

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

**Nanomateriály z biodegradabilních polymerů využitelné jako
„drug delivery system“**

Kateřina Teichmanová

Bakalářská práce

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kateřina Teichmanová**
Osobní číslo: **C15141**
Studijní program: **B2830 Farmakochemie a medicínální materiály**
Studijní obor: **Farmakochemie a medicínální materiály**
Název tématu: **Nanomateriály z biodegradabilních polymerů využitelné jako "drug delivery system"**
Zadávající katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Přehled biodegradabilních polymerů. Charakterizace, obecné využití.
2. Nanočástice z biodegradabilních polymerů, vč. hydrogelů a skafoldů a kopolymerů.
3. Využití pro farmakochemické účely, drug delivery systémy.
4. Výsledky zpracujte formou závěrečné zprávy.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Všechna dostupná chemická literatura.

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant bakalářské práce:

Mgr. Jitka Kašparová

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **28. února 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlášení

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, 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. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 28. 6. 2018.

Kateřina Teichmanová

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala Mgr. Jitce Kašparové a RNDr. Lucii Korecké, Ph.D. za pomoc při zpracování bakalářské práce, za cenné rady a věnovaný čas. Dále děkuji Ing. Jirímu Palarčíkovi, Ph.D. za pomoc s měřením velikosti nanočástic kyseliny hyaluronové.

V Pardubicích dne 28. 6. 2018.

Kateřina Teichmanová

ANOTACE

Bakalářská práce se zabývá nanomateriály z biodegradabilních polymerů s potenciálem pro využití v cílené distribuci léčiv. Teoretická část shrnuje základní vlastnosti, možnosti přípravy a využití některých polymerů s vysokým potenciálem pro kontrolované podání terapeutických látek. Dále se věnuje formám, v jakých se tyto systémy aplikují do těla pacienta. V experimentální části je popsán postup přípravy nanočástic z kyseliny hyaluronové, na které byl navázán biotin jako bioaktivní molekula. Součástí práce je také optimalizace postupu jeho kvantifikace, která byla prováděna spektrofotometricky. U připravených částic modifikovaných biotinem byla ověřena jeho skladovací stabilita. Byla také testována odolnost vazby biotinu na nanočásticích, a to po působení silně kyselého a zásaditého prostředí jako simulace extrémních podmínek v organismu.

KLÍČOVÁ SLOVA

cílené doručování léčiv, nanočástice, polymery, hydrogely, biodegradabilní

TITLE

Biodegradable polymers-based nanomaterials applied for drug delivery system

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with nanomaterials made of biodegradable polymers with potential for use in targeted drug delivery. The theoretical part summarizes general properties, methods of preparation and specific application areas of several polymers with high potential for controlled delivery of therapeutic substances. It also focuses on the way how these systems get into the patient's body. The experimental part describes the process of preparation of nanoparticles of hyaluronic acid to which biotin has been bound as a bioactive molecule. The thesis also includes the optimization of the process of its quantification, which was measured spectrophotometrically. The prepared biotin-modified particles have been tested for storage stability. Finally, the resistance of biotin binding to nanoparticles has also been tested in acidic and alkaline conditions as a simulation of extreme conditions in the body.

KEYWORDS

drug delivery system, nanoparticles, polymers, hydrogels, biodegradable

Seznam zkratek

BSA	hovězí sérový albumin, z angl. Bovine Serum Albumine
CD44	receptor kyseliny hyaluronové, z angl. Cluster of Differentiation 44
CS	chondroitin sulfát, z angl. Chondroitin Sulfate
DLS	dynamický rozptyl světla, z angl. Dynamic Light Scattering
DDS	cílený transport léčiva, z angl. Drug Delivery System
ECM	extracelulární matrix
EDMA	ethyldimethakrylát
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor; z angl. Epidermal Growth Factor Receptor
EO	ethylenoxid
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (USA), z angl. Food and Drug Administration
HAS	hyaluronansyntáza, z angl. Hyaluronic Acid Synthases
HEMA	2-hydroxyethylmethakrylát
HYAL-1	hyaluronidáza-1
LCST	dolní kritická rozpouštěcí teplota, z angl. Lower Critical Solution Temperature
LMWH	nízkomolekulární heparin, z angl. Low Molecular Weight Heparin
NPs	nanočástice, z angl. Nanoparticles
PAC	poly(alkylkyanoakrylát), z angl. Poly(alkyl-cyanoacrylate)
PCL	poly- ϵ -(kaprolakton), z angl. Poly- ϵ -(caprolactone)
PGA	kyselina polyglykolová, z angl. Polyglycolic Acid
PLA	kyselina polyléčná, z angl. Polylactic Acid
PLGA	poly(laktidy-co-glykolid)
PO	propylenoxid
RHAMM	receptor kyseliny hyaluronové zprostředkující buněčnou motilitu, z angl. Hyaluronan-Mediated Motility Receptor
RT	laboratorní teplota, z angl. Room Temperature
UCST	horní kritická rozpouštěcí teplota, z angl. Upper Critical Solution Temperature
UFH	nefrakcionovaný heparin, z angl. Unfractionated Heparin

Obsah

Úvod	10
1. Teoretická část	11
1.1 Historie a základní vlastnosti polymerů využívaných pro drug delivery systemy	11
1.2 Biodegradabilní polymery na bázi přírodních materiálů.....	12
1.2.1 Kyselina hyaluronová.....	12
1.2.2 Kyselina polymléčná	13
1.2.3 Chitosan.....	15
1.2.4 Alginát	17
1.2.5 Dextran	18
1.2.6 Heparin	19
1.2.7 Chondroitin sulfát	20
1.3 Formy pro drug delivery systemy	22
1.3.1 Nanočástice.....	22
1.3.2 Výroba nanočástic	24
1.3.3 Hydrogely	26
1.3.4 Výroba hydrogelů	28
1.3.2 Skafoldy.....	31
1.3.3 Výroba skafoldů.....	31
1.3.4 Kopolymery	34
2. Experimentální část.....	36
2.1 Použité přístroje a pomůcky	36
2.2 Příprava nanočástic z kyseliny hyaluronové.....	36
2.3 Imobilizace biotinu na připravené nanočástice.....	37
2.4 Kvantifikace biotinu navázaného na nanočástice	37
2.5 Skladovací stabilita biotinu navázaného na nanočástice	39
2.6 Ověření odolnosti navázaného biotinu na nanočásticích v silně kyselém a silně zásaditém prostředí	39
3. Výsledky a diskuze	40
3.1 Příprava nanočástic z kyseliny hyaluronové.....	40
3.2 Imobilizace biotinu na připravené nanočástice.....	41
3.3 Skladovací stabilita biotinu navázaného na nanočásticích	44
3.4 Ověření odolnosti navázaného biotinu na nanočásticích v silně kyselém a silně zásaditém prostředí	45
4. Závěr.....	47
5. Seznam použité literatury	49

6.	Seznam obrázků	57
7.	Seznam grafů	58

Úvod

Nanotechnologie je v současné době široce rozšířena do oblastí vláken a textilií, elektroniky, forenzních věd, zemědělství, a především medicíny a farmacie. Rozvoj materiálové vědy otevírá dveře do světa, kde zásadní roli hraje rozměr *nano*. Velikost struktur, které nás zajímají, se totiž běžně pohybuje od 1 do 100 nm. Unikátní vlastnosti jsou důvodem, proč se dnes nanomateriály stále častěji objevují v řadě medicínských aplikací. Setkáme se s nimi ve tkáňovém inženýrství, genové terapii nebo v systémech doručování léčiv a jiných bioaktivních látek. Kontrolované dodávání léků je jednou z nejběžnějších oblastí, kde se uplatňují nanočástice (NPs). Jejich použití je cestou, jak zlepšit terapeutické hodnoty léčiva, jako například účinnost léku, specifitu, toxicitu, rozpustnost a biologickou dostupnost. Nanoenkapsulací můžeme docílit zvýšené ochrany proti předčasné degradaci. S pomocí NPs lze distribuovat nízkomolekulární látky, proteiny, peptidy či dokonce geny do konkrétní tkáně nebo orgánu. Předpokládá se, že NPs interagují s buněčnou stěnou a jejími proteiny stejně snadno jako např. viry, protože jejich rozměr se také pohybuje v měřítku nanometrů [1].

K přípravě nanočástic se používají přírodní nebo syntetické polymery. Zástupci přírodních polymerů jsou například kyselina hyaluronová (HA) nebo chitosan. Za syntetických lze zmínit kyselinu polymlečnou (PLA), polyglykolovou (PGA) nebo jejich kopolymery (PLGA). Výběr polymeru záleží na požadovaných vlastnostech systému, biokompatibilitě a farmakokinetickém profilu léčiva [1, 2].

Při enterálním podání léčiva do těla pacienta je v důsledku interakce léku s biologickým prostředím spuštěna kaskáda biotransformací. Metabolismus léčiva v těle je velmi složitý sled reakcí a jeho osud je ovlivněn také způsobem užití. V případě podání léku ústy se může být značná část enzymaticky degradována např. v žaludku či v játrech ještě dříve, než se dostane do krevního oběhu. Cílený transport léčiva (DDS) lze obecně definovat jako různé mechanismy přijímání terapeutických látek do těla pacienta [3, 4]. Ideálně vytvořený DDS by měl vykazovat následující atributy: prodloužené a řízené uvolňování léčiva, vyšší dostupnost, optimální terapeutická koncentrace léku v plazmě s minimální fluktuací, zvýšení biologického poločasu rozpadu léku, odstranění toxických vedlejších účinků a častého dávkování. Vždy je nutno volit kompromis mezi vhodnou farmakokinetikou léku a pohodlím pro pacienta.

1. Teoretická část

1.1 Historie a základní vlastnosti polymerů využívaných pro drug delivery systémy

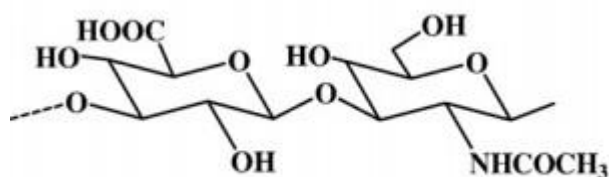
O prvním využití polymerů pro DDS informovali v roce 1964 Folkman a Long, jejichž práce uvádí experimenty, při kterých jsou schopny hydrofobní nízkomolekulární léčiva (např. digitoxin) difundovat stěnou silikonových trubic definovanou rychlostí [5]. Od té doby mají polymery nezastupitelné místo v oblasti výzkumu kontrolovaného dodávání léčiv. Farmaceutické technologie se stále častěji zabývají vývojem násobných lékových forem (mikročastic, pelet, nanofilmů apod.) a jejich zavedením do terapeutické praxe, přičemž klasické formy jako tablety, masti či injekční roztoky se dostávají do pozadí zájmu. Během posledních desetiletí bylo připraveno množství nových lékových forem, které dokáží plně využít hodnotný potenciál a jedinečné vlastnosti polymerních látek [6].

Takovéto systémy lze s léčivými látkami kombinovat kovalentně nebo nekovalentně, a překonat tak možné problémy, jako je omezená stabilita, rozpustnost, permeabilita apod. Polymery jsou voleny tak, aby citlivě odpovídaly na prostředí, ve kterém se nachází, což umožňuje trvale a řízeně uvolňovat léčivo. Lze je také modifikovat tzv. vektory, které směřují léky na konkrétní tkáň postižené chorobou. Mohou být zaměřeny nejen na určitý orgán, ale dokonce na konkrétní buňku či intracelulární prostor. Design takového systému je nezbytné přizpůsobit biologickým aspektům zamýšleného cíle, aby bylo dosaženo co nejlepšího výsledku. Léčiva jsou často nízkomolekulární a chemicky spojené s polymerní maticí, která je rozpustná ve vodě. Na trhu je řada terapeutik na bázi polymeru, mnohé další zatím podstupují klinické testy. Velká část z nich je určena k léčbě nádorových onemocnění. Slibují šetrnější léčbu než klasická chemoterapeutika s omezením mnoha vedlejších účinků [2, 6, 7].

1.2 Biodegradabilní polymery na bázi přírodních materiálů

1.2.1 Kyselina hyaluronová

Jednou z velmi důležitých látek vyskytujících se v živých organismech je kyselina hyaluronová (HA). Jedná se o přírodní glykosaminoglykan, který vytváří lineární polymerní struktury o molekulových hmotnostech 10^3 až 10^6 Da [8]. Stavebními jednotkami této sloučeniny jsou střídající se kyselina β -1,4-*D*-glukuronová a β -1,3-*N*-acetyl-*D*-glukosamin (viz Obrázek 1). V roce 1934 ji poprvé izolovali vědci Karl Meyer a John Palmer z očního sklivce hovězího dobytka [9].



Obrázek 1 Chemická struktura kyseliny hyaluronové. Převzato z [10].

Nejčastěji se vyskytuje ve formě sodné soli, která je důležitým prvkem v těle nejen obratlovců, ale i mikroorganismů, především se získává z gram pozitivních bakterií *Streptococcus* spp., a to konkrétně patologických kmenů A (*Streptococcus pyogenes*) a C (*Streptococcus zooepidemicus*) [11].

Primárně se HA vyskytuje v extracelulární (ECM) a pericelulární matrix, avšak průzkumy dokazují její přítomnost také uvnitř buněk [12]. Více než 50 % celkového obsahu HA v lidském těle se nachází v kůži, kterou hydratuje a urychluje proces hojení. Rovněž chrání pokožku před volnými kyslíkovými radikály a škodlivým UV zářením. V průběhu embryonálního vývoje se nachází v pupeční šňůře, odkud byla v minulosti také získávána. Ve vysoké koncentraci je přítomna v kloubních chrupavkách či v očním sklivci. V synoviální tekutině zajišťuje vysokomolekulární HA potřebnou viskozitu, čímž je docíleno dostatečného promazání kloubních spojení, dále tlumí nárazy, a tím snižuje opotřebení kloubu. Je také nedílnou součástí ECM v tkáních, kde se váže na proteiny (aggrecan, neurocan atd.) V neposlední řadě je zapojena do procesů jako např. proliferace, adheze a diferenciace buněk [11, 13, 14].

Potenciál pro DDS je úzce spjat s počtem receptorů se specifickou afinitou pro HA. Nejvýznamnější jsou CD44 a RHAMM. Důležitost HA je podtržena vysokou rychlostí její syntézy. Enzym *hyaluronansyntáza* (HAS), který je zodpovědný za polymeraci cukerných

prekurzorů, patří mezi *glykosyltransferázy*. Pro degradaci jsou nepostradatelné enzymy *hyaluronidázy* [15].

Díky dlouhému řetězci a hydrofilnímu charakteru HA snadno váže intermolekulárně vodu a v závislosti na své molekulové hmotnosti vytváří roztoky s jedinečnými viskoelastickými a reologickými vlastnostmi. Vykazuje také sklony ke gelaci. Elektrostatické odpuzování záporně nabitých karboxylových skupin na polysacharidovém řetězci přispívá k expanzi polymeru. Výsledný tlak způsobený touto expanzí je dostatečně velký, aby oddělil sousední tkáň, což umožňuje buňkám migrovat do nově vyprázdněných prostor. Tato HA-indukovaná "buněčná migrační dálnice" má zvláštní význam při hojení ran a vývoji tkání [14].

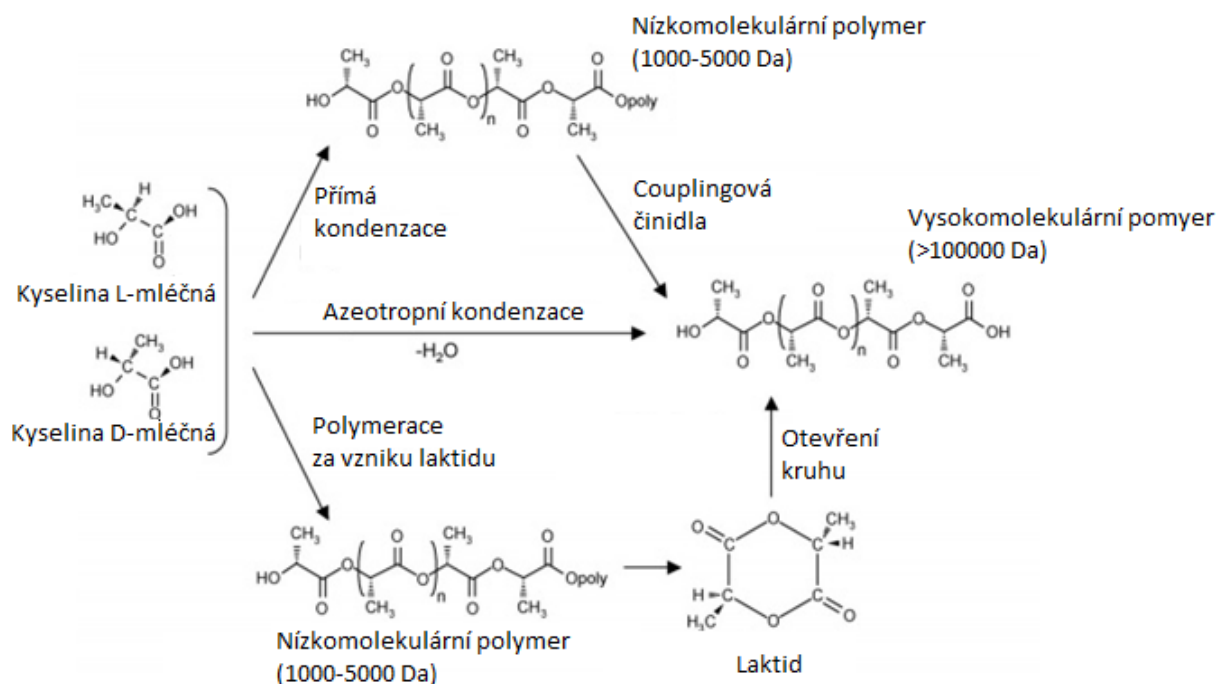
Vlastnosti a funkce HA se mohou lišit v závislosti na molární hmotnosti. Podle velikosti molekuly je HA dělena na vysokomolekulární (HMW-HA), nízkomolekulární (LMW-HA) a HA oligomery či fragmenty. Molekulová hmotnost HMW-HA může dosahovat až 6 MDa, u LMW-HA se pohybuje v řádech desetitisíců Da a oligomery dosahují velikosti pouze tisíců Da [16].

V oftalmologii hraje HA klíčovou roli při chirurgických zákrocích, kde slouží jako náhrada ztracené tekutiny z očního sklivce. V ortopedii je využita k léčbě artritidy zejména HMW-HA pomocí nitrokloubních injekcí. Zde obnovuje viskoelasticitu synoviální tekutiny a pomáhá udržet homeostázu. Jedná se o vysoce biokompatibilní materiál, díky čemuž se vyskytuje po aplikaci HA anafylaktická reakce jen velmi zřídka [18, 19].

1.2.2 Kyselina polymléčná

Kyselina polymléčná (PLA) je v současné době jedním z nejrozšířenějších polymerů v oblasti medicíny. Chemicky se jedná o opakující se úseky 2-hydroxypropanové kyseliny. Objev této látky se datuje k roku 1845, kdy francouzský vědec Theophile-Jules Pelouze získal polykondenzací kyseliny mléčné nízkomolekulární PLA s molekulovou hmotností v rozmezí 800–5000 g/mol [20]. V polovině 50. let minulého století chemik Wallace H. Carothers z americké společnosti DuPont, mimo jiné vynálezce nylonu, zefektivnil výrobu PLA, čímž se dosáhlo výrazného nárůstu molekulové hmotnosti dosahující až 100 000 g/mol [21]. Nákladná syntéza limitovala použití pouze k medicínám účelům (např. vstřebatelné nitě). V současnosti je výroba díky moderním technologiím, které využívají obnovitelné zdroje (např. kukuřice, pšenice), ekonomicky i ekologicky výhodná. Oblast jejího využití se stále rozšiřuje, ať už jsou to aplikace pro DDS, tkáňové inženýrství či implantáty [21, 22].

Základní stavební jednotkou je kyselina mléčná, která je přirozenou součástí lidského těla a účastní se různých metabolických drah (např. Coriho cyklus). Může se vyskytovat ve dvou opticky aktivních formách, a to jako *D*- a *L*- enantiomer. Polymer PLA může existovat v opticky aktivní formě (*L*-PLA) a opticky neaktivní racemické formě (*D,L*-PLA). V závislosti na poměru těchto dvou forem je možno připravit široké spektrum materiálů s různými vlastnostmi a krystalinitou [22]. PLA lze připravit chemicky i fermentačně. Odlišné metody dokládá Obrázek 2.



Obrázek 2 Příprava kyseliny polymléčné. Převzato a upraveno z [23].

V roce 1981 David Franklin Williams objevil enzymatický rozklad PLA na kyselinu mléčnou [24]. Primární fází degradace v organismu je hydrolyza esterové vazby. Důležitým aspektem je teplota a pH. Produktem degradace jsou buď netoxické monomery či oligomery laktátu, nebo oxid uhličitý a voda. Na terminálních úsecích štěpených PLA řetězců vznikají nové karboxylové skupiny, které fungují jako katalyzátor a urychlují degradační proces. Díky difuzi molekul vody dovnitř polymeru nastává rozklad jak na povrchu, tak také uvnitř vytvářením mikroskopických dutin. Biodegradace se vyskytuje většinou v místě zánětu a bakteriální infekce, kde je zvýšená hladina *kyselé fosfatázy* a *laktátdehydrogenázy*, což jsou enzymy sekretované fibroblasty, makrofágy a neutrofilů.

Střední poločas rozpadu polymeru je 30 týdnů, avšak může být upraven podle potřeby strukturními změnami [20]. Pomalá degradace může být zajímavou vlastností pro užití v DDS, a proto byly vyvinuty formy na bázi pěny. Tyto systémy mají extrémně velký povrch a lze na ně

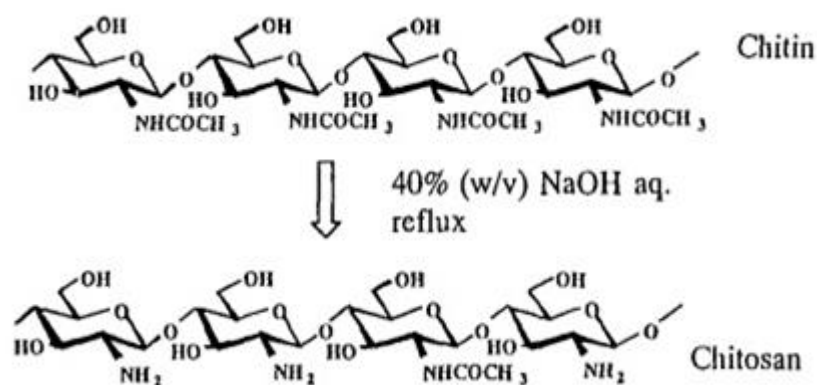
navázat léčivo, které může uvolňovat terapeutickou dávku ihned po implantaci, nebo až po dobu několika měsíců [25].

Další výzkum byl zaměřen na přípravu takových typů kopolymerů, které jsou schopny postupně a cíleně uvolňovat mnohá léčiva proteinové, peptidové nebo oligonukleotidové povahy. Reakcí karboxylových skupin PLA s aminoskupinami chitosanu byl připraven kopolymer, který byl dále zpracován do formy nanočástic. Jejich velikost se pohybovala v závislosti na koncentraci chitosanu a PLA od 292 nm do 420 nm (měřeno v PBS pufru). Takto připravené NPs vykazovaly vhodné asociační vlastnosti s proteiny. Hovězí sérový albumin (BSA) byl použit pro enkapsulaci a studie řízeného uvolňování. Výzkumy dokazují, že až 60 % BSA se uvolní během prvních hodin, dále následuje zpomalení a ustálený stav [26].

1.2.3 Chitosan

Chitosan je přírodní kationtový mukopolysacharid, který je možno připravit chemickou deacetylací chitinu. Ten se skládá z opakujících se molekul β -(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetoamido-2-deoxy-*D*-glukózy. Nachází se ve skeletu korýšů, hmyzu či hub z rodu *Aspergillus* a *Mucor*. Buněčné stěny houby *Aspergillus niger* obsahují až 42 % chitosanu, avšak jeho množství a kvalita závisí na stáří organismu, extrakční technice, kultivačním médiu a ostatních vnějších podmínkách [27].

Zavedené metody izolace spočívají v extrakci ze schránek krabů několikahodinovým varem s vodným roztokem hydroxidu sodného (viz Obrázek 3). Takto izolovaný chitosan je dále zpracováván v autoklávu s hydroxidem sodným po dobu jedné hodiny.



Obrázek 3 Příprava chitosanu. Převzato z [28].

Ve struktuře se nachází kromě hydroxylové i volná aminová skupina, kterou lze při nízkém pH protonizovat, což usnadňuje tvorbu komplexů s ionty těžkých kovů nebo s molekulami proteinů. Primární hydroxylová skupina je často substituována spojovacím článkem, na který se poté váže molekula léčiva nebo jiná struktura zodpovědná za cílený transport [29].

Chitosan se vyskytuje v širokém rozmezí molekulových hmotností a stupňů deacetylace, což jsou klíčové parametry ovlivňující kvalitu a fyzikálně chemickou povahu tohoto polymeru. Od zdrojového chitinu se liší nejen strukturou, ale i biologickou aktivitou. Díky svým vhodným vlastnostem, jako je netoxický charakter, biokompatibilita a biodegradabilita, je nyní považován za jednu z nejslibnějších látek ve výzkumu pokročilých materiálů pro řadu biomedicínských a farmaceutických aplikací. Používá se v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu, dále jako přísada do krmných směsí či jako materiál pro výrobu semipermeabilních membrán. Praktické využití je však limitováno skutečností, že ve vodném prostředí má výraznou tendenci bobtnat [30].

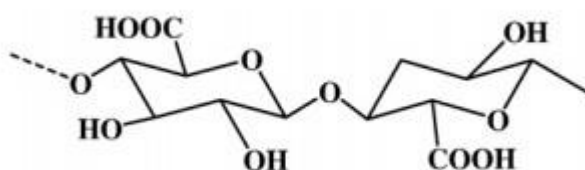
Zajímavou vlastností je jeho antimikrobiální aktivita. Přesný mechanismus účinku zatím není jednoznačně popsán, avšak za nejpravděpodobnější vysvětlení se považuje interakce kladně nabitých aminoskupin chitosanu se zápornými komponenty v membránách mikrobiálních buněk. V menší míře zasahuje do řídicího centra a může negativně ovlivnit přepis z deoxyribonukleové kyseliny (DNA) do ribonukleové kyseliny (RNA). Zásadním faktorem je pH prostředí a molekulová hmotnost chitosanu, která by neměla přesáhnout 5000 Da, aby mohl snadno proniknout do bakteriální buňky. Výzkumy dokazují, že vysokomolekulární forma se kumuluje na vnější straně buněčné membrány bakterie *E. coli*

a zabraňuje tak přístupu živin, naopak nízkomolekulární má tendenci se shromažďovat uvnitř buňky. Antimikrobiální účinky byly pozorovány i u dalších grampozitivních (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) a gramnegativních (*Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*) bakterií [28].

Dalším předmětem výzkumu je výroba mikrogelů, jejichž jádro je tvořeno chitosanem a alginátem, na které je metodou *layer-by-layer* nanесena polyelektrolytická vrstva PSS (polystyrensulfonát sodný) nebo PAH (polyallylamin hydrochlorid). Alginát je díky velkému počtu karboxylových skupin negativně nabitý, chitosan má naopak náboj kladný. V přítomnosti dvojmocného kationtu (např. Ca^{2+}) spolu vytváří gely. Velikost mikrogelů pouze z chitosanu a alginátu byla 409,18 μm , po nanесení třech vrstev PSS se zvětšily na 452,90 μm . Degradací produkty vznikající uvnitř mikrogelu se díky nepropustné vnější membráně nedostanou ven a zvyšují tím vnitřní tlak. V okamžiku, kdy je tlak bobtnajícího jádra dostatečně velký, praská povrchová vrstva a vnitřní obsah se může uvolnit do biologického systému. Testy *in vivo* prokázaly, že během prvních tří hodin od podání se hladina obsahu mikrogelu v těle myši zvyšovala jen velmi málo, avšak v následující hodinu stoupla koncentrace až o 80 %, což svědčí o protržení membrány a uvolnění obsahu do oběhového systému. Takové formy by v budoucnu mohly sloužit jako pulzní DDS [31].

1.2.4 Alginát

Alginát je přírodní polymer složený z lineárních řetězců β -D-manuronové a α -L-guluronové kyseliny (viz. Obrázek 4). Vyskytuje se převážně v hnědých řasách, které mohou kromě alginové kyseliny produkovat i jiné polysacharidy.



Obrázek 4 Chemická struktura alginátu. Převzato z [10].

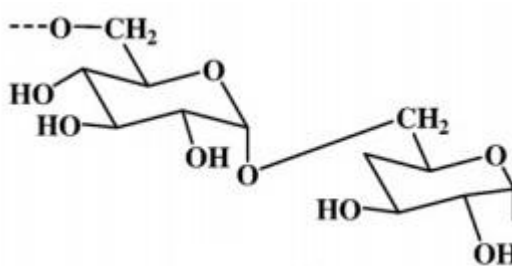
Komerčně se získává z řas rodu *Laminariales* a *Fucales*. Využití nachází v řadě odvětví, zejména v potravinářském průmyslu, nebo jako lepidlo a klíždlo v textilnictví. V chirurgii se alginátová vlákna používají jako obvazový materiál. Koloidní roztok má velmi viskózní a lepivý charakter. Rozpustná sodná sůl při kontaktu s dvojmocným kationtem kovu (nejčastěji Ca^{2+}) reaguje za vzniku nerozpustného gelu, který je schopen zadržet jiné látky. Významným

faktorem ovlivňujícím vlastností gelu je poměr mezi *D*-manuronovou (M) a *L*-guluronovou (G) kyselinou. Gely, ve kterých převažují G řetězce, jsou pevnější, avšak křehké. Na rozdíl od gelů bohatých na M řetězce, které se vyznačují větší elasticitou [32].

Oproti jiným přírodním polymerům se alginát vyznačuje větší odolností vůči enzymatické a bakteriální degradaci. Pro bukalní DDS byly navrženy mukoadhezivní filmy s obsahem alginátu, které mají schopnost setrvat na povrchu sliznice, čímž výrazně déle udrží vysokou koncentraci léčiva v místě aplikace a zvýší jeho biologickou dostupnost [33].

1.2.5 Dextran

Objev dextranu se datuje do roku 1874. Je to hydrofilní netoxický homopolysacharid, který se skládá převážně z molekul α -1,6-*D*-glukopyranózy s nižším procentuálním zastoupením vedlejších řetězců α -1,2-, α -1,3- a α -1,4-glukopyranózy (viz Obrázek 5). Hydrolytický enzym *dextranáza*, který se vyskytuje v savcích tkáních, štěpí dextran za přítomnosti vody [34].



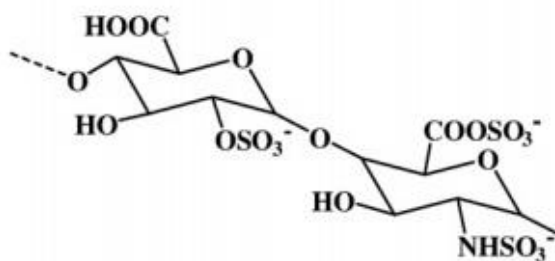
Obrázek 5 Chemická struktura dextranu. Převzato z [10].

Medicínské využití je velmi široké, běžně je používán ke snížení rizika vzniku cévních trombů a snižuje také zánětlivou odpověď organismu [34]. V kritických stavech lze rozpustnými komplexy dextranu s hemoglobinem dokonce po omezený čas nahradit ztrátu krve [35].

Na rozdíl od dříve zmiňovaných polymerů má dextran pouze hydroxy skupinu, kterou lze modifikovat za účelem získání požadovaných vlastností. Byly připraveny mikro- a nanostruktury jako, jsou skafoldy, trubičky či částice, které našly využití jako vysoce efektivní DDS. Zejména skafoldy určené pro regeneraci tkání slibují velký pokrok v terapeutické praxi. Neméně důležité jsou hydrogely na bázi dextranu, což jsou trojrozměrné hydrofilní struktury podobné extracelulární matrix. Používají se opět jako DDS, velký potenciál mají v regeneraci a hojení kůže [34].

1.2.6 Heparin

Heparin představuje heterogenní směs přírodních sulfatovaných mukopolysacharidů o různé délce řetězce. Skládá se z opakujících se jednotek disacharidu, který je složen z glukos-2-amin-*N*-sulfátu a *D*-glukuronové kyseliny, která může navíc podléhat epimeraci na *L*-iduronovou kyselinu (viz Obrázek 6). Sacharidy jsou spojeny vazbou 1→4. Strukturní heterogenita je zapříčiněna variabilní přítomností acetylové nebo sulfonové skupiny v *N*-poloze glukos-2-aminu. Sulfatovaná může být rovněž i glukuronová kyselina. Poprvé heparin izolovali v roce 1916 William Henry Howell a jeho student Jay McLean z tukové tkáně jater. Ve 30. letech proběhly detailnější studie, jejichž výsledkem byl v roce 1936 první komerční výrobek na bázi heparinu na trhu [36].



Obrázek 6 Chemická struktura heparinu. Převzato z [10].

Nalézá se v ECM žírných buněk a granulocytů, je součástí proteoglykanů, například serglycinu. Jeho maximální molekulová hmotnost dosahuje pouze 20 kDa. Interakcí s velkým množstvím proteinů reguluje mnohé metabolické procesy. Tvoří komplexy s antitrombinem III, ten následně díky konformační změně inaktivuje trombin a některé další koagulační faktory. Výsledkem je nižší srážlivost krve. Antikoagulační aktivita je připisována převážně pentasacharidové sekvenci [37, 38].

Terapeuticky důležitý je nefrakcionovaný (UFH) a také nízkomolekulární heparin (LMWH), který lze vyrábět fyzikálně-chemickými i enzymatickými metodami. Délka LMWH je většinou menší než 18 monosacharidových jednotek a dosahuje velikosti do 5000 Da. Je potvrzeno, že aktivita a farmakokinetika je závislá na mnoha faktorech, například na molární hmotnosti, délce a polydisperzitě řetězce [39].

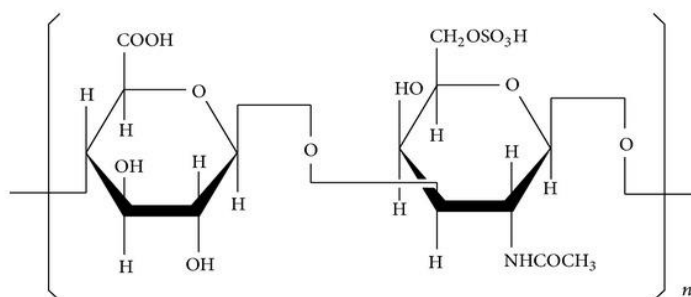
V praxi je toto antikoagulancium využíváno již přes 80 let. Výroba spočívá v extrakci z různých zvířecích sliznic. UFH je jedním z nejpoužívanějších antikoagulačních činidel podávaných k léčbě a profylaxi trombotických příhod. Navíc se používá k potahování zkumavek a chirurgických přístrojů k zabránění srážení krve na jejich povrchu [40]. Bylo také

prokázáno, že LMWH má anti-metastatické účinky, inhibuje enzym *heparanázu* a interaguje se selektinem, čímž se stává zajímavou substancí pro terapii nádorových onemocnění [41].

Pokud se heparin nachází ve formě nanočástic, jeho antikoagulační aktivita je výrazně redukována a zároveň není toxický při intravenózním podání, čímž se stává ideálním nosičem pro protinádorové léčivo. Byla připravena celá řada nosičových systémů ve spojení např. s kyselinou deoxycholovou nebo kyselinou listovou a paclitaxelem, což je přírodní alkaloid využívaný jako cytostatikum. Pozoruhodnou formou jsou také nanogely připravené z heparinu, na které je pomocí disulfidické vazby navázáno léčivo doxorubicin. V prostředí tumoru je vysoká koncentrace redukčních činidel (glutathion apod.), která způsobí redukci disulfidické vazby, a tím se léčivo efektivně uvolní pouze do místa potřeby [42].

1.2.7 Chondroitin sulfát

(CS) je příkladem přírodního glykosaminoglykanu (GAG), který je široce rozšířen na povrchu i uvnitř buněk v endoplazmatickém retikulu a Golgiho komplexu. Řetězce jsou složeny z jednotek kyseliny glukuronové a *N*-acetylgalaktosaminu, které jsou spojeny $\beta(1\rightarrow3)$ vazbou (viz Obrázek 7). Poprvé byl izolován z kloubní chrupavky v roce 1884 a detailněji popsán díky experimentům vědeckého týmu P. A. Levena [43, 44].



Obrázek 7 Chemická struktura chondroitin sulfátu. Převzato z [45].

Na syntéze CS se podílí řada enzymů, např. *sulfotransferázy*, *epimerázy* či *hydrolázy*. Právě *sulfotransferázy* připojují na skelet chondroitinu na různé pozice sulfátové skupiny, nejčastěji na uhlík 2 glukuronové kyseliny, nebo uhlík 4 a 6 v molekule *N*-acetylgalaktosaminu. Enzym *hyaluronidáza-1* (HYAL-1), který hraje hlavní roli v katabolismu HA, rozkládá mimo jiné také řetězce CS na kratší oligomerní až monomerní úseky [43].

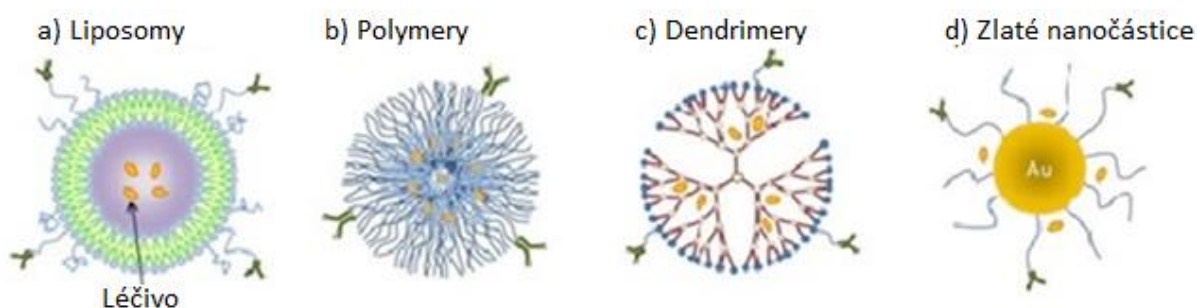
Extracelulární matrix pojivové tkáně obsahuje vysoký podíl CS, díky jehož přítomnosti disponuje např. chrupavčitá tkáň správnými mechanickými vlastnostmi (elasticita, viskozita apod.). Obecně je pojivová tkáň produkována speciálními buňkami fibroblasty a obsahuje látky proteinové povahy (kolagen a elastin) a velké množství proteoglykanů. Záporně nabitě sulfátové a karboxylové skupiny ve struktuře CS přitahují ionty s kladným nábojem a molekuly vody, což je příčinou pružnosti a pevnosti ECM. CS je doporučen pro léčbu revmatismu a používá se také při oftalmologických zákrocích. Řadí se mezi pomalu působící léky osteoartróz a vykazuje protizánětlivou a antikoagulační aktivitu. Bylo prokázáno, že mnohé bakterie, viry či parazité (*Plasmodium falciparum*) používají řetězce CS k přichycení a infikování hostitelské buňky [43, 46].

1.3 Formy pro drug delivery systemy

1.3.1 Nanočástice

Nanočástice jsou skvělými kandidáty pro DDS díky řadě svých jedinečných vlastností. Jednak je to jejich rozměr pohybující se do 100 nm, velký podíl plochy k objemu, široká možnost modifikace jejich povrchu a vhodná farmakokinetika. Bez potíží prochází buněčnými membránami a pronikají hluboko do tkání. Měly by být solubilní v krevním oběhu a upraveny tak, aby nebyly rozpoznány buňkami imunitního systému. Dalšími přednostmi jsou stabilita, vysoká nosná kapacita a snížení toxicity pomocí biologicky odbouratelných nosičů. Nevýhodou mohou být toxické produkty rozkladu NPs či nežádoucí skladování v tkáních. Významnou roli hrají NPs především při řízeném transportu cytostatik, kde slouží jako nosiče chemoterapeutika. Léčivo poté cíleně působí na zhoubné buňky a nepoškozuje okolní zdravé tkáň. Snížené riziko vedlejších účinků je jedním z nejdůležitějších atributů nanočástic v léčbě rakoviny. Nezůstává se však jen u cytostatik, NPs jsou nosičem také antibiotik, genů, inzulínu a dalších významných látek [6].

Od 80. let minulého století se začaly vyvíjet systémy dodávání léků za účelem zvýšení jejich účinnosti. Jedny z prvních mikročástic byly vyrobeny z polybutylkyanoakrylátu v laboratoři Jörga Kreutera v roce 1976 [47]. Počáteční nadšení pro použití mikročástic však brzy opadlo, protože byly příliš velké na to, aby prostoupily slizniční bariérou gastrointestinálního traktu. S nástupem nanočástic se však tento problém vyřešil. NPs lze aplikovat intravenózně, avšak je tak dosaženo nižší životnosti. Povrchové modifikace chrání NPs před nežádoucím pohlcením fagocytárními buňkami a předčasným odstraněním z krevního oběhu [2]. Některé z forem nanočástic jsou uvedeny na Obrázku 8.



Obrázek 8 Nanočástice využívané pro cílené doručení léčiv. Převzato a přeloženo z [48].

Liposomy

Liposomy jsou jedním z nejstudovanějších typů nosičů léků díky své morfologii a snadné přípravě. Jsou to mikroskopické vezikuly sestávající z vnitřního vodného prostředí ohraničeného hydrofobní lipidovou dvojvrstvou. Struktury s jednou membránou se nazývají micely, v případě většího počtu membrán se jedná o liposomy. Prostředí uvnitř nanočástice může být jak hydrofobní, tak hydrofilní. Díky tomu je možné do těchto struktur uzavřít jak látky nepolární, tak i polárnější povahy. Za účelem zlepšení vlastností byly připraveny modifikace těchto systémů, např. potahování liposomů polyethylenglykolem nebo začlenění molekuly cholesterolu. Množství terapeutických přípravků, které se vyrábí z lehce biodegradabilních a netoxických lipidů, prochází klinickými zkouškami, nebo již bylo schváleno. Prvním přípravkem schváleným Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration, FDA, USA) byl Doxil® (Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgie) s účinnou látkou doxorubicinem, který je zapouzdřen v liposomálním obalu. Používá se jako protinádorové léčivo [49, 50].

Další typy nanočástic

Do této skupiny jsou řazeny částice vyráběné z materiálů, jako jsou kovy nebo uhlík. Z kovů se nejčastěji používá zlato, stříbro, zinek či platina. Jde o inertní systémy, které jsou využívány pro diagnostické účely či tzv. biomonitoring. NPs z uhlíku se nejčastěji připravují ve formě fullerenu nebo jako nanotrubice a nanotyčinky [51].

Téměř 50 let jsou v biomedicínských aplikacích rozšířené NPs ze zlata. Vykazují silnou afinitu k funkčním skupinám, jako jsou thiohy, karboxyly a fosfáty, a proto mohou být snadno konjugovány s celou řadou proteinů nebo léčiv. Zlato je vysoce odolné vůči bakteriím, čehož se využívá v léčbě infekčních chorob. Nanočástice jsou vhodnou volbou také při diagnóze rakoviny. Nádorové buňky mají na svém povrchu vysokou koncentraci transmembránového receptoru EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), zatímco zdravé buňky jej mají mnohem méně. Nanočástice pokryté protilátkou proti EGFR se mnohem efektivněji vážou na nádorové buňky, čehož využíváme při zobrazování nádorů a také k jejich likvidaci. Značný zájem budí také magnetické nanočástice, u kterých se používá magnetické pole jako vnější stimul pro zvýšení lokální koncentrace farmaceutické substance. Při nukleární magnetické rezonanci se používají jako efektivní kontrastní látky [6, 52].

Dalším zástupcem jsou dendrimery, makromolekuly s vysoce uspořádanou a bohatě rozvětvenou strukturou. Z centrálního jádra pokračují na povrch větve s vysokou hustotou

funkčních skupin. Tyto systémy jsou schopné žádanou látku obalit, doručit na konkrétní místo a následně ji vypustit. Léčivo může být buď nekovalentně zapouzdřeno v jádře, nebo se může konjugovat na povrchu dendrimerů. Mezi významné deriváty patří polyamidoamin (PAMAM), který je složen z alkyl-diaminového jádra, na kterém jsou zavěšeny terciární aminy. Existují studie o funkcionalizaci PAMAM dendrimerů cytostatikem methotrexátem. Navázán na povrchu tvoří stabilní komplex, který je schopen selektivně zamířit na rakovinné buňky. Naopak v případě nekovalentního zapouzdření léku uvnitř dendrimeru dochází v biologickém prostředí k předčasnému uvolnění [53, 54].

1.3.2 Výroba nanočástic

Biologicky rozložitelné NPs mohou být připraveny z různých materiálů, jako jsou polysacharidy, bílkoviny a syntetické biologicky odbouratelné polymery. Výběr základního polymeru závisí na mnoha kritériích, jako je velikost požadovaných NPs, vlastnosti léčiva, které má být zapouzdřeno, stupeň rozložitelnosti nebo farmakokinetický profil uvolňování. Na základě těchto podmínek lze metody přípravy rozdělit do následujících kategorií: polymerace monomeru, odpaření rozpouštědla a iontová gelace. Pokud se pracuje s toxickými rozpouštědly, musí se jejich zbytkový obsah kontrolovat podle přísných limitů odpovídajících úřadů.

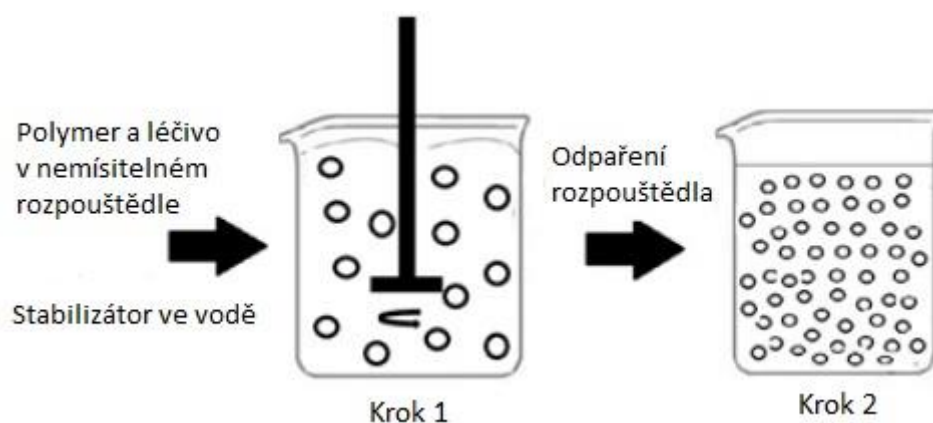
Polymerace monomeru

Jedná se o jednoduchý a efektivní způsob, kdy je monomer za mechanického míchání přidán do vodného roztoku povrchově aktivního média. Molekuly léčiva lze začlenit buď rozpuštěním v reakční směsi v průběhu polymerace, nebo konjugací s již hotovými nanočásticemi. Během polymerace mohou být přidávány různé stabilizátory, jako například dextransy a polysorbáty. Připravenou suspenzi NPs lze purifikovat centrifugací a odstraněním stabilizačních činidel. Důležitou roli hraje koncentrace organického rozpouštědla a typ surfaktantu. Reziduální molekuly monomeru v polymerační směsi mohou být toxické, a proto se upřednostňují metody využívající již hotové polymery [55].

Emulsifikace/odpařování rozpouštědla

Odpaření rozpouštědla je dlouho využívaná metoda, jejímž základním principem je odpařování té části emulze, která obsahuje rozpuštěné léčivo a polymer. Z rozpuštěného polymeru se během odpařování formuje pevná matrice, která do své struktury uzavírá léčivo. Předpřipravený polymer je nejdříve rozpuštěn v těkavém organickém rozpouštědle (dříve

toxičtější chloroform, dnes nahrazen ethylacetátem). Následně je požadované léčivo dispergováno do roztoku polymeru. V přítomnosti tenzidů je lipofilní fáze emulgována do vodné fáze za vzniku jemné emulze O/V (O značí olejovou fázi, V vodnou fázi). V laboratoři si používá např. vrtulové míchadlo, ultrazvuková lázeň nebo jiná homogenizační zařízení. Ze stabilizované emulze je zvýšením teploty a kontinuálním mícháním odpařeno použité rozpouštědlo, což je doprovázeno formováním nanočástic. Tyto NPs jsou shromažďovány ultracentrifugací a promyty destilovanou vodou, aby se odstranily přísady. Pro tuto metodu se často používá PLA nebo PLGA [56]. Schéma přípravy je uvedeno na Obrázku 9.



Obrázek 9 Příprava NPs pomocí metody odpařování rozpouštědla. Převzato a přeloženo z [2].

Iontová gelace

Pro tuto metodu jsou vhodné přírodní hydrofilní makromolekuly, jako například alginát nebo želatina. Při stanoveném pH utváří komplex, který je stabilní díky přitahování opačných nábojů síťovacího činidla a polymeru. Oblíbeným síťovacím činidlem je tripolyfosfát sodný (TPP). Kunjachan a spol. (2010) ve své práci představili NPs chitosanu, které byly připraveny touto metodou. Roztok chitosanu byl homogenizován v olejové fázi za vzniku emulze o/v. Po částech byl přidán glutaraldehyd, který hraje roli síťovacího činidla a stabilizátoru. Vytvořené NPs byly promyty hexanem a acetonem a následně vysušeny. V závislosti na koncentraci chitosanu dosáhly NPs velikosti 0,674 μm až 1,307 μm [57].

1.3.3 Hydrogely

Hydrogely jsou unikátní skupinou trojrozměrných sítí makromolekul, které stojí v popředí výzkumu mnoha vědeckých týmů. Našly uplatnění nejen v tkáňovém inženýrství jako materiál pro remodelaci měkké biologické tkáně, ale i jako nanoreaktory, superabsorpční materiály, obvazy a média pro skladování a dodávání léčiv [58, 59]. Při kontaktu s krví a tkáněmi jsou biokompatibilní. Mají celou řadu jedinečných vlastností, díky přítomnosti funkčních skupin (hydroxy, amino, karboxylová) jsou schopny zachytit velké množství vody a dokáží napodobit viskoelastický charakter lidských tkání. Můžeme je rozdělit na přírodní či syntetické (viz Tabulka 1) nebo podle povahy zesílení na fyzikální a chemické [60].

Tabulka 1 Materiály pro přípravu hydrogelů, upraveno z [61].

<i>Přírodní polymery</i>	<i>Syntetické monomery/polymery</i>
Chitosan	Hydroxyethylmethakrylát (HEMA)
Alginát	N-(2-hydroxypropyl)methakrylát (HPMA)
Fibrin	N-vinyl-2-pyrrolidon (NVP)
Kolagen	N-isopropylakrylamid (NIPAMM)
Kyselina hyaluronová	Vinylacetát (VAc)
Želatina	Kyselina akrylová (AA)
Dextran	Kyselina methakrylová (MAA)
	Polyethylenglykol-akrylát/methakrylát (IPEGA/PEGMA)
	Polyethylenglykol-diakrylát /dimethakrylát (PEGDA/PEGDMA)

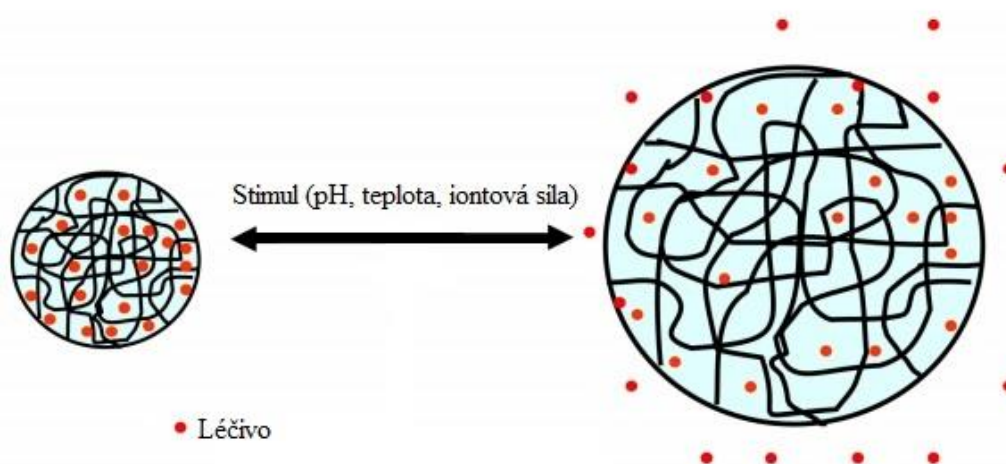
Přes původní skepticismus a nedůvěru, kterým makromolekulární chemie čelila na počátku 20. století, došlo k jejímu obrovskému vývoji a dnes je nepostradatelnou součástí našich běžných životů. Na počátku 50. let minulého století navrhli jako první vědci na světě Otto Wichterle a Drahoslav Lím nové biomateriály pro oftalmologii. V roce 1953 uspěl Lím při syntéze hydrogelu, který vznikl kopolymerací 2-hydroxyethylmethakrylátu (HEMA) s ethylendimethakrylátem (EDMA). Naopak Wichterle připravil procesem odstředování měkké kontaktní čočky, které byly tvarově a chemicky stabilní [62]. V následujících letech se hydrogely rozšířily do dalších odvětví medicíny a dále se detailně studoval vztah mezi jejich strukturou a účinkem. Na přelomu 80. a 90. let minulého století začal výzkumný tým polského

chemika Janusze Rosiaka využívat hydrogely také pro výrobu krycích materiálů a obvazů. Dokáží totiž absorbovat hnis z ran a dodávat molekuly kyslíku na poraněné místo. Navzdory mnoha skvělým vlastnostem mají hydrogely také nevýhody. Nízká pevnost v tahu může vést v některých případech k předčasnému rozpuštění a omezuje použití v nosných aplikacích. Velké póry a příliš vysoký podíl vody mají za následek urychlené uvolnění léku.

„Chytré“ hydrogely

Odezva na prostředí, ve kterém se hydrogely nachází, umožňuje řízeně uvolnit léčivo, čehož se také s oblibou využívá. Častá je reakce na externí i interní stimul, kterým je např. teplota, elektrický signál, přítomnost konkrétní molekuly (glukóza) nebo změna pH. V případě poslední uvedené možnosti se ve struktuře nachází skupiny, které lze (de)protonizovat [63, 64].

Významnými zástupci jsou polysacharidové hydrogely, například dextran funkcionizovaný aminovými skupinami má vysoký potenciál v oblasti hojení ran. Výzkumy dokazují, že v prostředí s nižším pH dochází k protonizaci aminových skupin a gel podléhá bobtnání, což zapříčiňuje snadnější difúzi molekul léčiva skrze rozšířené sítě polymeru. Reologické studie potvrdily, že viskoelastické vlastnosti takovýchto hydrogelů jsou závislé na zdroji aminových skupin a jejich poměru k dextranu [64]. Obrázek 10 znázorňuje uvolnění léčiva ze struktury vlivem vnějšího či vnitřního stimulu.



Obrázek 10 Uvolnění léčivé látky působením stimulu. Převzato a upraveno z [65].

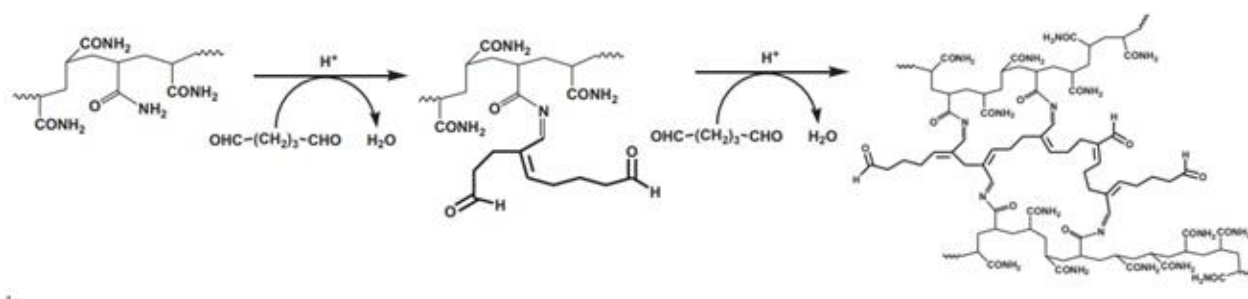
Vasi A. a spol. (2014) zkoumali deriváty kyseliny hyaluronanové k přípravě gelů. V prvním kroku byla sodná sůl HA převedena na kyselinu, poté byla v přítomnosti dimethylsulfoxidu smíchána s maleinanhydridem a na závěr proběhla kopolymerace

s kyselinou akrylovou za vzniku gelu. Pro modelové uvolňovací studie bylo inkorporováno léčivo pilokarpin, které se používá v oftalmologii. Do 36 hodin od počátku experimentu se uvolnilo 60 % léčiva. Klíčovou roli hraje velikosti pórů a rychlost degradace [15].

Další skupinou jsou termosenzitivní hydrogely, které lze klasifikovat jako pozitivně termosenzitivní, negativně termosenzitivní a tepelně reverzibilní. První jmenovaný typ charakterizuje tzv. horní kritická rozpouštěcí teplota (UCST), pod jejíž hodnotu se hydrogel smršťuje. Řadíme sem polymery složené z polyakrylátové kyseliny a polyakrylamidu. U negativně termosenzibilních hydrogelů určujeme tzv. dolní kritickou rozpouštěcí teplotu (LCST), která je definována jako kritická teplota, nad kterou se polymer smršťuje, pod ní naopak bobtná. Do této skupiny řadíme poly(*N*-izopropylakrylamid), jehož LCST je 32 °C. Tyto hydrogely vykazují ON-OFF uvolňování léčiv s „ON“ při nízké teplotě a „OFF“ při vysoké teplotě. Poslední skupinu tvoří reverzibilní systémy, které mohou zaznamenávat cyklické fázové přechody. Příkladem je želatina [66].

1.3.4 Výroba hydrogelů

Přechod roztoku na gel se obecně označuje jako sol-gel přechod. Při přípravě se vychází z hydrofilních rozpustných polymerů. Pokud k nim přidáme síťovací činidlo, řetězce spolu začnou interagovat a vytvoří mezi sebou vazby, což má za následek gelaci a zvýšení mechanické odolnosti. Toto zesílení může nastat nejen při laboratorní přípravě hydrogelů, ale také až v těle pacienta po aplikaci vlivem vnitřního prostředí. Některé z běžně používaných síťovacích činidel jsou glutaraldehyd (viz Obrázek 11), *N,N'*-methylenbisakrylamid, epichlorhydrin, glyoxal, borax a ethylenglykoldimethakrylát [67]. Důležitým parametrem při charakterizaci je množství absorbované tekutiny, molekulová hmotnost opakující se stavební jednotky a míra zesílení.



Obrázek 11 Zesílení polyakrylamidu pomocí glutaraldehydu. Převzato z [68].

Chemicky síťované

Chemicky zesíťované hydrogely mají polymerní řetězce propojené trvalými kovalentními nebo iontovými vazbami. Vznikají pomocí různých mechanismů, např. přidáním iniciátoru, fotopolymerací, reakcí s enzymy či volnými radikály. Chemické zesíťování je běžně využíváno k docílení požadovaných vlastností (např. tvrdost, stabilita). Jednou z nejběžnějších reakcí je kondenzace, při které se odštěpují molekuly vody, čímž vzniká pevná kovalentní vazba. Takovýmto mechanismem funguje například vznik Schiffovy báze reakcí aldehydů s primárními aminy. Často se setkáme s radikálovou polymerací, při níž reaguje monomer s volnými radikály. S oblibou se využívá iniciace tepelným nebo UV zářením, popř. změnou pH. Z hlediska biokompatibility je výhodné radiační síťování, protože nevyžaduje použití síťovadla, které může být v některých případech toxické. Hydrogel pak vzniká díky záření o vysoké energii, například gama či RTG záření, která jsou ionizující a vytváří volné radikály. Nové postupy využívající genetické inženýrství a návrhy hybridních gelů, ve kterých se mísí syntetické a přírodní molekuly, posilují potenciál pro využití v praxi [69].

Další variantou je zesíťování polymerního prekurzoru pomocí nízkomolekulárního činidla. Prekurzorem chápeme lineární nebo nerozvětvené homo- i kopolymery, které obsahují reaktivní funkční skupiny. V neposlední řadě existují také interpenetrační materiály, které se skládají ze dvou nezávisle propojených sítí bez většího množství kovalentních vazeb. Takovéto systémy kombinují mechanické vlastnosti syntetického polymeru s biologickými přednostmi materiálu přírodního. Syntetizovat je lze buď dvoustupňovým procesem, nebo v jednom kroku za použití různých polymerizačních mechanismů [62].

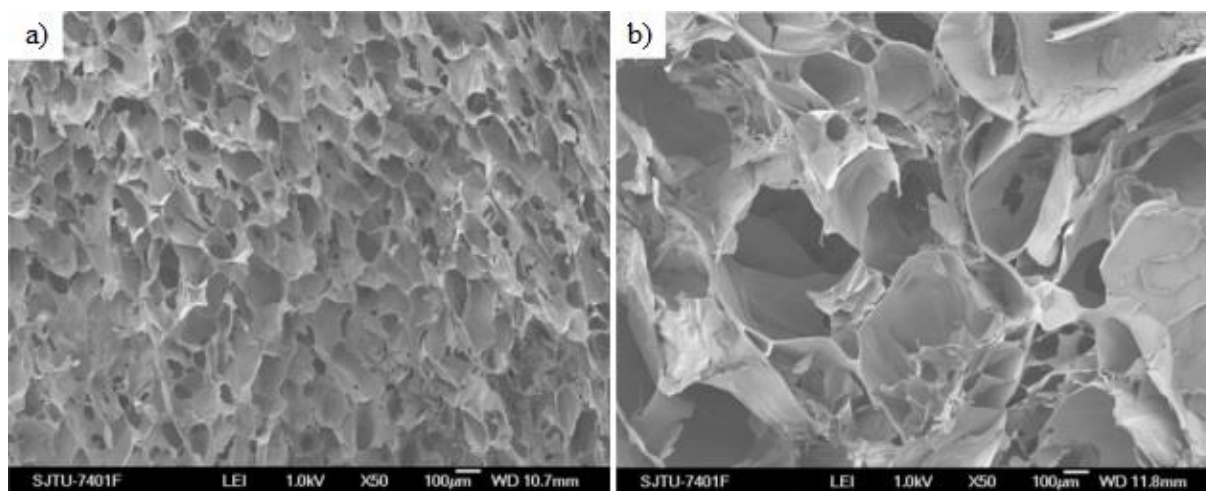
Na závěr samotné syntézy se často hydrogely zbavují nečistot promytím vodou. Doba a kvalita síťování je závislá na mnoha faktorech, například na koncentraci použitých reaktantů, jejich formě a přítomnosti iniciátorů. Velice důležité je optimalizovat způsob přípravy, abychom docílili požadovaných výsledků. Reakčními podmínkami lze minimalizovat vedlejší reakce a zvýšit efektivnost [70, 71].

Fyzikálně síťované

Fyzikální hydrogely tvoří mezi řetězci pouze nepermanentní vazby typu dipól–dipól, vodíkové můstky nebo van der Waalsovy síly, což vede ke zhoršení mechanické odolnosti. Jejich tvorba může být iniciována ve vodném prostředí změnou vnějších podmínek (např. teploty), nedochází během ní k větší změně objemu a není potřeba přidávat síťovadla, což je jedna z nejdůležitějších předností této skupiny. K zesíťování přispívají také elektrostatické

síly působící mezi řetězci. Příkladem může být přitahování kladně nabitých aminoskupin želatiny s negativně nabitou karboxylovou skupinou alginátu sodného [72].

Liu Li a kol. (2011) se zabývali přípravou termosenzitivních hydrogelů neutralizační reakcí bez přídavku jakéhokoli síťovadla či organických rozpouštědel. Ve vodném roztoku kyseliny octové rozpustili chitosan, jehož amino skupiny byly protonizovány. Po přidání bazického hydrogenuhličitanu sodného došlo k reakci mezi HCO_3^- a H^+ za vzniku CO_2 . Proces doprovázelo zvýšení hodnoty pH. Ke tvorbě gelu dochází díky přenosu protonu a síťování fyzikální povahy probíhá přímo *in situ* [73]. Na Obrázku 12 je znázorněn podstatný faktor ve vztahu ke struktuře, a sice koncentrace hydrogenuhličitanu.



Obrázek 12 SEM snímky příčného řezu hydrogelu připraveného z chitosanu v závislosti na koncentraci přidaného Na_2CO_3 . $c(\text{chitosan}) = 2\%$ (w/v), a) $c(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 0,1\text{ mol/l}$, b) $c(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 0,12\text{ mol/l}$. Převzato a upraveno z [73].

1.3.2 Skafoldy

Tkáňové inženýrství je obor, jenž se zabývá hlavně regenerací a obnovou poškozených tkání, k čemuž se stále častěji používají skafoldy. Jsou to tkáňová lešení, která jsou osázena buněčnými kulturami a podporují buňky v dělení, růstu a proliferaci. Zásadní je schopnost skafoldu co nejvěrohodněji napodobit vlastnosti a architekturu cílové tkáně. Lešení by mělo vyvolat vhodnou biologickou odpověď, aby nedošlo k nežádoucí reakci okolního prostředí. Nejprve je skafold osázen buňkami *in vitro* a následně se vloží do těla pacienta na místo poškození, kde sám postupně degraduje, buňky prorůstají jeho porézní strukturou a dochází tak k obnově ztracené funkce tkáně. Díky svým jedinečným mechanickým vlastnostem a podobností s měkkými tkáněmi hrají nenahraditelnou roli v DDS. Lze definovat velikost, tvar, vzájemné propojení a hlavně orientaci vláken. Ideální strukturou je prostorná síť těsně přilehlých pórů, ke kterým mohou přilnout buňky. Důležitá je velikost pórů, která se pohybuje v intervalu od 1 do 1000 μm . Při menší velikosti může dojít k adsorpci proteinů, naopak póry velikosti nad 1 mm pomáhají zachovat tvar implantátu. Ve struktuře lešení by se měly nacházet kanálky pro cirkulaci živin, kyslíku a odpadních látek. Při degradaci je nutné, aby se materiál rozkládal na látky netoxické povahy. Zároveň by měla být přiměřená rychlost degradace a rychlost proliferace nových buněk [74, 75].

1.3.3 Výroba skafoldů

Při přípravě skafoldů je důležité volit materiál tak, aby se co nejvíce přiblížil reálné tkáni, kterou chceme nahradit. Technologie výroby je vysoce moderní a zahrnuje širokou škálu metod. V současné době je kladen důraz na možnosti automatizace výroby. Mezi konvenční metody přípravy patří 3D tisk, vytlačování, stereolitografie, vstřikování, gelace či fotopolymerace [76, 77].

Při prvním možném postupu je materiál formován do předem připravené 3D formy. Vysoká teplota však může mít negativní vliv na biologické polymery. Póry lze vytvořit působením plynu, nejčastěji oxidu uhličitého. Spojovat struktury a docílit tak požadované pevnosti lze rovněž s využitím lepidla. Takovéto skafoldy jsou přesvědčivé kopie cílových tkání a hodí se jako nosiče látek. Mezi významné technologie, o které se zasloužili také čeští vědci, patří elektrostatické zvlákňování neboli electrospinning, kterým se obecně vyrábějí nanovlákná. Lze použít princip tzv. layer by layer, kdy je prostorová struktura vytvářena nanášením vrstev mikrostruktur [78, 79].

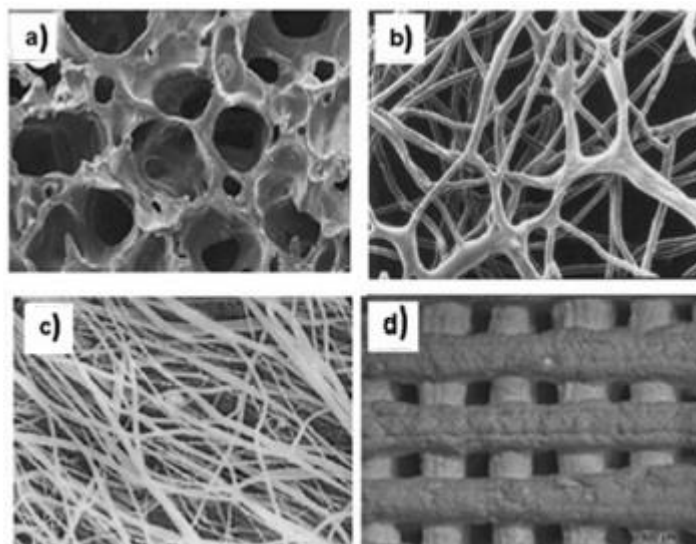
Rabionet a kol. (2018) se zabývali 3D tiskem tubulárních skafoldů z poly- ϵ -(kaprolaktonu) s malým průměrem, které jsou určeny pro léčbu kardiovaskulárních chorob. U náhrad malých cév v současné době totiž stále hrozí riziko trombózy. Skafoldy byly po sterilizaci osázeny myšími fibroblasty a po šesti dnech kultivace se provedl test buněčné proliferace, který potvrdil růst nových buněk. Zásadním úkolem je optimalizace tisku, neboť například jeho zvýšená rychlost negativně ovlivňuje proliferaci buněk, ty v takovém případě nemají dostatečný přísun kyslíku [75].

Dalším typem je decelularizovaný skafold, který se připravuje odstraněním buněk z tkání fyzikálními, chemickými nebo enzymatickými metodami tak, abychom získali pouze skelet z ECM. Při opakovaných cyklech zmrazení a rozmrazení vzniknou uvnitř buňky ledové krystalky, které naruší membrány a dojde k buněčné lýzi. K jejímu rozpadu lze také použít tlak či ultrazvuk. Zmrazení se používá často pro decelularizaci šlachové, vazivové a nervové tkáně. Změny teplot se však musí volit šetrně, aby nedošlo k poškození samotného skafoldu. Na závěr každého způsobu výroby je nutná sterilizace skafoldu například v autoklávu, ozonem či chemicky ethylenoxidem (EO) [80, 81].

Materiály vhodné pro přípravu skafoldů

Skafoldy lze vytvořit jak z materiálů syntetických, tak i přírodních, nebo kombinací obou. Kritéria pro jejich použitelnost jsou např. struktura, rozpustnost, míra hydrofility a molekulová hmotnost. Přírodní materiály mají tu výhodu, že lépe interagují s buňkami a jsou biokompatibilní. Odbouratelné polymery, které se již objevily v klinické praxi, jsou proteiny (kolagen, fibrin, želatina), polysacharidy (chitin, dextran, glykosaminoglykany) a v neposlední řadě také nukleové kyseliny (DNA, RNA). Naopak syntetické materiály se vyznačují tím, že u nich lze snáz docílit požadovaných mechanických vlastností a poté se i lépe kontrolují. Nesporným plusem je jejich nižší cena a možnost skladovat je delší dobu. Problémem je však nižší biokompatibilita a s ní spojené riziko zhoršeného růstu nových buněk. Řešením může být vrstva přírodní látky (např. kolagenu) nebo úprava povrchu laserem. Syntetickou povahu mají kyselina mléčná, glykolová a jejich kopolymery [81–83].

Kaczmarek a kol. (2018) se zabývali přípravou porézních skafoldů na bázi chitosanu a kolagenu obohacených o glykosaminoglykany. Jako metodu přípravy zvolili lyofilizaci, alginát sodný byl použit coby síťovací činidlo a zároveň zvyšoval tepelnou stabilitu. Takovéto materiály lze potenciálně využít u pacientů s poškozenou kloubní chrupavkou, která má nízkou schopnost regenerace [82]. Na Obrázku 13 jsou uvedeny další příklady výroby a materiálů:

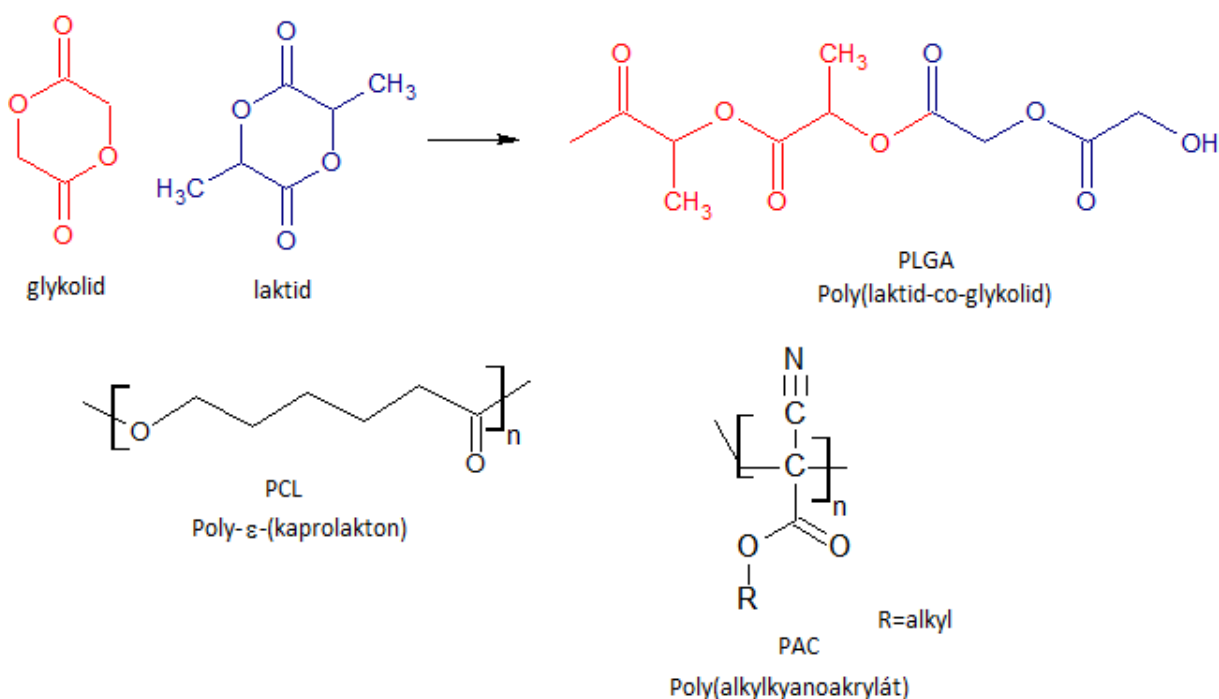


Obrázek 13 SEM snímky různých typů hydrogelů.

a) polymer PLA zpracovaný v superkritickém CO_2 , 240 bar, 35 °C, b) síť PGA vláken připravené zahříváním, c) sfakold z 7,3 % poly-L-mléčné kyseliny/1,2-dichloroetanu připraveného metodou elektrostatického zvlákňování, d) skafold z CaSiO_3 připravený 3D tiskem. Upraveno a přeloženo z [75].

1.3.4 Kopolyмеры

Díky chemii na bázi uhlíku jsou polymery blíže biologické tkáni než látky anorganické. Umělé polymery jsou stejně tak rozmanité jako ty přírodní a rychle vstupují do lékařské praxe, ačkoliv největší pokrok zaznamenala tato oblast vědy po 2. světové válce. K základním materiálům patří alifatické polyestery – kyselina polymléčná, kyselina polyglykolová a zejména jejich kopolyмеры, poly- ϵ -(kaprolakton), poly(vinylalkohol), poly(alkylkyanoakryláty), želatina a poly(hydroxyalkanoáty), z nichž nejvyužívanějším je poly(hydroxybutyrát) [84]. O významných zástupcích je pojednáno v samotných kapitolách. Na Obrázku 14 jsou znázorněny struktury několika z nich:



Obrázek 14 Struktury vybraných kopolymerů. Převzato a upraveno z [88].

Poly(laktid-co-glykolid)

Skupina látek, konvenčně označované jako poly(laktid-co-glykolidy) (PLGA), patří mezi nejúspěšnější kopolyмеры v oblasti medicíny. Jedná se o produkty kondenzace dvou α -hydroxykyselin. Vzhledem k tomu, že se v organismu rozkládají na kyselinu mléčnou a glykolovou, což jsou látky tělu vlastní, nehrozí téměř žádná systémová toxicita. PLGA je skvělým nosičem mnoha terapeutických molekul a vhodným kandidátem pro perorální formy DDS. Komerčně se PLGA využívá při léčbě nádorových onemocnění, ve vakcínách a také při řízeném uvolňování růstových hormonů. Mechanismus uvolnění léčiva z matrice se liší podle schopnosti bobtnání. Pokud nosič bobtná ve velkém rozsahu, molekuly se dostávají

do oběhu prostou difúzí. Ustálený stav uvolňování nastává často až po počáteční prodlevě, což může působit potíže. Řešení se dá najít v kombinaci s jinými polymery, např. s polyethylenglykolem [1]. Příklady komerčně dostupných léků na bázi kopolymeru PLGA jsou Arestin® (OraPharma Inc., Pensylvánie, USA), či Nutropin Depot® (Genentech Inc., Kalifornie, USA). Na nanočástice vytvořené z PLGA modifikované methoxy-polyethylenglykolem se podařilo navázat cis platinu, která vykazovala prodloužené uvolňování po intravenózním podání [85].

Poly- ϵ -(kaprolakton)

PCL, poly- ϵ -(kaprolakton), je netoxický biokompatibilní polymer využívaný ve farmaceutických aplikacích, který má vysoký potenciál ve vývoji nanočásticových lékových forem. Jeho výhodou je pomalá rychlost degradace, čehož se využívá při řízeném uvolňování léčiv. Pro zvýšení stability NPs se různými způsoby modifikuje jejich povrch. Jednou z úprav je nanesení vrstvy poloxameru, známého též jako Pluronic. Jedná se o kopolymer z bloků hydrofobního propylenoxidu (PO) a hydrofilního ethylenoxidu (EO). PCL je součástí mnoha farmaceutických přípravků, nejznámějším je tamoxifen, který je pod obchodním názvem Nolvadex® (AstraZeneca, UK) určen k léčbě karcinomu prsu [86].

Poly(alkylkyanoakrylát)

V 80. letech minulého století tým francouzského chemika Couvreaux poprvé využil při přípravě nanočástic poly(alkylkyanoakrylátů) (PAC). PAC byly již tehdy ověřeným šicím materiálem v chirurgii a dodnes nachází využití jako lepidla. Při degradaci uvnitř těla však mohou vznikat toxické produkty, které poškozují centrální nervový systém. V současné době se na trhu prodává lokální kožní lepidlo Dermabond® (Ethicon Inc., New Jersey, USA), které obsahuje 2-oktyl-kyanoakrylát. Byly také připraveny NPs s inkorporovanými antibiotiky, cytostatiky a antiflogistiky [84].

2. Experimentální část

2.1 Použité přístroje a pomůcky

- laboratorní váhy KERN 440-33N (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments, GmbH, Göttingen, Německo)
- pH metr model BOECO BT-600 (BOECO, Hamburg, Německo)
- magnetické míchadlo s ohřevem MSH-300 (Biosan SIA., Riga, Lotyšsko)
- UV/VIS spektrofotometr Libra S22 (Biochrom Ltd., Cambridge, UK)
- rotátor Bio RS-24 (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- vakuový koncentrátor RVC 2-18 (Christ, Osterode am Harz, Německo)
- termostat Biological Thermostat BT 120 M (Laboratorní přístroje Praha, Praha, ČR)
- dialyzační membrána, cut-off 12500 – 13000 Da (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- mikrozkušavky (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- automatické pipety Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- stanice pro produkci ultračisté vody TKA Smart2Pure (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

2.2 Příprava nanočástic z kyseliny hyaluronové

Použité chemikálie:

- kyselina hyaluronová 1,5–1,8 MDa; HA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimid hydrochlorid; EDAC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- kyselina adipová dihydrazid; AAD (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- aceton (Lachema, Neratovice, ČR)

Postup:

Pro přípravu 3 mg NPs se vycházelo ze zásobního roztoku HA o koncentraci 5 mg/ml ultračisté vody. Z tohoto roztoku bylo 0,6 ml zředěno 0,6 ml ultračisté vody na výslednou koncentraci 2,5 mg/ml. Dále bylo přidáno 2,04 ml čistého acetonu, směs byla 15 min inkubována na třepačce při laboratorní teplotě (RT). Následně byl přidán EDAC (1,2 mg/30 μ l ultračisté vody) a AAD (1,2 mg/30 μ l ultračisté vody). Směs byla inkubována 30 min při RT na třepačce. Dále bylo ve třech krocích přidáno 1,22 ml čistého acetonu vždy s inkubací 30 min po každém přidání (celkem 3,66 ml). Všechny vzorky byly

následně odpařeny ve vakuovém koncentrátoru při 50 °C na objem cca 2 ml a pipetovány do dialyzačních membrán. Dialýza probíhala do ultračisté vody přes noc na třepačce (s první výměnou vody po 30 min).

U připravených NPs byla ověřena jejich velikost (hydrodynamický průměr) metodou dynamického rozptylu světla DLS (z angl. Dynamic Light Scattering), kterou provedl Ing. Jiří Palarčík, Ph.D z Ústavu environmentálního a chemického inženýrství (FCHT, UPCE). Na měření byl poslán vzorek o koncentraci 250 µg/1,5 ml. Požadovaný limit velikosti byl pod 100 nm.

2.3 Imobilizace biotinu na připravené nanočástice

Použité chemikálie:

- N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid; EDAC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- biotin hydrazid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Postup:

Vazba biotinu na NPs byla provedena standardní karbodiimidovou metodou [87]. K množství 2 mg NPs byl přidán EDAC (1 mg/500 µl ultračisté vody). Vzorek byl na pět minut umístěn na rotátor při RT a poté byl přidán biotin hydrazid (1 mg/1 ml ultračisté vody). Po 30 min inkubaci na rotátoru při RT byla provedena dialýza přes noc do ultračisté vody. Současně byl připraven vzorek pro ověření nespecifické sorpce biotinu. Postup při přípravě vzorku byl totožný, pouze bez přídavku EDAC.

Pro optimalizaci navázání biotinu byly testovány tři vzorky lišící se v jeho množství. Byly připraveny následujícím způsobem. Každý z nich obsahoval 2 mg NPs, ke kterým byl přidán EDAC (1 mg/500 µl ultračisté vody). Po 5 min na rotátoru bylo jednotlivě ke vzorkům přidáno 1; 0,5 a 0,1 ml roztoku biotin hydrazidu (1 mg/ml). Po 30 min inkubaci na rotátoru při RT byly vzorky dialyzovány proti ultračisté vodě přes noc.

2.4 Kvantifikace biotinu navázaného na nanočástice

Použité chemikálie:

- azid sodný; NaN₃ (Chemapol limited, Londýn, UK)
- jodid draselný; KI (Penta, Chrudim, ČR)

- jod; I₂ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát; Na₂HPO₄·12 H₂O (Penta, Chrudim, ČR)

Postup:

Kvantifikace biotinu byla provedena podle dříve publikované vědecké práce [88] s úpravou reakčních podmínek pro naši aplikaci.

Roztoky biotinu pro měření kalibrační řady o koncentraci 0,5–10 µg/ml byly připraveny ze zásobního roztoku biotinu (0,1 mg/ml), který byl rozpuštěn v 1 mM roztoku NaOH. Dále bylo připraveno 100 ml 0,1M roztoku azidu sodného v ultračisté vodě. Roztok trijodidu (I₂ s KI) byl připraven rozpuštěním 9 g KI ve 200 ml ultračisté vody, do kterého bylo následně přidáno 25,4 mg jodu. Fosfátový pufr o pH 4 byl připraven rozpuštěním Na₂HPO₄·12 H₂O, pH bylo poté upraveno 1M HCl.

Roztoky pro body kalibrace byly připraveny z odpovídajícího objemu zásobního roztoku biotinu (0,1 mg/ml). Poté bylo přidáno 100 µl fosfátového pufru, 200 µl azidu sodného a odpovídající množství ultračisté vody tak, aby byl celkový objem 1 ml. Následovala 3 min inkubace při RT. Poté bylo přidáno 100 µl roztoku trijodidu. Spektrofotometricky byla změřena absorbance při vlnové délce 348 nm ihned po přidání roztoku jodidu a poté po 14 min inkubaci při RT. Do kalibračního grafu (viz Graf 2) byla vynesena závislost rozdílu absorbancí na množství navázaného biotinu. Nutné optimalizační kroky byly provedeny při přípravě slepého vzorku, kdy bylo proměřeno více variant o různém složení za účelem nalezení optimální kombinace reagensů (viz Tabulka 2).

Tabulka 2 Složení slepých vzorků pro spektrofotometrickou kvantifikaci navázaného biotinu na nanočástice. Měřeno při vlnové délce 348 nm.

Slepý vzorek č.	Ultračistá voda [µl]	Fosfátový pufr [µl]	Azid sodný [µl]	Trijodid [µl]	Biotin hydrazid [µl]
1	500	100	x	x	x
2	500	100	200	x	x
3	570	100	x	x	30
4	570	100	x	100	x
5	570	100	200	100	x
6	570	x	x	100	30
7	570	100	200	100	30*

*místo roztoku biotin hydrazidu byl použit stejný objem 1 mM NaOH

Množství biotinu navázaného na NPs bylo stanoveno totožným způsobem. Pro měření bylo použito 200 μ l vzorku biotinylovaných NPs.

2.5 Skladovací stabilita biotinu navázaného na nanočástice

Použité chemikálie:

- azid sodný; NaN_3 (Chemapol limited, Londýn, UK)
- jodid draselný; KI (Penta, Chrudim, ČR)
- jod; I_2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (Penta, Chrudim, ČR)

Postup:

Skladovací stabilita byla měřena vždy po jednom týdnu, celková doba experimentu byla šest týdnů od imobilizace. Před měřením bylo 200 μ l vzorku biotinylovaných NPs dialyzováno oproti ultračisté vodě po dobu 1 hodiny (v průběhu byla voda 2x vyměněna), aby došlo k případnému odstranění uvolněného biotinu v důsledku skladování. Po skončení dialýzy byl vzorek změřen spektrofotometricky při 348 nm dle postupu v kapitole 2.4.

2.6 Ověření odolnosti navázaného biotinu na nanočásticích v silně kyselém a silně zásaditém prostředí

Použité chemikálie:

- kyselina chlorovodíková; HCl (Penta, Chrudim, ČR)
- hydroxid sodný; NaOH (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- azid sodný; NaN_3 (Chemapol limited, Londýn, UK)
- jodid draselný; KI (Penta, Chrudim, ČR)
- jod; I_2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (Penta, Chrudim, ČR)

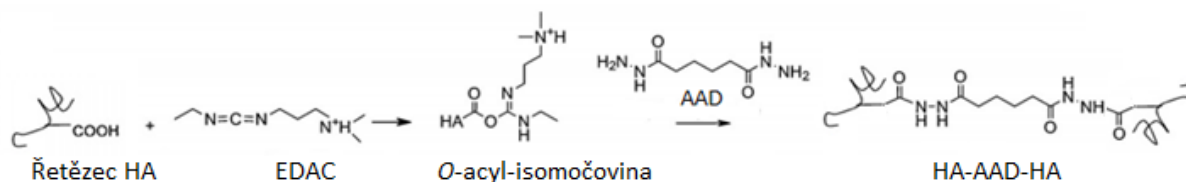
Postup:

Nejdříve byly připraveny 10 M roztoky HCl a NaOH. Bylo smícháno 0,9 ml biotinylovaných NPs s 1,8 ml 10 M HCl. Druhý vzorek byl připraven rovněž smícháním 0,9 ml biotinylovaných NPs s 1,8 ml 10 M NaOH. Oba vzorky byly inkubovány 30 min při 37 °C v termostatu. Poté byly dialyzovány do ultračisté vody po dobu jedné hodiny při RT. Po dialýze bylo stanoveno množství biotinu na částicích podle postupu uvedeného v kap. 2.4.

3. Výsledky a diskuze

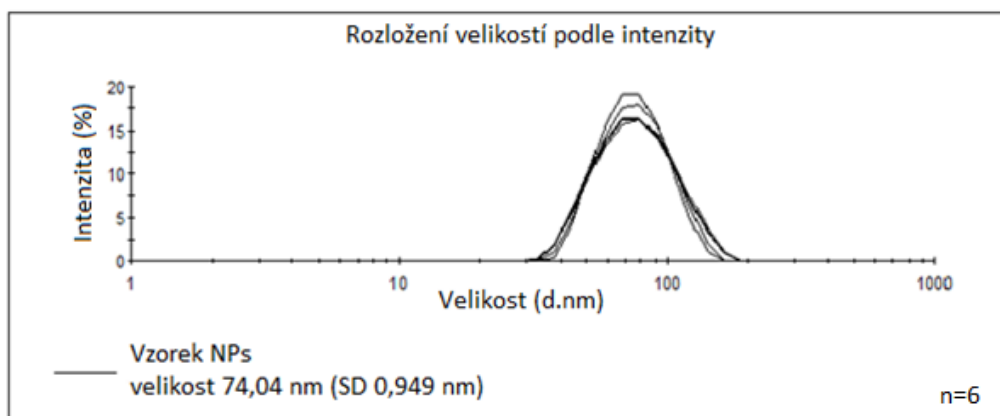
3.1 Příprava nanočástic z kyseliny hyaluronové

Při práci v laboratoři byly nejdříve připraveny nanočástice z kyseliny hyaluronové karbodiimidovou metodou za použití *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimidu hydrochloridu (EDAC) a dihydrazidu kyseliny adipové (AAD) jako síťovacího činidla v prostředí aceton/voda. Obrázek 15 uvádí mechanismus vzniku NPs:



Obrázek 15 Mechanismus vzniku nanočástic. Převzato a přeloženo z [89].

Analytická metoda, kterou byla zjištěna velikost nanočástic, se nazývá DLS. Detekuje rozptyl fotonů, k němuž dochází v roztoku na částicích při použití zdroje záření. Intenzita rozptýleného světla totiž kolísá kvůli tomu, že se částice pohybují Brownovým pohybem způsobeným nárazem molekul rozpouštědla. Měřením bylo zjištěno, že výše uvedeným postupem byly připraveny nanočástice o velikosti (hydrodynamický průměr) 74,04 nm (viz Graf 1), což splňuje požadavek, aby byly NPs menší než 100 nm. Jejich unikátní rozměr jim pak dovoluje snadno pronikat do buněčného prostoru.

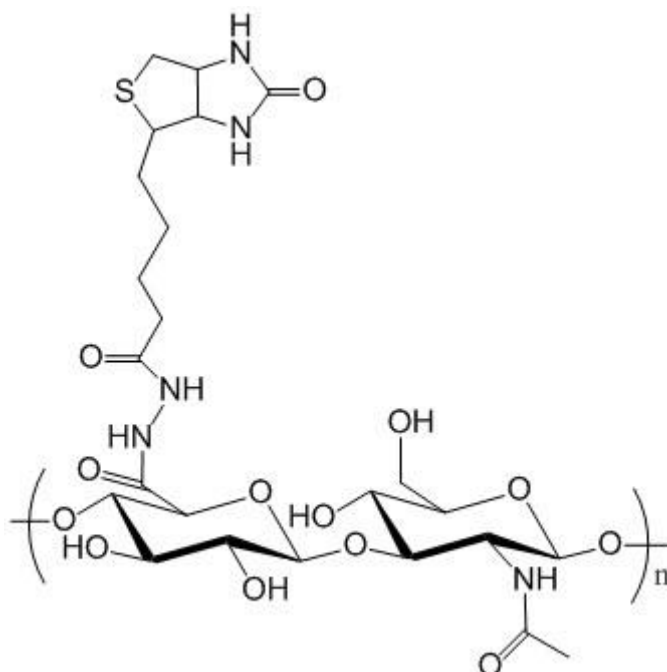


Graf 1 Distribuční záznam DLS vzorku nanočástic kyseliny hyaluronové. Velikost nanočástic 74,04 nm. Počet měření: 6.

Bylo zjištěno, že výrazný vliv na tvorbu NPs má odstranění acetonu z reakční směsi ve vakuovém koncentrátoru. Při teplotě 40 °C na 15 min docházelo k agregaci až na vlákna. Jako optimální varianta byla proto zvolena doba 10 min při 50 °C.

3.2 Imobilizace biotinu na připravené nanočástice

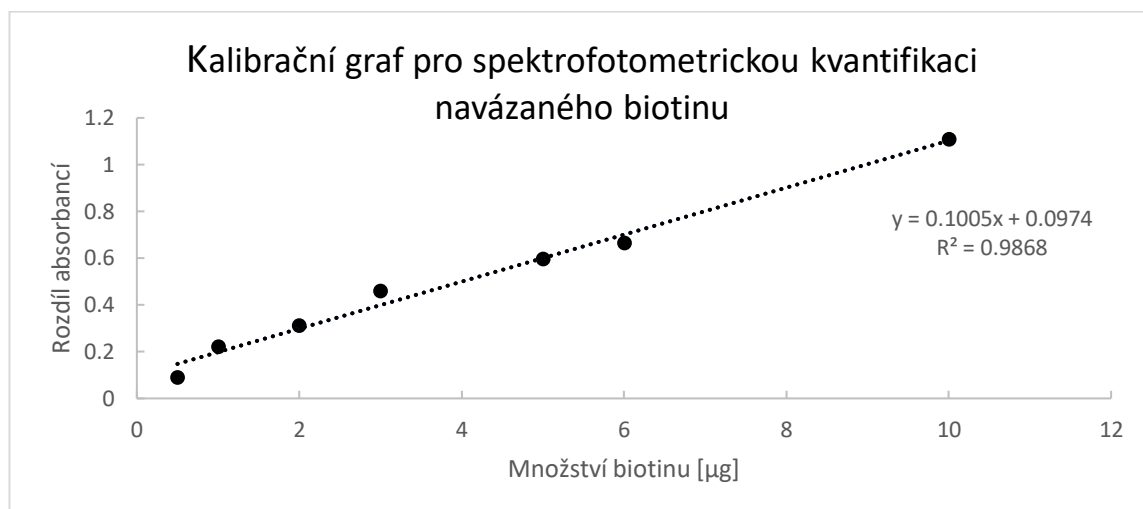
Dalším krokem bylo navázání bioaktivní molekuly (biotin) na připravené NPs standardní karbodiimidovou metodou s přidavkem EDAC jako činidla, které aktivuje karboxylové skupiny řetězců HA, na které se následně prostřednictvím koncové aminoskupiny váže molekula biotinu (viz Obrázek 16).



Obrázek 16 Kyselina hyaluronová s imobilizovaným biotinem. Převzato z [90].

Po imobilizaci byl přebytečný a nespecificky navázaný biotin odstraněn dialýzou proti ultračisté vodě. Abychom mohli potvrdit vznik vazby mezi NPs a biotinem, bylo třeba jeho navázané množství kvantifikovat. Byla provedena spektrofotometrická metoda, kdy byl měřen rozdíl absorbancí ihned po přidání roztoku trijodidu k měřenému vzorku a poté po 14 min inkubace [88]. Měření probíhalo při vlnové délce 348 nm, což odpovídá absorpčnímu maximu biotinu. Jod obsažený v roztoku trijodidu oxiduje azid sodný na dusík, sám se redukuje na jodid. Tato reakce je velmi pomalá, avšak v přítomnosti biotinu, který obsahuje sulfidickou skupinu, se urychlí. Oranžový roztok trijodidu se tak během inkubace odbarví, což lze sledovat také vizuálně.

Pro správné a přesné výsledky bylo potřeba provést několik optimalizačních kroků. Klíčovým z nich bylo nalezení optimálního složení slepého vzorku. Ten byl připraven pro každý bod kalibrační křivky zvlášť o shodném složení, jaké měl měřený roztok, kromě obsahu biotinu (viz kap. 2.4). Místo něj byl použit odpovídající objem 1 mM roztoku NaOH. Kalibrace byla sestavena v rozsahu koncentrací 0,5–10 µg/ml biotinu (viz Graf 2).



Graf 2 Kalibrační graf pro spektrofotometrickou kvantifikaci biotinu. Rozsah množství biotinu v reakci 0,5–10 µg/ml. Rozdíl absorbancí měřen při 348 nm. Slepý vzorek: stejné složení jako měřené roztoky mimo biotin, místo něj doplněn odpovídající objem 1mM roztok NaOH.

Stejným postupem byl změřen i vzorek obsahující 2 mg NPs s navázaným biotinem (1 mg/1 ml ultračistá voda). Současně byl připraven vzorek pro ověření nespecifické sorpce, který neobsahoval EDAC. Ze získané rovnice regrese bylo poté vypočítáno množství biotinu (viz Tabulka 3).

Tabulka 3 Výsledky spektrofotometrické kvantifikace biotinu navázaného na NPs s a bez přidavku EDAC. Kvantifikace biotinu proběhla při vlnové délce 348 nm podle postupu v kap. 2.4.

Vzorek č. 1	NPs [mg]	Biotin [mg]	EDAC [mg]	Navázané množství biotinu [µg/1 mg NPs]
1	2	1	1	10,52
2	2	1	x	Nebylo možné kvantifikovat

U vzorku s přidavkem EDAC byl stanoven biotinu v množství 10,52 µg/1 mg NPs. V případě druhého vzorku bez přidání EDAC výsledky potvrdily, že ke specifickému navázání nedošlo, protože rozdíl absorbancí po přidání trijodidu a po inkubaci byl příliš malý ($\Delta A = 0,022$) a již se nacházel pod limitem kvantifikace.

Z důvodu absence EDAC nedošlo k aktivaci karboxylových skupin nanočástic. Zároveň bylo potvrzeno, že nedochází k vysoké nespecifické sorpci biotinu na NPs.

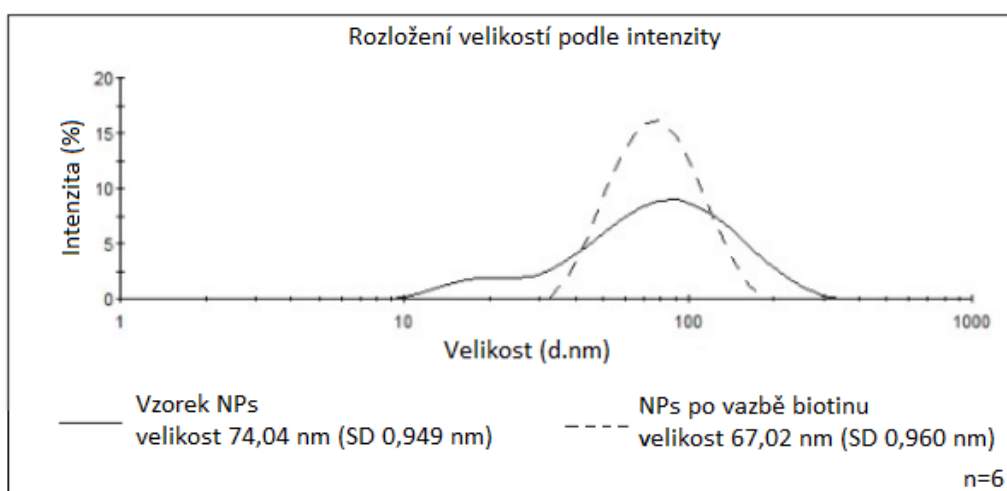
Pro optimalizaci navázání biotinu byly dále použity tři vzorky, které se lišily množstvím přidaným k NPs, a sice 1; 0,5 a 0,1 mg biotinu. Výsledky shrnuje Tabulka 4:

Tabulka 4 Výsledky spektrofotometrické kvantifikace biotinu navázaného na NPs. Kvantifikace biotinu proběhla při vlnové délce 348 nm podle postupu v kap. 2.4

Vzorek č.	NPs [mg]	Biotin [mg]	Navázané množství biotinu [μg/1 mg NPs]
1	2	1	7,57
2	2	0,5	2,25
3	2	0,1	nebylo možné kvantifikovat

Nejlépeších výsledků bylo dosaženo u vzorku č. 1, kdy byl vázán 1 mg biotinu na 2 mg nanočástic. Tento vzorek byl následně použit pro měření skladovací stability. U vzorků č. 2 a 3, které obsahovaly 0,5 a 0,1 mg biotinu, se po ukončení dialýzy objevily bíle zbarvené agregáty, a proto nebyly po kvantifikaci dále použity. Množství navázaného biotinu u vzorku č. 3 navíc leželo pod limitem kvantifikace.

Následně bylo provedeno měření DLS ke zjištění případné změny velikosti částic, což by potvrdilo další provázání řetězců v již vytvořených nanočásticích. Z Grafu 3 je patrné, že po imobilizaci biotinu klesla polydisperzita NPs. To může naznačovat shluk a vznik kompaktnější struktury, která je žádoucí.



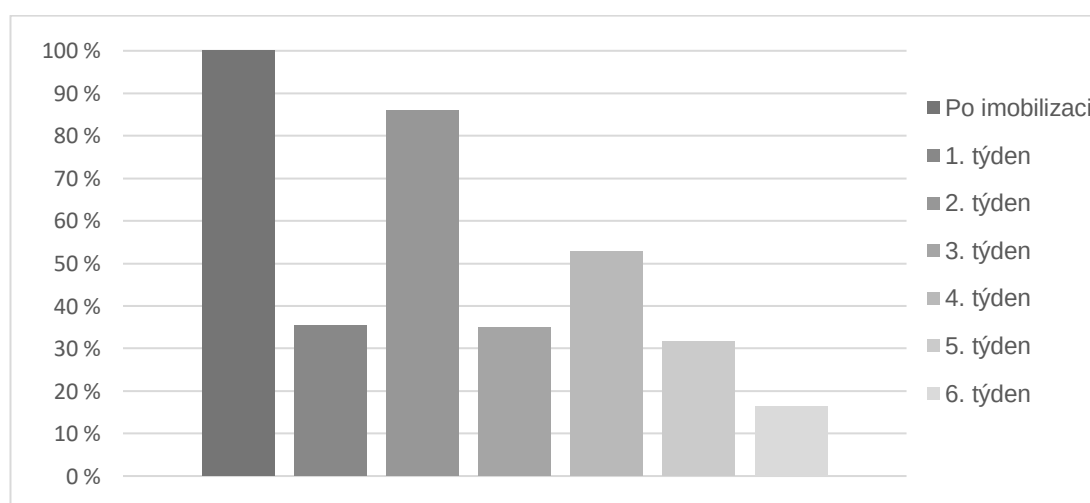
Graf 3 Distribuční záznam DLS vzorku čistých nanočástic a po vazbě biotinu (1 mg biotinu/2 mg NPs). Kvantifikace biotinu proběhla při vlnové délce 348 nm podle postupu v kap. 2.4. Počet měření: 6.

3.3 Skladovací stabilita biotinu navázaného na nanočásticích

Stabilita vazby mezi NPs a biotinem byla hodnocena na základě měření skladovací stability. Ta je důležitá především pro případné uskladnění jedné šarže připravených NPs a jejího pozdějšího použití. Při měření bylo odebráno 200 μ l zásobního roztoku biotinylovaných NPs (1 mg biotinu/2 mg NPs), tento vzorek byl dialyzován proti ultračisté vodě z důvodu odstranění případného uvolněného biotinu. Spektrofotometricky byl poté stanoven podle postupu uvedeného v kapitole 2. 4. Podle rovnice regrese (viz Graf 2) bylo spočítáno jeho množství. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 5. Graf 4 znázorňuje jednotlivé týdny měření skladovací stability.

Tabulka 5 Výsledky spektrofotometrické kvantifikace navázaného biotinu na NPs a následného měření skladovací stability. Kvantifikace biotinu proběhla při vlnové délce 348 nm podle postupu v kap. 2.4.

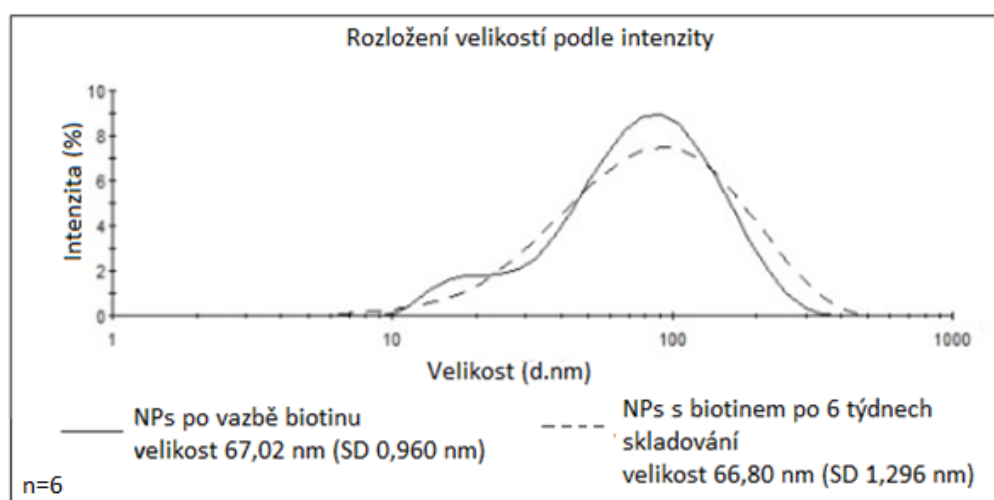
Týden	Množství navázaného biotinu [μ g/1 mg NPs]
Po imobilizaci	10,83
1	3,824
2	9,320
3	3,797
4	5,725
5	3,432
6	1,770



Graf 4 Záznam NPs s navázaným biotinem vyjadřující jeho schopnost se odštěpit a přejít do roztoku. Koncentrace 1 mg biotinu/2 mg NPs. NPs byly skladovány v lednici a měřeny spektrofotometricky při 348 nm podle postupu v kap. 2.4.

Jak ukazují výsledky (viz Graf 4), docházelo k postupnému uvolňování biotinu z nanočástic do roztoku, přičemž po prvním týdnu došlo k nejvýznamnějšímu poklesu. Měření ve druhém týdnu bylo z důvodu nepřesné přípravy slepého vzorku zatíženo chybou, avšak z časových důvodů již nebylo možné experiment opakovat.

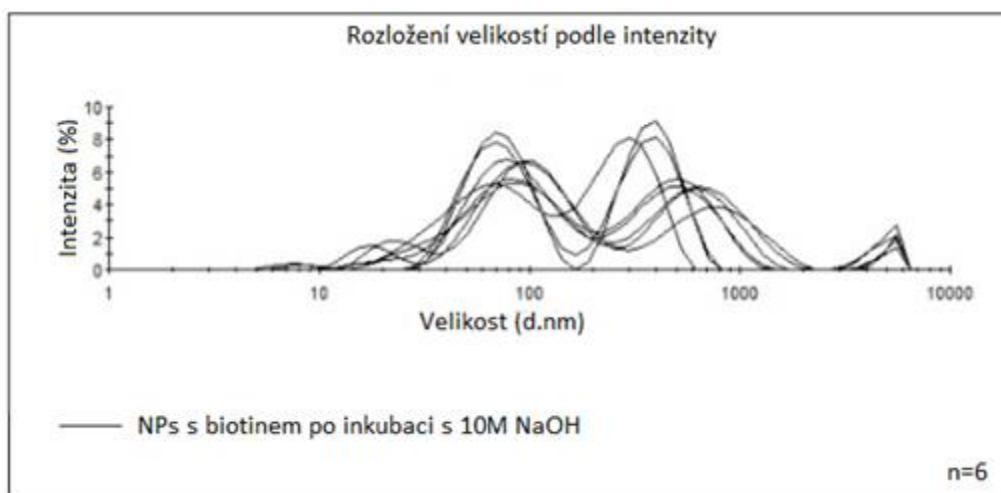
Po šestém týdnu, kdy bylo ukončeno měření skladovací stability, byla rovněž ověřena velikost NPs, abychom zjistili, zda nedošlo k rozpadu nebo agregaci. Graf 5 ukazuje, že ani po šesti týdnech nedošlo k výrazné změně distribuce velikosti, což potvrzuje, že k rozkladu ani ke shlukování částic do větších agregátů nedochází. Křivka se pouze lehce rozšířila, což značí tendenci posunu velikosti NPs hlavně k větším hodnotám.



Graf 5 Distribuční záznam DLS nanočástic (1 mg biotinu/2 mg NPs) po imobilizaci biotinu a po 6 týdnech skladování. Po imobilizaci velikost 67,02 nm, po 6 týdnech velikost 66,80 nm. NPs byly skladovány v lednici a měřeny spektrofotometricky při 348 nm dle postupu v kap 2.4.

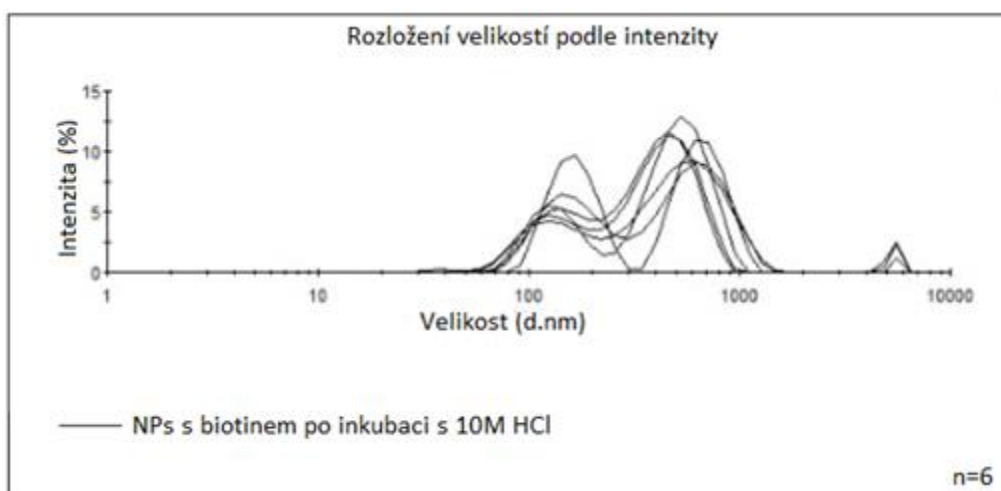
3.4 Ověření odolnosti navázaného biotinu na nanočásticích v silně kyselém a silně zásaditém prostředí

Vazba biotinu na NPs byla provedena standardní karbodiimidovou metodou, při které vzniká kovalentní vazba. Stabilita této vazby byla ověřována působením kyselého a zásaditého pH s následnou kvantifikací biotinu. V obou případech nebyla patrná výraznější změna absorbance po přidání roztoku trijodidu (v případě HCl $\Delta A = 0,090$; u NaOH $\Delta A = 0,097$), množství navázaného biotinu tudíž kleslo pod limit kvantifikace. Biotin funguje během reakce jako katalyzátor, který urychluje odbarvení trijodidu. Jeho absence během měření způsobila, že oranžový roztok zůstal neodbarven (viz [88]). Výsledky měření DLS (Graf č. 6 a 7) také ukázaly, že po inkubaci došlo k rozrušení kompaktní struktury a také k výraznému zvýšení polydisperzity ve velikosti částic. Křivky vykazovaly chaotičtější průběh. V případě hydroxidu sodného byla změřena vysoká intenzita v oblasti kolem 80 nm a poté nad 500 nm.



Graf 6 Distribuční záznam DLS nanočástic po 30 min inkubaci s 10M NaOH při 37 °C. Počet měření: 6.

Po inkubaci biotinylovaných nanočástic s kyselinou chlorovodíkovou byla zjištěna nejvýraznější intenzita v oblasti nad 500 nm a nižší poté nad 120 nm.



Graf 7 Distribuční záznam DLS nanočástic po 30 min inkubaci s 10M HCl při 37 °C. Počet měření: 6.

Vazba biotinu na NPs po působení silně kyselého a zásaditého prostředí jako simulace extrémních podmínek v organismu tedy nebyla stabilní a došlo k uvolnění navázané látky. Dialyzační membrána se při styku se silnou zásadou navíc začala lepit k sobě, což ztížilo manipulaci se vzorkem.

4. Závěr

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo vytvořit přehled biodegradabilních polymerních látek, které nachází uplatnění v medicíně jako cílené nosiče terapeutických molekul. Z těchto polymerů se dále připravují vhodné formy, jako například nanočástice či hydrogely, které se poté v těle pacienta chovají jako distributor léčiva. Zkoumanými oblastmi byly základní vlastnosti polymerů, způsob jejich přípravy a také využití v praxi.

V experimentální části bylo úkolem připravit nanočástice z kyseliny hyaluronové, dále na ně karbodiimidovou metodou navázat biotin a provést jeho spektrofotometrickou kvantifikaci. Rovněž byla měřena po dobu šesti týdnů skladovací stabilita, které ověřuje stabilitu vazby biotinu na nanočástice a jeho tendenci přecházet do roztoku. Závěrečným měřením bylo ověření odolnosti imobilizovaného biotinu na nanočásticích v silně kyselém a silně zásaditém prostředí.

Nanočástice z kyseliny hyaluronové byly připraveny pomocí *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimid hydrochloridu a kyseliny adipové dihydrazidu v prostředí aceton/voda. Povedlo se připravit NPs s velikostí 74,04 nm, což splňuje podmínku rozměru pod 100 nm. Abychom zamezili agregaci během přípravy NPs, byly testovány dvě varianty teploty a délky umístění vzorku ve vakuovém koncentrátoru. Jako vhodnější byla zvolena varianta 10 min na 50 °C.

Dalším krokem bylo navázání biotinu a jeho imobilizace na připravené NPs. Následně byla zavedena spektrofotometrická metoda, kdy byl při vlnové délce 348 nm měřen rozdíl absorbancí ihned po přidání roztoku trijodidu ke vzorku a po 14 min inkubaci. Po optimalizaci složení slepého vzorku byla testována tři různá množství navázaného biotinu na NPs. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u vzorku s obsahem 1 mg biotinu na 2 mg NPs, kdy se jej navázalo 7,52 µg/1 mg NPs.

Byla ověřena i skladovací stabilita biotinu navázaného na NPs, a to po dobu šesti týdnů. Pro toto opakující se měření byl vybrán vzorek obsahující 1 mg biotinu na 2 mg NPs. Z výsledků je zřejmé, že docházelo k postupnému uvolňování biotinu do roztoku a vazba tedy nebyla příliš stabilní.

Působením kyselého a zásaditého pH na nanočástice byla dále ověřována stabilita vazby biotinu v extrémních podmínkách. V obou případech nebyla patrná dostatečná změna absorbance, což indikuje nestabilní vazbu biotinu a jeho odštěpení. Zároveň došlo ke změně

velikosti NPs, což dokazuje, že se nanočástice při styku se silnými kyselinami a bázemi rozloží. V případě enterální aplikace do těla pacienta by v žaludku došlo k okamžitému rozpadu a uvolnění celého obsahu navázaného léčiva. Další experimenty by mohly být zaměřeny na vývoj postupného uvolnění navázané molekuly.

Metody přípravy a modifikace nanomateriálů by měly být i nadále intenzivně rozvíjeny, neboť se jedná o perspektivní oblast biomedicíny s využitím jak pro diagnostiku, tak terapii. Toto téma je také aktuální vzhledem k využití v léčbě nádorových onemocnění. Předmětem dalšího zkoumání by mělo být překonání nestability v různých podmínkách, kterým se systémy vystavují při aplikaci do lidského organismu.

5. Seznam použité literatury

- [1] GÜLTEKIN, Hazal Ezgi, DEĞİM, Zelihagül. Biodegradable Polymeric Nanoparticles are effective Systems for Controlled Drug Delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013, **38** (2), 107–118. ISSN 13004182.
- [2] MAHAPATRO, Anil, SINGH, Dinesh K. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in vivo delivery of drugs and vaccines. *Journal of Nanobiotechnology*. 2011, **9**, 1–11. ISSN 1477-3155. doi:10.1186/1477-3155-9-55
- [3] BALMAYOR, Elizabeth Rosado, AZEVEDO, Helena Sepulveda, REIS, Rui L. Controlled delivery systems: From pharmaceuticals to cells and genes. *Pharmaceutical Research*. 2011, **28** (6), 1241–1258. ISSN 07248741. doi:10.1007/s11095-011-0392-y
- [4] PAOLINO, Donatela, FRESTA, Massimo, SINHA, Piyush, FERRARI, Mauro. Principles of Controlled Drug Delivery. In: *Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation*. Weinheim (Německo): Wiley-VCH, 2006, 437–495. [cit. 2. 4. 2018]. ISSN 00433284.
- [5] FOLKMAN, Judah, LONG, David M. The use of silicone rubber as a carrier for prolonged drug therapy. *Journal of Surgical Research*. 1964, **4** (3), 42–139. Dostupné z: <https://www.popline.org/node/520760>
- [6] NAYAB, Pattan Sirajuddin, ARIF, Rizwan. Nanoparticles as Targeted Drug Delivery Agents : Synthesis , Mechanism and Applications. In: *Recent Trends in Nanomaterials*. Singapore: Springer Nature, 2017, 49–63. [cit. 2. 4. 2018], ISBN 9789811038426. doi:10.1007/978-981-10-3842-6
- [7] LEE, Wing-Hin, LOO, Ching-Yee, YOUNG, Paul M., TRAINI, Daniela. The Development and Achievement of Polymeric Nanoparticles for Cancer Drug Treatment. In: *Particulate Technology for Delivery of Therapeutics*. Singapore: Springer Nature, 2017, 25–60. [cit. 2. 4. 2018]. ISBN 9789811036477. doi:10.1007/978-981-10-3647-7
- [8] SMITH, Joel, MORGAN, Jennifer R., ZOTTOLI, Steven J., SMITH, Peter J., BUXBAUM, Joseph D, BLOOM, Ona E. Regeneration in the era of functional genomics and gene network analysis. *Biological Bulletin*. 2011, **221** (1), 18–34. ISSN 00063185. doi:10.1038/jid.2014.371
- [9] MEYER, Karl, HOBBY, Gladys L., CHAFFEE, Eleanor, DAWSON, Martin H. The hydrolisis of hyaluronic acid by bacterial enzymes. *The Journal of Experimental Medicine*. 1940, **71** (2), 137–146.
- [10] LEE, Kuen Yong, JEONG, Lim, KANG, Yun OK, LEE, Seung Jin, PARK, Won Ho. Electrospinning of polysaccharides for regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009, **61** (12), 1020–1032. ISSN 0169409X. doi:10.1016/j.addr.2009.07.006
- [11] KOGAN, Grigorij, ŠOLTÉS, Ladislav, STERN, Robert, GEMEINER, Peter. Hyaluronic acid: A natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*. 2007, **29** (1), 17–25. ISSN 01415492. doi:10.1007/s10529-006-9219-z

- [12] EVANKO, Stephen P., PARKS, Tony T., WIGHT, Thomas N. Intracellular hyaluronan in arterial smooth muscle cells: Association with microtubules, RHAMM, and the mitotic spindle. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2004, **52** (12), 1525–1535. ISSN 00221554. doi:10.1369/jhc.4A6356.2004
- [13] SANTINI, Maria T., CAMETTI, Cesare, FORMISANO, Giuseppe, FLAMMA, Floriana, PERILLI, Roberto. Effects of hyaluronan viscous materials on cell membrane electrical properties. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1998, **41** (2), 211–220. ISSN 00219304.
- [14] GUTER, Michaela, BREUNIG, Miriam. Hyaluronan as a promising excipient for ocular drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2017, **113**, 34–49. ISSN 18733441. doi:10.1016/j.ejpb.2016.11.035
- [15] VASI, Ana-Maria, POPA, Marcel Ionel, BUTNARU, Maria, DODI, Gianina, VERESTIUC, Liliana. Chemical functionalization of hyaluronic acid for drug delivery applications. *Materials Science & Engineering C*. 2014, **38**, 177–185. doi:10.1016/j.msec.2014.01.052
- [16] BAEVA, Larissa F., LYLE, Daniel B., RIOS, Maria, LANGONE, John J., LIGHTFOOTE, Marilyn M. Different molecular weight hyaluronic acid effects on human macrophage interleukin 1 β production. *Journal of biomedical materials research. Part A*. 2013, 305–314. ISSN 1552-4965. doi:10.1002/jbm.a.34704
- [17] MARCELLIN, Esteban, STEEN, Jennifer A., NIELSEN, Lars K. Insight into hyaluronic acid molecular weight control. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014, **98** (16), 6947–6956. ISSN 14320614. doi:10.1007/s00253-014-5853-x
- [18] FAN, Xing, DONG, Ming, LI, Tong, MA, Qiaoxin, YIN, Yue. Two Cases of Adverse Reactions of Hyaluronic Acid–based Filler Injections. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2016, **4** (12), 1112. ISSN 2169-7574. doi:10.1097/GOX.0000000000001112
- [19] CHONG, Barrie Fong, BLANK, Lars M., MCLAUGHLIN, Richard, NIELSEN Lars K. Microbial hyaluronic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005, **66** (4), 341–351. ISSN 01757598. doi:10.1007/s00253-004-1774-4
- [20] SILVA, Dana da, KADURI, Maya, POLEY, Maria, ADIR, Omer, KRINSKY, Nitzan et al. Biocompatibility, biodegradation and excretion of polylactic acid (PLA) in medical implants and theranostic systems. *Chemical Engineering Journal*. 2018, **340** (1), 9–14. ISSN 13858947. doi:10.1016/j.cej.2018.01.010
- [21] RASAL, Rahul M., JANORKAR, Amol V., HIRT, Douglas E. Poly(lactic acid) modifications. *Progress in Polymer Science*. 2010, **35** (3), 338–356. ISSN 00796700. doi:10.1016/j.progpolymsci.2009.12.003
- [22] LIM, L. T., AURAS, R., RUBINO, M. Processing technologies for poly(lactic acid). *Progress in Polymer Science*. 2008, **33** (8), 820–852. ISSN 00796700. doi:10.1016/j.progpolymsci.2008.05.004
- [23] AURAS, Rafael, HARTE, Bruce, SELKE, Susan. An overview of polylactides as packaging materials. *Macromolecular Bioscience*. 2004, **4** (9), 835–864. ISSN 16165187. doi:10.1002/mabi.200400043
- [24] WILLIAMS, Donjanea F. Enzymic Hydrolysis of Polylactic Acid. *Engineering in Medicine*. 1981, **10** (1), 5–7. ISSN 0046-

- [25] MIKOS, Antonios G., THORSEN, Amy J., CZERWONKA, Lisa A., BAO, Yuan, LANGER, Robert, WINSLOW, Douglas N., VACANTI, Joseph P. Preparation and characterization of poly(l-lactic acid) foams. *Polymer*. 1994, **35** (5), 1068–1077. ISSN 00323861. doi:10.1016/0032-3861(94)90953-9
- [26] DI MARTINO, Antonio, KUCHARCZYK, Pavel, ZEDNIK, Jiri, SEDLARIK, Vladimir. Chitosan grafted low molecular weight polylactic acid for protein encapsulation and burst effect reduction. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015, **496** (2), 912–921. ISSN 18733476. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.10.017
- [27] KUMARESAPILLAI, Natarajan, BASHA, Riyaz Ameer, SATHISH, Rengarajan. Production and evaluation of chitosan from *Aspergillus niger* MTCC strains. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2011, **10** (3), 553–558. ISSN 17350328.
- [28] TOKURA, Seiichi, UENO, Keisuke, MIYAZAKI, Satoshi, NISHI, Norio. Molecular Weight Dependent Antimicrobial Activity by Chitosan. *Macromolecular Symposia*. 1996, **120** (1–9), 199–207. ISSN 10221360. doi:10.1007/978-3-642-80289-8_21
- [29] XU, Long, HUANG, Yun An, ZHU, Qiu Jin, YE, Chun. Chitosan in molecularly-imprinted polymers: Current and future prospects. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015, **16** (8), 18328–18347. ISSN 14220067. doi:10.3390/ijms160818328
- [30] SZYMAŃSKA, Emilia, WINNICKA, Katarzyna. Stability of chitosan - A challenge for pharmaceutical and biomedical applications. *Marine Drugs* [online]. 2015, **13** (4), 1819–1846. ISSN 16603397. doi:10.3390/md13041819
- [31] ZHOU, Guichen, LU, Ying, ZHANG, He, CHEN, Yan, YU, Yuan, GAO, Jing, SUN, Duxin et al. A novel pulsed drug-delivery system: Polyelectrolyte layer-by-layer coating of chitosan-alginate microgels. *International Journal of Nanomedicine*. 2013, **8**, 877–887. ISSN 11769114. doi:10.2147/IJN.S38144
- [32] KAKITA, H., KAMISHIMA, H. Some properties of alginate gels derived from algal sodium alginate. *Journal of Applied Phycology*. 2008, **20** (5), 543–549. ISSN 09218971. doi:10.1007/s10811-008-9317-5
- [33] BODDUPALLI, Bindu M., MOHAMMED, Zulkar N. K., NATH, Ravinder A., BANJDI, David. Mucoadhesive drug delivery system: An overview. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*. 2010, **1** (4), 381–387. ISSN 0976-2094. doi:10.4103/0110-5558.76436
- [34] GUOMING, Sun, JEREMY, Mao J. Engineering dextran-based scaffolds for drug delivery and tissue repair. *Nanomedicine (Lond)*. 2012, **7** (11), 1771–1784. ISSN 1527-5418. doi:10.2217/nnm.12.149
- [35] TAM, S. C., BLUMENSTEIN, J., WONG, J. T. Soluble dextran-hemoglobin complex as a potential blood substitute. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1976, **73** (6), 2128–31. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=430463&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- [36] WARDROP, Douglas, KEELING, David. The story of the discovery of heparin and warfarin. *British Journal of Haematology*. 2008, **141** (6), 757–763. ISSN 00071048. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07119.x

- [37] MENEGHETTI, Maria C. Z., HUGHES, Ashley J., RUDD, Timothy R., NADER, Helena B., POWELL, Andrew K., YATES, Edwin A., LIMA, Marcelo A. Heparan sulfate and heparin interactions with proteins. *Journal of The Royal Society Interface*. 2015, **12** (110), 20150589. ISSN 1742-5689. doi:10.1098/rsif.2015.0589
- [38] GANDHI, Neha S., MANCERA, Ricardo L. Heparin/heparan sulphate-based drugs. *Drug Discovery Today* [online]. 2010, **15** (23–24), 1058–1069. ISSN 13596446. doi:10.1016/j.drudis.2010.10.009
- [39] ZHAO, Dan, SANG, Qing, CUI, Huifei. Preparation and evaluation a new generation of low molecular weight heparin. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2016, **79**, 194–200. ISSN 19506007. doi:10.1016/j.biopha.2016.02.021
- [40] RAU, J. C., BEAULIEU, L. M., HUNTINGTON, J. A., CHURCH, Frank C. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2007, **5** (1), 102–115. ISSN 15387933. doi:10.1111/j.1538-7836.2006.02283.x
- [41] CASU, Benuto, NAGGI, Annamaria, TORRI, Giangiacomo. Heparine-derived heparan sulfate mimics that modulate inflammation and cancer. *Matrix Biology*. 2010, **29** (6), 442–452. ISSN 1569-1802. doi:10.1016/j.matbio.2010.04.003. Heparin-derived
- [42] WU, Wei, YAO, Wei, WANG, Xin, XIE, Chen, ZHANG, Jialian, JIANG, Xiqun. Bio-reducible heparin-based nanogel drug delivery system. *Biomaterials*. 2015, **39**, 260–268. ISSN 18785905. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.11.005
- [43] MIKAMI, Tadahisa, KITAGAWA, Hiroshi. Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. 2013, **1830** (10), 4719–4733. ISSN 03044165. doi:10.1016/j.bbagen.2013.06.006
- [44] ROSEMAN, Saul. Reflections on Glycobiology. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001, **276** (9), 41527–41542. ISSN 20132247. doi:10.1074/jbc.R100053200 Saul
- [45] LI, Jun-Jun, XUE, Jun-Fa, OUYANG, Jian-Ming. Stabilization of submicron calcium oxalate suspension by chondroitin sulfate C may be an efficient protection from stone formation. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, **2013** (2013). ISSN 15653633. doi:10.1155/2013/360142
- [46] TAMADDON, M., WALTON, R. S., BRAND, D. D., CZERNUSZKA, J. T. Characterisation of freeze-dried type II collagen and chondroitin sulfate scaffolds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2013, **24** (5), 1153–1165. ISSN 09574530. doi:10.1007/s10856-013-4882-9
- [47] KREUTER, J., MILLS, S. N., DAVIS, S. S., WILSON, C. G. Polybutylcyanoacrylate nanoparticles for the delivery of [75Se]norcholestenol. *International Journal of Pharmaceutics*. 1983, **16** (1), 105–113. ISSN 0378-5173. doi:10.1016/0378-5173(83)90133-3
- [48] MEKARU, Harutaka, LU, Jie, TAMANOI, Fuyuhiko. Development of mesoporous silica-based nanoparticles with controlled release capability for cancer therapy. *Advanced drug delivery reviews*. 2015, **95**, 40–49. ISSN 1872-8294. doi:10.1016/j.addr.2015.09.009
- [49] LEWANDOWSKA-ŁA, Joanna, MYSTEK, Katarzyna, GILARSKA, Adriana. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Silicone-stabilized liposomes as a possible novel nanostructural drug carrier. 2016, **143**, 359–370.

doi:10.1016/j.colsurfb.2016.03.057

- [50] SERCOMBE, Lisa, VEERATI, Tejaswi, MOHEIMANI, Fatemeh, WU, Sherry Y., HUA, Susan. Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Frontiers in Pharmacology*. 2015, **6** (12), 1–13. doi:10.3389/fphar.2015.00286
- [51] LLEVOT, Audrey, ASTRUC, Didier. Applications of vectorized gold nanoparticles to the diagnosis and therapy of cancer. *Chemical Society Reviews*. 2012, **41** (1), 242–257. ISSN 0306-0012. doi:10.1039/C1CS15080D
- [52] BROWN, Sarah D., NATIVO, Paola, SMITH, Jo-Ann, STIRLING, David, EDWARDS, Paul R., VENUGOPAL, Balaji et. al. Gold Nanoparticles for the Improved Anticancer Drug Delivery of the Active Component of Oxaliplatin. *Journal of American Chemical Society*. 2010, **132** (13), 4678–4684.
- [53] PATRI, Anil K., KUKOWSKA-LATALLO, Jolanta F., BAKER, James R. Targeted drug delivery with dendrimers : Comparison of the release kinetics of covalently conjugated drug and non-covalent drug inclusion complex B. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005, **57**, 2203–2214. doi:10.1016/j.addr.2005.09.014
- [54] MADAAN, Kanika, KUMAR, Sandeep, POONIA, Neelam, LATHER, Viney, PANDITA, Deepti. Dendrimers in drug delivery and targeting: Drug-dendrimer interactions and toxicity issues. *Journal of pharmacy & bioallied sciences* [online]. 2014, **6** (3), 139–50. ISSN 0976-4879. doi:10.4103/0975-7406.130965
- [55] ZHANG, Youwei, ZHUANG, Xin, GU, Wenjuan, ZHAO, Jiongxin. Synthesis of polyacrylonitrile nanoparticles at high monomer concentrations by AIBN-initiated semi-continuous emulsion polymerization method. *European Polymer Journal*. 2015, **67**, 57–65. ISSN 0014-3057. doi:10.1016/J.EURPOLYMJ.2015.03.057
- [56] JAISWAL, Jagdish, GUPTA, Suresh Kumar, KREUTER, Jorg. Preparation of biodegradable cyclosporine nanoparticles by high-pressure emulsification-solvent evaporation process. *Journal of Controlled Release*. 2004, **96** (1) 169–178. doi:10.1016/j.jconrel.2004.01.017
- [57] KUNJACHAN, Sijumon, JOSE, Sajan. Understanding the mechanism of ionic gelation for synthesis of chitosan nanoparticles using qualitative techniques. *Asian Journal of Pharmaceutics*. 2010, **4** (2), 148. ISSN 0973-8398. doi:10.4103/0973-8398.68467
- [58] HOSSEINKHANI, Hossein, HOSSEINKHANI, Mohsen et al. Enhanced angiogenesis through controlled release of basic fibroblast growth factor from peptide amphiphile for tissue regeneration. *Biomaterials*. 2006, **27**, 5836–5844. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.08.003
- [59] HOSSEINKHANI, Hossein, HOSSEINKHANI, Mohsen et. al. Ectopic bone formation in collagen sponge self-assembled peptide–amphiphile nanofibers hybrid scaffold in a perfusion culture bioreactor. *Biomaterials*. 2006, **27**, 5089–5098. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.05.050
- [60] BHATIA, J. K., KAITH, B. S, KALIA, S. Polysaccharide Hydrogels: Synthesis, Characterization, and Applications. In: *Polysaccharide Based Graft Copolymers*. Heidelberg (Německo): Elsevier, 2013, s. 271. doi:10.1007/978-3-642-36566-9_7
- [61] GANJI, Fariba, VASHEGHANI-FARAHANI, Ebrahim. Hydrogels in Controlled Drug Delivery Systems. *Iranian Polymer Journal*. 2009, **18** (1), 63–88. Dostupné

z: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.468.8206&rep=rep1&type=pdf>

- [62] KOPEČEK, Jindřich, YANG, Jiyuan. Hydrogels as smart biomaterials. *Polymer International*. 2007, **56** (9), 1078–1098. ISSN 09598103. doi:10.1002/pi.2253
- [63] KOKABI, Mehrdad, SIROUSAZAR, Mohammad, HASSAN, Zuhair Muhammad. PVA-clay nanocomposite hydrogels for wound dressing. *European Polymer Journal*. 2007, **43** (3), 773–781. ISSN 00143057. doi:10.1016/j.eurpolymj.2006.11.030
- [64] O'CONNOR, Naphtali A., JITIANU, Mihaela, NUNEZ, Greisly, PICARD, Quentin, WONG, Madeline, AKPATSU, David et al. Dextran hydrogels by crosslinking with amino acid diamines and their viscoelastic properties. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, **111**, 370–378. ISSN 18790003. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.01.042
- [65] SERRA, Laura, DOMÉNECH, Josep, PEPPAS, Nicholas A. Engineering design and molecular dynamics of mucoadhesive drug delivery systems as targeting agents. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.* 2009, **71** (3), 519–28. ISSN 1873-3441. doi:10.1016/j.ejpb.2008.09.022
- [66] BAJPAI, Anil Kumar, SHUKLA, Sandeep Kumar, BHANU, Smitha, KANKANE, Sanjana. Responsive polymers in controlled drug delivery. *Progress in Polymer Science*. 2008, **33** (11), 1088–1118. doi:10.1016/j.progpolymsci.2008.07.005.
- [67] WINTGENS, Véronique, LORTHIOIR, Cédric, DUBOT, Pierre, SÉBILLE, Bernard, AMIEL, Catherine. Cyclodextrin/dextran based hydrogels prepared by cross-linking with sodium trimetaphosphate. *Carbohydrate Polymers*. 2015, **132**, 80–88. doi:10.1016/j.carbpol.2015.06.038
- [68] DMITRIEV, Ivan, KURYNDIN, Ivan, BOBROVA, Natalya, SMIRNOV, Michael. Swelling behavior and network characterization of hydrogels from linear polyacrylamide crosslinked with glutaraldehyde. *Materials Today Communications* [online]. 2015, **4**, 93–100. doi:10.1016/j.mtcomm.2015.06.005
- [69] APPEL, Eric A., BARRIO, del Jesús, LOH, Xian Jun, SCHERMAN, Oren A. Supramolecular polymeric hydrogels. *Chemical Society Reviews*. 2012, **41** (18), 6195. ISSN 0306-0012. doi:10.1039/c2cs35264h
- [70] GARCÍA, Louis, AGUILAR, Rosa María, ROMÁN, San Julio. Biodegradable Hydrogels for Controlled Drug Releas. In: *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook*. New York (USA): Springer, 2010, 147–155. [cit. 14. 5. 2018]. doi:10.1007/978-1-4419-5919-5_8
- [71] ILIC-STOJANOVIC, Snezana, NIKOLIC, Ljubisa, NIKOLIC, Vesna, PETROVIC, Slobodan et al. Stimuli-sensitive hydrogels for pharmaceutical and medical applications. *Facta universitatis - series: Physics, Chemistry and Technology*. 2011, **9** (1), 37–56. ISSN 0354-4656. doi:10.2298/FUPCT1101037I
- [72] MAGNIN, Dephine, LEFEBVRE, Jacques, CHORNET, Esteban, DUMITRIU, Severian. Physicochemical and structural characterization of a polyionic matrix of interest in biotechnology, in the pharmaceutical and biomedical fields. *Carbohydrate Polymers*. 2004, **55** (4), 437–453. doi:https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2003.11.013

- [73] LIU, Li, TANG, Ximin, WANG, Yuanyuan, GUO, Shengrong. Smart gelation of chitosan solution in the presence of NaHCO₃ for injectable drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011, **414**, 6–15. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.04.052
- [74] CHEN, Fa Ming, LIU, Xiaohua. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Progress in Polymer Science*. 2016, **53**, 86–168. ISSN 00796700. doi:10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004
- [75] DUTTA, Ranjna C., DEY, Madhuri, DUTTA, Aroop K., BASU, Bikramjit. Competent processing techniques for scaffolds in tissue engineering. *Biotechnology Advances*. 2017, **35** (2), 240–250. ISSN 07349750. doi:10.1016/j.biotechadv.2017.01.001
- [76] DHANDAYUTHAPANI, Brahatheeswaran, YOSHIDA, Yasuhiko, MAEKAWA, Toru, KUMAR, Sakthi D. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review. *International Journal of Polymer Science*. 2011, **2011** (2). ISSN 16879430. doi:10.1155/2011/290602
- [77] KACZMAREK, B., SIONKOWSKA, A., STOJKOVSKA, J. Characterization of scaffolds based on chitosan and collagen with glycosaminoglycans and sodium alginate addition. *Polymer Testing*. 2018, **68**, 229–232, doi:10.1016/j.polymertesting.2018.04.021
- [78] WEI, G., MA, P. X. Polymeric biomaterials for tissue engineering. In: *Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers. Second Edition*. New York (USA): Springer, 2014, 35–66. [cit. 14. 5. 2018]. ISBN 9780857097163. doi:10.1533/9780857097163.1.35
- [79] RABIONET, Marc, GUERRA, Antonio Jesús, PUIG, Teresa, CIURANA, Joaquim. 3D-printed tubular scaffolds for vascular tissue engineering. *Procedia CIRP*. 2018, **68**, 352–357. ISSN 2212-8271. doi:10.1016/j.procir.2017.12.094
- [80] TANODEKAEW, Siriporn, CHANNASANON, Somruethai, KAEWKONG, Pakkanun, UPPANAN, Paweena. PLA-HA scaffolds: preparation and bioactivity. *Procedia Engineering*. 2013, **59** (59), 144–149. doi:10.1016/j.proeng.2013.05.104
- [81] STRATTON, Scott, SHELKE, Namdev B., HOSHINO, Kazunori, RUDRAIAH, Swetha, KUMBAR, Sangamesh G. Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering. *Bioactive Materials*. 2016, **1** (2), 93–108. ISSN 2452199X. doi:10.1016/j.bioactmat.2016.11.001
- [82] YU, Jonelle Z., KORKMAZ, Emrullah, BERG, Monica I., LEDUC, Philip R., OZDOGANLAR, Burak O. Biomimetic scaffolds with three-dimensional undulated microtopographies. *Biomaterials*. 2017, **128**, 109–120. ISSN 18785905. doi:10.1016/j.biomaterials.2017.02.014
- [83] CHEN, Kai, LIN, Xianfeng, ZHANG, Qi, NI, Jinhu, LI, Jianmin, XIAO, Jian, WANG, Yang, YE, Yiheng, CHEN, Li, JIN, Keke, CHEN, Lei. Acta Biomaterialia Decellularized periosteum as a potential biologic scaffold for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 2015, **19**, 46–55. ISSN 1742-7061. doi:10.1016/j.actbio.2015.02.020
- [84] MAITZ, M.F. Applications of synthetic polymers in clinical medicine. *Biosurface and Biotribology*. 2015, **1** (3), 161–176. ISSN 24054518. doi:10.1016/j.bsbt.2015.08.002

- [85] AVGOUSTAKIS, K, BELETSI, A., PANAGI, Z., KLEPETSANIS, P., KARYDAS, A. G., ITHAKISSIOS, D. S. PLGA–mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties. *Journal of Controlled Release*. 2002, **79**, 123–135.
- [86] TAVARES, Marina Rodrigues, MENEZES de, Livia Rodrigues et al. Surface-coated polycaprolactone nanoparticles with pharmaceutical application: Structural and molecular mobility evaluation by TD-NMR. *Polymer Testing*. 2017, **60**, 39–48. ISSN 01429418. doi:10.1016/j.polymertesting.2017.01.032
- [87] WALASH, M. I., RIZK M., SHERIBAH, Z. A., SALIM, M. M. Kinetic spectrophotometric determination of biotin in pharmaceutical preparations. *International Journal of Biomedical Science*. 2008, **4** (3), 238–244. ISSN 15509702.
- [88] University of North Texas. Process for synthetizing oil and surfactant-free hyaluronic acid nanoparticles and microparticles. Inv: HU, Zhibing, Xiaohu XIA a Liping TANG. US007601704 B2. 13. 10. 2009.
- [89] CUI, Yuan, LI, Yanhui, DUAN, Qian, KAKUCHI, Toyoji. Preparation of Hyaluronic Acid Micro-Hydrogel by Biotin–Avidin-Specific Bonding for Doxorubicin-Targeted Delivery. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2013, **169**, 239–249. doi:10.1007/s12010-012-9968-1

6. Seznam obrázků

Obrázek 1 Chemická struktura kyseliny hyaluronové. Převzato z [10].	12
Obrázek 2 Příprava kyseliny polymléčné. Převzato a upraveno z [23].	14
Obrázek 3 Příprava chitosanu. Převzato z [28].	16
Obrázek 4 Chemická struktura alginátu. Převzato z [10].	17
Obrázek 5 Chemická struktura dextranu. Převzato z [10].	18
Obrázek 6 Chemická struktura heparinu. Převzato z [10].	19
Obrázek 7 Chemická struktura chondroitin sulfátu. Převzato z [45].	20
Obrázek 8 Nanočástice využívané pro cílené doručení léčiv. Převzato a přeloženo z [48].	22
Obrázek 9 Příprava NPs pomocí metody odpařování rozpouštědla. Převzato a přeloženo z [2].	25
Obrázek 10 Uvolnění léčivé látky působením stimulu. Převzato a upraveno z [65].	27
Obrázek 11 Zesítnění polyakrylamidu pomocí glutaraldehydu. Převzato z [68].	28
Obrázek 12 SEM snímky příčného řezu hydrogelu připraveného z chitosanu v závislosti na koncentraci přidaného Na_2CO_3 . Převzato a upraveno z [73].	30
Obrázek 13 SEM snímky různých typů hydrogelů. Převzato a upraveno z [75].	33
Obrázek 14 Struktury vybraných kopolymerů. Převzato a upraveno z [88].	34
Obrázek 15 Mechanismus vzniku nanočástic. Převzato a přeloženo z [89].	40
Obrázek 16 Kyselina hyaluronová s imobilizovaným biotinem. Převzato z [90].	41

7. Seznam grafů

Graf 1 Distribuční záznam DLS vzorku nanočástic kyseliny hyaluronové.	40
Graf 2 Kalibrační graf pro spektrofotometrickou kvantifikaci biotinu.	42
Graf 3 Distribuční záznam DLS vzorku čistých nanočástic a po vazbě biotinu (1 mg biotinu/2 mg NPs).	43
Graf 4 Záznam NPs s navázaným biotinem vyjadřující jeho schopnost se odštěpit a přejít do roztoku.	44
Graf 5 Distribuční záznam DLS nanočástic (1 mg biotinu/2 mg NPs) po imobilizaci biotinu a po 6 týdnech skladování.	45
Graf 6 Distribuční záznam DLS nanočástic po 30 min inkubaci s 10M NaOH při 37 °C.	46
Graf 7 Distribuční záznam DLS nanočástic po 30 min inkubaci s 10M HCl při 37 °C.	46