

Syntéza nanoformulací na bázi modifikovaného hyaluronanu pro přenos léčiv

Bc. Vítek Hrbáček

Diplomová práce
2023



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav fyziky a mater. inženýrství

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Vítek Hrbáček
Osobní číslo: T21436
Studijní program: N0711A130023 Materiálové inženýrství a nanotechnologie
Forma studia: Prezenční
Téma práce: Syntéza nanoformulací na bázi modifikovaného hyaluronanu pro přenos léčiv

Zásady pro vypracování

Oxidované polysacharidy a (bio)materiály na nich založené jsou výbornými nosiči různých biologicky aktivních látek, a to včetně protinádorových léčiv na bázi platiny. Tato léčiva jsou jedním z hlavních nástrojů pro terapii zhoubných nádorů, vykazují však velmi závažné vedlejší účinky. Konjugací léčiva na různé nanoformulace lze tyto nežádoucí účinky výrazně snížit a současně zvýšit efektivitu nasazené látky vůči novotvarům díky pasivní akumulaci nanoformulací v tumoru v důsledku tzv. "enhanced permeability and retention" efektu. Další výhodou je možnost přípravy formulací s pozvolným uvolňováním léčiva, které tak zůstává v organismu déle, což dále umožňuje snížit celkovou dávku léčiva.

Cílem práce je příprava nanoformulací tvořených oxidovanou k. hyaluronovou a sloučeninami na bázi platiny, které budou sloužit zároveň jako modelové léčivo i síťovací činidlo. Kyselina hyaluronová bude modifikována pomocí regioselektivní oxidace, což značně zvýší její kapacitu pro přenos léčiv a schopnost síťovat. Dále bude připraven vhodný čtvercově-planární Pt(II) komplex zastupující v současnosti používaná protinádorová léčiva, který bude schopen síťovat řetězce oxidované k. hyaluronové a iniciovat tak vznik různých nano-či mikro-struktur. Bude studován hlavně vliv podmínek přípravy (teplota, koncentrace léčiva, pH) a molekulové hmotnosti k. hyaluronové na vlastnosti konjugátů. Vzniklé formulace budou analyzovány vhodnými fyzikálně-chemickými metodami pro stanovení jejich velikosti, morfologie a zeta potenciálu. Bude také sledován obsah léčiva a kinetika jeho uvolňování. Získaná data budou porovnána s literaturou, diskutována a bude vypracována literární rešerše na toto téma.

Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická

Seznam doporučené literatury:

Ohta, S.; Hiramoto, S.; Amano, Y.; Sato, M.; Suzuki, Y.; Shinohara, M.; Emoto, S.; Yamaguchi, H.; Ishigami, H.; Sakai, Y.; Kitayama, J.; Ito, T. Production of Cisplatin-Incorporating Hyaluronan Nanogels via Chelating Ligand-Metal Coordination. *Bioconjugate Chem.* 2016, 27 (3), 504-508. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00674>.

Xu, X.; Jha, A. K.; Harrington, D. A.; Farach-Carson, M. C.; Jia, X. Hyaluronic Acid-Based Hydrogels: From a Natural Polysaccharide to Complex Networks. *Soft Matter* 2012, 8 (12), 3280-3294. <https://doi.org/10.1039/C2SM06463D>.

Münster, L.; Fojtů, M.; Capáková, Z.; Muchová, M.; Musilová, L.; Vaculovič, T.; Balvan, J.; Kuřitka, I.; Masařík, M.; Vícha, J. Oxidized Polysaccharides for Anticancer-Drug Delivery: What Is the Role of Structure? *Carbohydrate Polymers* 2021, 257, 117562. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117562>.

Ohta, S.; Hiramoto, S.; Amano, Y.; Emoto, S.; Yamaguchi, H.; Ishigami, H.; Kitayama, J.; Ito, T. Intraperitoneal Delivery of Cisplatin via a Hyaluronan-Based Nanogel/in Situ Cross-Linkable Hydrogel Hybrid System for Peritoneal Dissemination of Gastric Cancer. *Mol. Pharmaceutics* 2017, 14 (9), 3105-3113. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00349>.

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Jan Vícha, Ph.D.
 Centrum polymerních systémů

Datum zadání diplomové práce: 31. prosince 2022

Termín odevzdání diplomové práce: 12. května 2023

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Mgr. Aleš Mráček, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 20. února 2023

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Jedním z velkých problémů protirakovinných léčiv je jejich systémová toxicita. Proto je snahou tyto léčiva zabudovat do vhodného nosiče, který by byl schopen léčivo enkapsulovat a uvolnit jej až v rakovinné tkáni. Jednou z možností je využití nanogelu jako nosiče léčiv. Tato práce se zabývá přípravou nanogelů na bázi selektivně oxidované kyseliny hyaluronové přenášející rakovinné léčivo cisplatinu. Předmětem této práce je úprava podmínek syntézy těchto nanogelů za účelem získání co nejmenších částic. U nanogelů byla charakterizována velikosti hydrodynamického průměru jejich částic, zeta potenciálu a rychlost uvolňování in vitro.

Klíčová slova: Nanogel, cisplatin, hyaluronan, hydrodynamický průměr, zeta potenciál

ABSTRACT

One of the big problems of anticancer drugs is their systemic toxicity. Today's effort aims to incorporate these drugs in a suitable carrier, which would be able to encapsulate this drug and release it after reaching cancer cells. One of the options is to use nanogels as drug carriers. In this work, we prepare nanogels from selectively oxidized hyaluronan which will carry cisplatin as its anticancer drug. The aim of this work is to modify nanogel synthesis conditions to obtain the smallest possible particles. Nanogels were characterized by hydrodynamic radius of their particles, zeta potential, and drug release rates in vitro.

Keywords: Nanogels, cisplatin, hyaluronan, hydrodynamic radius, zeta potencial

Chtěl bych poděkovat vedoucímu mé diplomové práce Mgr. Janu Víchovi, Ph.D. za jeho pomoc, rady a především trpělivost, kterou se mou měl během psaní této práce. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Lukáši Münsterovi, Ph.D. za jeho pomoc při přípravě a charakterizaci vzorků. A nakonec bych chtěl poděkovat Filipu Latečkovi za intelektuální a morální podporu v laboratoři i mimo ni.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 KYSELINA HYALURONOVÁ	11
1.1 STRUKTURA HA.....	11
1.2 VLASTNOSTI HA.....	12
1.3 VYUŽITÍ HA.....	14
2 CISPLATINA	19
2.1 CISPLATINA JAKO LÉČIVO.....	20
2.2 MECHANISMUS ÚČINKU CISPLATINY A VZNIK REZISTIVITY.....	22
3 NANOGELY	27
3.1 DĚLENÍ NANOGELŮ PODLE ZPŮSOBU PŘÍPRAVY.....	28
3.2 PŘÍKLADY NANOGELŮ A JEJICH VYUŽITÍ.....	30
3.3 NANOGELY PRO LÉČBU RAKOVINY.....	32
4 2,3-DIKARBOXYHYALURONAN	33
4.1 RESIOSELEKTIVNÍ OXIDACE HA.....	33
4.2 SYNTÉZA NANOGELŮ DCH.....	35
5 POUŽITÉ METODY	36
5.1 DYNAMIC LIGHT SCATTERING.....	36
5.2 ZETA POTENCIÁL.....	36
5.3 X-RAY FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE.....	37
5.4 INFRAČERVENÁ SPEKTROMETRIE.....	37
6 CÍL PRÁCE	38
II PRAKTICKÁ ČÁST	39
7 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40
7.1 MATERIÁLY A METODY.....	40
7.2 PŘÍPRAVA DCH.....	41
7.3 PŘÍPRAVA NANOGELŮ.....	43
8 VÝSLEDKY A DISKUSE	46
8.1 NANOGELY PŘIPRAVENÉ Z DCH1.....	46
8.2 NANOGELY PŘIPRAVENÉ Z DCH2.....	47
8.3 NANOGELY PŘIPRAVENÉ Z DCH3.....	49

8.4	NANOGELY PŘIPRAVENÉ S ACP S NASTAVENÝM PH.....	50
8.5	UVOLŇOVÁNÍ CP Z NANOGELŮ	52
	ZÁVĚR	55
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	56
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	60
	SEZNAM OBRÁZKŮ	60
	SEZNAM TABULEK.....	67

ÚVOD

Pojem nanogel se sice v odborných kruzích objevil teprve nedávno, ale i přes to se nanogely staly velmi důležitou součástí v oblasti přenosu léčiv. Je tomu tak především díky možnosti připravovat nanogely jak z přírodních, tak i ze syntetických polymerů, nebo dokonce i z kombinace obou dvou. Díky tomu jsme tak schopni připravit nanogely o různé velikosti a tvaru, s modifikovatelným povrchem a degradací. Spolu s velkým měrným povrchem částic jsou tyto vlastnosti ideální pro zakomponování léčiva do této struktury.

Nanogely je možné připravit i z kyseliny hyaluronové, která hraje velmi důležitou roli v lidském těle a je obsažena v mezibuněčné hmotě. Její biodegradabilita a biokompatibilita jsou ideální vlastnosti pro přenos léčivých látek. Díky navázání léčiva na kyselinu hyaluronovou může dojít ke snížení jeho toxicity, což je velmi důležité především u látek, které není možné podávat lokálně, ale jsou podávány intravenózně a cestují tak celým organismem. Mezi takové léky patří například některá protirakovinná léčiva jako je například cisplatina.

Důležitou součástí protirakovinného nosiče léčiv je jeho schopnost interagovat s rakovinnými buňkami nebo se v nich pasivně hromadit. EPR efekt je považován za způsob pasivního cílení tumorů u nanočástic, a tedy i u nanogelů. Tento efekt je způsoben vytvářením otvorů v cévách rakovinné tkáně o velikosti až 200 nm, kterými jsou schopny snadno pronikat částice s menším průměrem.

V této práci budu syntetizovat nanogely z oxidovaného hyaluronanu, které budou síťovány pomocí komplexu cisplatin. Cisplatina v této práci vystupuje také jako protirakovinné léčivo. Naším cíle je vytvořit nanogely, jejichž částice budou mít co nejmenší průměr a zároveň budou stabilní ve vodném prostředí. Připravené nanogely by měly být také schopny postupného uvolňování léčiva po co nejdelší dobu.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KYSELINA HYALURONOVÁ

Kyselinu hyaluronovou poprvé izolovali Mayer a Palmer v roce 1934. Popsali ji jako mukoidní látku získanou z hovězího sklivce v kyselém prostředí. Další výzkum odhalil, že se jedná o kyselý polysacharid, který je složený z glukosaminů a uronových kyselin. Pojmenování nového polysacharidu vzniklo z latinského pojmenování sklivce (hyaloid) a části jeho chemické struktury, uronové kyseliny[1]. Kyselina hyaluronová se v *in vivo* nevyskytuje jako protonovaná kyselina ale v podobě soli v závislosti na daném prostředí (sodné, draselné, vápenaté aj.)[2] Z tohoto důvodu je v této práci označována zkratkou HA, která pod sebou zahrnuje jak protoprotonovanou kyselinu hyaluronovou tak její soli nazávané hyaluronát nebo hyaluronan.

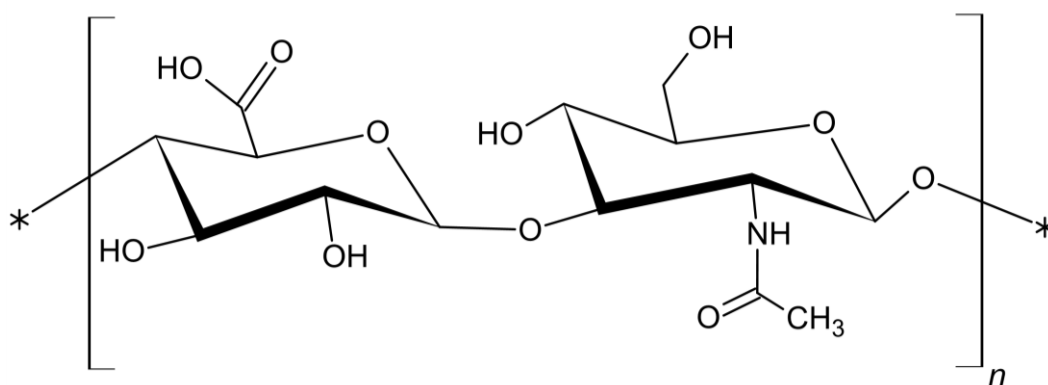
Převážná většina lidských tkání obsahuje ve své extracelulární matrix HA. Extracelulární matrix (ECM) je materiál složený z proteinů, glykosaminoglykanů a glykoproteinů, který vyplňuje mezibuněčné prostory. Extracelulární matrix je produkována především fibroblasty a buňkami vaziva. Více než 50 % celkové hmotnosti HA je lokalizováno ve střevech, plicích a kůži. Tyto hodnoty jsou velmi podobné téměř u všech obratlovců. Díky tomu existuje velké množství zdrojů, ze kterých je možné ji získávat. HA je nyní komerčně izolována z kůže, pupeční šňůry, synovialní tekutiny a kohoutích hřebínků nebo získávána pomocí fermentace z modifikované bakterie *Bacillus subtilis* (bacil senný) [2, 3]. HA je syntetizována membránovými proteiny označovanými jako HA syntázy (HAS). Obratlovci mají tři typy HAS označovaných jako HAS1, HAS2, HAS3, které se liší svou aktivitou a molekulovou hmotností (M_w) syntetizované HA. Syntázy HAS1 a HAS2 produkují vysokomolekulární HA. HAS3 vytváří nízkomolekulární HA a její aktivita je daleko vyšší než HAS1 a HAS2. Produkt těchto syntáz je poté transportován do buněk přes buněčnou stěnu pomocí transportního proteinu ABC (ATP Binding Cassette) [4].

1.1 Struktura HA

HA je mukopolysacharid (glykosaminoglykan) s lineárním nerozvětveným řetězcem složeným z disacharidických jednotek složených z kyseliny glukuronové a N-acetylglukosaminu. Oproti ostatním glykosaminoglykanům neobsahuje žádnou síranovou skupinu ani jinou modifikaci v celé délce svého řetězce. Molekulová hmotnost HA je velmi rozmanitá a je dána především zdrojem, ze kterého pochází, ale také závisí na funkci, kterou má vykonávat. Komerčně dostupná HA může tedy dosahovat až několika MDa.

Přesnou strukturu HA stanovili Weissman and Meyer v roce 1954 za využití hyaluronidáz, které jsou schopny hydrolyzovat N-acetylglukosaminidovou vazbu. Pro výzkum byly využity bakteriální hyaluronidázy a hyaluronidázy varlat. V obou případech byl výsledkem degradace ekvimolární poměr kyseliny glukoronové a N-acetylglukosaminu[1]. Dalším zkoumáním byla potvrzena lineární sktruktura HA (Obr. 1).

Vazba mezi k. glukoronovou a N-acetylglukosaminem je tvořena $\beta(1\rightarrow3)$ glykosidickou vazbou a od N-acetylglukosaminu ke kyselině glukoronové $\beta(1\rightarrow4)$ glykosidickou vazbou[2] (Obrázek 1). Podle rozsáhlé studie o struktuře HA je preferována konformace 4C_1 , při které jsou všechny substituenty v ekvatoriální pozici[5]. Tato konformace omezuje rotaci glykosidické vazby a má tak velký vliv na tuhost celého polysacharidického řetězce. Omezení rotace vazby napomáhá také objemná N-acetylová skupina v blízkosti glykosidické vazby[1]. Díky vlastnostem primární a sekundární struktury dochází u HA k vytvoření terciální struktury v podobě skládaného listu (β -sheet), která je stabilizována díky přítomnosti intramolekulárních vodíkových vazeb. Kvarterní strukturou je poté agregace těchto struktur díky nekovalentním interakcím a vytvořením molekulární matrix[2].



Obrázek 1 – Chemická struktura kyseliny hyaluronové

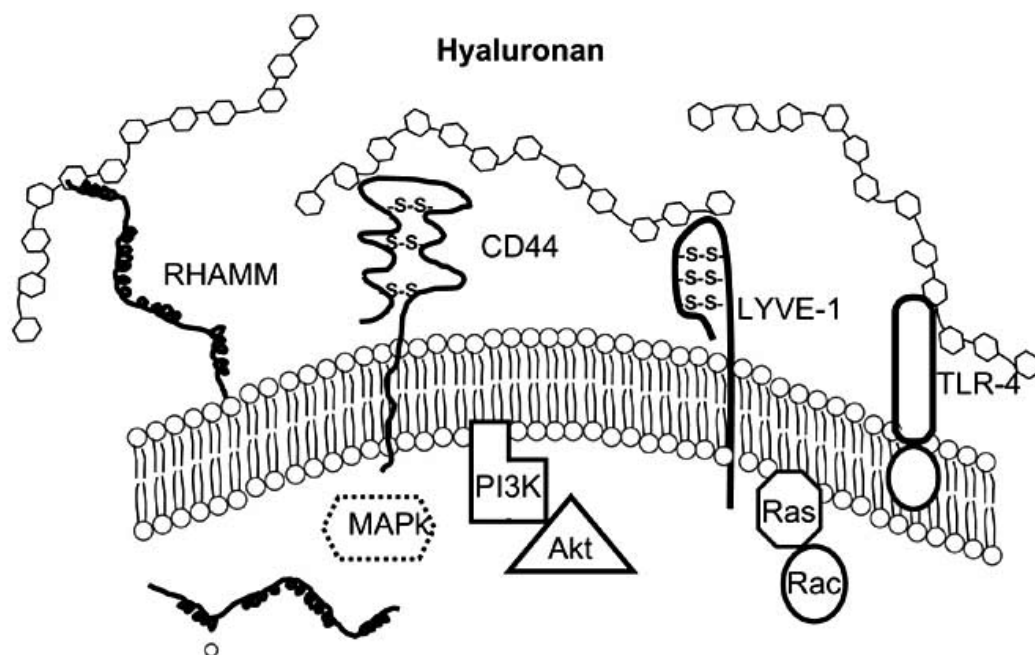
1.2 Vlastnosti HA

Pro představu, v lidském těle o váze 70 kg je kolem 15 g HA[6]. Jak bylo řečeno, HA je jednou ze základních složek extracelulární matrix. Díky její schopnosti zadržovat vodu ve své struktuře zde poté plní mnoho důležitých funkcí. Na základě studií bylo zjištěno, že

pokud je HA smíchána s vodou, získává neneutonské vlastnosti. Se zvyšující se koncentrací a molekulovou hmotností HA dochází růstu viskoelasticity tohoto roztoku. Viskoelasticita je zároveň závislá na pH tohoto roztoku a je tedy ovlivněna iontovou silou prostředí. Hodnota pKa HA se pohybuje kolem 3.0[2].

V lidském těle slouží jako výplň v některých orgánech, například ve sklivci nebo v kůži. Je obsažena v chrupavce, kde pomáhá absorbovat nárazy, nebo se nachází v synoviální tekutině v kloubech, kde snižuje tření mezi pohybující se tkání[1]. Její poločas rozpadu se pohybuje od 1 dne v pokožce až k 70 dnům ve sklivci oka. HA hraje také důležitou roli v buněčném cyklu. Bylo potvrzeno, že k proliferaci buněk dochází v extracelulární matrix bohaté na HA. Během mitózy buněk dochází totiž k její zvýšené produkci. První funkce HA na chování buněk je vytváření cest pro migraci buněk. Druhou funkcí je specifická interakce mezi HA a různými receptory.

Asi nejdůležitějším receptorem je glykoprotein CD44, který je odpovědný za internalizaci HA během vývoje kostí a plic[1]. Může také sloužit k udržování homeostázy, protože v místě zánětu dochází k navázání nízkomolekulární HA, která je zde štěpena přítomnými volnými radikály. Vzniklý komplex HA a CD44 poté vyšle signál mesenchymálním buňkám. Mezi další receptory patří například RHAMM (Receptor for Hyaluronate-Mediated Motility), GHAP (Glial HA binding protein) a LYVE-1 (Lymphatic Vessel Endothelial Hyaluronan Receptor 1) a další jsou zobrazeny na obrázku 2.



Obrázek 2 – Grafické znázornění receptorů a hyaluronanu na povrchu buňky[7]

Důležitou vlastností HA je její nativní biokompatibilita neboli schopnost organismu snášet materiál či látku. To je zapříčiněno tím, že HA se ve všech organismech vyskytuje ve stejné podobě, a proto se nemůže jevit imunitnímu systému jako cizí látka. Zároveň lidské tělo denně vytváří až několik gramů HA, a proto přidáním malého množství této látky do organismu nezpůsobí téměř žádné metabolické zatížení.

1.3 Využití HA

Kyselina hyaluronová ve své čisté formě má několik nedostatků, které komplikují její využití v některých aplikacích. Například se jedná o její špatné mechanické vlastnosti, poměrně rychlý poločas rozpadu nebo problém interagovat s některými buňkami. Pomocí modifikací HA je možné tyto vlastnosti zlepšit. Pro zlepšení mechanických vlastností a zvýšení stability je možné na HA navázat například pomocí karbodiimidů jako je N-Ethyl (N,N-dimethylaminopropyl) karbodiimid další látky nebo funkční skupiny, či případně vytvořit vazby mezi jednotkami HA a připravit tak zesíťovanou strukturu. Zesíťování může být docíleno aktivací karboxylových skupin, které následně vytvoří vazby s hydroxylovými skupinami. Síťování může probíhat i přidáním jiných látek do struktury HA, jako je divinyl sulfon nebo bis-epoxydy. Velké množství takto modifikovaných HA je v této době používáno v medicínských aplikacích nebo jsou v preklinické fázi[1].

První produkty z HA určené pro medicínské využití byly uznány v roce 1983 úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). Jednalo se o produkty Healon and Amvisc, které se využívaly při očních operacích. Byly používány například při operacích šedého zákalu, kde byla důležitá průhlednost a viskozita použité látky. Roztok používaný během operací měl koncentraci kolem 1% a pro jeho výrobu byla používána HA s molekulovou hmotností minimálně 1 MDa[1]. Za těchto podmínek je viskozita roztoku schopna udržet sítnici na jejím místě během operace. Zároveň je roztok čirý, takže nebrání chirurgovi v práci a nevytváří ani pooperační problémy pro pacienta.

Další velkou skupinou produktů založených na HA jsou kosmetické přípravky. Tyto produkty se převážně zaměřují na úpravy nedostatků pleti, jako jsou například vrásky[8]. Během testů dosahovaly přípravky z HA stejných, ne-li lepších výsledků než přípravky založené na kolagenu. V porovnání s krémy a chemickým peelingem je výsledek používání

produktů z HA výraznější a celkový proces méně invazivní. Příkladem komerčních produktů může být například Restylan a Hylaform. Oba tyto produkty obsahují zesíťovanou formu HA a to buď pomocí divinyl sulfonu (Hylaform) a nebo butanediolu diglycidyl etheru (Restylan). Důvodem pro použití zesíťované HA je požadovaný čas účinku. Ten je v případě zesíťované formy až 4 měsíce, zatímco u přírodní HA by účinky trvaly pouze 1 až 2 dny [1].

HA a její modifikace se klinicky také využívají ke zmírnění bolesti způsobené osteoartrózou. Rozsáhlé studie a následné klinické testy injekčního podání HA do poškozených kloubů potvrdili pozitivní vliv této terapie pro zmírnění bolesti pacientů. Výzkum zahrnoval testy u kloubů kolene, kyčle, ramene, kotníku a mandibulárního kloubu[1]. Účinnost terapie u pacientů s postiženým kolenním kloubem publikoval Lo *et al.* [9]. Studie provedená Reichenbach *et al.*[10] zkoumala, jestli je výsledek terapie rozdílný při použití zesíťované formy HA. Mírně lepších výsledků zmírnění bolesti dosahovala zesíťovaná forma HA. Docházelo u ní však k častějším vedlejším účinkům. Mezi komerční produkty používané k léčbě osteoartrózy kolene patří Hyalgan, Synvisc, Supartz, Orthovisc a Nuflexxa [1].

HA je také využívána ve veterinární praxi při léčbě poranění. Využívá se například v podobě kožních filmů určených ke zrychlení procesu léčení hlubokých poranění nebo popálenin. HA je zde modifikována pomocí dihydrazid adipové kyseliny a síťována pomocí PEG-dialdehydu. Při využití filmů u hlubokých ran dochází ke zvýšenému vytváření epitelové tkáně v průběhu 5-7 dnů a později také fibrovaskulární tkáně. Velmi podobných výsledků je dosaženo i u popálenin léčených s využitím těchto filmů. HA je schopna vytvářet u poranění vysoce hydratované prostředí, které umožňuje migraci buněk a vytváření dalších částí matrix. HA byla také využita pro pooperační účely v podobě Seprafilmu. Ten slouží ke snížení adheze operované tkáně po zákroku, kde je schopen fungovat až po dobu jednoho týdne. Studie těchto jevů byly provedeny u celé řady zvířat a do budoucna by měli posloužit jako základ pro vytvoření produktů pro lidské využití[1].

Jedním z novějších využití HA je vytváření syntetické extracelulární matrix. Hlavní výhodou využití HA je její schopnost vázat buňky na svůj povrch, napomáhání proliferace buněk a jejich růstu. Hydrogely z HA jsou například využívány k obalení embryonálních kmenových buněk. V tomto prostředí buňky zůstávají v jejich nediferenciovaném stavu a zachovávají si svůj karyotyp. Pozměněním podmínek prostředí je možné upravit vlastnosti hydrogelu a navodit tak diferenciaci buněk až v požadovanou chvíli[1].

1.4 HA jako nosič léčiv

Jak bylo zmíněno dříve, HA je schopna interagovat s několika receptory (CD44, RHAMM), je poměrně snadné ji modifikovat a jedná se o látku běžně se vyskytující v těle. Tyto faktory dělají z HA ideální nosič léčiv. Jednou z důležitých otázek u nosičů léčiv je jejich podání. Léčiva připravená z HA je možno podávat přes sliznice oka, nosu, plic, vstřebáním přes kůži nebo podání přímo do krevního řečiště [2].

Při lokálním podání léku přes pokožku je výhodou, že lék neprochází přes metabolismus jater, což zvyšuje jeho účinnost a nezpůsobuje systémovou toxicitu. Při tomto podání je ovšem nutno překonat několik překážek. Hned první je překonání zevní vrstvy kůže (stratum corneum). Ta slouží jako ochranná vrstva a zabraňuje vstřebávání některých hydrofilních molekul do hlubších částí kůže, kde se nacházejí cílové buňky. Což znamená, že je nutné tyto látky chemicky či fyzikálně modifikovat, aby byly tuto vrstvu schopny překonat a zároveň aby neprostupovaly dále do krevního řečiště. Studie provedená Brown *et al.*[11] prokázala, že gel z HA je schopen přivést látku diclofenac až do epidermis, kde dojde k jejímu zadržení. Studie probíhala v porovnání s jinými GAG (glykosaminoglykany) a farmaceuticky běžně používanými gelujícími činidly, která dosahovala horších výsledků než HA. Lin and Maibach poté zjistili že HA je schopna efektivně přivést až dvojnásobné množství diclofenacu v porovnání se sodnou solí dikarboxymethyl celulózy. Podobných výsledků dosahuje HA i jako nosič ibuprofenu, klindamycin-fosfátu a cyklosporinu[2].

V případě léčiv podávaných přes sliznici oka nebo jeho jiné části je HA skvělým nosičem těchto léčiv. Hlavními důvody jsou její vlastnosti popsané v kapitole 1.2 a 1.3. Jedná se především o schopnost vázat velké množství vody a interagovat s tkáněmi a buňkami přes receptory (CD44). Zároveň je HA součástí velké části těchto tkání (rohovka, duhovka, čočka, sklivec a sítnice) a hraje významnou roli při hojení rohovky a angiogenezi (proces tvorby nových krevních kapilár)[12]. Účinnost látek podávaných přes oko je však výrazně snižována kvůli statickým a dynamickým bariérám. Mezi statické bariéry oka se řadí jednotlivé vrstvy rohovky, spojivky, sklery a také sítnice. Mezi dynamické bariéry patří proudění krve v cévnatkách a spojivkách nebo naředění léčiva slzami. Proto existuje několik možností podání léku do oka. Mezi tři nejběžnější patří lokální podání látky přímo na oko, dále intravitrealní podání (vnesezení látky do zadní části oka) a nakonec periokulární podání (vnesezení látky do přímého okolí oka). Nejčastěji je používané lokální podání léčiv, protože se jedná o nejpříjemnější možnost pro pacienta, s nejmenšími riziky a možností podání léku samotným pacientem. Problémem jsou zde zmíněné bariéry oka, které omezují způsob

tohoto podání pouze na choroby přední části oka, jako jsou keratitida, alergie, infekce nebo glaukom (zelený zákal). U chorob zadní části oka se využívá nejčastěji intravitrealní podání, které nemusí překonávat bariéry oka a díky tomu je možné docílit vysoké koncentrace léčivé látky přímo v místě jejího účinku. Velkou nevýhodou tohoto podání je, že dochází k poškození oka a může dojít i k vážným problémům, jako je o GAG lípení sítnice, krvácení, katarakt (šedý zákal) nebo endoftalmitida (zánět nitroočních struktur). Mezi choroby léčené touto cestou patří makulární degenerace, diabetický makulární edém, virová retinitida atd. Třetí variantou je periokulární podání, které je střední cestou mezi lokálním a intravitrealním podáním. Je možné jej použít pro choroby přední i zadní části oka. Léčivo podané tímto způsobem musí ovšem překonat bariéry a navíc u něj hrozí zanesení léčiva do systémové cirkulace přes kapiláry na spojivce a cévnatce. Nosiče léčiv z HA pro oftalmologické použití mohou být ve formě viskózního roztoku, gelu, insertů (pevné nebo polopevné preparáty s velikostí a tvarem určeným pro oftalmologické použití) nebo jako nanočástice. Přípravou nanočástic pro přenos FK-506 (takrolimus) s pomocí HA se zabývala skupina Zeng et al.[13], která se snažila vytvořit alternativní terapii pro pacienty po transplantaci, kteří nereagují na léčbu steroidy nebo pomocí cyklosporinu.

HA se také používá jako nosič léčiv podávaných přes nosní sliznici. Při kombinaci HA s léčivem dochází ke zlepšení biodostupnosti a bioadheze. Díky zlepšené biodostupnosti je možné snížit množství účinné látky v dávce léku. To je zapříčiněno prodloužením retenčního času a lepším pronikáním léčiva přes slizniční epitel díky HA. Tyto vlastnosti HA jsou ovšem závislé na molekulové hmotnosti. Pozitivní účinky byly ověřeny pro HA s MW vyšší než 300 kDa[4]. Nejčastěji se léčivo podává v podobě kapek nebo aerosolu. Studie Souza-Fernandes et al.[14] potvrdila, že podávání HA spolu s antibiotiky mělo pozitivní efekt při terapii pacientů s chronickou bronchitidou. Došlo k urychlení léčby i při snížené dávce antibiotik a pacientům se zlepšila činnost plic i zkoušky výměny plynu. Výzkumná skupina Pandey et al.[15] zkoumala možnosti léčby glioblastomu (nádor mozku) pomocí nanočástic připravených z HA a posléze modifikovaných laktoferinem. HA zde sloužila jako marker pro protein CD44[4].

Důležitým způsobem podání léčiva je intravenózní podání. Na rozdíl od ostatních způsobů se jedná o ideální možnost podání léčiv, které mají účinkovat na větším množství míst v těle. Dále je také používáno pro podávání léčiv do vnitřních orgánů těla a především do jater. Nevýhodou tohoto způsobu podání je průchod léčiva metabolismem jater, ve kterém může dojít k jeho odbourání. Dalším problémem oproti ostatním způsobům podání může být

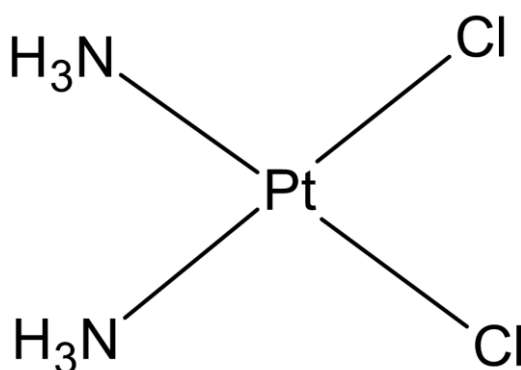
vysoká systémová toxicita. Studie provedená *Yu et al.*[16] se zabývala přípravou nanočástic určených k léčbě revmatoidní artritidy. Skupina se zabývala využitím dexamethasonu jako léčiva, který byl obalován HA pro zvýšení biokompatibility.

2 CISPLATINA

Jednou z nejčastějších příčin úmrtí v dnešní době je nádorové onemocnění. Až do nedávné doby se množství úmrtí meziročně zvyšovalo, což se ale změnilo s příchodem nových léčiv pro dříve neléčitelné diagnózy. Cytostatik jako takových bylo vyvinuto několik druhů a mezi tyto se řadí různé typy alkylačních látek, deriváty kyseliny listové, rostlinná léčiva, cytotoxická antibiotika nebo komplexotvorné látky ze skupiny platinových cytostatik[17].

Za objevitele platinových cytostatik je považován Barnett Rosenberg, který se v roce 1965 zabýval chováním bakterie *Escherichia coli* v elektrickém poli. Při svém výzkumu používal platinové elektrody, které během elektrolyzy uvolňovaly ionty platiny do roztoku. Uvolněná platina v elektrolytu následně vytvářela cis-diammindichloroplatnatý komplex (cisplatina). Ten způsobil, že buňky *Escherichia coli* stále rostly a prodlužovaly se, ale přestaly se dělit kvůli poškozené DNA. Tento objev vedl k velkému zájmu o studium a pozdější vývoj dalších platinových cytostatik[18].

Cisplatinu poprvé syntetizoval v roce 1845 Michele Peyrone a dlouho byla nazývána Peyronova sůl. Její strukturu popsal v roce 1892 Alfred Werner jako planární komplex s centrálním atomem platiny a dvěma ligandy NH_3 a dvěma ligandy Cl^- , jak je vidět na obrázku 3. Ligandy NH_3 jsou označovány jako nosné ligandy, což znamená, že na centrálním atomu zůstávají po celou dobu. Chloro ligandy jsou takzvané odstupující ligandy, a to znamená, že ve fyziologickém prostředí jsou nahrazeny jinými ligandy[19]. Cisplatina se klasicky vyskytuje v podobě prášku žlutooranžové barvy. Její molekulová hmotnost je $301,1 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, rozpustnost je $2,53 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ a hustota $3,74 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ [20].



Obrázek 3 – Strukturní vzorec cis-diammindichloroplatnatý komplex

2.1 Cisplatina jako léčivo

Nedlouho po objevu protinádorových vlastností byla cisplatina roku 1978 schválena FDA pro klinické využití v oblasti léčby různých nádorů. Od té doby byla a stále je hojně využívána pro léčbu široké škály nádorových onemocnění. Bylo prokázáno, že je možné ji využít při léčbě sarkomů, nádorů měkkých tkání. Především se jedná o rakovinu kostní dřeně, plic nebo cév. V dnešní době se cisplatina používá k léčbě nádorů varlat, vaječníků, plic, hlavy, krku, močového měchýře. Léčba pomocí cisplatiny probíhá podáváním nitrožilních injekcí jednou za 3 až 4 týdny. Tato dávka obvykle nepřekračuje $100 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ a je podávána v podobě vodného roztoku obsahujícího cisplatinu ($1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), chlorid sodný ($9 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), kyselinu chlorovodíkovou a hydroxid sodný pro úpravu roztoku na $\text{pH}=4$ [21].

Přestože se cisplatina osvědčila jako protinádorové léčivo, její použití spolu nese poměrně velké množství omezení a rizik. Mezi vedlejší efekty podání cisplatiny patří závažné problémy s ledvinami, alergické reakce, porušení nervových drah v míše, snížení imunity, gastrointestinální poruchy, krvácení a ztráta sluchu[20]. Dalším problémem je vytvoření rezistivity nádorových buněk při častém nebo dlouhodobém podávání léku.

Rakovina plic patří mezi nečastější typy maligních rakovinných onemocnění léčených cisplatinou. Lze ji rozdělit na dva typy podle velikosti rakovinných buněk v nádorech. SCLS (small cell lung cancers) je rakovina plic malých buněk. Nejčastějším faktorem pro její vznik je kouření a zastupuje téměř 15 % z celkového počtu veškerých rakovinných onemocnění. Při použití cisplatiny jako léčiva je největším problémem vysoká zátěž ledvin a mezi vedlejší účinky proto často patří nevolnost a zvracení. Druhým typem je NSCLS (non-small-cell lung cancer), který zahrnuje všechny typy rakoviny tkáně plic kromě SCLS. Cisplatina je zde používána pro pooperační terapii ve 2. a 3. stádiu. Pětiletá klinická studie potvrdila příznivý vliv používání cisplatiny při těchto pooperačních terapiích, jelikož došlo ke zvýšení počtu vyléčených pacientů o 5,3 %[22].

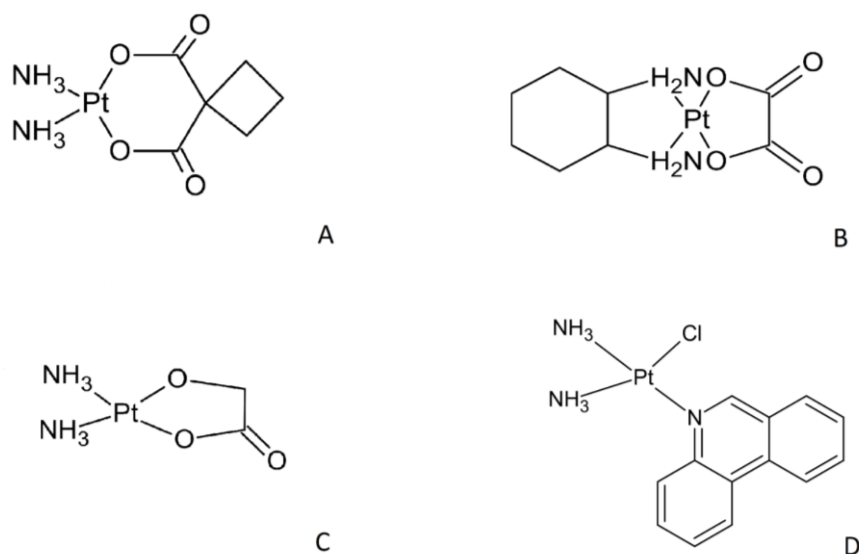
Dalším rakovinným onemocněním, kde se využívá cisplatina, je rakovina vaječníků, u které je největším problémem odhalení nemoci v brzkých stádiích, protože její symptomy nejsou dostatečně specifické pro její odhalení. Léčba se proto často skládá z chirurgického odstranění nádoru a chemoterapie pomocí kombinace cisplatiny a taxanu. Ač bývá první léčba účinná, tak u 75 % pacientů dochází k opakovanému návratu rakoviny, která si postupně buduje odolnost vůči cisplatině a pacienti podlehnou nemoci[20].

Tyto problémy vedly ke snaze kombinovat cisplatinu s jinými léky během terapie nebo dokonce k vytvoření nových komplexů na bázi platiny, jejichž chemické struktury jsou uvedeny na Obrázku 4. Druhé platinové cytostatikum uznané FDA v roce 2003 byla karboplatina. Její struktura je velmi podobná cisplatině, ale dva chloridové ligandy jsou nahrazeny bidentálním dikarboxylátem[23].

Bylo prokázáno, že mechanismus účinku karboplatiny je prakticky stejný jako u cisplatin, ale rozdíl je v kinetice této reakce. Karboplatina má nižší reaktivitu a její komplexy s proteiny nejsou tak rychle vylučovány z těla, což zajišťuje až desetinásobně delší dobu účinku. Díky tomu jsou i vedlejší účinky karboplatiny menší, a to včetně nefrotoxicity, což je její hlavní výhoda proti cisplatině. To ovšem zároveň souvisí i s její efektivitou, která je menší než u cisplatin, a je tedy nutno podávat vyšší dávky, přibližně 4:1 v porovnání s cisplatinou[20].

O rok později byla schválena oxaliplatina. Studie prokázala, že oxaliplatina je méně toxická než cisplatin a její terapie je pacienty lépe tolerována. Díky rozdílnému mechanismu reakce je účinná i u jiných typů rakoviny než cisplatin a karboplatina. Další velkou výhodou je, že u ní nebyl potvrzen vznik postupně získané rezistivity[24].

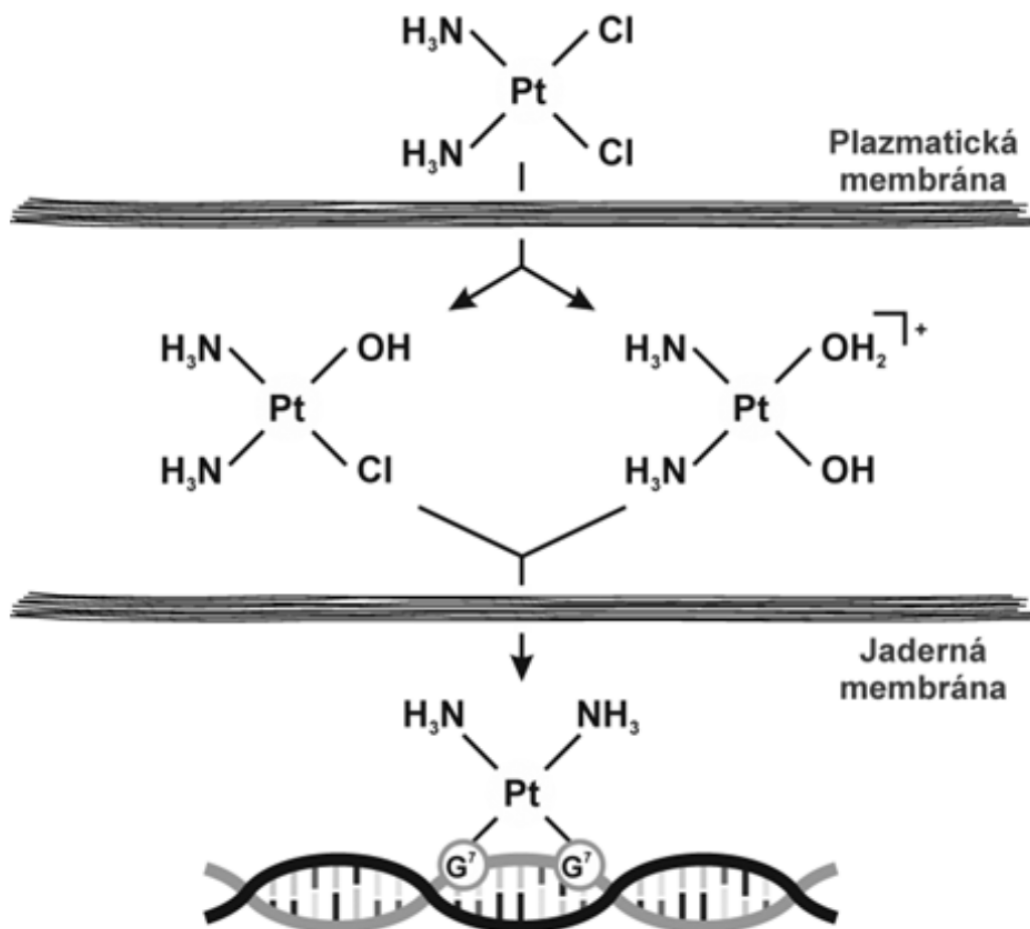
Dalším cytostatikem je například nedaplatina, která má podobnou strukturu jako karboplatina a sdílí i některé její vlastnosti. Její používání je omezeno převážně na Japonsko, protože dodnes nebyla uznaná FDA. Posledním příkladem platinových cytostatik je phenanthriplatina, která díky své struktuře dokáže lépe pronikat do rakovinných buněk a interagovat s DNA a která má na rozdíl od ostatních výrazně odlišný mechanismus účinku.



Obrázek 4 – Chemické struktury platinových cytostatik: A – karboplatina, B – oxaliplatina, C – nedaplatina, D – phenanthriplatina

2.2 Mechanismus účinku cisplatiny a vznik rezistivity

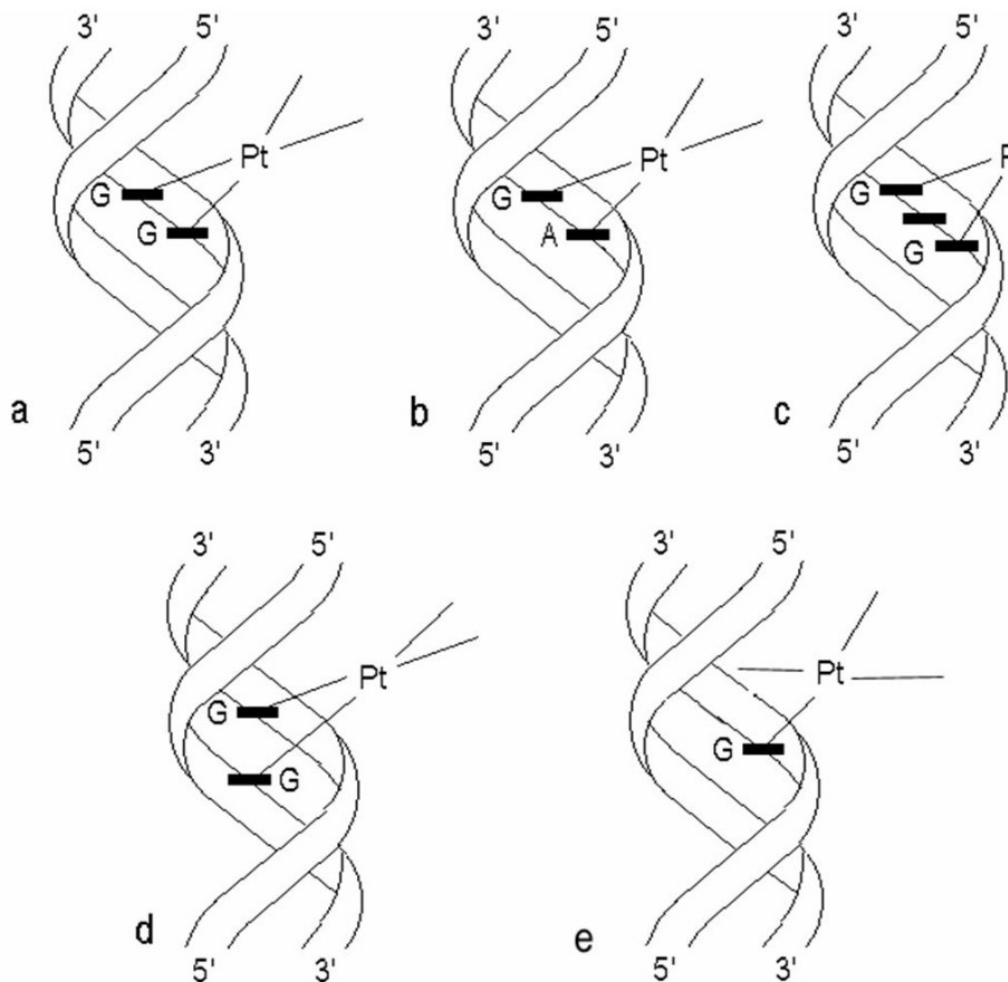
Pro dosažení léčebného účinku musí nejprve cisplatina překonat plasmatickou membránu buňky. Bylo prokázáno, že k přenosu platinových sloučenin slouží několik nosičů, jako jsou ATPázy (MRPs, ATP7A/B) a nosiče rozpustných látek (CTR1, AQP9). Příjem cisplatiny do buňky je řízen proteinem CTR1. To bylo potvrzeno i ve studii, kdy se cisplatina akumulovala v buňkách se zvýšeným počtem tohoto proteinu[20]. Přenos cisplatiny je podpořen také gradientem pH. Extracelulární pH zdravé tkáně je 7.3–7.4, zatímco u rakovinné tkáně se pH pohybuje mezi 6.2–6.9. Hodnoty intracelulárního pH pro zdravé buňky jsou uvedeny v rozmezí 6.99 až 7.05, zatímco pro rakovinné buňky to je 7.12 až 7.70[25]. Takto obrácený pH gradient je ideální pro cisplatinu, která se chová jako slabá kyselina.



Obrázek 5 – Schéma mechanismu cisplatiny po vstupu do buňky a následné vytvoření aduktu na dvoušroubovici DNA[19]

Po prostupu cisplatiny membránou dochází chemické reakci, kdy jsou chloridové ligandy nahrazeny molekulami vody. Reakce probíhá díky snížené koncentraci chloridových iontů v cytoplazmě. Kladně nabitý hydratovaný komplex je schopen reagovat s nukleofilními místy, jako jsou sulfhydrylové skupiny na proteinech nebo donorové atomy dusíku na DNA a RNA. Takto se cisplatina váže na N7 guaninu a adeninu a dojde k vytvoření monofunkčního aduktu. Cisplatina má však dvě reakční místa a díky tomu je schopná se navázat na dalším místě a vzniká bifunkční adukt, jak je vidět na obrázku 5. Ten se může vytvářet na jednom řetězci (IAC – intrastrand), anebo mezi dvěma řetězci (IEC – interstrand). Nejčastějším typem je vytvoření aduktu mezi dvěma sousedícími guaniny (1,2 – GG IAC). K jeho vytvoření dochází v 65 % všech případů. Druhé nejčastější můstky se vytvářejí mezi sousedícím adeninem a guaninem (1,2 – GA IAC) v 25 %. Můstek se může vytvořit i mezi guaniny, které jsou odděleny jednou bází (1,3 – GG IAC) s možností

5–10 %. Nejméně časté jsou můstky vytvořené mezi komplementárními řetězci[26]. Všechny adukty uvedené na obrázku 6 jsou schopny zabránit buňce v jejím dalším dělení a způsobit apoptickou smrt buňky.



Obrázek 6 – Znázornění různých druhů platinových aduktů na DNA. A - 1,2 – GG IAC, B – 1,2 – GA IAC, C - 1,3 – GG IAC, D – IEC, E – monofunkční adukt [26]

Další mechanismus buněčné smrti tumorových buněk souvisí se zvýšením oxidačního stresu v buňce. Ten je způsoben zvýšeným počtem ROS (reaktivní formy kyslíku) v buňce. Ve zdravých buňkách dochází k tvorbě ROS v mitochondriích během Krebsova cyklu a oxidativní fosforylace. Buňka odbourává vznikající ROS pomocí antioxidantních enzymů (superoxiddismutáza, mitochondriální Mn-SOD a cytosolová Cu, Zn-SOD) a neenzymatických antioxidantů (vitamin C, vitamin E, karotenoidy, thiolové antioxidanty)[27].

U tumorových buněk byla prokázána vyšší tvorba ROS z důvodu poškození mitochondrie a její aktivity. Z tohoto důvodu dochází v rakoviných buňkách k přeměně buněčného metabolismu na glykolýzu a omezení funkce mitochondrii. Tento fenomén se nazývá Warburgův efekt[25] a má za následek mírné snížení koncentrace ROS a tedy oxidačního stresu. Cisplatina vyvolává v buňce zvýšenou tvorbu ROS, která souvisí s okyselením mitochondrie a cytosolu a také snížením schopnosti buňky měnit svůj metabolický stav. Je známo, že okyselení cytosolu zabraňuje průběhu glykolýzy a podporuje oxidativní fosforylaci, která zapříčiní zvýšení produkce ROS. Cisplatina se také váže na mtDNA (mitochondriální DNA) a vytváří zde podobné adukty jako u jaderné DNA. Oproti jádru nemá mitochondrie opravné mechanismy, které by adukty odstranily. Takovéto poškození mitochondrie zpomaluje růst nádorů. Výsledkem těchto změn způsobených přítomností cisplatin je zvýšení oxidačního stresu na úroveň, která vede k buněčné smrti buňky[20].

Velkým problémem cisplatiny ale stále zůstává resistance nádorových buněk na její účinky. Tato resistance může být rozdělena do několika druhů v závislosti na části mechanismu účinku cisplatiny, který narušuje.

Prvním typem je resistance způsobená inaktivací transportních mechanismů cisplatiny pro vstup do buňky anebo redukce jejich aktivovaných komplexů pomocí buněčných proteinů. Důležitým transportérem cisplatiny přes buněčnou membránu je nosič mědi (High affinity copper uptake protein 1 - CTR1), jehož koncentrace je velmi proměnlivá v závislosti na typu buněk. Bylo také potvrzeno, že interakce cisplatiny s buňkou vyvolávají rychlou degradaci tohoto nosiče. Rezistivitu buňky na cisplatinu zvyšuje také přítomnost membránového proteinu TMEM20, jehož účinky byly potvrzeny u buněk jater, slinivky a nadledvinek[20].

Hydratovaný komplex cisplatiny se také ochotně váže na nukleofilní proteiny. Nejdůležitějším je glutathion (γ -glutamylcysteinylglycin), také označovaný jako GSH. Dále se může vázat na methionin, metalothioneiny a další proteiny s vysokým obsahem cysteinových skupin. GSH v buňce zastupuje funkci antioxidantu, takže jeho účinky snižují hlavně toxicitu cisplatiny vůči jaderné DNA[28].

Druhý typ resistance je oprava aduktů vytvořených na jaderné DNA, nebo schopnost tyto chyby naprosto ignorovat. Převážnou většinu oprav cisplatinových lézí DNA provádí systém opravy nukleotidové excize (NER). Dále mají buňky mismatch repair systém (MMR), ten slouží především k odhalení lézí na DNA, ale většinou je neschopen je sám opravit. Klasicky by tedy tento systém odhalil chybu, pokusil se ji opravit, neuspěl a vyslal signál

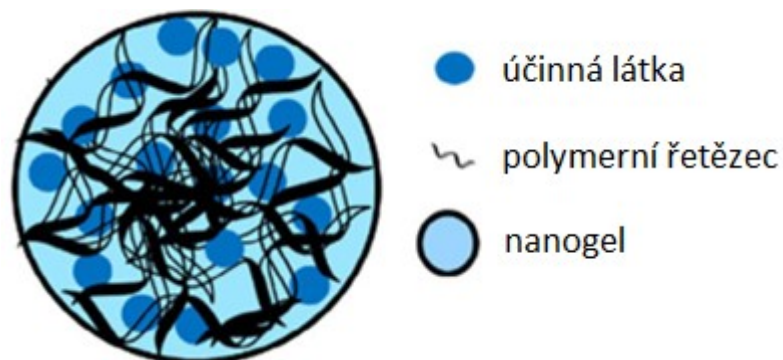
pro apoptickou smrt buňky. Studie ale prokázaly, že v rakovinných buňkách dochází k mutaci nebo potlačení vzniku některých proteinů tohoto systému[28].

Rezistivita může být také způsobena změnami a chybami vyvolaných mutací v signalizačních drahách apoptické smrti. To samé platí i pro mechanismy provádějící apoptózu. Mezi často pozměněné geny související se signalizací patří například TP53 a DNp63 α [28].

3 NANOGELY

Termín nanogel (NanoGel) poprvé použil Alexander and Serguei ve své práci v roce 2008 při popsání zesíťovaného bifunkčního systému z neiontového polymeru a polyiontu vytvořeného pro transport polynukleotidů. Nyní se tento pojem obecně používá pro vodní disperze hydrogelních nanočástic složených z fyzikálně nebo chemicky zesíťovaných hydrofilních polymerů, jejichž rozměry jsou menší než 200 nm[29]. Převážně se jedná o kulovité částice, jejichž vlastnosti jsou obdobné jako vlastnosti hydrogelů, jako je vysoká biokompatibilita, tvarová přizpůsobivost a schopnost udržet velké množství vody, aniž by došlo k rozpadu nebo degeneraci jejich struktury [30]. Další vlastnosti nanogelů připomínají ty, které jsou připisované nanočásticím, jako je velký měrný povrch, dobrá prostupnost do tkání přes receptory, kapiláry i biologické membrány a zvýšený čas výměny v krevním řečišti, což snižuje šanci na pohlcení makrofágy [31].

Nanogely mohou být připraveny z velkého množství přírodních polymerů, syntetických polymerů nebo jejich kombinací. Díky tomu je poměrně snadné modifikovat jejich vlastnosti změnou chemické struktury polymerů, ze kterých jsou složeny. Je možné ovlivnit náboj, velikost, tvrdost, odbouratelnost a amfipatický charakter molekul. Tyto vlastnosti z nich dělají ideální nosiče léčiv nebo jiných látek. Do své struktury jsou schopny začlenit různé druhy léčiv, fluorofory, peptidy, proteiny, nukleové kyseliny, a dokonce i anorganické nanočástice (zlato, stříbro a oxidy železa), jak je schematicky znázorněno na obrázku 7. Léčiva jsou ve struktuře udržována pomocí chemických vazeb, iontových interakcí, vodíkových můstků nebo pomocí hydrofobních interakcí. Vlastnosti nanogelů podporují cílení léčiva díky schopnostem reagovat na podněty, měkkosti, či bobtnání a zajišťují ochranu začleněné látky před degradací a odstraněním ze systému. Další cílení nanogelů může být dosaženo navázáním chemických struktur na polymerní řetězce[30].

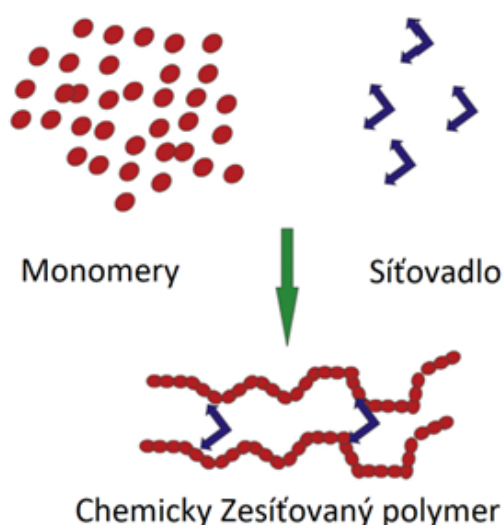


Obrázek 7 – Schéma struktury nanogelu a začleněné účinné látky v něm[32]

3.1 Dělení nanogelů podle způsobu přípravy

Nejjednodušeji můžeme nanogely rozdělit do dvou kategorií podle typu zesíťování. Fyzikálně zesíťované nanogely jsou spojeny vazbami vznikajícími pomocí fyzikálních procesů, jako jsou krystalizace, elektrostatické interakce, asociace, Van der Waalsovy síly nebo vodíkové můstky. Vlastnosti nanogelu jsou zde silně závislé na struktuře použitého polymeru, iontové síle disperzního média a množství použitého síťovacího činidla. Fyzikální zesíťované nanogely obvykle vznikají rychleji než chemicky vázané[31].

Druhou kategorií jsou chemicky zesíťované nanogely. Struktura těchto nanogelů je vytvořena pomocí kovalentních vazeb vznikajících mezi polymerem a síťovadlem (obrázek 8), nebo může docházet i k vazbě mezi jednotlivými polymerními řetězci. Tyto vazby jsou daleko silnější než ty u fyzikálně zesíťovaných polymerů. Vlastnosti nanogelu jsou ovlivněny typem chemické vazby a funkčními skupinami přítomnými na polymerech.



Obrázek 8 – Schéma chemického síťování s použitím síťovadla z monomeru [31]

Existuje několik přístupů, jakými je možno připravit zesíťované nanogely. Prvním je fotopolymerizace, kdy syntéza probíhá za použití světla. Při použití této metody není zapotřebí žádné síťovadlo nebo surfaktant a k iniciaci reakce monomerů se používá pouze UV světlo. Tímto způsobem je připravován například nanogel z N-isopropyl akrylamidu[33].

Další možností je emulzní polymerace, jejímž výsledkem je chemicky zesíťovaný nanogel. Pro syntézu je zapotřebí monomer, organické rozpouštědlo, surfaktant, síťovací činidlo a voda. Takto dojde k vytvoření organické fáze, která je následně ozářena a očištěna pro získání výsledného nanogelu. Tato metoda se využívá pro přípravu nanogelů z polyakrylamidu, polyethyleniminu a polyvinyl alkoholu[33].

Třetí možností je fyzikální samouspořádání interaktivních polymerů (Physical self-assembly of interactive polymers). Používá se především pro přípravu nanogelů obsahujících proteiny, protože touto metodou je možné obalit poměrně velké částice. Příprava probíhá ve vodním prostředí, kde dochází k akumulaci hydrofilních polymerů, které mezi sebou vytváří hydrofobní nebo elektrostatické interakce podporované vodíkovými můstky[34]. Byl takto připraven například cholesterolem modifikovaný pullulan enkapsulující inzulin[35].

Velmi rozmanitým typem přípravy nanogelů je chemické síťování předem připravených polymerů. Tyto typy reakce zpravidla probíhají ve vodním prostředí. Patří sem karboimidová reakce (carbodiimide coupling reaction), která se používá pro přípravu pH senzitivních chitosanových nanogelů. Další je Michaelova adiční reakce (Michael addition reaction), která spočívá v modifikaci hydroxy skupin s použitím thiolů nebo akrylátů. Často je používána pro přípravu dextranových nanogelů[31]. Poslední je polymerizace volných radikálů (free-radical polymerization). Tato metoda se opět používá pro práci s dextranem. Fotoinicializovaná radikálová polymerizace byla například použita i pro vytvoření lipidem potahované biodegradovatelné nanogely[36].

Příprava nanogelů může probíhat také pomocí heterogenní polymerizace kontrolovaných/živých radikálů. Jedná se poměrně novou metodu určenou pro syntézu různých biokonjugátů, jako je polymer-protein nebo polymer-peptid. Patří sem radikálová polymerace s přenosem atomů (ATRP), polymerace stabilních volných radikálů a polymerace reverzibilní fragmentace přenosu řetězců[33].

3.2 Příklady nanogelů a jejich využití

Nanogely jsou připravovány z polymerů, které můžeme rozdělit na přírodní a syntetické. U přírodních polymerů se jedná o polysacharidy, proteiny a peptidy, jejichž hlavní výhody jsou jejich kompatibilita, stabilita a netoxický charakter [31]. Většina nanogelů z přírodních polymerů je připravena chemickým zesíťováním. Mezi důležité polysacharidy používané pro přípravu nanogelů patří chitosan. Je možné jej získat deacetylací z chitinu nebo z krunýřů korýšů, kde je přítomen ve velkém množství. Díky jeho hydrofilní a kationtové povaze je schopen interagovat s negativně nabitými částicemi nebo molekulami. Spolu s jeho vlastností přilnout k povrchu sliznice to z něj dělá ideální materiál pro přípravu chytrého nosiče léčiv. Ve studii, kterou prováděla skupina *Schmitt et al.* [37] byl využit chitosan jako základ pro syntézu nanogelu pro přenos fotosenzibilizátorů pro léčbu zánětlivých onemocnění kloubů. Ve studii byly použity tři fotosenzibilizátory určené pro selektivní transport do makrofágů (Tetra-fenyl-porfyrin-tetrasulfonát, Tetra-fenyl-chlorin-tetra-karboxylová kyselina, Chlorin e6). Testy potvrdili, že po enkapsulaci léčiva nanogelem došlo ke zvýšení retenčního času a také ke zvýšení účinnosti léčby.

Dalším příkladem polysacharidu hojně využívaného pro přípravu hydrogelů a nanogelů je alginová kyselina. Spíše známá pod označením alginát, jež zahrnuje všechny její soli. Kyselina alginová je složena z α -L-glukuronové kyseliny a β -D-manuronové kyseliny, které tvoří lineární řetězec. Jejimi důležitými vlastnostmi je vysoká rozpustnost ve vodě, biokompatibilita a afinita ke gelování za určitých podmínek. Díky jejímu anionovému charakteru ochotně reaguje s většinou kationtových částic za vzniku hydrogelů. Nejčastěji se tato reakce provádí s chloridem vápenatým. Vědecká skupina *Ahmad et al.* [38] testovala vlastnosti léků tuberkulózy po jejich enkapsulaci v alginátovém nanogelu. Studie pracovala se třemi léčebnými látkami (isoniazid, rifampicin a pyrazinamid). Efektivita enkapsulace látek se pohybovala kolem 80 % a následné testy prokázaly zvýšení účinnosti léčiv. Připravené nanogely byly schopny účinnou látku uvolňovat až po dobu 15 dní, což je velká výhoda oproti podávání čistého léčiva, které v systému zůstává pouze po dobu jednoho dne.

Heparin je mukopolysacharid široce používaný pro snížení srážlivosti krve. Jeho struktura je složena ze zbytků uronové kyseliny a D-glukosaminu [39]. Struktura heparinu je zároveň závislá na zdroji původu. Klasicky je izolován z prasečích střev nebo kravských plic. Vědecká skupina *Park et al.* [40] pracovala s kombinací makrogelu vytvořeného z želatiny a nanogelu z heparinu, který sloužil jako transport pro fibroblastový růstový faktor pro léčbu močové inkontinence. Výsledky testů ukázaly, že při použití heparinového nanogelu je

růstový faktor uvolňován po dobu až 28 dní. Zároveň použitý makro/nanogel podporuje regeneraci svalové tkáně v oblasti močové stěny, což vede k obnovení její biologické funkce.

Příkladem syntetických polymerů používaných pro přípravu nanogelů je polyvinylalcohol, známý pod zkratkou PVA. PVA je připravován radikálovou polymerizací vinylacetátu následovanou jeho hydrolyzou, které se vytvářejí hydroxylové skupiny schopné dalších reakcí. Mezi jeho hlavní přednosti patří schopnost tvořit krystality, jeho mechanická odolnost a možnosti síťování pomocí fyzikálních i chemických vazeb.[31] Příkladem použití PVA pro přenos léčiv je studie provedená *Li et al*[41], která se zabývala přípravou nanočástic pro přenos léčiv na bázi proteinu. Ve studii byl použit hovězí sérový albumin, který se podařilo zachytit v PVA nanočásticích a zajistit tak jeho postupné uvolňování až po dobu 30 h.

Často používaným syntetickým polymerem je poly-N-isopropylacrylamid označovaný také jako NIPA nebo PNIPAM. Jedná se o termoresponzivní polymer s LCST přechodem při teplotě 32 °C v čistém stavu. Kopolymerizací s hydrofilními nebo hydrofobními polymery je možno tuto teplotu řídit[42]. Díky této vlastnosti je ideálním polymer pro přípravu smart nanogelů pro přenos léčiv s postupným uvolňováním. Kopolymer PNIPAMu a polyethyleniminu byl vytvořen jako termoresponzivní nosič DNA pro genové terapie.[43]

Nanogely byly připraveny také z polyvinylpyrrolidonu, známého také pod zkratkou PVP. Jedná se o biokompatibilní polymer rozpustný v polárních rozpouštědlech, jehož vodný roztok zachovává newtonovskou viskozitu. Vědecká skupina *Hassan et al.*[44] použila PVP spolu s kyselina akrylovou pro syntézu nanogelů pro postupné uvolňování pilokaprinu v podobě očních kapek. Studie prokázala, že připravené nanogely byly schopny zadržet téměř 50 % polikaprinu po dobu 6 hodin. Reologické vlastnosti připravených očních kapek měly nízkou viskozitu a pseudoplastické vlastnosti, které jsou výhodné pro nosič léčiv určený pro sliznici oka.

Nanogely je možné připravit také z HA, která je použita i v této práci. Její vlastnosti jsou podrobně popsány v Kapitole 1.2. Příkladem nanogelů připravených z HA je studie provedená skupinou *Ohta et al.* [45]. Nanogely byl připravovány z modifikované HA pro přenos cisplatinu, která slouží jako protirakovinné léčivo.

3.3 Nanogely pro léčbu rakoviny

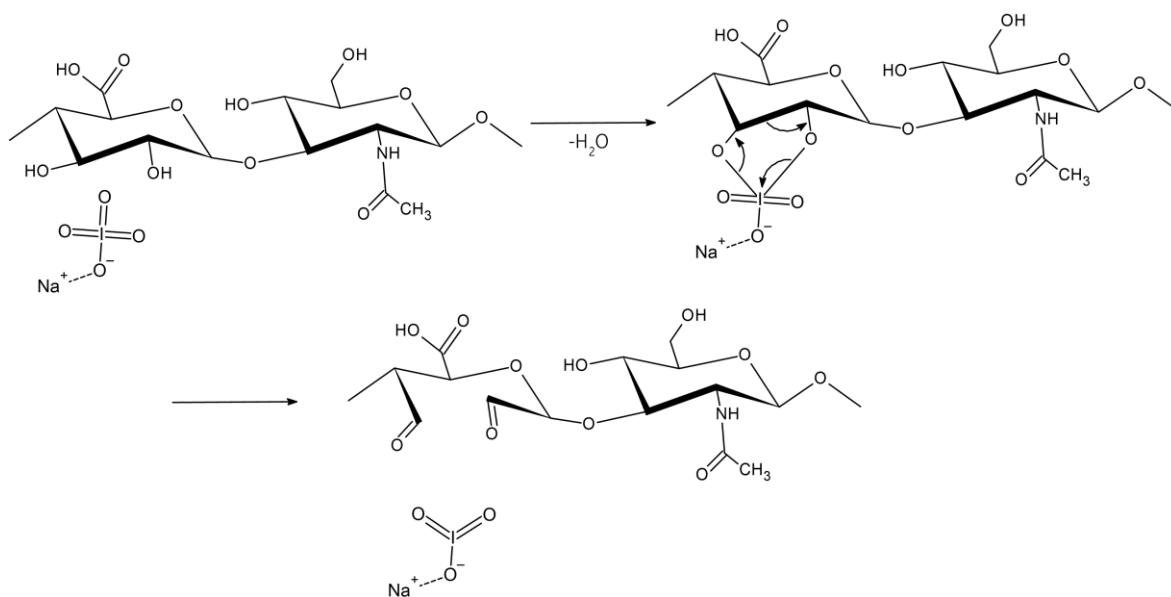
Nanogely sloužící jako nosiče látek určených k léčbě rakoviny by měly splňovat některá kritéria jako je biokompatibilita a biodegradabilita, schopnost cirkulovat po delší dobu v krevním řečišti, postupně uvolňovat léčivo, být schopné efektivně vázat velké množství léčiva a ochránit jej před reakcí imunitního systému. Další velmi důležitou vlastností nanogelu je velikost jeho částic, která by se měla pohybovat mezi 10 – 200 nm[46]. Taková velikost totiž podporuje pasivní cílení nosiče léčiva. Tento jev se nazývá EPR efekt (Enhanced Permeability and Retention efekt) a je způsoben abnormální strukturou nádorové tkáně, která vzniká během jejího rychlého růstu. Především se jedná o cévy, které kvůli urychlenému růstu postrádají vrstvu hladké svaloviny, a proto dochází k vytváření až 200 nm otvorů v jejich stěnách. Těmito otvory mohou poté snadněji prostupovat částice s menším poloměrem. Díky tomu nakonec dojde ke zvýšenému usazování těchto částic v rakovinné tkáni[47].

4 2,3-DIKARBOXYHYALURONAN

2,3-Dikarboxyhyaluronan je funkční derivát kyseliny hyaluronové. Základní disacharidová jednotka kyseliny hyaluronové obsahuje jednu karboxylovou skupinu a to znamená, že na nanogel připravený z kyseliny hyaluronové je možné navázat jen relativně omezené množství účinné látky. Tento problém je často řešen navázáním ligandů s vyšším počtem karboxylových skupin[48], kdy byly použity chelátové ligandy (kyselina iminodioctová a kyselina malonová). Další možností modifikace HA pro přípravu hydrogelů je její oxidace na 2,3-dialdehyd hyaluronan. Takto připravený dialdehyd je možné znovu oxidovat za vzniku 2,3-dikarboxyhyaluronanu, který má tři karboxylové skupiny v opakujícím se dimeru. Touto modifikací dochází zachování důležitých vlastností HA a zároveň dojde ke zvýšení schopnosti navázat cisplatinu do své struktury a vytvořit tak nanogel[49]. Právě tomuto derivátu se věnuji v této práci.

4.1 Resioselektivní oxidace HA

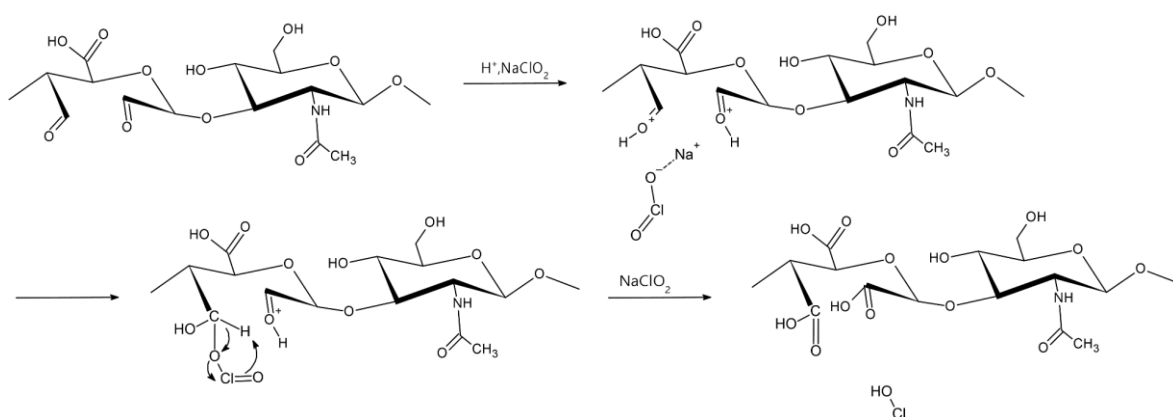
Regioselektivní oxidace polysacharidů na dikarboxypolysacharidy je dvoustupňová reakce, podmíněná přítomností hydroxylových skupin na sousedních uhlíkových atomech. První oxidace probíhá na tomto vicinálním diolu za použití jodistanu sodného (NaIO_4 , tzv. periodátu) nebo tetraacetátu olovnatého ($\text{Pb}(\text{OAc})_4$). Průběh a výsledek této reakce jsou na obrázku 9.



Obrázek 9 – Schéma primární oxidace HA za použití jodistanu sodného. Vzniká 2,3-dialdehydhyaluronan

Během oxidace dochází ke štěpení vazby mezi těmito vicinálními uhlíky a vytvoření aldehydických skupin. Průběh této reakce je podmíněn orientací hydroxylových skupin vicinálních uhlíku, a to ekvatoriální-ekvatoriální nebo axiální-ekvatoriální. Oxidaci periodátem lze zastavit přidáním ethylen glykolu, který přednostně reaguje se zbytkovým činidlem[49].

Pro přípravu 2,3-dikarboxyhyaluronanu (DCH) je nutné provést sekundární oxidaci pomocí chloritanu sodného, který reaguje s aldehydickými skupinami a dochází k vytvoření karboxylových skupin. Reakce je zastavena hydroxidem sodným a dochází tak k vytvoření sodné soli. Průběh této reakce je znázorněn na obrázku 10.

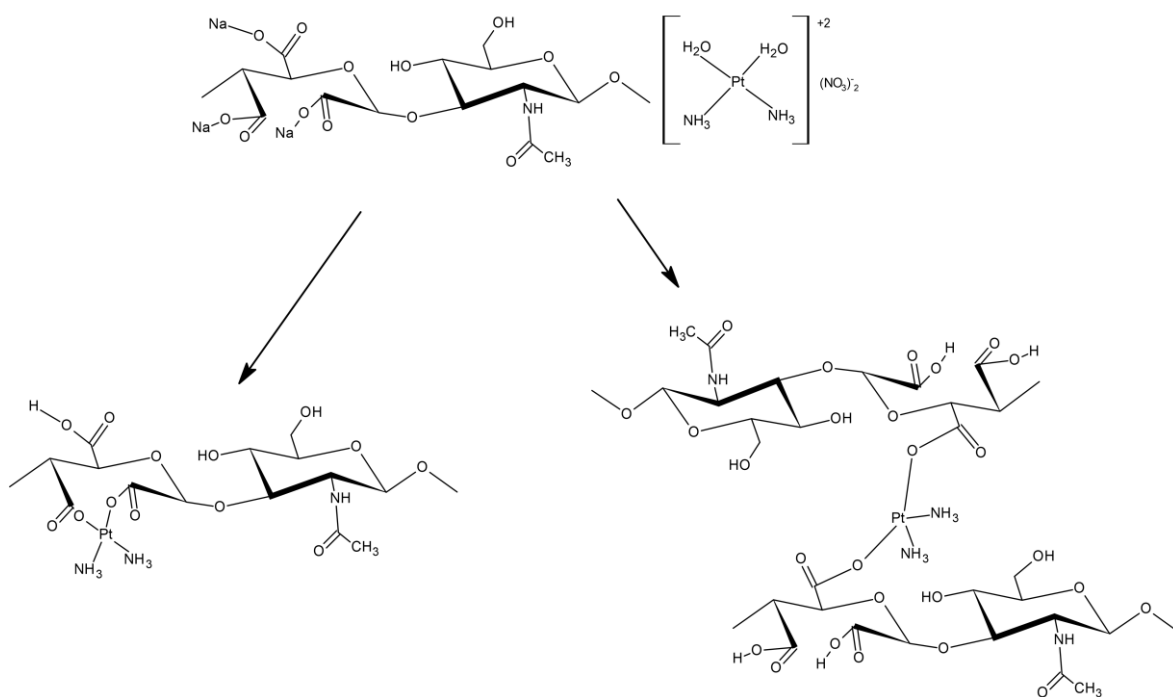


Obrázek 10 – Schéma sekundární oxidace za použití chloritanu sodného. Vzniká 2,3-dikarboxyhyaluronan.

Studie provedená *Münster et al.*[50] prokázala možnost řídit hmotnostní střed molárních hmotností (M_w) u polysacharidů v průběhu selektivní oxidace. Pokud je před sekundární oxidací do reakce přidána kyselina amidosulfonová (H_3NSO_3), dojde k sulfonaci indukovanému štěpení řetězce. Štěpení probíhá přes aldehydické skupiny, na které se naváže skupina $-SO_3H$. V takové pozici je $-SO_3H$ schopna účinně protonovat kyslík glykosidické vazby a započít kyselou hydrolyzu. Rozsah protonace je možné ovlivnit pomocí množství přidané kyseliny amidosulfonové nebo časem této reakce. Díky tomu je možné řídit M_w připravovaného dikarboxyhyaluronanu. Touto metodou je možné také docílit snížení polydisperzity připravované látky, což je výhoda při syntéze nanogelů určených pro léčbu rakoviny[50]. Této metody bylo využito také v této práci pro přípravu částic nanogelů na bázi dikarboxyhyaluronanu (DCH).

4.2 Syntéza nanogelů DCH

Pro vytvoření nanogelu z dikarboxyhyaluronanu je nutné zesíťovat jeho polymerní řetězec. V této práci má připravený nanogel sloužit jako nosič protirakovinného léčiva cisplatinou, které zde zároveň slouží jako síťovadlo. V dřívější práci při syntéze dextranových nanogelů pro přenos cisplatinou[51] bylo zjištěno, že velká část cisplatinou je na nanogelu navázána pouze fyzikálně a to mělo negativní dopad na kinetiku jejího uvolňování. U cisplatinou je možné zvýšit její reaktivitu pomocí dusičnanu stříbrného. Po jeho reakci s cisplatinou dojde k vytvoření dusičnan diaqua diamino platnatého komplexu, který je reaktivní a váže se na karboxylové skupiny DCH a který byl použit v této práci při syntéze nanogelů. Navázání cisplatinou může probíhat více způsoby v závislosti na množství a pozici funkčních karboxylových skupin v jednotce polysacharidu. Dikarboxyhyaluronan totiž obsahuje tři karboxylové skupiny, které mohou reagovat s cisplatinou. Karboxylová skupina v poloze 6 je osamocená a monodentátně navázaná cisplatinou může sloužit pro vytvoření vazby s dalším řetězcem a síťovat tak nanogel. Skupiny v poloze 2 a 3 jsou v ideální vzdálenosti pro bidentátní vázání cisplatinou (chelataci), jak je vidět na obrázku 11. Tato metoda vázání je upřednostňována, ale i na těchto karboxylových skupinách může za předpokladu nadbytku cisplatinou docházet k vytvoření pouze jedné vazby a k tvorbě síťování s dalším řetězcem.



Obrázek 11 – schéma reakce dikarboxyhyaluronanu s dusičnan diaqua diamino platnatým komplexem. A dva pravděpodobné výsledky této reakce.

5 POUŽITÉ METODY

Nanogely připravené v této práci mají sloužit jako nosič léčiv proti rakovině a měly by splňovat požadovaná kritéria. Hlavním sledovanou vlastností byla velikost částic nanogelu, která byla zjišťována metodou DLS (Dynamic Light Scattering). Jako další byla hodnocena stabilita nanogelu ve vodném prostředí pomocí měření zeta potenciálu. Poslední měřenou vlastností byla uvolňování léčiva z nosiče, které bylo vyhodnoceno pomocí XRF (X-ray fluorescence) spektroskopie.

5.1 Dynamic light scattering

Metoda DLS slouží k určení velikosti částic koloidního roztoku. Samotná metoda je založena na rozptylu světla dopadajícího na částice. Pro tento účel slouží laser, který prochází skrz koloidní roztok. Dopadající světlo je rozptýleno na základě velikosti částice. Pokud je částice menší než desetina vlnové délky dopadajícího světla, dochází k tzv. elastickému rozptylu, kdy rozptýlené a dopadající světlo má stejnou energii a není závislé na úhlu dopadu. Takovýto rozptyl světla se nazývá Rayleighův rozptyl. Pokud je ovšem průměr částice větší než desetina vlnové délky, dochází k neelastickému rozptylu a energie rozptýleného paprsku začne být závislá na úhlu dopadu a není již totožná s energií dopadajícího paprsku. V takovém případě se jedná o Mieův rozptyl[52].

Zetasizer Nano využívá této metody při měření vzorků a díky matematickým úpravám je schopen vykreslit křivku procentuálního zastoupení částice podle velikosti. Nejdůležitějšími daty jsou průměrná velikost částic zastoupených v roztoku vyjádřená jako hydrodynamický průměr (R_h) a index polydisperzity (PDI). Termín polydisperze popisuje stejnorodost rozložení velikosti částic ve vzorku. Vysoce monodisperzní distribuce částice je u vzorků s hodnotou PDI menší než 0,05. U nanonočástic určených pro přenos látek by hodnota PDI měla být pod 0,3. Nad touto hodnotou je totiž možné, že jednotlivé částice budou mít příliš rozdílné vlastnosti. Hodnota 0,7 označuje velkou distribuci velikosti částic ve vzorku[53].

5.2 Zeta potenciál

Další důležitou vlastností nanogelů je stabilita jejich částic v koloidním roztoku, kterou je možné hodnotit podle zeta potenciálu. Zeta potenciál nebo také elektrokinetický potenciál je rozdíl potenciálu mezi elektrickou dvojvrstvou a prostředím, které ji obklopuje. Podle jeho hodnoty je poté možno určit elektrostatickou stabilitu koloidního roztoku. Hodnoty zeta potenciálu mohou být kladné i záporné, a proto je nejlepší uvažovat o jeho absolutní hodnotě,

pokud mluvíme o stabilitě roztoku. Absolutní hodnota zeta potenciálu menší než 10mV označuje vysoce elektrostaticky nestabilní systém, 10 až 20mV je poté poměrně stabilní systém, 20 až 30mV je mírně stabilní systém a hodnoty vyšší než 30mV označují vysoce stabilní systém[52]. Samotná hodnota zeta potenciálu je určena z pohyblivosti částic. Zetasizer nano, který byl použit v této studii, používá k měření elektroforetické pohyblivosti laserový paprsek. Ten je rozdělen na dva paprsky, z nichž jeden prostupuje vzorkem a druhý slouží jako referenční. Z rozdílu frekvencí paprsků (Dopplerova posunu) je poté možné spočítat pohyblivost částic[54].

5.3 X-ray fluorescenční spektroskopie

Pomocí metody XRF je možné určit procentuální zastoupení prvku ve vzorku. Z této hodnoty je poté možno určit efektivní vázání látky v nosiči a její postupné uvolňování. Metoda je založena na ozáření vzorku rentgenovým zářením, které způsobí excitaci elektronů z core orbitalů (hluboké orbitaly). Tato excitace zapříčiní vyzáření kvanta energie ve formě fotonu. Každý atom vyzařuje specifické kvantum energie a díky tomu je možné určit látkové složení vzorku. Metoda XRF se dá používat ke kvalitativní, ale i kvantitativní analýze vzorku.

5.4 Infračervená spektrometrie

Jedná se o nedestruktivní metodu poskytující informace o složení vzorku. Metoda spočívá v ozáření vzorku infračerveným zářením a následným měřením vibračních energií fotonů po interakci se vzorkem. Naměřené hodnoty souvisí s molekulovou geometrií, hmotností jader a pevností chemických vazeb[55].

6 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo syntetizovat vhodné nanogely z derivátu kyseliny hyaluronové určené k přenosu účinné látky cisplatinu do rakovinné tkáně. Cisplatinu v této práci slouží nejen jako léčivo, ale také jako síťovadlo připravených nanogelů. Práce se zabývá úpravou HA pomocí regioselektivní oxidace za vzniku dikarboxyhyaluronanu (DCH) o různých molárních hmotnostech. Dále se zabývá modifikací podmínek reakce CP a DCH a jejich vlivu na vlastnosti vzniklých nanogelů. Mezi sledované parametry patří teplota reakce, molární poměr mezi DCH a CP, pH roztoku během reakce a objem reakce. U připravených nanogelů byl sledován hydrodynamický průměr (R_h) a zeta potenciál pomocí Zetasizer Nano. Vzorky s vhodnými vlastnostmi byly poté charakterizovány pomocí XRF a u vzorku s nejvhodnějšími vlastnostmi pro přenos léčiva byla provedena uvolňovací zkouška.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

7 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7.1 Materiály a metody

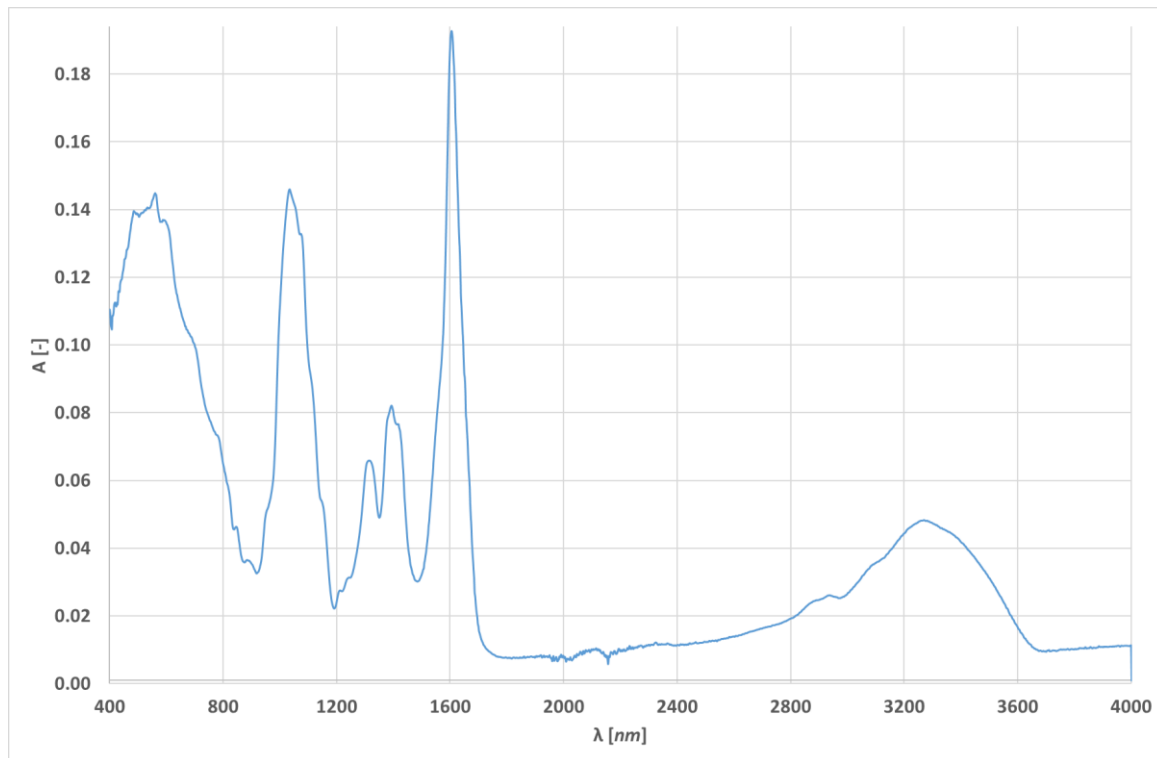
V této práci bylo pracováno s kyselinou hyaluronovou (Contipro) s M_w 500-750, 50-90 a 8-15 kDa. Mezi látky použité při primární oxidaci patřil jodistan sodný (NaIO_4) a ethylen glykol (čistota p.a., Penta, Česká republika). Sekundární oxidace AHA probíhala s použitím chloritanu sodného (NaClO_2 , 80 %), kyseliny octové (CH_3COOH , ≥ 99.8), octanu sodného trihydrátu ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; p.a.; Penta, Česká republika) a hydroxidu sodného (NaOH , ≥ 98 %) (Lachner, Czech Republic). Pro test uvolňování cisplatin z nanogelu byl použit fosfátem pufovaný solný roztok (PBS – Phosphate-buffered saline, pH 7,4, Invitrogen, USA). Dalšími chemikáliemi použitými v průběhu charakterizace vzorků byly dusičnan sodný (NaNO_3 , 99.8 %) (Lachner, Czech Republic) a dodekahydrát dihydrogenfosforečnanu sodného ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 99.6 %) (VWR, Czech Republic). Pro experiment byla využita demineralizovaná voda (0,1 μS). Na dialýzu produktů byly použity dialyzační membrány schopné zachytit látky o molární hmotnosti (MWCO - molecular weight cut-off) 10 kDa a 3,5 kDa (Sigma Aldrich Co.) M_w připravených DCH byla stanovena pomocí metody GPC, která byla provedena chromatografem Waters HPLC Breeze (Waters, USA) s detektorem indexu lomu Waters 2414 (teplota driftové trubice 60 °C), kolonou Tosoh TSK gel GMPWXL (300 mm \times 7.8 mm \times 13 μm , teplota 30 °C) a mobilní fází složenou z 0,1 M NaNO_3 a vodného roztoku 0,05 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$. Pro charakterizaci složení připravené cisplatin a DCH byla využita metoda infračervené spektroskopie. Pro měření byl použit spektrometr Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Fisher Scientific, USA) vybavený diamantovým krystalem. Měření se provádělo metodou ATR (Attenuated total reflectance – zeslabená úplná reflektance) v rozmezí vlnové délky 4000-700 cm^{-1} (rozlišení 4 cm^{-1} , 64 skenů s potlačáním vlivů atmosférického vzduchu). Měření zeta potenciálu a R_h bylo provedeno na přístroji Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK) pomocí metody DLS (Dynamic light scattering - Dynamický rozptyl světla) a Smoluchowského modelu. Měřené vzorky byly rozpuštěny ve vodě na koncentraci 0,1 mg/ml při teplotě 25 °C v kapilární květu DTS1070. Množství navázané cisplatin bylo stanoveno rentgenovou fluorescencí (XRF) pomocí Quant'X 30 EDXRF analyzátoru (Thermo Scientific, USA). Použité kalibrační standardy byly připraveny rozpuštěním známého množství cisplatin v PBS 7,4.

7.2 Příprava DCH

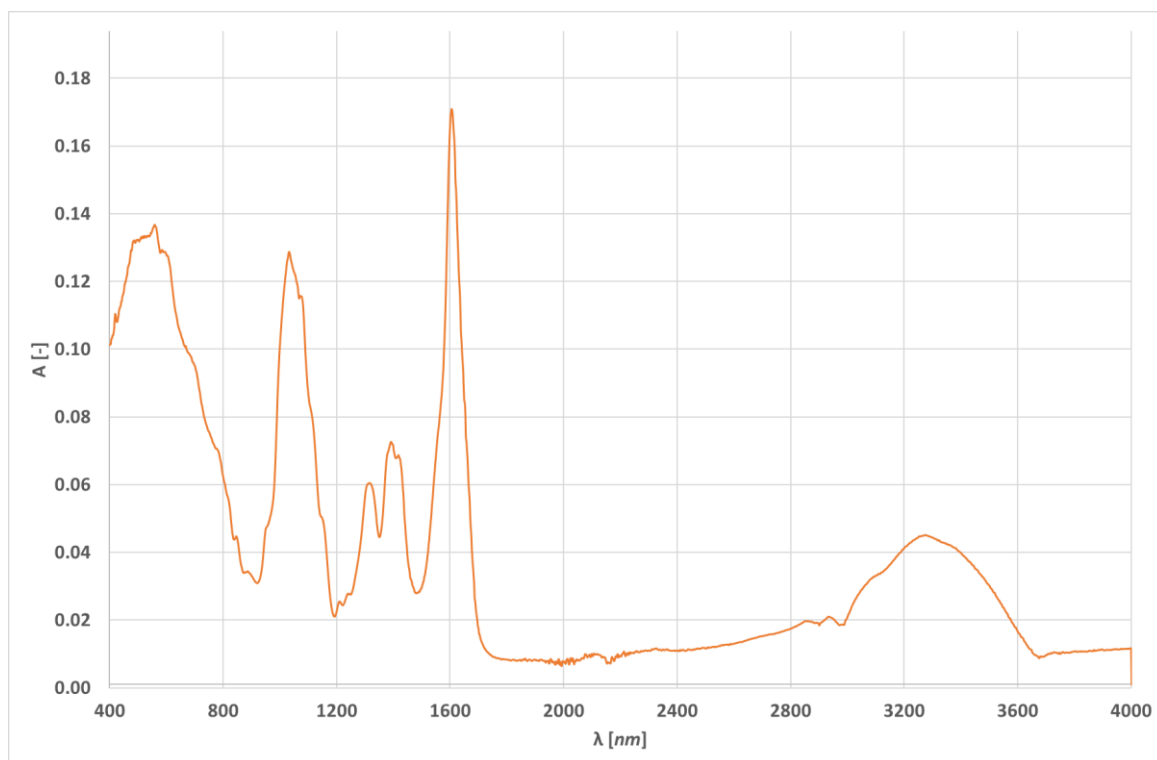
Primární oxidace HA byla provedena pomocí NaIO_4 . Hmotnostní poměr NaIO_4 a HA 1,65:1 byl převzat z předchozích studií[56]. HA o hmotnosti 1 g byla rozpuštěna v 50 ml vody za laboratorní teploty po dobu 24 h. Po rozpuštění HA bylo připraveno oxidační činidlo v podobě 1,65 g periodátu, který byl rozpuštěn v 50 ml vody při teplotě 30 °C po dobu 30 minut bez přístupu světla. Oba roztoky byly smíchány v 100 ml reakční láhvi, která byla ponořena do vodní lázně a umístěna do digestoře se zamezeným přístupem světla. Vodní lázeň byla zahřata na teplotu 30 °C. Do vodní lázně i reakční láhve byla umístěna magnetická míchadla a reakce takto probíhala po dobu 24 hodin. Zastavení reakce proběhlo přidáním nadbytku ethylenglykolu vůči molárnímu množství periodátu. Produkt byl následně převeden do dialyzační membrány s MWCO („Molecular-weight cut-off“) = 14 kDa (membrána schopná zadržet látky o molární hmotnosti vyšší než 14 kDa) a byl dialyzován v roztoku NaCl (0,01 M) po dobu 2 dnů. První tři hodiny byla voda měněna každou hodinu a poté jednou za 12 hodin. Tento postup probíhal stejně u všech tří HA s různými molekulovými hmotnostmi. Po dialýze byl produkt lyofilizován a výsledkem byly tři produkty složené z dialdehydhyaluronanu (AHA) o různých M_w .

Sekundární oxidace byla provedena u všech tří vzorků AHA o různé M_w . Nejprve byl připraven pufr z kyseliny octové (0,055 M) a trihydrátu octanu sodného (0,045 M) rozpuštěných ve vodě. 1 gram vzorku byl poté rozpuštěn v 185 ml pufru a připravený roztok byl míchán pomocí magnetického míchadla za absence světla po dobu 1 hodiny. Poté bylo do roztoku přidáno 15 ml NaClO_2 (0,12 g/ml) a výsledný roztok tak měl 200 ml. Reakce pak dále probíhala za stálého míchání a absence světla ještě po dobu 24 hodin. Navážka NaClO_2 byla vypočítána tak, aby molární poměr aldehydických skupin v AHA a NaClO_2 byl 1:4. Při tomto výpočtu se počítalo se 100 % konverzí na aldehydické skupiny během primární oxidace. Všechny sekundární oxidace byly zastaveny úpravou pH roztoku na 8 pomocí několika kapek 5 M NaOH. Stejně jako u primární oxidace byl vzorky dialyzovány po dobu dvou dní v roztoku NaCl (0,01 M) a následně lyofilizovány. Výsledkem sekundární oxidace byla sodná sůl dikarboxyhyaluronanu (DCH) o třech různých M_w . Charakterizace vzorků proběhla pomocí metody GPC pro zjištění jejich M_w a infračervené spektroskopie pro ověření úspěšnosti provedené oxidace. Vzorky jsou dále označovány pod zkratkou DCH1, DCH2 a DCH3. U vzorku DCH1 byl naměřen hmotnostní střed molárních hmotností $M_w = 52$ kDa, index polydisperzity 2,09 a jeho IR spektrum je na obrázku 12. Pro vzorek DCH2 byl naměřen hmotnostní střed molárních hmotností $M_w = 37$ kDa, index polydisperzity 1,93

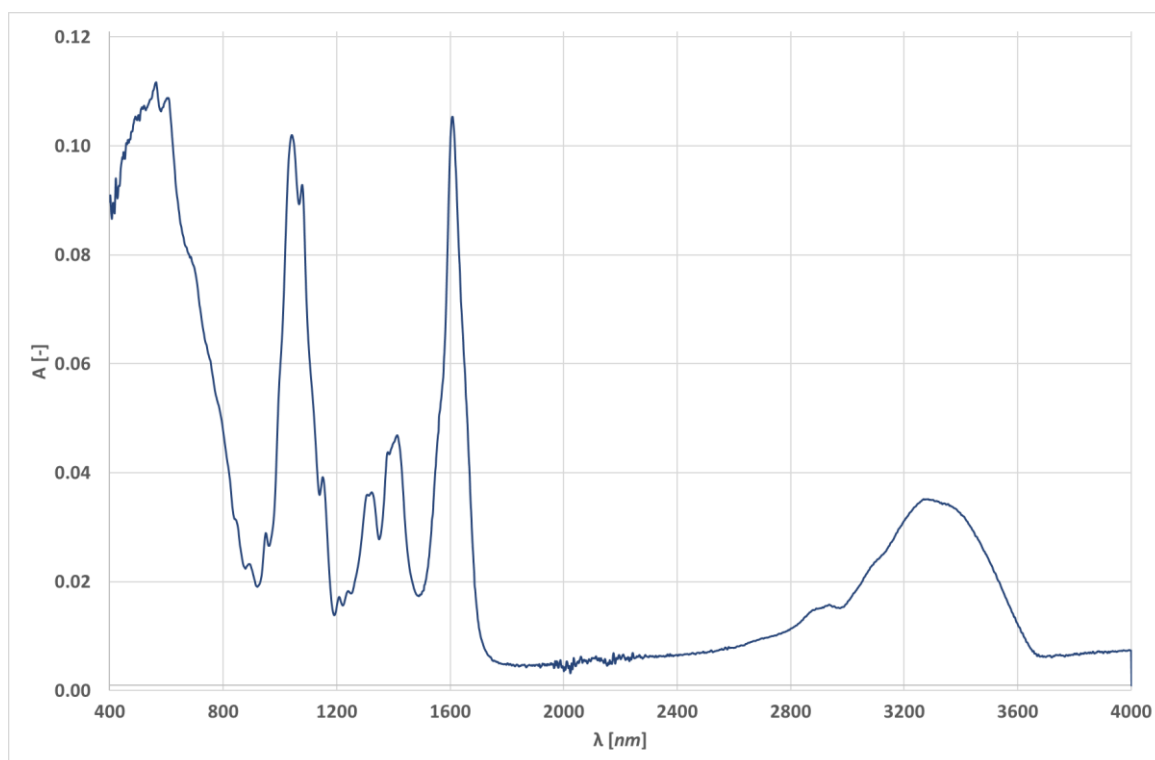
a jeho IR spektrum je na obrázku 13. Vzorek DCH3 měl hmotnostní střed molárních hmotností $M_w = 21$ kDa, index polydisperzity 1,69 a jeho IR spektrum je na obrázku 14. U všech spekter je vidět silný signál u 1600 cm^{-1} naznačující přítomnost karboxylových skupin.



Obrázek 12 – Infračervené spektrum vzorku DCH1



Obrázek 13 - Infračervené spektrum vzorku DCH2

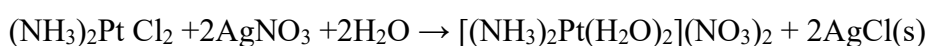


Obrázek 14 - Infračervené spektrum vzorku DCH3

7.3 Příprava nanogelů

Příprava nanogelů v této práci spočívala v síťování DCH pomocí aktivované cisplatin (ACP). Jako první bylo nutné zvolit vhodný poměr cisplatin a DCH. U tohoto výpočtu se vycházelo ze zjištění učiněných skupinou Munster et al.[56], která se důkladně zabývala selektivní oxidací hyaluronanu. Při syntéze byl nakonec použity 3 hmotnostní poměry DCH a ACP. Při stoprocentním využití všech vzniklých karboxylových skupin DCH pro navázání ACP byl hmotnostní poměr určen na 5 : 4,75 (DCH : ACP). Jako další byl testován hmotnostní poměr 5 : 3,5, kdy je při syntéze nadbytek karboxylových skupin. Třetí hmotnostní poměr použitý při syntéze byl 5 : 6, při kterém bylo množství ACP v nadbytku.

Jak bylo zjištěno v předchozí práci s dextranem[51], tak při přímém použití cisplatin při syntéze často docházelo k fyzikálnímu síťování místo vytvoření chemické vazby. Proto byla v této práci cisplatina před reakcí „aktivována“ za vzniku dusičnan diammin diaqua platnatého komplexu. Aktivace proběhla rozpuštěním cisplatin ve vodě po dobu půl hodiny a následným přidáním dusičnanu stříbrného, který s cisplatinou reagoval přes noc za stálého míchání při 55°C. Aktivace cisplatin je popsána rovnicí 1.



Rov. 1

Po reakci zůstává v roztoku sraženina AgCl a nezreagované AgNO₃. To je odstraněno přidáním malého množství NaCl a následnou filtrací AgCl přes filtry s porozitou 200 nm (0,2 μm). Takto připravený komplex snadněji reaguje s karboxylovými skupinami a zajišťuje vyšší pravděpodobnost vytvoření chemické vazby.

Samotná příprava nanogelů poté probíhala smícháním předem rozpuštěného DCH (2,5 mg·ml⁻¹) a připraveného roztoku ACP (1 mg·ml⁻¹). Roztoky byly smíchány podle předem vypočítaných hmotnostních poměrů a podle potřeby doplněny vodou na zvolený objem. U vzorků bylo sledováno několik podmínek reakce, podle kterých byly také pojmenovány. Zkratka vzorku se skládala z písmen NH, což znamená, že nanogel byl vytvořen z oxidované HA. Před NH je číslo od jedné do tří. Číslo jedna zastupuje vzorky, u kterých bylo použito DCH1. Číslo dva zastupuje vzorky připravené z DCH2 a číslo 3 vzorku z DCH3. Číslo za NH pak označuje hmotnostní poměr DCH a ACP. Nejnižší poměr 5 : 3,5 zastupuje číslo jedna. Číslo dva zastupuje poměr 5 : 4,75. A nejvyšší poměr 5 : 6 je zastoupen číslem 3. Dále byl sledován vliv objemu reakce na velikost vzniklých částic. Reakce, které probíhaly v objemu 10 ml byly vybrány jako základní a zkratka jejich vzorku neobsahuje nadbytečné symboly. Druhou možností byly reakce, které probíhaly v objemu 45 ml a název vzorku obsahuje za pomlčkou písmeno V z anglického volume. Jako další byla testována teplota reakce. První byla použita teplota 60 °C a vzorky byly označeny písmeny TL z anglického Temperature - Low. Druhá testovaná teplota byla 90 °C a vzorky, které takto byly připraveny byly označeny písmeny TH (Temperature High).

Poslední změna podmínek spočívala v úpravě pH připravené ACP na hodnotu 7. Klasicky měl roztok připravené totiž ACP pH kolem 4 což může vést k protonaci karboxylových skupin DCH a tím snížení efektivity reakce. Všechny vzorky byly zahřívány v olejové lázni po dobu jedné hodiny. Po uplynutí této doby byly vzorky zchlazeny a převedeny do destilačních membrán s MWCO = 3,5 a byly podrobeny dvouhodinové dialýze. Nakonec byly vzorky vždy lyofilizovány a charakterizovány. Primárně docházelo k měření R_h a zeta potenciálu, které jsou jedněmi z nejdůležitějších vlastností nanogelů pro přenos léčiv. Pokud vzorky dosahovaly vhodných vlastností popsaných v kapitole 3.3, byly podrobeny charakterizaci pomocí metody XRF, která vyhodnotila množství navázané cisplatin a efektivitu jejího vázání. V tabulce 1 je vysvětleno značení vzorků a podmínky jejich přípravy.

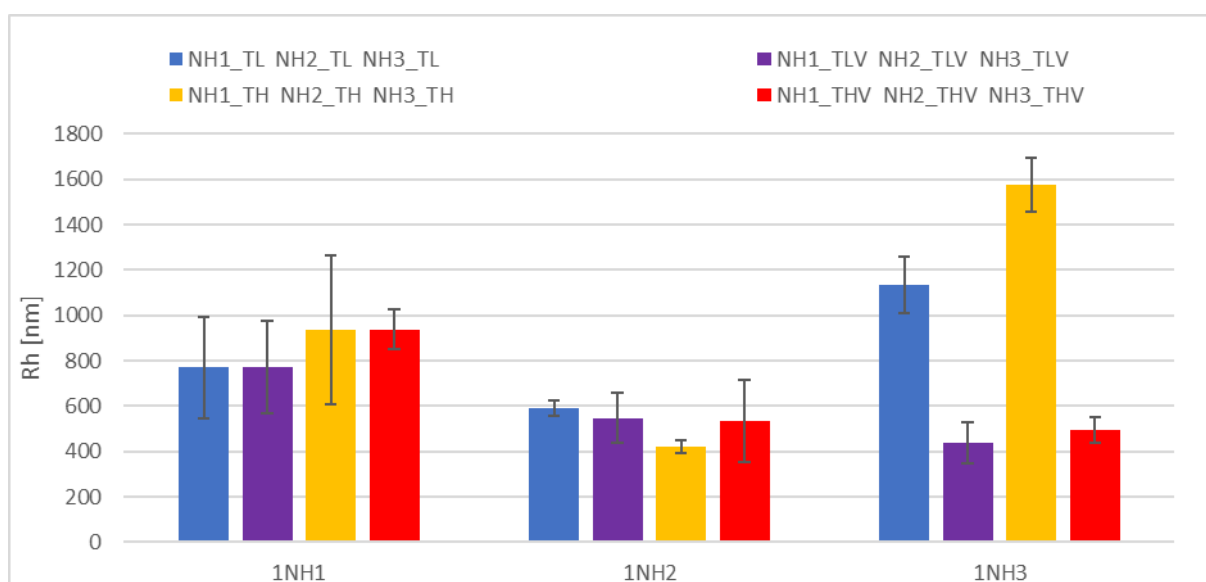
Tabulka 1 - Tabulka značení vzorků nanogelů s rozepsanými podmínkami reakce a materiálu ze kterého byly připraveny

Název vzorku	doba reakce [h]	objem reakce [ml]	teplota reakce [°C]	hmotnostní poměr (DCH:ACP)	nastavení pH ACP	M _w DCH [kDA]
1NH1_TL	1	10	60	5,00:3,50		52
1NH2_TL	1	10	60	5,00:4,75		52
1NH3_TL	1	10	60	5,00:6,00		52
1NH1_TLV	1	45	60	5,00:3,50		52
1NH2_TLV	1	45	60	5,00:4,75		52
1NH3_TLV	1	45	60	5,00:6,00		52
1NH1_TH	1	10	90	5,00:3,50		52
1NH2_TH	1	10	90	5,00:4,75		52
1NH3_TH	1	10	90	5,00:6,00		52
1NH1_THV	1	45	90	5,00:3,50		52
1NH2_THV	1	45	90	5,00:4,75		52
1NH3_THV	1	45	90	5,00:6,00		52
2NH1_TL	1	10	60	5,00:3,50		37
2NH2_TL	1	10	60	5,00:4,75		37
2NH3_TL	1	10	60	5,00:6,00		37
2NH1_TLV	1	45	60	5,00:3,50		37
2NH2_TLV	1	45	60	5,00:4,75		37
2NH3_TLV	1	45	60	5,00:6,00		37
2NH1_TH	1	10	90	5,00:3,50		37
2NH2_TH	1	10	90	5,00:4,75		37
2NH3_TH	1	10	90	5,00:6,00		37
2NH1_THV	1	45	90	5,00:3,50		37
2NH2_THV	1	45	90	5,00:4,75		37
2NH3_THV	1	45	90	5,00:6,00		37
3NH1_TH	1	10	90	5,00:3,50		21
3NH2_TH	1	10	90	5,00:4,75		21
3NH3_TH	1	10	90	5,00:6,00		21
3NH1_THV	1	45	90	5,00:3,50		21
3NH2_THV	1	45	90	5,00:4,75		21
3NH3_THV	1	45	90	5,00:6,00		21
1NH2_TH pH=7	1	10	90	5,00:4,75	ano	52
2NH2_TH pH=7	1	10	90	5,00:4,75	ano	37
3NH2_TH pH=7	1	10	90	5,00:4,75	ano	21
1NH2_THV pH=7	1	45	90	5,00:4,75	ano	52
2NH2_THV pH=7	1	45	90	5,00:4,75	ano	37
3NH2_THV pH=7	1	45	90	5,00:4,75	ano	21

8 VÝSLEDKY A DISKUSE

8.1 Nanogely připravené z DCH1

První série vzorků byla vytvořena syntézou vysokomolekulárního DCH1 (52kDa) a ACP. U těchto vzorků byl sledován vliv teploty, objemu a hmotnostního poměru DCH : ACP. Příprava vzorků probíhala podle postupu popsáního v kapitole 7.3. Vzorky byly následně charakterizovány pomocí metody DLS pro zjištění hydrodynamického průměru částic nanogelu a byl u nich změřen zeta potenciál. Na obrázku 12 je graf znázorňující průměrné hodnoty R_h jednotlivých vzorků spolu s jejich standartními odchylkami. Tabulka 2 uvádí číselné hodnoty R_h , PDI a zeta potenciálu jednotlivých vzorků.



Obrázek 15 – Graf průměrné velikosti R_h vzorků připravených z DCH1. Vzorky jsou rozděleny podle hmotnostního poměru DCH1:ACP do tří skupin a jednotlivé barvy zastupují různé objemy a teplotu při syntéze. Detailní podmínky přípravy jsou zapsány v tabulce 1.

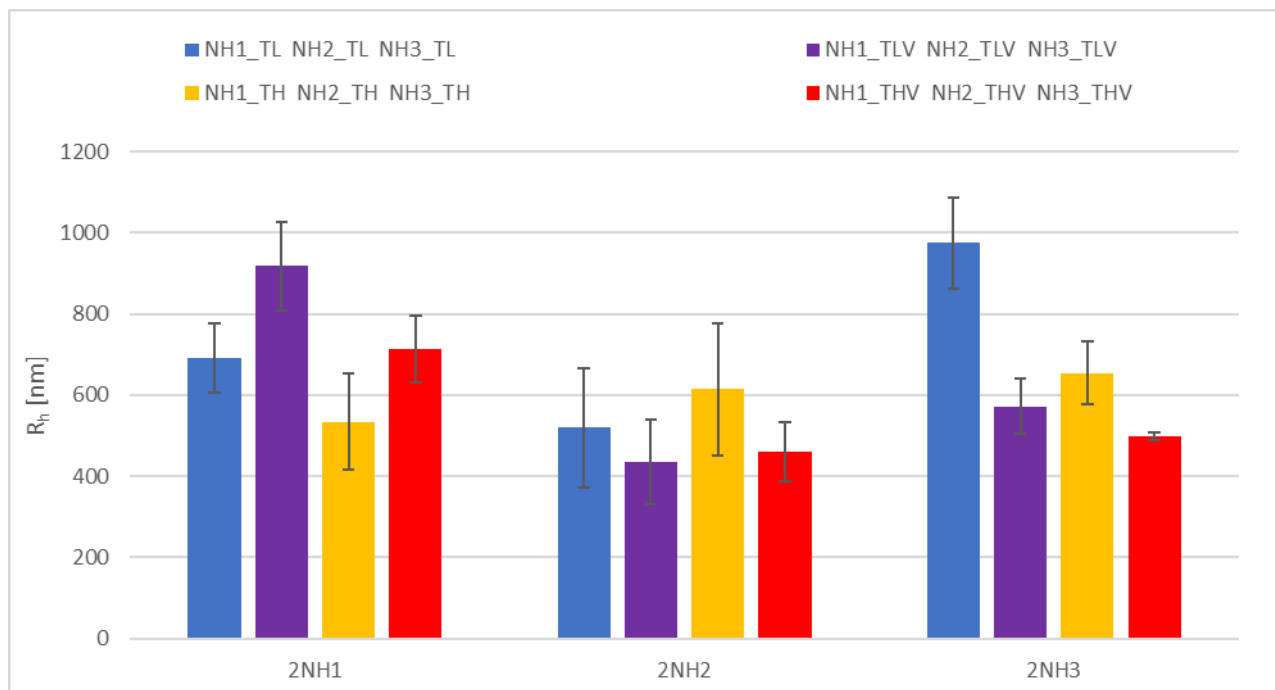
Tabulka 2 – Zprůměrované hodnoty R_h , odchylky, PDI a zeta potenciál naměřených u vzorků připravených z DCH1.

Název vzorku	R_h [nm]	odchylka [nm]	PDI	Zeta potenciál [mV]	odchylka [mV]
1NH1_TL	771	222	0.92	-44.87	2.41
1NH2_TL	593	35	0.55	-25.50	0.26
1NH3_TL	1133	124	0.44	-22.27	0.12
1NH1_TLV	770	204	0.57	-40.60	0.61
1NH2_TLV	547	110	0.84	-27.03	1.96
1NH3_TLV	436	91	0.60	12.77	0.21
1NH1_TH	935	329	0.55	-40.80	1.65
1NH2_TH	422	27	0.55	-26.93	1.00
1NH3_TH	1576	120	0.85	-22.83	0.97
1NH1_THV	939	87	0.86	-43.23	0.31
1NH2_THV	535	180	0.56	-33.47	0.50
1NH3_THV	496	58	0.52	26.33	7.41

Nanogely, nebo v tomto případě spíše mikrogely připravené z DCH1 měly všechny příliš velké průměry částic, aby byly vhodné jako nosiče léčiv. Jak je vidět v tabulce 2 žádný vzorek neměl částice menší než 400 nm. U většiny vzorků je vidět, že připravené systémy měly velmi různorodé částice, jak je vidět z hodnot PDI i vypočítaných odchylek. Z grafu na obrázku 12 je možné usoudit, že nejmenší částice vznikaly při hmotnostním poměru 5:4,75 (DCH:ACP). Ani teplota ani objem reakce u této série nevykazují jasné trendy vlivu na velikost částic. Nejlepším vzorkem této série byl 1NH2_TH, který měl $R_h = 422 \pm 27$ nm a zeta potenciál $-26,93 \pm 1,00$ mV. Zajímavým faktem byl vznik kladně nabitých částic (pozitivní zeta potenciál) u vzorků 1NH3_TLV a 1NH3_THV. Ostatní nanogely připravené z polysacharidů a cisplatiny mají totiž převážně záporné hodnoty zeta potenciálu v důsledku přítomnosti volných karboxylových skupin. Zde zřejmě došlo k jejich plnému vysycení a převládají tak kladně nabitě CP zbytky.

8.2 Nanogely připravené z DCH2

Druhá série vzorků byla syntetizována z DCH2 (37 kDA) a ACP. Stejně jako první série byly testovány různé hmotnostní poměry (DCH:ACP) a vliv objemu a teploty na výslednou velikost částic nanogelů. Vzorky byly opět charakterizovány pomocí metody DLS a byl u nich změřen jejich zeta potenciál ve vodě pro určení jejich stability. Na obrázku 13 je velikost R_h částic jednotlivých vzorků s jejich odchylkami. Přesné hodnoty R_h , směrodatných odchylek, PDI, a jejich zeta potenciálu jsou uvedeny v tabulce 3.



Obrázek 16 - Graf průměrné velikosti R_h vzorků připravených z DCH2. Vzorky jsou rozděleny podle hmotnostního poměru DCH2:ACP do tří skupin a jednotlivé barvy zastupují různé objemy a teplotu při syntéze. Detailní podmínky přípravy jsou zapsány v tabulce 1.

Tabulka 3 - Zprůměrované hodnoty R_h , odchylky, PDI a zeta potenciálů naměřených u vzorků připravených z DCH2.

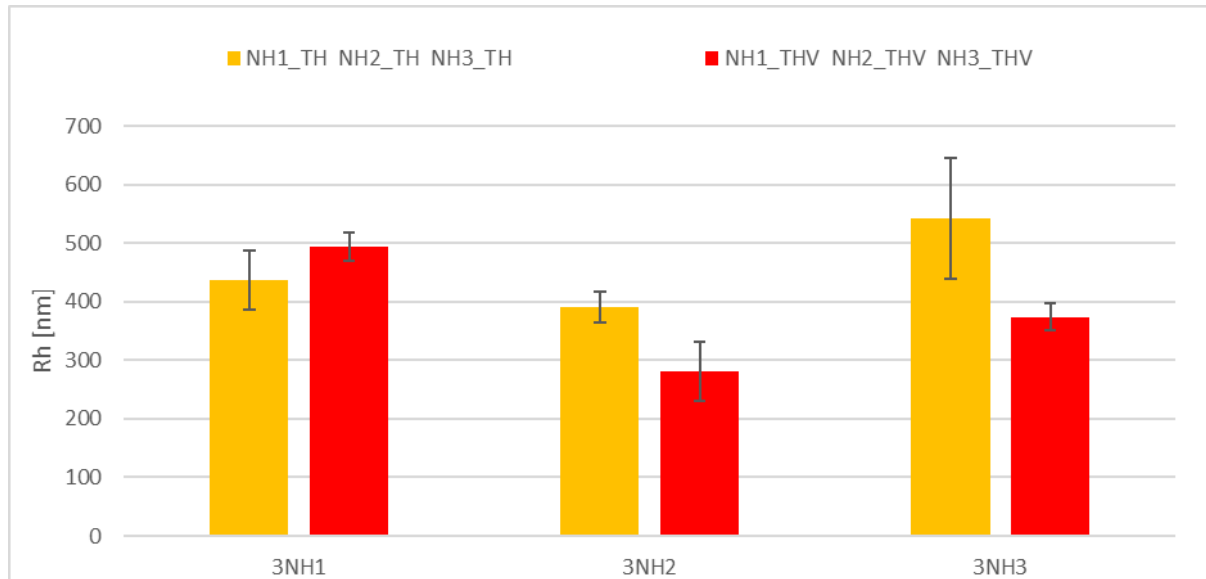
Název vzorku	R_h [nm]	odchylka [nm]	PDI	Zeta potenciál [mV]	odchylka [mV]
2NH1_TL	692	86	0.56	-46.70	1.73
2NH2_TL	519	148	0.44	-23.40	0.44
2NH3_TL	975	113	1.00	-3.47	1.15
2NH1_TLV	919	109	0.56	-40.02	0.84
2NH2_TLV	435	104	0.74	-26.96	1.47
2NH3_TLV	572	68	0.64	-22.20	1.27
2NH1_TH	534	118	1.00	-39.93	2.22
2NH2_TH	615	163	0.96	-25.43	0.78
2NH3_TH	655	77	0.58	8.95	0.34
2NH1_THV	713	83	0.52	-35.20	0.51
2NH2_THV	461	72	0.50	-26.64	1.62
2NH3_THV	498	10	0.57	24.22	1.42

Stejně jako vzorky připravené z DCH1 ani vzorky v této sérii nesplnily požadavky pro nosiče protirakovinných léčiv. Velikost částic žádného vzorku nebyla menší než 400 nm. V tabulce je vidět že hodnoty PDI jsou opět poměrně vysoké, což naznačuje nerůznorodost částic ve vzorku. Z celé série je obtížné stanovit nejlepší vzorek, protože vzorky 2NH2_THV a 2NH2_TLV mají velmi podobné velikosti částic v rámci odchylek. Vzorek 2NH2_THV

má ale hodnotu PDI 0,50 a vzorek 2NH2_TLV 0,74, což je podstatně vyšší a ukazuje na vysoce nehomogenní systém. Hodnoty zeta potenciálu jsou si opět velmi podobné. Zeta potenciál 2NH2_THV je $-26,64 \pm 1,62$ mV, což znamená, že se jedná o poměrně stabilní vzorek. Z výsledků prvních dvou sérií je vidět, že vliv teploty není pro velikost částic určující. Při teplotě 60 °C ale u velikosti částic pozorujeme vyšší odchylky než u teploty 90 °C. Stejně jako u 1. série se u některých vzorků objevil kladný zeta potenciál. Jedná se o vzorky 2NH3_TH a 2NH3_THV.

8.3 Nanogely připravené z DCH3

Třetí série vzorků byla připravena syntézou DCH3 (21 kDA) a ACP. U této série bylo sníženo množství vzorků na polovinu, protože vzorky z předchozích sérií syntetizované při 60 °C měli vysoké hodnoty R_h i PDI. Z tohoto důvodu byly připraveny pouze vzorky s koncovkou TH a THV, které byly připravovány při 90 °C. Charakterizace vzorků proběhla pomocí metody DLS a byl u nich změřen zeta potenciál. Porovnání velikostí R_h jednotlivých vzorků i se směrodatnými odchylkami je vidět na obrázku 14. Průměrné hodnoty R_h , odchylek, PDI a zeta potenciálu jsou uvedené v tabulce 4.



Obrázek 17 - Graf průměrné velikosti R_h vzorků připravených z DCH3. Vzorky jsou rozděleny podle hmotnostního poměru DCH3:ACP do tří skupin a jednotlivé barvy zastupují různé objemy při syntéze. Detailní podmínky přípravy jsou zapsány v tabulce 1.

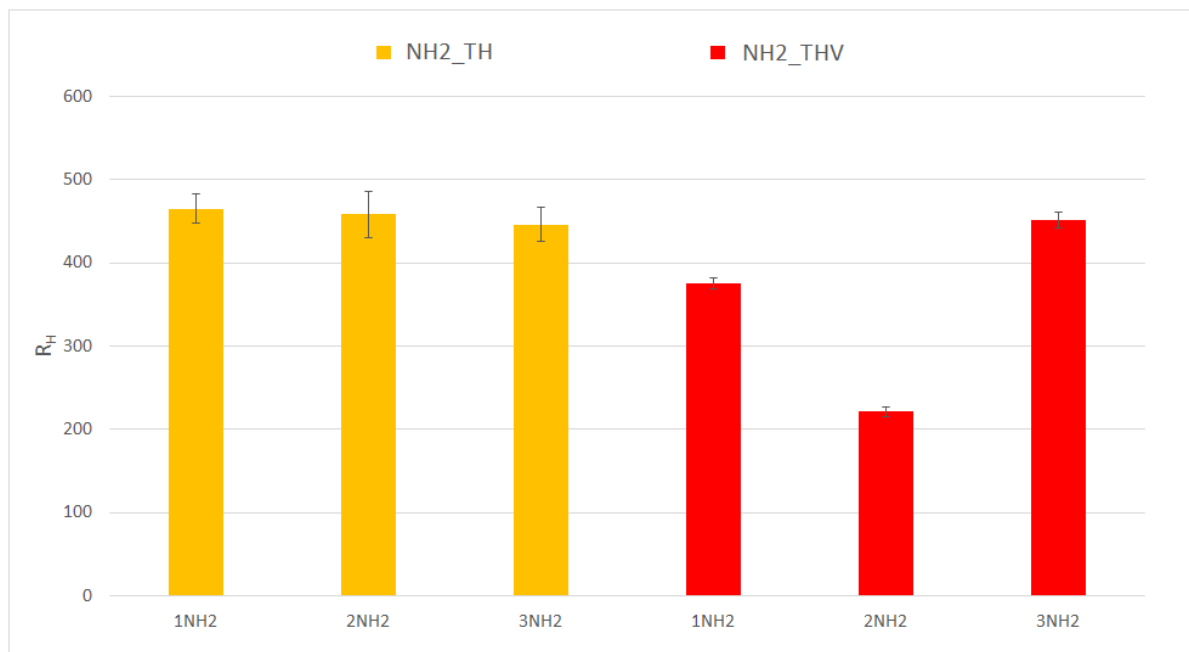
Tabulka 4 - Zprůměrované hodnoty R_h , odchylky, PDI a zeta potenciál naměřených u vzorků připravených z DCH3.

Název vzorku	R_h [nm]	odchylka [nm]	PDI	Zeta potenciál [mV]	odchylka [nm]
3NH1_TH	436	51	0.37	-38.88	1.24
3NH2_TH	391	27	0.33	-33.77	0.51
3NH3_TH	543	104	0.36	-47.50	0.25
3NH1_THV	494	24	0.37	-37.10	0.78
3NH2_THV	280	50	0.35	-34.88	0.27
3NH3_THV	374	22	0.26	-31.38	0.43

Jak je vidět na obrázku 14, hodnoty R_h všech připravených vzorků byly nižší než u předchozích sérií. Průměr částic vzorků 3NH2_TH, 3NH2_THV a 3NH3_THV byl menší než 400 nm. Jsou to první vzorky, které překonaly tuto hranici a jedná se o posun k požadovaným vlastnostem pro použití jako nosiče léčiv. Výrazné zlepšení oproti předchozím sériím je vidět také u odchylek jednotlivých vzorků. Velmi důležitou změnou je také snížení hodnot PDI. Hodnoty PDI se poprvé přiblížily k požadované hodnotě 0,3. Vzorek 3NH3_THV měl dokonce hodnotu menší, a to 0,26. V tabulce 4 je vidět, že všechny vzorky byly stabilní ve vodním prostředí, jelikož jejich hodnoty zeta potenciálu jsou menší než -30 mV. Nejlepším vzorkem této série byl 3NH2_THV, který měl $R_h = 280 \pm 50$ nm a hodnotu zeta potenciálu $-34,88 \pm 0,27$ mV. U hodnot zeta potenciálu se poprvé nevyskytly kladné hodnoty ani u vzorků s hmotnostním poměrem 5:6 (DCH:ACP), jak tomu bylo u prvních dvou sérií.

8.4 Nanogely připravené s ACP s nastaveným pH

Poslední modifikací přípravy nanogelů bylo nastavení pH u ACP přímo před samotnou syntézou s DCH. Podle výsledků předchozích vzorků byl pro testování úpravy pH vybrán pouze jeden hmotnostní poměr DCH:ACP, u kterého byly naměřeny nejlepší hodnoty R_h , a tím byl poměr 5:4,75. Syntéza probíhala se všemi třemi připravenými DCH (DCH1, DCH2, DCH3). Stejně jako u předchozí série probíhala syntéza jen při 90°C. Při této syntéze bylo pH ACP nastaveno na hodnotu 7 před reakcí s DCH. Před nastavením se pH ACP pohybovalo kolem hodnoty 3,5, takže jeho úprava probíhala pomocí NaOH. Připravené vzorky byly charakterizovány metodou DLS a byl u nich změřen zeta potenciál. Srovnání velikosti částic je na obrázku 15. Průměrné hodnoty R_h , odchylek, PDI a zeta potenciálů jsou uvedeny v tabulce 5.



Obrázek 18 Graf průměrné velikosti R_h vzorků připravených z DCH1, DCH2 a DCH3 s ACP s pH=7. Vzorky jsou rozděleny podle objemu reakce do dvou barev (žlutá = 10 ml, červená = 45ml). Detailní podmínky přípravy jsou zapsány v tabulce 1.

Tabulka 5 - Zprůměrované hodnoty R_h , odchylek, PDI a zeta potenciálů naměřených u vzorků připravených z DCH1, DCH2, DCH3 a ACP s pH=7.

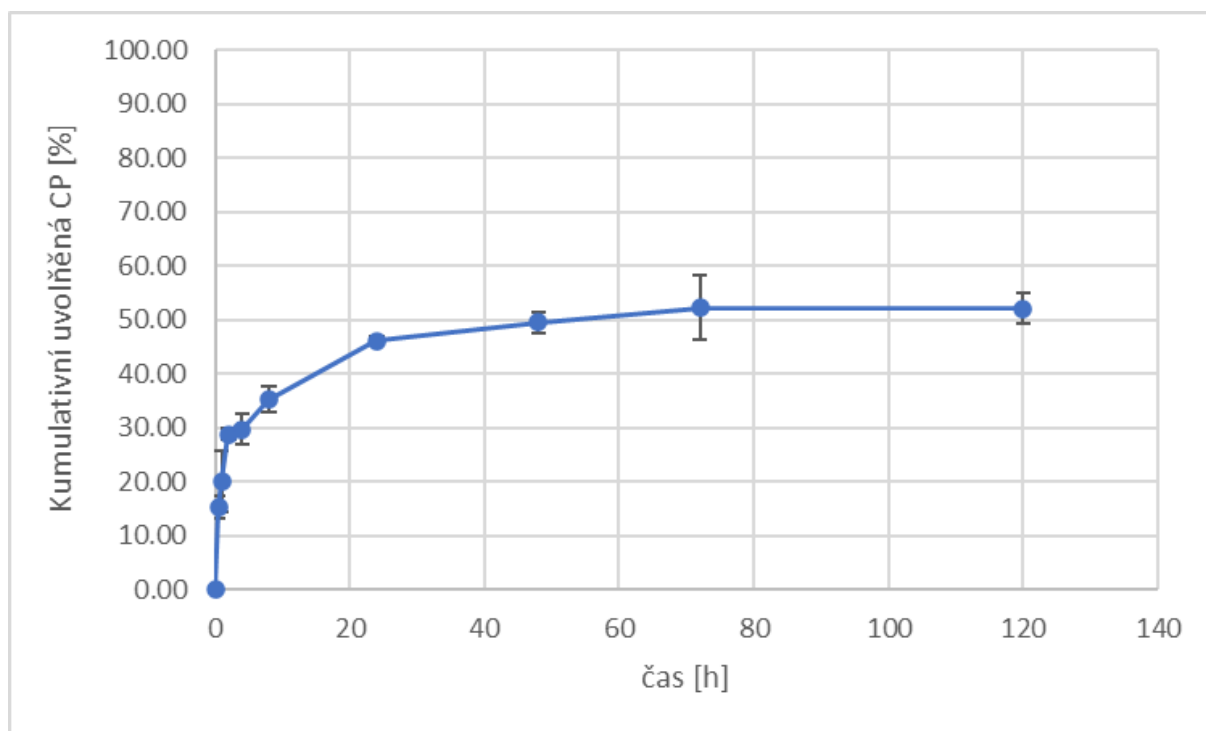
Název vzorku	R_h [nm]	odchylka [nm]	PDI	Zeta potenciál [mV]	odchylka [mV]
1NH2_TH pH=7	465	18	0.40	-30.53	1.51
2NH2_TH pH=7	458	28	0.51	-32.84	0.78
3NH2_TH pH=7	446	20	0.44	-29.78	1.24
1NH2_THV pH=7	375	7	0.46	-35.70	0.50
2NH2_THV pH=7	221	6	0.46	-42.22	1.99
3NH2_THV pH=7	451	10	0.36	-37.38	1.18

U vzorků připravených z DCH1 a DCH2 došlo ke snížení hodnot R_h i PDI. Jak je vidět v tabulce 5, došlo také k výraznému snížení odchylky R_h u všech vzorků v porovnání se vzorky připravených za stejných podmínek ale bez úpravy pH (tabulka 2, tabulka 3 a tabulka 4). Nejvýraznější zlepšení bylo u vzorku 2NH2_THV pH=7 oproti vzorku 2NH2_TH, kdy se jeho R_h snížilo z 461 ± 72 nm na 221 ± 6 nm. Hodnota PDI klesla z 0,50 na 0,46 a zeta potenciál klesl z $-26,64 \pm 1,62$ mV na $-42,22 \pm 1,99$ mV, což vypovídá o vysoké stabilitě tohoto nanogelů ve vodném prostředí. Odlišný efekt byl pozorován u vzorků připravených z DCH3, u kterých došlo ke zvýšení hodnoty R_h i PDI.

8.5 Uvolňování CP z nanogelů

Vzhledem k výsledkům měření R_h a zeta potenciálu byl obsah cisplatiny měřen pouze u vzorku 2NH2_THV $pH=7$. Vzorek byl vybrán, protože se jeho hodnoty nejvíce blížily požadovaným vlastnostem pro nanogely určené pro léčbu rakoviny. Pomocí metody XRF bylo zjištěno, že vzorek obsahoval 54 hm.% CP a dosahoval efektivity vázání 91 % CP. Tato hodnota je velmi vysoká v porovnání s jinými nanogely připravenými z nemodifikované HA, která dosahuje efektivity vázání 44 % a mohou obsahovat maximálně 26 hm% CP ve vzorku [56]. Zlepšení je patrné také vůči HA modifikované chelatujícími ligandy, u které vzorek obsahoval až 28 hm.% CP[48].

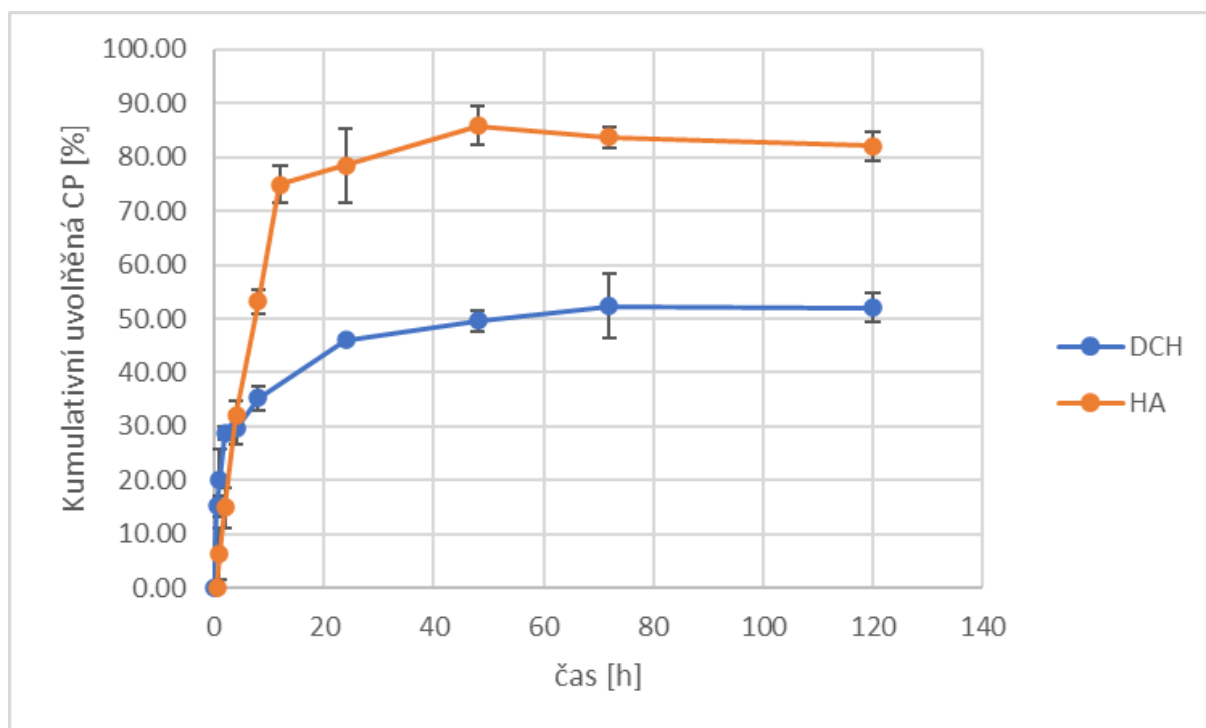
Dalším krokem bylo provedení uvolňovacího testu CP v prostředí podobajícím se lidskému tělu. K tomuto účelu byl použit roztok PBS s $pH=7,4$, který má podobnou koncentraci solí jako v těle. Uvolňovací test se skládal z 9 odběrů prováděných v určitých časových intervalech od počátku uvolňování (0,5 hodiny, 1 hodina, 2 hodiny, 4 hodiny, 8 hodin, 24 hodin, 48 hodin, 72 hodin, 120 hodin). U každého odběru byl následně změřen obsah cisplatiny pomocí metody XRF. Naměřené hodnoty byly poté přepočítány na uvolněná procenta CP a tyto hodnoty jsou uvedeny v grafu (obrázek 19).



Obrázek 19 - Graf závislosti kumulativního uvolňování CP na čase pro vzorek 2NH2_THV v roztoku PBS $pH = 7,4$.

V grafu je vidět, že během prvních dvou hodin dochází k rychlému uvolnění téměř 30% veškeré CP. Poté dochází již k pomalému uvolňování až do doby 72 hodin. Počáteční vysoká rychlost uvolňování CP naznačuje, že veškerá cisplatina není vázána pomocí chemických vazeb, ale je pravděpodobně částečně zadržována v nanogelu pouze pomocí fyzikálních sil. Je také možné, že rychlé uvolňování je důsledkem rozpouštění nanogelu pomocí ultrazvuku, který může způsobit uvolnění části CP z nanogelů. Také lze vidět, že téměř polovina léčiva zůstává navázána na nosič. Lze tak předpokládat, že by došlo k jeho uvolnění až při jeho degradaci v organismu. To je výhodné, protože nanogel má dostatek času koncentrovat se v rakovinových buňkách v důsledku tzv. EPR efektu (viz. Kapitola 3.3) a k uvolnění by proto mohlo docházet na optimálním místě.

Pro srovnání rychlosti uvolňování byl připraven vzorek HA síťovaný CP. Použitá HA nebyla upravena pomocí oxidace jako tomu bylo u DCH. Obsahuje tak jen jedinou karboxylovou skupinu v každé jednotce. To, kromě snížení maximálního obsahu CP, má za následek, že CP nemůže být vázáno bidentátně, což by mělo mít vliv na rychlost uvolňování. Následně u ní byl proveden stejný uvolňovací test jako u vzorku 2NH₂_TH pH=7. Oba uvolňovací testy jsou porovnány na obrázku 20.



Obrázek 20 - Graf závislosti kumulativního uvolňování CP na čase. Hodnoty DCH označují vzorek připravený ze selektivně oxidované HA a hodnoty označeny HA jsou pro vzorek připravený z nemodifikované HA.

Jak je vidět na obrázku 20, tak u nemodifikované HA se už během prvních 8 h se uvolnilo téměř 80 % léčiva, což je více než dvojnásobek ve srovnání s DCH. Vzorek z nemodifikované HA je tak schopen uvolnit procentuálně vyšší množství CP, ale vzhledem k tomu, že je velká část uvolněna právě během počátečních 8 hodin, tak se léčivo může uvolňovat ještě mimo cílovou rakovinnou tkáň. Za předpokladu postupné degradace HA a následného uvolnění CP z obou nanogelů je selektivně oxidovaná HA schopna uvolnit větší množství cisplatinu až v cíleném místě uvnitř rakovinné buňky.

ZÁVĚR

Tato práce se věnovala přípravě a charakterizaci nanogelů a mikrogelů pro přenos protirakovinového léčiva cisplatiny. Nanogely a mikrogely byly připraveny syntézou dikarboxyhyaluronanu a aktivovaného komplexu cisplatiny. Cílem práce bylo získat co nejmenší hydrodynamický průměr částic u stabilního nanogelu, ze kterého se léčivo postupně uvolňuje.

Dicarboxyhyaluronan byl připraven pomocí oxidace kyseliny hyaluronové periodátem za vzniku aldehydických skupin a následné sekundární oxidace, při které se tyto aldehydické skupiny mění na karboxylové skupiny. Tímto krokem byl ztrojnásoben počet reakční míst pro navázání cisplatiny a podařilo se tak připravit částice s obsahem 54 hm.% cisplatiny. V porovnání se studii zabývajícími se nosiči z nemodifikované kyseliny hyaluronové je to více než dvojnásobek.

V této práci byly sledován vliv podmínek reakce dikarboxyhyaluronanu a komplexu cisplatiny na velikost částic vzniklého nanogelu. Vzorkem s nejmenším průměrem částic byl 2NH2_THV pH=7, který byl připraven z DCH o $M_w = 37$ kDa a aktivovaného komplexu cisplatiny s pH nastaveným na hodnotu 7. Reakce toho vzorku probíhala jednu hodinu při teplotě 90°C v objemu 45 ml a hmotnostním poměrem 4,75:5 (ACP:DCH). Tento vzorek měl hodnotu zeta potenciálu -42 ± 2 mV, takže připravený nanogel byl stabilní ve vodném prostředí. Jeho průměr částic byl 221 ± 2 nm, což je bohužel vyšší, než je požadovaná hodnota účinek EPR efektu. Na druhou stranu bylo zjištěno, že připravený nanogel uvolní během prvních osmi hodin pouze 35 % navázané cisplatiny a následně u něj dochází pouze k pozvolnému uvolňování léčiva. Takovýto způsob uvolňování by měl přispět ke snížení systémové toxicity léčiva a jeho zvýšenému hromadění až v rakovinné tkáni.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KUO, J. -W. a G. D. PRESTWICH. 2.214 - Hyaluronic Acid. In: Paul DUCHEYNE, ed. *Comprehensive Biomaterials* [online]. Oxford: Elsevier, 2011 [vid. 2022-12-29], s. 239–259. ISBN 978-0-08-055294-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-055294-1.00073-8
- [2] BROWN, M., S. JONES. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* [online]. 2005, **19**(3), 308–318. ISSN 1468-3083. Dostupné z: doi:10.1111/j.1468-3083.2004.01180.x
- [3] WIDNER, B. et al. Hyaluronic Acid Production in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2005, **71**(7), 3747–3752. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.71.7.3747-3752.2005
- [4] VASVANI, S., P. KULKARNI a D. RAWTANI. Hyaluronic acid: A review on its biology, aspects of drug delivery, route of administrations and a special emphasis on its approved marketed products and recent clinical studies. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, **151**, 1012–1029. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.11.066
- [5] HARGITTAI, I., M. HARGITTAI. Molecular structure of hyaluronan: an introduction. *Structural Chemistry* [online]. 2008, **19**(5), 697–717. ISSN 1572-9001. Dostupné z: doi:10.1007/s11224-008-9370-3
- [6] SLÍVA, J., J. MINÁRIK. Hyaluronát – nejen pasivní pozorovatel, nýbrž aktivní modulátor imunitních reakcí. nedatováno.
- [7] ALANIZ, L. et al. Altered Hyaluronan Biosynthesis and Cancer Progression: an Immunological Perspective. *Mini reviews in medicinal chemistry* [online]. 2009, **9**, 1538–46. Dostupné z: doi:10.2174/138955709790361485
- [8] CHEN, L. H. et al. Hyaluronic acid, an efficient biomacromolecule for treatment of inflammatory skin and joint diseases: A review of recent developments and critical appraisal of preclinical and clinical investigations. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2018, **116**, 572–584. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.05.068
- [9] LO, G. H. et al. Intra-articular Hyaluronic Acid in Treatment of Knee Osteoarthritis A Meta-analysis. *JAMA* [online]. 2003, **290**(23), 3115–3121. ISSN 0098-7484. Dostupné z: doi:10.1001/jama.290.23.3115
- [10] REICHENBACH, S. et al. Hylan versus hyaluronic acid for osteoarthritis of the knee: A systematic review and meta-analysis. *Arthritis Care & Research* [online]. 2007, **57**(8), 1410–1418. ISSN 1529-0131. Dostupné z: doi:10.1002/art.23103
- [11] BROWN, M. B., C. MARRIOTT, G. P. MARTIN. The effect of hyaluronan on the in vitro deposition of diclofenac within the skin. *International journal of tissue reactions*. 1995, **17**(4), 133–140. ISSN 0250-0868.
- [12] ZHANG, X. et al. Hyaluronic acid in ocular drug delivery. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2021, **264**, 118006. ISSN 0144-8617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2021.118006
- [13] ZENG, W. et al. Hyaluronic acid-coated niosomes facilitate tacrolimus ocular delivery: Mucoadhesion, precorneal retention, aqueous humor pharmacokinetics, and transcorneal permeability. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2016, **141**, 28–35. ISSN 0927-7765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2016.01.014
- [14] SOUZA-FERNANDES, A. B., P. PELOSI, P. RM ROCCO. Bench-to-bedside review: The role of glycosaminoglycans in respiratory disease. *Critical Care* [online]. 2006, **10**(6), 237. ISSN 1364-8535. Dostupné z: doi:10.1186/cc5069

- [15] PANDEY, A. et al. Hyaluronic acid tethered pH-responsive alloy-drug nanoconjugates for multimodal therapy of glioblastoma: An intranasal route approach. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2019, **98**, 419–436. ISSN 0928-4931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2018.12.139
- [16] YU, Ch. et al. Hyaluronic Acid Coated Acid-Sensitive Nanoparticles for Targeted Therapy of Adjuvant-Induced Arthritis in Rats. *Molecules* [online]. 2019, **24**(1), 146. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24010146
- [17] OKTÁBEC, Z., J. JAMPÍLEK. Stručná historie chemoterapie. *Chemické listy*. 2013, **107**(2), 151–159. ISSN 1213-7103.
- [18] LIPPARD, S. J. New Chemistry of an Old Molecule: *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂]. *Science* [online]. 1982, **218**(4577), 1075–1082. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.6890712
- [19] ŠTARHA, P., Z. TRÁVNÍČEK. Protinádorově účinné komplexy přechodných kovů: historie a současnost. *Chemické listy*. 2018, **112**(7), 412–420. ISSN 1213-7103.
- [20] DASARI, S., P. B. TCHOUNWOU. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology* [online]. 2014, **740**, 364–378. ISSN 0014-2999. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.025
- [21] *018057s083lbl.pdf* [online]. [vid. 2023-01-19]. Dostupné z: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2015/018057s083lbl.pdf
- [22] PIGNON, J.-P. et al. Lung adjuvant cisplatin evaluation: A pooled analysis by the LACE collaborative group. *Journal of Clinical Oncology* [online]. 2008, **26**(21), 3552–3559. ISSN 0732-183X. Dostupné z: doi:10.1200/JCO.2007.13.9030
- [23] GILL, M., K. VALLIS. Transition metal compounds as cancer radiosensitizers. *Chemical Society Reviews* [online]. 2019, **48**, 540–557. Dostupné z: doi:10.1039/C8CS00641E
- [24] MONTAGNANI, F. et al. Effectiveness and safety of oxaliplatin compared to cisplatin for advanced, unresectable gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gastric Cancer* [online]. 2011, **14**(1), 50–55. ISSN 1436-3305. Dostupné z: doi:10.1007/s10120-011-0007-7
- [25] RAUDENSKA, M. et al. Unexpected therapeutic effects of cisplatin. *Metallomics* [online]. 2019, **11**(7), 1182–1199. ISSN 1756-5901. Dostupné z: doi:10.1039/c9mt00049f
- [26] SUCHÁNKOVÁ, T. *Interakce nových asymetrických komplexů platiny s azolovými a izopropylaminovými ligandy s DNA. Vztah k biologické aktivitě.* [online]. Brno, 2008 [vid. 2023-01-16]. Diplomová práce, Masarykova univerzita. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/eif07/diplomova_prace.pdf
- [27] *MOLTX_Molekularni_toxikologie_5_Oxidativni_stres.pdf* [online]. [vid. 2023-01-21]. Dostupné z: https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/kbb/Dokumenty/Materialy_k_vyuce/MOLTX_Molekularni_toxikologie_5_Oxidativni_stres.pdf
- [28] GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* [online]. 2012, **31**(15), 1869–1883. ISSN 1476-5594. Dostupné z: doi:10.1038/onc.2011.384
- [29] GRIMAUDDO, M. A., A. CONCHEIRO, C. ALVAREZ-LORENZO. Nanogels for regenerative medicine. *Journal of Controlled Release* [online]. 2019, **313**, 148–160. ISSN 0168-3659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2019.09.015
- [30] PATHAK, Ch., F. U. VAIDYA, S. M. PANDEY. Mechanism for Development of Nanobased Drug Delivery System. In: *Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems* [online]. B.m.: Elsevier, 2019 [vid. 2023-01-25], s. 35–67. ISBN 978-0-12-814029-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814029-1.00003-X

- [31] SETIA, A., P. AHUJA. Nanohydrogels. In: *Organic Materials as Smart Nanocarriers for Drug Delivery* [online]. B.m.: Elsevier, 2018 [vid. 2023-01-25], s. 293–368. ISBN 978-0-12-813663-8. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-813663-8.00008-7
- [32] PASHIROVA, T. N. et al. Polymer nanogels: Fabrication, structural behavior, and biological applications. In: *Theory and Applications of Nonparenteral Nanomedicines* [online]. B.m.: Elsevier, 2021 [vid. 2023-01-25], s. 97–111. ISBN 978-0-12-820466-5. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-820466-5.00005-3
- [33] PAUL, S. D. et al. Novel gels: implications for drug delivery. In: *Nanostructures for Drug Delivery* [online]. B.m.: Elsevier, 2017 [vid. 2023-01-25], s. 379–412. ISBN 978-0-323-46143-6. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-46143-6.00012-9
- [34] KABANOV, A. V., S. V. VINOGRADOV. Nanogels as Pharmaceutical Carriers: Finite Networks of Infinite Capabilities. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 2009, **48**(30), 5418–5429. ISSN 1521-3773. Dostupné z: doi:10.1002/anie.200900441
- [35] AKIYOSHI, K. et al. Self-assembled hydrogel nanoparticle of cholesterol-bearing pullulan as a carrier of protein drugs: Complexation and stabilization of insulin. *Journal of Controlled Release* [online]. 1998, **54**(3), 313–320. ISSN 0168-3659. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-3659(98)00017-0
- [36] KAZAKOV, S. et al. UV-Induced Gelation on Nanometer Scale Using Liposome Reactor. *Macromolecules* [online]. 2002, **35**(5), 1911–1920. ISSN 0024-9297. Dostupné z: doi:10.1021/ma011644+
- [37] SCHMITT, F. et al. Chitosan-based nanogels for selective delivery of photosensitizers to macrophages and improved retention in and therapy of articular joints. *Journal of Controlled Release* [online]. 2010, **144**(2), 242–250. ISSN 0168-3659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2010.02.008
- [38] ZAHOOR, A., S. SHARMA, G. K. KHULLER. Inhalable alginate nanoparticles as antitubercular drug carriers against experimental tuberculosis. *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. 2005, **26**(4), 298–303. ISSN 0924-8579. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijantimicag.2005.07.012
- [39] DVOŘÁK, M. *Nízkomolekulární hepariny a jejich účinnost v prevenci arteriální trombózy* [online]. Brno, 2007 [vid. 2023-04-10]. Dizertační práce, Masarykovy univerzity v Brně. Dostupné z: <https://is.muni.cz/th/xuwog/Disertace.pdf>
- [40] PARK, K. M. et al. Macro/Nano-Gel Composite as an Injectable and Bioactive Bulking Material for the Treatment of Urinary Incontinence. *Biomacromolecules* [online]. 2014, **15**(6), 1979–1984. ISSN 1525-7797, 1526-4602. Dostupné z: doi:10.1021/bm401787u
- [41] LI, J. K., N. WANG, X. SHEN WU. Poly(vinyl alcohol) nanoparticles prepared by freezing–thawing process for protein/peptide drug delivery. *Journal of Controlled Release* [online]. 1998, **56**(1), 117–126. ISSN 0168-3659. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-3659(98)00089-3
- [42] RZAEV, Z. M. O., S. DINÇER, E. PIŞKIN. Functional copolymers of N-isopropylacrylamide for bioengineering applications. *Progress in Polymer Science* [online]. 2007, **32**(5), 534–595. ISSN 0079-6700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.01.006
- [43] PIŞKIN, E. Molecularly designed water soluble, intelligent, nanosize polymeric carriers. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2004, **277**(1), Selected Papers from The 11th International Pharmaceutical Technology Symposium, 105–118. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2003.06.003

- [44] ABD EL-REHIM, H. A. et al. Developing the Potential Ophthalmic Applications of Pilocarpine Entrapped Into Polyvinylpyrrolidone–Poly(acrylic acid) Nanogel Dispersions Prepared By γ Radiation. *Biomacromolecules* [online]. 2013, **14**(3), 688–698. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm301742m
- [45] OHTA, S. et al. Intraperitoneal Delivery of Cisplatin via a Hyaluronan-Based Nanogel/in Situ Cross-Linkable Hydrogel Hybrid System for Peritoneal Dissemination of Gastric Cancer. *Molecular Pharmaceutics* [online]. 2017, **14**(9), 3105–3113. ISSN 1543-8384. Dostupné z: doi:10.1021/acs.molpharmaceut.7b00349
- [46] YALLAPU, M. M., M. JAGGI, S. C. CHAUHAN. Design and engineering of nanogels for cancer treatment. *Drug Discovery Today* [online]. 2011, **16**(9), 457–463. ISSN 1359-6446. Dostupné z: doi:10.1016/j.drudis.2011.03.004
- [47] RAJANI, Ch. et al. 7 - Cancer-targeted chemotherapy: Emerging role of the folate anchored dendrimer as drug delivery nanocarrier. In: Abhay CHAUHAN a Hitesh KULHARI, ed. *Pharmaceutical Applications of Dendrimers* [online]. B.m.: Elsevier, 2020 [vid. 2023-04-15], Micro and Nano Technologies, s. 151–198. ISBN 978-0-12-814527-2. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814527-2.00007-X
- [48] OHTA, S. et al. Production of Cisplatin-Incorporating Hyaluronan Nanogels via Chelating Ligand–Metal Coordination. *Bioconjugate Chemistry* [online]. 2016, **27**(3), 504–508. ISSN 1043-1802, 1520-4812. Dostupné z: doi:10.1021/acs.bioconjchem.5b00674
- [49] MÜNSTER, L. et al. Oxidized polysaccharides for anticancer-drug delivery: What is the role of structure? *Carbohydrate Polymers* [online]. 2021, **257**, 117562. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2020.117562
- [50] MÜNSTER, L. et al. Mechanism of sulfonation-induced chain scission of selectively oxidized polysaccharides. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2020, **229**, 115503. ISSN 0144-8617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2019.115503
- [51] HRBÁČEK, V. *Příprava nanogelů na bázi modifikovaných polysacharidů pro přenos léčiv* [online]. Zlín, 2021 [vid. 2023-01-26]. Bakalářská práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Dostupné z: https://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/47317/hrb%03%a1%0c4%8dek_2021_dp.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- [52] BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release* [online]. 2016, **235**, 337–351. ISSN 0168-3659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.017
- [53] DANAEI, M. et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* [online]. 2018, **10**(2), 57. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics10020057
- [54] *ZetaPotential-Introduction-in-30min-Malvern.pdf* [online]. [vid. 2023-04-16]. Dostupné z: <https://www.research.colostate.edu/wp-content/uploads/2018/11/ZetaPotential-Introduction-in-30min-Malvern.pdf>
- [55] *Infracervena_Spektroskopie_VSCHT.pdf* [online]. [vid. 2023-05-11]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/sci/podzim2013/C3804/Infracervena_Spektroskopie_VSCHT.pdf
- [56] MÜNSTER, L. et al. Dicarboxylated hyaluronate: Synthesis of a new, highly functionalized and biocompatible derivative. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2022, **292**, 119661. ISSN 0144-8617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2022.119661

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

1NH1_TH	Vzorek nanogelu připravený z DCH1, který reagoval s ACP v hmotnostním poměru 3,5 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 10 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny
1NH1_THV	Vzorek nanogelu připravený z DCH1, který reagoval s ACP v hmotnostním poměru 3,5 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 45 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny
1NH1_TL	Vzorek nanogelu připravený z DCH1, který reagoval s ACP v hmotnostním poměru 3,5 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 10 ml za teploty 60°C po dobu 1 hodiny
1NH1_TLV	Vzorek nanogelu připravený z DCH1, který reagoval s ACP v hmotnostním poměru 3,5 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 45 ml za teploty 60°C po dobu 1 hodiny
1NH2_TH	Vzorek nanogelu připravený z DCH1, který reagoval s ACP v hmotnostním poměru 4,75 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 10 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny
1NH2_TH pH=7	Vzorek nanogelu připravený z DCH1, který reagoval s ACP s nastaveným pH na hodnotu 7 v hmotnostním poměru 4,75 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 10 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny
1NH2_THV	Vzorek nanogelu připravený z DCH1, který reagoval s ACP v hmotnostním poměru 4,75 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 45 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny
1NH2_THV pH=7	Vzorek nanogelu připravený z DCH1, který reagoval s ACP s nastaveným pH na hodnotu 7 v hmotnostním poměru 4,75 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 45 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny.
1NH2_TL	Vzorek nanogelu připravený z DCH1, který reagoval s ACP v hmotnostním poměru 4,75 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 10 ml za teploty 60°C po dobu 1 hodiny

1NH2_TLV	Vzorek nanogelu připravený z DCH1, který reagoval s ACP v hmotnostním poměru 4,75 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 45 ml za teploty 60°C po dobu 1 hodiny
1NH3_TH	Vzorek nanogelu připravený z DCH1, který reagoval s ACP v hmotnostním poměru 6 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 10 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny
1NH3_THV	Vzorek nanogelu připravený z DCH1, který reagoval s ACP v hmotnostním poměru 6 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 45 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny
1NH3_TL	Vzorek nanogelu připravený z DCH1, který reagoval s ACP v hmotnostním poměru 6 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 10 ml za teploty 60°C po dobu 1 hodiny
1NH3_TLV	Vzorek nanogelu připravený z DCH1, který reagoval s ACP v hmotnostním poměru 6 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 45 ml za teploty 60°C po dobu 1 hodiny
2NH1_TH	Vzorek nanogelu připravený z DCH2, který reagoval s ACP v hmotnostním poměru 3,5 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 10 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny
2NH1_THV	Vzorek nanogelu připravený z DCH2, který reagoval s ACP v hmotnostním poměru 3,5 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 45 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny
2NH1_TL	Vzorek nanogelu připravený z DCH2, který reagoval s ACP v hmotnostním poměru 3,5 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 10 ml za teploty 60°C po dobu 1 hodiny
2NH1_TLV	Vzorek nanogelu připravený z DCH2, který reagoval s ACP v hmotnostním poměru 3,5 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 45 ml za teploty 60°C po dobu 1 hodiny
2NH2_TH	Vzorek nanogelu připravený z DCH2, který reagoval s ACP v hmotnostním poměru 4,75 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 10 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny

2NH2_TH pH=7	Vzorek nanogelu připravený z DCH ₂ , který reagoval s ACP s nastaveným pH na hodnotu 7 v hmotnostním poměru 4,75 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 10 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny
2NH2_THV	Vzorek nanogelu připravený z DCH ₂ , který reagoval s ACP v hmotnostním poměru 4,75 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 45 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny
2NH2_THV pH=7	Vzorek nanogelu připravený z DCH ₂ , který reagoval s ACP s nastaveným pH na hodnotu 7 v hmotnostním poměru 4,75 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 45 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny.
2NH2_TL	Vzorek nanogelu připravený z DCH ₂ , který reagoval s ACP v hmotnostním poměru 4,75 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 10 ml za teploty 60°C po dobu 1 hodiny
2NH2_TLV	Vzorek nanogelu připravený z DCH ₂ , který reagoval s ACP v hmotnostním poměru 4,75 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 45 ml za teploty 60°C po dobu 1 hodiny
2NH3_TH	Vzorek nanogelu připravený z DCH ₂ , který reagoval s ACP v hmotnostním poměru 6 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 10 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny
2NH3_THV	Vzorek nanogelu připravený z DCH ₂ , který reagoval s ACP v hmotnostním poměru 6 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 45 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny
2NH3_TL	Vzorek nanogelu připravený z DCH ₂ , který reagoval s ACP v hmotnostním poměru 6 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 10 ml za teploty 60°C po dobu 1 hodiny
2NH3_TLV	Vzorek nanogelu připravený z DCH ₂ , který reagoval s ACP v hmotnostním poměru 6 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 45 ml za teploty 60°C po dobu 1 hodiny

3NH1_TH	Vzorek nanogelu připravený z DCH3, který reagoval s ACP v hmotnostním poměru 3,5 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 10 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny
3NH1_THV	Vzorek nanogelu připravený z DCH3, který reagoval s ACP v hmotnostním poměru 3,5 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 45 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny
3NH2_TH	Vzorek nanogelu připravený z DCH3, který reagoval s ACP v hmotnostním poměru 4,75 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 10 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny
3NH2_TH pH=7	Vzorek nanogelu připravený z DCH3, který reagoval s ACP s nastaveným pH na hodnotu 7 v hmotnostním poměru 4,75 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 10 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny
3NH2_THV	Vzorek nanogelu připravený z DCH3, který reagoval s ACP v hmotnostním poměru 4,75 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 45 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny
3NH2_THV pH=7	Vzorek nanogelu připravený z DCH3, který reagoval s ACP s nastaveným pH na hodnotu 7 v hmotnostním poměru 4,75 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 45 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny.
3NH3_TH	Vzorek nanogelu připravený z DCH3, který reagoval s ACP v hmotnostním poměru 6 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 10 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny
3NH3_THV	Vzorek nanogelu připravený z DCH3, který reagoval s ACP v hmotnostním poměru 6 : 5 (ACP : DCH), při objemu reakce 45 ml za teploty 90°C po dobu 1 hodiny
ABC	ATP Binding Cassette
ACP	aktivovaný komplex cisplatiny
AHA	Dialdehydhyaluronan
ATPáza	Enzym katalyzující hydrolyzu ATP na ADP

ATRP	Radikálová polymerace s přenosem atomů
CP	Cis-diammin-dichloroplatnatý komplex
CD44	Buněčný povrchový glykoprotein, sloužící k interakci buňka-buňka
CTR1	High affinity copper uptake protein 1
Da	Dalton, atomová hmotnostní jednotka, odpovídá g.mol ⁻¹
DCH	Dikarboxyhyaluronan
DLS	Dynamický rozptyl světla
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ECM	Extracelulární matrix
EPR	Enhanced permeability and retention
FDA	Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv
GAG	Glykosaminoglykany
GHAP	Glial hyaluronan binding protein
GSH	Glutathion (γ -glutamylcysteinylglycin)
HA	Kyselina hyaluronová
HAS	syntáza kyseliny hyaluronové
IAC	Intrastrand
IEC	Interstrand
M _w	Hmotnostní střed molárních hmotností
LCST	Lower critical solution temperature
LYVE-1	Lymphatic Vessel Endothelial Hyaluronan Receptor 1
MMR	Mismatch repair systém
mtDNA	Mitochondriální Deoxyribonukleová kyselina
MWCO	Molecular weight cut off
NER	Nukleotidové excize
NIPA	N-isopropylacrylamid

NSCLS	Non-small cell lung cancers)
PBS	Fosfátem pufovaný solný roztok
PDI	Index polydispersity
PEG	Polyethylenglykol
PNIPAM	Poly-N-isopropylacrylamid
PVA	Polyvinylalkohol
PVP	Polyvinylpyrrolidonu
R_h	Hydrodynamický průměr
RHAMM	Receptor for Hyaluronate-Mediated Motility
RNA	Ribonukleová kyselina
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SCLS	Small cell lung cancers
TEM	Transmisní elektronový mikroskop
UV	ultrafialové záření
XRF	X-ray fluorescence

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Chemická struktura kyseliny hyaluronové.....	12
Obrázek 2 – Grafické znázornění receptorů a hyaluronanu na povrchu buňky[7].....	13
Obrázek 3 – Strukturní vzorec cis-diammindichloroplatnatý komplex.....	19
Obrázek 4 – Chemické struktury platinových cytostatik: A – karboplatina, B – oxaliplatina, C – nedaplatina, D – fenantriplatina	22
Obrázek 5 – Schéma mechanismu cisplatinu po vstupu do buňky a následné vytvoření aduktu na dvoušroubovici DNA[19]	23
Obrázek 6 – Znázornění různých druhů platinových aduktů na DNA. A - 1,2 – GG IAC, B – 1,2 – GA IAC, C - 1,3 – GG IAC, D – IEC, E – monofunkční adukt [26].....	24
Obrázek 7 – Schéma struktury nanogelu a začleněné účinné látky v něm[32]	28
Obrázek 8 – Schéma chemického síťování s použitím síťovadla z monomeru [31].....	28
Obrázek 9 – Schéma primární oxidace HA za použití jodistanu sodného. Vzniká 2,3-dialdehydhyaluronan.....	33
Obrázek 10 – Schéma sekundární oxidace za použití chloritanu sodného. Vzniká 2,3-dikarboxyhyaluronan.	34
Obrázek 11 – schéma reakce dikarboxyhyaluronanu s dusičnan diaqua diamino platnatým komplexem. A dva pravděpodobné výsledky této reakce.	35
Obrázek 12 – Infračervené spektrum vzorku DCH1	42
Obrázek 13 - Infračervené spektrum vzorku DCH2	42
Obrázek 14 - Infračervené spektrum vzorku DCH3	43
Obrázek 15 – Graf průměrné velikosti R_h vzorků připravených z DCH1. Vzorky jsou rozděleny podle hmotnostního poměru DCH1:ACP do tří skupin a jednotlivé barvy zastupují různé objemy a teplotu při syntéze. Detailní podmínky přípravy jsou zapsány v tabulce 1.	46
Obrázek 16 - Graf průměrné velikosti R_h vzorků připravených z DCH2. Vzorky jsou rozděleny podle hmotnostního poměru DCH2:ACP do tří skupin a jednotlivé barvy zastupují různé objemy a teplotu při syntéze. Detailní podmínky přípravy jsou zapsány v tabulce 1.	48
Obrázek 17 - Graf průměrné velikosti R_h vzorků připravených z DCH3. Vzorky jsou rozděleny podle hmotnostního poměru DCH3:ACP do tří skupin a jednotlivé barvy zastupují různé objemy při syntéze. Detailní podmínky přípravy jsou zapsány v tabulce 1.	49
Obrázek 18 Graf průměrné velikosti R_h vzorků připravených z DCH1, DCH2 a DCH3 s ACP s pH=7.Vzorky jsou rozděleny podle objemu reakce do dvou barev. Detailní podmínky přípravy jsou zapsány v tabulce 1.....	51
Obrázek 19 - Graf závislosti kumulativního uvolňování CP na čase. Hodnoty DCH označují vzorek připravený ze selektivně oxidované HA a hodnoty označeny HA jsou pro vzorek připravený z nemodifikované HA.....	53

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Tabulka značení vzorků nanogelů s rozepsanými podmínkami reakce a materiálu ze kterého byly připraveny	45
Tabulka 2 – Zprůměrované hodnoty R_h , odchylky, PDI a zeta potenciál naměřených u vzorků připravených z DCH1.	47
Tabulka 3 - Zprůměrované hodnoty R_h , odchylky, PDI a zeta potenciálů naměřených u vzorků připravených z DCH2.	48
Tabulka 4 - Zprůměrované hodnoty R_h , odchylky, PDI a zeta potenciál naměřených u vzorků připravených z DCH3.	50
Tabulka 5 - Zprůměrované hodnoty R_h , odchylek, PDI a zeta potenciálů naměřených u vzorků připravených z DCH1, DCH2, DCH3 a ACP s $ph=7$	51

