

Nalezení vhodné a originální modifikace kyseliny hyaluronové pro nosičové systémy

Ing. Alena Matelová, Ph.D.

Teze disertační práce

Teze disertační práce

**Nalezení vhodné a originální modifikace kyseliny
hyaluronové pro nosičové systémy**

**Development of a suitable and original modification of hyaluronic
acid for drug delivery systems**

Autor:	Ing. Alena Matelová, Ph.D.
Studijní program:	Chemie a technologie materiálů P2808
Studijní obor:	Chemie a technologie materiálů P2808V009
Školitel:	doc. Mgr. Robert Vícha, Ph.D.
Konzultant:	Gloria Huerta-Angeles, Ph.D.
Oponenti:	prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc. doc. Ing. Věra Kašpárková, CSc.

Zlín, září 2018

© Ing. Alena Matelová, Ph.D.

Vydala **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně** v edici **Doctoral Thesis Summary**.
Publikace byla vydána v roce 2018

Klíčová slova: Kyselina hyaluronová, nosiče léčiv, polymerní micely, estery kyseliny hyaluronové.

Key words: Hyaluronic acid, drug delivery systems, polymeric micelles, hyaluronic acid esters.

Plná verze disertační práce je dostupná v Knihovně UTB ve Zlíně.

ISBN 978-80-7454-787-4

Abstrakt

V rámci této disertační práce byla připravena série derivátů hyaluronanu (HA) modifikovaného různými karboxylovými kyselinami nesoucími ve struktuře aromatické jádro. V postranních řetězcích vázaných na HA se pak benzenové jádro nacházelo v různých vzdálenostech od páteře polymeru nebo toto benzenové jádro bylo nahrazeno stericky náročnějšími strukturami. Cílem této práce bylo zjistit, zda vůbec, jakým způsobem a do jaké míry ovlivňují použité aromatické karboxylové kyseliny vlastnosti nových derivátů HA a zejména micel z nich připravených.

Do micel těchto derivátů byly inkorporovány aromatické modelové látky a byla porovnána vazebná kapacita micel připravených z aromatických derivátů HA s vazebnou kapacitou micel připravených z alifatických derivátů HA. Prokázalo se, že micely aromatických derivátů HA jsou schopny lépe inkorporovat aromatické modelové látky a než micely derivátů aromát neobsahující.

Abstract

Presented doctoral thesis was focused on the preparation of the set of hyaluronan (HA) derivatives modified with different carboxylic acids containing aromatic ring in their structures. The benzene rings in these side-chains attached to HA were located in varying distance from polymeric backbone or the benzene ring was changed for sterically more hindering structures. The aim of the thesis was to find out if and how the aromatic carboxylic acids influence the properties of derivatives and mainly micelles made thereof. Micelles were loaded with aromatic model substances and aromatic micelles drug loading was compared with aliphatic micelles drug loading. It was found, that aromatic micelles loaded higher amount of model compounds than aliphatic micelles.

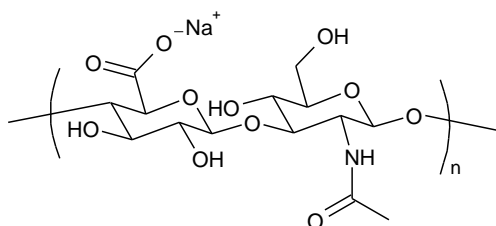
Obsah

1. Současný stav řešené problematiky	5
1.1 Kyselina hyaluronová.....	5
1.2 Polymerní micely	6
1.3 Nosiče na bázi amfifilního HA s aromatickými postranními řetězci	6
2. Cíle disertační práce	8
3. Výsledky a diskuze	9
3.1 Příprava esteru HA s aromatickými modifikačními činidly	9
3.1.1 Výběr a zdůvodnění struktury modifikačních činidel	9
3.2 Modifikace HA ω -fenylmastnými kyselinami	11
3.3 Stanovení stability micel s FRET barvivy	13
3.4 Stanovení kritické asociační koncentrace.....	14
3.5 Dynamická viskozita	14
3.6 Studium inkorporace modelových látek do micel.....	16
3.7 Cytotoxicita derivátů	18
3.8 Hemolytická aktivita derivátu HA-11C.....	21
4. ZÁVĚR – přínos pro vědu a praxi	22
Seznam obrázků.....	24
Seznam tabulek	24
Seznam schémat.....	24
CURRICULUM VITAE	25

1. Současný stav řešení problematiky

1.1 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová (Obrázek 1) je lineární polysacharid přirozeně se vyskytující v tělech vyšších organismů i u některých kmenů bakterií. Tato látka se také často označuje jako „hyaluronát“ nebo „hyaluronan“, protože *in vivo* se vyskytuje jako polyaniont (každá glukuronátová jednotka HA nese na karboxylové skupině záporný náboj, který je vyvážen kationty, například Na^+) a nikoliv ve své protonované formě.^{1,2} Označení „kyselina hyaluronová“ se však hojně používá ve farmaceutickém prostředí, a často se používají všechny názvy k označení téže látky.³ Nebude-li uvedeno jinak, budu v této práci zkratku HA používat pro sodnou sůl, nikoliv kyselou formu této látky.



Obrázek 1: Kyselina hyaluronová/hyaluronan.

Molekulární struktura HA je tvořena opakujícími se disacharidovými jednotkami D-glukuronové kyseliny a N-acetylglukosaminu. D-glukuronová kyselina je k N-acetylglukosaminu připojena $\beta(1\rightarrow3)$ glykosidovou vazbou, zatímco opakující se disacharidové jednotky jsou spojeny $\beta(1\rightarrow4)$ vazbami.^{4,5,6}

Díky své přirozené biokompatibilitě, fyzikálně–chemickým a biologickým vlastnostem je HA jedním z nejslibnějších polymerů využitelných ve farmacii pro nosičové systémy.^{7,8,9} Mimo to je HA také častým výchozím materiálem pro nové biokompatibilní a biodegradabilní deriváty, které nalézají využití v tkáňovém inženýrství, hojení ran aj.^{9,10}

Přírodní HA je mnohdy výhodné, zejména pro aplikace v oblasti medicíny či kosmetiky, modifikovat. Modifikací se získává nejčastěji amfifilní forma HA se zpomaleným *in vivo* odbouráváním nebo se připravují deriváty s požadovanými vlastnostmi (odlišná viskozita roztoků apod.).

Za účelem získání optimálních derivátů pro aplikace, bylo vypracováno mnoho postupů pro chemické modifikace obou typů funkčních skupin dostupných na řetězci přírodního HA, tedy karboxylových a hydroxylových skupin.^{11,12} Nicméně, karboxylová skupina je rozpoznávacím místem pro HA receptory a hyaluronidázy, tudíž chemická modifikace těchto skupin může zásadním způsobem změnit biologické chování v organismu.¹³ Také bylo zjištěno, že HA ztrácí schopnost cílení na CD44 receptory, je-li modifikována alespoň jedna čtvrtina karboxylových skupin¹⁴ a snižuje se rozpustnost ve vodném prostředí. Z tohoto úhlu pohledu se jako vhodnější alternativa jeví modifikace hydroxylových skupin HA.¹³

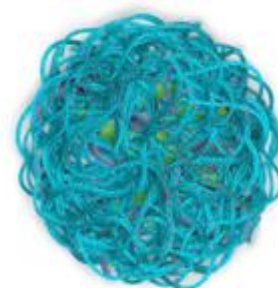
1.2 Polymerní micely

Neúčinnější léčiva často mívají velmi silné vedlejší nežádoucí účinky. Navíc se mohou připojit i další problémy související se způsobem podání léčiva, jako jsou obtížná rozpustnost ve vodném prostředí a biologická dostupnost, krátká doba cirkulace v krevním řečišti, nevyhovující biodistribuce do cílového orgánu, kontakt léčiva s inaktivujícími látkami, jako například enzymy přítomnými v biologických tekutinách atd.^{9,15,16,17} Naproti tomu, vazba léčiva na vhodně zvolený nosič může vést k potlačení nežádoucích fyzikálně–chemických vlastností, k prodloužení doby cirkulace v krevním řečišti a může rovněž umožnit cílenou dopravu léčiva do určité (například nádorové) tkáně (buňky či buněčného kompartmentu) a jeho řízené uvolňování na požadovaném místě působení.

Aplikace většiny léčiv je však omezená zejména kvůli jejich špatné rozpustnosti ve vodném prostředí.^{9,18} Odhaduje se, že ve vodném prostředí je špatně rozpustných až 70 % nových léčiv. Pro zvýšení rozpustnosti léčiva ve vodném prostředí bylo vyzkoušeno mnoho postupů, ale jako nejslibnější cesta se jeví využití polymerních micel.^{9,19,20}

Polymerní micely (Obrázek 2) jsou vytvářeny hydrofobní asociací tzv. amfifilních molekul, tj. molekul, které mají určitou část výrazně hydrofobní a část molekuly je výrazně hydrofilní.^{20,21,22}

Polymerní micela ve vodném prostředí pak má hydrofobní jádro a hydrofilní obal, a jsou obvykle využívány jako nosiče hydrofobních léčiv.^{16,23,24,25} Tvorba micel nastává od okamžiku, kdy koncentrace amfifilního polymeru vzroste nad určitou koncentraci označovanou jako kritická agregační koncentrace (CAC). Při této koncentraci začnou hydrofobní segmenty asociovat, aby minimalizovaly kontakt s molekulami vody, a hydrofilní řetězce se rozprostírají do vodného prostředí.^{26,27} Lipofilní léčiva pak mohou být zachycena v hydrofobním středu vzniklé micely.



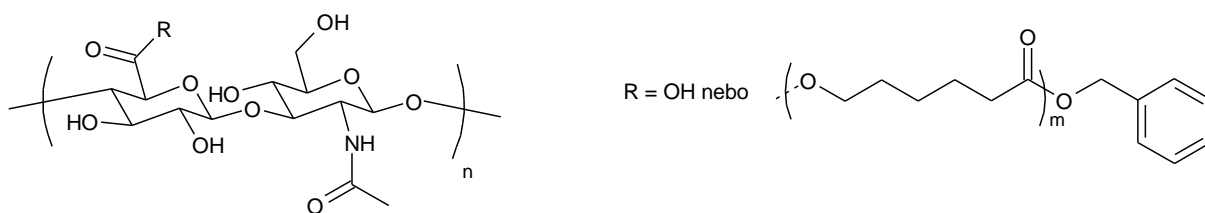
Obrázek 2: Polymerní micela.

1.3 Nosiče na bázi amfifilního HA s aromatickými postranními řetězci

Dosavadní výzkumy se zaměřovaly zejména na přípravu amfifilních derivátů s alifatickými hydrofobními skupinami.^{7,28,29} Lze však předpokládat, že léčiva aromatického charakteru, kterých je zejména mezi kancerostatickými léčivy většina,²⁹ mohou být lépe inkorporována do micel aromatických derivátů pomocí $\pi \cdots \pi$ interakcí.

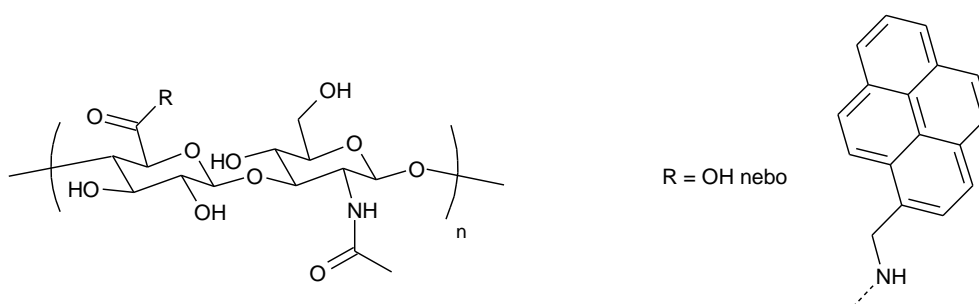
Jeden z těchto nosičů³⁰ (Obrázek 3), amfifilní roubovaný polymer kyseliny hyaluronové (kyselá forma), byl připraven z HA a polykaprolaktonu esterifikovaného benzylalkoholem (PCL), který byl získán polymerací benzylalkoholu a ϵ -kaprolaktonu. Tato syntéza však vykazuje mnoho nevýhod. Využívá například kyselou formu hyaluronanu a vysokou teplotu (80 °C po dobu 4 h), což vede k rozkladu polysacharidového řetězce. Další nevýhodou je nemožnost přesně definovat délku alifatického řetězce kvůli polymerizaci. Při syntéze PCL se navíc používá vysoce toxický katalyzátor 2-ethylhexanoát cínatý nedoporučený pro biomedicínské aplikace, což představuje zásadní problém kvůli registrační dokumentaci.

Velikou nevýhodou takto připravených polymerních micel je také relativně vysoká hodnota CAC ($0,05 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$).



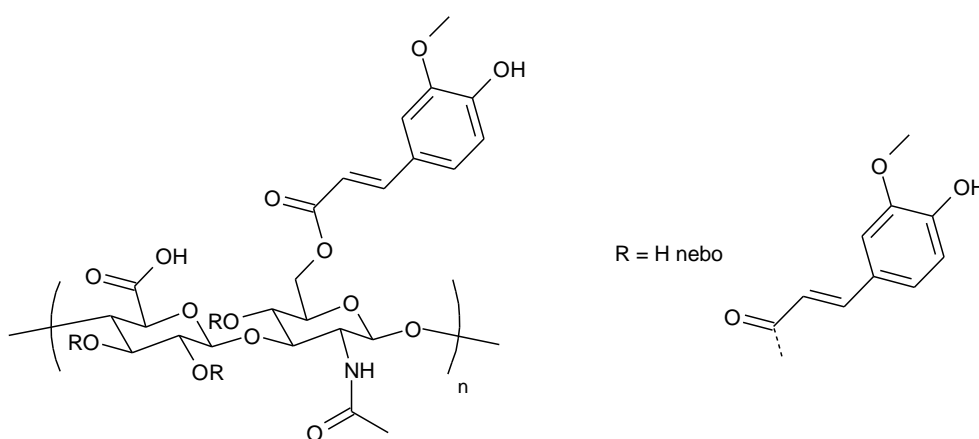
Obrázek 3: HA modifikovaný PCL.

Jiným aromatickým nosičem je kyselina hyaluronová (kyselé forma) substituovaná pyrenem³¹ (Obrázek 4). 1-Pyrenmethylamin je ale navázán na karboxylové skupiny HA a blokuje tak tyto terapeuticky významné karboxylové skupiny polymeru. Navíc bylo prokázáno, že deriváty pyrenu po dermální i podkožní expozici způsobují nádory u myši.³²



Obrázek 4: Hyaluronan substituovaný 1-pyrenmethylaminem.

Existují i deriváty³³, kde byl HA modifikován aromatickými substituenty na hydroxylových skupinách (Obrázek 5). Modifikace však bohužel probíhala za bezvodých podmínek a tudíž bylo nezbytné použít kyselou formu HA. Reakce byla prováděna ve formamidu, což je podezřelý karcinogen a potvrzený teratogen. U derivátů se stupněm substituce vyšším než 12 % je další nevýhodou velmi nízká rozpustnost v 0,2M NaCl.



Obrázek 5: Hyaluronan modifikovaný derivátem kyseliny skořicové.

2. Cíle disertační práce

- Provést literární rešerši a na základě získaných informací navrhnout vhodná modifikační činidla obsahující aromatické kruhy, případně jejich přípravu a způsob modifikace HA s ohledem na zamýšlené aplikace v oblasti nosičů léčiv,
- připravit navržená modifikační činidla a provést jejich úplnou charakterizaci,
- modifikovat HA připravenými činidly a charakterizovat produkty dostupnými spektroskopickými metodami,
- využít modifikovaný HA pro přípravu polymerních micel s vybranými biologicky aktivními látkami a charakterizovat je,
- shrnout výsledky do publikací v odborných periodících a prezentovat je na vědeckých konferencích.

3. Výsledky a diskuze

3.1 Příprava esteru HA s aromatickými modifikačními činidly

Vybraná modifikační činidla byla na HA navázána kovalentně pomocí esterové vazby. V tomto případě hydroxylové skupiny pocházejí z HA a karboxylové skupiny při této reakci pochází z aromatických kyselin používaných k modifikaci. Hydroxylové skupiny HA byly vybrány proto, že při jejich modifikaci může být HA používán v přírodní podobě. Modifikační činidlo tak neblokuje terapeuticky významné karboxylové skupiny, a tím zároveň zachovává rozpustnost HA ve vodném prostředí.

Příprava esterů HA zahrnuje dva kroky. Prvním z nich je aktivační reakce uvažované karboxylové kyseliny (Schéma 1A). V tomto kroku je připravena reaktivní forma aromatické karboxylové kyseliny, tedy směsný anhydrid uvažované kyseliny a aktivátoru, jimž je zde chlorid kyseliny benzoové. Tento krok probíhá reakcí aromatické karboxylové kyseliny a aktivátoru ve vhodném, s vodou mísitelném organickém rozpouštědle, s přidávkem báze. Vzniklý směsný anhydrid se zpravidla neizoluje, ale je ihned v druhém kroku použit k reakci s HA ve směsi vody a organického rozpouštědla (stejného jako v aktivačním kroku), báze a katalyzátoru (Schéma 1B). V tomto roztoku pak dochází k vytváření esterové vazby mezi karboxylovou skupinou modifikačního činidla a hydroxylovou skupinou HA.

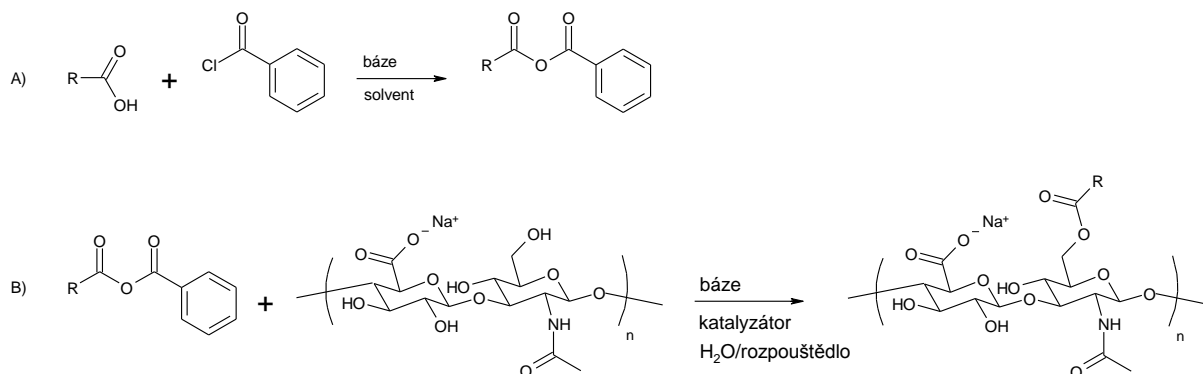
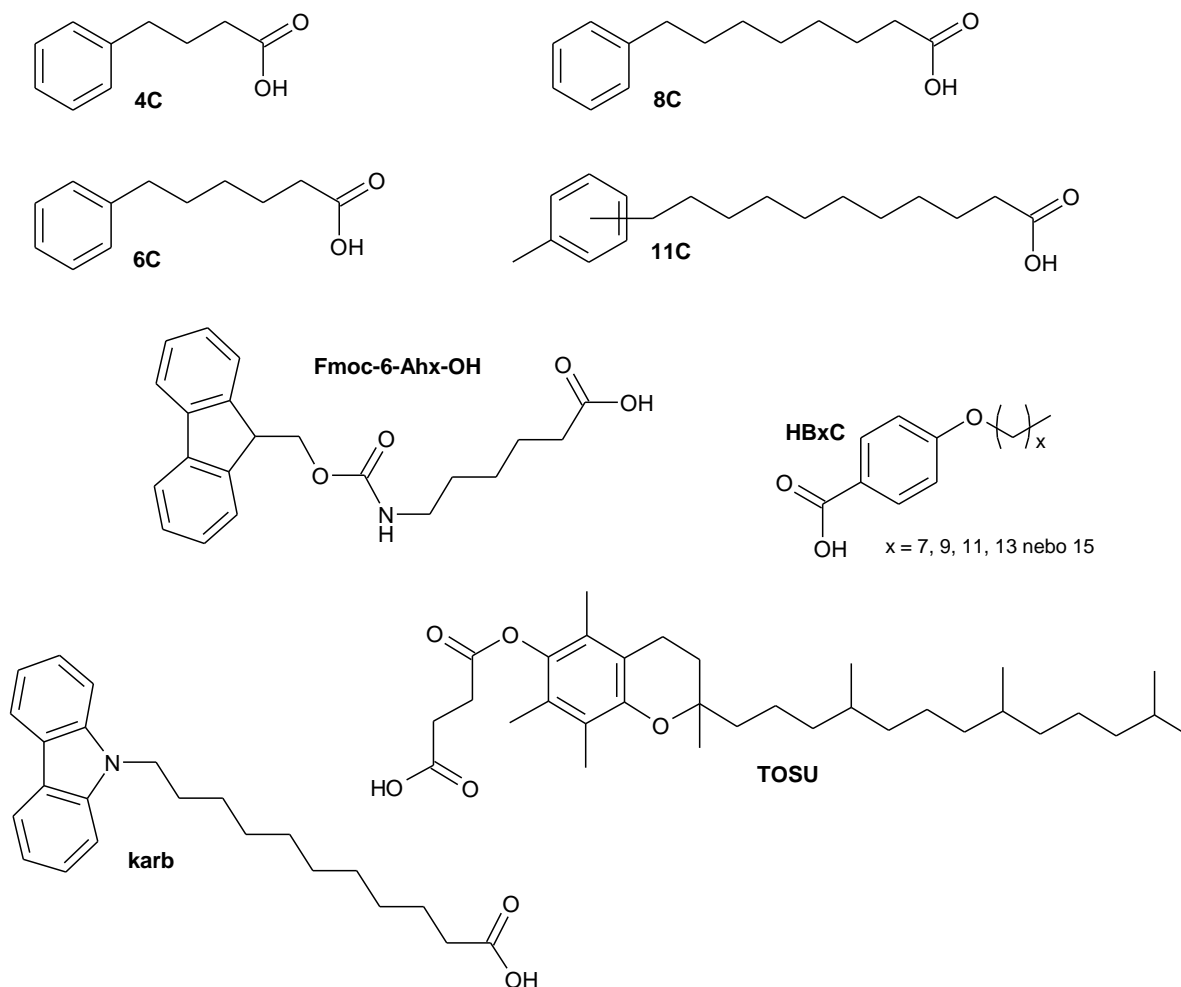


Schéma 1: Aktivační krok (A) a samotná modifikace hyaluronanu (B).

3.1.1 Výběr a zdůvodnění struktury modifikačních činidel

Jako vhodné lipofilní substituenty byly vybrány organické karboxylové kyseliny obsahující ve své molekule aromatické jádro (Obrázek 6). Jako první byla vybrána 4-fenylmásečná kyselina (**4C**) kvůli dobré dostupnosti, manipulovatelnosti a ceně. Na základě sledování parametrů micel připravených z derivátů HA a 4-fenylmásečné kyseliny byly dále vybrány 6-fenylhexanová (**6C**), 8-fenyl-oktanová (**8C**) a 11-tolylundekanová kyselina (**11C**) (obecně ω -fenylmastné kyseliny) s cílem porovnat vlastnosti micel připravených z derivátů HA a těchto kyselin. Jako další sada aromatických kyselin byla použita série 4-alkoxybenzoových kyselin (**HBxC**). Za zástupce stericky náročnějších kyselin byly vybrány Fmoc-6-Ahx-OH, 11-(9H-karbazol-9-yl)undekanová kyselina (**karb**) a DL- α -tokoferyl-sukcinát (**TOSU**). Všechny tyto vybrané kyseliny obsahují aromatický kruh a lze u nich tedy předpokládat možnost tvorby $\pi \cdots \pi$ interakcí mezi těmito acylovými zbytky tvořícími jádro polymerní

micely a inkorporovanou aromatickou modelovou látkou. Tyto interakce by mohly vést ke zlepšení vlastností micel s inkorporovaným aromatickým léčivem.



Obrázek 6: Aromatické mastné kyseliny použité k modifikaci HA.

Zatímco kyseliny 4-fenylmásečná, 6-fenylhexanová a 8-fenyl-oktanová a DL- α -tokoferyl-sukcinát jsou látky komerčně dostupné, 11-tolylundekanová kyselina byla připravena tříkrokovou syntézou vycházející z 11-bromundekanové kyseliny. 11-Bromundekanová kyselina byla pomocí Fisherovy esterifikace převedena na methyl ester, který poté posloužil jako alkylační činidlo při Friedelově-Craftsově alkylyci toluenu. Chránící methylová skupina byla odstraněna v posledním kroku.

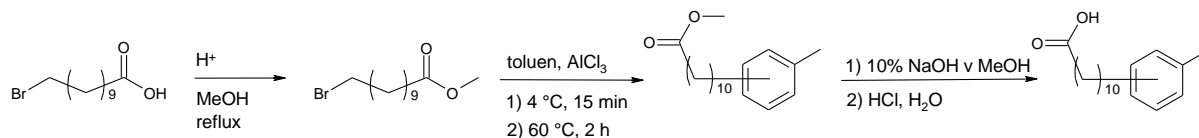


Schéma 2: Sled reakčních kroků vedoucích k přípravě aromatické karboxylové kyseliny odvozené od toluenu.

Po úspěšné přípravě derivátů HA s ω -fenylmastnými kyselinami, vyvstala otázka, zda záměna benzenového kruhu za stericky náročnější a na π -elektrony bohatší systém ovlivní (a popřípadě do jaké míry) vlastnosti micel z tohoto derivátu připravených.

Jako skelet vhodný z hlediska ceny, dostupnosti a náročnosti navázání na methyl-11-bromundekanoát byl vybrán karbazol, což je heterocyklus tvořený třemi kondenzovanými kruhy a obsahující dusíkový atom. Kyselina 11-(9*H*-karbazol-9-yl)undekanoová byla z karbazolu připravena tříkrokovou syntézou. V prvním kroku byl připraven methyl-11-bromundekanoát a ten byl použit pro alkylation karbazolu v bazickém prostředí a následně byla odstraněna ochranná skupina z karboxylové skupiny.

Další skupinou modifikačních činidel byla série 4-alkoxybenzoových kyselin. Jako výchozí látka byl použit methyl-4-hydroxybenzoát. Substituce vodíkového atomu hydroxylové skupiny úspěšně proběhla za bezvodých bazických podmínek (DMF a K₂CO₃) pod inertní atmosférou, a to pomocí *n*-alkylbromidů s délkou řetězce C8, C10, C12, C14 a C16. Hydrolyza esteru proběhla během zahřívání methylesteru v bazickém prostředí.

3.2 Modifikace HA ω -fenylmastnými kyselinami

Optimalizace reakcí vedoucích k tvorbě esterů HA a aromatických mastných kyselin byla provedena s 4-fenylmáseľnou kyselinou. Optimalizovaný postup byl aplikován na všechny další kyseliny této řady.

Z Tabulky 1 je patrné, že s výjimkou HA-4C derivátů DS klesá s rostoucí délkou řetězce modifikačního činidla (například řádky **7**, **10** a **13** nebo **6**, **9** a **12**). Důvodem může být snižující se reaktivita výchozích kyselin. Deriváty HA-4C se tomuto pravidlu vymykají. Důvodem může být jiné skupenství 4-fenylmáseľné (pevné) než u zbývajících ω -FAK (oleje), které může zapříčinit horší rozpustnost této kyseliny v rozpouštědle při vzniku směšného anhydridu.

Pokud byl molární poměr 11-tolylundekanoová kyselina:HA roven 1,5:1, nebylo možné zjistit DS výsledného produktu. V tomto případě totiž nebylo možné získaný modifikovaný HA rozpustit na roztok, protože vždy vznikal gel, který nebylo možné převést do NMR kyvety. Snižování molárního poměru na 0,7:1 poskytlo dobře rozpustný derivát. Získané hodnoty DS derivátů HA-11C jsou ve srovnání s hodnotami získanými v případě použití jiných ω -FAK nízké. Je však známo, že chemická reaktivita dlouhých mastných kyselin klesá s délkou řetězce³⁴, a proto tyto hodnoty DS nejsou natolik překvapivé.

I pro přípravu esteru HA a 11-(9*H*-karbazol-9-yl)undekanoové kyseliny byly nejprve vyzkoušeny podmínky použité pro přípravu esteru HA a 4-fenylmáseľné kyseliny. V tomto případě ale docházelo ke vzniku produktů s nízkým DS (přibližně 3 %). Z tohoto důvodu byly podmínky reakce upravovány (délka reakční doby obou kroků, teplota reakčních směší, objem rozpouštědel). Žádná změna reakčních podmínek však nevedla k přípravě derivátu s výrazně vyšším DS. Nejvyšší dosažená hodnota stupně substituce byla 6 %. Kromě nízké reaktivity kyselin s dlouhým řetězcem³⁴ mohla být důvodem získání derivátů s nízkým DS velká sterická náročnost karbazolové skupiny, která, je-li navázána na HA, brání přístupu dalších molekul modifikačního činidla k polymernímu řetězci. Jiným vysvětlením může být silná agregace modifikovaného HA, a tím zabránění přístupu dalších molekul modifikačního činidla.

Tabulka 1: Výsledky modifikace HA různými ω -FAK.

	Derivát	ω -FAK: HA	DS [%]	Efektivita rce [%]	Výtěžek [%]
1		0,5 : 1	13	26,8	96
2		0,7 : 1	17	24,3	86
3	HA-4C	1 : 1	25	24,8	76
4		2 : 1	43	21,6	85
5		0,2 : 1	5	23,0	89
6		0,5 : 1	15	30,6	79
7	HA-6C	0,7 : 1	20	29,0	86
8		2 : 1	47	23,4	89
9		0,5 : 1	12	24,6	95
10	HA-8C	0,7 : 1	18	25,1	72
11		2 : 1	33	16,2	86
12	HA-11C	0,5 : 1	6	12,0	68
13		0,7 : 1	15	17,7	79

Dalšími látkami použitými k modifikaci HA byla série 4-alkoxybenzoových kyselin. Pro modifikaci HA substituovanou kyselinou benzoovou byl použit stejný postup jako v případě modifikace HA ω -fenylmastnými kyselinami. Srovnáním výsledků modifikace HA ω -fenylmastnými kyselinami (HA- ω -FAK) a 4-alkoxybenzoovými kyselinami (HA-HBxC) (za stejných podmínek), bylo DS derivátů HA-HBxC nižší. To mohlo být způsobeno nízkou rozpustností 4-alkoxybenzoových kyselin, ale i sterickými důvody. 4-Alkoxybenzoové kyseliny z podstaty své struktury modifikují HA tak, že benzenové jádro je velmi blízko páteři polymeru.

Tabulka 2: Výsledky modifikačních reakcí s využitím 4-oktyloxybenzoových kyselin.

	Použitá kyselina	Použitá kyselina:HA [n:n]	DS [%]	Výtěžek [%]
1	HB8C	2:1	11	93
2*	HB8C	1:1	6	87
3*	HB10C	2:1	11	78
4*	HB12C	2:1	10	75
5	HB14C	2:1	--	--
6*	HB16C	2:1	--	--

*reakce byla provedena pouze jednou.

DL- α -Tokoferyl-sukcinát (TOSU) byl na HA navázán využitím stejného postupu jako v případě ω -fenylmastných kyselin. Výchozí molární poměr disacharidu HA a TOSU byl zvolen 1:0,7 podle optimálního poměru disacharidu HA a 11-tolylundekanové kyseliny.

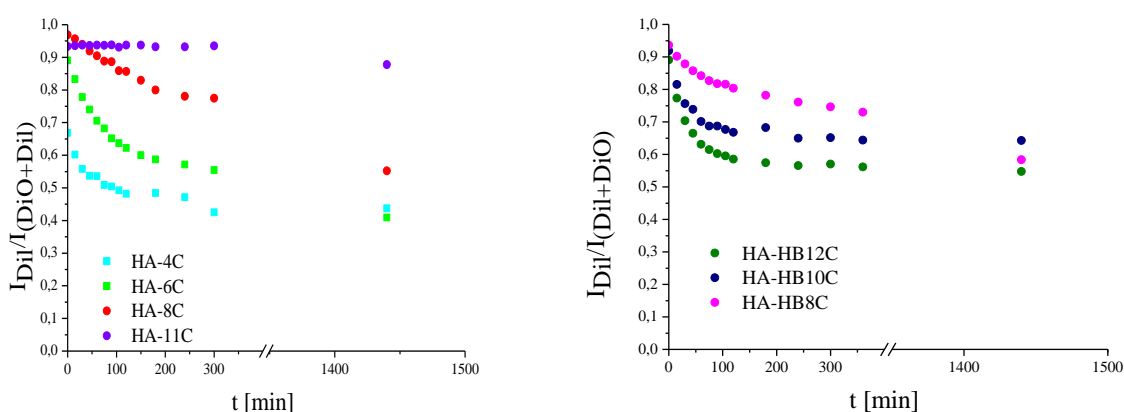
DL- α -Tokoferyl-sukcinát je stericky dosti náročné modifikační činidlo a poskytlo pouze deriváty s nízkým DS (1,1 %).

Připravené deriváty byly charakterizovány (^1H NMR, IČ) a použity pro přípravu micel s resveratolem. Není-li uvedeno jinak, byly všechny modifikační reakce provedeny třikrát a výsledný DS byl získán jako průměr tří hodnot.

3.3 Stanovení stability micel s FRET barvivy

Jednou z důležitých vlastností nosičů léčiv je jejich stabilita ve fyziologickém prostředí. Po intravenózním podání na micely působí okolní prostředí (pH, soli), dostávají se do kontaktu s různými buňkami a zejména proteiny a nastává výrazné ředění.^{35,36} Jako největší zdroj problémů se v živém prostředí jeví přítomnost krevních proteinů (albumin, α -, β - a γ -globuliny), které se mohou adsorbovat na povrch micel.^{35,37} Adsorpce sérových proteinů může indukovat předčasné uvolnění léčiva z micely díky štěpícímu efektu, který může nastat dříve, než micely dosáhnou cílových míst. Příliš rychlé a nekontrolované uvolňování léčiv z nosičů omezuje jejich aplikace.

Na Obrázku 7 vlevo je zachycen trend závislosti stability micel na délce alifatického řetězce použitého modifikačního činidla pro deriváty HA-4C, HA-6C, HA-8C a HA-11C. Z poměru $I_{\text{Dil}}/(I_{\text{Dil}}+I_{\text{DiO}})$ lze pozorovat, že stabilita micel s délkou řetězce stoupala. Pomaleji se rozpadající micely si zachovávaly tento poměr v čase vyšší. Prodlužování délky řetězce pravděpodobně umožňuje lepší uspořádání jádra micely (benzenových jader modifikačního činidla) a vytvoření stabilnější micely. Micely derivátu HA-11C se jeví jako téměř optimálně stabilní a během sledování docházelo k rozpadu jen zanedbatelného množství micel.



Obrázek 7: Srovnání stability micel derivátů HA-4C, HA-6C, HA-8C a HA-11C, $M_w=15$ kDa, $c=1,5$ $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ (vlevo); srovnání stability micel derivátů HA-HB8C, HA-10C a HA-12C, $M_w=6$ kDa, $c=1,5$ $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ (vpravo).

Další série testovaných micel byly micely připravené z derivátů HA a 4-alkoxybenzoových kyselin. Na Obrázku 7 vpravo je zachycena závislost poměru intenzit jednotlivých FRET

barviv na čase. Všechny testované micely (HA–HB12C, HA–HB10C, HA–HB8C) se však v přítomnosti albuminu jeví jako nestabilní.

Stabilita micel zbývajících dvou typů derivátů (HA–TOSU a HA–karb) nebyla provedena, protože se tyto deriváty ukázaly jako cytotoxické (kap. 3.7) a tedy byly z dalších testování vyloučeny.

3.4 Stanovení kritické asociační koncentrace

Kritická asociační koncentrace (CAC) je významný ukazatel kvality polymerních micel popisující hraniční koncentraci, při které dochází k samoshlukování (či naopak rozpadu micel).³⁸ Hodnota CAC amfifilních derivátů HA byla stanovena fluorescenčně s využitím Nilské červeně jako fluorescenční sondy.³⁹

Tabulka 3: Hodnoty CAC jednotlivých derivátů.

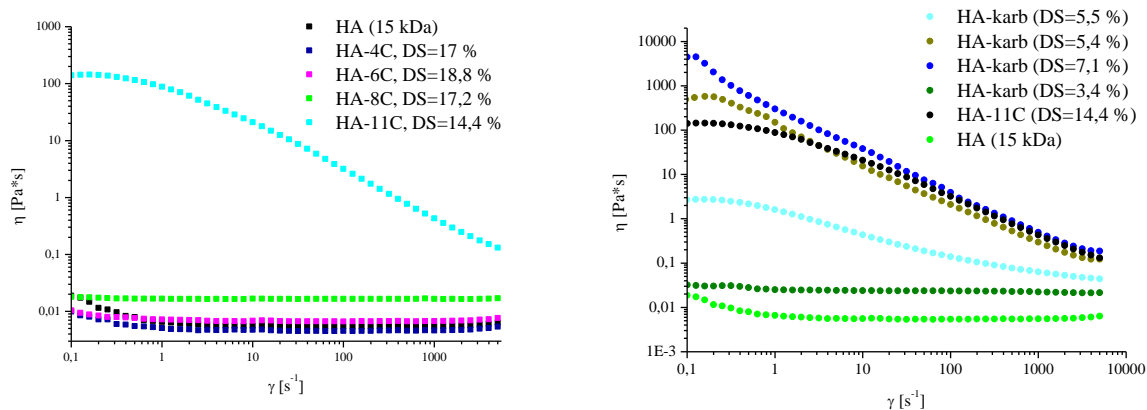
Derivát	DS [%]	CAC[mg·cm ⁻³]
HA–4C	14	0,004
HA–6C	15	0,003
HA–8C	18	0,003
HA–11C	13	0,003
HA–karb	7	0,001–0,002
HA–TOSU	1	0,001

Na základě těchto výsledků lze konstatovat, že hodnota CAC není výrazněji ovlivněna strukturami použitých substituentů.

3.5 Dynamická viskozita

Dynamická viskozita je mírou vnitřního odporu způsobeného vnitřním mezimolekulovým třením, který musí kapalina překonat, aby došlo k jejímu toku. Čím větší mezimolekulové síly jsou, tím vyšší je dynamická viskozita roztoku. Viskozita roztoku pravděpodobně souvisí s rychlostí uvolňování léčiva z nosičových systémů. Zvyšující se viskozita roztoku nosičového systému pravděpodobně způsobuje pomalejší uvolňování léčiva ze systému^{40,41} a právě pomalé uvolňování léčiva je velmi důležitý parametr, který by měly nosičové systémy splňovat.

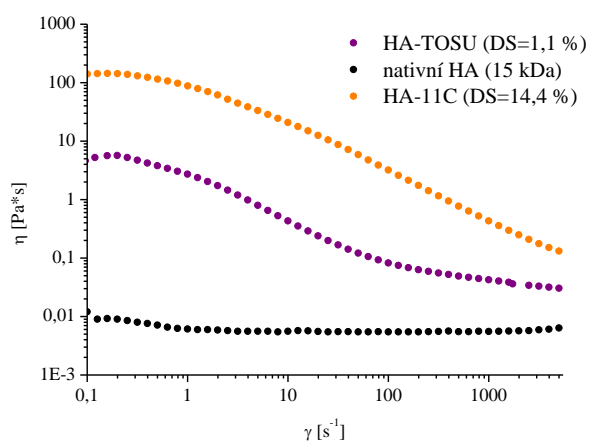
Na Obrázku 8 vlevo je znázorněna závislost dynamické viskozity (osa y) na smykové rychlosti (osa x) pro roztoky derivátů HA– ω -FAK s DS okolo 17 %. Z grafu je vidět, že viskozita roztoků derivátů stoupá s délkou řetězce modifikačního činidla. Nejvyšší viskozita byla pozorována u roztoku derivátu HA–11C.



Obrázek 8: Dynamická viskozita derivátů HA (HA- ω -FAK a HA-karb).

Dynamická viskozita byla sledována také u derivátů HA-karb. Na Obrázku 8 vpravo jsou znázorněny tokové křivky derivátů HA-karb s různými DS, které jsou srovnány s tokovou křivkou derivátu HA-11C. Lze zde pozorovat velké rozdíly hodnot dynamické viskozity derivátů s téměř shodným DS. Nevyzpytatelné chování tohoto derivátu může být způsobeno například nedokonalým „skládáním“ hydrofobních substituentů uvnitř micely. Karbazolový heterocyklus je stericky náročný a uspořádání hydrofobních řetězců může tedy být náročnější. Při tvorbě micely (měření viskozity probíhá při koncentraci nad hodnotou CAC) dochází k náhodnému sbalování polymerního řetězce a může tak dojít k takovému uspořádání jádra, které není energeticky příliš výhodné.

Jako poslední srovnávaný derivát byl proměřen derivát HA-TOSU a výsledky byly porovnány s HA-11C (Obrázek 9). Dynamická viskozita derivátu HA-TOSU je nižší než viskozita derivátu HA-11C. Podle trendu, který byl pozorován pro roztoky derivátů HA- ω -FAK by tento výsledek měl poukazovat na možnou nižší vazebnou kapacitu než je vazebná kapacita micel derivátu HA-11C. Toto očekávání se však nepotvrdilo, jak naznačují výsledky stanovení vazebné kapacity těchto micel (kap. 3.6).



Obrázek 9: Tokové křivky derivátů HA-TOSU, HA-11C a přírodního HA.

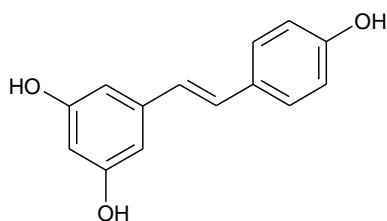
Vzhledem k porovnání výsledků vazebných kapacit micel derivátů HA-11C a HA-TOSU a viskozit těchto derivátů lze usoudit, že tuto metodu (měření dynamické viskozity) nelze spolehlivě použít pro predikci vazebné kapacity micel.

3.6 Studium inkorporace modelových látek do micel

Hlavním cílem této práce bylo ověřit hypotézu, že aromatické biologicky aktivní látky (například léčiva) budou v micelách na bázi aromaticky substituovaného HA pevněji inkorporovány než v micelách na bázi alifaticky substituovaného HA. Vazebná kapacita micel připravených z aromaticky modifikovaných HA byla proto porovnána s vazebnou kapacitou micel získaných z amfifilních derivátů HA modifikovaného nearomatickými modifikačními činidly.

Jako modelová látka byl vybrán resveratrol. Pro testování micel s touto modelovou látkou byly z řady derivátů HA- ω -FAK vybrány pouze micely derivátu HA-11C, kvůli stabilitě v přítomnosti krevního proteinu albuminu. Dále byl resveratrol inkorporován do micel derivátů HA-karb a HA-TOSU. Pro srovnání vazebné kapacity micel aromatických derivátů a nearomatických derivátů byl resveratrol inkorporován i do micel derivátu HA-C18:1 (HA modifikovaný kyselinou olejovou).

Resveratrol (Obrázek 10) je neflavonoidní polyfenol přirozeně se vyskytující v mnoha rostlinách.^{42,43}



Obrázek 10: Struktura resveratrolu.

Resveratrol vykazuje mnohé blahodárné účinky a využívá se pro různé, zejména topické, aplikace za různých fyziologických a patologických podmínek.⁴² Jako nejranější objev prospěšnosti resveratrolu pro lidský organismus je považován kardioprotektivní účinek,⁴³ související s antioxidačními schopnostmi resveratrolu. V klinické praxi je resveratrol používán například k ošetření pokožky postižené psoriázou.⁴²

Zjištěné hodnoty vazebných kapacit micel obou derivátů HA-11C a HA-C18:1 s resveratrolelem jsou shrnuty v Tabulce 4. Vazebná kapacita micel připravených za použití methanolu jako rozpouštědla byla velmi dobrá, ale kvůli toxicitě nebude vhodné jej používat. Další použitá rozpouštědla, ethanol i propan-2-ol (IPA), použitá při inkorporaci poskytla micely s dobrou vazebnou kapacitou resveratrolu. Pro další testování byl, zejména kvůli ceně, používán IPA i přes to, že výsledky byly v rámci testovaných rozpouštědel nejhorší. Příprava micel z dalších derivátů (HA-karb a HA-TOSU) a resveratrolu byla tedy prováděna za využití IPA jako rozpouštědla pro resveratrol.

Tabulka 4: Výsledky vazebných kapacit micel s inkorporovaným resveratrolem.

HA- 11C/res [mg/mg]	rozpouštědlo	DL [%]	HA-C18:1/res [mg/mg]	rozpouštědlo	DL [%]
100:5	IPA	1,99	100:5	IPA	1,33
100:5	MeOH	1,42	100:5	MeOH	1,16
100:3	IPA	2,01	100:3	IPA	1,30
100:3	MeOH	2,85	100:3	MeOH	1,34
100:3	EtOH	2,78	100:5	EtOH	1,21

Vazebná kapacita micel připravených z derivátu HA–karb byla rovněž stanovena na modelu inkorporování resveratrolu. Pro stanovení vazebné kapacity byly vybrány deriváty se čtyřmi různými stupni substituce (3,4 %; 4,1 %; 5,4 % a 7,2 %) abychom zjistili, zda i tyto malé rozdíly v DS mohou ovlivnit vazebnou kapacitu micel. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 5.

Tabulka 5: Výsledky vazebné kapacity micel připravených z derivátu HA–karb.

Derivát	DS [%]	Vstupní množství resveratrolu [mg]	DL [%]
1	3,4	3	0,74
2	4,1	5	1,05
3	HA–karb	3	0,96
4	5,4	3	2,43
5	7,2	3	2,49

Výsledky měření vazebných kapacit byly však překvapivě rozdílné i přes minimální rozdíly v DS. Micely derivátů **3** a **4** vykazují velmi odlišné hodnoty vazebné kapacity i přes to, že tyto deriváty byly připraveny za zcela stejných reakčních podmínek. Tyto výsledky korespondují s výsledky měření dynamických viskozit roztoků derivátů, kdy deriváty připravené za stejných podmínek vytvořily rozdílně viskózní roztoky.

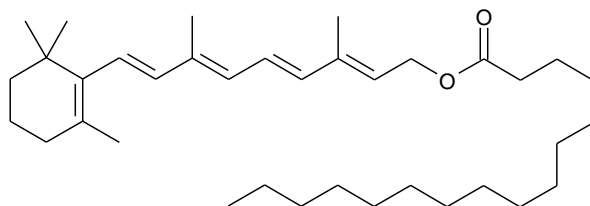
Z Tabulky 6 je patrné, že micely derivátu HA–TOSU mají velmi dobrou vazebnou kapacitu a to i přes velmi nízký stupeň substituce derivátu, z něhož jsou micely připravené (DS=1,1 %).

Tabulka 6: Srovnání vazebných kapacit micel vybraných derivátů.

Derivát	DS [%]	Vstupní množství derivátu [mg]	Vstupní množství resveratrolu [mg]	DL [%]
HA–C18:1	14,0	100	3	1,30
HA–11C	14,0	100	3	2,01
HA–TOSU	1,0	100	3	2,84

Pro získání dalších výsledků umožňujících srovnání aromatických micel HA–11C a alifatických micel HA–C18:1 byl pro inkorporaci využit i retinyl-palmitát, jehož struktura také obsahuje velké množství dvojných vazeb schopných poskytnout π -elektrony pro vytvoření $\pi\cdots\pi$ interakcí.

Retinyl-palmitát (Obrázek 11), patřící do skupiny retinoidů, je nejstabilnější formou vitamínu A a zároveň slouží jako zásobní forma tohoto vitamínu. Retinoidy jsou esenciální pro normální růst, zrak, imunitu, embryogenezi a neurogenezi a také inhibují vznik a rozvoj nádorů.^{44,45} Z farmakologického hlediska nebyly popsány kvalitativní rozdíly mezi retinyl-palmitátem a ostatními retinoidy.⁴⁶



Obrázek 11: Struktura retinyl-palmitátu.

Výsledky měření vazebných kapacit micel s inkorporovaným retinyl-palmitátem jsou zaznamenány v Tabulce 7. Jako rozpouštědla pro retinyl-palmitát byly použity ethanol a IPA.

Tabulka 7: Výsledky vazebných kapacit micel s inkorporovaným retinyl-palmitátem (RP).

HA– 11C/RP [mg/mg]	rozpouštědlo	vazebná kapacita [%]	HA–C18:1/RP [mg/mg]	rozpouštědlo	vazebná kapacita [%]
100:12	EtOH	2,6	100:12	EtOH	2,4
100:12	IPA	7,2	100:12	IPA	4,3

Z Tabulek 6 a 7 je jasné, že vazebná kapacita aromatických micel je vyšší než vazebná kapacita micel neobsahujících aromatický substituent. Lze předpokládat, že tento trend je způsoben přítomností $\pi\cdots\pi$ interakcí a vysokou hydrofobicitou aromatického jádra micely a inkorporované látky.

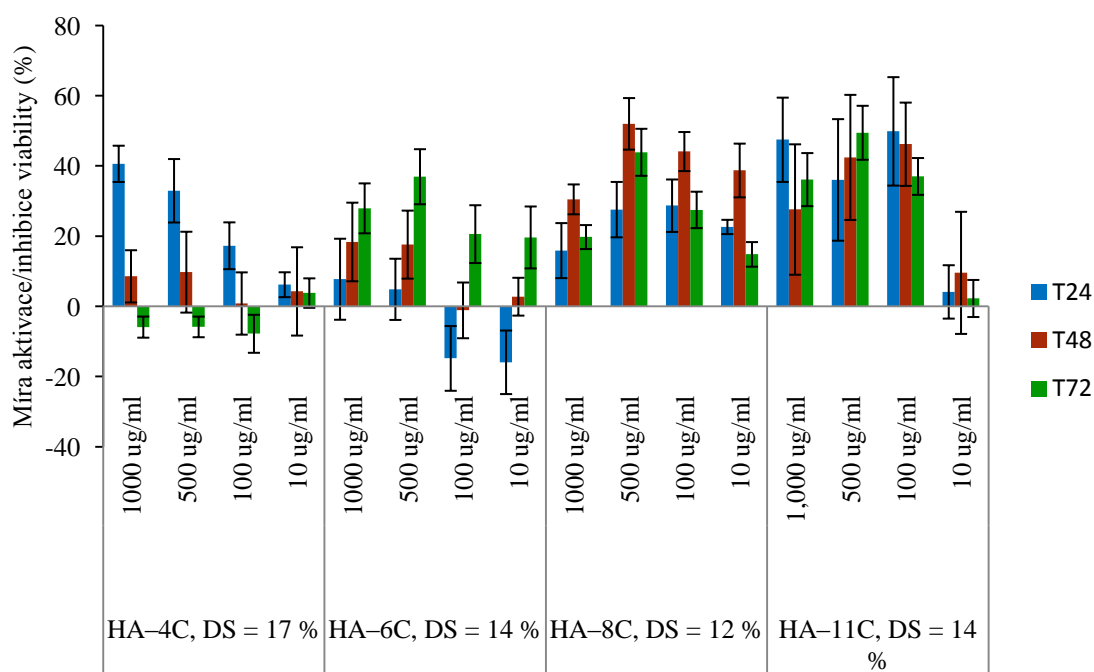
Srovnání vazebných kapacit obou typů micel potvrzuje předpoklad o vyšší „afinitě“ aromatických léčiv či biologicky aktivních látek (resveratrol, retinyl-palmitát) k aromatickým micelám než k micelám neobsahující na π -elektrony bohaté jádro.

3.7 Cytotoxicita derivátů

Jelikož jsou připravené deriváty HA zamýšleny pro *in vivo* aplikace, je důležité, aby nebyly toxické vůči organismu, do něž jsou aplikovány. Látky obsahující ve svém skeletu benzenový kruh však obecně nebudí přílišnou důvěru. Na druhou stranu, je známo, že

aromatické mastné kyseliny jsou běžnou součástí přírody a mají své, pro organismus prospěšné, funkce. Například 4-fenylmásečná kyselina vykazuje protinádorový efekt inhibicí histonových deacetyláz⁴⁷ či inhibuje stres endoplazmatického retikula.⁴⁸ Dříve byla tato látka používána k léčbě poruch močovinového cyklu.⁴⁸ Všechny použité aromatické mastné kyseliny jsou také přirozenou složkou kravského mléka.⁴⁹ 11-Tolylundekanová kyselina spolu s dalšími (aromatickými) mastnými kyselinami tvoří lipidovou část semen rostliny *Dracunculus vulgaris* (Drakovec obecný).⁵⁰

I přes tyto znalosti je maximálně vhodné podrobit připravené deriváty testování na cytotoxicitu. Cytotoxický účinek byl sledován po dobu tří dnů (první den = T24, druhý den = T48, třetí den = T72) na Swiss 3T3¹ buňkách. Kromě buněk ošetřených roztoky derivátů byl sledován i slepý vzorek (označený jako CTRL). Porovnáním výsledků viability² buněk po ošetření roztoky derivátů HA- ω -FAK s výsledky viability buněk slepého vzorku je zřejmé, že ve sledovaném čase sledované deriváty nepůsobí na buňky toxicky v žádné testované koncentraci. Na Obrázku 12 je zachycena míra aktivace/inhibice viability v čase. Uvedený parametr naznačuje, zda a do jaké míry dochází k množení a růstu buněk (aktivace) či zda naopak dochází k redukci jejich počtu (inhibice) působením testované látky.



Obrázek 12: Míra aktivace/inhibice viability buněk roztoky derivátů HA-4C, HA-6C, HA-8C a HA-11C.

Pokud se buňky i po aplikaci testované látky množí a rostou, nepůsobí na ně testovaná látka negativně. Výsledky působení testovaných látek se porovnávají s výsledky slepého vzorku,

¹Myší fibroblasty buněčné linie 3T3 prokazují vysokou míru citlivosti na kontaktní inhibici (tj. zastavení dělení živočišných buněk v kultuře vzájemným dotekem), a jsou proto běžně používány pro testování cytotoxicity *in vitro*.

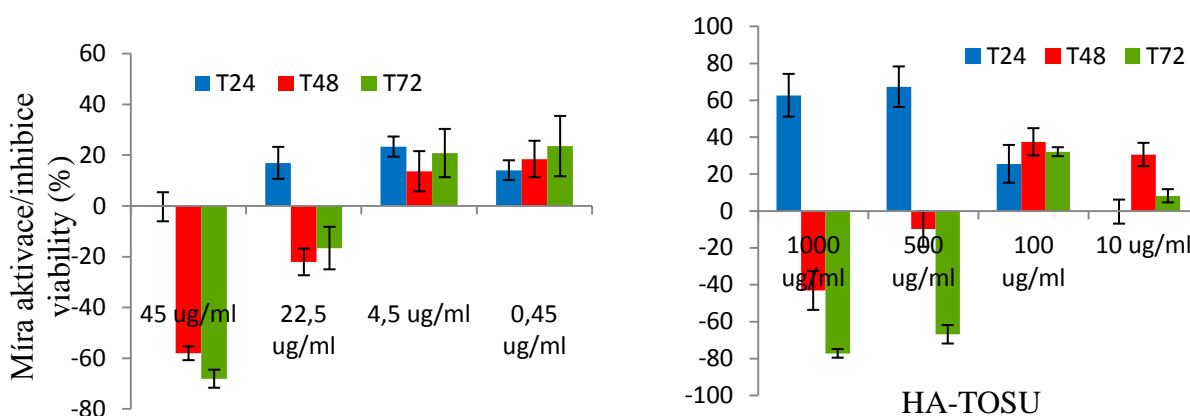
²životaschopnost

aby byla vyloučena možnost, že například používané buňky nejsou životaschopné samy o sobě. Hranice toxicity jsou určeny podle oficiální tabulky SZÚ (Státní zdravotní ústav).

Další skupinou testovaných derivátů byly deriváty HA–karb a HA–TOSU. Deriváty HA–karb (s DS=3,4 a 5,4 %) po 24 h a 48 h nevykazovaly toxický efekt v žádné testované koncentraci. Po 72 h však deriváty HA–karb vykázaly inhibiční chování vůči 3T3 buňkám. Derivát HA–karb s DS=3,4 % vykazoval při koncentraci 1 000 a 500 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ silně toxické účinky na 3T3 buňky. Derivát HA–karb s DS=5,4 % při koncentraci 1 000 a 500 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ vykazoval silně toxické, při koncentraci 100 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ slabě toxické účinky a jen v koncentraci 10 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ nebyl derivát po 72 h působení cytotoxický.

Pro zjištění zdroje toxicity byla podrobena stanovení samotná 11-(9*H*-karbazol-9-yl)undekanová kyselina. Touto zkouškou bylo zjištěno, že už při koncentraci 22,5 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ inhibuje 11-(9*H*-karbazol-9-yl)undekanová kyselina růst buněk (Obrázek 13 vlevo). Protože toxické účinky nejsou pozorovány ihned ale až po dvou či třech dnech působení, je pravděpodobné, že toxická není 11-(9*H*-karbazol-9-yl)undekanová kyselina, ale například metabolity nebo produkty hydrolýzy, které od určité koncentrace inhibují růst buněk.

I derivát HA–TOSU byl podroben testování cytotoxicity. Tento derivát po 72 h testování působí v koncentraci 1000 a 500 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ silně cytotoxicky (Obrázek 13 vpravo). I derivát HA–TOSU byl po testování a ověření pravdivosti výsledků přečištěn a testování bylo zopakováno. Bohužel toto opakované testování nepřineslo lepší výsledky a i tyto deriváty byly shledány cytotoxickými.



Obrázek 13: Míra aktivity/inhibice viability buněk ošetřených roztokem 11-(9*H*-karbazol-9-yl)undekanové kyseliny (vlevo); míra aktivity/inhibice viability buněk ošetřených roztokem HA–TOSU (vpravo).

Z tohoto důvodu byl výzkum tohoto derivátu i přes nadějně výsledky vazebné kapacity micel ukončen. Tyto výsledky byly poměrně překvapivé. Vysvětlení pro toxicitu derivátu může být

následující. Bylo totiž zjištěno, že α -tokoferyl-sukcinát poskytuje pozitivní test výměny sesterských chromatid. Určitá frekvence jejich výměny je běžná a spontánní. Je-li ovšem tento proces častější (14–100 výměn na chromozomový pár za jednu mitózu), představuje pro organismus riziko. Tato výměna je dávana do souvislosti s indukcí mutací a cytotoxicitou.⁵¹

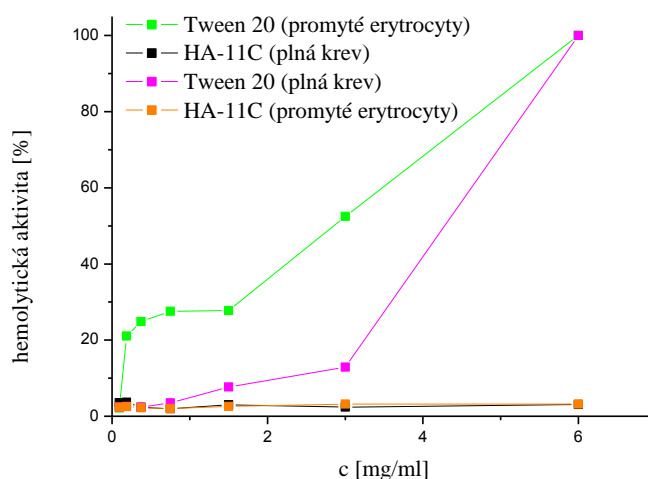
Poslední testovanou skupinou derivátů HA byly tři deriváty substituované 4-alkoxybenzoovými kyselinami. V tomto případě nebyl ani jeden z derivátů nalezen jako cytotoxický.

Závěrem lze tedy konstatovat, že stanovení toxicity připravených derivátů HA vyloučilo dva typy derivátů: HA–karb a HA–TOSU. Zejména vyloučení derivátu HA–TOSU bylo velkým zklamáním, protože podle výsledků vazebné kapacity micel byl tento derivát velmi nadějný. Zbývající deriváty byly vyhovující: skupina HA- ω -FAK, HA–HB8C, HA–HB10C a HA–HB12C.

3.8 Hemolytická aktivita derivátu HA–11C

Neopomenutelným parametrem, podle kterého jsou posuzovány nosičové systémy, je jejich hemokompatibilita. Hemolýza nastává tehdy, když jsou membrány červených krvinek narušeny a dojde k uvolnění hemoglobinu z buňky. Hemolýza může v krajním případě negativně ovlivňovat zdraví a způsobovat například chudokrevnost či vysoký krevní tlak. Materiály či látky zamýšlené jako nosičové systémy musí být proto hemokompatibilní.

Hemolytická aktivita derivátu HA–11C byla testována jak v systému plné krve tak i na promytých erythrocytech. Jako pozitivní kontrola byl použit materiál Tween 20, který způsobuje hemolýzu již v malé koncentraci. Pro samotný derivát HA–11C nebyla pozorována hemolytická aktivita (Obrázek 14).



Obrázek 14: Výsledek měření hemolytické aktivity derivátu HA–11C.

4. ZÁVĚR – přínos pro vědu a praxi

Cílem této disertační práce bylo navrhnout originální funkční nosičové systémy založené na hyaluronanu (HA). Důležitým hlediskem byla zejména kompatibilita nosičových systémů s aromatickými léčivy. Bedlivě však byly sledovány také další parametry kladené na aplikace těchto nosičových systémů, jako například dostatečně nízká kritická asociační koncentrace nosičových systémů, jejich stabilita v přítomnosti krevního proteinu albuminu či cytotoxicita.

Navrženo bylo několik skupin nízkomolekulárních aromatických látek (modifikačních činidel), které mohly být nenáročnými postupy navázány na hydroxylové skupiny HA. Při navrhování vhodných substituentů musel být také brán zřetel na hledisko odbouratelnosti těchto látek v organismu. Během přípravy všech nízkomolekulárních látek byly použity netoxické reagenty nebo takové, které bylo možné z produktů beze zbytku, snadno a prokazatelně odstranit.

Samotný proces navázání připravených substituentů na HA byl navržen tak, aby HA nemusel být nikterak upravován (převáděn na kyselou formu a podobně), protože za podmínek používaných při těchto úpravách dochází zpravidla k degradaci polymerního řetězce. Modifikace vždy probíhaly na hydroxylových skupinách HA, tedy tak, aby karboxylové skupiny zůstaly volné. Tímto byla zachována rozpustnost HA ve vodném prostředí, a také umožněno přirozené cílení nosičových systémů na HA receptory.

Hyaluronan byl modifikován třemi skupinami substituentů: ω -fenylmastnými kyselinami, 4-alkoxybenzoovými kyselinami a DL- α -tokoferyl-sukcinátem. ω -Fenylmastné kyseliny se lišily délkou řetězce, což znamenalo, po navázání na HA, rostoucí vzdálenost aromatického jádra od řetězce polymeru. Derivát HA jedné z testovaných kyselin, 11-tolylundekanové kyseliny, se ukázal jako velmi dobrý nosičový systém splňující všechny požadavky. Jistým analogem této látky byla 11-(9H-karbazol-9-yl)undekanová kyselina, kde bylo benzenové jádro nahrazeno stericky náročnějším aromatickým systémem (karbazolem) a alkylový řetězec byl na aromát vázán přes dusíkový, nikoliv uhlíkový atom. Nosičový systém připravený z HA modifikovaného touto kyselinou se však ukázal být cytotoxický. Také výsledky vazebné kapacity nebyly uspokojivé, a proto bylo od dalšího výzkumu tohoto derivátu upuštěno. Stejný problém (toxicita vůči buňkám) byl pozorován i u nosičových systémů připravených z derivátů HA a DL- α -tokoferyl-sukcinátu, což bylo velké zklamání, protože micely těchto derivátů vykazovaly vysokou vazebnou kapacitu i přes nízký stupeň substituce. Poslední skupinou testovaných derivátů byla série 4-alkoxybenzoových kyselin, které byly připraveny substitucí hydroxylové skupiny 4-hydroxybenzoové kyseliny různě dlouhými alifatickými řetězci. V tomto případě byl, po navázání na polymer, aromatický kruh stále ve stejné vzdálenosti od polymeru, ale prodlužoval se terminální alifatický řetězec tvořící jádro micely připravené z těchto derivátů. Tyto micely však nebyly stabilní v přítomnosti krevního proteinu albuminu, a tudíž byl jejich výzkum zastaven.

Vlastnosti připravených derivátů HA (například kritická asociační koncentrace, cytotoxicita) a zejména jejich micel (například vazebná kapacita, stabilita v přítomnosti albuminu), byly porovnány a byly vybrány ty deriváty, které splňovaly všechny požadavky kladené na funkční nosičové systémy. Uvedené parametry jsou velmi důležité, a jejich nesplnění vedlo

k vyloučení derivátů HA a 4-alkoxybenzoových kyselin, DL- α -tokoferyl-sukcinátu a 11-(9*H*-karbazol-9-yl)undekanové kyseliny (a z nich připravených micel) z dalšího testování. U žádného z derivátů HA s ω -fenylmastnými kyselinami naopak toxicita prokázána nebyla. Stabilita micel připravených z této skupiny derivátů stoupala v přítomnosti albuminu se stoupající délkou alifatického řetězce ω -fenylmastné kyseliny. Zatímco micely derivátu HA-4C byly nestabilní ve všech testovaných koncentracích, micely derivátu HA-11C již dosáhly dostatečné stability pro aplikace do krevního oběhu.

Stejný trend byl pozorován i pro vazebnou kapacitu micel. Se stoupající délkou alifatického řetězce ω -fenylmastné kyseliny stoupá i množství inkorporované modelové látky. Micely derivátu HA-11C reprodukovatelně inkorporovaly větší množství aromatických modelových látek (resveratrolu a retinyl-palmitátu) než micely nearomatického derivátu HA-C18:1. Tento jev může být připsán $\pi \cdots \pi$ interakcím mezi aromatickým jádrem micely a π -elektronovými systémy modelových látek.

Z hlediska dalších sledovaných vlastností derivátů HA (CAC) i jejich micel (ζ -potenciál, velikost micel) byly micely připravené z derivátu HA-11C shledány jako nejlépe vyhovující funkční nosičové systémy.

Dosažené výsledky se mohou stát inspirací pro další výzkum zabývající se vztahy mezi jádrem micely a inkorporovanou látkou/léčivem, zejména využití $\pi \cdots \pi$ interakcí, protože tyto vztahy jsou pravděpodobně jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujícím vazebnou kapacitu micel.

Seznam obrázků

Obrázek 1: Kyselina hyaluronová/hyaluronan.	5
Obrázek 2: Polymerní micela.	6
Obrázek 3: HA modifikovaný PCL.	7
Obrázek 4: Hyaluronan substituovaný 1-pyrenmethylaminem.	7
Obrázek 5: Hyaluronan modifikovaný derivátem kyseliny skořicové.	7
Obrázek 6: Aromatické mastné kyseliny použité k modifikaci HA.	10
Obrázek 7: Srovnání stability micel derivátů HA-4C, HA-6C, HA-8C a HA-11C, Mw=15 kDa, c=1,5 mg·cm ⁻³ (vlevo); srovnání stability micel derivátů HA-HB8C, HA-10C a HA-12C, Mw=6 kDa, c=1,5 mg·cm ⁻³ (vpravo).	13
Obrázek 8: Dynamická viskozita derivátů HA (HA- ω -FAK a HA-karb).	15
Obrázek 9: Tokové křivky derivátů HA-TOSU, HA-11C a přírodního HA.	15
Obrázek 10: Struktura resveratrolu.	16
Obrázek 11: Struktura retinyl-palmitátu.	18
Obrázek 12: Míra aktivace/inhibice viability buněk roztoky derivátů HA-4C, HA-6C, HA-8C a HA-11C.	19
Obrázek 13: Míra aktivace/inhibice viability buněk ošetřených roztokem 11-(9H-karbazol-9-yl)undekanové kyseliny (vlevo); míra aktivace/inhibice viability buněk ošetřených roztokem HA-TOSU (vpravo).	20
Obrázek 14: Výsledek měření hemolytické aktivity derivátu HA-11C.	21

Seznam tabulek

Tabulka 1: Výsledky modifikace HA různými ω -FAK.	12
Tabulka 2: Výsledky modifikačních reakcí s využitím 4-oktyloxybenzoových kyselin.	12
Tabulka 3: Hodnoty CAC jednotlivých derivátů.	14
Tabulka 4: Výsledky vazebných kapacit micel s inkorporovaným resveratrolem.	17
Tabulka 5: Výsledky vazebné kapacity micel připravených z derivátu HA-karb.	17
Tabulka 6: Srovnání vazebných kapacit micel vybraných derivátů.	17
Tabulka 7: Výsledky vazebných kapacit micel s inkorporovaným retinyl-palmitátem (RP).	18

Seznam schémat

Schéma 1: Aktivační krok (A) a samotná modifikace hyaluronanu (B).	9
Schéma 2: Sled reakčních kroků vedoucích k přípravě aromatické karboxylové kyseliny odvozené od toluenu.	10

CURRICULUM VITAE

Osobní údaje

Jméno a příjmení	Alena Matelová
Datum a místo narození	7. 9. 1988 ve Vsetíně
Trvalá adresa	Bratří Hlaviců 129, 755 01 Vsetín
Kontaktní údaje	+420 739 176 390, matelova.a@centrum.cz

Dosažené vzdělání

- 2013 – nyní Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, doktorský studijní program Chemie a technologie materiálů, od září 2017 kombinovaná forma studia
- 2011 – 2013 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, studijní program Chemie a technologie potravin, studijní obor Chemie potravin a bioaktivních látek, udělen titul Ing., *udělena Cena rektora*
- 2008 – 2011 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, studijní program Chemie a technologie potravin, udělen titul Bc.
- 2004 – 2008 Masarykovo gymnázium, Vsetín

Pracovní zkušenosti

Srpen 2017– nyní

DPlast, a.s., U Tescomy 206, Zlín, 760 01

Laborant – technik centra VaV

- obsluha infračerveného spektrometru (řešení problémů neshodné výroby a reklamací), spolupráce na vývoji a zavádění nových zkušebních metod do praxe, zpracování technické dokumentace a příprava zkušebních postupů při zavádění nových přístrojů a zařízení v laboratoři, interní školení pracovníků laboratoře.

Září 2015 – srpen 2016, září 2013 – únor 2015

Contipro a.s., Dolní Dobrouč 401, 561 02

Asistent specialista R&D

- samostatná výzkumná činnost (návrhy a příprava organických sloučenin pro derivatizaci hyaluronanu, derivatizace hyaluronanu a příprava polymerních micel ze získaných derivátů, strukturní analýza připravených organických i polymerních sloučenin a popis vlastností).

Zahraniční studijní stáž

březen/duben 2017 Státní Petrohradská Univerzita, Petrohrad, Ruská federace, Ústav vysokomolekulárních látek, školitel: Doc. Ing. Ivan Michajlovič Zorin, Ph.D., program Freemovers.

Publikační činnost

Jelínková, K., Surmová, H., Matelová, A., Rouchal, M., Prucková, Z., Dastychová, L., Nečas, M., Vícha, R. Cubane Arrives on the Cucurbituril Scene, *Organic Letters*, **2017**, *19*(10), 2698–2701.

Matelová, A., Huerta–Angeles, G., Šmejkalová, D., Brůnová, Z., Dušek, J., Vícha, R., Velebný, V. Synthesis of novel amphiphilic hyaluronan containing–aromatic fatty acids for fabrication of polymeric micelles, *Carbohydrate Polymers*, **2016**, *151*, 1175–1183.

Rouchal, M., Matelová, A., Pires de Carvalho, F., Bernat, R., Grbić, D., Kuřitka, I., Babinský, M., Marek, R., Čmelík, R., Vícha, R. Adamantane–bearing Benzylamides: Novel Building Blocks for Supramolecular Systems with Finely Tuned Binding Properties toward β –Cyclodextrin, *Supramolecular Chemistry*, **2013**, *25*, 349–361.

Příspěvek ve sborníku

Matelová, A., Huerta–Angeles, G., Brůnová, Z., Šmejkalová, D., Vícha, R., Velebný, V., Synthesis of novel amphiphilic hyaluronan containing π – π conjugated moieties as carriers for drug delivery, *12th International Conference on Polysaccharides–Glycoscience*, **2016**, 63–66.

Příspěvky na konferencích – aktivní účast

Matelová, A., Huerta–Angeles, G., Šmejkalová, D., Brůnová, Z., Vícha, R., Velebný V. May be drug loading content improved by aromatic amphiphiles?, *X. International conference of young scientists on chemistry “Mendeleev–2017”*, Petrohrad, Ruská federace, **2017**, P2.11. Získáno ocenění “Nejlepší poster v sekci Polymeric materials: Methods of preparation and processing”.

Matelová, A., Huerta–Angeles, G., Brůnová, Z., Šmejkalová, D., Vícha, R., Velebný, V. Synthesis of novel amphiphilic hyaluronan containing π – π conjugated moieties as carriers for drug delivery, *12. International Conference on Polysaccharides–Glycoscience*, Praha, Česká republika, **2016**, ústní prezentace.

Matelová, A., Rouchal, M., Čmelík, R., Vicha, R. Preparation of Adamantylated *N*-Benzyl-acetamides and Study of Their Binding Properties Towards beta-Cyclodextrin, *13. Belgian Organic Synthesis Symposium*, Leuven, Belgie, **2012**, P295.

Příspěvky na konferencích – pasivní účast

Huerta–Angeles, G., Matelová, A., Brůnová, Z., Šmejkalová, D., Velebný, V. Synthesis of amphiphilic hyaluronan containing-phenyl fatty acids for the preparation of polymeric micelles for drug delivery. *International Conference On Nanomedicine And Nanobiotechnology – ICONAN*, Paříž, Francie, **2016**.

Fetin, P., Matelová, A., Povshednaya, M., Zorin, I., Bilibin, A.Yu. Comb-like polyelectrolyte with „Tailed counter-ions“. *9th International Symposium Molecular Mobility nad Order in Polymer Systems*. Petrohrad, Ruská federace, **2017**, P–089.

Patentová přihláška

Matelová, A., Huerta–Angeles, G., Brůnová, Z., Šmejkalová, D., Dalecká, M., Velebný, V. Hydrophobized ester derivatives of hyaluronic acid or their salts, nanomicellar compositions, patent udělen.

Účast na grantových projektech

Projekt interní grantové agentury ve Zlíně IGA/FT/2017/001 – Funkční supramolekulární systémy, *spoluřešitel*.

Projekt interní grantové agentury ve Zlíně IGA/FT/2016/001 – Multitopické ligandy pro pokročilé supramolekulární systémy, *řešitel*.

Projekt interní grantové agentury ve Zlíně IGA/FT/2015/005 – Syntéza a charakterizace molekulárních komponent a studium vlastností souvisejících supramolekulárních systémů, *spoluřešitel*.

Projekt interní grantové agentury ve Zlíně IGA/FT/2012/005 – Supramolekulární stavebnice – syntéza komponent na bázi adamantanu a studium jejich fyzikálně–chemických vlastností, *spoluřešitel*.

Seznam použité literatury

- ¹ Credi C, Biella S, De Marco C, Levi M, Suriano R, Turri S. *J Mech Behav Biomed Mater.* **2014**, 29, 309–316.
- ² D'Este M, Eglin D, Alini M. *Carbohydr Polym.* **2014**, 108, 239–246.
- ³ Kakehi K, Kinoshita M, Yasueda S. *J Chromatogr B.* **2003**, 797, 347–355. Kakehi K, Kinoshita M, Yasueda S. *J Chromatogr B.* **2003**, 797, 347–355.
- ⁴ Mravec F, Pekar M, Velebny V. *Colloid Polym Sci.* **2008**, 86, 1681–1685.
- ⁵ Eenschooten C, Guillaumie F, Kontogeorgis GM, Stenby EH, Schwach-Abdellaoui K. *Carbohydr Polym.* **2010**, 79, 597–605.
- ⁶ Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J. *Vet Med.* **2008**, 53, 397–411.
- ⁷ Bergman K, Elvingson C, Hilborn J, Svensk G, Bowden T. *Biomacromolecules.* **2007**, 8, 2190–2195.
- ⁸ Daoud-Mahammed S, Ringard-Lefebvre C, Razzouq N, Rosilio V, Gillet B, Couvreur P, Amiel C, Gref R. *J Colloid Interface Sci.* **2007**, 307, 83–93.
- ⁹ Manna U, Bharani S, Patil S. *Biomacromolecules.* **2009**, 10, 2632–2639.
- ¹⁰ Prestwich G, Marecak D, Marecek J, Vercruyse K, Ziebell M. *J Controlled Release.* **1998**, 53, 93–103.
- ¹¹ Schante CE, Zuber G, Herlin C, Vandamme TF. *Carbohydr Polym.* **2011**, 85, 469–489.
- ¹² Vasi A, Popa MI, Butnaru M, Dodi G, Verestiuc L. *Mater Sci Eng C-Mater Biol Appl.* **2014**, 38, 177–185.
- ¹³ Chanmee T, Ontong P, Itano N. *Cancer Lett.* **2016**, 375, 20–30.
- ¹⁴ Dosio F, Arpicco S, Stella B, Fattal E. *Adv Drug Deliv Rev.* **2016**, 97, 204–236.
- ¹⁵ Hruby M, Kucka J, Kozempel J, Lebeda O. *Chem Listy.* **2006**, 100, 10–16.
- ¹⁶ Cao J, Su T, Zhang L, Liu R, Wang G, He B, Gu Z. *Int J Pharm.* **2014**, 471, 28–36.
- ¹⁷ Wang X, Gu X, Wang H, Sun Y, Wu H, Mao S. *Eur J Pharm Sci.* **2017**, 96, 255–262.
- ¹⁸ Krouska J, Pekar M, Klucakova M, Sarac B, Bester-Rogac M. *Carbohydr Polym.* **2017**, 157, 1837–1843.
- ¹⁹ Sosnik A, Raskin MM. *Biotechnol Adv.* **2015**, 33, 1380–1392.
- ²⁰ Akiyoshi K, Sunamoto J. *Supramol Sci.* **1996**, 3, 157–163.
- ²¹ Goncalves C, Gama FM. *Eur Polym J.* **2008**, 44, 3529–3534.
- ²² Nichifor M, Lopes S, Bastos M, Lopes A. *J Phys Chem B.* **2004**, 108, 16463–16472.
- ²³ Muthiah M, Park S, Nurunnabi M, Lee J, Lee Y, Park H, Lee B, Min J, Park I. *Colloid Surf B-Biointerfaces.* **2014**, 116, 284–294.
- ²⁴ Pepic I, Lovric J, Filipovic-Grcic J. *Eur J Pharm Sci.* **2013**, 50, 42–55.
- ²⁵ al Bo AG, Soldi V, Giacomelli FC, Travelet C, Jean B, Pignot-Paintrand I, Borsali R, Fort S. *Langmuir.* **2012**, 28, 1418–1426.
- ²⁶ Sezgin Z, Yuksel N, Baykara T. *Eur J Pharm Biopharm.* **2006**, 64, 261–268.
- ²⁷ Daman Z, Ostad S, Amini M, Gilani K. *Int J Pharm.* **2014**, 468, 142–151.
- ²⁸ Stefanello TF, Szarpak-Jankowska A, Appaix F, Louage B, Hamard L, De Geest BG, van der Sanden B, Nakamura CV, Auzély-Velty R. *Acta Biomater.* **2014**, 10, 4750–4758.
- ²⁹ Hong D, Lai P, Ku K, Lai Z, Chu I. *Polym Degrad Stab.* **2013**, 98, 1578–1585.
- ³⁰ Huang P, Yang C, Liu J, Wang W, Guo S, Li J, Sun Y, Dong H, Deng L, Zhang J, Liu J, Dong A. *J Mat Chem B.* **2014**, 2, 4021–4033.
- ³¹ Jang E, Lim EK, Choi Y, Kim E, Kim HO, Kim DJ, Suh JS, Huh YM, Haam S. *J Mat Chem B.* **2013**, 41, 8 stran.
- ³² NTP 12th report on carcinogens. **2011**;12:iii-499.
- ³³ Cappelli A, Grisci G, Paolino M, Giuliani G, Donati A, Mendichi R, Artusi R, Demiranda M, Zanardi A, Giorgi G, Vomero S. *J Mat Chem B.* **2014**, 2, 4489–4499.
- ³⁴ Liu Y, Lotero E, Goodwin JG. *J Catal.* **2006**, 242(2), 278–286.
- ³⁵ Owen SC, Chan DPY, Shoichet MS. *Nano Today.* **2012**, 7, 53–65.
- ³⁶ Kim S, Shi Y, Kim JY, Park K, Cheng JX. *Expert Opin Drug Deliv.* **2010**, 7, 49–62.
- ³⁷ Lu J, Owe SC, Shoichet MS. *Macromolecules.* **2011**, 44, 6002–6008.
- ³⁸ Tommeraas K, Eenschooten C. Aryl/alkyl succinic anhydride hyaluronan derivatives. 2005, patent číslo US2012/0283213 A1.
- ³⁹ Eenschooten C, Vaccaro A, Delie F, Guillaumie F, Tommeraas K, Kontogeorgis GM, Schwach-Abdellaoui K, Borkovec M, Gurny R. *Carbohydr Polym.* **2012**, 87, 444–451.
- ⁴⁰ Obeidat WM, Price JC. *J Microencapsulation.* **2003**, 20(1), 57–65.
- ⁴¹ Ali A, Ahmed S. *Int J Biol Macromol.* **2018**, 109, 273–286.
- ⁴² Scognamiglio I, De Stefano D, Campani V, Mayol L, Carnuccio R, Fabbrocini G, Ayala F, La Rotonda MI, De Rosa G. *Int J Pharm.* **2013**, 440, 179–187.
- ⁴³ Mohammadi RK, Arablou T. *Biom Pharm.* **2017**, 91, 220–228.

- ⁴⁴ Yokota S, Oshio S. *J Food Drug Anal.* **2017**, 26(2), 504–511.
- ⁴⁵ Ibrahim T, Rouby MNE, Al-Sherbini ES, Noury HE, Morsy ME. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* **2016**, 13, 316–322.
- ⁴⁶ Wang SQ, Dusza SW, Lim HW. *J Am Acad Dermatol.* **2010**, 63, 903–906.
- ⁴⁷ Li L, Deng H, Lou W, Sun X, Song M, Tao J, Xiao B, Guo J. *World J Gastroenterol.* **2012**, 18(1), 79–83.
- ⁴⁸ Kolb PS, Ayoub EA, Zhou W, Yum V, Dickhout JG, Ask K. *Int J Biochem Cell Biol.* **2015**, 61, 45–52.
- ⁴⁹ Schroder M, Abdurahman H, Ruoff T, Lehnert K, Vetter W. *J Am Oil Soc.* **2014**, 91, 1695–1702.
- ⁵⁰ Rezanka T, Schreiberova O, Cejkova A, Sigler K. *Phytochem.* **2011**, 72, 1914–1926.
- ⁵¹ Safety Assessment of Tocopherols and Tocotrienols as Used in Cosmetics, Tentative Amended Report for Public Comment.

Ing. Alena Matelová, Ph.D.

**Nalezení vhodné a originální modifikace kyseliny hyaluronové pro
nosičové systémy**

Development of a suitable and original modification of hyaluronic
acid for drug delivery systems

Teze disertační práce

Vydala Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně,
nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín.

Náklad: vyšlo elektronicky

Sazba: Ing. Alena Matelová

Publikace neprošla jazykovou ani redakční úpravou.

Rok vydání: 2018

Pořadí vydání: první

ISBN 978-80-7454-787-4

