrace PLL a naměřené koncentrace proteinů pomocí fluorimetru Quibit™ 2.0 u HANPs a HA/PLL nanočástic se 25 μ g PLL připravených dle Přípravy 4	86
Tabulka 21 – Porovnání vypočítané koncentrace PLL a naměřené koncentrace proteinů pomocí fluorimetru Quibit™ 2.0 u HANPs a HANPs/PLL připravených dle Přípravy 5	86
Tabulka 22 – Vliv lyofilizace na hydrodynamický průměr HA/PLL nanočástic se 25 μ g PLL připravených dle Přípravy 4	92

Seznam grafů

Graf 1 – Závislost intenzity rozptýleného světla na hydrodynamickém průměru HANPs připravených dle Přípravy 1	63
Graf 2 – Závislost intenzity rozptýleného světla na hydrodynamickém průměru HA/PLL částic se 1200 μg PLL připravených dle Přípravy 2.....	68
Graf 3 – Závislost intenzity rozptýleného světla na hydrodynamickém průměru HA/PLL částic se 600 μg PLL připravených dle Přípravy 2.....	68
Graf 4 – Závislost intenzity rozptýleného světla na hydrodynamickém průměru HA/PLL nanočástic s 100 μg PLL připravených dle Přípravy 2.....	69
Graf 5 – Závislost intenzity rozptýleného světla na hydrodynamickém průměru HA/PLL nanočástic se 100 μg PLL připravených dle Přípravy 3	71
Graf 6 – Závislost intenzity rozptýleného světla na hydrodynamickém průměru HA/PLL nanočástic s 25 μg PLL připravených dle Přípravy 3.....	72
Graf 7 – Závislost intenzity rozptýleného světla na hydrodynamickém průměru HA/PLL nanočástic se 100 μg PLL připravených dle Přípravy 4.....	73
Graf 8 – Závislost intenzity rozptýleného světla na hydrodynamickém průměru HA/PLL nanočástic se 25 μg PLL připravených dle Přípravy 4.....	75
Graf 9 – Závislost intenzity rozptýleného světla na hydrodynamickém průměru HANPs/PLL 1 připravených dle Přípravy 5	77
Graf 10 – Závislost intenzity rozptýleného světla na hydrodynamickém průměru HANPs/PLL 2,5 připravených dle Přípravy 5	78
Graf 11 – Závislost mezi intenzitou a velikostí zeta potenciálu u HANPs a HA/PLL nanočástic připravených dle Přípravy 4	79
Graf 12 – Závislost mezi intenzitou a velikostí zeta potenciálu u HANPs a HANPs/PLL připravených dle Přípravy 5	80
Graf 13 – Závislost intenzity na velikosti zeta potenciálu u HA a PLL v ultračisté vodě a fyziologickém roztoku	81
Graf 14 – Závislost mezi intenzitou a velikostí zeta potenciálu u PLL ve vodném prostředí ..	82
Graf 15 – Absorpční spektra a maxima vybraných roztoků a nanočástic	83
Graf 16 – Závislost intenzity rozptýleného světla na hydrodynamickém průměru HA/PLL nanočástic se 25 μg PLL připravených dle Přípravy 4 (vliv lyofilizace).....	92

Seznam zkratek

AAD	Dihydrazid kyseliny adipové (adipic acid dihydrazode)
AMK	Aminokyselina
Bcl-1	Protein odvozený od B-buněčného lymfomu (B-cell lymphoma)
BSA	Hovězí sérový albumin (bovine serum albumin)
CD44	Povrchový receptor buněk (cluster of differentiation)
CEMIP	Protein indukující migraci buněk a vázající hyaluronan (cell migration-inducing and hyaluronan-binding protein)
DDS	Systém přenosu léčiv (drug delivery system)
DMTMM	4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chlorid
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
FT-IR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GPI	Glykosylfosfatidylinositol
HA	Kyselina hyaluronová, hyaluronan (hyaluronic acid)
HANPs	Nanočástice z kyseliny hyaluronové (hyaluronic acid nanoparticles)
HANPs/PLL	Hyaluronanové nanočástice v poly-L-lysinem vázaným na povrchu
HARE	Hyaluronanový receptor pro endocytózu (hyaluronan endocytosis receptor)
HAS	Hyaluronan syntáza
HYAL	Hyaluronidáza
LYVE-1	Receptor endotelu lymfatických cév (lymfatic vesel endothelial receptor)
miRNA	mikroRNA
N	Negativně nabitě karboxylové skupiny kyseliny hyaluronové
NHS	N-hydroxysukcinimid
NP	Nanočástice
P	Pozitivně nabitě aminoskupiny poly-L-lysinu
PAGE	Polyakrylamidová gelová elektroforéza
PBS	Fosfátový pufr (Phosphate Buffer Saline)
PDI	Polydisperzní index (polydispersity index)
PDL	Poly-D-lysin
PH-20	Hyaluronidáza PH-20
PLL	Poly-L-lysin

RHAMM	Receptor pro hyaluronanem zprostředkovanou motilitu (receptor for hyaluronic acid-mediated motility)
SD	Směrodatná odchylka
SDS	Dodecylsulfát sodný
SPAM	Adhezivní molekula spermií (sperm adhezive molecule)
TEMED	N,N,N,N-tetramethylenethyldiamin
TMEM 2	Transmembránový protein 2
UDP	Uridindifosfát

ÚVOD

Kyselina hyaluronová je běžnou složkou lidského organismu. Umožňuje nejen správnou funkci kůže, kloubů, ale i např. imunitního systému. V posledních letech se její význam začal rozšiřovat i díky přípravě biokompatibilních a biodegradabilních nanomateriálů. Ukázalo se, že tyto nanomateriály jsou schopné do svého nitra nebo na povrch inkorporovat různá léčiva nebo geny a zvýšit tak účinnost terapie např. u nádorových onemocnění.

Podobné výhody má i poly-lysin. Jedná se o polymer, ve kterém je několik lysinových jednotek spojeno peptidovou vazbou. Stejně jako kyselina hyaluronová i poly-lysin je pro lidský organismus netoxický a snadno odbouratelný. Navíc má i antibakteriální vlastnosti.

Zatímco kyselina hyaluronová zajišťuje hlavně vazbu na povrch cílové buňky, poly-lysin hraje roli v uvolnění navázaných látek. Dohromady tyto polymery tvoří poměrně stabilní struktury vhodné k přenosu léčiv a jejich cílenému a řízenému uvolnění. Kombinace kyseliny hyaluronové a poly-lysinu při přípravě různých materiálů je v dnešní době široce diskutované téma. Nanomateriály lze připravit dvěma základními postupy: fyzikálním nebo chemickým síťováním.

Cílem této diplomové práce bylo připravit stabilní hyaluronan/poly-lysinové nanočástice pomocí chemického síťování za využití karbodiimidu a dihydrazidu kyseliny adipové. Po syntéze byla velikost nanočástic ověřena pomocí dynamického rozptylu světla, další charakterizační metody zahrnovaly měření zeta potenciálu, spektrofotometrii v UV-VIS oblasti, fluorescenční detekci peptidů nebo elektroforézu na polyakrylamidovém gelu.

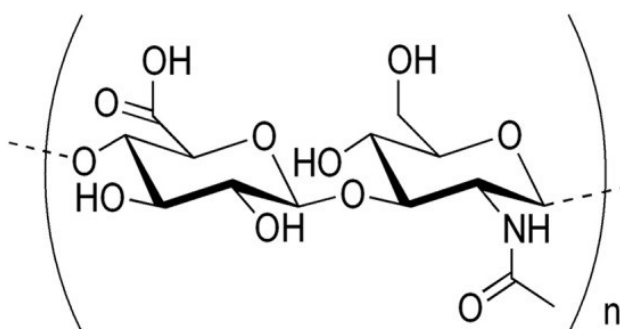
1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová je jednou z důležitých součástí živých organismů. Za její objevitele jsou považováni vědci Karl Meyer a John W. Palmer, kteří v roce 1934 vyizolovali z hovězích očí polysacharid málo rozpustný ve vodě, odhadli i jeho přibližnou molekulovou hmotnost a strukturu. Následně byl pojmenován podle strukturních jednotek „hyaloid“ a „uronic acid“ jako hyaluronic acid (HA), tedy kyselina hyaluronová (Meyer a Palmer, 1934). O několik let později byla struktura HA přesně popsána Bernardem Weissmannem a Karlem Meyerem (Weissmann a Meyer, 1954). Následně byl zaveden i obecnější název: „hyaluronan“ (Balazs a kol., 1986).

1.1.1 Struktura a vlastnosti hyaluronanu

Z chemického hlediska se jedná o glykosaminoglykan. Jeho struktura je složena z několika opakujících se jednotek. Základem je kyselina D-glukuronová spojená β (1 \rightarrow 3) glykosidickou vazbou s N-acetylglukosaminem, jak je uvedeno na Obrázku 1. Další molekula kyseliny glukuronové je připojena β (1 \rightarrow 4) glykosidickou vazbou, (PubChem, 2005; Laurent a Fraser; 1992). Díky karboxylovým funkčním skupinám, které se při pH 7 maximálně deprotonují, a tedy i záporně nabíjejí (Giubertoni a kol., 2019), tvoří HA tzv. polyanionty (Hahn a Hoffman, 2005). Ty k sobě na základě elektrostatických interakcí přitahují kladně nabitě ionty nebo funkční skupiny, např. aminoskupiny. Mohou tak vytvářet složitější komplexy, které mají široké uplatnění např. v medicíně (Carneiro a kol., 2016; Hahn a Hoffman, 2005).

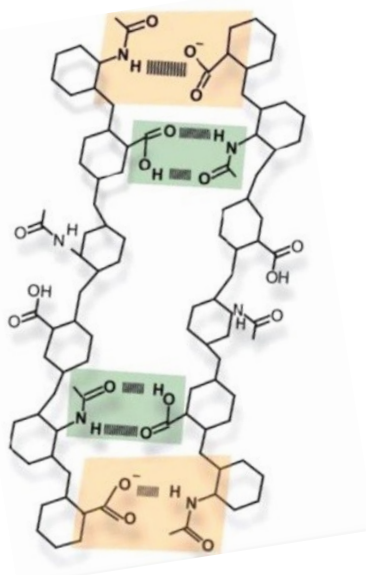


Obrázek 1 – Struktura kyseliny hyaluronové (Gupta a kol., 2019)

D'Agostino a kol. (2017) popsali tři skupiny HA podle velikosti. Jako nízkomolekulární jsou označovány fragmenty menší než 50 kDa, střední fragmenty dosahují velikosti 50 – 500 kDa a vysokomolekulární jsou větší než 500 kDa. Na délce polysacharidového řetězce závisí i jeho vlastnosti, např. způsoby interakce s buňkami, pro- a protizánětlivé účinky nebo podpora hojení ran. Délka řetězce souvisí i s vyšší viskozitou sloučeniny. Běžně se HA vyskytuje jako vysokomolekulární sloučenina o velikosti 1 000 – 2 000 kDa (D'Agostino a kol., 2017).

Vysokomolekulární HA může zaujímat tři různá prostorová uspořádání, která ovlivňují její funkce. Za primární strukturu se považuje pořadí sacharidových jednotek v řetězci. V rámci jednoho řetězce se mohou v roztocích vytvářet mezi acetamidovou skupinou a karboxylovou, popř. i hydroxylovou skupinou intramolekulové vodíkové můstky. Vzniká tak sekundární struktura ve formě dvojnásobně stočené šroubovice. Dvě a více šroubovic vzájemně spojených vodíkovými a hydrofobními interakcemi vytváří terciární strukturu podobnou β -skládanému listu. Tyto intra a hlavně intermolekulové interakce jsou však velmi náchylné ke změnám pH a teploty. Za fyziologických podmínek je HA schopna přecházet ze sekundární struktury na terciární a opačně (Scott a Heatley, 2002).

Bylo zjištěno, že při pH kolem 2,5 dochází u části karboxylových skupin k deprotonaci. Vznikají pak silné intermolekulární vodíkové můstky mezi deprotonovanou karboxylovou skupinou a amidem a zároveň i dva vodíkové můstky mezi karboxylovou skupinou a amidem na vedlejší sacharidové jednotce (viz Obrázek 2). V tomto stavu je HA tak viskózní, že může vytvářet tuhé gely až silná vlákna (Giubertoni a kol., 2019).



Obrázek 2 – Intermolekulární vodíkové můstky při pH 2,5 (upraveno, převzato z: Giubertoni a kol., 2019)

1.1.2 Syntéza hyaluronanu

Syntéza HA probíhá v buňce na vnitřní straně cytoplazmatické membrány. Je zajištěna hyaluronan syntázou (HAS), enzymem, který existuje ve 3 izoformách označovaných jako HAS1, HAS2, HAS3. Jejich hlavní funkcí je syntéza řetězců z uridindifosfát (UDP)-N-acetylglukosaminu a UDP-glukuronátu (Rilla a kol., 2013) i následný transport ven z buňky (Hubbard a kol., 2012). Jednotlivé izoformy se od sebe liší jak aktivitou, tak zastoupením v různých typech buněk. Např. aktivita i výskyt HAS1, na rozdíl od HAS2 a HAS3, je silně závislá na koncentraci substrátů v buňkách (Rilla a kol., 2013).

1.1.3 Interakce hyaluronanu se savčími buňkami

Interakce HA s buňkami a následná endocytóza jsou zprostředkovány několika receptory. Mezi ně patří: CD44, receptor pro hyaluronanem zprostředkovanou motilitu (receptor for hyaluronic acid-mediated motility, RHAMM), hyaluronanový receptor pro endocytózu (hyaluronan endocytosis receptor, HARE) a receptor endotelu lymfatických cév (lymfatic vessel endothelial receptor 1, LYVE-1) (Spadea a kol., 2019).

1.1.3.1 Receptor CD44

Molekula CD44 hraje hlavní úlohu ve vychytávání HA. Jedná se o glykoprotein složený z extracelulárních domén, zahrnujících variabilní úseky, transmembránové domény i intracelulárního konce (Kawaguchi a kol., 2020). Právě extracelulární část zajišťuje vazbu HA. Podle molekulové hmotnosti, variantních exonů a posttranskripčních modifikací lze rozlišit několik izoform. CD44 se vyskytuje na povrchu všech typů buněk, ovšem významně je zvýšena jeho exprese v tumorech. Bylo zjištěno, že nejvyšší koncentrace je právě uvnitř nádorové masy. Avšak různé maligně zvrhlé buňky exprimují různé množství jednotlivých izoform. Ne vždy zvýšená exprese CD44 znamená i zvýšenou vazbu HA a následnou endocytózu. Záleží jak na převažující variantě receptoru, tak i na podmínkách prostředí. I přesto je toto zjištění rozhodující při vývoji cílené chemoterapie (Spadea a kol., 2019).

1.1.3.2 Receptor RHAMM

Dalším klíčovým receptorem pro katabolismus HA je RHAMM. Jedná se o cytoplazmatický protein, který se nachází na buněčném povrchu, v jádře nebo v cytoskeletu (Carvalho a kol., 2021). Chen a kol. (2018) prokázali jeho přítomnost pomocí

imunohistochemické analýzy ve tkáních s rychlou obnovou, jako je intestinální trakt, thymus, lymfatické uzliny, kůže, kostní dřev, placenta nebo varlata, konkrétně spermatocyty. Mnohem vyšší výskyt byl zaznamenán u maligně zvrhlých buněk, dokonce u některých nádorů odpovídalo množství exprimovaného receptoru histologickému stupni onemocnění (Chen a kol., 2018). V závislosti na dostupnosti HA může RHAMM interagovat s receptorem CD44, aktivovat signální dráhy uvnitř buněk a zvyšovat tak např. agresivitu nádorů (Carvalho a kol., 2021).

1.1.3.3 Receptor HARE

I v případě HARE jde o transmembránový protein, existuje ve dvou izoformách. (190 a 315 kDa). Jeho nejvyšší výskyt byl prokázán v sinusoidách červené pulpy lymfatických uzlin, sleziny nebo jater. Vychytává tedy hlavně HA molekuly přenášené krví a lymfou (Zhou a kol., 2003). Kromě buněčného povrchu se díky neustálé recyklaci nachází i v cytosolu. Stejně jako CD44 i HARE zajišťuje receptorem zprostředkovanou endocytózu. Po navázání HA v tzv. klathrinem potažené jamce vzniká klathrinový váček, který je v buňce dále zpracován. HARE však může vychytávat i jiné glykosaminoglykany jako např. heparin (Pandey a kol., 2015).

1.1.3.4 Receptor LYVE-1

Dalším z receptorů vyskytujících se v lymfatickém systému je LYVE-1. Jedná se o transmembránový protein exprimovaný na povrchu endoteliálních buněk lymfatických cév a sinusoid mízních uzlin, vyšší zastoupení bylo objeveno hlavně v oblasti mezibuněčných spojů. Pro vazbu HA je nutná nejen určitá prahová koncentrace receptoru ale i jeho agregace na buněčném povrchu. Kromě HA o vysoké molekulové hmotnosti může zachytit i různé supramolekulární struktury nebo agregáty HA s proteiny, které se běžně vytváří *in vivo*, a dokážou samy indukovat shlukování receptoru. LYVE-1 zajišťuje i vazbu komplexů HA na povrchu makrofágů, což umožňuje jejich následný transport přes stěnu lymfatických cév (Lawrance a kol., 2016).

1.1.4 Degradace hyaluronanu

HA může být metabolizována přímo v některých tkáních, jako je kůže (Žádníková a kol., 2022) nebo sklivec (Schwartz a kol., 1996), za patologických podmínek jsou to ve větší míře i klouby (Zhang a kol., 2021) a plíce (Ormiston a kol., 2010). Zbytek HA je

poté uvolněn do oběhu a následně odbourán v játrech nebo lymfatických uzlinách (Laurent a Fraser, 1992).

Degradace v jednotlivých buňkách je zajišťována enzymy označovanými jako hyaluronidázy. Mezi ty nejvýznamnější patří hyaluronidáza 1 (HYAL 1), hyaluronidáza 2 (HYAL 2) a hyaluronidáza PH-20. Podobnou funkci zastává i transmembránový protein 2 (TMEM 2) nebo protein indukující migraci buněk a vázající hyaluronan (cell migration-inducing and hyaluronan-binding protein, CEMIP) (Tobisawa a kol., 2021). Všechny tyto molekuly jsou schopné štěpit glykosidické vazby mezi kyselinou glukuronovou a N-acetylglukosaminem. Jejich aktivita závisí na pH a velikosti degradované molekuly HA (Žádníková a kol., 2022).

1.1.4.1 Hyaluronidáza HYAL 1,2

HYAL 1 je lokalizována hlavně v lysozomech, z čehož vyplývá, že je aktivní v kyselém pH kolem 3,5. Jejím působením vznikají produkty o velikosti několika sacharidových jednotek. I protein HYAL 2 štěpí zejména v kyselém prostředí. Substrátem je vysokomolekulární HA, z níž vznikají krátké řetězce. Nejčastěji je exprimována v extracelulárním prostoru, ale objevuje se i na cytoplazmatické membráně nebo v cytosolu. Zároveň může být dokonce jednou z klíčových hyaluronidáz v kůži (Žádníková a kol., 2022).

Podle Harada a Takahashi (2007) HYAL 2 štěpí pouze HA o vysoké molekulové hmotnosti navázané na receptor CD44 a produkty uvolňuje do extracelulárního prostoru. Stejně tak i HYAL 1 je schopna v lysozomech štěpit jen vysokomolekulární HA pohlčenou endocytózou zprostředkovanou receptorem CD44. Tato studie tedy předpokládá, že cesty degradace přes HYAL 1 a HYAL 2 jsou na sobě nezávislé (Harada a Takahashi, 2007).

Obecný model katabolismu však naznačuje, že HA o vysoké molekulové hmotnosti nejprve interaguje s receptory na povrchu buněk, které jsou spřažené s HYAL 2. Štěpením vznikají fragmenty o velikosti cca 20 kDa, ty se pomocí receptorem zprostředkované endocytózy dostávají do lysozomu, kde jsou pomocí HYAL 1 a lysozomálních β -exoglykosidáz degradovány na menší fragmenty (Stern, 2003). I když Harada a Takahashi (2007) ve své práci kooperaci HYAL 1 a HYAL 2 vylučují.

1.1.4.2 Protein indukující migraci buněk CEMIP

Další hyaluronidázou vázanou k cytoplazmatické membráně je CEMIP, enzym, který také štěpí vysokomolekulární HA na nízkomolekulární řetězce (Zhang a kol., 2021). CEMIP je

s největší pravděpodobností vázán ke klathrinem potaženým jamkám. Extracelulární HA tedy interaguje s CEMIP na povrchu buněk, následně se kolem ní vytvoří klathrinový váček a HA je v kyselém prostředí rozštěpena (Yoshida a kol., 2013). Zvýšený výskyt tohoto enzymu byl potvrzen v synoviálních fibroblastech, kde se díky svojí hyaluronidázové aktivitě podílí na vzniku revmatoidní artritidy. Zároveň zde ke svojí aktivitě potřebuje vazbu s jiným membránovým proteinem, např. anexinem A1 (Zhang a kol., 2021). Jiné studie ukazují i jeho klíčovou úlohu při metabolismu HA v kůži (Yoshida a kol., 2013).

1.1.4.3 Hyaluronidáza PH-20

Hyaluronidáza PH-20 je vázána na cytoplazmatické membráně pomocí glykosylfosfatidylinositol (GPI)-kotvy. Její aktivita má optimum při neutrálním pH. Díky výskytu na povrchu spermií a účasti při reprodukci se nazývá i jako adhezivní molekula spermií (sperm adhezive molecule, SPAM 1). Je totiž schopna degradovat HA v extracelulárním matrix a zároveň i na povrchu oocyty (Gómez-Torres a kol., 2022).

1.1.4.4 Transmembránový protein TMEM 2

Podle nejnovějších výzkumů velmi důležitou roli v celkovém obratu HA hraje TMEM 2. Jeho nejvýraznější exprese je v lymfatických uzlinách a na endoteliích jaterních sinusů. Vychytává z krve vysokomolekulární HA a štěpí ji na fragmenty o střední molekulové hmotnosti (Tobisawa a kol., 2021).

1.1.5 Funkce hyaluronanu v živých organismech

Výskyt HA byl prokázán v mnoha tkáních, např. ve sklivci (Meyer a Palmer, 1934), kůži (Žádníková a kol., 2022), pupečníku (Lago a kol., 2005), plicích, plodové vodě apod. (Laurent a Reed, 1991). Důležitou roli hraje také v kloubních synoviích, kde díky své vysoké viskozitě funguje jako mazivo. Během života však koncentrace HA klesá, tudíž se zhoršuje i pohyblivost kloubů (Temple-Wong a kol., 2016).

Klíčovou úlohu má i v tvorbě extracelulární matrix (Assunção a kol., 2021). Kromě strukturálních funkcí může aktivovat také intracelulární signální dráhy a ovlivňovat chování buněk (Carvalho a kol., 2021). Zároveň se podílí na hojení ran. Čím je molekula HA větší, tím rychleji ránu zaceluje. Naopak velmi malé molekuly hyaluronanu (např. 6 kDa) hojení spíše brání, a naopak silně podporují produkci prozánětlivých cytokinů (D'Agostino a kol., 2017). HA také umožňuje transport makrofágů (Lawrance a kol., 2016), proliferaci a migraci buněk

(D'Agostino a kol., 2017; Murakami a kol., 2019) a podílí se na reprodukci (Gómez-Torres a kol., 2022).

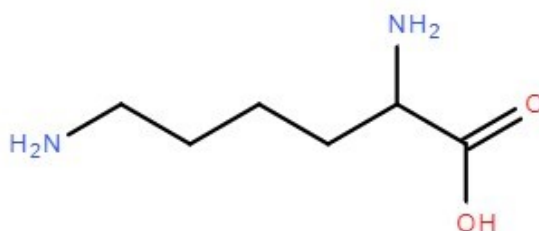
1.2 Lysin a poly-lysin

Lysin se spolu s leucinem, izoleucinem, valinem, threoninem, methioninem, tryptofanem, fenylalaninem a histidinem řadí do skupiny tzv. esenciálních aminokyselin (AMK), což znamená, že je lidské tělo neumí syntetizovat a musí je přijímat z exogenních zdrojů (Reeds, 2000). Histidin však je považován i za semi-esenciální AMK, protože v průběhu života si jej lidský organismus začne vytvářet sám (NCIthesaurus, 2022). Podobně je to např. i s argininem (NCIthesaurus, 2023).

1.2.1 Struktura a vlastnosti lysinu

Všechny AMK jsou složeny z uhlíkové kostry, alespoň jedné amino (-NH₂) a jedné karboxylové (-COOH) funkční skupiny (ChEBI, 2020).

V případě lysinu jsou přítomny dvě aminoskupiny. První je umístěna na α -uhlíku, tedy na uhlíku následujícím po karboxylu, což lysin zařazuje mezi α -aminokyseliny (ChEBI, 2019; Luo, 2018). Druhá aminoskupina je lokalizovaná na posledním uhlíku řetězce označovaném jako ϵ (viz Obrázek 3) (Stagi a kol., 2022; Luo, 2018). Zde může docházet k posttranslačním modifikacím, jako je methylace (Luo, 2018) nebo acetylace (Ali a kol., 2018). Aminoskupiny navíc umožňují lysinu vystupovat jako báze, protože jsou schopné vázat další vodíkové protony a kladně se nabíjet (Stagi a kol., 2022; ChEBI, 2019).



Obrázek 3 – Struktura lysinu (ChEBI, 2019)

Podle polohy α -aminoskupiny v prostou lze rozlišit dva enantiomery: L-lysin a D-lysin (ChEBI, 2019). Hlavním rozpoznávacím znakem je schopnost vychylovat rovinu polarizovaného světla o určitý úhel, D-formy jej vychylují doprava, L-formy doleva (Stagi, a kol., 2022). V živých organismech se vyskytuje hlavně L-lysin, protože je důležitou

součástí proteinů, enzymů a dalších stavebních složek (Kohlmeier, 2003). D-aminokyseliny naopak mohou v organismu savců působit až toxicky. Při jejich odbourávání pomocí D-aminooxidázy vzniká peroxid vodíku, který způsobuje oxidativní poškození buněk. Na druhou stranu u D-lysinu nebyla prokázána zvýšená produkce peroxidu vodíku, ale i tak působil na rakovinné buněčné linie *in vitro* více toxicky než jiné D-formy aminokyselin. Ukázalo se, že D-lysin je ve velké míře schopný indukovat apoptózu buněk (Bardaweel a kol., 2013).

1.2.2 Metabolismus lysinu u savců

Vzhledem k tomu, že se L-lysin řadí mezi proteinogenní AMK, je součástí všech potravin obsahujících bílkoviny (Kohlmeier, 2003). Mezi hlavní zdroje patří červené maso, drůbež, mléko a mléčné výrobky nebo i pečivo. Samozřejmě živočišné bílkoviny mají vyšší obsah lysinu než ty rostlinné (Górska-Warsewicz, 2018).

Katabolismus lysinu probíhá dvěma cestami. Buď je odbouráván metabolickou dráhou přes sacharopin (Gatrell a kol., 2013; Crowther a kol., 2019) nebo kyselinu pipekolovou (Crowther a kol., 2019). Obě dráhy jsou propojeny vznikem semialdehydu kyseliny α -aminoadipové. Dále již probíhají společně. V poslední době se však ukazuje, že vznik kyseliny pipekolové je charakteristický spíše pro buňky nervové soustavy myši (Posset a kol., 2015). V lidském mozku se podle Crowthera a kol. (2019) objevuje kyselina pipekolová také, ale vzniká spíše působením prvního zmíněného mechanismu.

Právě sacharopin-dependentní dráha je považována za hlavní katabolickou dráhu lysinu (Gatrell a kol., 2013). Lysin je zde přes sacharopin přeměněn až na kyselinu glutarovou (Blemings a kol., 1994; Higashino a kol., 1965), která je následně odbourána na dvě molekuly acetylkoenzymu A (Blemings a kol., 1994).

Vznik sacharopinu je zprostředkován proteinem α -aminoadipát δ -semialdehyd syntázou, skládající se z lysin- α -ketoglutarát reduktázy a sacharopin dehydrogenázy. V rozsáhlé studii prováděné na vepřích byl nejvyšší výskyt lysin- α -ketoglutarát reduktázy, ale i celkově α -aminoadipát- δ -semialdehyd syntázy, popsán v játrech a ve střevě, což naznačuje rozhodující funkci těchto orgánů v sacharopinové dráze. Naopak koncentrace i aktivita sacharopin dehydrogenázy byla kromě jater zvýšená i v ledvinách (Gatrell a kol., 2013).

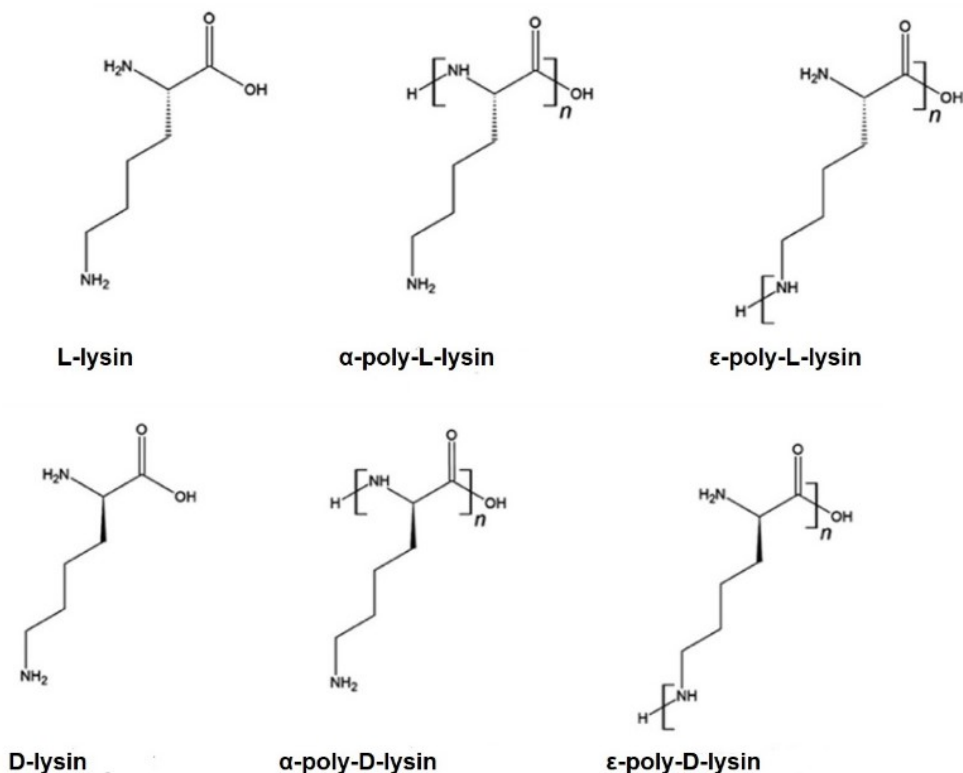
Podobných výsledků bylo dosaženo již v roce 1975, kdy ve studii Hutzlera a Dancise (1975) byla zaznamenána nejvyšší koncentrace lysin- α -ketoglutarát reduktázy

v lidských játrech nebo svalech, stejně tak zastoupení sacharopin dehydrogenázy bylo nejvyšší v játrech nebo ledvinách (Hutzler a Dancis, 1975).

Jak lysin- α -ketoglutarát reduktáza, tak i sacharopin dehydrogenáza se nacházejí hlavně v matrix mitochondrií (Blemings a kol., 1994). Aby byl lysin metabolizován, musí být nejprve transportován přes cytoplazmatickou membránu buněk pomocí kationických aminokyselinových transportérů (Jungnickel a kol., 2018; Gatrell a kol., 2013). Následně je pomocí ornitinového přenašeče transportován až do matrix mitochondrií. Tyto přenašeče se nejvíce vyskytují v játrech, ledvinách nebo střevě (Gatrell a kol., 2013; Fiermonte, a kol., 2003).

1.2.3 Struktura a vlastnosti poly-lysinu

Poly-lysin vzniká polymerací několika jednotek lysinu. Pokud jsou jednotky spojeny peptidovou vazbou mezi α -aminoskupinou a karboxylovou skupinou vzniká α -poly-lysin, v případě vzniku vazby mezi ϵ -aminoskupinou a karboxylem se vytváří ϵ -poly-lysin (Stagi a kol., 2022; Zhu a kol., 2023). V závislosti na prostorové konformaci α -aminoskupin lysinů existují i u jejich polymerů D- a L- enantiomery (Zhu a kol., 2023). Všechny struktury jsou zobrazeny v Obrázku 4.



Obrázek 4 – Konformace lysinu a poly-lysinu (převzato a upraveno z: Zhu a kol., 2023)

Lineární řetězce jsou v prostoru dále vázány do sekundárních struktur. Poly-L-lysin (PLL) může zaujímat celkem tři: PP II helix, α -helix, β -skládaný list. Výskyt a zastoupení jednotlivých uspořádání ovlivňuje teplota, pH nebo i typ rozpouštědla (Mirtič a Grdadolnik, 2013).

Například ve vodném prostředí o pH kolem 11,2 a nižší teplotě (kolem 10 °C) převažují α -helixy. Naopak při vyšší teplotě cca 80 °C se konformace PLL změní na β -skládaný list. Při snížení pH na hodnotu okolo 4 a teplotě 10 °C se volné aminoskupiny nabíjí kladně, což neumožňuje udržení α -helixů. Proto je zde typičtější výskyt PP II konformace nebo β -listu. Naopak molekuly rozpouštědla jako např. dimethylsulfoxid vytváří s PLL vodíkové vazby a pomáhají tak udržovat téměř 100% zastoupení α -helixů (Mirtič a Grdadolnik, 2013).

1.2.4 Syntéza poly-lysinu

PLL lze syntetizovat buď chemickou polymerací (Zhu a kol., 2023) nebo za účasti vhodných mikroorganismů (Xu a kol., 2017). Chemické postupy zahrnují tzv. ring-opening polymeraci (Li a Dong., 2017; Tao a kol., 2015), chemo-enzymatickou syntézu (Ageitos a kol., 2015) nebo syntézu peptidů na pevné fázi (Palomo, 2014).

1.2.4.1 Ring-opening polymerace

V případě ring-opening polymerace je základem L-lysin-N-karboxyanhydrid (Li a Dong., 2017) obsahující na svém C konci cyklickou část, nebo α -amino- ϵ -kaprolaktam (Tao a kol., 2015).

L-lysin-N-karboxyanhydrid lze využít například pro polymerace řízené UV zářením. Volné ϵ -aminoskupiny sloučeniny jsou ošetřeny tzv. protektivní skupinou, která je fotosenzitivní a po reakci s UV zářením se odštěpí. Následně může docházet k reakcím mezi takto aktivovanou ϵ -aminoskupinou jedné molekuly a cyklem molekuly druhé. Cyklus je rozvolněn, dojde ke vzniku peptidové vazby a prodloužení řetězce. Výsledkem takto řízené polymerace mohou být lineární nebo různě větvené molekuly PLL (Li a Dong., 2017).

Naopak u α -amino- ϵ -kaprolaktamu lze protektivní skupinou zablokovat α -aminoskupinu a syntetizovat tak lineární ϵ -poly-lysinové řetězce. Tao a kol. (2015) uvádí jako nejvhodnější protektivum 2,5-dimethylpyrrol. Opět dochází k reakci mezi volnou ϵ -aminoskupinou na jednom laktamu s cyklickou strukturou druhého laktamu, cyklus se rozpadá a vzniká peptidová vazba. Katalyzátorem polymerace jsou sodné ionty. Protektivum se z α -aminoskupin hotového řetězce vyváže pomocí hydroxyaminu (Tao a kol., 2015).

1.2.4.2 Chemo-enzymatická polymerace

Dalším způsobem je chemo-enzymatická polymerace. V první fázi je lysin esterifikován a váže se do katalytického místa specifické proteázy, v tomto případě Proteinázy K, za vzniku acyl-enzymového komplexu (Ageitos a kol., 2015). Při dostatečném přísunu volného esterifikovaného lysinu a Proteinázy K dochází k aminolýze, to znamená, že je přerušena vazba lysin-Proteináza K a enzym je nahrazen další lysinovou jednotkou. Vznikající PLL se poté opět naváže na Proteinázu K. Při vhodném nastavení reakčních podmínek, hlavně při dostatečném množství proteázy a lysinu, se řetězec dále prodlužuje nebo dokonce větví. Reakce je definitivně ukončena přidáním vody a následnou hydrolýzou vazby mezi navázaným lysinovým řetězcem a proteázou (Tsuchiya a kol., 2017; Ageitos a kol., 2015).

1.2.4.3 Syntéza na pevné fázi

Princip syntézy na pevné fázi spočívá ve tvorbě a prodlužování AMK řetězce, který je vázán k pryskyřicím. Jejich povrch je většinou modifikován sloučeninami s funkčními skupinami umožňující vazbu AMK, tzv. linkery (Palomo, 2014).

Před samotnou polymerací se nejprve pomocí vhodných činidel aktivuje karboxylová skupina AMK. Naopak aminoskupiny jsou opět blokovány protektivními látkami. Následně je aktivovaná karboxylová skupina lysinu připojena přes linker k pevné fázi. Nеспецифicky navázané AMK jsou poté odstraněny promytím. V dalším kroku jsou odštěpeny protektivní skupiny a na uvolněné aminoskupiny se mohou přes peptidovou vazbu připojovat další lysinové jednotky (Palomo, 2014).

1.2.4.4 Biosyntéza poly-lysinu

Jedním z nejvýraznějších přirozených producentů polymerů lysinu jsou mikroorganismy, konkrétně *Streptomyces albulus*. Mikroorganismy mohou fermentovat substráty bohaté na proteiny (Xu a kol., 2017) a za pomoci genu *pls*, který kóduje enzym ϵ -poly-L-lysin syntetázu, jsou schopné syntetizovat ϵ -poly-L-lysin. Produkce závisí na množství ATP, pH, teplotě (Yamanaka a kol., 2008) a typu substrátu (Xu a kol., 2017).

1.2.5 Biokompatibilita a toxicita poly-lysinu

U ϵ -PLL byl prokázán silný antibakteriální účinek například vůči *Escherichia coli* (Zhang a kol., 2018; Li a kol., 2014) nebo *Staphylococcus aureus* (Li a kol., 2014). ϵ -PLL je

schopný narušovat cytoplazmatickou membránu těchto mikroorganismů a způsobit tak jejich smrt (Zhang a kol., 2018).

Naopak díky téměř nulové toxicitě vůči savčí buňkám je ϵ -PLL např. schváleným konzervantem potravin. Bylo prokázáno, že ϵ -PLL je v těle krysy odbourán do 168 h, minimum je vstřebáno v gastrointestinálním traktu, zbytek je vyloučen stolicí (Hiraki a kol., 2003). PLL je také hojně využíván při výrobě nanostruktur pro přenos léčiv nebo genů (viz Kapitola 1.4).

Díky svému kladnému náboji je PLL schopný adherovat na záporně nabitý fosfatidylserin, který je součástí cytoplazmatické membrány buněk. Následně může projít i skrz tuto bariéru, a dokonce způsobit její fragmentaci. Vazba na povrch buněk a následný průnik dovnitř je ovlivněn množstvím dodaného PLL a zastoupením cholesterolu a fosfatidylserinu v cytoplazmatické membráně (Gorman a kol., 2020).

1.3 (Nano)struktury z hyaluronanu a poly-lysinu

Za nanomateriály lze zjednodušeně považovat pevné struktury ať přírodního nebo antropogenního charakteru, které mají alespoň jeden rozměr v rozmezí 1 – 100 nm. Bližší specifikace pak uvádí doporučení Evropské komise z roku 2022. Tato doporučení se však týkají pouze pevných částic nikoli micel, kapiček apod. (Doporučení Komise 2022/C 229/01).

Podle prostorového uspořádání lze nanomateriály dělit na 0D, což jsou materiály, které mají všechny rozměry ve výše uvedeném měřítku, 1D nanostruktury, které mají jeden rozměr větší než 100 nm a 2D materiály mající větší dva rozměry. 3D nanostruktury mohou mít jakýkoliv rozměr, ovšem jednotlivé komponenty, ze kterých jsou složeny, musí splňovat definici nanomateriálu, sem patří např. nanovrstvy (Chiraiyl a kol., 2017).

HA se využívá k syntéze nanomateriálů různého uspořádání a vlastností (Xue a kol., 2021; Lee a kol., 2022; Li a kol., 2020). Společně s PLL mohou tvořit samostatné nanostruktury v podobě nanogelů nebo „gelových“ nanočástic (Amato a kol., 2021), dále jsou využívány k modifikování různých povrchů ve formě dvojvrstev (bilayer) (Amorim a kol., 2014) nebo filmů (multilayer) (Hahn a Hoffman, 2005). V posledních letech se objevila i HA/PLL nanovlákna (Yang a kol., 2021). Podstatou všech zmíněných materiálů je interakce mezi karboxylovou skupinou HA a aminoskupinou PLL. Liší se pouze způsobem interakce, tvarem a využitím (Hahn a Hoffman, 2005; Soury a kol., 2016; Wei a kol., 2010).

1.3.1 Hyaluronan/poly-lysinové nanogely a hydrogely

Hydrogely jsou pórovité hojně provázané trojrozměrné struktury tvořené polymery. Jsou schopné vázat velké množství tekutiny a díky tomu zvětšit svůj objem (Salma-Ancane a kol., 2022). Jejich podskupinu tvoří tzv. nanogely, což jsou hydrogely o rozměrech přibližně 100 – 200 nm (Ullah a Lim, 2022), jiné zdroje uvádí pouze velikost v nm (Soni a kol., 2016).

Obecně lze hydrogely připravit buď chemickým nebo fyzikálním síťováním (Salma-Ancane a kol., 2022; França a kol., 2021). Fyzikální síťování je zprostředkováno interakcí mezi záporně nabitou karboxylovou skupinou HA a kladně nabitou funkční skupinou jiné sloučeniny, např. chitosanu (Gennari a kol., 2019; Yang a kol., 2015) nebo právě PLL (Le a kol., 2022; Simonson a kol., 2019; Pan a kol., 2019). Dalším způsobem může být interakce mezi HA a hydrofobní kyselinou cholánovou (Kang a kol., 2021).

Chemické metody využívají tzv. síťovacích činidel, jako jsou např. 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid (EDC), N-hydroxysukciimid (NHS) (Salma-Ancane a kol., 2022) nebo dihydrazid kyseliny adipové (adipic acid dihydrazide, AAD) (Wei a kol., 2010; Berkland a kol., 2013). Karboxylová skupina HA je nejprve aktivována pomocí EDC za vzniku intermediátu *O*-acyl isourey, která následně reaguje s NHS. Vzniklý ester je pak schopný zprostředkovat vazbu mezi karboxylovou skupinou HA a např. aminoskupinou PLL (He a kol., 2022). Naopak AAD vnáší do reakce dvě aminoskupiny, díky nimž je schopna propojit dvě aktivované karboxylové skupiny HA (Novák a Kruppa, 2008; Berkland a kol., 2013; Hu a kol., 2004). Na rozdíl od fyzikálních postupů vzniká tímto způsobem kovalentní vazba (Salma-Ancane a kol., 2022).

V následujících kapitolách budou zmíněny jak nanogely, tak částečně hydrogely, protože i ty mají velké uplatnění v oblasti přenosu léčiv a jiných medicínských aplikacích (Wei a kol., 2010; Simonson a kol., 2019). Také na nich lze přiblížit možnosti přípravy HA/PLL struktur pomocí chemických činidel, což je předmětem experimentální části práce. Vzhledem k tomu, že různým typům nanomateriálů z HA je v odborné literatuře věnována velká pozornost a ve většině případů je jejich příprava velmi podobná přípravě HA/PLL hydrogelů, nanogelů nebo nanovláken, budou zde uvedeny pro porovnání pouze některé vybrané postupy.

1.3.1.1 Výroba hyaluronanových nanogelů a hydrogelů

Využití NHS a kyseliny cholanové při výrobě nanogelů popsali např. Beldman a kol. (2017). Ti k roztoku HA v pufru obsahujícím 2-ethansulfonovou kyselinu (pH = 6) za stálého míchání přidávali roztok EDC a NHS. Následně bylo pH upraveno na 7 a přidán ethylendiamin. Příprava probíhala cca 16 h s následnou dialýzou HA do destilované vody. Poté byla HA opakovaně vysrážena pomocí ethanolu. Odseparovaná sraženina byla následně rozpuštěna v ultračisté vodě, opět dialyzovaná a následně lyofilizována. Produkt byl převeden do roztoku o pH = 9 a za stálého míchání byla přidána kyselina cholanová modifikovaná pomocí NHS, produkt byl očištěn dialýzou a lyofilizován. Vzhledem k velmi dobré schopnosti nanogelů absorbovat tekutiny byla jejich velikost v roztoku přibližně 80 nm, ve vysušeném stavu pouze 32 nm (Beldman a kol., 2017).

Na druhou stranu postup, který patentoval Hu a kol. (2004) popisuje přípravu nanočástic z HA (hyaluronic acid nanoparticles, HANPs) zesítním za pomoci EDC a AAD v prostředí vody a acetonu. Vodný roztok HA spolu s přísadkou acetonu byl nejprve 2 h promícháván. Následně bylo přidáno EDC a AAD ve vzájemném poměru 2:1 (w:w). Takto připravená reakční směs byla míchána dalších 24 h při 21 °C. Následoval druhý přísadka acetonu a míchání pokračovalo dalších 20 h. Poté byly vzorky dialyzovány do destilované vody po dobu 3 týdnů. Hydrodynamický poloměr takto připravených částic činil 197 nm. Ukázalo se také, že jakmile se po druhém přísadka acetonu začaly formovat nanočástice, změnila se barva roztoku z čiré na světle modrou opaleskující. Případné zakalení pak mohlo značit vznik mikročástic (Hu a kol., 2004).

Modifikovanou verzi předchozího postupu patentoval i Berkland a kol. (2013). V této práci byla inkubace HA s acetonem v prvním kroku zkrácena na 15 min. Po přísadka EDC a AAD následovalo pouze 30min promíchávání a poté byl opět přidán aceton. Poslední inkubace za stálého míchání probíhala 3 h. Následně byly nanočástice dialyzovány do deionizované vody a lyofilizovány (Berkland a kol., 2013).

Velikost připravených HANPs se pohybovala v rozmezí asi 80 – 560 nm v závislosti na koncentraci HA v použitém roztoku, její molekulové hmotnosti, poměru mezi karboxylovými skupinami HA a aminoskupinami AAD nebo času síťování. Zeta potenciál ve všech případech dosahoval záporných hodnot. Z lyofilizovaných nanočástic vytvořených zesítním HA o molekulové hmotnosti 17 kDa byly připraveny vodné roztoky o koncentraci 15, 30, a 45hm. % HANPs. Ukázalo se, že HANPs za těchto podmínek tvoří stabilní koloidní gely, které jsou v prostředí destilované vody nebo fosfátového pufru (Phosphate Buffer Saline,

PBS) dále schopné absorbovat tekutiny, čímž splnily výše zmíněnou definici nanogelů (Berkland a kol., 2013).

Jako příklad fyzikálního síťování lze uvést i interakci mezi HA a chitosanem. Yang a kol. (2015) nejprve připravili vodný roztok HA ($\text{pH} = 6,5$) a roztok chitosanu v 2% kyselině octové ($\text{pH} = 2,75$). Během intenzivního míchávání byl do roztoku chitosanu rychlostí 60 ml/min přidáván roztok HA a směs byla promíchávána ještě další hodinu. Výsledná velikost nanočástic se v závislosti na použitém hmotnostním poměru HA:chitosan pohybovala v širokém rozmezí hodnot. Např. při poměru HA:chitosan 3:7 (w:w) byla velikost nanočástic 160 nm a zeta potenciál 27,74 mV z důvodu převažujících kladně nabitých aminoskupin chitosanu (Yang a kol., 2015).

Mezi specifitější postupy přípravy se řadí tzv. fotopolymerace, což je síťování za pomoci UV záření. HA je nejprve modifikována metakrylátem, následně je přidán vhodný fotoiniciátor, který po vystavení UV záření zahájí síťování (Yamanlar a kol., 2011; Labie a kol., 2019; Yoon a kol., 2013).

1.3.1.2 Výroba a vlastnosti hyaluronan/poly-lysinových nanogelů a nanočástic

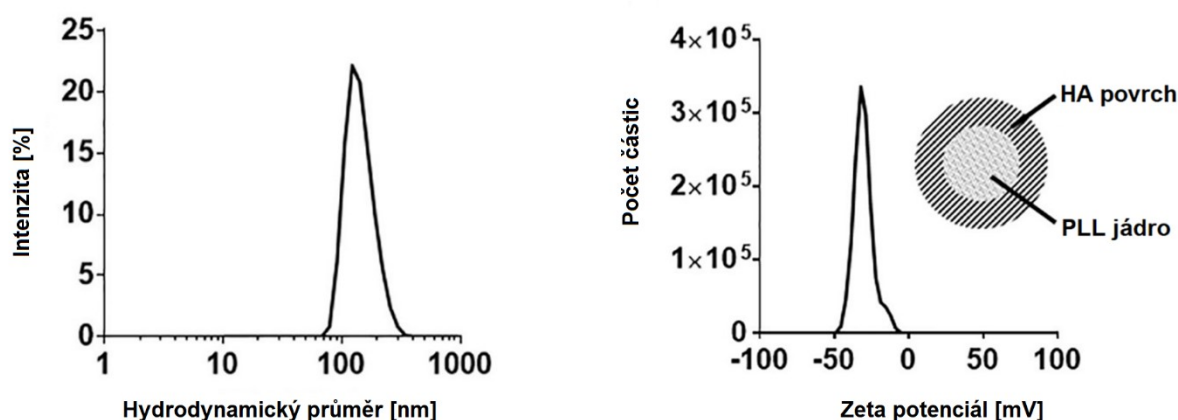
Hydrogely z HA a PLL jsou obvykle připravovány jak fyzikálním, tak i chemickým síťováním. Výsledkem každé metody jsou materiály s různou strukturou i vlastnostmi (Salma-Ancane a kol., 2022). Na druhou stranu příprava HA/PLL nanogelů, neboli gelových nanočástic, je v literatuře popisována hlavně fyzikálními metodami (Simonson a kol., 2019; Soury a kol., 2022; Carneiro a kol., 2016).

Při fyzikálním síťování se využívá elektrostatické interakce mezi HA a PLL. Jak již bylo zmíněno dříve, HA je díky své karboxylové skupině záporně nabitá. Naopak aminoskupiny PLL se nabíjí kladně. Ve vodném prostředí a za laboratorní teploty vzniká díky přitažlivým silám mezi těmito funkčními skupinami gel. U chemických postupů je síťování založeno na vzniku amidových vazeb (Salma-Ancane a kol., 2022).

Fyzikální síťování

Fyzikální zesíťování představili ve své práci Simonson a kol. (2019). K výrobě nanogelů byl využit elektrosprej. Poměry HA a PLL pro přípravu byly nastaveny tak, aby byl zachován poměr negativně (N) nabitých karboxylových skupin HA a pozitivně (P) nabitých aminoskupin PLL od 1:1 – 15:1 (n:n). HA i PLL byly v odpovídajících množstvích rozpuštěny v deionizované vodě. Roztok PLL byl poté přenesen do Petriho misky s elektrodou, zatímco

roztok HA byl aplikován z injekční stříkačky s tenkou jehlou, na kterou bylo vloženo napětí v rozmezí 8 – 24 kV. HA byla postupně dávkována k PLL v podobě kapiček rychlostí 0,1 ml/min. Hotové částice nanogelu byly monodisperzní o velikosti kolem 120 nm. Vzhledem k negativnímu zeta potenciálu (-35 mV) je předpoklad, že jádro je složené z PLL a povrch potažený HA (viz Obrázek 5) (Simonson a kol., 2019).



Obrázek 5 – Velikost a zeta potenciál nanogelů vyrobených pomocí elektrospreje (převzato a upraveno z: Simonson a kol., 2019)

Tato studie také ukazuje, že velikost částic není závislá na poměru N:P (n:n), ten ovlivňuje hustotou zesíťování. Čím je zesíťování hustší, tím pomaleji je nanogel schopný absorbovat tekutiny, jako jsou např. média pro kultivaci buněk. Bylo prokázáno, že za určitou dobu tyto materiály změni svoji velikost až na 300 nm. Naopak v deionizované vodě zůstává jejich velikost konstantní. Velkou výhodou takto vyrobených nanogelů je, že do nich lze vázat jak chemoterapeutika, tak i proteiny nebo antibiotika. Navíc jde o poměrně levnou metodu s vysokou výtěžností (Simonson a kol., 2019).

Le a kol. (2022) ve své práci poukázali na to, že pokud je poměr molů N:P < 0,8; tzn., že v systému převažují kladně nabitě aminoskupiny PLL, dochází u částic zesíťovaných pomocí elektrostatických interakcí k agregaci. Výsledkem byly agregáty o velikosti 1000 – 10 000 nm. Naopak částice, ve kterých převažovaly spíše záporně nabitě skupiny HA, se pohybovaly v rozmezí 100 – 300 nm (Le a kol., 2022).

Důvody těchto dějů detailně popsal Pan a kol. (2019). PLL totiž ve své struktuře obsahuje hydrofobní uhlíkatý řetězec. Pokud je v systému poměr molů N:P roven 1 nebo nižší, tzn., že řetězce PLL převažují, přítomná HA se váže na většinu aminoskupin, tím sníží nebo úplně

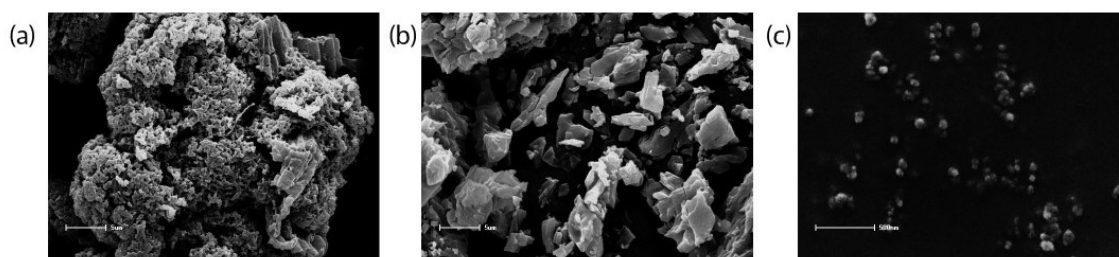
neutralizuje kladný náboj PLL a hydrofobní části PLL zapříčiní agregaci částic. To znamená, že čím je obsah PLL v porovnání s HA větší, tím méně jsou částice stabilní (Pan a kol., 2019).

Pokud je HA v nadbytku ($N:P > 1$) nabývají částice kulovitěho tvaru, hutnější jádro je tvořeno PLL a povrch pokrývá méně hutná vrstva HA. V případě vytvoření částice přidáním roztoku PLL do roztoku HA jsou vzniklé struktury poměrně stabilní. Při opačném pořadí přísad se však ukázalo, že částice také více agregují (Pan a kol., 2019).

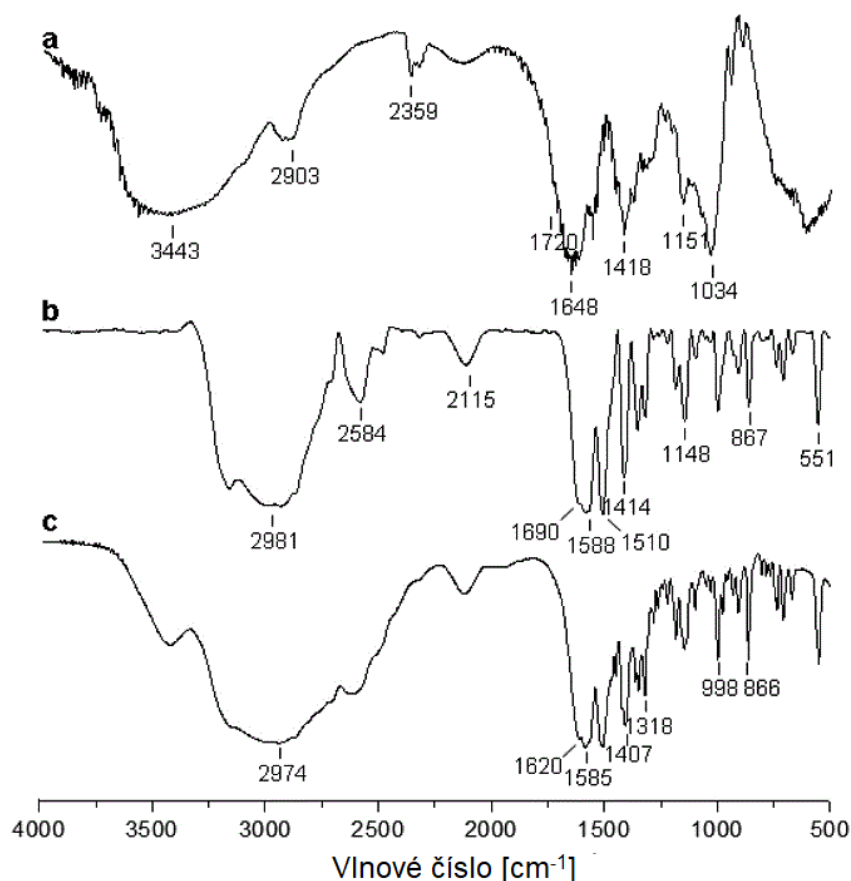
Naopak stabilita hotových částic, ve kterých převažuje HA, není ve vodném roztoku dále ovlivněna poměrem $N:P$ a nanočástice jsou schopné udržet si konstantní velikost během skladování při 4 °C až 30 dní. To ale neplatí u fyziologického roztoku (vodný roztok NaCl). Velikost částic zde v čase nejprve narůstá, poté ale zase klesne. Podle autorů je příčinou jejich reorganizace a následné opakované zesítnění způsobené přítomnými ionty solí (Le a kol., 2022).

Carneiro a kol. (2016) popsali postup přípravy nanočástic bez vloženého napětí. K výrobě gelových nanočástic navíc nepoužili PLL ale pouze L-lysin. O to větší byl poměr mezi HA a lysinem. Na 1 mol HA připadlo 16 700 molů lysinu. Z obou sloučenin byly připraveny vodné roztoky. Na rozdíl od předchozí metody, zde byl roztok lysinu přikapáván rychlostí 2,5 ml/min do roztoku HA za stálého míchání reakční směsi. Následně byly částice z roztoku separovány vysušením mrazem (Carneiro a kol., 2016).

Velikost nanočástic připravených touto metodou se pohybovala kolem 134 nm, zeta potenciál dosahoval hodnot přibližně -58,9 mV, povrch byl podle skenovací elektronové mikroskopie mnohem hladší než u samotného HA nebo L-lysinu (viz Obrázek 6). Rozdíl byl patrný i ve spektrech infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FT-IR) (viz Obrázek 7). Zároveň částice vykazovaly i vysokou stabilitu ve vodném prostředí (Carneiro a kol., 2016).

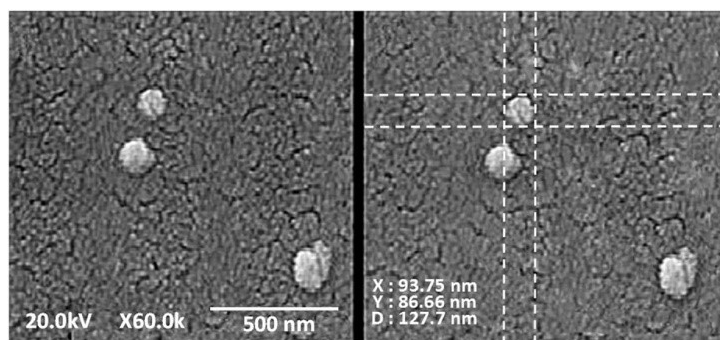


Obrázek 6 – Struktura hyaluronanu (a) (měřítko 5 µm), lysinu (b) (měřítko 5 µm) a nanočástic (c) (měřítko 500 nm) (převzato z: Carneiro a kol., 2016)



Obrázek 7 – FT-IR spektrum hyaluronanu (a), lysinu (b) a nanočástic (c) (převzato z: Carneiro a kol., 2016)

Souri a kol. (2022) využili podobný postup. Jen byla na použitý ϵ -PLL nejprve navázána DNA v podobně plazmidu. Následně byl opět po kapkách a za stálého míchání přidáván roztok HA. Byl očekáván vznik PLL jádra s HA obalem. Síťování probíhalo asi 30 min za laboratorní teploty. Vzniklé částice dosahovaly velikosti 138 nm (viz Obrázek 8) a zeta potenciál přibližně -24 mV (Souri a kol., 2022).



Obrázek 8 – Velikost nanočástic hyaluronanu s poly-lysinem a DNA (převzato z: Souri a kol., 2022)

Existuje teorie, která říká, že elektrostatická interakce mezi HA a PLL závisí na pH. Jak je uvedeno i zde, prostorová konformace PLL se mění v závislosti na pH. Podle Mirtiče a Grdadolnika (2013) je při pH 4 ve vodném roztoku spíše převaha P II helixů nebo β -skládaných listů, zato α -helixy se zde vůbec nevyskytují. Proto byl Amatem a kol. (2021) vyzkoušen postup, kdy bylo pH vodného roztoku PLL upraveno na pH 6. Při těchto podmínkách zaujímá PLL konformaci tzv. náhodných šroubovic (Zahouani a kol., 2016), což by mělo zajistit maximální interakci s HA (Amato a kol., 2021).

Pro přípravu nanogelů byl použit roztok HA (Mw 200 nebo 700 kDa), který byl za stálého míchání přidáván k vodnému roztoku PLL. Nejvhodnější koncentraci výchozích roztoků pro vznik gelových nanočástic o rozměrech kolem 200 nm uvádí autoři 2 mg/ml HA (Mw 200 kDa) a 1,25 mg/ml PLL. Zeta potenciál částic se zde pohyboval v kladných hodnotách (Amato a kol., 2021).

Chemické síťování

Na rozdíl od fyzikálního síťování, chemické je popisováno pouze u hydrogelů o velikostech v řádech mm (Salma-Ancane a kol., 2022; Wei a kol., 2010). Wei a kol. (2010) přimíchávali PLL v pevném stavu přímo do vodného roztoku HA o pH 4,75. Zároveň byl zachován poměr HA:PLL 5:1 (w:w). Následně byly karboxylové skupiny HA pro vazbu s PLL aktivovány pomocí EDC. Ty, které se nenavázaly s aminoskupinou PLL, mohly reagovat s AAD, pomocí něžž byla na hydrogel navázána ještě protilátka pro další výzkum. Reakce probíhala při laboratorní teplotě (Wei a kol., 2010).

Salma-Ancane a kol. (2022) použili podobný protokol s poměry HA:PLL 40:60; 50:50 a 60:40 (w:w). HA rozpouštěli v roztoku NaOH, ϵ -PLL v roztoku HCl. Následně byly oba roztoky zchlazeny a při 4 °C bylo k HA přidáno EDC a NHS v poměru molů 1:1. Takto smíchané roztoky přenesli do speciální formy, kde probíhalo po dobu 24 hodin síťování (Salma-Ancane a kol., 2022).

Bylo prokázáno, že čím více HA tyto hydrogely obsahují, tím více vody jsou schopné pojmout, a to dokonce i v porovnání s fyzikálně zesítěnými hydrogely, které měly shodný poměr HA:PLL(w:w). Rostoucí obsah HA zároveň souvisel i s větší porozitou a nižší hustotou zesíťování. U fyzikálně zesíťovaných hydrogelů je tento jev opačný (Salma-Ancane a kol., 2022).

He a kol. (2022) zase zasadili chemicky zesíťované částice do tzv. aerogelů. K tomu využili celulózoové membrány, které byly nejprve lyofilizovány. Lyofilizát byl následně inkubován v 1-butyl-3-methylimidazolium chloridu. Připravený roztok o koncentraci 1,2 hm. % celulózy byl převeden do speciální formy umístěné ve vodní lázni. Po hodinové inkubaci a následné

lyofilizaci vznikl aerogel. Aerogel byl smíchán s HA a ϵ -PLL v poměru 2:2:2hm. %, směs byla rozpouštěna za stálého míchání opět v 1-butyl-3-methylimidazolium chloridu. Hotový roztok byl převeden do formy, která obsahovala pufr s 0,4hm. % EDC a 0,2hm. % NHS. Po 24h inkubaci byl hydrogel mrazem vysušen na aerogel (He a kol., 2022).

Vytvořený materiál obsahoval ve své vláknité struktuře kulovité částice vzniklé zesíťením HA a ϵ -PLL, které byly označeny jako mikrosféry, protože jejich velikost se pohybovala kolem 1,9 μ m. Takto připravené aerogely vykazovaly dobré antibakteriální vlastnosti (He a kol., 2022).

Ukázalo se, že HA a poly-D-lysin (PDL) je možné spolu provázat pouze za využití EDC jako aktivačního i síťovacího činidla. Tian a kol. (2005) tak vytvořili hydrogely s různými poměry HA a PDL. HA byla nejprve rozpuštěna v destilované vodě za vzniku roztoků o koncentraci 0,5 mg/ml, jejichž pH bylo upraveno pomocí HCl na 4,75. Následně byl do jednotlivých roztoků přidán PDL v pevném stavu tak, aby poměr HA:PDL byl 10:1, 5:1 a 4:1 (w:w). Do takto připravené reakční směsi bylo následně přidáno EDC. Síťování probíhalo 1 h za laboratorní teploty a hotový hydrogel byl lyofilizován (Tian a kol., 2005).

Sktruktura jednotlivých hydrogelů byla opět závislá na poměru HA:PDL (w:w). S klesajícím poměrem HA:PDL stoupala tloušťka vláken tvořících hydrogel, ale zároveň klesal i průměr pórů. Naopak hydrogely s převládající HA (HA:PDL = 10:1) byly tvořeny tenčími vlákny a většími póry (Tian a kol., 2005).

Pro dosažení lepších vlastností chemicky síťovaných hydrofilních materiálů lze využít tzv. dvojitého síťování, které ve své práci popsali Guo a kol. (2021). PLL nejprve rozpustili v roztocích s různými koncentracemi NaCl a následně přidali HA. Směs bobtnala za stálého míchání při 4 °C po dobu 48 h. Jako aktivátor karboxylových skupin HA byl zde použit 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chlorid (DMTMM), který byl rozpuštěn v roztocích se stejnou koncentrací NaCl jako směs pro přípravu hydrogelu. Koncentrace DMTMM byla volena tak, aby po smíchání s HA a PLL byl poměr molů DMTMM a HA v jednotlivých roztocích roven 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6. Síťování probíhalo dalších 16 h při 4 °C, reakce byla zastavena přidávkem NaOH (Guo a kol., 2021).

Hydrogel byl následně lyofilizován a opět rozpuštěn v roztocích NaCl, koncentrace soli zde však byla nižší (0,1 – 1,5 %) než při přípravě HA a PLL. Díky tomu mohlo dojít k elektrostatické interakci mezi karboxylovou skupinou a aminoskupinou (Guo a kol., 2021).

Tímto postupem bylo dosaženo chemického a následně i sekundárního fyzikálního síťování, což dodává hydrogelům vyšší odolnost při tlaku a tahu. Rostoucí velikost pórů a snižující se kompaktnost struktury byla nepřímou úměrnou obsahu DMTMM v původní

reakční směsi. Obecně se velikost pórů pohybovala v řadech několika stovek μm . Po ponoření hydrogelů do roztoků s NaCl došlo k dalšímu provázání, čímž vznikly mezi chemicky a fyzikálně zesíťovanými částmi o něco menší póry. Navíc čím byla koncentrace NaCl v roztocích nižší, tím silnější byly elektrostatické interakce mezi HA a PLL. To znamená, že se HA s PLL více provazovaly a vznikalo i více menších spojovacích pórů (Guo a kol., 2021).

1.3.2 Polyelektrolytové filmy a modifikace jiných nanostruktur

HA/PLL polyelektrolytové vrstvy neboli filmy se skládají ze dvou a více vrstev HA a PLL. Mohou být syntetizovány na pevném podkladu, např. na skle (Hahn a Hoffman, 2005), skelných vláknech, již hotových hydrogelech (Yamanlar a kol., 2011) nebo mohou modifikovat jiné nanočástice (Pulakkat a kol., 2016; Amorim a kol., 2014). Lze je využít pro cílení a kontrolované uvolňování léčiv (Lee a kol., 2007; Pulakkat a kol., 2016), podporují také diferenciaci buněk a regeneraci tkání (Amorim a kol., 2014).

Využívá se zde opět interakcí mezi karboxylovou skupinou HA a aminoskupinou PLL. Jednotlivé polyelektrolyty se skládají na sebe v opakujících se cyklech, tzv. „layer-by-layer“ metodou (Velk a kol., 2016). Za jeden cyklus se většinou považuje vytvoření dvojvrstvy HA a PLL (Hahn a Hoffman, 2005; Velk a kol., 2016). Stejně jako u hydrogelů lze i tyto filmy síťovat buď na základě elektrostatických interakcí, tedy fyzikálně (Velk a kol., 2016, Hahn a Hoffman, 2005), nebo za pomoci síťovacích činidel (Amorim a kol., 2014; Lee a kol., 2007).

1.3.2.1 Výroba a charakterizace polyelektrolytových filmů a dvojvrstev

Například Hahn a Hoffman (2005) využili jako pevný nosič sklo potažené chitosanem, který zde zastával funkci kladně nabitého substrátu. První vrstva filmu byla tvořena pomocí polyaniontu HA. Roztok o koncentraci 0,2hm. % byl připraven rozpuštěním HA v PBS. Do něj byl následně ponořen nosič potažený chitosanem a neadsorbovaná HA byla odmyta vodou. Vznik druhé vrstvy byl iniciován roztokem PLL v PBS o koncentraci 0,5hm. %. Celý cyklus se 14krát zopakoval. PLL použitý v jednotlivých experimentech měl molekulové hmotnosti: 3 970, 14 400, 34 300, 57 900, 99 500 Da (Hahn a Hoffman, 2005).

Při použití PLL o molekulové hmotnosti 34 000 Da a vyšší byla elektrostatická interakce mezi jednotlivými vrstvami nejsilnější. Množství začleněné HA záviselo na počtu cyklů.

Nejvíce HA se začlenilo během prvních 8 cyklů, pak již nárůst jejího obsahu nebyl tak markantní (Hahn a Hoffman, 2005).

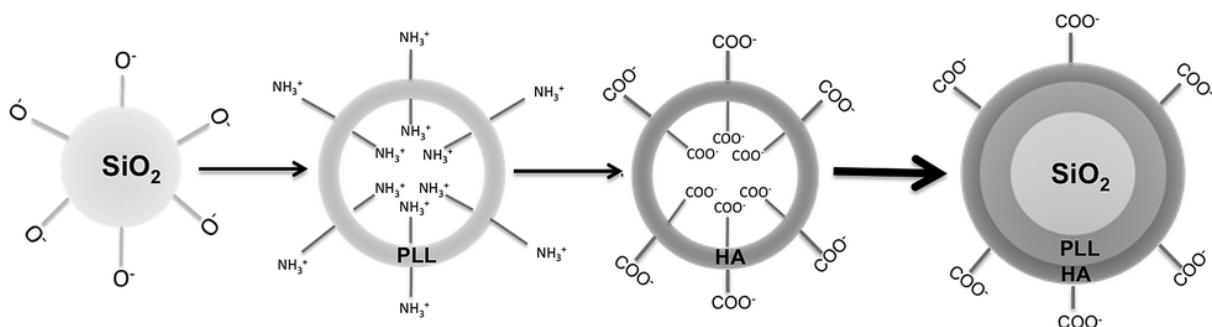
Důležitou roli ve struktuře i stabilitě filmu hraje vnější vrstva. Ve výše popsané studii byla tvorba polyelektrolytových filmů ověřena měřením kontaktního úhlu, což je úhel mezi pevnou fází a tečnou k povrchu kapky roztoku (Kwok a Neumann, 1999). U skleněné plochy modifikované pouze chitosanem byl kontaktní úhel asi $33,3^\circ$. Pokud byla po 8. cyklu na povrchu HA, kontaktní úhel klesl na 21° a stabilita celé struktury byla v čase vyšší než v případě PLL, kdy se kontaktní úhel naopak zvýšil na 35° , zato stabilita v čase klesla (Hahn a Hoffman, 2005).

Polyelektrolytové filmy lze vytvářet i na 3D strukturách, jako jsou skleněná mikrovlákná (Velk a kol., 2016). Velk a kol. (2016) vlákna nejprve ošetřili polyetyleniminem. Následně byla vlákna vložena do roztoku PLL, promyta, a poté ponořena do roztoku HA. Takových cyklů bylo provedeno 24 při teplotě 37°C . Při teplotě 24°C probíhala souběžně syntéza filmu i na plochém krycím skle (Velk a kol., 2016).

Povlaky vzniklé na vláknech měly šířku kolem $20\ \mu\text{m}$, zatímco na krycím skle pouze $600\ \text{nm}$. Zajímavé bylo, že pokud se již hotový polyelektrolytový film znovu ponořil do roztoku PLL, nabobtnal, což bylo způsobeno průnikem dalších molekul PLL do povlaku. Naopak při ponoření filmů do roztoku HA se tloušťka filmu snížila. To bylo způsobeno řetězci HA o velké molekulové hmotnosti, které nejsou schopné procházet mezi jednotlivé vrstvy, drží se na povrchu a dodávají mu záporný náboj. Díky tomu je PLL přitahován z nitra filmu blíž k povrchu a následně může být uvolněn do roztoku (Velk a kol., 2016).

Pokud jsou však do roztoku PLL ponořeny již hotové HA hydrogely zesíťované pomocí fotopolymerizace, jejich objem se spíše zmenšuje. Vše závisí na pórovitosti původní struktury a molekulové hmotnosti PLL. Nízkomolekulární PLL totiž proniká póry hluboko do nitra hydrogelu a díky elektrostatickým interakcím s HA se hydrogely více provážou a zmenší. Vysokomolekulární PLL naopak zůstává spíše u povrchu, ale i tak zajistí lepší zesíťování, opouzdření a zmenšení hydrogelu. Do takto připravených nosičů pak lze uzavírat i léčiva, která s HA hydrogely nijak neinteragují (Labie a kol., 2019).

V případě syntézy filmů na povrch hotových nanomateriálů je výhodnější volit nanočástice s povrchovým nábojem, jako jsou například nanočástice z oxidu křemičitého. Záporně nabitě silanolové skupiny na povrchu nanočástic umožní interakci s kladně nabitým PLL a následné nasednutí záporných řetězců HA (viz Obrázek 9) (Amorim a kol., 2014).



Obrázek 9 – Modifikace nanočástic oxidu křemičitého pomocí PLL/HA dvojvrstvy (Amorim a kol., 2014)

Amorim a kol. (2014) v prvním kroku modifikace křemíkových nanočástic využili fyzikální interakce. Nanočástice byly nejprve ponořeny do roztoku PLL, promyty a následně přeneseny do roztoku HA o dvojnásobné koncentraci. K dosažení lepšího provázání byly nanočástice promíchávány spolu se síťovacími činidly EDC a NHS. Všechny reakce probíhaly v prostředí 0,15M vodného roztoku NaCl (Amorim a kol., 2014).

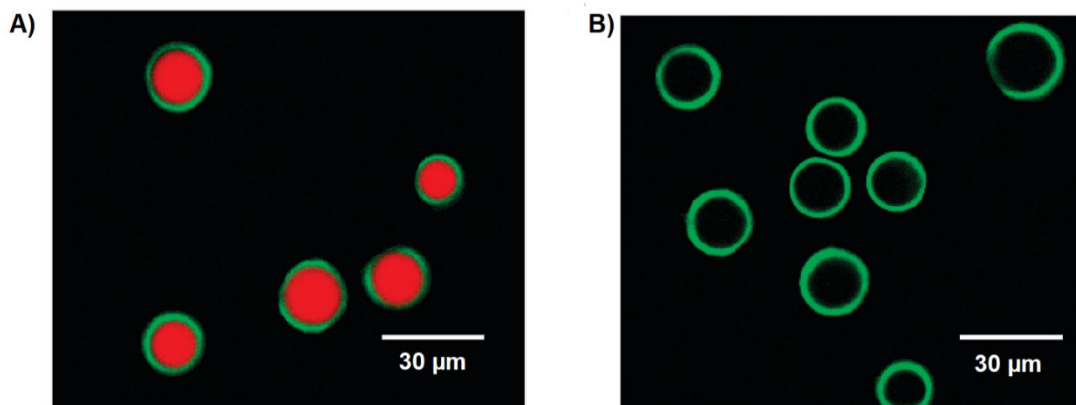
Základní nanočástice bez filmu měly velikost přibližně 240 nm, zeta potenciál dosahoval hodnot -25 mV. Po navázání dvojvrstvy se velikost částic v roztoku zvýšila na 567 nm, naopak díky záporně nabitě vrstvě HA na povrchu klesl zeta potenciál na $-34,9$ mV. Před i po vytvoření povlaku si částice zachovaly kulovitý tvar (Amorim a kol., 2014).

Vlastnosti a sestavování polyelektrolytových povlaků závisí nejen na molekulové hmotnosti PLL, ale také na velikosti HA nebo způsobu síťování. Filmy vytvořené pomocí síťovacích činidel se ukazují být tenčí než ty, které jsou sestaveny na základě elektrostatických interakcí za stejných podmínek. Zjistilo se, že kovalentní vazby v chemicky síťovaných vrstvách udržují jejich vyšší kompaktnost a elasticitu. Naopak schopnost hydratace je u chemicky provázaných vrstev v porovnání s elektrostatickými rozdílná, respektive nižší, zejména při použití nízkomolekulární HA (např. 6,4 kDa) (Amorim a kol., 2020).

Obecně platí, že čím je vyšší molekulová hmotnost použité HA, tím je silnější i film. Stejně tak s rostoucím počtem jednotlivých vrstev, roste i celkový objem filmů, u elektrostatických sestav jde o exponenciální závislost u chemicky zesíťovaných spíše o lineární (Amorim a kol., 2020).

Lee a kol. (2007) vytvořili za pomoci sekundárního chemického zesíťování tzv. duté mikrokapsle. Hotové HA hydrogelové mikročástice o průměru přibližně 16 μm byly střídavě ponořovány do roztoků HA a PLL ($\text{pH} = 6,5$) s 0,9M NaCl. Po 10 cyklech bylo pomocí dithiotreitolu rozloženo mikrogelové jádro (viz Obrázek 10). Dutý obal byl následně pro zpevnění struktury inkubován s roztokem EDC (Lee a kol., 2007).

Mikrokapsle, zesítené pomocí EDC byly, na rozdíl od nezesítených, odolnější vůči opakovanému zmrazování a rozmrazování a také stabilnější při pH 2, což může být podle autorů značnou výhodou při transportu léčiv (Lee a kol., 2007).



Obrázek 10 – A) HA/PLL filmy na povrchu hyaluronanového jádra, B) duté HA/PLL mikrokapsle (převzato a upraveno z: Lee a kol., 2007)

1.3.3 Hyaluronan/poly-lysinová nanovlákná

Cílem Yanga a kol. (2021) bylo vytvoření kompaktních materiálů složených z HA/PLL nanovláken. HA byla nejprve oxidována jodistanem sodným, což vedlo k oxidaci některých sousedních hydroxylových skupin HA na aldehydové. Po 24h inkubaci ve tmě byl roztok zoxidované HA dále vhodně upraven pro elektrostatické zvlákňování. Z takto připraveného roztoku byly následně pomocí elektrostatického síťování při napětí 8 kV vytvořeny nanovláknenné komplexy (Yang a kol., 2021).

Hotová vlákna byla ponořena do roztoku PLL (pH ~ 7), přičemž došlo k interakci mezi aldehydovými skupinami HA a aminoskupinou PLL a jejich vzájemnému zesítní. Velikost vzniklých nanovláken i množství navázaného PLL byla závislá na stupni oxidace HA a tedy i poměru mezi HA a jodistanem sodným použitým při výrobě. Pokud došlo k 58% oxidaci, výsledná velikost vláken byla 444 nm a obsahovala více PLL než vlákna s 28% zoxidováním a velikostí 546 nm (Yang a kol., 2021).

1.3.4 Biokompatibilita a toxicita hyaluronan/poly-lysinových nanostruktur

U nanogelů zesítených za použití elektrospreje nebyla prokázána téměř žádná toxicita vůči lidským endoteliálním buňkám při koncentracích nanogelů dosahujících až 100 µg/ml. Neobjevila se zde dokonce ani výrazná hemolýza savčích erytrocytů, a to ani při použití

několikanásobně vyšších koncentrací nanomateriálu než v předchozím případě (Simonson a kol., 2019).

I u aerogelů s inkorporovanými HA/PLL mikrosférami byla viabilita epiteliálních buněk po 24h inkubaci více jak 80 %. Naopak zde byly prokázány výborné antibakteriální účinky vůči *Candida albicans*, *Streptococcus aureus* nebo *Escherichia coli* (He a kol., 2022).

Vysoká biokompatibilitu byla pospána i u chemicky zesíťovaných HA/PDL materiálů testovaných na nervových buňkách myší (Tian a kol., 2005).

V případě, že fyzikálně zesíťené nanočástice nesou ve svém jádru např. DNA, toxicita je závislá spíše na nákladu než na samotném nosiči. Buňky lidských embryonálních ledvin vykazovaly 95,5% viabilitu při použití koncentrace 5 $\mu\text{g/ml}$ zmíněných nanočástic, při koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ byla životaschopnost kultury snížena až o 33 % (Souri a kol., 2022).

Salma-Ancane a kol. (2022) zjistili, že hydrogely připravené na základě fyzikálních interakcí jsou výrazně méně biokompatibilní než chemicky zesíťené. Při přímém kontaktu elektrostaticky zesíťovaných hydrogelů s buňkami klesla viabilita buněk pod 50 % nezávisle na množství HA a PLL v použitém materiálu (Salma-Ancane a kol., 2022).

Zajímavé je, že pokud byly jak z fyzikálně, tak i z chemicky zesíťovaných hydrogelů připraveny extrakty a z nich roztoky v kultivačním médiu o různých koncentracích materiálu, ukázalo se, že toxicita závisela nejen na způsobu síťování, ale také na poměru HA a PLL. U elektrostaticky zesíťovaných struktur byla viabilita buněk snížena u všech použitých koncentrací hydrogelu i všech testovaných poměrů HA:PLL (40:60, 50:50, 60:40; w:w). Se zvyšující se koncentrací hydrogelu viabilita buněk klesala. Nejvíce cytotoxická byla 50% koncentrace hydrogelu s poměrem HA:PLL 60:40 (w:w). Naopak u chemicky zesíťovaných struktur bylo výraznější snížení životaschopnosti buněk zaznamenáno až při 50% koncentraci hydrogelu. Nejnižší viabilita buněk pak byla popsána při poměru HA a PLL 60:40 (w:w). (Salma-Ancane a kol., 2022).

1.3.5 Degradace hyaluronan/poly-lysinových materiálů

Degradace HA/PLL materiálů byla zkoumána hlavně při použití hyaluronidázy. Ukázalo se, že odbourávání závisí na složení vnější vrstvy. Pokud v částicích a hlavně na jejich povrchu převažuje HA ($N:P > 1$), enzym odštěpí pouze tuto část a dál se nedostane. Navíc se odhalí řetězce PLL, mezi nimiž působí hydrofobní interakce (Le a kol., 2022), které již byly popsány dříve (Pan a kol., 2019), a částice začnou agregovat. V okamžiku, kdy je $N:P < 1$ a na povrchu

převažuje PLL, velikost nanočástic se ani po 24h působení hyaluronidázy téměř nezmění (Le a kol., 2022).

Blokující funkci PLL na povrchu HA hydrogelů pozorovali i Labie a kol. (2019). Tuto vrstvu lze odstranit např. pomocí trypsinu. Naopak u čistých HA hydrogelů bylo zjištěno, že čím je materiál více zesíťovaný a kompaktnější, tím je jeho odbourávání hyaluronidázou rychlejší (Labie a kol., 2019).

Na druhou stranu u polyelektrolytových filmů vázaných na skleněné ploše se obsah HA po ošetření hyaluronidázou výrazně snížil nezávisle na složení vnější vrstvy (Hahn a Hoffman, 2005).

1.4 Aplikace hyaluronan/poly-lysinových struktur v medicíně a biologii

HA/PLL nanogely, hydrogely a nanočástice modifikované HA/PLL filmem mají široké uplatnění hlavně v oblasti přenosu léčiv, jako tzv. drug delivery systémy (DDS) (Simonson a kol, 2019; Le a kol., 2022), lze je také využít jako scaffoldy pro kultivaci buněk (Guo a kol., 2021) nebo podpůrné materiály pro hojení ran (Amato a kol., 2021) a zacelení poškozených tkání (Tian a kol., 2005; Wei a kol., 2010).

Přenos léčiv pomocí DDS se týká z velké části nádorových onemocnění (Salahpour-Anajran a kol., 2019; Yang a kol., 2015; Xiong a kol., 2017). Je rozdělen na dvě kategorie: aktivní transport a pasivní transport. Při pasivním transportu se využívá hlavně specifických podmínek nádorového prostředí, jako je zvýšená propustnost cév a snížený odvod lymfy (Andreous a kol., 2022; Maeda, 2012). Naopak aktivní transport je založen na interakci mezi nanomateriálem a typickou povrchovou strukturou buňky (Salahpour-Anajran, 2019).

1.4.1 Využití hyaluronanových nanomateriálů v medicíně

HA nanomateriály mohou v kombinaci s dalšími strukturami najít uplatnění jak v přenosu léčiv (Yang a kol., 2015; Han a kol., 2015; Yoon a kol., 2013) nebo genů (Sato a kol., 2017), tak i zobrazovacích technikách nebo fototerapii (Yoon a kol., 2012).

Samotné nanostruktury pak mohou přímo přispívat k léčbě některých onemocnění jako např. psoriázy (Lee a kol., 2022), osteoartrózy (Kang a kol., 2021), diabetu II. typu nebo k potlačení zánětu (Rho a kol., 2018). Výhodami takových materiálů je téměř nulová toxicita a vysoká biokompatibilita (Lee a kol., 2022; Han a kol., 2015).

1.4.2 Přenos léčiv a nukleových kyselin pomocí hyaluronan/poly-lysinových struktur

Vazba a následné uvolnění léčiv z nanomateriálu je ovlivněna hustotou zesíťení nanočástice, vlastnostmi vázané molekuly (Simonson a kol., 2019), pH prostředí (Lee a kol., 2007; Xiong a kol., 2017) nebo teplotou (Le a kol., 2022). Obecně lze říci, že existují 3 způsoby, jak léčiva do nosičů vázat. Zvolené látky se mohou před samotným síťováním nosičů přidat buď do roztoku HA (Simonson a kol., 2019; Amato a kol., 2021), PLL (Le a kol., 2022; Xiong a kol., 2017) nebo až k hotovým nanočásticím (Simonson a kol., 2019).

Interakce s cílovými buňkami je umožněna převážně vazbou HA v nosiči s receptorem CD44 (Simonson a kol., 2019; Xiong a kol., 2017), který je ve větší míře exprimován právě na nádorových buňkách (Spadea a kol., 2019). Po receptorem zprostředkované endocytóze je nanočástice díky obsaženému PLL schopna reagovat v kyseleném prostředí endozomu, uniknout z něj a náklad pak může být rozptýlen v cytoplazmě buňky (Simonson a kol., 2019; Xiong a kol., 2017).

Na druhou stranu Amorim a kol. (2020) upozornili na to, že elektrostaticky zesíťené HA/PLL filmy obalující jiné nanostruktury, jsou při kontaktu s CD44 méně stabilní. Přitažlivé síly mezi CD44 a HA jsou silnější než mezi jednotlivými vrstvami filmu, který se následně může rozpadnout. Naopak filmy propojené pomocí síťovacích činidel (EDC a NHS) se ukázaly být stabilnější (Amorim a kol., 2020).

Při použití částic vyrobených pomocí elektrospreje s poměrem N:P 10:1 (n:n) bylo prokázáno, že hydrofilní léčiva jako vankomycin se z nosiče uvolní během prvních 4 h. Naopak hydrofobní doxorubicin difunduje z částice pomaleji po dobu až 48 h. V případě inkorporace velkých proteinů je uvolňování zahájeno až téměř po 24 h (Simonson a kol., 2019).

Pro účinnější zapouzdření hydrofobních léčivých látek využili Le a kol. (2022) molekuly HA ošetřené termosenzitivní látkou. Hydrofobní léčivo zde bylo smícháno přímo s roztokem HA a následně byl přidáván i roztok PLL. Při zvýšení teploty na 50 °C během sestavování nanočástic se termosenzitivní látka stala hydrofobnější, což zároveň vedlo i ke zvýšení hydrofobicity celé vznikající struktury, která ve vodném prostředí zmenšila svoji velikost. Hydrofobní interakce mezi termosenzitivní látkou a léčivem vedla i k vyšší inkorporaci léčiva. Naopak při ochlazení na laboratorní teplotu se velikost nosiče opět vrátila do původního stavu a léčivo zůstalo zapouzdřeno uvnitř. Takto připravené nosiče byly schopné internalizovat léčivé látky v daleko větším množství než např. nanočástice z HA a dextransu připravené stejným způsobem. Komerčně dodávané termosenzitivní činidlo navíc zvyšuje stabilitu částic v roztocích PBS (Le a kol., 2022).

Druhým způsobem využití nanomateriálů je přenos genetické informace. Např. při nádorových onemocněních prsu lze terapii cílit i na snížení exprese Bcl-2 (B-cell lymphoma) proteinu, který může zvyšovat rezistenci buněk k proapoptotickým mechanismům (Djafari a kol., 2020). Djafari a kol. (2020) navrhli nanočástice, jejichž jádro tvořil PLL modifikovaný imidazolem a mikroRNA (miRNA), zatímco povrch byl potažen HA. Pro kompletní začlenění nukleové kyseliny do částice bylo zapotřebí dostatečného množství PLL, a to až 20násobek v porovnání s miRNA. Přestože pro vazbu k povrchu rakovinných buněk byla důležitá HA, pohlcení nanomateriálu buňkami záviselo hlavně na množství PLL. K nejvýraznějšímu snížení exprese Bcl-2 proto docházelo hlavně u nosičů s optimálním množstvím a poměrem HA, PLL a nukleové kyseliny (Djafari a kol., 2020).

Vysokou schopnost pohlcování HA/PLL nanočástic s nukleovou kyselinou (DNA) vykazovaly i buňky lidských embryonálních ledvin. Dokonce s rostoucí koncentrací podaných nanomateriálů, resp. DNA, rostla u buněk i schopnost jejich pohlcení (Souri a kol., 2022).

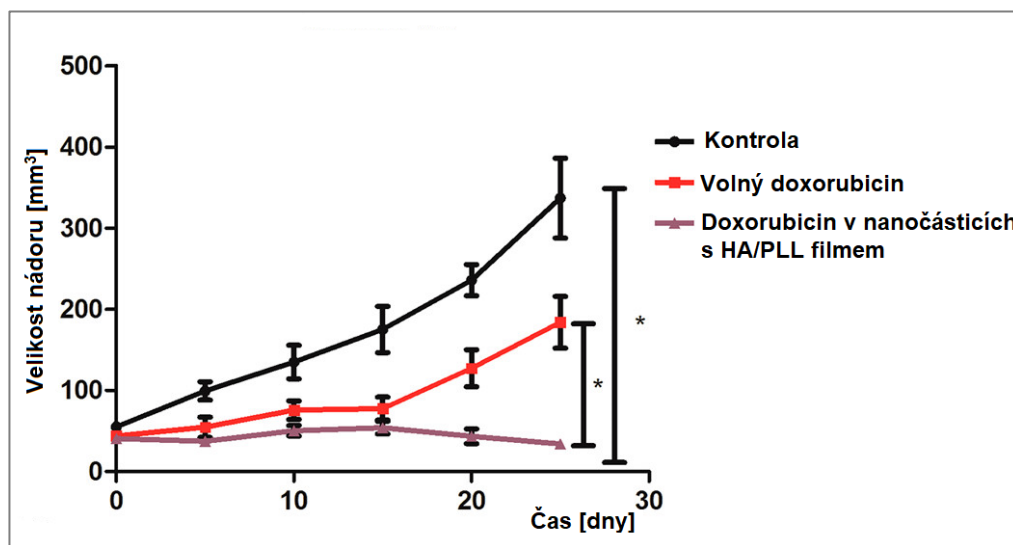
Xiaong a kol. (2017) popsali, že pro ještě komplexnější léčbu nádorů je výhodná kombinace nukleové kyseliny spolu s chemoterapeutikem. Při začlenění oligoRNA spolu s doxorubicinem, cyklodextrinem a PLL do jádra částic potažených HA bylo u hepatocelulárního karcinomu dosaženo velmi slibných výsledků, a to jak v testech *in vitro*, tak i *in vivo* na myších modelech. Léčiva vázána do těchto nosičů mohou na rozdíl od volných molekul RNA nebo doxorubicinu efektivně a ve větší míře vstupovat do nádorových buněk. Dokonce byla zaznamenána vyšší kumulace i retence HA/PLL nosičů přímo v nádoru, zatímco nanočástice, které obsahovaly pouze léčivé látky a PLL, byly detekovány v celé jaterní tkáni i v ledvinách. Uvolnění léčiva z nosiče bylo řízeno změnou pH. Největší množství přenášených látek se uvolnilo během 144 h při pH 5, naopak za fyziologických podmínek (pH = 7) byla míra uvolnění výrazně nižší (Xiong a kol., 2017).

Velmi podobný trend je popsán i u HA/PLL mikrokapslí. Při pH 5 je struktura HA/PLL filmu nejvíce rozvolněná, takže požadovaná látka může být buď začleněna dovnitř, nebo uniknout ven. Za těchto podmínek se přenášený náklad uvolní nárazově za méně než 1 h, zatímco při pH 7 je uvolňování pomalejší, plynulejší a k úplnému vyprázdnění mikrokapslí dojde až po 5 h, což je výhodné pro použití v živých organismech. Uvolňování lze také urychlit působením hyaluronidázy (Lee a kol., 2007).

Pulakkat a kol. (2016) zase pro cílenou chemoterapii vytvořili nanočástice přímo z doxorubicinu a hovězího sérového albuminu (bovine serum albumine, BSA), které zesíl'ovali pomocí glutaraldehydu. Na jejich povrch byly poté nanášeny dvě vrstvy HA/PLL elektrostaticky sestaveného filmu. Bylo zajímavé, že film zpomaloval uvolňování doxorubicinu

z částice při fyziologickém a mírně i v kyselém pH. Hodnota pH totiž ovlivňuje počet nabitých funkčních skupin jednotlivých polymerů a sílu jejich vzájemné elektrostatické interakce. Při fyziologickém pH dochází k nejsilnější elektrostatické interakci, protože HA vystupuje jako plně deprotonovaný polyaniont, zatímco PLL jako plně protonovaný polykationt. Naopak při pH 4 karboxylové skupiny HA náboj ztrácí a díky tomu slábnou i elektrostatické interakce mezi polymery. Naopak k nejrychlejšímu uvolnění látky došlo v přítomnosti trypsinu (Pulakkat a kol., 2016).

I u těchto nosičů bylo prokázáno, že HA na povrchu zvyšuje interakci částic s buňkami a tím zvyšuje cytotoxicitu léčiva v porovnání s nosiči obalenými pouze PLL nebo volnými molekulami doxorubicinu. Nanočástice zároveň umožňují i specifitější cílení na nádorové buňky, vyšší kumulaci a retenci v nádorové masě. V porovnání s volným léčivem zde byla zaznamenána i vyšší koncentrace nanočástic v plazmě. Dokonce po pravidelném intravenózním podávání těchto nanomateriálů myším s indukovaným nádorovým onemocněním se velikost nádoru po 25 dnech snížila více jak 6krát oproti kontrole a více jak 3krát v porovnání s volným doxorubinem (viz Obrázek 11) (Pulakkat a kol., 2016).



Obrázek 11 – Vliv volného doxorubicinu a doxorubicinu v nanočásticích s HA/PLL filmem na velikost nádoru (převzato a upraveno z: Pulakkat a kol., 2016)

1.4.3 Hojení ran pomocí hyaluronan/poly-lysinových hydrogelů

Ve snaze urychlit a zefektivnit hojení ran Amato a kol. (2021) zařadili do HA/PLL nanogelů berberin, látku, která může působit bakteriostaticky a podporovat hojení ran

(Hu a kol., 2022). V této studii se 50 % berberinu obsaženého v HA/PLL nanočásticích uvolnilo z nosiče nárazově během prvních několika minut, zbytek difundoval pomaleji dalších cca 25 h. I přesto však bylo hojení rány velmi pomalé a k úplnému zacelení vůbec nedošlo. Naopak prázdné HA/PLL nanočástice zacelily ránu rychleji a úplně. Podle autorů mohlo dojít u nanostruktur s berberinem k interakci mezi HA a léčivem, což zabránilo k jejich působení v místě poškození (Amato a kol., 2021).

Stejně tak i HA/PLL nanovlákná mají vysoký předpoklad k efektivnímu hojení ran. Materiály vyrobené z těchto nanovláken jsou schopné pojmout velké množství vody, tedy i exsudátu z poškozených tkání, navíc mají poměrně nízkou cytotoxicitu a vysokou biokompatibilitu (Yang a kol., 2021).

Zhou a kol. (2020) dokonce využili kombinaci HA a PLL jako tkáňová lepidla. K tomuto účelu byla HA nejprve modifikovaná dopaminem. Podle autorů byl nejvhodnější poměr jednotek dopaminu k HA 0,47. Mezi dva pláty vepřové kůže byl poté nanesen 0,1% roztok PLL a následně i 2% roztok modifikované HA spolu s peroxidem vodíku a křenovou peroxidázou, které působily jako síťovací činidla. Hydrogel tak vznikal přímo v určeném místě. Ukázalo se, že přítomný PLL byl schopný pronikat jak do vznikajícího hydrogelu, tak i do kůže, díky čemuž tato tkáňová lepidla prokázala, na rozdíl od čistých HA hydrogelů, vyšší schopnost adheze ke kůži, a navíc i vysokou biokompatibilitu (Zhou a kol., 2020).

1.4.4 Kultivace buněk na hyaluronan/poly-lysinových materiálech

Bylo zjištěno, že křemíkové nanočástice potažené HA/PLL dvojvrstvou lze potencionálně využít i v regenerativní medicíně. Lidské mezenchymové kmenové buňky v jejich přítomnosti vykazovaly vyšší schopnost osteogenní diferenciace, tedy transformace na buňky, které by měly být schopné syntetizovat kostní hmotu (Amorim a kol., 2014).

Tian a kol (2005) zase ukázali, že HA/PDL hydrogely jsou vhodné jako scaffoldy pro kultivaci nervových buněk a potenciálně i jako implantáty při traumatech mozku. Na rozdíl od HA hydrogelů, na které nervové buňky *in vitro* téměř nepřisedaly, na povrchu HA/PDL materiálů bylo zaznamenáno nejen přisednutí buněk, ale již během 24h kultivace i schopnost buněk se diferenciovat. Buňky postupně pokrývaly větší plochu a začaly se propojovat pomocí axonů. V případě implantace tohoto materiálu do poškozených míst mozku myši se hydrogel začlenil do tkáně, byl postupně osidlován buňkami, po 6 týdnech byl postupně degradován a na jeho místě vznikala nová tkáň. Navíc zde nebyla patrná žádná gliová jizva (Tian a kol., 2005).

Podobných výsledků dosáhli i Wei a kol. (2010), kteří nahradili PDL za PLL. Pro rychlejší obnovu nervových buněk byl hydrogel modifikován ještě protilátkou antiNgR a následně byl aplikován do poškozeného míšního kanálu krysy. Po několika týdnech byla znatelná obnova tkání i cév (Wei a kol., 2010).

Zajímavé je, že při použití dvojitě zesíťovaných HA/PLL hydrogelů jako scaffoldů se s rostoucí délkou kultivace mění jejich mechanické vlastnosti, hlavně se zvyšuje tlakové napětí, zatímco objem zůstává přibližně stejný. Ukázalo se, že tato vlastnost pozitivně ovlivňuje buňky. Fibroblasty kultivované na těchto scaffoldech byly schopné se poměrně rychle dělit, migrovat, v průběhu času dokonce tvořily sféroidy nebo jinak měnily svoji morfologii (Guo a kol., 2021).

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přístrojové vybavení a pomůcky

- Analytické váhy Kern ABT (Kern, Německo)
- Analyzátor velikosti a zeta potenciálu nanočástic Nano-Partica SZ-100 (Horiba Ltd., Japonsko)
- Automatické mikropipety Eppendorf (Eppendorf, Německo)
- Fluorimetr Quibit™ 2.0 (Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific, USA)
- Laboratorní váhy Kern PCB (Kern, Německo)
- Minicentrifuga (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Rotátor Bio RS-24 (Biosan Ltd., Lotyšsko)
- pH metr Orion (Boeco, Německo)
- UV/VIS spektrofotometr Libra S22 (Biochrom Ltd., UK)
- Ultracentrifugační filtr Amicon® Ultra 10 K, 0,5 ml (Merck Millipore Ltd., Irsko)
- Stanice pro denzitometrické vyhodnocení gelů ChemiDoc XRS+ Systém (Bio-Rad, USA) se softwarem ImageLab™ (Bio-Rad, USA)
- Stanice pro výrobu utračisté vody Halios (NEPTEC GmbH, Německo)
- Inkubátor - termoblok Bio BRD-100 (Grant Bio, Lotyšsko)
- Třepačka PSU-20i (Biosan Ltd, Lotyšsko)
- Rotační vakuový koncentrátor RVC 2-18 CDPLUS CHRIST (Martin Christ, Německo)
- Mini-PROTEAN® Tetra Cell pro vertikální elektroforézu (Bio-Rad, USA)
- Magnetické míchadlo MSH 300-N (Biosan Ltd. Lotyšsko)
- Vortex Biovortex V1 (Biosan Ltd., Lotyšsko), Velp Scientific (Velp Scientific Srl., Itálie)

2.2 Výroba nanočástic z kyseliny hyaluronové a poly-L-lysinu

2.2.1 Použité chemikálie a pomůcky

- Sodná sůl kyseliny hyaluronové (HA, zdroj *Streptococcus equi*, Mw 1,5 – 1,8 MDa, Sigma-Aldrich, USA)
- Aceton (p.a. Penta, Chrudim)
- 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid (EDC, Thermo Fisher Scientific, USA)
- Dihydrazid kyseliny adipové (AAD, Sigma-Aldrich, USA)
- Poly-L-lysin hydrobromid (PLL, Mw 30 000 – 70 000 Da, Sigma-Aldrich, USA)
- Dialyzační střívka (cut-off 12,5 – 13 kDa, Sigma-Aldrich, USA)
- Chlorid sodný (NaCl, Lach-Ner, ČR)

2.2.2 Použité roztoky a jejich příprava

- **Zásobní roztok HA (2,5 mg/ml)** – 50 mg hyaluronanu sodného bylo rozpuštěno ve 20 ml ultračisté vody. Bobtnání probíhalo při laboratorní teplotě za mírného míchání přes noc. Takto připravený roztok mohl být skladován při 4°C.
- **Roztok PLL 1 (2,5 mg/ml)** – 8,86 mg PLL bylo rozpuštěno v 3,54 ml ultračisté vody. Pro důkladné rozpuštění byl roztok míchán přes noc (alespoň 12 h) na rotátoru.
- **Roztok PLL 2 (1 mg/ml)** – roztok byl připraven vždy těsně před použitím naředěním roztoku PLL 1 ultračistou vodou.
- **Roztok EDC 1 (1,2 mg/30 µl)** – roztok byl připraven vždy těsně před použitím rozpuštěním odpovídající navážky EDC v ultračisté vodě a důkladně promíchán.
- **Roztok EDC 2 (1 mg/200 µl)** – roztok byl připraven pro vazbu PLL na povrch HANPs, vždy těsně před použitím bylo EDC rozpuštěno v ultračisté vodě a důkladně promícháno.
- **Roztok AAD (1,2 mg/30 µl)** – roztok byl připraven vždy těsně před použitím rozpuštěním odpovídající navážky AAD v ultračisté vodě a důkladně promíchán.
- **Fyziologický roztok (9 mg/ml)** – roztok byl vždy připraven těsně před použitím rozpuštěním odpovídající navážky NaCl v destilované vodě.

2.2.3 Příprava 1: nanočástice z kyseliny hyaluronové připravené chemickým zesítním pomocí karbodiimidu a dihydrazidu kyseliny adipové

Postup výroby:

Pro výrobu chemicky síťovaných nanočástic (nanogelů) z HA pomocí EDC a AAD byl využit zavedený a optimalizovaný protokol. Pro přípravu 3 mg nanočástic bylo do skleněné lahvičky s teflonovým víčkem pipetováno 1,2 ml roztoku HA (3 mg). Poté bylo za stálého míchání přikapáno 2,04 ml acetonu, následovala 15min inkubace na rotátoru při laboratorní teplotě. Ve druhém kroku bylo opět za stálého míchání přikapáno 30 μ l roztoku EDC 1, směs byla promíchána a poté bylo stejným způsobem přidáno 30 μ l roztoku AAD. Následovala 30min inkubace na rotátoru při laboratorní teplotě. Nakonec bylo při stálém míchání postupně přikapáno $3 \times 1,22$ ml acetonu, po každém přidavku proběhla vždy 30min inkubace (laboratorní teplota, rotátor).

Po poslední inkubaci byl roztok převeden do 15ml centrifugačních zkumavek a přebytečný aceton byl odpařen při 50°C po dobu 15 min ve vakuovém koncentrátoru. Zakoncentrovaný vzorek byl přenesen do dialyzačních střev.

Dialýza do fyziologického roztoku probíhala nejprve 20 min při laboratorní teplotě na třepačce, následně byl fyziologický roztok vyměněn za čerstvý a dialýza pokračovala za stejných podmínek cca 16 h.

2.2.4 Příprava 2: nanočástice z kyseliny hyaluronové a poly-L-lysinu připravené chemickým zesítním pomocí karbodiimidu

Postup výroby:

Tento postup byl z části inspirován protokolem, který použil Tian a kol. (2005), a upraven na podmínky pro výrobu čistých HA nanočástic (viz kapitola 2.2.3).

K 1,2 ml roztoku HA (3 mg) ve skleněné lahvičce bylo nejprve po kapkách a za stálého míchání přidáno 2,04 ml acetonu. Po 15min inkubaci (laboratorní teplota, rotátor) bylo opět za stálého míchání přikapáno 30 μ l roztoku EDC 1. Po 5 nebo 15min aktivaci karboxylových skupin HA bylo stejným způsobem přidáno i 480 μ l, 240 μ l nebo 40 μ l roztoku PLL 1 (1200 μ g, 600 μ g nebo 100 μ g). Následovala inkubace 30 min (laboratorní teplota, rotátor), po které bylo postupně přidáno $3 \times 1,22$ ml acetonu, po každém přidavku proběhla vždy 30min inkubace. Roztok byl vždy důkladně homogenizován na rotátoru při laboratorní teplotě.

Následně byl roztok nanočástic převeden do 15ml centrifugačních zkumavek a přebytečný aceton byl odstraněn odpařením při 50 °C po dobu 15 min ve vakuovém koncentrátoru. Zakoncentrovaný vzorek byl převeden do dialyzačních střev.

Dialýza do fyziologického roztoku probíhala nejprve 20 min při laboratorní teplotě na třepače, poté byl fyziologický roztok vyměněn na čerstvý a dialýza pokračovala za stejných podmínek přibližně 16 h.

2.2.5 Příprava 3: nanočástice z kyseliny hyaluronové a poly-L-lysinu připravené chemickým zesítním pomocí karbodiimidu

K 1,2 ml roztoku HA (3 mg) bylo pomalu a za stálého promíchávání přidáno 2,04 ml acetonu. Po 15min důkladné homogenizaci na rotátoru při laboratorní teplotě bylo pomalu přikapáno 100 µl roztoku PLL 2 (100 µg) nebo 10 µl roztoku PLL 1 (25 µg). Po 15min společné inkubaci (laboratorní teplota, rotátor) bylo opět za stálého míchání přidáno 30 µl roztoku EDC 1. Následovala 30min inkubace (laboratorní teplota, rotátor) a po ní 3 přídavky 1,22 ml acetonu. Mezi jednotlivými přídavky byl roztok vždy 30 min homogenizován (laboratorní teplota, rotátor).

Takto připravený vzorek byl převeden do 15ml centrifugační zkumavky, přebytečný aceton byl odpařen ve vakuovém koncentrátoru při 50°C po dobu 15 min ve vakuovém koncentrátoru. Následně byl zakoncentrovaný roztok převeden do dialyzačních střev.

Dialýza probíhala do fyziologického roztoku nejprve 20 min na třepače, poté byl fyziologický roztok vyměněn za čerstvý a dialýza pokračovala dalších cca 16 h.

2.2.6 Příprava 4: nanočástice z kyseliny hyaluronové a poly-L-lysinu připravené chemickým zesítním pomocí karbodiimidu a dihydrazidu kyseliny adipové

K 1,2 ml roztoku HA (3 mg) bylo po kapkách přidáno 2,04 ml acetonu. Po 15min inkubaci (rotátor, laboratorní teplota) bylo za stálého míchání přikapáno 30 µl roztoku EDC 1 a následovalo opět 15 min inkubace (laboratorní teplota, rotátor). Paralelně s touto inkubací byl připraven roztok:

1. 27,5 µl roztoku AAD a 40 µl roztoku PLL 1 (100 µg)
nebo
2. 29,4 µl roztoku AAD a 10 µl roztoku PLL 1 (25 µg)

Roztok AAD s PLL byl 15 min inkubován při laboratorní teplotě za stálého míchání, poté byl velmi pomalu a při intenzivním míchání přikapáván do reakční směsi s HA. Po další 30min

inkubaci (laboratorní teplota, rotátor) bylo opět přidáno $3 \times 1,22$ ml acetonu. Po každém přidavku byl roztok opět 30 min homogenizován na rotátoru při laboratorní teplotě.

Takto připravený roztok byl převeden do centrifugačních zkumavek a na 15 min vložen do vakuového koncentrátoru vytemperovaného na 50 °C. Po odpaření přebytečného acetonu byl vzorek přenesen do dialyzačních střev.

Dialýza do fyziologického roztoku probíhala nejprve 20 min při laboratorní teplotě na třepačce, poté byl fyziologický roztok vyměněn a dialýza pokračovala ještě cca 16 h.

2.2.7 Příprava 5: vazba poly-L-lysinu na povrch nanočástic z kyseliny hyaluronové

K 1 mg HANPs (připravených podle kapitoly 2.2.3) bylo nejprve přidáno 200 µl roztoku EDC 2, směs byla krátce promíchána na rotátoru. Následně bylo přikapáno buď 33,3 µl roztoku PLL 2 (33,3 µg), nebo 3,30 µl roztoku PLL 1 (8,3 µg). Směs HANPs, EDC a PLL byla následně inkubována přes noc na rotátoru při teplotě 4 °C.

Jednotlivé objemy přidávaných roztoků byly sečteny a následně byla vypočítaná celková koncentrace nanočástic a uvedena v mg/ml.

2.2.8 Příprava 6: nanočástice připravené chemickým zesíťením poly-L-lysinu pomocí karbodiimidu a dihydrazidu kyseliny adipové

Postup je shodný s postupem pro přípravu HANPs (kapitola 2.2.3) s malými úpravami. Přidávky všech reagentů byly přepočítány na přípravu pouze 250 µg nanočástic, tzn., že v prvním kroku bylo ke 100 µl roztoku PLL 1 (250 µg) přidáno 170 µl acetonu. Následovala 15min inkubace při laboratorní teplotě na rotátoru. Podobně byly upraveny i koncentrace EDC a AAD. Aby byl zachován stejný poměr těchto látek k polymeru, bylo nutné rozpustit 100 µg EDC nebo AAD v 5 µl ultračisté vody. Vždy 5 µl takto připraveného roztoku EDC a AAD bylo po kapkách a za stálého míchání přidáno do reakční směsi, která byla poté 30 min inkubována při laboratorní teplotě na rotátoru. Následně 3 přidávky acetonu byly redukovány z 1,22 ml pouze na 101,6 µl. Mezi jednotlivými přidávkami byla pouze 15 min inkubace (rotátor, laboratorní teplota).

Zakoncentrování ve vakuovém koncentrátoru bylo díky malému objemu zkráceno na 5 min (50 °C) a následně byl roztok převeden do dialyzačních střev.

Dialýza probíhala opět nejprve 20 min při laboratorní teplotě na třepačce, po výměně fyziologického roztoku pak ještě dalších cca 16 h.

2.3 Metody charakterizace připravených nanočástic

2.3.1 Měření velikosti nanočástic pomocí dynamického rozptylu světla

Použité roztoky a pomůcky:

- Fyziologický roztok
- 2-stěnné kyvety, objem 2,5 ml, BRAND (BRAND GmbH + CO KG, Německo)

Postup:

K analýze bylo použito alespoň 1,2 ml vzorku převedeného do 2-stěnné kyvety. Každý vzorek byl 10krát proměřen při laboratorní teplotě v módu „particle size“. V případě potřeby byly vzorky naředěny fyziologickým roztokem na přibližně stejnou koncentraci.

2.3.2 Měření zeta potenciálu nanočástic

Použité chemikálie, roztoky a pomůcky:

- Fyziologický roztok
- Ultračistá voda
- 96% ethanol (Penta, ČR)
- Kyveta pro měření zeta potenciálu (Horiba Ltd, Japonsko)

Postup:

Kyveta pro měření zeta potenciálu byla nejprve důkladně promyta ultračistou vodou. Všechny vzorky určené k analýze byly naředěny fyziologickým roztokem na stejnou koncentraci, aby mohly být výsledky porovnány mezi sebou, následně byly důkladně promíchány a pomocí injekční stříkačky nadávkovány do kyvety. Měření probíhalo vždy 10krát s 10s pauzou mezi jednotlivými analýzami téhož vzorku v módu „zeta potential“. Mezi dávkováním jednotlivých vzorků byla cela propláchnuta ultračistou vodou popř. 96% ethanolem, aby se zabránilo ulpívání PLL na elektrodách.

2.3.3 Polyakrylamidová gelová elektroforéza

Použité chemikálie:

- Akrylamid (Sigma-Aldrich, USA)
- Bromfenolová modř (Lachema, ČR)
- Dodecylsulfát sodný (SDS, Lachema, ČR)
- Glycin (Sigma-Aldrich, USA)
- Glycerol (Penta, ČR)
- Kyselina chlorovodíková 35% (HCl, Penta, ČR)
- Proteinový standard molekulových hmotností – Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards, 10 – 250 kDa, (Bio-Rad, USA)
- N,N'-methylenbisakrylamid (Sigma-Aldrich, USA)
- N,N,N,N-tetramethylenethylendiamin (TEMED, Bio-Rad, USA)
- Persíran amonný (Lachema, ČR)
- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris, Sigma-Aldrich, USA)

Použité roztoky, jejich příprava a objemy pro přípravu gelů:

- 6M HCl
- **Roztok A (29,2% akrylamid, 0,8%N,N'-methylenbisakrylamid)** – 8,77 g akrylamidu a 0,24 g bisakrylamidu bylo nejprve rozpuštěno v 15 ml destilované vody. Po 30 min bobtnání byl roztok doplněn na objem 30 ml.
- **Roztok B (1,5M Tris-HCl pufr, pH = 8,8)** – 5,45 g Tris bylo rozpuštěno ve 30 ml destilované vody. Následně bylo upraveno pH pomocí 6M HCl na pH 8,8.
- **Roztok C (1M Tris-HCl pufr, pH = 6,8)** – 4,87 g Tris bylo rozpuštěno ve 40 ml destilované vody. Opět bylo upraveno pH 6M HCl na pH 6,8.
- **Roztok D (10% SDS)** – 1,02 g SDS bylo rozpuštěno v 10 ml destilované vody.
- **Roztok E (10% persíran amonný)** – 0,11 g persíranu amonného bylo rozpuštěno v 1 ml destilované vody. Tento roztok byl vždy připraven těsně před použitím.
- **Elektrodový pufr s SDS (0,025M Tris, 0,192M glycin, 0,1% SDS, pH = 8,3 – 8,6)** – v 1 l destilované vody bylo rozpuštěno 3,04 g Tris, 14,44 g glycinu a 0,99 g SDS. Opět bylo pH upraveno pomocí 6M HCl.

- **Elektrodový pufr bez SDS (0,025M Tris, 0,192M glycin)** – 3,04 g Tris a 14,43 g glycinu bylo rozpuštěno v 1 l destilované vody. V tomto případě nebylo pH nijak upravováno.
- **Vzorkový pufr pro nativní elektroforézu (1% bromfenolová modř, 62,5mM Tris-HCl, 25% glycerol)** – 5 ml pufru bylo připraveno smícháním 312,5 µl roztoku C, 1 ml 5% roztoku bromfenolové modři, 1,26 ml glycerolu a 2,43 ml ultračisté vody.
- **Vzorkový pufr „G“** – Laemmli Sample Buffer, (Bio-Rad, USA) bez přídavku merkaptoethanolu.

Tabulka 1 – Roztoky a jejich objemy pro přípravu dělicího a zaostřovacího gelu pro jednotlivé typy elektroforézy

	12% dělicí gel [ml]	5% zaostřovací gel [ml]
Destilovaná voda	1,68	1,4
Roztok A	2	0,33
Roztok B	1,25	0,25
Roztok C	-	0,25
Roztok D	0,05	0,02
TEMED	0,002	0,002
Roztok E	0,05	0,02

Diskontinuální polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsulfátu sodného a glycinu

Postup SDS-PAGE:

Skla pro přípravu gelů byla důkladně očištěna a vložena do speciálního držáku. Do zkumavky byly pipetovány roztoky A, B, D, E, TEMED a destilovaná voda v objemech pro přípravu 12% dělicího gelu (viz Tabulka 1). Směs byla promíchána a nanášena mezi skla tak, aby hladina sahala cca 1 – 1,5 cm pod horní okraj skel. Dělicí gel byl převrstven destilovanou vodou. Po 20 min byla voda z povrchu zpolymerovaného gelu odsáta filtračním papírem. Ve zvláštní zkumavce byly smíchány roztoky A, C, D, E, TEMED a destilovaná voda v objemech pro přípravu 5% zaostřovacího gelu (viz Tabulka 1), směs byla opatrně promíchána a nanášena mezi ztuhlý dělicí gel a horní okraj skel. Následně byla mezi skla opatrně vložena šablona pro vytvoření 10 jamek. Polymerace zaostřovacího gelu trvala cca 20 min.

Následně byla z gelu opatrně vyjmuta šablona, tak aby nedošlo k poškození jamek. Skla s hotovým gelem byla přenesena do stojánku s elektrodami, který byl poté vložen do elektroforetické vany. Elektrodoým pufrem byla vyplněna mezera mezi gely a pomocí pipety jím byly propláchnuty i jednotlivé jamky v gelu.

Vzorky určené k elektroforéze byly smíchány se vzorkovým pufrem G v poměru 1:1 (10 μ l + 10 μ l), důkladně promíchány, zcentrifugovány a 3 min inkubovány při 100 °C v termobloku. Po inkubaci byly vzorky opět zcentrifugovány a ochlazeny na laboratorní teplotu. Následně bylo vždy 10 – 20 μ l vzorku (dle potřeby) dávkováno pomocí Gel Loading špiček do jamek v gelu. Proteinový standard molekulových hmotností byl nanášen na gel v objemu 4 μ l bez předchozí úpravy.

Pro jeden gel byly nastaveny tyto podmínky: napětí 180 V, proud 30 mA (v případě separace více gelů se proud násobil jejich počtem). Separace následně probíhala přibližně 45 min. Následně byl gel obarven roztokem amoniakálního stříbra (viz kapitola 2.3.4)

Nativní elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v diskontinuálním uspořádání

Postup:

Příprava gelů i elektroforetické aparatury byla shodná s postupem pro SDS-PAGE. Na přípravu 12% dělicího gelu a 5% zaostřovacího gelu byly podle Tabulky 1 použity pouze roztoky A, B, E, TEMED a destilovaná voda v odpovídajících objemech. Separace probíhala v prostředí elektrodového pufru bez SDS.

Vzorky určené k analýze byly smíchány se vzorkovým pufrem určeným pro nativní elektroforézu v poměru 1:1 (10 μ l + 10 μ l), důkladně promíchány a zcentrifugovány. Vždy 10 – 20 μ l (dle potřeby) vzorku a 4 μ l proteinového standardu molekulových hmotností bylo pomocí Gel Loading špiček pipetováno do jednotlivých jamek v gelu.

Pro separaci jednoho polyakrylamidového gelu byly zvoleny tyto podmínky: napětí 180 V, proud 30 mA. Elektroforetická separace probíhala přibližně 45 min. Gely byly následně vyjmuty ze skel a obarveny roztokem amoniakálního stříbra (viz kapitola 2.3.4).

Kombinace nativní gelové elektroforézy a SDS-PAGE v diskontinuálním uspořádání

Postup:

Pro přípravu 12% dělicího gelu byla podle Tabulky 1 připravena směs smícháním stejných roztoků jako u SDS-PAGE v odpovídajících objemech. Pro 5% zaostřovací gel byly

smíchány roztoky A, C, D, E, TEMED, destilovaná voda nebo pouze A, B, E, TEMED a destilovaná voda v odpovídajících objemech (viz Tabulka 1). Polymerace jednotlivých gelů a příprava elektroforetické sestavy probíhala stejně jako v postupu SDS-PAGE. K separaci byl použit elektrodový pufr bez SDS.

Vzorky byly smíchány se vzorkovým pufrem pro nativní elektroforézu (bez SDS) v poměru 1:1, promíchány, zcentrifugovány a 3 min zahřívány při 100 °C v termobloku. Po druhé centrifugaci a ochlazení na laboratorní teplotu bylo vždy v 10 – 20 µl takto připravených vzorků pipetováno do jamek v gelu. Proteinový standard molekulových hmotností (4 µl) byl dávkován do jamek bez úpravy.

Pro separaci jednoho gelu byly nastaveny tyto podmínky: napětí 180 V, proud 30 mA. Separace trvala přibližně 45 min. Poté byl gel vyjmut ze skel a obarven amoniakálním stříbrem (viz kapitola 2.3.4).

2.3.4 Barvení gelu pomocí roztoku amoniakálního stříbra

Použité chemikálie:

- 25 – 29% vodný roztok amoniaku (Penta, ČR)
- Dusičnan stříbrný (AgNO₃, Penta, ČR)
- Ethanol (Lach-Ner, ČR)
- 36 – 38% vodný roztok formaldehydu (Penta, ČR)
- 50% glutaraldehyd (Sigma-Aldrich, USA)
- Hydroxid sodný (NaOH, Penta, ČR)
- Bezvodá kyselina citronová (Penta, ČR)
- 99% kyselina octová (CH₃COOH, Lach-Ner, ČR)

Použité roztoky a jejich příprava:

- **10% roztok glutaraldehydu** – na jeden gel bylo smícháno 10 ml 50% glutaraldehydu se 40 ml destilované vody.
- **Fixační roztok (5% kyselina octová, 50% ethanol)** – roztok byl připraven smícháním 50 ml ledové kyseliny octové, 500 ml ethanolu a 450 ml destilované vody.
- **Roztok amoniakálního stříbra** – pro přípravu 20% AgNO₃ byly rozpuštěny 2 g AgNO₃ v 10 ml destilované vody. Následně byl tento roztok po kapkách přidáván

k 10,5 ml destilované vody s 0,7 ml vodného roztoku amoniaku a 119,5 μ l 9M NaOH. Po vzniku slabě hnědého zákalu byl roztok doplněn destilovanou vodou na objem 50 ml.

- **Ustalovací roztok (5% kyselina octová)** – roztok byl připraven smícháním 50 ml ledové kyseliny octové s 1 l destilované vody.
- **Vyvolávací roztok (0,05% kyselina citronová, 0,04% formaldehyd)** – do 500 ml destilované vody bylo přidáno 250 mg kyseliny citronové a 540 μ l 37% formaldehydu.

Postup barvení:

Po uvolnění ze skel byl gel přenesen do Petriho misky a přibližně 1 min za mírného míchání proplachován v destilované vodě. Následně byla destilovaná voda vyměněna za fixační roztok a gel byl 30 min za stálého míchání fixován. Následovala 30 min inkubace v roztoku 10% glutaraldehydu na třepačce a poté 6×10 min proplach destilovanou vodou. Po promytí byl gel následně ponořen do roztoku amoniakálního stříbra. Po 15min inkubaci na třepačce byl gel opět propláchnut destilovanou vodou a vyvoláván ve vyvolávacím roztoku, dokud nebyl zřetelně viditelný standard molekulových hmotností a jednotlivé vzorky. Poté byl gel přenesen do ustalovacího roztoku, v němž může být při 4 °C skladován.

2.3.5 Spektrofotometrie v UV-VIS oblasti

Použité roztoky:

- Fyziologický roztok
- Kyveta skleněná s optickou dráhou 10 mm (Hellma ® GmbH + CO KG, Německo)

Postup měření:

Pro určení vhodné vlnové délky pro měření absorpance jednotlivých vzorků byla nejprve proměřena absorpční spektra čistého vodného roztoku PLL, HA, zesíťovaného PLL, HANPs, HA/PLL nanočástic a HANPs s PLL vázaným na povrchu. Spektra byla měřena v rozmezí vlnových délek 190 – 600 nm.

Následně byly všechny vzorky před analýzou naředěny fyziologickým roztokem na stejnou koncentraci, důkladně promíchány na vortexu a poté bylo vždy 400 μ l roztoku nanočástic pipetováno do kyvety. Každý vzorek byl proměřen 10krát a mezi jednotlivými měřeními byl promíchán. Z naměřených hodnot byl vypočítán aritmetický průměr.

2.3.6 Stanovení koncentrace proteinů pomocí fluorimetru Quibit™ 2.0

Použité chemikálie a pomůcky:

- Quibit™ Protein Assay Kit (mez detekce: 0,25 – 5 µg) (Invitrogen™, USA)
 - Quibit™ Protein Reagent
 - Quibit™ Protein Buffer
 - Quibit™ Protein Standard 1
 - Quibit™ Protein Standard 2
 - Quibit™ Protein Standard 3

Postup měření:

Před samotnou analýzou musí být všechny reagentie i vzorky vytemperovány na pokojovou teplotu.

Nejprve byl připraven pracovní roztok smícháním reagentie a pufru v poměru 1:200. Tzn., že k analýze 1 vzorku/standardu bylo potřeba 1 µl reagentie a 199 µl pufru. Pro n-počet vzorků bylo potřeba $1 \times n$ µl reagentie a $199 \times n$ µl pufru.

Před samotným měření vzorků bylo nutné fluorimetr kalibrovat. Ke 190 µl pracovního roztoku bylo přidáno 10 µl jednotlivých standardů, roztoky byly krátce promíchány na vortexu a inkubovány 15 min ve tmě. Následně byly takto připravené standardy postupně proměřeny.

Vzorky byly připraveny smícháním 180 µl pracovního roztoku a 20 µl vzorku. Poté byly opět krátce promíchány na vortexu a 15 min inkubovány v temnu. Následně byly proměřeny na fluorimeru s nastaveným analyzovaným objemem vzorku (20 µl). Byla odečtena celková koncentrace proteinů jak ve 20 µl vzorku, tak i původním objemu. Výsledná koncentrace byla udávána v µg/ml.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem experimentální části bylo zavést a optimalizovat metodu přípravy nanočástic z HA v kombinaci s PLL, která se bude opírat o již zavedený postup přípravy HANPs. Důvodem přípravy nanočástic modifikovaných PLL bylo zamýšlené použití *in vivo* v rámci dlouhodobé spolupráce s Katedrou radiobiologie, Fakulty vojenského zdravotnictví, Univerzity obrany v Hradci Králové, kde byly již připravené HANPs testovány na myších modelech a byl sledován jejich radioprotektivní účinek. Poly-lysin byl pro kombinaci s HA vybrán na základě jeho schopnosti zvyšovat interakci s buněčnou membránou (Gorman a kol., 2020; Djafari a kol., 2020).

Vyzkoušeli jsme jak metodu fyzikálního síťování HA a PLL na základě elektrostatických interakcí, tak chemického pomocí síťovacích činidel (EDC a AAD). Vedle toho byla zkoušena i post-syntetická modifikace předem připravených HANPs pomocí PLL. Během jednotlivých experimentů byly testovány různé poměry mezi oběma polymery. Cílem bylo připravit nanočástice s velikostí do 150 nm a nízkým indexem polydisperzity. Byl kladen důraz na reprodukovatelnost zavedené metody.

Jako základní metoda pro ověření tvorby nanočástic bylo použito měření velikosti pomocí dynamického rozptylu světla (dynamic light scattering, DLS) na analyzátoru Nano-Partica SZ-100 (Horiba Ltd., Japonsko). Metoda je založena na snímání intenzity rozptýleného světelného paprsku v čase. Nanočástice se v roztoku pohybují vlivem Brownova pohybu. Čím je částice menší, tím rychleji se pohybuje, což se promítne v intenzitě rozptýleného světla. Analyzátor z těchto dat pak vypočítá hydrodynamickou velikost nanočástic (Stetefeld a kol., 2016).

Ve výsledcích jsou vždy uváděny hydrodynamické průměry (velikost) částic ve formě z-average, což je průměrná distribuce velikostí částic vážená intenzitou rozptýleného světla (Stetefeld a kol., 2016). Dále je uveden index polydisperzity (polydispersity index, PDI), který vyjadřuje distribuční šíři hydrodynamických průměrů (Ramos a kol., 2017). Pokud je PDI v rozmezí 0 – 0,7, jedná se o monodisperzní systém. Při $PDI > 0,7$ je systém polydisperzní (Stetefeld a kol., 2016).

3.1 Příprava 1: nanočástice z kyseliny hyaluronové zesítné chemicky pomocí karbodiimidu a dihydrazidu kyseliny adipové

HANPs byly připraveny zesítním vysokomolekulární HA (zdroj *Streptococcus equi*, Mw 1,5 – 1,8 kDa) pomocí EDC a AAD, při kterém dochází nejprve k aktivaci karboxylových skupin HA pomocí EDC a k jejich následnému vzájemnému provázání díky aminoskupinám přítomným na AAD. Zvolený postup přípravy byl převzat z protokolu, který patentovali Hu a kol. (2004), a modifikován. Jako vhodné prostředí pro tvorbu nanočástic byl zde využit aceton. Díky jeho schopnosti rozrušovat vodíkové můstky udržující sekundární struktury nebo jiné prostorové konformace HA v roztoku a zároveň snižovat interakce mezi hydrofilní HA a vodou, je usnadněn přístup síťovacích činidel (Hu a kol., 2004).

Vzhledem k tomu, že byly HANPs vyrobené podle Přípravy 1 (Kapitola 2.2.3) dále modifikovány PLL, byla snaha o vytvoření co nejmenších základních částic. Na základě předchozích prací v naší laboratoři bylo zjištěno, že velikost nanočástic je ovlivněna délkou inkubace mezi jednotlivými přídávky acetonu a počtem přídávků. Byly použity vždy tři přídávky acetonu a doba inkubace mezi nimi byla vždy 30 min. Výsledkem byly nanočástice o velikosti $72,64 \pm 1,50$ nm. Tato velikost je menší, než publikovali Hu a kol. (2004) nebo Berkland a kol. (2013), kteří ve svých experimentech použili pouze jeden přídavek acetonu, zato ale několikanásobně prodloužili dobu inkubace.

Pro ověření reprodukovatelnosti byla příprava zopakována v 8 nezávislých experimentech. Každý vzorek byl 10krát proměřen pomocí DLS a následně byl vypočítán průměrný hydrodynamický průměr částic (velikost) uvedený ve formě z-average, směrodatná odchylka (SD) a PDI. V Tabulce 2 a 3 jsou uvedeny průměrné hydrodynamické průměry připravených nanočástic a PDI, závislost intenzity rozptýleného světla na hydrodynamickém průměru je uvedena v Grafu 1. Jak vyplývá z uvedených dat, PDI u každého vzorku bylo pod hodnotou 0,7, což potvrdilo monodisperzitu a uniformitu vyrobených částic.

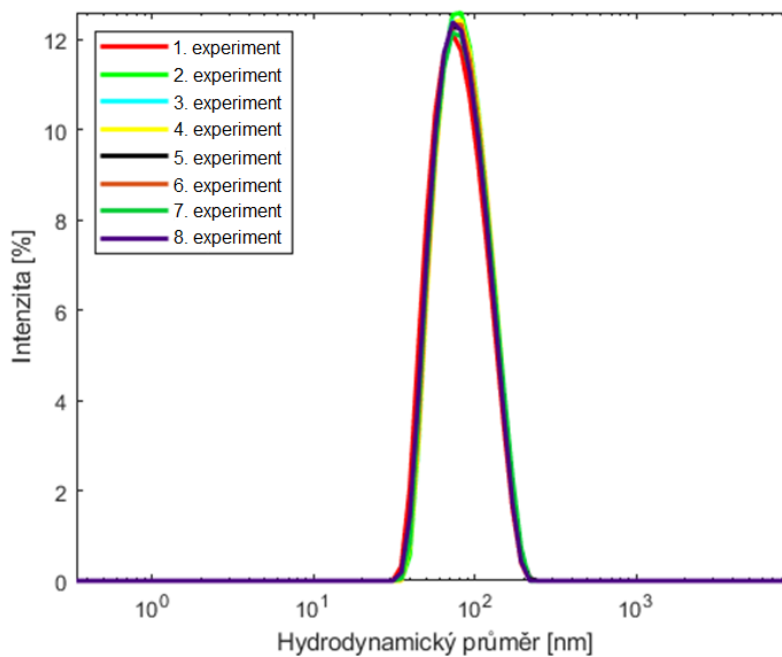
Z makroskopického hlediska se vždy jednalo o čiré roztoky, bez viditelného mléčného zákalu nebo sraženin.

Tabulka 2 – Průměrné hodnoty hydrodynamických průměrů a PDI u HANPs připravených dle Přípravy 1

	1. experiment	2. experiment	3. experiment	4. experiment
Hydrod. průměr [nm]	70,44	74,65	73,16	74,69
SD hydrod. průměru [nm]	1,01	0,71	0,91	0,67
PDI	0,16	0,18	0,17	0,20
SD PDI	0,02	0,03	0,03	0,02

Tabulka 3 – Průměrné hodnoty hydrodynamických průměrů a PDI u HANPs připravených dle Přípravy 1

	5. experiment	6. experiment	7. experiment	8. experiment
Hydrod. Průměr[nm]	72,16	72,34	71,18	72,50
SD hydrod. průměru [nm]	1,26	0,67	0,55	0,45
PDI	0,24	0,21	0,15	0,20
SD PDI	0,04	0,03	0,03	0,02



Graf 1 – Závislost intenzity rozptýleného světla na hydrodynamickém průměru HANPs připravených dle Přípravy 1

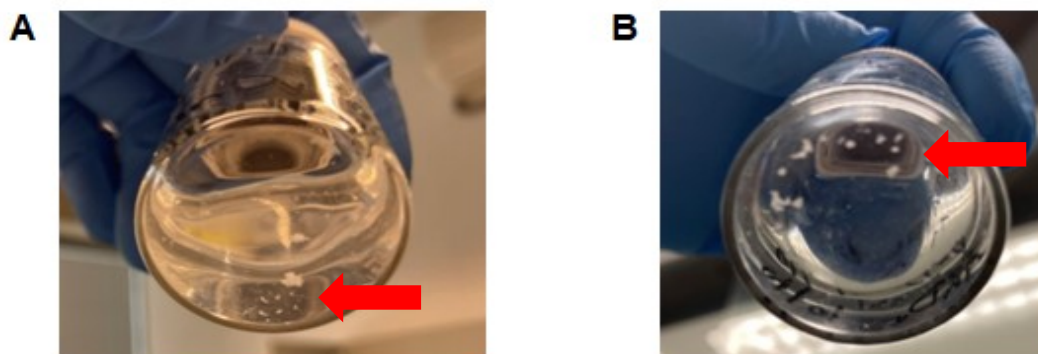
3.2 Příprava hyaluronan/ poly-L-lysinových nanočástic

Výchozími polymery pro přípravu HA/PLL nanočástic byly vysokomolekulární HA, stejná jako v Přípravě 1 (kapitola 2.2.3), a PLL s molekulovou hmotností 30 000 – 70 000 Da. V průběhu jednotlivých experimentů se ukázalo, že na výslednou velikost nanočástic mělo vliv i stáří zásobního roztoku PLL, který byl pro jejich přípravu použit. V případě, že byl PLL rozpuštěn těsně před použitím, byly v roztocích s připravenými nanočásticemi, které byly zesíťeny s vyšším množstvím PLL (100 μg), přítomny i sraženiny. Vznikaly pak spíše polydisperzní mikročástice nebo agregáty. Takové vzorky proto nebyly dále analyzovány. Naopak u nanočástic s nižším obsahem PLL (25 μg) neměla doba rozpouštění polypeptidu na výslednou velikost vliv.

3.2.1 Hyaluronan/poly-lysinové nanočástic připravené fyzikálním síťováním

Vzhledem k informacím v odborné literatuře (Carneiro a kol., 2016; Pan a kol., 2019; Le a kol., 2022; Amato a kol., 2021, Simonson a kol., 2019), týkajících se síťování HA a PLL pomocí fyzikálních interakcí, byl vyzkoušen i tento způsob přípravy. Ten spočíval v elektrostatické interakci mezi záporně nabitými karboxylovými skupinami HA a kladně nabitými aminoskupinami PLL. V těchto experimentech bylo postupováno tak, že byl roztok PLL pomalu přidáván k roztoku HA. Končený objem byl vždy 1,2 ml, součet absolutního množství jednotlivých polymerů byl 3 mg.

V prvním experimentu bylo ke 2,5 mg HA přidáno 500 μg PLL, byl tedy použit poměr HA:PLL 5:1 (w:w). Ihned po smíchání obou výchozích polymerů se objevily okem viditelné sraženiny (viz Obrázek 12). Ani po 15min homogenizaci směsi intenzivním mícháním na rotátoru nedošlo k viditelnému zlepšení. Následovalo přidání acetonu, tak, jako tomu bylo při přípravě nanočástic chemickým zesíťováním. Směs byla 5 min promíchávána na rotátoru při laboratorní teplotě. Sraženiny však byly stále viditelné (viz Obrázek 12 A).



Obrázek 12 – Fotografie roztoku: sraženiny při fyzikálním síťování nanočástic s poměrem HA:PLL 5:1 (w:w) (A) a 11:1 (w:w) (B)

Vzhledem k výsledku jsme se rozhodli pro úpravu poměru HA:PLL na 11:1 (w:w), tzn, že k 2,75 mg HA jsme přidali pouze 250 µg PLL. Ihned po smíchání polymerů i po následném přidání acetonu však byly opět viditelné sraženiny (viz Obrázek 12 B). Experimenty byly v této fázi ukončeny a vzorky již nebyly dále analyzovány z pohledu charakterizace připravených nanočástic.

V literatuře (Le a kol., 2022; Pan a kol., 2019, Simonson a kol., 2019) jsou fyzikálně zesíťované nanomateriály často charakterizovány na základě výpočtu molárního poměru záporně a kladně nabitých funkčních skupin výchozích polymerů. Proto jsme se podle rovnice, kterou uvedli Le a kol. (2022) v doplňujících informacích, tento poměr snažili vypočítat pro námi připravené nanočástice (viz Rovnice 1). Jako N jsou v rovnici označeny záporně nabitě karboxylové skupiny HA, P jsou pozitivně nabitě aminoskupiny PLL, jako α je označen počet ionizovaných skupin v jednotce polymeru, c je koncentrace v g/ml, V objem v ml a M_j (g/mol) je molární hmotnost opakující se jednotky polymeru. U HA je M_j dimeru rovna 378 g/mol, u PLL je hmotnost lysinové jednotky rovna 128 g/mol (Le a kol., 2022).

$$n(N):n(P) = \frac{\alpha_{COO^-} \cdot c_{HA} \cdot V_{HA} \cdot M_{j PLL}}{\alpha_{NH_3^+} \cdot c_{PLL} \cdot V_{PLL} \cdot M_{j HA}}$$

Rovnice 1 – Výpočet molárního poměru N:P (převzato a upraveno z: Le a kol., 2022)

Bylo změřeno, že použitý vodný roztok HA měl pH mezi hodnotami 6 – 7. Za takových podmínek by měly být všechny karboxylové skupiny plně deprotonované (Le a kol., 2022;

Giubertoni a kol., 2019). Na druhou stranu pH roztoku PLL se blížilo 7, což naznačuje, že všechny volné aminoskupiny peptidu byly nabitě kladně (Le a kol., 2022).

Z rovnice by tedy mělo vyplývat, že při poměru HA:PLL 5:1 (w:w) je molární poměr N:P roven přibližně 1,7, při poměru 11:1 (w:w) je molární poměr N:P roven 3,72. Podle studie, kterou provedli Pan a kol. (2019) by při $N:P > 1$ neměly vznikat žádné agregáty. Autoři však použili mnohem méně koncentrované roztoky než my, které navíc před použitím ještě zfiltrovali. Při snaze zfiltrovat připravený roztok PLL o $c = 2,5$ mg/ml však zůstávalo velké množství roztoku zachyceno na membráně, nešlo tedy přesně určit skutečnou koncentraci PLL v přefiltrovaném vzorku. Ve studiích uvedených v kapitole 1.3.1.2 také k promíchání reakční směsi používali magnetické míchadlo. Při našich podmínkách se ukázalo, že HA v roztoku obaluje jakékoli nečistoty, domnívali jsme se tedy, že by obalila i magnetické míchadlo. Zároveň je ale možné, že rychlost a čas míchání na rotátoru nebyly dostatečné, a proto docházelo ke sraženinám nebo agregaci částic.

Vzhledem k optimalizovanému protokolu pro výrobu nanočástic s EDC a AAD bylo od fyzikálního síťování HA/PLL nanočástic i z časových důvodů upuštěno. Díky velmi podobným způsobům přípravy HANPs a HA/PLL nanočástic lze porovnávat výsledky získané modifikací experimentu.

3.2.2 Příprava 2: nanočástice z kyseliny hyaluronové a poly-L-lysinu zesíťené chemicky pomocí karbodiimidu

Stejně jako PLL obsahuje i AAD ve své struktuře aminoskupiny interagující s karboxylovými skupinami HA. Proto byla v Přípravě 2 AAD nahrazena různým množstvím PLL. Karboxylové skupiny HA byly předtím aktivovány pomocí EDC. Při všech následujících experimentech bylo celkové množství HA zachováno na 3 mg.

V prvním experimentu bylo množství AAD, obvykle přidávané k HA a EDC při přípravě HANPs (kapitola 2.2.3), plně nahrazeno PLL, tedy 1,2 mg. Ihned po přidání polypeptidu se však v roztoku objevilo mléčné zakalení a silné vlákno, které se nerozpustilo ani po 30min intenzivním promíchávání směsi na rotátoru, ani po třech následných přidavcích acetonu a finální dialýze.

Výsledná velikost částic byla $667,41 \pm 23,51$ nm, PDI se pohybovalo kolem hodnoty 0,9, což ukazuje, že částice byly polydisperzní a obsahovaly agregáty (viz Tabulka 4). Závislost intenzity rozptýleného světla na hydrodynamickém průměru částic je uvedena v Grafu 2.

V dalším experimentu byl obsah PLL snížen na polovinu, to znamená, že ke směsi roztoků HA, aceton, EDC bylo přidáno pouze 600 μg PLL. Stejně jako v předchozím případě, i zde vznikl ihned po přidání PLL mléčný zákal a silné vlákno, které zůstalo po celou dobu přípravy. Velikost částic při použití polovičního množství PLL byla dvojnásobná (viz Tabulka 4). Závislost intenzity rozptýleného světla na hydrodynamickém průměru částic je uvedena v Grafu 3.

Při výpočtu poměru molů N:P podle Rovnice 1 byla jeho hodnota v experimentu s 1200 μg PLL přibližně 0,8, ve druhém případě se blížila 1,7. I přesto, že nanočástice byly v prostředí acetonu, jehož pH je kolem hodnoty 5, hodnota α by u obou polymerů měla dosahovat 1 (Le a kol., 2022). I když u chemického síťování není rozhodující náboj, s velkou pravděpodobností jeho hodnoty ovlivňují vzájemnou interakci částic v roztoku.

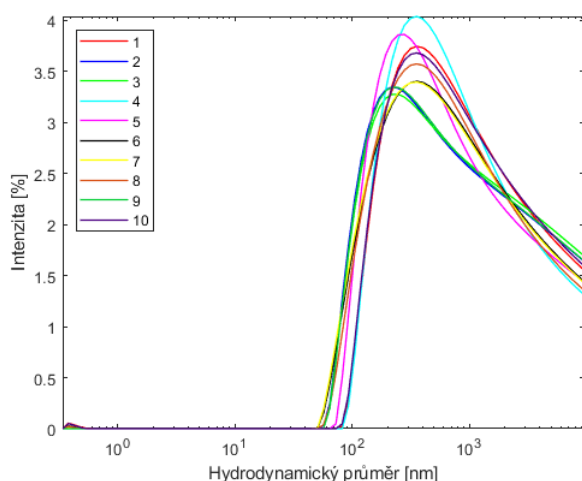
Dle práce Pan a kol. (2019), při použití HA o vysoké molekulové hmotnosti a PLL o nízké molekulové hmotnosti je v systému velké množství kratších peptidových řetězců. V našem případě byla použita HA o molekulové hmotnosti 1500 – 1800 kDa a PLL o molekulové hmotnosti 30 – 70 kDa. S ohledem na relativně širokou distribuci molekulových hmotností polypeptidu nelze určit přesný počet ani délku řetězců PLL ve směsi. Na druhou stranu rozptyl molekulové hmotnosti HA není v poměru k velikosti celé molekuly tak výrazný, proto zde nehraje tak velkou roli.

Výsledné nanočástice mohly mít podobné vlastnosti a chování, jako bylo již dříve popsáno u elektrostaticky zesítěných nanočástic (Pan a kol., 2019). Jakmile se aminoskupiny PLL navážou s karboxylovými skupinami HA, mohly by v systému převážit hydrofobní interakce uhlíkových řetězců PLL, což by mohlo vést ke vzájemné agregaci částic. Tato teorie by vysvětlovala vznik mléčného zakalení i velikost a polydisperzitu připravených nanočástic v našem prvním experimentu. Ve druhém případě je sice poměr molů N:P větší než 1, ale zase ne o tolik. Z našich výsledků vyplývá, že ani takový poměr není optimální pro přípravu stabilních nanočástic chemickým zesítěním.

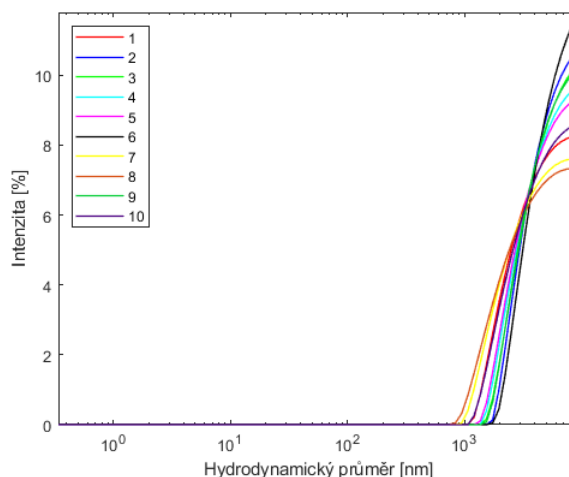
Tvorba vláken by mohla souviset i s precipitací nenavázaného PLL v přítomnosti acetonu. Takové chování bylo popsáno např. v práci Nguyen a kol. (2022), kteří cíleně precipitovali řetězce PLL v nadbytku acetonu přímo po polymeraci polypeptidu, který tímto způsobem oddělovali z reakční směsi.

Tabulka 4 – Srovnání průměrných hodnot hydrodynamických průměrů a PDI u HA/PLL částic s rozdílným množstvím použitého PLL připravených dle Přípravy 2

	1200 μg PLL	600 μg PLL
Hydrod. průměr [nm]	667, 41	1018,50
SD hydrod. průměru [nm]	23,51	60,79
PDI	0,99	4,75
SD PDI	0,08	0,51



Graf 2 – Závislost intenzity rozptýleného světla na hydrodynamickém průměru HA/PLL částic se 1200 μg PLL připravených dle Přípravy 2



Graf 3 – Závislost intenzity rozptýleného světla na hydrodynamickém průměru HA/PLL částic se 600 μg PLL připravených dle Přípravy 2

V našich experimentech se ukázalo, že pokud se v roztoku objevilo silné mléčné zakalení, velikost vzniklých částic již neodpovídala velikosti nanomateriálů. Zajímavé je, že některé práce, jako např. Simonson a kol. (2019) nebo Carneiro a kol. (2016), popisovali při fyzikálním zesílení nanogelů vznik mléčně zakalených nebo opaleskujících koloidních roztoků. Přitom velikost jejich nanočástic se pohybovala okolo 120, resp. 137 nm. Naše výsledky spíše odpovídají výsledkům uvedeným v práci Hu a kol. (2004).

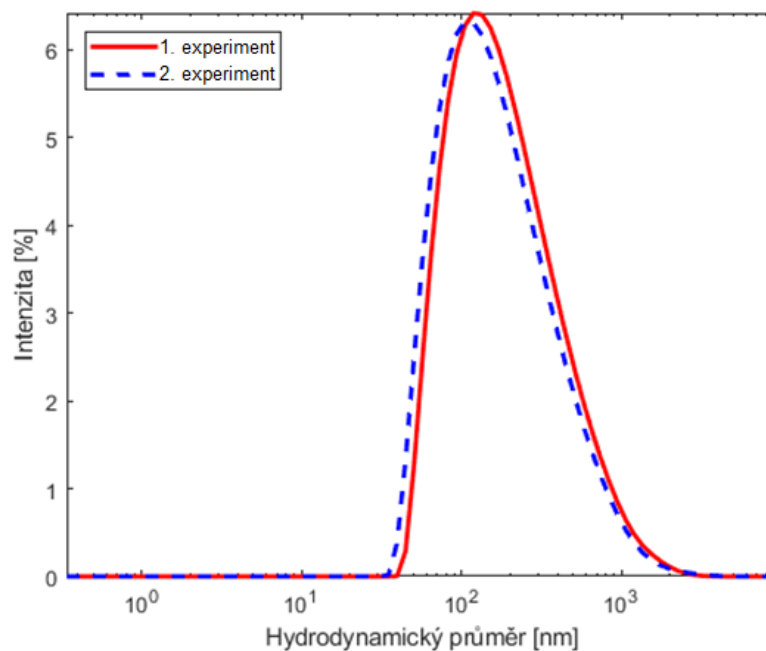
Ve snaze připravit nanočástice o námi požadované velikosti (do 150 nm) byl obsah PLL snížen až na 100 μg . K roztoku HA v acetonu bylo v prvním kroku přidáno EDC. Aktivace karboxylových skupin probíhala nejprve pouze 5 min. Následně bylo přidáno 100 μg PLL. Ihned po přidavku PLL se ve vzorku objevila pouze velmi tenká vlákna, ale roztok zůstal čirý. Vzhledem k velikosti $134,78 \pm 8,83$ nm a $\text{PDI} < 0,7$ byl experiment zopakován. Ve druhém experimentu byla doba aktivace prodloužena na 15 min. Celý postup i množství PLL zůstalo zachováno. Jak je vidět v Tabulce 5, hydrodynamický průměr nanočástic se s rostoucí délkou

aktivace zmenšil. Dokonce i SD byla nižší. Závislost intenzity rozptýleného světla na hydrodynamickém průměru je pak uvedena v Grafu 4.

Poměr molů N:P byl roven přibližně 10 (vypočteno z Rovnice 1). V systému tedy převažovaly záporně nabitě karboxylové skupiny HA, takže by se zde neměly vyvířet agregáty. Díky tomu se nejspíš podařilo eliminovat i mléčné zakalení.

Tabulka 5 – Průměrné hodnoty hydrodynamických průměrů a PDI u HA/PLL nanočástic se 100 µg PLL připravených dle Přípravy 2

	1. experiment	2. experiment
Hydrod. průměr [nm]	134,78	119,22
SD hydrod. průměru [nm]	8,83	4,24
PDI	0,58	0,55
SD PDI	0,049	0,086



Graf 4 – Závislost intenzity rozptýleného světla na hydrodynamickém průměru HA/PLL nanočástic s 100 µg PLL připravených dle Přípravy 2

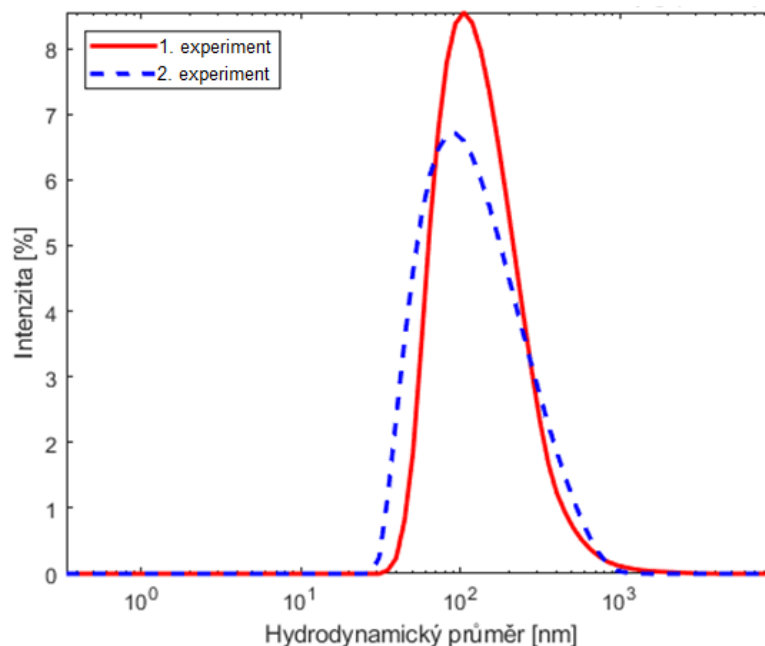
3.2.3 Příprava 3: nanočástic z kyseliny hyaluronové a poly-L-lysinu zesíťené chemicky pomocí karbodiimidu

Příprava 3 byla velmi podobná předchozímu postupu, pouze došlo k záměně pořadí přídavku EDC a PLL. Ke směsi HA, aceton bylo nejprve velmi pomalu, po kapkách přidáno 100 µg PLL. Následovala 15min homogenizace na rotátoru. K takto připravené směsi bylo následně přidáno i EDC. Roztok PLL 2 o nižší koncentraci byl zde připraven kvůli pomalejšími dávkování většího množství polypeptidu do reakční směsi. Ihned po přídavku PLL však vzniklo silné vlákno a větší množství menších, které se nepodařilo rozpustit během celého experimentu. Navíc vlákna měla tendenci adsorbovat na stěny i dno skleněných lahvíček, ve kterých příprava probíhala, takže bylo snadné je před další analýzou odstranit. Průměrná velikost nanočástic ze dvou nezávislých experimentů se pohybovala kolem $98,43 \pm 8,23$ nm. V porovnání s čistými HANPs jsou tyto nanočástice o 26 nm větší. Zprůměrované hodnoty hydrodynamických průměrů z 10 měření jsou pro jednotlivé vzorky uvedeny v Tabulce 6, závislost intenzity rozptýleného světla na hydrodynamickém průměru pak v Grafu 5.

Přestože byly oba vzorky připraveny totožným způsobem, rozdíl velikostí mezi experimenty je poměrně velký. Důvodem je použitý PLL, jehož molekulová hmotnost se pohybuje v širokém rozmezí. I když lze vypočítat poměr N:P, který je stejný jako v Přípravě 2 (N:P = 10), nelze přesně odhadnout velikost navázaných řetězců PLL. Z uvedených dat tedy vyplývá, že tato příprava není dostatečně reprodukovatelná.

Tabulka 6 – Průměrné hodnoty hydrodynamických průměrů a PDI u HA/PLL nanočástic se 100 µg PLL připravených dle Přípravy 3

	1. experiment	2. experiment
Hydrod. průměr [nm]	104,25	92,61
SD hydrod. průměru [nm]	4,90	2,58
PDI	0,54	0,41
SD PDI	0,08	0,03



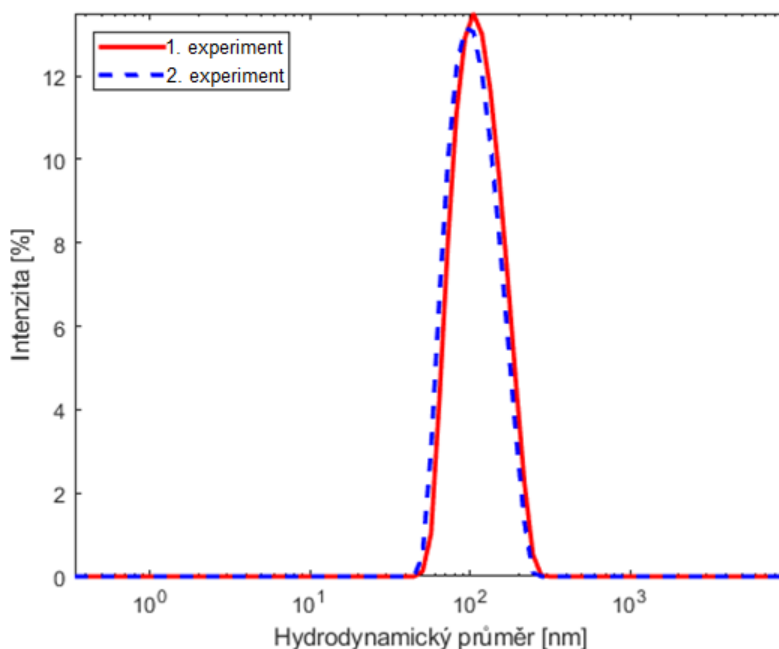
Graf 5 – Závislost intenzity rozptýleného světla na hydrodynamickém průměru HA/PLL nanočástic se 100 μg PLL připravených dle Přípravy 3

Dalším testovaným množstvím bylo 25 μg PLL. Experiment byl opět proveden dvakrát. Průměrná velikost nanočástic na základě DLS analýzy byla $89,04 \pm 3,74$ nm, což je o 16,4 nm více, než je průměrná velikost čistých HANPs. Příslušná data jsou uvedena v Tabulce 7 a Grafu 6. Jak je vidět, velikost nanočástic se se snižujícím obsahem PLL také snížila. Pokud vznikaly drobné vločky, měly opět tendenci adsorbovat ke stěnám nádoby, takže bylo snadné je před další manipulací odstranit. Reprodukovatelnost této přípravy byla mnohem lepší než v předchozím případě. Poměr molů N:P byl podle Rovnice 1 vypočítán na 40,6. To znamená, že v tomto systému byl velký přebytek záporně nabitých karboxylových skupin, což umožnilo vznik stabilních nanočástic.

Důvodem případných vznikajících vláken nebo vloček by mohlo být prostředí acetonu. I když při použití 100 μg i 25 μg PLL stále převažují karboxylové skupiny HA, je pravděpodobné, že PLL, který se okamžitě nenaváže na HA, je v acetonu ihned precipitován. Z toho vyplývá, že vazba by mohla být závislá na prostorové konformaci HA a dostupnosti jejich karboxylových skupin, což nebylo možné ovlivnit. Navíc zde bylo EDC přidáno až po PLL, takže HA nemusela být dostatečně rychle aktivována.

Tabulka 7 – Průměrné hodnoty hydrodynamických průměrů a PDI u HA/PLL nanočástic s 25 µg PLL připravených dle Přípravy 3

	1. experiment	2. experiment
Hydrod. průměr [nm]	91,68	86,39
SD hydrod. průměru [nm]	1,96	1,15
PDI	0,36	0,34
SD PDI	0,02	0,03



Graf 6 – Závislost intenzity rozptýleného světla na hydrodynamickém průměru HA/PLL nanočástic s 25 µg PLL připravených dle Přípravy 3

3.2.4 Příprava 4: nanočástice z kyseliny hyaluronové a poly-L-lysinu zesíťené chemicky pomocí karbodiimidu a dihydrazidu kyseliny adipové

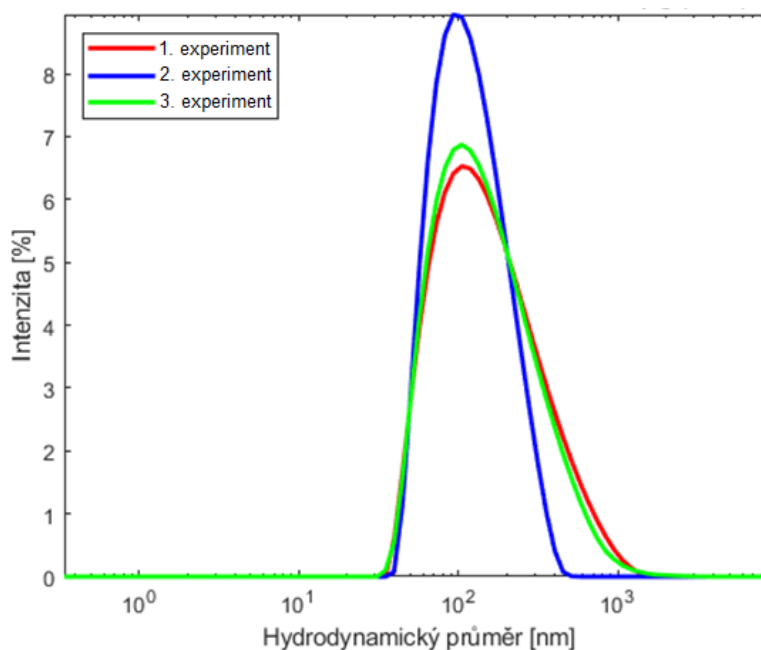
Pro lepší provázání nanočástic, hlavně volných karboxylových skupin, byla navržena Příprava 4, ve které byla část AAD smíchána s PLL a následně přidána do reakční směsi. Množství použitého PLL bylo zachováno na 100 µg a 25 µg.

HA v acetonu byla nejprve aktivována pomocí EDC. Následně byla přidána směs AAD s PLL. Množství síťovacího činidla a PLL bylo ve výsledku stejné jako ve výchozím protokolu pro přípravu HANPs, tzn. 1,2 mg.

V případě 100 µg PLL byla průměrná velikost nanočástic ve 3 nezávislých experimentech $105,50 \pm 10,91$ nm, což je o 33 nm více než u čistých HANPs. Data z DLS analýzy jsou uvedena v Tabulce 8 a Grafu 7.

Tabulka 8 – Průměrné hodnoty hydrodynamických průměrů a PDI u HA/PLL nanočástic se 100 µg PLL připravených dle Přípravy 4

	1. experiment	2. experiment	3. experiment
Hydrod. průměr [nm]	112,82	92,96	110,71
SD hydrod. průměru [nm]	3,06	3,23	3,02
PDI	0,49	0,52	0,52
SD PDI	0,022	0,04	0,11



Graf 7 – Závislost intenzity rozptýleného světla na hydrodynamickém průměru HA/PLL nanočástic se 100 µg PLL připravených dle Přípravy 4

Nanočástice připravené tímto způsobem byly však větší než nanočástice zesítené podle Přípravy 3 obsahující stejné množství PLL. Vzhledem k tomu, že zde nevznikala žádná (1. experiment) nebo menší vlákna (2. experiment) než v předchozím zmíněném postupu, lze usuzovat, že se do těchto nanočástic provázalo více PLL. Navíc reakční směs obsahovala i AAD, která mohla dále zvyšovat velikost produktu.

Je zajímavé, že ve 3. experimentu vzniklo slabé mléčné zakalení. Jak je ale vidět v Tabulce 8, velikost těchto nanočástic je velmi podobná jako u 1. experimentu. Ale mléčné

nebo namodralé zakalení pozorovali i Carneiro a kol. (2016) nebo Simonson a kol (2019). Roli mohl hrát i nově připravený zásobní roztok PLL a různá délka řetězců polypeptidu, což mohlo být i příčinou rozdílné velikosti mezi jednotlivými experimenty.

Na druhou stranu AAD na rozdíl od PLL obsahuje dvě aminoskupiny na jednotku. Poměr molů všech karboxylových skupin ke všem aminoskupinám (PLL + AAD) byl zde 0,59, takže převažovaly aminoskupiny. Poměr funkčních skupin mezi HA a PLL byl však stále zachován na hodnotě 10. Vzhledem k tomu, že během optimalizace této metody při některých experimentech vznikala vlákna, někde nikoli a někde dokonce velké sraženiny s mléčným zákalem, je možné, že AAD s PLL soutěží o karboxylové skupiny. Při vzniku vláken nejspíš dochází přednostně k vazbě mezi HA a AAD, zatímco PLL je precipitován v acetonu.

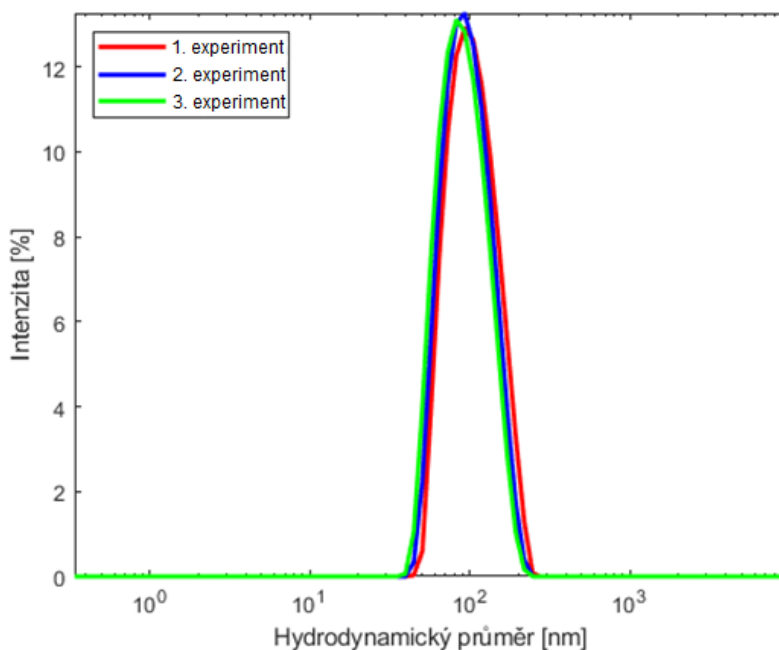
Vzhledem k tomu, že se nejedná o elektrostatické síťování, kde většinou vzniká PLL jádro obalené HA (Pan a kol., 2019; Simonson a kol., 2019), nelze zde určit, jak bude zesíťená částice vypadat. Lze předpokládat, že pokud budou na povrchu nanočástice převažovat delší řetězce PLL, zatímco karboxylové skupiny HA budou vyvázaný pomocí AAD, mohlo by dojít k převaze hydrofobních interakcí mezi PLL a tím pádem k agregaci nanočástic a vzniku silného mléčného zákalu. Na druhou stranu, pokud by byl PLL zakomponován spíše uvnitř částice a na povrchu převažovala HA, která není hydrofobní, k agregaci by nemuselo docházet. Chování nanočástic s navázaným PLL může být navíc ovlivněno i acetonem.

Obdobně byly připraveny i HA/PLL nanočástice s celkovým obsahem 25 μg PLL. Nanočástice připravené tímto způsobem byly stabilnější, netvořily agregáty. Tabulka 9 a Graf 8 shrnují výsledky 3 experimentů. Nanočástice zde měly průměrnou velikost $84,71 \pm 1,65$ nm, což je nejméně ze všech připravených HA/PLL nanočástic a zároveň o pouhých 12 nm více než velikost čistých HANPs. Vzhledem k výskytu tenkých nebo žádných vláken lze předpokládat, že všechen PLL byl inkorporován do nanočástic.

Menší velikost výsledného produktu může být způsobena i kompaktnější strukturou a lepším provázáním i volných karboxylových skupin HA díky přítomnosti AAD. Příprava nanočástic s použitím pouze 25 μg PLL se i přes vznik občasných vláken ukázala jako nejvíce reprodukovatelná.

Tabulka 9 – Průměrné hodnoty hydrodynamických průměrů a PDI u HA/PLL nanočástic s 25 µg PLL připravených dle Přípravy 4

	1. experiment	2. experiment	3. experiment
Hydrod. průměr [nm]	82,81	85,62	85,71
SD hydrod. průměru [nm]	0,50	1,58	3,61
PDI	0,39	0,33	0,30
SD PDI	0,03	0,02	0,02



Graf 8 – Závislost intenzity rozptýleného světla na hydrodynamickém průměru HA/PLL nanočástic se 25 µg PLL připravených dle Přípravy 4

3.2.5 Příprava 5: vazba poly-L-lysinu na povrch nanočástic z kyseliny hyaluronové

Posledním vyzkoušeným způsobem přípravy nanočástic byla vazba PLL na povrch předem připravených HA nanočástic. V experimentech byl použit 1 mg HANPs připravených podle Přípravy 1. Aby byl zachován poměr HA a PLL jako v předchozích metodách (Příprava 3 a 4) byl obsah PLL přepočítán. I zde se osvědčilo připravit roztok PLL 2 o nižší koncentraci pro pomalejší dávkování většího množství polypeptidu.

Pokud bylo ke 3 mg HA přidáno 100 µg PLL, na 1 mg hotových HANPs bylo potřeba asi 33,3 µg PLL. Naopak při přidavku 25 µg PLL ke 3 mg HA, bylo na 1 mg HANPs potřeba pouze 8,30 µg PLL. Nanočástice s navázaným PLL o koncentraci 1 mg/ml jsou pro přehlednost

v následujícím textu označovány jako HANPs/PLL 1, s koncentrací PLL 2,5 mg/ml jako HANPs/PLL 2,5.

Vazba na HANPs byla s oběma zvolenými množstvími PLL provedena ve 3 nezávislých experimentech. Pro lepší srovnání je v Tabulce 10 uveden vždy hydrodynamický průměr původních HANPs a k nim příslušných HANPs/PLL 1 nebo HANPs/PLL 2,5. Z tabulky je jasné, že velikost nanočástic roste s rostoucím množstvím vázaného PLL.

Tabulka 10 – Srovnání hydrodynamických průměrů HANPs a k nim příslušným HANPs/PLL připravených dle Přípravy 5

	Hydrodynamický průměr [nm]		
	HANPs	HANPs/PLL 1	HANPs/PLL 2,5
1. experiment	74,65	78,78	77,04
2. experiment	72,34	74,28	73,45
3. experiment	71,18	76,30	73,06

Obecně lze říci, že HANPs/PLL 1 se 33, 3 µg PLL se zvětšily v porovnání se základními HANPs přibližně o 2 – 5 nm, HANPs/PLL 2,5 s 8,30 µg PLL o 1 – 3 nm. Při srovnání s průměrnou velikostí všech vyrobených HANPs (viz kapitola 3.2.1), která se rovnala $72,65 \pm 1,50$ nm, byl nárůst v prvním případě o 2 – 6 nm, resp. o 1 – 5 nm.

Zajímavé je kolísání velikostí nanočástic jak mezi jednotlivými experimenty se shodným obsahem PLL, tak i mezi různými přídávky PLL. Např. HANPs/PLL 1 (2. experiment) měly velikost 74,28 nm, zatímco HANPs/PLL 2,5 s nižším obsahem PLL měly velikost 77,04 nm (1. experiment). Hlavním důvodem je velikost původních HANPs, na které byl PLL vázán.

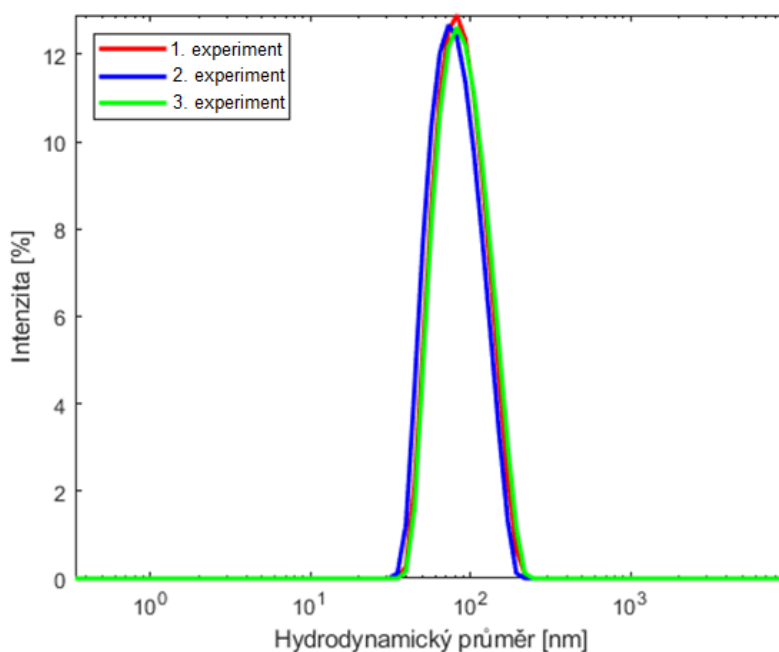
Důležitou roli může hrát i různá hustota zesílení původních HANPs. Pokud by základní částice měly póry o větším průměru, je možné, že kratší řetězce PLL se vázaly dovnitř, zatímco větší zůstávaly na povrchu. PLL, který se dostal dovnitř, mohl navíc elektrostaticky interagovat s HA a způsobit dodatečné zesílení. Podobný mechanismus popsali u elektrostaticky sestavených materiálů Labie a kol. (2019). Je pravděpodobné, že z tohoto důvodu jsou nárůsty velikostí našich nanočástic v jednotlivých experimentech různé.

Srovnání hydrodynamického průměru a PDI pro jednotlivá provedení přípravy HANPs/PLL 1 uvádí Tabulka 11. Graf 9 poté shrnuje závislost intenzity rozptýleného světla na hydrodynamickém průměru připravených nanočástic. Obdobně jsou uvedena data

v Tabulce 12 a Grafu 10 pro HANPs/PLL 2,5. Na rozdíl od předchozích metod zde nevznikaly žádná vlákna ani agregáty, ve všech případech se jednalo o monodisperzní systémy.

Tabulka 11 – Průměrné hodnoty hydrodynamických průměrů a PDI u HANPs/PLL 1 připravených dle Přípravy 5

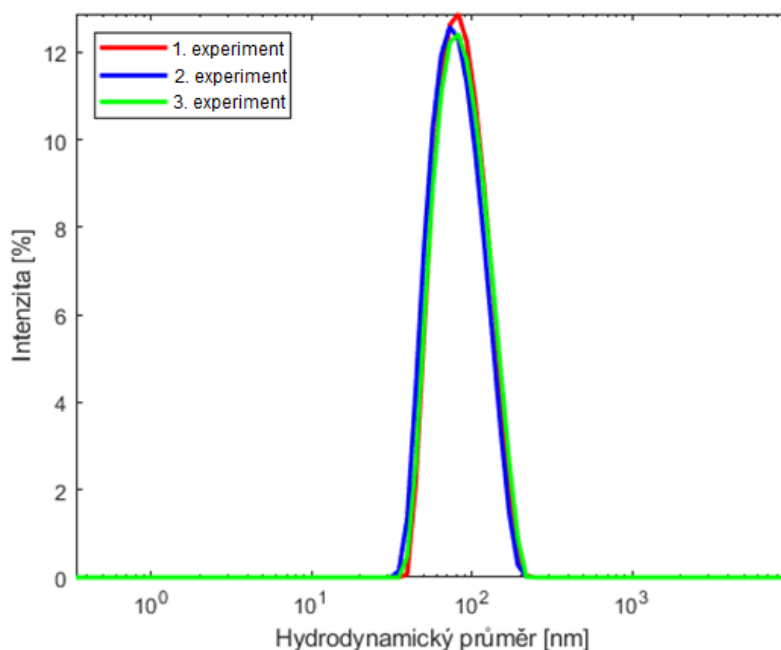
	1. experiment	2. experiment	3. experiment
Hydrod. průměr [nm]	78,78	74,28	76,30
SD hydrod. průměru [nm]	1,27	0,91	1,50
PDI	0,24	0,22	0,20
SD PDI	0,02	0,03	0,03



Graf 9 – Závislost intenzity rozptýleného světla na hydrodynamickém průměru HANPs/PLL 1 připravených dle Přípravy 5

Tabulka 12 – Průměrné hodnoty hydrodynamického průměru a PDI u HANPs/PLL 2,5 připravených dle Přípravy 5

	1. experiment	2. experiment	3. experiment
Hydrod. průměr [nm]	77,04	73,45	73,06
SD hydrod. průměru [nm]	1,14	0,76	0,68
PDI	0,23	0,20	0,18
SD PDI	0,03	0,02	0,03



Graf 10 – Závislost intenzity rozptýleného světla na hydrodynamickém průměru HANPs/PLL 2,5 připravených dle Přípravy 5

3.3 Měření zeta potenciálu připravených nanočástic

Pro ověření inkorporace PLL a stability vytvořených nanočástic v roztoku byl proměřen i zeta potenciál. Každá částice je totiž v roztoku obklopena ionty, které tvoří dvě vrstvy. Tzv. Sternova vrstva těsně obaluje povrch částic a má stabilní náboj. Na ní přisedá vnější difuzní vrstva, do které mohou ionty difundovat a různě se přeskupovat v závislosti na pohybu částice v elektrickém poli. Elektrostatický potenciál na ploše, kde dochází ke vzájemnému kontaktu mezi částicemi nebo částicí a jinými povrchy je označován jako zeta potenciál. Jeho velikost může nabývat jak kladných, tak i záporných hodnot, čím jsou však jeho hodnoty vzdálenější od nuly, tím více se částice navzájem odpuzují a nedochází k jejich agregaci. Zeta potenciál se obvykle stanovuje nepřímo z elektroforetické pohyblivosti (Lowry a kol., 2016).

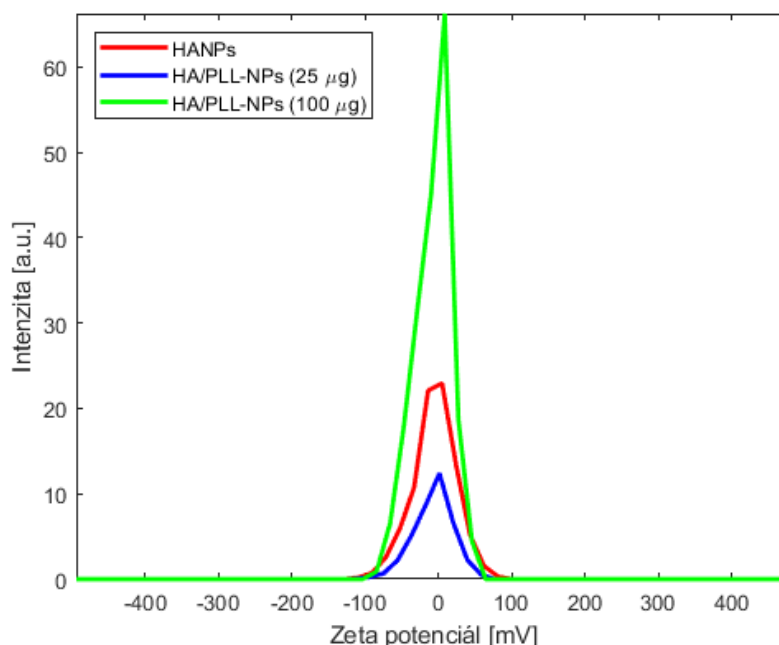
Vzhledem k předešlým výsledkům byly pro další analýzu vybrány pouze HA/PLL nanočástice s 100 μg a 25 μg PLL připravené podle Přípravy 4, tedy nanočástice připravené současným zesítním obou polymerů, a nanočástice HANPs/PLL 1 a HANPs/PLL 2,5 (Příprava 5), tedy post-synteticky modifikované HANPs.

Předpokládalo se, že HANPs budou díky záporně nabitě HA dosahovat záporného zeta potenciálu a s přibývajícím množstvím PLL se bude hodnota blížit k nule. Reprezentativní průměrné hodnoty zeta potenciálu, konduktivity a elektroforetické pohyblivosti u HANPs

a HA/PLL nanočástic s 25 μg a 100 μg PLL zesíťených podle Přípravy 4 jsou uvedeny v Tabulce 13. Závislost mezi intenzitou a velikostí zeta potenciálu pak ilustruje Graf 11. Zde je opravdu vidět, že nejzápornější hodnotu mají HANPs a s rostoucím obsahem PLL stoupá i zeta potenciál. Obdobná data pro HANPs a nanočástice HANPs/PLL 1 a HANPs/PLL 2,5 jsou zobrazena v Tabulce 14 a Grafu 12.

Tabulka 13 – Průměrné hodnoty zeta potenciálu, konduktivity a elektroforetické pohyblivosti u HANPs a HA/PLL nanočástic připravených dle Přípravy 4

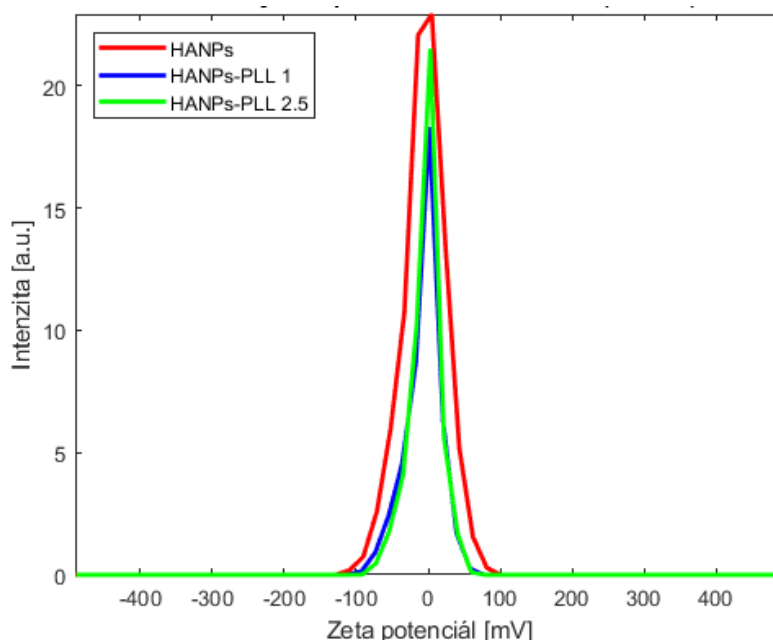
	HANPs	HA/PLL NPs (25 μg)	HA/PLL NPs (100 μg)
Zeta potenciál [mV]	-4,87	-2,51	-0,74
SD zeta potenciálu [mV]	8,90	2,62	1,95
Konduktivita [mS/cm]	16,19	15,72	15,80
SD konduktivity [mS/cm]	0	0	0
Elektrof. pohyblivost [$10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$]	-0,38	-0,19	-0,06
SD elektroforetické pohyblivosti [$10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$]	0,69	0,20	0,15



Graf 11 – Závislost mezi intenzitou a velikostí zeta potenciálu u HANPs a HA/PLL nanočástic připravených dle Přípravy 4

Tabulka 14 – Průměrné hodnoty zeta potenciálu, konduktivity a elektroforetické pohyblivosti u HANPs a HANPs/PLL připravených dle Přípravy 5

	HANPs	HANPs/PLL 1	HANPs/PLL 2,5
Zeta potenciál [mV]	-4,87	-0,01	-0,65
SD zeta potenciálu [mV]	8,90	0,66	0,77
Konduktivita [mS/cm]	16,19	13,08	13,34
SD konduktivity [mS/cm]	0	0	0
Elektrof. mobilita [10⁻⁴ cm²/Vs]	-0,38	0,00	-0,05
SD elektrofor. mobility [10⁻⁴ cm²/Vs]	0,69	0,05	0,06



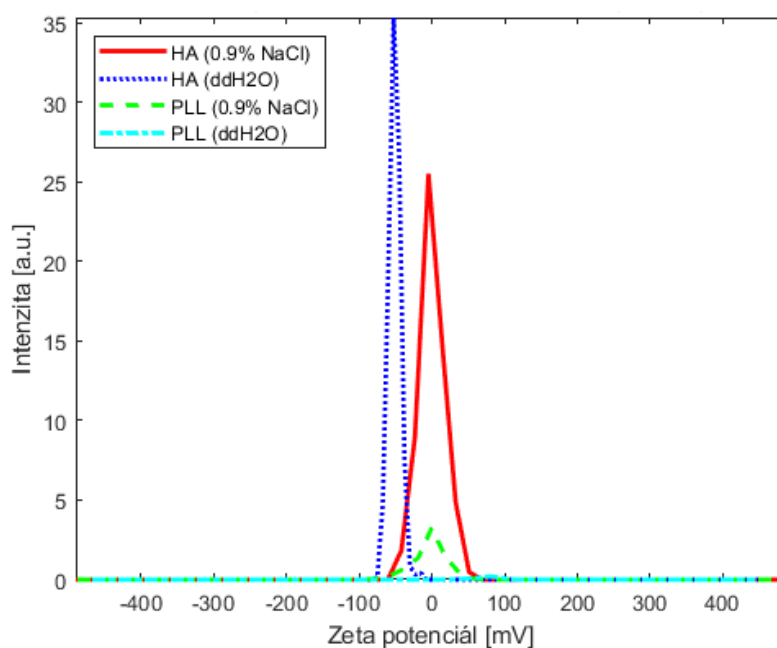
Graf 12 – Závislost mezi intenzitou a velikostí zeta potenciálu u HANPs a HANPs/PLL připravených dle Přípravy 5

Ukázalo se však, že v prostředí fyziologického roztoku, ve kterém jsou nanočástice skladovány, byl jejich zeta potenciál velmi variabilní. V některých případech byly hodnoty u nanočástic obsahujících PLL srovnatelné nebo dokonce zápornější než u čistých HANPs. Na základě tohoto pozorování byl proměřen zeta potenciál HA a PLL v ultračisté vodě (ddH₂O) a porovnán s hodnotami ve fyziologickém roztoku (0,9% NaCl). Srovnání dat uvádí Tabulka 15 a k ní příslušný Graf 13. Jak je vidět, zeta potenciál PLL ve vodném prostředí dosahoval velmi

kladných hodnot, zatiaľ čo HA záporných. Na druhú stranu vo fyziologickom roztoku bol zeta potenciál oboch polymerů téměř srovnatelný. Toto zjištění naznačuje, že byl zeta potenciál v tomto případě velmi zkrácen obsahem solí. Měření tedy nelze považovat za směrodatné.

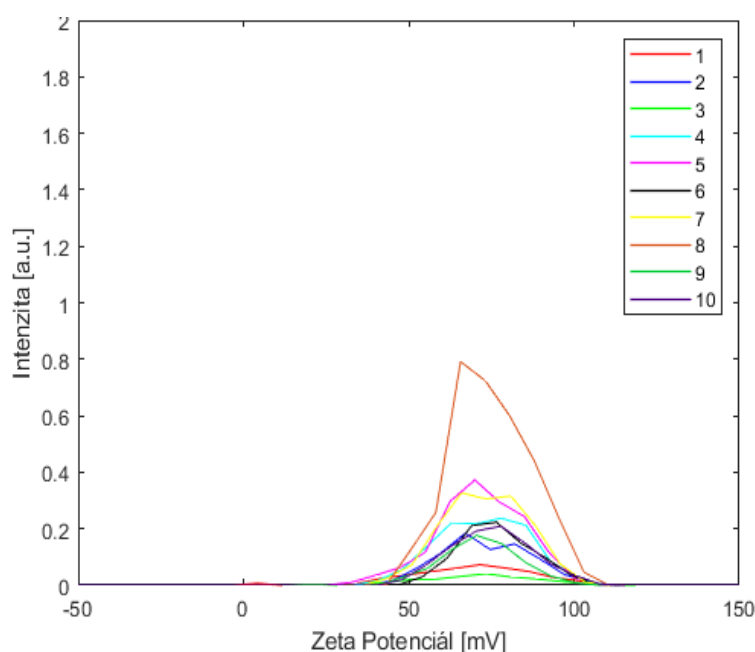
Tabulka 15 – Průměrné hodnoty zeta potenciálu, konduktivity a elektroforetické mobility u HA a PLL v ultračisté vodě a fyziologickém roztoku

	HA (0,9% NaCl)	HA (ddH₂O)	PLL (0,9% NaCl)	PLL (ddH₂O)
Zeta potenciál [mV]	-0,47	-51,52	0,05	72,86
SD zeta poten. [mV]	0,48	8,35	0,90	1,26
Konduktivita [mS/cm]	11,47	0,27	11,68	0,31
SD konduktivity [mS/cm]	0	0	0	0
Elektrof. mobilita [10⁻⁴ cm²/Vs]	-0,04	-3,98	0,00	5,63
SD Elektrof. mobility [10⁻⁴ cm²/Vs]	0,04	0,65	0,07	0,10



Graf 13 – Závislost intenzity na velikosti zeta potenciálu u HA a PLL v ultračisté vodě a fyziologickém roztoku

Jak je vidět v Grafu 13, intenzita zeta potenciálu PLL v ultračisté vodě je velmi nízká, téměř splývá se základní linií. Z tohoto důvodu je zde uveden zvlášť Graf 14, který zobrazuje pouze intenzitu a velikost zeta potenciálu PLL z 10 měření ve vodném prostředí. Nízká intenzita může být způsobena používaným PLL, který byl ve formě hydrobromidové soli. Bromidové ionty by mohly neutralizovat náboj na některých aminoskupinách. Výsledný zeta potenciál se sice pohyboval v kladných hodnotách, ale intenzita byla díky této interakci snížena. Pomocí centrifugace a centrifugačních filtrů Amicon® Ultra 10K jsme zkusili ionty odstranit a porovnat zeta potenciál s bromidovými ionty a bez nich. Zeta potenciál odseparovaného PLL se však pohyboval na nulové hodnotě, je pravděpodobné, že odstředivá síla nebyla dostatečná k tomu, aby se polypeptid uvolnil z filtru, takže srovnání nebylo bohužel možné.



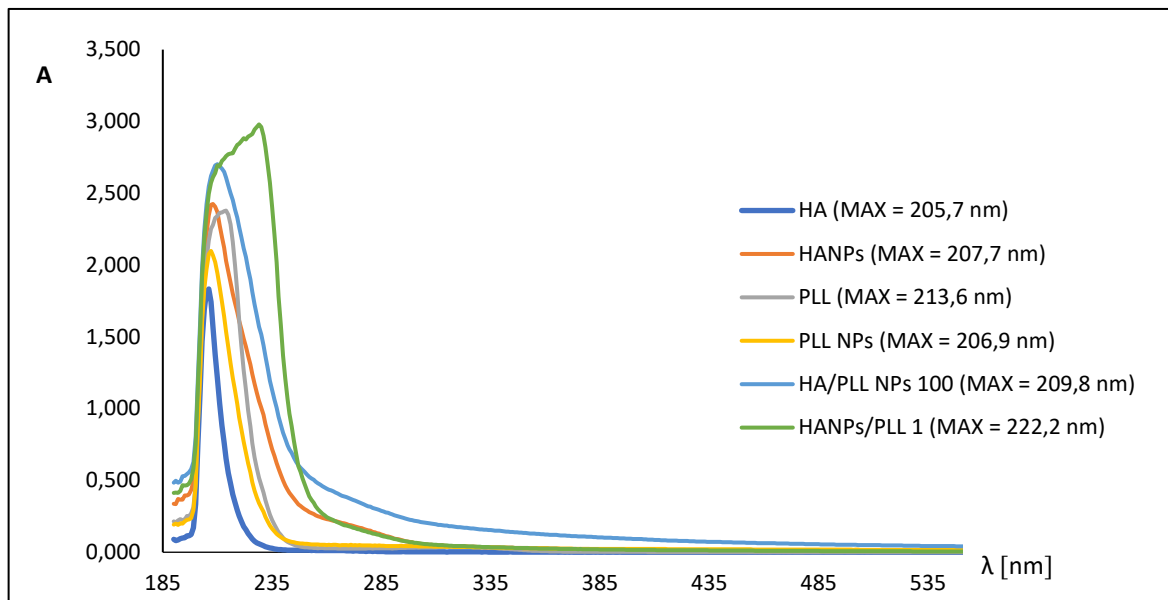
Graf 14 – Závislost mezi intenzitou a velikostí zeta potenciálu u PLL ve vodném prostředí

3.4 UV – VIS spektrofotometrie

Další metodou pro ověření navázání PLL dovnitř nebo na povrch nanočástic byla zvolena spektrofotometrie v UV – VIS oblasti.

Pro stanovení vhodné vlnové délky byla nejprve proměřena absorpční spektra HANPs, roztoku HA, roztoku PLL, zesíťného PLL (PLL NPs) na základě postupu v Přípravě 6 (viz kapitola 2.2.8), HA/PLL nanočástic se 100 µg a 25 µg PLL uvnitř, HANPs/PLL 1 a HANPs/PLL 2,5. Absorpční spektrum bylo měřeno v rozmezí vlnových délek 190 – 600 nm.

Vzhledem k velmi podobným absorpčním spektrům i maximům u HA/PLL nanočástic se 100 μg a 25 μg PLL i HANPs/PLL 1 a HANPs/PLL 2,5 jsou pro lepší přehlednost v Grafu 15 uvedena pouze data pro nanočástice s větším obsahem PLL.



Graf 15 – Absorpční spektra a maxima vybraných roztoků a nanočástic

Pomocí této metody byly opět charakterizovány pouze HANPs, HA/PLL nanočástice připravené podle Přípravy 4 a HANPs/PLL připravené podle Přípravy 5. Označení 1. – 3. experiment v jednotlivých tabulkách koresponduje s experimenty pro jednotlivé přípravy nanočástic.

Na základě výše uvedených dat byla jako nejvhodnější zvolena vlnová délka 222 nm. Po několika prvních měřeních jsme předpokládali, že pokud bude PLL navázán uvnitř nanočástic, absorpance těchto částic bude při 222 nm nižší než u čistých HANPs. Tabulka 16 zobrazuje rozdíly absorbancí mezi HA/PLL nanočásticemi se 100 μg PLL a čistými HANPs, které byly měřeny a připraveny za stejných podmínek. V prvních dvou experimentech je vidět pokles absorpance u nanočástic s inkorporovaným PLL, u 3. experimentu je však trend opačný. U HA/PLL nanočástic s 25 μg PLL byly rozdíly absorbancí mnohem variabilnější (viz Tabulka 17). Kolísá však i absorpance čistých HANPs.

Tabulka 16 – Srovnání absorbančí ($\lambda = 222 \text{ nm}$) HANPs a HA/PLL nanočástic se 100 μg PLL připravených dle Přípravy 4

Nanočástice	Absorbance ($\lambda = 222 \text{ nm}$)		
	1. experiment	2. experiment	3. experiment
HANPs	2,00	1,85	1,74
HA/PLL NPs 100 μg	1,79	1,44	1,91

Tabulka 17 – Srovnání absorbančí ($\lambda = 222 \text{ nm}$) HANPs a HA/PLL nanočástic se 25 μg PLL připravených dle Přípravy 4

Nanočástice	Absorbance ($\lambda = 222 \text{ nm}$)		
	1. experiment	2. experiment	3. experiment
HANPs	1,15	1,66	1,55
HA/PLL NPs 25 μg	1,71	1,44	1,53

Mezi hodnotami absorbančí u HANPs a HA/PLL nanočástic však nebyla nalezena žádná souvislost. Neexistuje zde ani žádná korelace mezi velikostí nanočástic a absorbančí. Touto metodou tedy nelze určit, zda došlo k začlenění PLL, popř. jakého množství.

Na druhou stranu při vazbě PLL na povrch připravených nanočástic je absorbance mnohem vyšší než u základních HANPs (viz Tabulka 18).

Je možné, že pokud se PLL nachází blízko povrchu, absorbance bude vyšší než u čistých HANPs. Naopak pokud bude peptid navázán spíše uvnitř, absorbance se sníží, což by vysvětlovalo kolísání absorbančí při vazbě PLL dovnitř částice (viz Tabulka 16 a 17).

Tabulka 18 – Porovnání absorbančí ($\lambda = 222 \text{ nm}$) HANPs před vazbou PLL a nanočástic HANPs/PLL připravených dle Přípravy 5

Nanočástice	Absorbance ($\lambda = 222 \text{ nm}$)		
	1. experiment	2. experiment	3. experiment
HANPs (před vazbou)	1,61	1,66	1,55
HANPs/PLL 1	2,92	2,98	2,97
HANPs/PLL 2,5	2,94	2,97	2,97

3.5 Stanovení koncentrace proteinů pomocí fluorimetru Quibit™ 2.0

K ověření navázání PLL byla použita i fluorescenční detekce proteinů. K analýze byla využita komerčně dodávaná sada Quibit™ Protein Assay Kit (mez detekce: 0,25 – 5 µg). Vzorky nebylo potřeba ředit, protože použitý fluorimetr přepočítával koncentraci proteinů ve vzorku přímo na µg/ml.

Analyzovány byly opět HANPs, HA/PLL nanočástice z Přípravy 4 a HANPs/PLL z Přípravy 5. K porovnání hodnot je vždy v Tabulce 19 – 21 uvedena teoreticky vypočítaná koncentrace PLL v µg/ml a koncentrace proteinů naměřená na pomocí fluorimetru Quibit™ 2.0. Vždy jsou uvedeny i hodnoty HANPs měřené za stejných podmínek. Označení 1. – 3. experiment koresponduje s 1. – 3. experimentem v jednotlivých přípravách.

Tabulka 19 – Porovnání vypočítané koncentrace PLL a naměřené koncentrace proteinů pomocí fluorimetru Quibit™ 2.0 u HANPs a HA/PLL nanočástic se 100 µg PLL připravených dle Přípravy 4

Nanočástice	Vypočítaná koncentrace PLL v NP [µg/ml]	Celková naměřená koncentrace proteinů [µg/ml]
	1. experiment	
HANPs	0,00	18,10
HA/PLL NPs 100 µg	38,46	22,40
	2. experiment	
HANPs	0,00	18,30
HA/PLL NPs 100 µg	34,48	22,80
	3. experiment	
HANPs	0,00	19,60
HA/PLL NPs 100 µg	33,33	23,20

Tabulka 20 – Porovnání vypočítané koncentrace PLL a naměřené koncentrace proteinů pomocí fluorimetru Quibit™ 2.0 u HANPs a HA/PLL nanočástic se 25 µg PLL připravených dle Přípravy 4

Nanočástice	Vypočítaná koncentrace PLL v NP [µg/ml]	Celková naměřená koncentrace proteinů [µg/ml]
1. experiment		
HANPs	0,00	16,00
HA/PLL NPs 25 µg	8,33	20,70
2. experiment		
HANPs	0,00	18,60
HA/PLL NPs 25 µg	8,77	17,60
3. experiment		
HANPs	0,00	17,20
HA/PLL NPs 25 µg	8,33	15,20

Tabulka 21 – Porovnání vypočítané koncentrace PLL a naměřené koncentrace PLL pomocí fluorimetru Quibit™ 2.0 u HANPs a HANPs/PLL připravených dle Přípravy 5

Nanočástice	Vypočítaná koncentrace PLL v NP [µg/ml]	Celková naměřená koncentrace proteinů [µg/ml]
1. experiment		
HANPS (před vazbou)	0,00	18,50
HANPs/PLL 1	25,62	48,80
HANPs/PLL 2,5	6,55	37,80
2. experiment		
HANPS (před vazbou)	0,00	18,60
HANPs/PLL 1	26,29	34,40
HANPs/PLL 2,5	6,67	30,20
3. experiment		
HANPS (před vazbou)	0,00	17,20
HANPs/PLL 1	27,00	37,80
HANPs/PLL 2,5	6,86	31,30

Z uvedených tabulek vyplývá, že ani zde neexistuje žádná souvislost mezi teoreticky vypočítaným a naměřeným obsahem PLL. Nebyla nalezena ani korelace mezi velikostí nebo absorbancí a koncentrací peptidu stanovenou pomocí Quibit kitu.

V případech, kdy by měl být PLL inkorporován dovnitř (viz Tabulka 19), byla u nanočástic se 100 μg PLL naměřená koncentrace polypeptidu nižší než teoreticky vypočítaná. Tzn., že část PLL by mohla být skutečně obsažena v částicích. Na druhou stranu u nanočástic s pouhými 25 μg PLL (viz Tabulka 20) byla naměřená koncentrace mnohem vyšší než teoreticky vypočítaná. U HANPs/PLL byla pak vždy naměřená koncentrace vyšší ať byl obsah PLL jakýkoli (viz Tabulka 21).

Zajímavé je, že fluorescenční odezvu měly i HANPs. Proto byl proměřen i fyziologický roztok nebo roztok HA. Podle této metody byla koncentrace PLL ve fyziologickém roztoku 19,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, což je vyšší hodnota než u HANPs. Ve vodném roztoku HA byla koncentrace PLL stanovena na 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

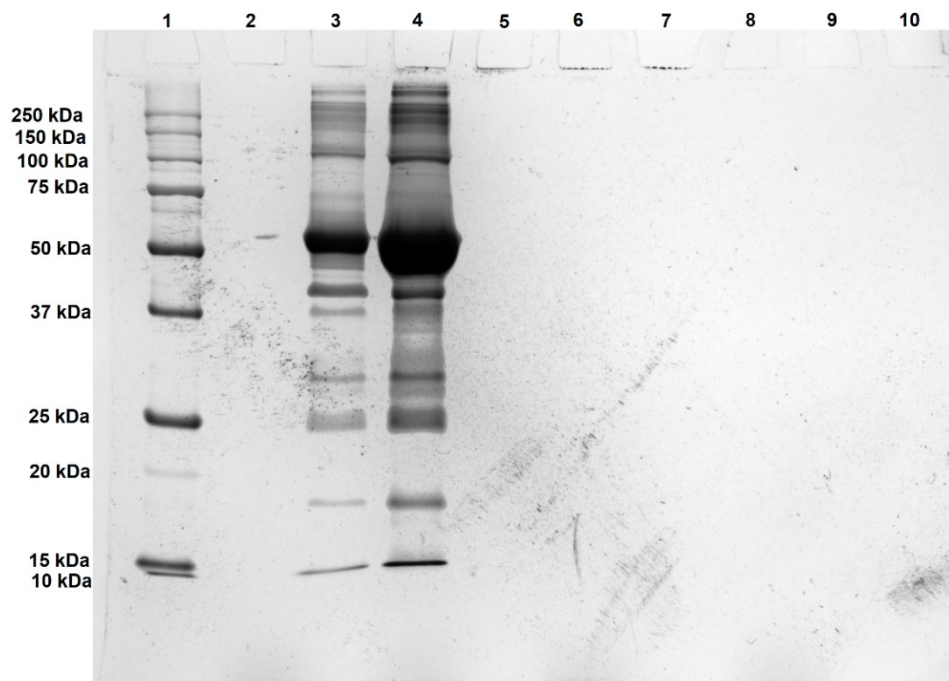
Vzhledem k tomu, že výrobce soupravy neuvádí způsob interakce mezi peptidy a fluorescenční značkou, nelze určit důvod těchto zkřížených reakcí. Na druhou stranu vysoká odezva fyziologického roztoku by mohla opět značit vliv solí.

K detekci PLL byla použita i metoda stanovení proteinů dle Bradfordové. Byly sestaveny dvě kalibrační řady PLL, jedna ve fyziologickém roztoku, druhá v ultračisté vodě. Paralelně byly analyzovány i HANPs, HA/PLL nanočástice z Přípravy 4 nebo HANPs/PLL. Bohužel se ukázalo, že závislost koncentrace na absorbanci ($\lambda = 595 \text{ nm}$) nebyla lineární ani u jedné kalibrační řady. Na vině byly s velkou pravděpodobností opět řetězce PLL o různé délce.

3.6 Ověření vazby poly-L-lysinu pomocí elektroforetická separace

3.6.1 SDS-PAGE

Pro detekci PLL, který se nenavázal do částic, byla provedena SDS-PAGE elektroforéza. Předpokládali jsme totiž, že nanočástice díky své velikosti do gelu neprojdou nebo zůstanou na jeho počátku, zatímco zbylý nenavázaný PLL bude možné v gelu detegovat. K separaci byl použit 12% dělicí gel a 5% zaostřovací gel. Jako kontrolní protein byl použit BSA. Jako standard molekulových hmotností byl použit Precision Plus ProteinTM Unstained Protein Standards, 10 – 250 kDa (Bio-Rad, USA). Po separaci byl gel obarven roztokem amoniakálního stříbra (viz Obrázek 13).



Obrázek 13 - Výsledek SDS-PAGE analýzy pro detekci volného PLL

1 – standard molekulových hmotností Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards, 10 – 250 kDa (Bio-Rad, USA), 2 – prázdná jamka, 3 – 3 μg BSA, 4 – 18,75 μg BSA, 5 – 3 μg PLL, 6 – 15 μg PLL, 7 – 18,75 μg PLL, 8 – HANPs, 9 – HANPs/PLL 1, 10 – HANPs/PLL 2,

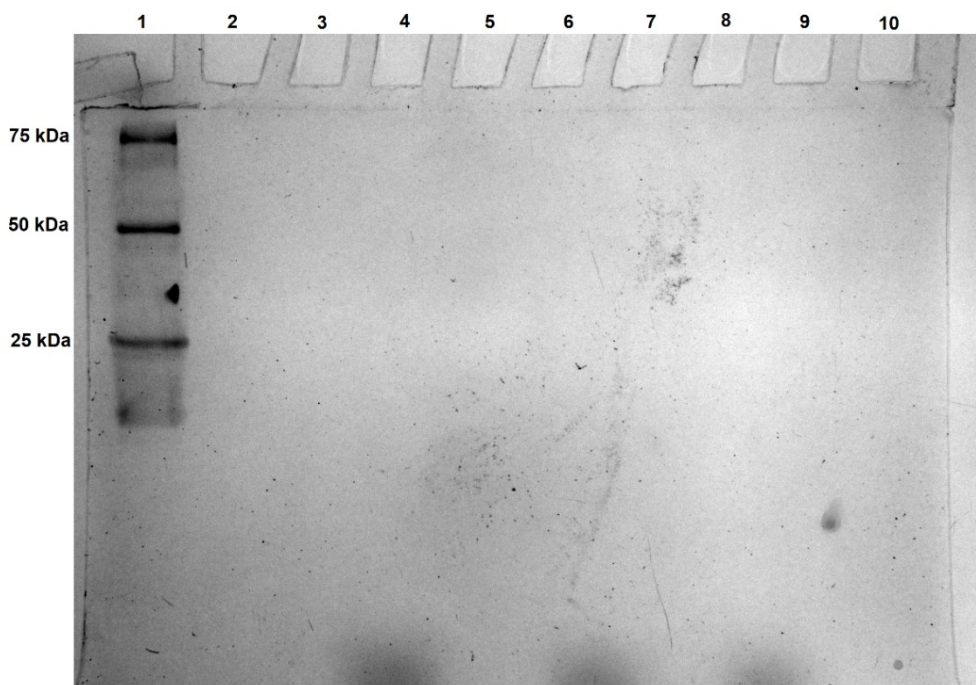
Na Obrázku 13 je vidět úplné rozdělení proteinového standardu i BSA, naopak PLL nebyl na gelu vůbec detegován. Důvodem by mohla být precipitace polypeptidu. Během přípravy vzorku se po smíchání PLL se vzorkovým pufrům obsahujícím SDS objevily okem viditelné sraženiny. Proto zřejmě do gelu neprošel ani volný PLL v jamkách 5 – 7. Na základě tohoto pozorování byla pro další separace použita nativní elektroforéza.

3.6.2 Nativní elektroforéza v diskontinuálním uspořádání

Nativní elektroforéza byla provedena velmi podobně jako SDS-PAGE, jen bylo ve všech použitých pufrách a gelech vynecháno SDS. K separaci byl použit 12% dělicí a 5% zaostřovací gel, který byl následně obarven roztokem amoniakálního stříbra.

Abychom ověřili, jaké množství PLL jsme touto metodou schopni detegovat, byl na gel dávkován PLL v různém množství, konkrétně 1 – 20 μg PLL na jamku (viz Obrázek 14). Použitý proteinový standard byl stejný jako u SDS-PAGE.

Jak je vidět na Obrázku 14, ani v tomto případě k vizualizaci PLL nedošlo. Navíc i standard molekulových hmotností je zde rozdělen pouze částečně, což by mohlo být způsobeno právě chybějícím SDS.

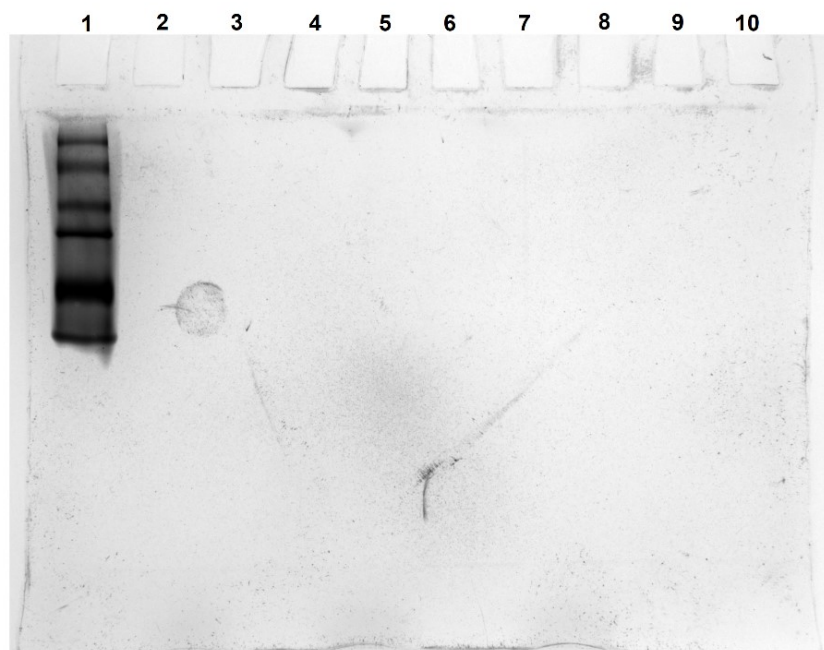


Obrázek 14 – Výsledek separace PLL pomocí nativní elektroforézy

1 - standard molekulových hmotností Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards, 10 – 250 kDa (Bio-Rad, USA), 2 – prázdná jamka, 3 - 20 µg PLL, 4 – prázdná jamka, 5 -10 µg PLL, 6 – prázdná jamka, 7- 5 µg PLL, 8 – prázdná jamka, 9 – 2,5 µg PLL, 10 – 1 µg PLL

3.6.3 Kombinace SDS-PAGE a nativní elektroforézy

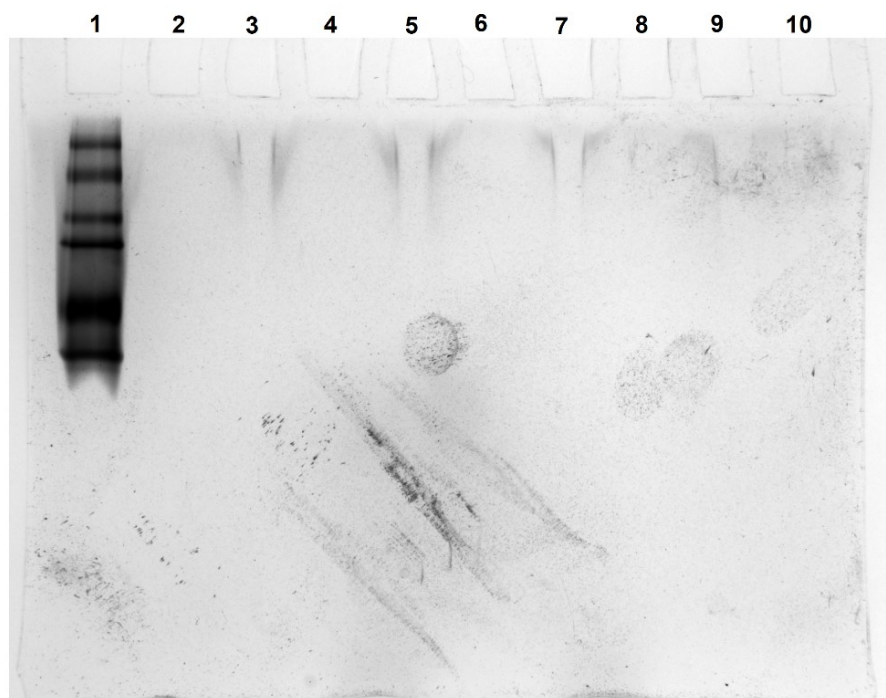
Na základě výsledků předchozích separací byla navržena kombinace SDS-PAGE a nativní elektroforézy. Standard molekulových hmotností byl stejný jako u předchozích experimentů. Zůstaly zachovány i koncentrace PLL v jamkách. K separaci byl opět použit 12% dělicí a 5% zaostřovací gel. Následně byly provedeny dva typy elektroforézy. V prvním případě zaostřovací gel, elektrodový ani vzorkový pufr neobsahovaly SDS, zatímco dělicí gel ano. Jak je vidět na Obrázku 15, ani zde nedošlo k separaci PLL. Navíc standard molekulových hmotností je opět rozdělen jen částečně proto nelze přesně určit molekulové hmotnosti proteinů v jednotlivých zónách.



Obrázek 15 – Výsledek separace PLL pomocí kombinace SDS-PAGE a nativní elektroforézy (zaostřovací gel bez SDS)

1 - standard molekulových hmotností Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards, 10 – 250 kDa (Bio-Rad, USA), 2 – prázdná jamka, 3 - 20 μ g PLL, 4 – prázdná jamka, 5 -10 μ g PLL, 6 – prázdná jamka, 7- 5 μ g PLL, 8 – prázdná jamka, 9 – 2,5 μ g PLL, 10 – 1 μ g PLL

Ve druhém případě bylo SDS přítomno v dělicím i zaostřovacím gelu, elektrodový a vzorkový pufr byl stejný jako u nativní elektroforézy. Zde je vidět PLL, který difundoval do gelu kolem jamek, do kterých byl pipetován. I když vyvolávání trvalo velmi dlouhou dobu, byl to jediný způsob, jak při našich podmínkách vizualizovat PLL na polyakrylamidovém gelu barveném pomocí roztoku amoniakálního stříbra. Jak je vidět na Obrázku 16, ani zde však není standard molekulových hmotností úplně rozdělen.



Obrázek 16 – Výsledek separace PLL pomocí kombinace SDS-PAGE a nativní elektroforézy (zaostřovací i dělicí gel s SDS)

1 - standard molekulových hmotností Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards, 10 – 250 kDa (Bio-Rad, Hercules, USA), 2 – prázdná jamka, 3 - 20 μg PLL, 4 – prázdná jamka, 5 -10 μg PLL, 6 – prázdná jamka, 7- 5 μg PLL, 8 – prázdná jamka, 9 – 2,5 μg PLL, 10 – 1 μg PLL

3.7 Ověření stability nanočástic po lyofilizaci

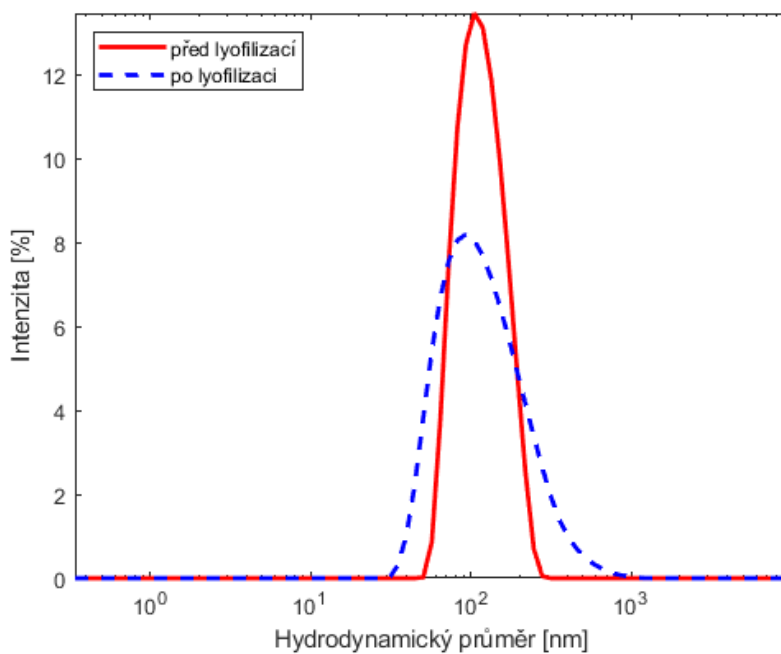
Vzhledem k tomu, že nanočástice byly připravovány za účelem použití *in vivo*, byla testována i jejich stabilita po lyofilizaci. Pro tento účel byly vybrány pouze HA/PLL nanočástice s 25 μg a 100 μg PLL připravené podle Přípravy 4. Po jejich lyofilizaci následovala rehydratace ve fyziologickém roztoku, která probíhala přibližně 12 h při 4 °C.

Ukázalo se, že nanočástice se 100 μg PLL byly po opětovném nabobtnání značně nestabilní. Místo původního roztoku vznikl spíše hustý gel obsahující sraženiny, proto tento vzorek nebyl dále analyzován. Na druhou stranu v roztoku obsahujícím nanočástice se 25 μg PLL se sice objevily okem viditelné sraženiny, ale i přesto si nanočástice téměř zachovaly svoji původní velikost. Před další manipulací jsme nechali sraženiny sedimentovat na dno zkumavky a k následné analýze byl použit pouze čirý roztok. Na základě DLS analýzy bylo zjištěno, že se hydrodynamický průměr nanočástic po lyofilizaci zvýšil

z původních 90,15 nm na 91,41 nm. Stejně tak se zvýšila i SD hydrodynamického průměru i PDI, stále se však jednalo o monodisperzní systém (viz. Tabulka 22 a Graf 16).

Tabulka 22 – Vliv lyofilizace na hydrodynamický průměr HA/PLL nanočástic se 25 µg PLL připravených dle Přípravy 4

	před lyofilizací	po lyofilizaci
Hydrod. průměr [nm]	90,15	91,41
SD hydrod. průměru [nm]	1,20	6,07
PDI	0,40	0,58
SD PDI	0,03	0,10



Graf 16 – Závislost intenzity rozptýleného světla na hydrodynamickém průměru HA/PLL nanočástic se 25 µg PLL připravených dle Přípravy 4 (vliv lyofilizace)

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo připravit stabilní nanočástice z kyseliny hyaluronové a poly-lysinu. Nejprve bylo vyzkoušeno fyzikální síťování, které spočívalo v elektrostatické interakci mezi záporně nabitými karboxylovými skupinami HA a kladně nabitými aminoskupinami PLL. Takto připravené nanočástice však nesplňovaly naše požadavky na stabilitu, takže tyto postupy nebyly dále rozvíjeny.

Druhou použitou metodou bylo chemické síťování polymerů pomocí EDC a AAD. Téměř všechny provedené experimenty vycházely ze zavedeného protokolu pro přípravu HANPs. Nanočástice byly připravovány vzájemným zesíťováním obou polymerů nebo post-syntetickou modifikací HANPs pomocí PLL. Během optimalizace bylo vyzkoušeno různé množství PLL, resp. různý poměr výchozích polymerů, různé pořadí síťovacích činidel a jednotlivých komponent.

Na základě našich výsledků se jako nejreprodukovatelnější jeví příprava, ve které bylo 25 µg, popř. i 100 µg PLL nejprve smícháno s AAD a následně přidáno do roztoku k EDC-aktivované HA. Druhou úspěšnou metodou byla post-syntetická modifikace, tedy vazba PLL na povrch připravených nanočástic pouze z kyseliny hyaluronové.

Připravené nanočástic bylo v naší laboratoři možné charakterizovat pouze pomocí DLS analýzy. Další použité konfirmační metody jako měření zeta potenciálu nebo stanovení koncentrace proteinů, tedy použitého PLL spektrofotometricky nebo fluorescenčně nepřinesly výsledky, které by poskytly informace o charakterizaci nanočástic.

Ve spolupráci s externími pracovišti máme možnost využít i další charakterizační metody, jako jsou např. analýza sledování nanočástic (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA), frakcionace v tokovém poli (Field Flow Fractionation, FFF) nebo transmisní elektronová mikroskopie (kryoTEM). Tyto možnosti jsou však omezené, proto nebyly zatím na naše experimenty aplikovány. V průběhu dalšího výzkumu budou vybrané HA/PLL nanočástice, včetně nanočástic připravených v této práci, pomocí některé z těchto metod charakterizovány.

Seznam zdrojů:

AGEITOS, Jose M., CHUAH, Jo-Ann, NUMATA, Keiji. Chemo-enzymatic synthesis of linear and branched cationic peptides: evaluation as gene carriers. *Macromolecular Bioscience*, 2015, **15**(7), 990-1003. Dostupné z: doi:10.1002/mabi.201400487

ALI, Ibraheem, CONRAD, Ryan J., VERDIN, Eric, et al. Lysine acetylation goes global: from epigenetics to metabolism and therapeutics. *Chemical Reviews*, 2018, **118**(3), 1216-1252. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.7b00181

AMATO, Giovanni, GRIMAUDO, Maria A., ALVAREZ-LORENZO, Carmen, et al. Hyaluronan/poly-L-lysine/berberine nanogels for impaired wound healing. *Pharmaceutics*, 2021, **13**(1), 34. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics13010034

AMORIM, Sara, MARTINS, Albino, NEVES, Nuno M., et al. Hyaluronic acid/poly- l -lysine bilayered silica nanoparticles enhance the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J. Mater. Chem. B*. 2014, **2**(40), 6939-6946. Dostupné z: doi:10.1039/C4TB01071J

AMORIM, Sara, PASHKULEVA, Iva, REIS, Celso A., et al. Tunable layer-by-layer films containing hyaluronic acid and their interactions with CD44. *Journal of Materials Chemistry B*, 2020, **8**(17), 3880-3885. Dostupné z: doi:10.1039/D0TB00407C

ANDREOU, Chrysafis, GREGORIOU, Yiota, ALI, Akbar, et al. In vivo imaging with SERS nanoprobe. *SERS for Point-Of-care and Clinical Applications*. Elsevier, 2022, s. 199-235. ISBN 9780128205488. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-820548-8.00003-5

ASSUNÇÃO, Marisa, YIU, Chi H. K., WAN, Ho-Ying, et al. Hyaluronic acid drives mesenchymal stromal cell-derived extracellular matrix assembly by promoting fibronectin fibrillogenesis. *Journal of Materials Chemistry B*, 2021, **9**(35), 7205-7215. Dostupné z: doi:10.1039/D1TB00268F

BALAZS, Endre A., LAURENT Torvard C, JEANLOZ, Roger W. Nomenclature of hyaluronic acid. *Biochemical Journal*, 1986, **235**(3), 903-903. Dostupné z: doi:10.1042/bj2350903

BARDAWEEL, Sanaa K., ABU-DAHAB, Rana, ABU-DAHAB, Nour F. XI. An in vitro based investigation into the cytotoxic effects of D-amino acids. *Acta Pharmaceutica*, 2013, 63(4), 467-478. Dostupné z: doi:10.2478/acph-2013-0032

BELDMAN, Thijs J., SENDERS, Max L., ALAARG, Amr, et al. Hyaluronan nanoparticles selectively target plaque-associated macrophages and improve plaque stability in atherosclerosis. *ACS Nano*, 2017, 11(6), 5785–5799. Dostupné z: doi:10.1021/acsnano.7b01385

BERKLAND, Cory, FAKHARI, Amir. *Hyaluronic acid particles and their use in biomedical application*. WO2013109959A1, 2013

BLEMINGS, Ken P., CRENSHAW, Thomas D., SWICK, Robert W., et al. Lysine- α -ketoglutarate reductase and saccharopine dehydrogenase are located only in the mitochondrial matrix in rat liver. *The Journal of Nutrition*, 1994, 124(8), 1215-1221., Dostupné z: doi:10.1093/jn/124.8.1215

CARNEIRO, Jaqueline, DÖLL-BOSCARDIN, Patrícia M., FIORIN, Bárbara C. Development and characterization of hyaluronic acid-lysine nanoparticles with potential as innovative dermal filling. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016, 52(4), 645-651, Dostupné z: doi:10.1590/s1984-82502016000400008

CARVALHO, Ana M., SOARES DA COSTA, Diana, PAULO, Pedro M.R., et al. Co-localization and crosstalk between CD 44 and RHAMM depend on hyaluronan presentation. *Acta Biomaterialia*, 2021, 119, 114-124. Dostupné z: doi:10.1016/j.actbio.2020.10.024

CROWTHER, Lisa M., MATHIS, Déborah, POMS, Martin, et al. New insights into human lysine degradation pathways with relevance to pyridoxine-dependent epilepsy due to antiquitin deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2019, 42(4), 620-628, Dostupné z: doi:10.1002/jimd.12076

D'AGOSTINO, Antonella, STELLAVATO, Antonietta, CORSUTO, Luisana, et al. Is molecular size a discriminating factor in hyaluronan interaction with human cells? *Carbohydrate Polymers*, 2017, 157(10), 21-30. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2016.07.125

DJAFARI, Jamila, FERNÁNDEZ-LODEIRO, Javier, SANTOS, Hugo M. et al. Study and preparation of multifunctional poly(L-lysine)@hyaluronic acid nanopolyplexes for the effective delivery of tumor suppressive MiR-34a into triple-negative breast cancer cells. *Materials*, 2020, **13**(23). Dostupné z: doi:10.3390/ma13235309

DOPORUČENÍ KOMISE 2022/C 229/01 ze dne 10. června 2022, o definici nanomateriálu, 2022. In: Brusel: Úřední věstník Evropské unie, ročník 65, číslo 229. Dostupné také z: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=uriserv%3AOJ.C_.2022.229.01.0001.01.CES&toc=OJ%3AC%3A2022%3A229%3ATOC

FIERMONTE, Giuseppe, DOLCE, Vincenza, DAVID, Laura, et al, The mitochondrial ornithine transporter. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**(35), 32778-32783. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M302317200

FRANÇA, Carla G., VILLALVA, Denise G., SANTANA, Maria H. A. Oxi-HA/ADH hydrogels: a novel approach in tissue engineering and regenerative medicine. *Polysaccharides*. 2021, **2**(2), 477-496. Dostupné z: doi:10.3390/polysaccharides2020029

GATRELL, S. K., BERG, L. E., BARNARD, J. T., et al. Tissue distribution of indices of lysine catabolism in growing swine¹. *Journal of Animal Science*, 2013, **91**(1), 238-247. Dostupné z: doi:10.2527/jas.2011-5070

GENNARI, Arianna, RIOS DE LA ROSA, Julio M., HOHN, Erwin, et al. The different ways to chitosan/hyaluronic acid nanoparticles: templated vs direct complexation. Influence of particle preparation on morphology, cell uptake and silencing efficiency. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 2019, **10**(2019), 2594-2608. Dostupné z: doi:10.3762/bjnano.10.250

GIUBERTONI, Giulia, BURLA, Federica, MARTINEZ-TORRES, Cristina, et al. Molecular origin of the elastic state of aqueous hyaluronic acid. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2019, **123**(14), 3043-3049. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jpcc.9b00982

GÓMEZ-TORRES, María J., SÁEZ-ESPINOSA, Paula, MANZANO-SANTIAGO, Paula, et al. Sperm adhesion molecule 1 (SPAM1) distribution in selected human sperm by hyaluronic acid test. *Biomedicines*, 2022, **10**(10), 2553. Dostupné z: doi:10.3390/biomedicines10102553

GORMAN, Amy, HOSSAIN, Khondker R., CORNELIUS, Flemming, et al, Penetration of phospholipid membranes by poly-l-lysine depends on cholesterol and phospholipid composition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 2020, **1862**(2), 183128, Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamem.2019.183128

GÓRSKA-WARSEWICZ, Hanna, LASKOWSKI, Waław, KULYKOVETS, Olena, et al. Food products as sources of protein and amino acids—the case of Poland. *Nutrients*, 2018, **10**(12), 1977. Dostupné z: doi:10.3390/nu10121977

GUO, Jiahong, WEI, Changzheng, WANG, Xiaotong, et al. An in situ mechanical adjustable double crosslinking hyaluronic acid/poly-lysine hydrogel matrix: fabrication, characterization and cell morphology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021 **180**, 234-241. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.03.071

GUPTA, Ramesh C., LALL, Rajiv, SRIVASTAVA Ajay, et al. Hyaluronic acid: molecular mechanisms and therapeutic trajectory. *Frontiers in Veterinary Science*, 2019, **6**(192), 1-24. Dostupné z: doi:10.3389/fvets.2019.00192

HAHN, Sei K., a HOFFMAN, Allan S. Preparation and characterization of biocompatible polyelectrolyte complex multilayer of hyaluronic acid and poly-l-lysine. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2005, **37**(5), 227-231. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2005.11.010

HAN, Hwa S., THAMBI, Thavasyappan, CHOI, Ki Y., et al. Bioreducible shell-cross-linked hyaluronic acid nanoparticles for tumor-targeted drug delivery. *Biomacromolecules*, 2015, **16**(2), 447-456. Dostupné z: doi:10.1021/bm5017755

HARADA, Hosami a TAKAHASHI, Masaaki. CD 44-dependent intracellular and extracellular catabolism of hyaluronic acid by hyaluronidase-1 and -2. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, **282**(8), 5597-5607. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M608358200

HE, Shu, LIU, An, ZHANG, Jie, et al, Preparation of ϵ -polylysine and hyaluronic acid self-assembled microspheres loaded bacterial cellulose aerogels with excellent antibacterial activity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2022, **654**(2022). Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2022.130114

HIGASHINO, Kazuya, TSUKADA, Kinji, LIEBERMAN, Irving. Saccharopine, a product of lysine breakdown by mammalian liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1965, **20**(3), 285-290. Dostupné z: doi:10.1016/0006-291X(65)90361-X

HIRAKI, Jun, ICHIKAWA, Takafumi, NINOMIYA, Shin-ichi, et al. Use of ADME studies to confirm the safety of ϵ -polylysine as a preservative in food. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2003, **37**(2), 328-340. Dostupné z: doi:10.1016/S0273-2300(03)00029-1

HU, Haofeng, LUO, Fulin, ZHANG, Qian, et al. Berberine coated biocomposite hemostatic film based alginate as absorbable biomaterial for wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, **209**(Part B), 1731-1744. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.04.132

HU, Zhibing, XIA, Xiaohu, TANG, Liping. *Process for synthesizing oil and surfactant-free hyaluronic acid nanoparticles and microparticles*. US 7,601,704 B2, 2004

HUBBARD, Caitlin, MCNAMARA, Joshua T., AZUMAYA, Caleigh, et al. The hyaluronan synthase catalyzes the synthesis and membrane translocation of hyaluronan. *Journal of Molecular Biology*, 2012, **418**(1-2), 21-31. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmb.2012.01.053

HUTZLER, Joel a DANCIS, Joseph. Lysine-ketoglutarate reductase in human tissues., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Enzymology*, 1975, **377**(1), 42-51. Dostupné z: doi:10.1016/0005-2744(75)90284-3

ChEBI. CHEBI:25094 - lysine. *EMBL-EBI* [online]. UK: European Molecular Biology Laboratory, 2019 [cit. 2023-01-29]. Dostupné z: <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:25094>

ChEBI. CHEBI:33709 - amino acid. *EMBL-EBI* [online]. UK: European Molecular Biology Laboratory, 2020 [cit. 2023-01-29]. Dostupné z: <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:33709>

CHEN, Yao-Tseng, CHEN, Zhengming, DU, Yi-Chieh N.. Immunohistochemical analysis of RHAMM expression in normal and neoplastic human tissues: a cell cycle protein with distinctive expression in mitotic cells and testicular germ cells. *Oncotarget*, 2018, **9**(30), 20941-20952. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.24939

CHIRAYIL, Cintil J., ABRAHAM, Jiji, MISHRA, Raghvendra K. *et al.* Instrumental techniques for the characterization of nanoparticles. *Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization*, Elsevier, 2017, s. 1-36. ISBN 9780323461399. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-46139-9.00001-3

JUNGNICKEL, Katharina E, J., PARKER, Joanne L., NEWSTEAD, Simon. Structural basis for amino acid transport by the CAT family of SLC7 transporters. *Nature Communications*, 2018, **9**(1), 550. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-018-03066-6

KANG, Li-Jung, YOON, Juhwan, RHO, Jun G., *et al.* Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles for osteoarthritis treatment. *Biomaterials*. 2021, **275**(2021), 1-10. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2021.120967

KAWAGUCHI, Madoka, DASHZEVEG, Nurmaa, CAO, Yue, *et al.* Extracellular domains I and II of cell-surface glycoprotein CD 44 mediate its trans-homophilic dimerization and tumor cluster aggregation. *Journal of Biological Chemistry*, 2020, **295**(9), 2640-2649, Dostupné z: doi:10.1074/jbc.RA119.010252

KOHLMEIER, Martin. Lysine. *Nutrient Metabolism*, Academic Press, 2003, s. 356-363, ISBN 9780124177628. Dostupné z: doi:10.1016/B978-012417762-8.50056-9

KWOK, Daniel Y., NEUMANN, August W. Contact angle measurement and contact angle interpretation. *Advances in Colloid and Interface Science*, 1999, **81**(3), 167-249. Dostupné z: doi:10.1016/S0001-8686(98)00087-6

LABIE, Hélène, PERRO, Adeline, LAPEYRE, Véronique, *et al.* Sealing hyaluronic acid microgels with oppositely-charged polypeptides: a simple strategy for packaging hydrophilic drugs with on-demand release. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2019, **535**, 16-27. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcis.2018.09.048

LAGO, Guillermo, ORUNA, Loida, CREMATA, Jose A., *et al.* Isolation, purification and characterization of hyaluronan from human umbilical cord residues. *Carbohydrate Polymers*, 2005, **62**(4), 321-326. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2005.04.014

LAURENT, Torvard C. a FRASER, Robert E. J. Hyaluronan 1. *The FASEB Journal*, 1992, **6**(7), 2397-2404. Dostupné z: doi:10.1096/fasebj.6.7.1563592

- LAURENT, Ulla B.G. a REED, Rolf K. Turnover of hyaluronan in the tissues. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1991, **7**(2), 237-256. Dostupné z: doi:10.1016/0169-409X(91)90004-V
- LAWRANCE, William, BANERJI, Suneale, DAY, Anthony J., et al. Binding of hyaluronan to the native lymphatic vessel endothelial receptor LYVE-1 is critically dependent on receptor clustering and hyaluronan organization. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, **291**(15), 8014-8030. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M115.708305
- LE, Huu V., DULONG, Virginie, PICTON, Luc, et al. Thermoresponsive nanogels based on polyelectrolyte complexes between polycations and functionalized hyaluronic acid. *Carbohydrate Polymers*, 2022, **292**(2022), 1-10. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2022.119711
- LEE, Hyukjin, JEONG, Yongho, PARK, Tae G., et al. Shell Cross-linked hyaluronic acid/polylysine layer-by-layer polyelectrolyte microcapsules prepared by removal of reducible hyaluronic acid microgel cores. *Biomacromolecules*, 2007, **8**(12), 3705-3711. Dostupné z: doi:10.1021/bm700854j
- LEE, Wang H., RHO, Jun G., YANG, Yeyoung, et al. Hyaluronic acid nanoparticles as a topical agent for treating psoriasis. *ACS Nano*, 2022, **16**(12), 20057-20074. Dostupné z: doi:10.1021/acsnano.2c07843
- LI, Pan a DONG, Chang-Ming., Phototriggered ring-opening polymerization of a photocaged L-lysine N -carboxyanhydride to synthesize hyperbranched and linear polypeptides. *ACS Macro Letters*, 2017, **6**(3), 292-297. Dostupné z: doi:10.1021/acsmacrolett.7b00167
- LI, Wenhao, ZHOU, Chuchu, FU, Yao, et al. Targeted delivery of hyaluronic acid nanomicelles to hepatic stellate cells in hepatic fibrosis rats. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2020, **10**(4), 693-710. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsb.2019.07.003
- LI, Ying-Qiu, HAN, Qing, FENG, Jian-Ling, et al. Antibacterial characteristics and mechanisms of ϵ -poly-lysine against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, 2014, **43**, 22-27. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2014.02.023
- LOWRY, Gregory V., HILL, Reghan J., HARPER, Stacey, et al. Guidance to improve the scientific value of zeta-potential measurements in nanoEHS. *Environmental Science: Nano*. 2016, **3**(5), 953-965. Dostupné z: doi:10.1039/C6EN00136J

LUO, Minkui. Chemical and biochemical perspectives of protein lysine methylation. *Chemical Reviews*, 2018, **118**(14). Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.8b00008

MAEDA, Hiroshi. Vascular permeability in cancer and infection as related to macromolecular drug delivery, with emphasis on the EPR effect for tumor-selective drug targeting. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 2012, **88**(3), 53-71. Dostupné z: doi:10.2183/pjab.88.53

MEYER, Karl a PALMER, John W. The polysaccharides of the vitreous humor. *Journal of Biological Chemistry*, 1934, **107**(3), 629-634,. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(18)75338-6

MIRTIČ, Andreja a GRDADOLNIK, Jože. The structure of poly-L-lysine in different solvents. *Biophysical Chemistry*, 2013, **175-176** (2013), 47-53. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpc.2013.02.004

MURAKAMI, Tomohiko, OTSUKI, Shuhei, OKAMOTO, Yoshinori, et al. Hyaluronic acid promotes proliferation and migration of human meniscus cells via a CD44-dependent mechanism. *Connective Tissue Research*, 2019, **60**(2), 117-127. Dostupné z: doi:10.1080/03008207.2018.1465053

NCIthesaurus. Arginine (Code C62008). In: *NCIthesaurus* [online]. USA: National Cancer Institute, 2023 [cit. 2023-03-30]. Dostupné z: https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/pages/concept_details.jsf?dictionary=NCI_Thesaurus&version=23.02d&code=C62008&ns=ncit&type=properties&key=227985007&b=1&n=0&vse=null

NCIthesaurus. Histidine (Code C29597). *NCIthesaurus* [online], USA: National Cancer Institute 2022 [cit. 2023-01-29]. Dostupné z: https://ncithesaurus.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=ncit&code=C29597

NGUYEN, Do M., TOAN, Tran T. T. Detection of methylparaben in cosmetics by poly L-lysine/reduced graphene oxide-based Sensor. *ECS Sensors Plus*, 2022, **1**(3). Dostupné z: doi:10.1149/2754-2726/ac8aa7

NOVÁK, Petr, KRUPPA, Gary H. Intra-molecular cross-linking of acidic residues for protein structure studies. *European Journal of Mass Spectrometry*, 2008, **14**(6), 355-365. Dostupné z: doi:10.1255/ejms.963

ORMISTON, Mark L., SLAUGHTER, Graham R. D., DENG, Yupu, et al. The enzymatic degradation of hyaluronan is associated with disease progression in experimental pulmonary hypertension: isolation and characterization. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2010, **298**(2), 148-157. Dostupné z: doi:10.1152/ajplung.00097.2009

PALOMO, Jose M. Solid-phase peptide synthesis: an overview focused on the preparation of biologically relevant peptides, *RSC Adv*, 2014, **4**(62), 32658-32672., Dostupné z: doi:10.1039/C4RA02458C

PAN, Wei, YIN, Dong-Xiao, JING, Hai-Rong, et al. Core-corona structure formed by hyaluronic acid and poly(L-lysine) via kinetic path. *Chinese Journal of Polymer Science*, 2019, **37**(1), 36-42. Dostupné z: doi:10.1007/s10118-018-2166-z

PANDEY, Madhu S., HARRIS, Edward N., WEIGEL, Paul H. HARE-Mediated endocytosis of hyaluronan and heparin is targeted by different subsets of three endocytic motifs. *International Journal of Cell Biology*, 2015, **2015**, 1-12. Dostupné z: doi:10.1155/2015/524707

POSSET, Roland, OPP, Silvana, STRUYS, Eduard A., et al. Understanding cerebral L-lysine metabolism: the role of L-pipecolate metabolism in Gcdh-deficient mice as a model for glutaric aciduria type I. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2015, **38**(2), 265-272. Dostupné z: doi:10.1007/s10545-014-9762-z

PUBCHEM. COMPOUND SUMMARY Hyaluronan. In: *National Library of Medicine* [online]. USA: National Center for Biotechnology Information, 2005 [cit. 2022-10-28]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/24759>

PULAKKAT, Sreeranjini, BALAJI, Sai A., RANGARAJAN, Annapoorni, et al. Surface engineered protein nanoparticles with hyaluronic acid based multilayers for targeted delivery of anticancer agents. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2016, **8**(36), 23437-23449. Dostupné z: doi:10.1021/acsami.6b04179

- RAMOS, Ana P. Dynamic light scattering applied to nanoparticle characterization. In: *Nanocharacterization Techniques*. Elsevier, 2017, s. 99-110. ISBN 9780323497787. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-49778-7.00004-7
- REEDS, Peter J. Dispensable and indispensable amino acids for humans. *The Journal of Nutrition*, 2000, **130**(7), 1835-1840. Dostupné z: doi:10.1093/jn/130.7.1835S
- RHO, Jun G., HAN, Hwa S., HAN, Ji H., et al. Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles: implications as a nanomedicine for treatment of type 2 diabetes. *Journal of Controlled Release*, 2018, **279**, 89-98. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2018.04.006
- RILLA, Kirsi, OIKARI, Sanna, JOKELA, Tiina A., et al. Hyaluronan synthase 1 (HAS1) requires higher cellular UDP-GlcNAc concentration than HAS2 and HAS3*. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, **288**(8), 5973-5983. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M112.443879
- SALAHPOUR-ANARJAN, Fatemeh. Active targeting drug delivery nanocarriers: Ligands. *Nano-Structures & Nano-Objects* [online], 2019,**19**. Dostupné z: doi:10.1016/j.nanoso.2019.100370
- SALMA-ANCANE, Kristine, SCEGLOVS, Artemijs, TRACUMA, Eliza, et al. Effect of crosslinking strategy on the biological, antibacterial and physicochemical performance of hyaluronic acid and ϵ -polylysine based hydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, **208**, 995-1008. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.03.207
- SATO, Toshinori, NAKATA, Mitsuhiro, YANG, Zhihong, et al. In vitro and in vivo gene delivery using chitosan/hyaluronic acid nanoparticles: influences of molecular mass of hyaluronic acid and lyophilization on transfection efficiency. *The Journal of Gene Medicine*, 2017, **19**(8). Dostupné z: doi:10.1002/jgm.2968
- SCOTT, John E. a HEATLEY, Frank. Biological properties of hyaluronan in aqueous solution are controlled and sequestered by reversible tertiary structures, defined by NMR spectroscopy. *Biomacromolecules*, 2002, **3**(3), 547-553. Dostupné z: doi:10.1021/bm010170j
- SCHWARTZ, Daniel M., SHUSTER, Svetlana, JUMPER, Michele D., et al. Human vitreous hyaluronidase: isolation and characterization. *Current Eye Research*, 1996, **15**(12), 1156-1162. Dostupné z: doi:10.3109/02713689608995150

SIMONSON, Andrew W., LAWANPRASERT, Atip, GORALSKI, Tyler D.P., et al. Bioresponsive peptide-polysaccharide nanogels — A versatile delivery system to augment the utility of bioactive cargo. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2019, **17**, 391-400, Dostupné z: doi:10.1016/j.nano.2018.10.008

SONI, Kruti S., DESALE, Swapnil S., BRONICH, Tatiana K. Nanogels: an overview of properties, biomedical applications and obstacles to clinical translation. *Journal of Controlled Release*. 2016, **240**(2016), 109-126. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2015.11.009

SOURI, Masoumeh, BAGHERZADEH, Mohammad A., MOFAZZAL JAHROMI, Mirza A., et al, Poly-L-lysine/hyaluronan nanocarriers as a novel nanosystem for gene delivery. *Journal of Microscopy*, 2022, **287**(1), 32-44, Dostupné z: doi:10.1111/jmi.13107

SPADEA, Alice, RIOS DE LA ROSA, Julio M., TIRELLA Annalisa, et al. Evaluating the efficiency of hyaluronic acid for tumor targeting via CD 44. *Molecular Pharmaceutics*, 2019, **16**(6), 2481-2493. Dostupné z: doi:10.1021/acs.molpharmaceut.9b00083

STAGI, Luigi, SINI, Martina, CARBONI, Davide, et al. Modulating the poly-l-lysine structure through the control of the protonation–deprotonation state of l-lysine. *Scientific Reports*, 2022, **12**(1). Dostupné z: doi:10.1038/s41598-022-24109-5

STERN, Robert. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology*, 2003, **13**(12), 105R-115. Dostupné z: doi:10.1093/glycob/cwg112

STETEFELD, Jörg, MCKENNA, Sean A., PATEL, Trushar R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*, 2016, **8**(4), 409-427. Dostupné z: doi:10.1007/s12551-016-0218-6

TAO, Youhua, CHEN, Xiaoyu, JIA, Fan, et al., New chemosynthetic route to linear ϵ -poly-lysine. *Chemical Science*, 2015, **6**(11), 6385-6391,. Dostupné z: doi:10.1039/C5SC02479J

TEMPLE-WONG, Michele M., REN, Shuwen, QUACH, Phu, et al. Hyaluronan concentration and size distribution in human knee synovial fluid: variations with age and cartilage degeneration. *Arthritis Research & Therapy*, 2016, **18**(1), 1-8. Dostupné z: doi:10.1186/s13075-016-0922-4

- TIAN, Weiming M., HOU, Shui-Ping, MA, J., et al. Hyaluronic acid–poly-D-lysine-based three-dimensional hydrogel for traumatic brain injury. *Tissue Engineering*, 2005, **11**(3-4), 513-525. Dostupné z: doi:10.1089/ten.2005.11.513
- TOBISAWA, Yuki, FUJITA, Naoki, YAMAMOTO, Hayato, et al. The cell surface hyaluronidase TMEM2 is essential for systemic hyaluronan catabolism and turnover. *Journal of Biological Chemistry*, 2021, **297**(5). Dostupné z: doi:10.1016/j.jbc.2021.101281
- TSUCHIYA, Kousuke a NUMATA, Keiji, Chemoenzymatic synthesis of polypeptides for use as functional and structural materials. *Macromolecular Bioscience*, 2017, **17**(11), Dostupné z: doi:10.1002/mabi.201700177
- ULLAH, Aziz a LIM, Sung I. Nanogels: update on the methods of synthesis and applications for cardiovascular and neurological complications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2022, **77**(2022), Dostupné z: doi:10.016/j.jddst.2022.103879
- VELK, Natalia, UHLIG, Katja, VIKULINA, Anna, et al. Mobility of lysozyme in poly(l-lysine)/hyaluronic acid multilayer films. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2016, **147**, 343-350. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2016.07.055
- WEI, Yue-Teng, HE, Yu, XU, Chang-Lei, et al. Hyaluronic acid hydrogel modified with nogo-66 receptor antibody and poly-L-lysine to promote axon regrowth after spinal cord injury. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2010, **95B**(1), 110-117. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.b.31689
- WEISSMANN, Bernard a MEYER, Karl. The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical cord 1,2. *Journal of the American Chemical Society*, 1954, **76**(7), 1753-1757. Dostupné z: doi:10.1021/ja01636a010
- XIONG, Qingqing, CUI, Mangmang, BAI, Yang, et al. A supramolecular nanoparticle system based on β -cyclodextrin-conjugated poly-l-lysine and hyaluronic acid for co-delivery of gene and chemotherapy agent targeting hepatocellular carcinoma. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2017, **155**, 93-103. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2017.04.008
- XU, Delei, YAO, Haiqing, XU, Zhaoxian, et al. Production of ϵ -poly-lysine by *Streptomyces albulus* PD-1 via solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 2017, **223**, 149-156. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2016.10.032

XUE, Fuxin, ZHANG, Hui, HU, Junli, et al. Hyaluronic acid nanofibers crosslinked with a nontoxic reagent. *Carbohydrate Polymers*, 2021, **259**(2021), 1-9. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2021.117757

YAMANAKA, Kazuya, MARUYAMA, Chitose, TAKAGI, Hiroshi, et al. E-Poly-L-lysine dispersity is controlled by a highly unusual nonribosomal peptide synthetase. *Nature Chemical Biology*, 2008, **4**(12), 766-772. Dostupné z: doi:10.1038/nchembio.125

YAMANLAR, Seda, SANT, Shilpa, BOUDOU, Thomas, et al. Surface functionalization of hyaluronic acid hydrogels by polyelectrolyte multilayer films. *Biomaterials*, 2011, **32**(24), 5590-5599. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2011.04.030

YANG, Liu, GAO, Shiya, ASGHAR, Sajid, et al. Hyaluronic acid/chitosan nanoparticles for delivery of curcuminoid and its in vitro evaluation in glioma cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, **72**(2015), 1391-1401. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.10.039

YANG, Qianwen, XIE, Zhigang, HU, Junli, et al. Hyaluronic acid nanofiber mats loaded with antimicrobial peptide towards wound dressing applications. *Materials Science and Engineering: C*, 2021, **128**(2021), 1-9. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2021.112319

YOON, Hong Y., KOO, Heebeom, CHOI, Ki Y., et al. Photo-crosslinked hyaluronic acid nanoparticles with improved stability for in vivo tumor-targeted drug delivery. *Biomaterials*, 2013, **34**(21), 5273-5280. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2013.03.050

YOON, Hong Y., KOO, Heebeom, CHOI, Ki Y., et al. Tumor-targeting hyaluronic acid nanoparticles for photodynamic imaging and therapy. *Biomaterials*, 2012, **33**(15), 3980-3989. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2012.02.016

YOSHIDA, Hiroyuki, NAGAOKA, Aya, KUSAKA-KIKUSHIMA, Ayumi, et al. KIAA1199, a deafness gene of unknown function, is a new hyaluronan binding protein involved in hyaluronan depolymerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, **110**(14), 5612-5617. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1215432110

ZAHOUANI, Sarah, CHAUMONT, Alain, SENGER, Bernard, et al. Stretch-induced helical conformations in poly(L-lysine)/hyaluronic acid multilayers. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2016, **8**(24), 14958-14965. Dostupné z: doi:10.1021/acsami.5b08302

ZHANG, Wei, YIN, Guoyu, ZHAO, Heping, et al. Secreted KIAA1199 promotes the progression of rheumatoid arthritis by mediating hyaluronic acid degradation in an ANXA1-dependent manner. *Cell Death and Disease*, 2021, **12**(1), 1-14. Dostupné z: doi:10.1038/s41419-021-03393-5

ZHANG, Xiaowei, SHI, Ce, LIU, Zuoqia, et al. Antibacterial activity and mode of action of ϵ -polylysine against *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Medical Microbiology*, 2018, **67**(6), 838-845. Dostupné z: doi:10.1099/jmm.0.000729

ZHOU, B. Purification and molecular identification of the human hyaluronan receptor for endocytosis. *Glycobiology*, 2003, **13**(5), 339-349. Dostupné z: doi:10.1093/glycob/cwg029

ZHOU, Ying, KANG, Lingzhi, YUE, Zhilian, et al. Composite tissue adhesive containing catechol-modified hyaluronic acid and poly-L-lysine. *ACS Applied Bio Materials*, 2020, **3**(1), 628-638. Dostupné z: doi:10.1021/acsabm.9b01003

ZHU, Haofang, LIU, Rui, SHANG, Yixuan, et al. Polylysine complexes and their biomedical applications. *Engineered Regeneration*, 2023, **4**(1), 20-27., Dostupné z: doi:10.1016/j.engreg.2022.11.001

ŽÁDNÍKOVÁ, Petra, ŠÍNOVÁ, Romana, PAVLÍK, Vojtěch, et al. The degradation of hyaluronan in the skin. *Biomolecules*, 2022, **12**(2), 251. Dostupné z: doi:10.3390/biom12020251