

# **Příprava termoresponzivních nanogelů a mikrogelů 2,3-dikarboxyhyaluronové kyseliny pro přenos protinádorových léčiv**

Bc. Filip Latečka

---

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. Filip Latečka**  
Osobní číslo: **T21438**  
Studijní program: **N0711A130023 Materiálové inženýrství a nanotechnologie**  
Forma studia: **Prezenční**  
Téma práce: **Příprava termoresponzivních nanogelů a mikrogelů 2,3-dikarboxyhyaluronové kyseliny pro přenos protinádorových léčiv**

## Zásady pro vypracování

Kyselina hyaluronová a její deriváty jsou jedněmi z nejpoužívanějších biopolymerů současnosti obzvláště v oblasti biomedicínských aplikací, mezi něž patří také přenos protinádorových léčiv. Základní nevýhodou k. hyaluronové v této oblasti je relativně nízká hustota vhodných funkčních (karboxylových) skupin, které jsou navíc často hlavním cílem různých modifikací. To ovšem značně snižuje maximální možné množství přenášeného léčiva. Jedním z možných řešení je selektivní oxidace glukuronových jednotek k. hyaluronové za vzniku 2,3-dikarboxyhyaluronanu. Ten lze dále modifikovat, například pomocí poly(N-isopropylakrylamidu), termoresponzivního polymeru s dolní kritickou teplotou přechodu roztoku v gel okolo 32 °C, což umožní přípravu termoresponzivních materiálů.

Náplní diplomové práce bude kromě zpracování literární rešerše na zadané téma hlavně příprava termoresponzivních nanogelů a mikrogelů ze selektivně oxidované kyseliny hyaluronové modifikované pomocí poly(N-isopropylakrylamidu). Cílem je připravit a charakterizovat systém, který umožní snadnou konjugaci protinádorového léčiva za laboratorní teploty a zároveň bude při tělesné teplotě tvořit mikro či nanogely vhodné pro transport léčiv k nádorům. K. hyaluronová bude modifikována pomocí tzv. biokonjugačních reakcí, oxidována na 2,3-dikarboxyhyaluronan a ten bude charakterizován dostupnými fyzikálně-chemickými metodami (infračervená spektroskopie, viskozimetrie, DLS). Hlavní důraz bude kladen na určení dolní kritické teploty přechodu sol-gel a studium vlastností částic pod a nad touto teplotou (hydrodynamický průměr, zeta potenciál). Na nevhodnější vzorky bude navázáno vybrané protinádorové léčivo a bude zkoumán jeho vliv na vlastnosti částic a také rychlost jeho uvolňování.

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

**Seznam doporučené literatury:**

- Chen, J.-P., Y.-L. Leu, C.-L. Fang, C.-H. Chen a J.-Y. Fang. Thermosensitive Hydrogels Composed of Hyaluronic Acid and Gelatin as Carriers for the Intravesical Administration of Cisplatin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2011**, 100(2), 655–666. ISSN 0022-3549. Doi:10.1002/jps.22309.
- D'Este, M., D. Eglin a M. Alini. A systematic analysis of DMTMM vs EDC/NHS for ligation of amines to Hyaluronan in water. *Carbohydrate Polymers*. **2014**, 108, 239–246. ISSN 01448617. Doi:10.1016/j.carbpol.2014.02.070.
- Wilhelm, S., A. J. Tavares, Q. Dai, S. Ohta, J. Audet, H. F. Dvorak a W. C. W. Chan. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nature Reviews Materials*. **2016**, 1(5), 1–12. ISSN 2058-8437. Doi:10.1038/natrevmats.2016.14.
- Münster, L., M. Fojtů, Z. Capáková, M. Muchová, L. Musilová, T. Vaculovič, J. Balvan, I. Kuřitka, M. Masařík a J. Vicha. Oxidized polysaccharides for anticancer-drug delivery: What is the role of structure? *Carbohydrate Polymers*. **2021**, 257, 117562. ISSN 0144-8617. Doi:10.1016/j.carbpol.2020.117562.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Jan Vicha, 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 užit 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

Tato diplomová práce se věnuje studiu biokonjugační reakce kyseliny hyaluronové a termoresponzivního poly(*N*-isopropylakrylamidu) s následnou regioselektivní oxidací vzniklých termoresponzivních konjugátů. Byl zde zkoumán vliv různých reakčních parametrů na vlastnosti připravených termoresponzivních konjugátů 2,3-dikarboxy hyaluronanu, u kterých byla pozorována dolní kritická teplota přechodu sol-gel okolo 32 °C. Dále byla sledována velikost a stabilita částic při 37 °C. Konjugáty vykazující nejmenší velikost a nejvyšší stabilitu byly využity pro navázání protirakovinového léčiva – dusičnanu *cis*-diammin-dichloro-phenanthridinplatnatého, přičemž byl opět sledován vliv různých parametrů této reakce na velikost vzniklých produktů a bylo studováno uvolňování léčiva ve fosfátem pufované soli o pH = 7,4.

Klíčová slova: termoresponzivní nosič léčiv, poly(*N*-isopropylakrylamid), biokonjugační reakce, regioselektivní oxidace, 2,3-dikarboxyhyaluronová kyselina, hydrodynamický průměr, dusičnan *cis*-diammin-dichloro-phenanthridinplatnatý

## ABSTRACT

This diploma thesis focuses on bioconjugation of hyaluronic acid and thermoresponsive poly(*N*-isopropylacrylamide) followed by regioselective oxidation of created thermoresponsive conjugates. An effect of different reaction parameters on the properties of prepared thermoresponsive conjugates of 2,3-dicarboxy hyaluronate was examined and lower critical solution temperature of the final products was established approximately at 32 °C. Size and stability of these conjugates at 37 °C had been determined. The conjugates with the lowest size and the highest stability were loaded by the anticancer drug *cis*-diamminechlorido(phenanthridine)platinum(II) nitrate and the effect of different reaction parameters of the loading reaction on the size of the final products was examined together with the release of the drug in phosphate-buffered saline at pH = 7.4.

Keywords: thermoresponsive drug delivery system, poly(*N*-isopropylacrylamide), bioconjugation, regioselective oxidation, 2,3-dicarboxyhyaluronic acid, hydrodynamic diameter, *cis*-diamminechlorido(phenanthridine)platinum(II) nitrate

Chtěl bych velmi poděkovat mému vedoucímu diplomové práce Mgr. Janu Víchovi, Ph.D. za jeho nesmírnou pomoc, velmi cenné informace, obrovskou podporu a skvělé vedení během psaní této práce i během mých studií na vysoké škole. Rovněž bych také chtěl poděkovat Ing. Lukáši Münsterovi, Ph.D. za jeho obětavost, trpělivost a obrovskou pomoc v laboratorním prostředí i během mých studií na vysoké škole. Díky nim jsem našel své životní poslání, za což jsem jim neskonale vděčný. Velmi také děkuji Ing. Monice Muchové, Ing. Alžbětě Důbravové a Vítkovi Hrbáčkovi za cenné informace a pomoc v laboratořích během měření a přípravě vzorků. Děkuji doc. Ing. et Ing. Ivu Kuřítkovi, Ph.D. et Ph.D. za jeho prvotní nasměrování mých zájmů na studium nosičů protirakovinových léčiv. Velké díky patří i všem vyučujícím z technologické fakulty univerzity Tomáše Bati ve Zlíně za veškeré informace, které mi během mých studií předali, především bych chtěl jmenovat doc. RNDr. Marka Ingra, Ph.D., RNDr. Evu Kutálkovou, Ph.D. a prof. RNDr. Petra Ponižila, Ph.D., za jejichž nesmírně cenné informace, inspirativní myšlenky a filozofii učení jsem velmi vděčný. Také bych chtěl poděkovat Zuzaně Vachalové za její pomoc a konzultaci ohledně českého pravopisu. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat mé rodině a blízkým za nekonečnou trpělivost či podporu během mých studií a psaní diplomové práce.

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

ÚVOD .....	9
<b>I. TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>10</b>
<b>1 CHYTRÉ MATERIÁLY .....</b>	<b>11</b>
1.1 MATERIÁLY REAGUJÍCÍ NA CHEMICKÉ FAKTORY.....	11
1.1.1 pH prostředí .....	11
1.2 MATERIÁLY REAGUJÍCÍ NA FYZIKÁLNÍ FAKTORY .....	14
1.2.1 Elektrické pole.....	14
1.2.2 Magnetické pole.....	15
1.2.3 Elektro-magnetické záření.....	17
1.2.4 Teplota .....	17
<b>2 TERMORESPONZIVNÍ POLYMERY .....</b>	<b>19</b>
2.1 POLYMERY VYKAZUJÍCÍ UCST .....	20
2.2 POLYMERY VYKAZUJÍCÍ LCST.....	22
<b>3 POLYSACHARIDY JAKO BIOPOLYMERY .....</b>	<b>25</b>
3.1 KYSELINA HYALURONOVÁ .....	27
<b>4 BOKONJUGAČNÍ REAKCE HA A PNIPAMU .....</b>	<b>29</b>
<b>5 SELEKTIVNÍ OXIDACE POLYSACHARIDŮ .....</b>	<b>32</b>
5.1 SELEKTIVNÍ OXIDACE POLYSACHARIDŮ – PRIMÁRNÍ FÁZE.....	32
5.2 SELEKTIVNÍ OXIDACE POLYSACHARIDŮ – SEKUNDÁRNÍ FÁZE .....	34
<b>6 TERMORESPONZIVNÍ NOSIČE PLATINOVÝCH PROTIRAKOVINOVÝCH LÉČIV .....</b>	<b>37</b>
6.1 PŘÍPRAVA TERMORESPONZIVNÍHO POLYSACHARIDOVÉHO NOSIČE S LÉČIVY NA BÁZI PLATINY.....	40
<b>7 POUŽITÉ METODY .....</b>	<b>43</b>
7.1 GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRFIE.....	43
7.2 INFRAČERVENÁ SPEKTROMETRIE S FOURIEROVOU TRANSFORMACÍ.....	44
7.3 NUKLEÁRNÍ MAGNETICKÁ REZONANCE .....	45
7.4 FOTONOVÁ KORELAČNÍ SPEKTROMETRIE .....	45
7.4.1 Stanovení zeta-potenciálu koloidních částic .....	46
7.5 ROTAČNÍ REOMETRIE S GEOMETRIÍ VÁLEC-VÁLEC .....	47
7.6 RENTGENOVĚ-FLUORESCENČNÍ SPEKTROMETRIE.....	48
7.7 TRANSMISNÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE .....	49
<b>8 CÍL PRÁCE .....</b>	<b>50</b>
<b>II. PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>51</b>
<b>9 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>52</b>
9.1 MATERIÁLY A PŘÍSTROJE .....	52
9.2 PŘÍPRAVA VZORKŮ DCH-PNIPAM .....	54
9.2.1 pNIPAMace.....	55
9.2.2 Primární oxidace.....	56
9.2.3 Sekundární oxidace .....	57
9.3 PŘÍPRAVA OXIDOVANÝCH KONJUGÁTŮ S PHPT.....	58
<b>10 VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>61</b>
10.1 STRUKTURA VZNIKLYCH PRODUKTŮ.....	61
10.2 DEGRADACE MOLÁRNÍ HMOTNOSTI PRODUKTŮ.....	65
10.3 VELIKOST ČÁSTIC A STABILITA OXIDOVANÝCH KONJUGÁTŮ .....	66
10.3.1 Důvody změny velikosti a stability konjugátů .....	69
10.4 STANOVENÍ LCST .....	71
10.5 VLIV REAKČNÍCH PARAMETRŮ NA VELIKOST ČÁSTIC A PDI KONJUGÁTŮ DCH-PNIPAM S NAVÁZANÝM PHPT	

10.6	TEM ANALÝZA .....	76
10.7	UVOLŇOVÁNÍ PHPT Z KONJUGÁTŮ DCH-PNIPAM A DCH .....	78
<b>ZÁVĚR.....</b>		<b>84</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>		<b>86</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>		<b>92</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>		<b>98</b>
<b>SEZNAM TABULEK .....</b>		<b>100</b>



## ÚVOD

V současné době dochází k nárůstu využívání tzv. chytrých materiálů v podobě různých aplikací od elektroniky, distribuce surovin až po medicínu, ve které získávají tyto materiály čím dál větší úspěch. Tyto materiály obecně reagují na odlišné faktory okolního prostředí změnou svých daných vlastností, přičemž nejznámějšími faktory jsou chemické, kam lze zařadit pH prostředí, a fyzikální, např. v podobě světla, elektrického pole či teploty. Z hlediska medicíny jsou intenzivně zkoumány především pH- a termoresponzivní materiály v podobě rozmanitých systémů a struktur, které mohou potenciálně najít aplikaci především jako nosiče léčiv či scaffoldy pro pěstování buněk. Termoresponzivní systémy lze efektivně využít pro obě zmíněné aplikace, kdy při vhodném výběru daného systému skládajícího se nejčastěji z jednoho či více polymerů, je možné dosáhnout při změně teploty požadovaného děje – přichycení/uvolnění buněk nebo navázání/uvolnění léčiva. Tyto děje jsou důsledkem změny vlastností termoresponzivního systému v závislosti na měnící se teplotě, přičemž tyto systémy vykazují horní kritickou teplotu přechodu gel-sol, dolní kritickou teplotu přechodu sol-gel nebo kombinaci těchto dvou kritických teplot. V případě termoresponzivních nosičů léčiv se hojněji využívají termoresponzivní systémy vykazující dolní kritickou teplotu přechodu sol-gel zejména díky jejich vhodnějším vlastnostem v prostředí lidského těla, jehož teplota se pohybuje přibližně okolo 37 °C. Jedny z možných transportovatelných léčiv v oblasti termoresponzivních systémů jsou protirakovinová léčiva, kdy díky vhodným vlastnostem tohoto systému při zvýšené tělesné teplotě v okolí rakovinové tkáně může dojít k cílenému a pozvolnému uvolňování velkého množství takového léčiva. Pokud dojde k modifikaci termoresponzivního nosiče například méně toxickým polymerem jako je polysacharid, který se může vázat na některé receptory rakovinových buněk, je možné zvýšit efektivitu pronikání léčiva do buněk. Pro nejlepší výsledky je ovšem potřeba snížit velikosti částic takového termoresponzivního nosiče na bázi modifikovaného polysacharidu na mikrorozměry až nanorozměry. Dále zvýšení počtu reaktivních míst na termoresponzivním systému pro protirakovinové léčivo vede k potenciálnímu zvýšení množství navázaného léčiva.

V této práci jsem se věnoval přípravě termoresponzivních oxidovaných konjugátů 2,3-dikarboxyhyaluronové k. a poly(*N*-isopropylakrylamidu), které by mohly být potenciálně vhodnými nosiči protirakovinového platinového léčiva.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 CHYTRÉ MATERIÁLY

Chytré materiály (z angl. Smart Materials) v současné době nabývají velkého významu v řadě odvětví a jejich aplikace nabývá na intenzitě, jelikož ovlivňují či dokonce vylepšují některé vlastnosti původních „nechytrých“ materiálů. Těmto materiálům se také říká stimuli-responzivní a mohou být ve formě pevných látek, kapalných roztoků, suspenzí anorganických či organických částic [1]. Stimuli-responzivní znamená, že u nich dochází ke změně různých vlastností v prostředí pomocí externích faktorů, které jsou charakteristické pro dané prostředí. Nejčastěji se jedná o chemické, fyzikální a biochemické faktory, které ovlivňují chování samotných materiálů. Konkrétních faktorů je mnoho, např. elektrické a magnetické pole, světlo, teplota, pH prostředí nebo přítomnost enzymů [1–4].

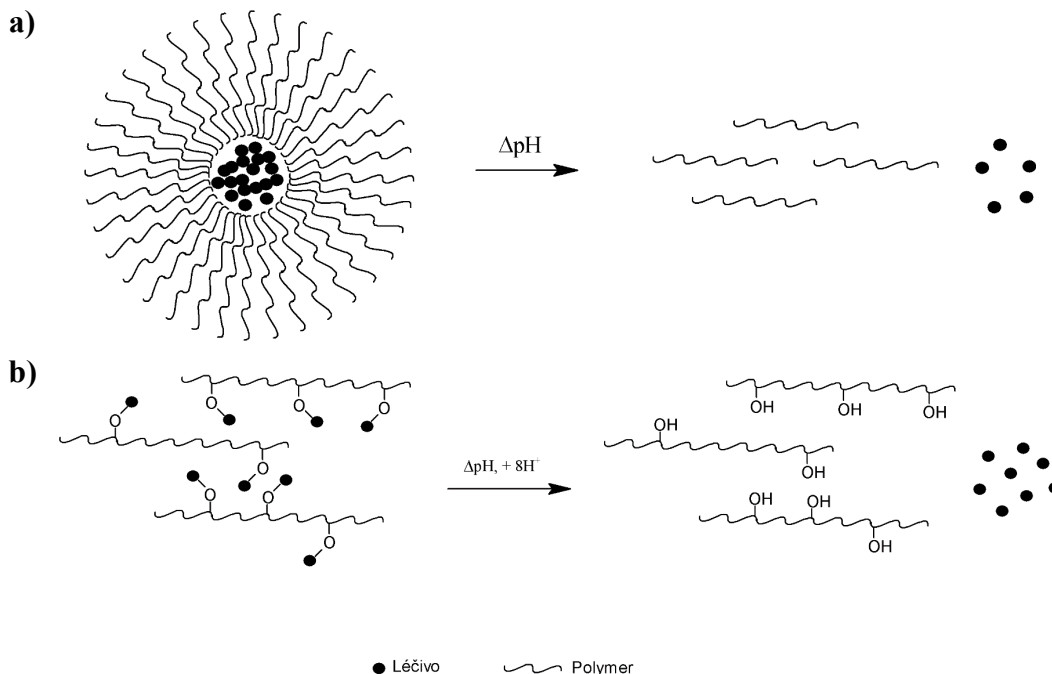
### 1.1 Materiály reagující na chemické faktory

#### 1.1.1 pH prostředí

Materiály, které je možné ovlivňovat pomocí pH prostředí, jsou tvořeny zejména roztoky pH-responzivních polymerů – polyelektrolytů. Zároveň tento polymer musí obsahovat funkční skupiny ochotně poskytující nebo přijímající protony dle Brønsted-Lowryho teorie v závislosti na pH prostředí. Ovlivněním pH okolního prostředí lze měnit vlastnosti polymerních struktur, jako jsou tvorba micel a supramolekulárních uspořádání, botnání nebo smrštění. Změna struktury polymerního řetězce má vliv na konečné vlastnosti polyelektrolytu, např. na změnu viskoelastických vlastností, změnu spektrometrických vlastností, či samouzdravovací vlastnosti (z angl. self-healing) [1].

Díky strukturním změnám makromolekul pH-responzivních systémů v závislosti na měnícím se pH prostředí je lze využít například jako nosiče léčiv, senzory, či modifikátory viskozity [2]. V současnosti jsou tyto systémy intenzivně zkoumány z hlediska protinádorové terapie, jelikož ve většině zdravých tkáních a krevním řečišti bývá velmi často konstantní pH prostředí o hodnotě 7,4, zatímco uvnitř buněk může být  $\text{pH} = (7,0–7,2)$ . Avšak u většiny nádorových tkání vně buněk se hodnota pH pohybuje v intervalu  $(6,5–7,2)$  [5]. Díky rozdílu pH hodnoty zdravé a nádorové tkáně může dojít k uvolnění protinádorového léčiva z pH-responzivního nosiče, přičemž se nejčastěji využívají dva mechanismy uvolňování. První je založen na uvolnění slabě vázaného léčiva při změně rozměru nebo rozpadu

supramolekulárních micel pH-responzivních polymerů (Obrázek 1a) a druhý mechanismus spočívá v protonaci a následnému rozštěpení kovalentní vazby mezi léčivem a funkční skupinou pH-responzivního polymeru (Obrázek 1b) [2].



Obrázek 1: Ilustrace možného uvolnění léčiva z pH-responzivních systémů. Rozpad micely a následné uvolnění léčiva (a), protonace funkční skupiny s navázaným léčivem s jeho následným uvolněním (b) [2].

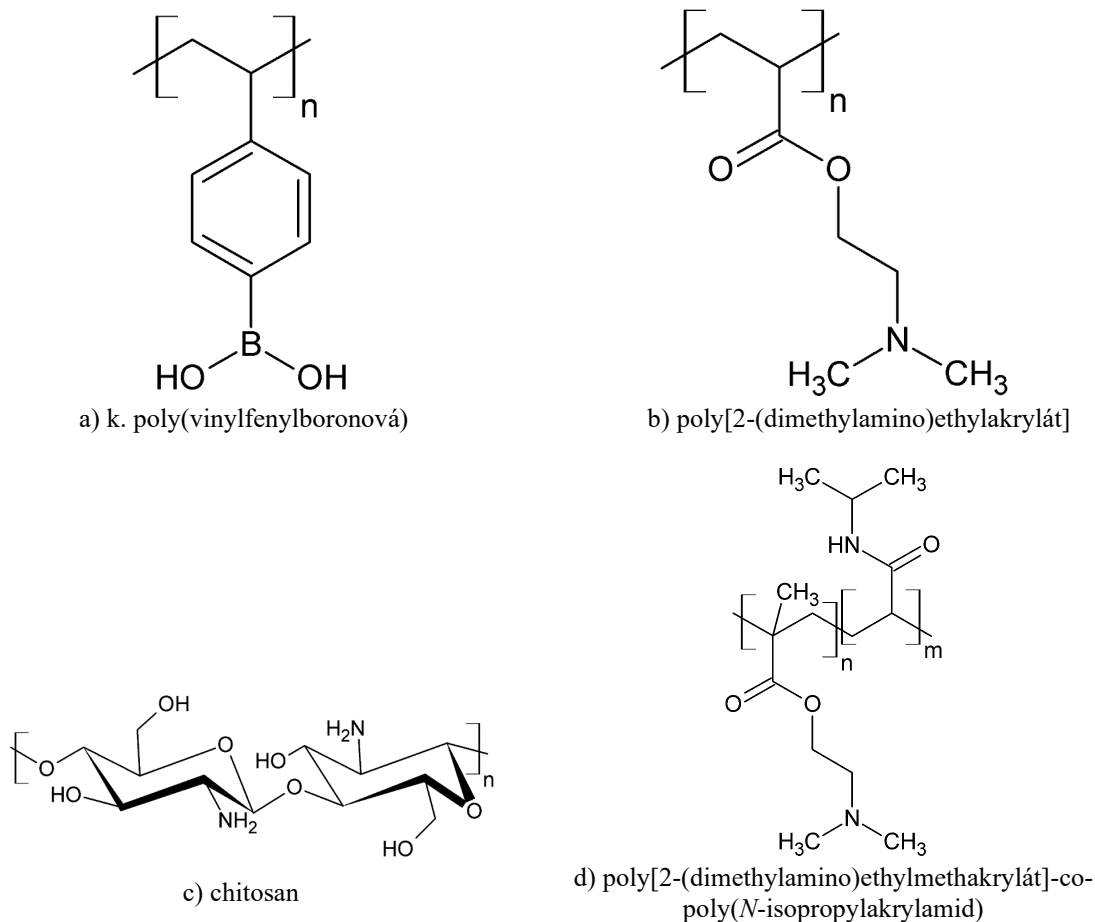
pH-responzivní polymery lze rovněž využít jako modifikátory viskozity roztoků, např. polymery obsahující katecholové skupiny mohou v kombinaci s kovy (Fe, Ti, Ag) vytvářet síťované struktury prostřednictvím koordinačně kovalentních vazeb v závislosti na zvyšování pH prostředí, přičemž dochází k nárůstu viskozity. Při zvyšujícím se pH prostředí dochází k mnohačetnému navázání pH-responzivního polymeru na kovový ligand a při velmi vysokém pH může u takového systému dojít až k vytvoření kovalentních vazeb mezi polymery, což zvýší viskozitu takového systému. pH-responzivní systémy, které jsou síťovány prostřednictvím koordinačně kovalentních vazeb, vykazují rychlejší samouzdravovací vlastnosti než systémy obsahující kovalentně síťované vazby [1, 2].

pH-responzivní polymery lze roztrždit do 4 pomyslných skupin [2]:

- 1) pH-responzivní kyselé polymery: Obsahují převážně slabě kyselé funkční skupiny, jež při nízkém pH prostředí ochotně přijímají protony za vzniku celkového neutrálního náboje polymerního řetězce a při vysokém pH

protony uvolňují za vzniku záporného náboje. Lze zde zařadit např. k. poly(vinylfenylboronová) (Obrázek 2a).

- 2) pH-responzivní bazické polymery: Obsahují převážně slabé bazické funkční skupiny, které při nízkém pH prostředí přijímají protony za vzniku celkového kladného náboje polymerního řetězce a uvolňují je při vysokém pH prostředí za vzniku neutrálního náboje. Řadí se zde např. poly[2-(dimethylamino)ethylakrylát] (Obrázek 2b).
- 3) pH-responzivní přírodní polymery: Tyto polymery obsahují kyselé, bazické či obojí funkční skupiny ve své struktuře. Typicky se jedná o polysacharidy nebo proteiny. Pokud tyto skupiny nejsou přítomny na řetězcích například polysacharidů, je možné je vhodnou modifikací vytvořit, např. selektivní oxidací lze hydroxylové skupiny převést na karboxylové skupiny. Příkladem může být chitosan (Obrázek 2c).
- 4) Multi-responzivní polymery: Jsou responzivní na více faktorů zároveň, než je jen pH okolního prostředí. Jako další faktory lze uvést teplotu, elektro-magnetické záření, elektrické a magnetické pole, biostimuly [6], redukčně-oxidační prostředí. Jedná se také o polymery připravené k modifikaci či roubování základního polymerního řetězce, který vykazuje stimuli-responzivní chování či nikoliv, pomocí různých stimuli-responzivních substituentů nebo polymerů. Typickým příkladem je kopolymer poly[2-(dimethylamino)ethylmethakrylátu] s poly(*N*-isopropylakrylamidem) vykazující pH-termoresponzivitu (Obrázek 2d).

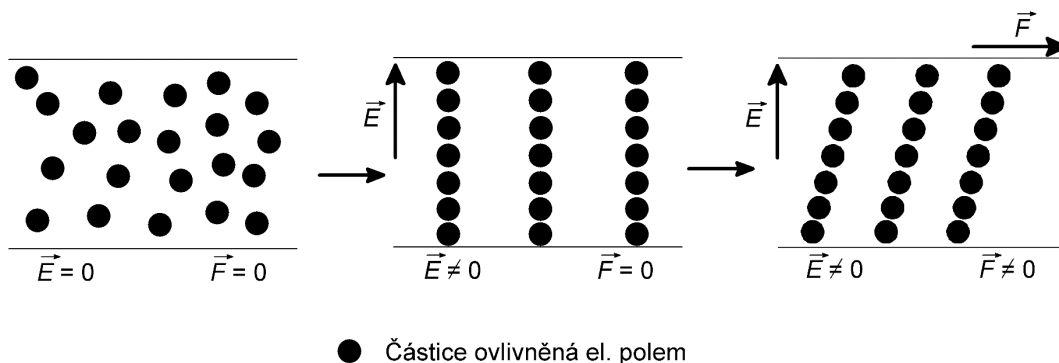


Obrázek 2: Příklady pH-responzivních a multi-responzivního polymeru [2].

## 1.2 Materiály reagující na fyzikální faktory

### 1.2.1 Elektrické pole

Elektrické pole se z hlediska stimuli-responzivních materiálů využívá primárně u kapalných suspenzí, jež nazýváme elektoreologické suspenze (ERS), kdy je dispergovaná fáze tvořena částicemi, které jsou polarizovatelné. Je důležité, aby částice byly v suspenzi mobilní, protože po aplikaci elektrického pole se částice orientují ve směru intenzity elektrického pole a vytváří řetězové struktury (Obrázek 3), a zároveň musí dojít k přenosu náboje prostřednictvím částic. Díky vzniklým strukturám dochází ke zvýšení mechanických vlastností, jako je smykové napětí či viskozita, ve směru kolmém na vektory veličiny intenzity elektrického pole. Důvodem je interakce polarizovaných částic tvořících řetězové struktury pomocí elektrostatických sil. Po vypnutí elektrického proudu dojde k zániku řetězových struktur a mechanické vlastnosti se sníží. Jedná se tedy o reverzibilní děj [1, 4, 7].



Obrázek 3: Ilustrace vytvoření řetězkových struktur z částic prostřednictvím elektrického pole a jejich deformace pomocí externí síly ( $\vec{E}$  je vektor intenzity elektrického pole a  $\vec{F}$  je vektor vnější síly) [1, 7].

Elektroreologická suspenze se nejčastěji skládá z [1]:

- 1) Částic, které mohou být v kapalně fázi (kapalné krystaly) či v pevné fázi (anorganické, organické částice).
- 2) Kapalného média, které by mělo být nevodivé, aby při aplikaci elektrického pole nedošlo ke zkratu celého systému. Nejčastěji se používá silikonový olej.
- 3) Aditiv pro ovlivnění vlastností ERS, např. voda nebo močovina.

Využití elektrického pole lze také u transportu ropy, kdy při vhodném zapojení elektrického pole, tj. ve směru intenzity elektrického pole podél směru toku, dochází ke snížení viskozity ropy, protože částice formují řetězce orientované rovnoběžně s vektory intenzity elektrického pole, čímž se zrychlí jejich tok [1, 8]. Obdobně lze aplikovat elektrické pole při výrobě čokolády. Vhodná orientace elektrického pole sníží viskozitu čokoládové taveniny o (40–50) % [9]. Díky tomu lze zvýšit obsah kakaových částic a snížit množství tuku v konečném čokoládovém výrobku, takto vzniklá čokoláda je chutnější a zdravější [1, 9].

### 1.2.2 Magnetické pole

Princip působení magnetického pole na stimuli-responzivní materiál je obdobný jako u elektrického pole. Částice v systému musí podléhat magnetizaci v magnetickém poli, přičemž dojde k jejich orientaci ve směru vektoru magnetické indukce a opět ke tvorbě řetězců částic (Obrázek 4). Při působení magnetického pole nedochází k přenosu náboje prostřednictvím částic, ale v částicích se indukují magnetické domény, které interagují s magnetickým polem a orientují se v jeho směru.

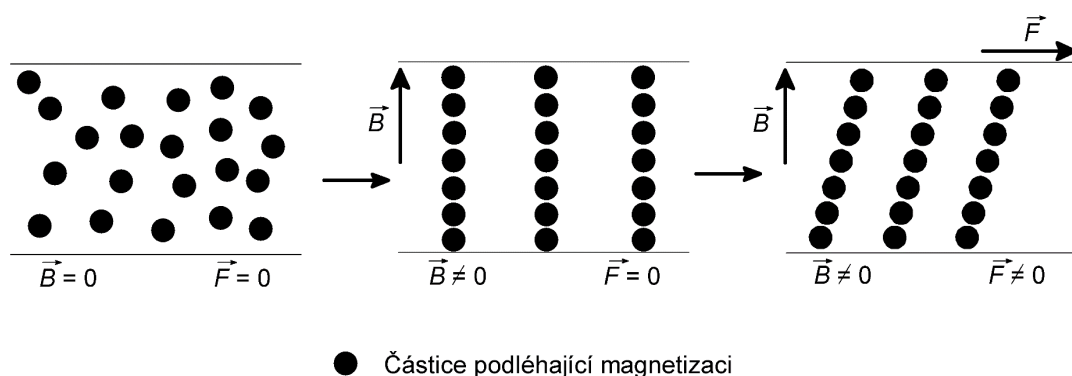
Z tohoto důvodu lze použít nejen kapalné systémy, ale také pevné v podobě různých elastomerů. Částice podléhající magnetizaci v kapalině tvoří magnetoreologické kapaliny (MRK), u matric se nejčastěji používají elastomery a tvoří tedy tzv. magnetoreologický elastomer (MRE). Při působení magnetického pole na takový materiál dojde ke zvýšení mechanických vlastností (viskozita, smykové napětí) v kolmém směru na působící magnetickou indukci. Po vypnutí magnetického pole nebo po vyjmutí materiálu z něj dojde k rozrušení organizovaných řetězců a mechanické vlastnosti se vrátí do původního stavu, avšak ztráta magnetického chování částic se řídí hysterezní křivkou [1, 4, 10].

MRK obsahují [1]:

- 1) Kapalnou fází – voda, krev, silikonový olej.
- 2) Pevné částice – magnetit, směs kobaltu a železa, karbonyl železa.
- 3) Aditiva – maghenit nebo jílové částice.

MRE se skládá z [1]:

- 1) Matrice – může být tvořena síťovaným přírodním kaučukem.
- 2) Pevných částic – obdobně jako u MRK.
- 3) Aditiv – obdobně jako u MRK.



Obrázek 4: Ilustrace vytvoření organizovaných struktur z částic podléhající magnetizaci prostřednictvím magnetického pole a jejich deformace pomocí externí síly ( $\vec{B}$  je vektor intenzity magnetického pole a  $\vec{F}$  je vektor vnější síly) [1, 10].

Magnetoreologické systémy lze využít při mechanickém tlumení vibrací, kdy tyto systémy absorbují nebo izolují mechanické vlnění. Princip spočívá v indukování elektrického pole v cívce za přítomnosti permanentního magnetu prostřednictvím mechanického namáhání. Vzniklé elektrické pole vytváří zároveň i magnetické pole, které ovlivňuje vlastnosti přítomného MRE či MRK [11]. Mění se tak jeho



mechanické vlastnosti a pohlcuje či odolává mechanickým oscilacím z externího prostředí. Takový komplexní systém lze využít v absorbérech vibrací u konstrukcí mostů nebo u lidských protéz [1, 11].

### 1.2.3 Elektro-magnetické záření

Ovlivnění vlastností foto-responzivních materiálů za využití elektromagnetického (elmag.) záření se nazývá fotoaktuace (z angl. photoactuation). Samotné elektromagnetické vlnění působí nepřímo na materiál, jelikož se jeho energie absorbuje a převádí se na tepelnou energii, která v konečném důsledku ovlivňuje chování materiálu. Nejčastěji dochází k rozměrovým změnám daného materiálu nebo ke změně mechanických vlastností. Působení elmag. záření musí být však krátké, aby nedošlo k degradaci materiálu, tudíž je nutné, aby daný materiál vykazoval rychlou změnu požadovaných vlastností. Pokud elmag. záření přestane působit, dojde k obnově původních vlastností materiálu a fotoaktuace je tedy reverzibilní [1].

Potenciální využití takových materiálů může být u hmatových 3D displejů či přístrojů podporujících Braillovo písmo pro nevidomé, kdy je informace převedena z digitálního prostředí do fyzického prostřednictvím fotoaktuace, kterou vyvolávají diody pod foto-responzivními materiály. Dochází ke změně rozměrů tohoto materiálu v závislosti na působení elmag. záření, a tím dojde k vytvoření 3D obrazu nebo Braillova písma, k čemuž by jinak nedošlo [1].

Mezi nejpoužívanější materiály pro fotoaktivaci lze považovat foto-responzivní polymery, kapalné elastomerní krystaly v nematickém uspořádání, kompozity foto-responzivních polymerů a uhlíkových alotropů, keramiky vykazující piezoelektrický efekt nebo chalkogenidová skla [1, 12].

### 1.2.4 Teplota

Teplota prostředí mění dané vlastnosti u tzv. termoresponzivních systémů. Tyto systémy jsou tvořeny nejčastěji termoresponzivním polymerem a kapalinou, která je často rozpouštědlem pro daný polymer. Ovlivňováním teploty prostředí dochází ke změně konformace struktury polymeru, a to na hydrofobní nebo hydrofilní, v závislosti na chemickém složení jeho bočních substituentů nebo hlavního řetězce. Vlastnosti ovlivněné u takových systémů při změně teploty mohou být viskoelastické povahy – viskozita, dynamické moduly, smykové napětí, nebo dochází ke změně spektrometrických vlastností – absorbance, reflektance [1, 3, 13].

Termoresponzivní systémy mají potenciální využití primárně v medicíně a farmacii v podobě různých hydrogelů, nosičů léčiv či scaffoldů. Jejich aplikace spočívá primárně ve změně hydrofilní konformace na hydrofobní a naopak [1, 3, 13] (Kapitola 2).

Konkrétních termoresponzivních polymerů je celá řada, primárně se využívají deriváty polyakrylamidů či jejich roubované varianty. Kapalná fáze se používá v závislosti na požadované aplikaci a vzhledem k povaze termoresponzivního polymeru v závislosti na jeho hydrofilním či hydrofobním charakteru. Lze tak využít vodu nebo fyziologické roztoky [1, 3]. Těmito polymery se zabývá také tato práce, a proto se jim podrobněji věnuje v dalších kapitolách.

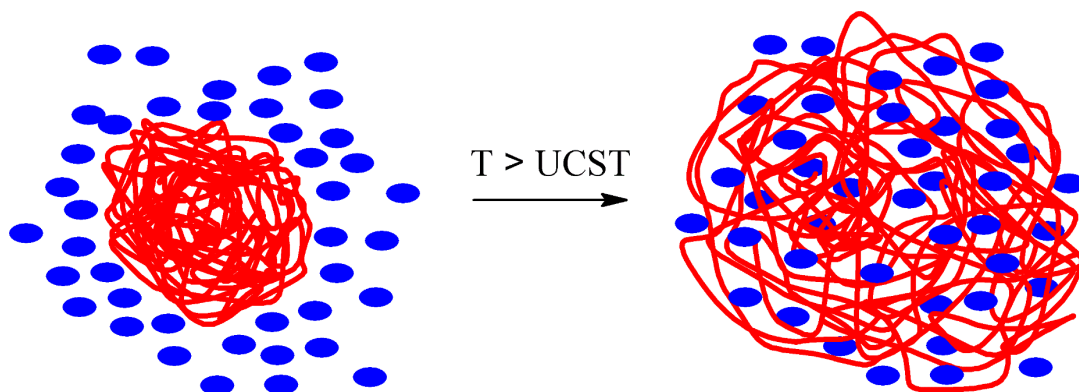
## 2 TERMORESPONZIVNÍ POLYMERY

Termoresponzivní polymery reagují na změnu teploty prostřednictvím hydrofilních a hydrofobních skupin v jejich struktuře. Mezi hydrofilní funkční skupiny lze zařadit ty, které vytváří ochotně vodíkové vazby a jsou polární, například karboxylová, hydroxylová nebo aminová skupina. Díky těmto skupinám dochází k solvataci polymerních struktur molekulami vody a k jejich bobtnání, kdy se molekuly vody dostávají mezi řetězce polymerního klubka směrem do středu [13].

Naopak hydrofobní funkční skupiny jsou nepolární, typicky dlouhé alifatické řetězce či cyklické struktury. Tyto funkční skupiny nejsou solvatovány molekulami vody a spíše dochází k jejich vypuzování z vodného prostředí, přičemž dochází k jejich shlukování do hydrofobních struktur, které jsou rovněž ovlivňovány slabými hydrofobními interakcemi [1, 3, 13]. Tyto systémy rovněž vykazují tzv. kritickou micelární koncentraci ve vodném prostředí (z angl. critical micellar concentration, CMC), pod kterou se polymery nachází ve formě jednotlivých řetězců v roztoku. Při zvyšování koncentrace daného polymeru v roztoku dochází k vypuzování hydrofobních funkčních skupin z vodného roztoku směrem k rozhraní, resp. povrchu kapaliny a druhé fáze, nejčastěji plynné fáze, kdy dochází k orientaci hydrofilních skupin směrem do kapaliny a hydrofobních skupin směrem od ní. Po nasycení rozhraní kapaliny těmito polymery, a tedy dosažení CMC, dochází následně ke tvorbě micel, což jsou supramolekulární útvary, které jsou tvořeny zvnějšku hydrofilními funkčními skupinami a uvnitř hydrofobními skupinami v případě vodného polárního roztoku. Pokud je roztok tvořen nepolární hydrofobní kapalinou, dochází k opačnému upořádání funkčních skupin, tedy hydrofobní skupiny jsou vně micely a hydrofilní uvnitř. Při navyšování koncentrace dochází k agregaci micelárních struktur, jež začnou tvořit převážně fyzikálně síťované struktury [1].

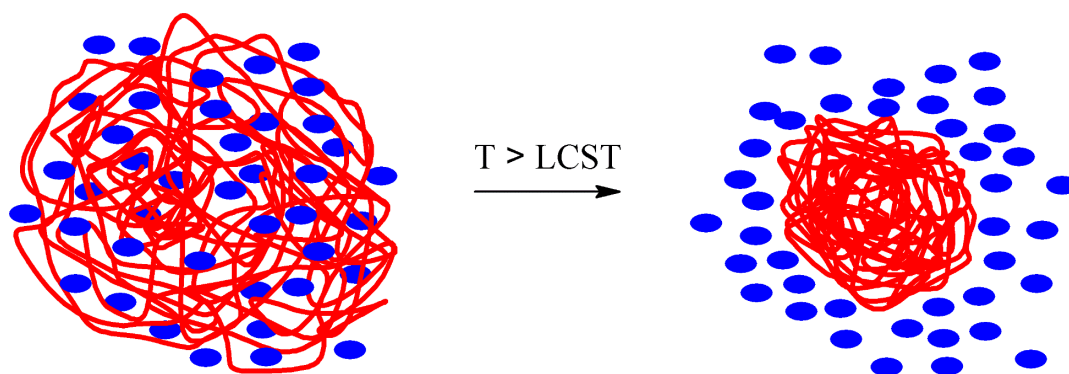
U termoresponzivního polymeru dochází prostřednictvím hydrofilních a hydrofobních skupin k jeho hydrataci, resp. dehydrataci v roztoku, přičemž stěžejní roli má teplota. Termoresponzivní polymer je tedy při určitých teplotách ve vodném roztoku hydratovaný, tedy převažuje u něj hydrofilní charakter, avšak při jiných teplotách se nachází v dehydratované formě a vykazuje hydrofobní chování. Přechod mezi hydratovanou a dehydratovanou formou je dán kritickou teplotou, která se dělí na dva typy. První je horní kritická teplota přechodu gel-sol (z angl. upper critical solution temperature, UCST). Definuje termoresponzivní polymer, který se pod UCST

nachází ve vodném roztoku v dehydratované formě, tedy neobsahuje ve své struktuře molekuly vody a vytváří hydrofobní struktury. Avšak po zvýšení teploty nad UCST dojde k hydrataci struktury termoresponzivního polymeru a dojde tak k jeho rozpuštění za vzniku roztoku (Obrázek 5) [1, 3, 13].



Obrázek 5: Hydratace polymeru vykazující UCST pomocí zvýšení teploty nad hodnotu UCST [3].

Druhým typem kritické teploty je dolní kritická teplota přechodu sol-gel (z angl. lower critical solution temperature, LCST), kdy se pod kritickou teplotou polymerní struktura nachází v hydratované formě a po zahřátí nad LCST dojde k dehydrataci polymeru, a tedy k vypuzení vody ze struktury polymeru (Obrázek 6). Systémy vykazující UCST i LCST lze navrátit do původního stavu opětovnou změnou teploty. Jedná se tedy o reverzibilní systémy [1, 3, 13]. Lze vytvořit polymery vykazující UCST a zároveň i LCST, kdy hydratace a dehydratace příslušných polymerů vykazující UCST a LCST závisí na tom, jestli je UCST systému vyšší nebo nižší než LCST.

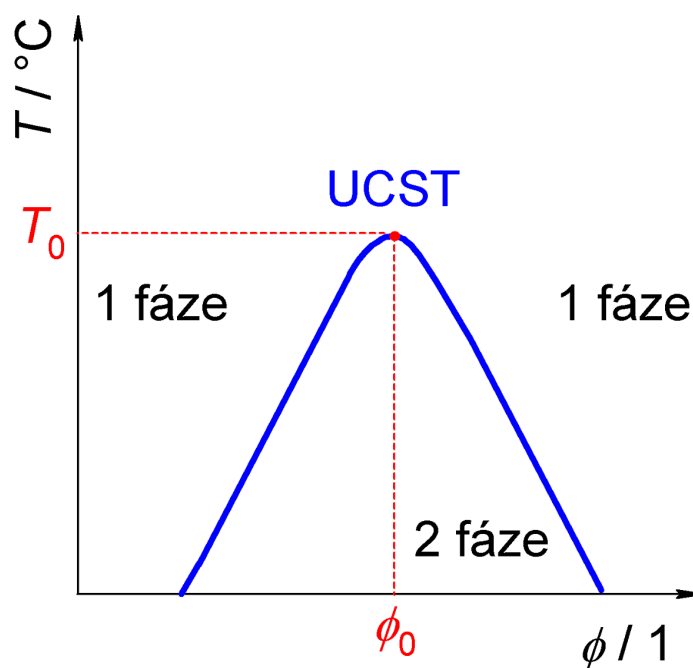


Obrázek 6: Dehydratace polymeru vykazující LCST pomocí zvýšení teploty nad hodnotu LCST [3].

## 2.1 Polymery vykazující UCST

Obecně u vodných roztoků termoresponzivních polymerů vykazující UCST s jedním fázovým přechodem platí takový fázový diagram (Obrázek 7), kde danému

objemovému zlomku polymeru v roztoku odpovídá určitá hodnota UCST. Modrá křivka vyznačuje závislost měnící se hodnoty UCST při změně obsahu daného polymeru. Při ideálním obsahu je hodnota UCST nejvyšší pro daný termoresponzivní polymer. Při zvýšení ale i snížení obsahu polymeru v roztoku dochází ke snižování UCST hodnoty. Při snížení teploty pod UCST dojde k dehydrataci polymerní struktury, vytvoří se dvě nemísitelné fáze (kapalina a polymer) a dojde k zakalení směsi polymeru a rozpouštědla. Nicméně po zvýšení teploty nad UCST dojde k hydrataci polymerní struktury a vzniká jedna mísitelná fáze, přičemž polymerní roztok není zakalený [3, 13].

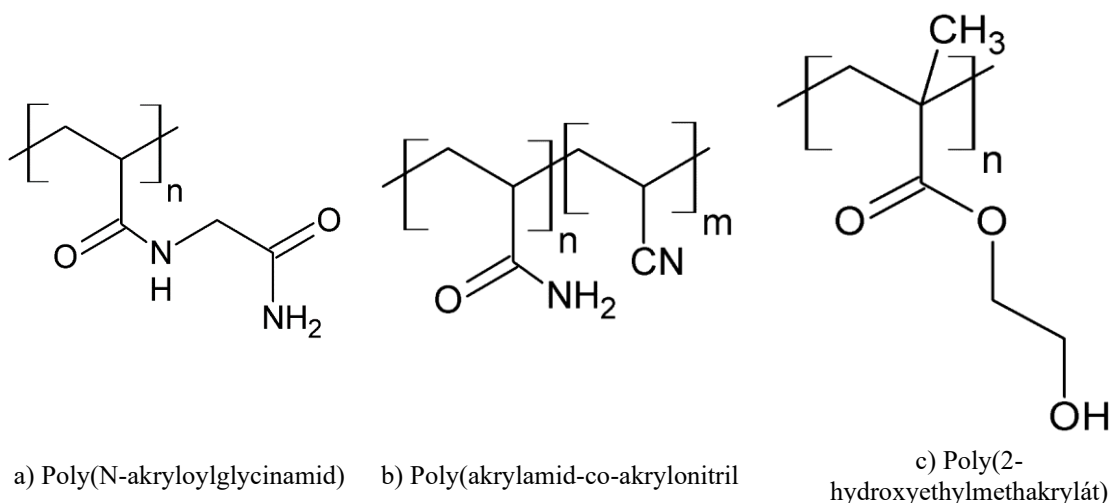


Obrázek 7: Fázový diagram (závislost teploty  $T$  na objemovém zlomku polymeru  $\phi$ ) pro polymer vykazující UCST, kde  $T_0$  představuje ideální teplotu při ideálním obsahu  $\phi_0$  termoresponzivního polymeru vykazující UCST [3, 13].

O polymery vykazující UCST není v současnosti velký zájem v porovnání s polymery vykazující LCST, jelikož jsou jejich charakteristiky vysoce závislé na vlastnostech prostředí, ve kterém se nachází, jako např. pH, iontová síla a koncentrace. Tímto vznikají určité limitace v potenciálním využití takových polymerů. Avšak i přes tyto limitace nachází uplatnění u nosičů léčiv, kdy je lipofilní léčivo vázáno na termoresponzivní polymer při nízkých teplotách, přičemž jeho uvolnění proběhne po zvýšení teploty nad UCST [3]. Dále lze tyto termoresponzivní polymery využít pro tvorbu hydrogelů, jenž vznikají po ochlazení polymerního roztoku, je možné tedy

injektovat zahřátý roztok polymeru obsahující podpůrné či léčivé látky nad UCST do těla, kdy dojde ke snížení teploty a tvorbě hydrogelu, jehož síť zpomalují uvolňování léčiva nebo podpůrných látek v čase. Polymery vykazující UCST lze využít pro separaci proteinů v koloně, kdy po snížení teploty v koloně lze zachytit a separovat různé proteiny v závislosti na obsažených funkčních skupinách v UCST polymerech [3, 13].

Mezi nejčastější systémy vykazující UCST je možné uvést např. poly(N-akryloylglucosaminid), poly(akrylamid-co-akrylonitril), poly(2-hydroxyethylmethakrylát) (Obrázek 8a–c) [3, 13].

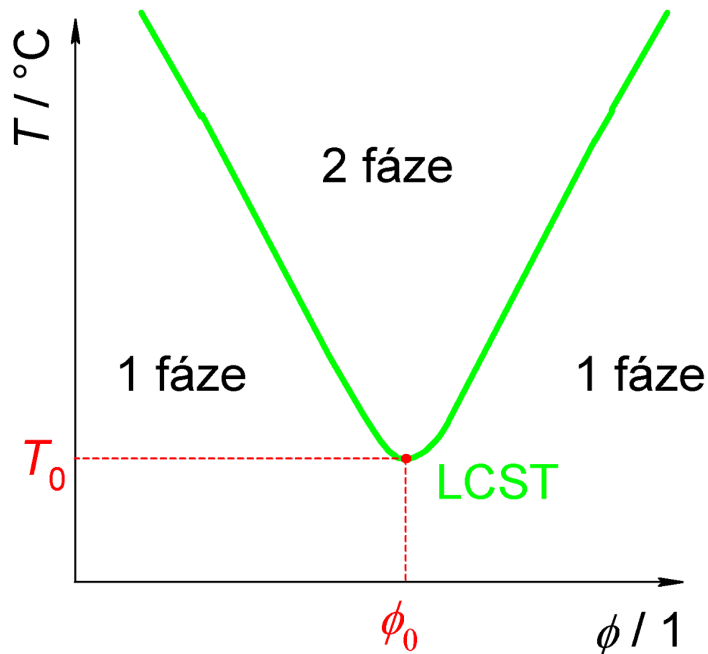


Obrázek 8: Polymery vykazující UCST [3].

## 2.2 Polymery vykazující LCST

Fázový diagram (Obrázek 9) vodných roztoků termoresponzivních polymerů vykazující LCST pouze s jedním fázovým přechodem ukazuje, že danému objemovému zlomku polymeru v roztoku odpovídá určitá hodnota LCST. Zelená křivka vyznačuje závislost měnící se hodnoty LCST při změně obsahu odpovídajícího polymeru. Obdobně jako u systémů vykazujících UCST, odpovídá ideální obsah polymeru nejnižší možné hodnotě LCST pro daný termoresponzivní polymer. Při zvýšení, ale i snížení, obsahu polymeru v roztoku dochází ke zvyšování LCST hodnoty [3, 13]. Při zvýšení teploty nad LCST dojde k dehydrataci polymerní struktury, vytvoří se dvě nemísitelné fáze (kapalina a polymer) a dojde k zakalení směsi polymeru a rozpouštědla (vody). Po snížení teploty pod LCST dojde k hydrataci polymerní struktury, vznikne jedna mísitelná fáze a polymerní roztok není zakalený. Zelená křivka vyznačuje závislost měnící se hodnoty LCST při změně obsahu

odpovídajícího polymeru. Při zvýšení, ale i snížení, obsahu polymeru v roztoku dochází ke zvyšování LCST hodnoty [3, 13].

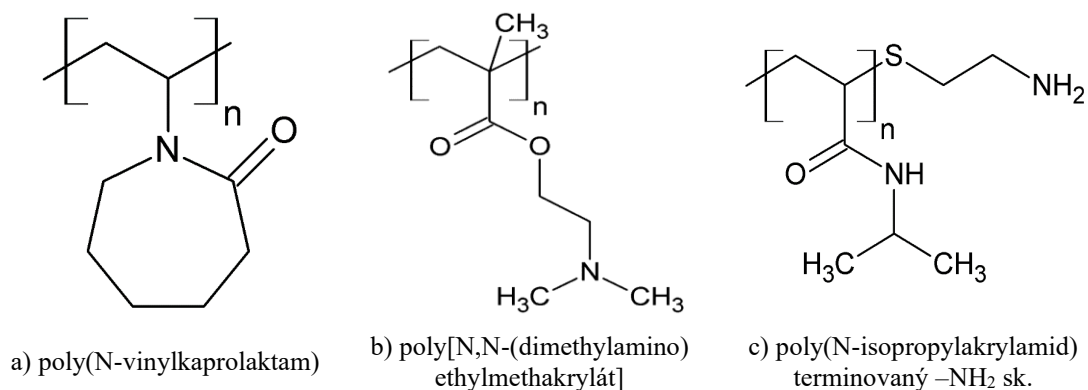


Obrázek 9: Fázový diagram (závislost teploty  $T$  na objemovém zlomku polymeru  $\phi$ ) pro polymer vykazující LCST, kde  $T_0$  představuje ideální teplotu při ideálním obsahu  $\phi_0$  termoresponzivního polymeru vykazující LCST [3, 13].

Termoresponzivní polymery vykazující LCST jsou v současnosti běžnější oproti UCST systémům a jsou tak více využívány v různých aplikacích, zejména v biomedicině [3]. Důvodem jsou hlavně požadované vlastnosti termoresponzivního systému při daných teplotách. Zatímco při běžné teplotě je polymer v roztoku, při teplotách nad LCST (např. při tělesné teplotě) je polymer zpravidla v dehydratované formě a vznikají tak hydrofobní struktury, na které je možné například zachytit různé druhy buněk. Tohoto lze využít v tkáňovém inženýrství pro přípravu substrátů či scaffoldů pro kultivaci buněk [3]. Zachycené buňky (lidské nebo savčí) se na takovémto termoresponzivním substrátu množí, potažmo diferencují, při teplotě (36–37) °C [14]. Po ochlazení takového systému pod hodnotu LCST dojde k hydrataci polymerních řetězců, jež se stanou hydrofilní, a vypěstované buňky se tak uvolní do okolního prostředí [15]. Podobného výsledku u UCST systému by nebylo možné dosáhnout, jelikož po snížení teploty pod UCST by nedošlo k uvolnění buněk, protože se polymery vykazující UCST nachází v dehydratované formě. Pokud by došlo ke zvýšení teploty nad UCST,

a tedy k hydrataci termoresponzivních polymerů, mohlo by dojít k uvolnění buněk. Nicméně vzhledem k omezenému rozsahu teplot při pěstování lidských či savčích buněk by mohlo dalším navýšení teploty dojít k nežádoucím jevům v podobě koagulace proteinů uvnitř a vně buněčných struktur, což by mohlo vést k buněčné smrti. Další potenciální využití polymerů vykazujících LCST je u nosičů léčiv, kdy se využívá tvorby micelárních či tzv. core-shell struktur termoresponzivních systémů nad LCST, v nichž jsou obsaženy biologicky aktivní látky či léčiva. Transportované látky bývají většinou hydrofobního charakteru, aby došlo k jejich obalení termoresponzivním systémem a centrování do nitra supramolekulární struktury. Tímto je možné efektivněji transportovat látku na požadované místo, aniž by došlo k jejímu předčasnému uvolňování [1, 3, 13].

Mezi nejpoužívanější termoresponzivní polymery vykazující LCST lze zařadit např. poly(N-vinylkaprolaktam), poly[N,N-(dimethylamino)ethylmethakrylát] či poly(N-isopropylakrylamid), který může být terminovaný aminovou skupinou (Obrázek 10a–c), což je výhodné například pro biokonjugační reakci s karboxylovou skupinou (Kapitola 4) [3, 16].



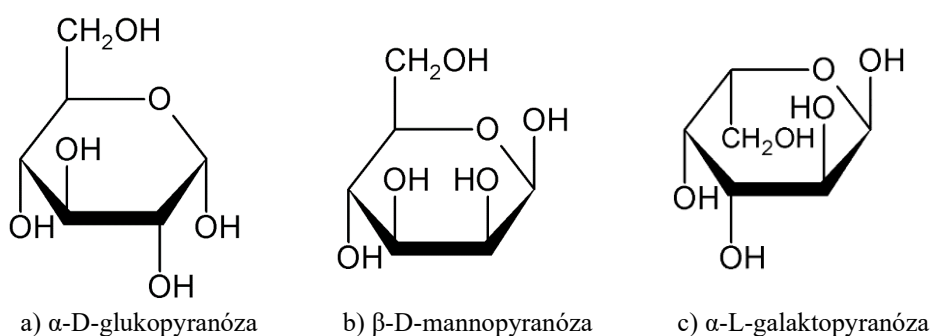
Obrázek 10: Polymery vykazující LCST [3, 13].



### 3 POLYSACHARIDY JAKO BIOPOLYMERY

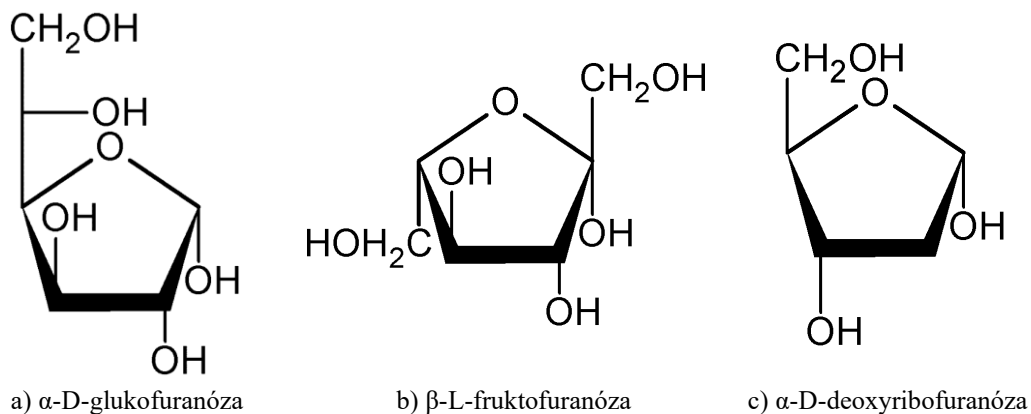
Polysacharidy patří mezi nejznámější a nejčetnější materiály na planetě Zemi, což umožňuje jejich relativně levné a masivní používání v různých odvětvích. Zároveň pochází velmi často z obnovitelných zdrojů a jejich získávání nemusí tolik zatěžovat ekologii planety v porovnání s jinými druhy materiálů. Převážně jsou také biokompatibilní, biodegradovatelné a díky těmto vlastnostem jsou ideální pro používání ve farmako-medicinálních a biologických aplikacích. Protože je v těchto aplikacích nutná především čistota daných materiálů a uniformita polymerních řetězců, často se využívají bakteriální zdroje polysacharidů, které výše zmíněné vlastnosti splňují [17–19].

Polysacharidy jsou biopolymery tvořené z monosacharidů jako základních stavebních jednotek (monomerů), které jsou spojeny pomocí glykosidických vazeb. Pokud je celý řetězec tvořen pouze jedním typem monosacharidu, jedná se o homopolysacharid (homoglukan). V případě obsahu více typů monosacharidů v polysacharidu hovoříme o heteropolysacharidu (heteroglukanu) [20]. Druhů monosacharidů je několik, nejznámější jsou pyranózy skládající se z 6 uhlíků a furanózy, které jsou tvořeny 5 uhlíky. Pyranózové jednotky v cyklické formě se nachází nejčastěji v židličkové a vaničkové konformaci v polysacharidových řetězcích a patří mezi ně např.  $\alpha$ -D-glukopyranóza,  $\beta$ -D-mannopyranóza či  $\alpha$ -L-galaktopyranóza (Obrázek 11a–c) [20].



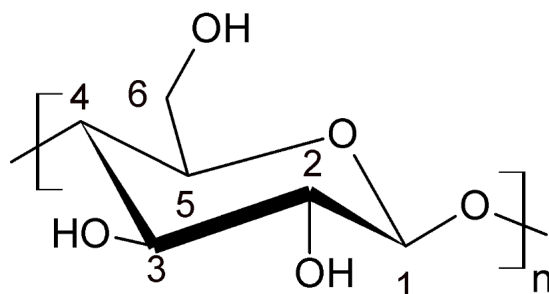
Obrázek 11: Haworthovy vzorce některých pyranózových monosacharidů [21].

Oproti tomu furanózové jednotky v cyklické formě nabývají obálkové a vaničkové konformace, přičemž mezi nejznámější zástupce furanózových jednotek lze uvést  $\alpha$ -D-glukofuranóza,  $\beta$ -L-fruktofuranóza,  $\alpha$ -D-deoxyribofuranóza (Obrázek 12a–c).



Obrázek 12: Haworthovy vzorce některých furanózových monosacharidů [21].

Monomerní jednotky v polysacharidech jsou spojeny prostřednictvím glykosidických vazeb, které mohou být různého typu. Nejčastější u polysacharidů je O-glykosidická vazba vznikající kondenzační reakcí dvou hydroxylových skupin příslušných monomerů polysacharidu. Nicméně tato vazba může vznikat i mezi monomerem polysacharidu a jinou chemickou sloučeninou obsahující hydroxylovou skupinu [18, 20]. N-glykosidická vazba vzniká kondenzací hydroxylové skupiny a aminové skupiny, dále existuje i S-glykosidická vazba vznikající reakcí hydroxylové a thiolové skupiny nebo C-glykosidická vazba, jež vzniká přímo mezi dvěma uhlíky dvou rozdílných molekul [22]. Mezi monomery polysacharidů je glykosidická vazba lokalizována na konkrétní polohu, typickým příkladem je homopolysacharid celulóza. Monomerní jednotkou celulózy je D-anhydroglukopyranóza, která vytváří vazbu s dalšími monomery na uhlících C1 a C4 (Obrázek 13), přičemž tento monomer vznikl z  $\beta$ -D-glukopyranózy, což znamená, že monomery v celulóze jsou vázány  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glykosidickou vazbou [20, 23].



Obrázek 13: Celulóza (D-anhydroglukopyranóza) [24].

Monomery celulózy vytváří lineární řetězce, které společně interagují pomocí intermolekulárních vodíkových můstků, a to vede ke vzniku organizovaných struktur v podobě krystalitů, resp. krystalických oblastí. Každý monomer celulózy obsahuje 3

hydroxylové skupiny vhodné pro případné modifikace, konkrétně se jedná o hydroxylové skupiny na uhlících C2, C3 a C6 [25].

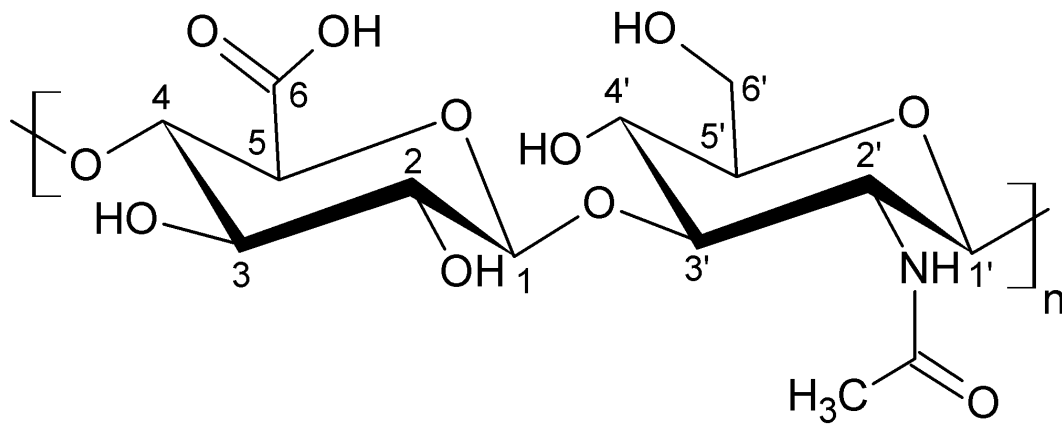
Pro rozšíření aplikací celulózy je její nativní struktura často modifikována chemicky či fyzikálně. Mezi nejčtenější chemické modifikace celulózy se řadí oxidace. Celulózu lze například oxidovat pomocí 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxylu, kdy dochází k oxidaci hydroxylových skupin až na karboxylové skupiny. Toto oxidační činidlo je také známé pod zkratkou TEMPO [23]. Dále lze hydroxylové skupiny na uhlících C2 a C3 v D-glukopyranózové jednotce celulózy selektivně oxidovat na karbonylové skupiny, a to za pomoci jodistanu sodného (periodát), přičemž dojde k rozštěpení vazby mezi uhlíky C2 a C3 (Kapitola 5). Selektivně oxidovanou celulózu lze poté využít jako síťovací činidlo například pro polyvinylalkohol (PVA), kdy karbonylové skupiny oxidované celulózy reagují s hydroxylovými skupinami PVA v kyselém prostředí. Vzniká zesíťovaná struktura charakteristická pro hydrogel, který lze následně nasytit různými bioaktivními látkami, jako je rutin, vitamín C či hydroxykyseliny. Takový hydrogel, jenž umožňuje uvolňování látek ze své struktury lze využít nejen v kosmetice, ale také ve zdravotnictví či farmacii [26]. Dalším velmi známým zástupcem polysacharidů je kyselina hyaluronová (Kapitola 3.1).

### 3.1 Kyselina hyaluronová

K. hyaluronová (HA) se řadí mezi heteropolysacharidy a její monomer se skládá z D-glukoronové kyseliny a N-acetylglukosaminu (Obrázek 14), přičemž D-glukoronová kyselina vytváří  $\beta(1\rightarrow4)$  glykosidickou vazbu a N-acetyl-D-glukosamin zase  $\beta(1\rightarrow3)$  glykosidickou vazbu [18, 19].

HA se vyskytuje hlavně v pojivových tkáních, kloubech v rámci synoviální tekutiny a v kůži. Zároveň se podílí na různých biologických procesech v organismu, např. diferenciaci buněk či hydrataci. V lidském těle je snadno odbouratelná, což z ní činí ideální substrát pro transport různých bioaktivních látek nebo růst buněk. I HA se hojně využívá v modifikovaném stavu, jelikož strukturní jednotka této látky obsahuje reaktivní funkční skupiny, které jsou ideální pro různé chemické reakce. Příkladem je modifikace karboxylové skupiny na D-glukoronové kyselině či primární hydroxylové skupiny na N-acetyl-D-glukosaminu. Potažmo lze odštěpit N-acetylovou skupinu z N-acetyl-D-glukosaminu, kdy je takto získána reaktivní amino skupina [27].

S karboxylovou skupinou HA může reagovat například peptid s terminální amino skupinou, přičemž dochází ke vzniku amidové vazby, což vede k vytvoření hydrogelů. Tyto hydrogely lze následně aplikovat v rámci hojení ran ve formě náplastí nebo chirurgických obvazů [28].



Obrázek 14: Monomerní jednotka k. hyaluronové složená z D-glukoronové kyseliny (vlevo) a N-acetylglukosaminu (vpravo) [29].

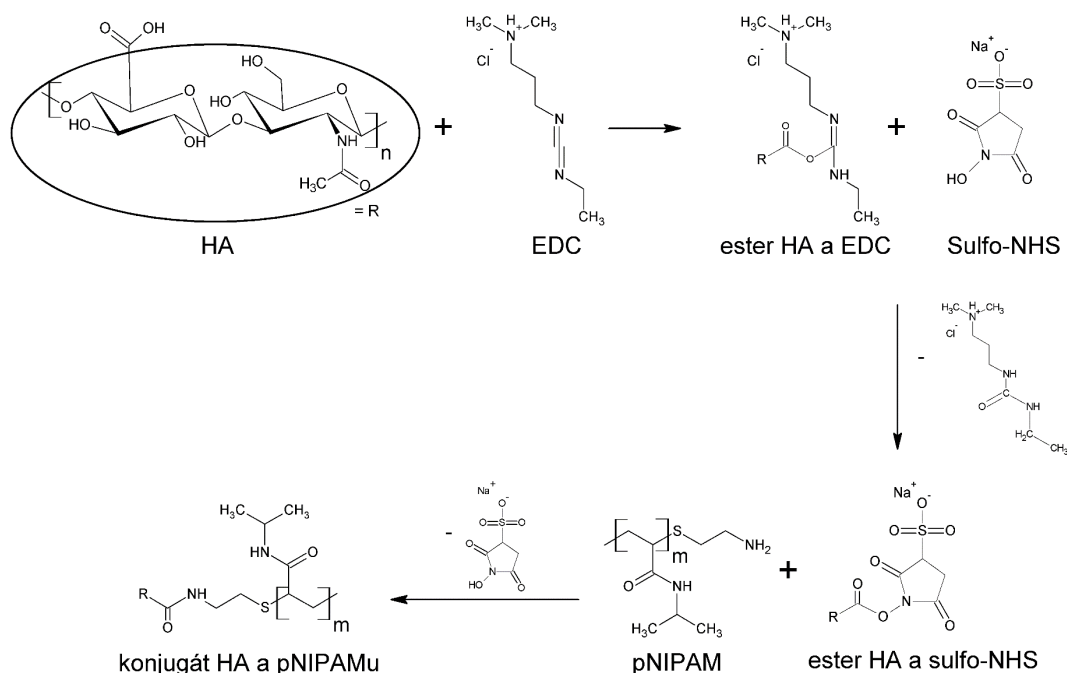
## 4 BIONKONJUGAČNÍ REAKCE HA A PNIPAMU

Biokonjugační reakce, nebo také biokonjugace, je chemická reakce mezi dvěma molekulami, přičemž jedna z nich bývá zpravidla biomolekula [30]. Biomolekula může být tvořena polysacharidem, proteinem nebo třeba nukleovou kyselinou. Tato reakce nachází široké uplatnění zejména u proteinů, jelikož obsahují mnoho reaktivních funkčních skupin, které mohou vytvořit vazbu například s chemickou značkou (z angl. marker), léčivem nebo se stimuli-responzivním materiálem. Biokonjugace je selektivní u daných funkčních skupin na biomolekule, avšak není selektivní pro celé molekuly, což nemusí být vždy žádoucí. Například pokud by u proteinu byly dva druhy aminokyselin obsahující aminovou skupinu, avšak bylo by nutné modifikovat tuto skupinu pouze u jednoho druhu aminokyseliny, došlo by s největší pravděpodobností k biokonjugaci na obou aminokyselinách. Obdobná situace může nastat i v případě karboxylových skupin, thiolových skupin, hydroxylových skupin a dalších [30].

Tato práce se zaměřuje na tvorbu termoresponzivních konjugátů kyseliny hyaluronové (HA) a poly(*N*-isopropylakrylamidu) (pNIPAMu) terminovaného aminovou skupinou, právě prostřednictvím biokonjugační reakce, kdy dojde k vytvoření vazby mezi HA (biomolekula) a termoresponzivním pNIPAMem. Vhodnou funkční skupinou na HA pro biokonjugaci je karboxylová skupina na uhlíku C6 v D-glukoronové jednotce [16, 31].

Pro selektivní biokonjugaci těchto dvou makromolekul je možné využít více chemických reakcí. Nejčastěji je využívána biokonjugační reakce (Obrázek 15) za pomoci hydrochloridu 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu (EDC) a 1-hydroxypyrrolidin-2,5-dionu (NHS), resp. jeho analogu 1-hydroxy-2,5-dioxypyrrolidin-3-sulfonátu sodného (sulfo-NHS), který je lépe rozpustný ve vodě [32]. Při této reakci dochází k elektrofilní substituci EDC na záporně nabitý kyslík karboxylové skupiny HA po protonaci jednoho z dusíků diimidové skupiny molekuly EDC, přičemž kyselý vodík pochází z karboxylové skupiny [32]. Vzniká tak ve vodě nestabilní ester HA a EDC. Z důvodu nízké stability vzniklého esteru HA a EDC následuje reakce s vodorozpustným sulfo-NHS. Ta probíhá nukleofilní substitucí sulfo-NHS prostřednictvím hydroxylové skupiny na karboxylový uhlík esteru HA a EDC za vzniku esteru HA a sulfo-NHS, přičemž dochází k odštěpení močovinového derivátu (zbytek z EDC). Následuje nukleofilní substituce látky

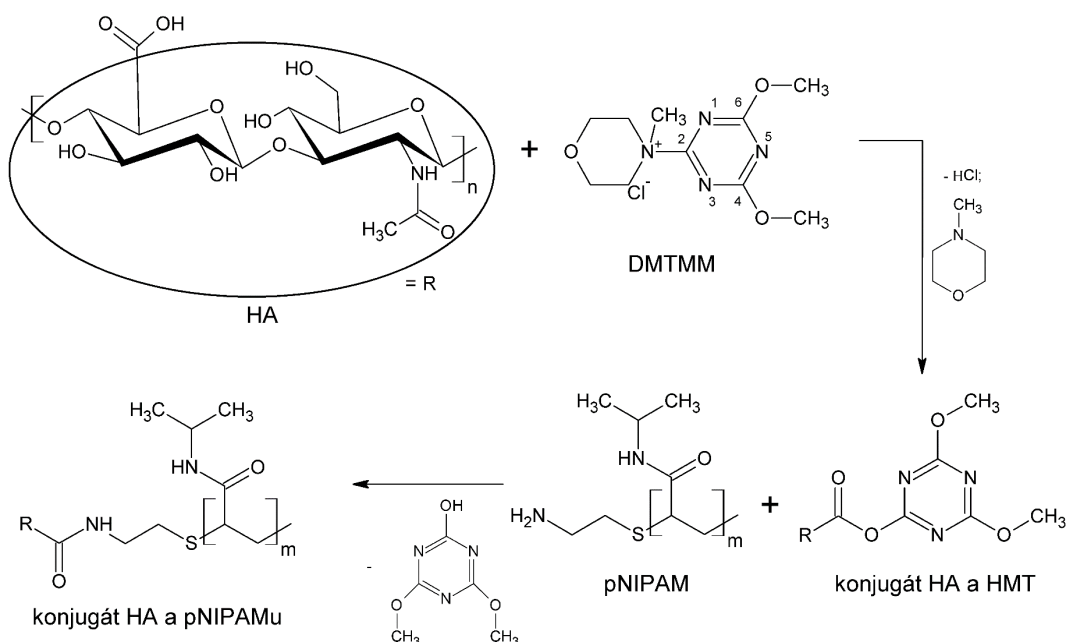
obsahující amin (pNIPAM) na uhlík esterové skupiny HA a sulfo-NHS pomocí volného elektronového páru dusíku primárního aminu, přičemž dochází k odštěpení aktivačního činidla sulfo-NHS a následnému vzniku konjugátu HA a pNIPAMu [32]. Nevýhodou této metody je nízká efektivita reakce ve vodném prostředí, kde často dochází k rozpadu HA a EDC esteru ještě před tím, než se může navázat NHS.



Obrázek 15: Chemismus biokonjugační reakce HA a pNIPAMu za využití aktivačních činidel EDC/sulfo-NHS [30, 32].

Další možná biokonjugační reakce HA s pNIPAMem (dále pro jednoduchost označována jako „pNIPAMace“) je za využití aktivačního činidla chloridu 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinia (DMTMM). Reakce s využitím DMTMM je v porovnání s biokonjugací pomocí EDC/NHS výrazně efektivnější ve vodném prostředí, díky čemuž je možné použít nižšího množství aktivačního činidla za srovnatelného či vyššího výtěžku finálního konjugátu [31]. Mechanismus této reakce ve vodném prostředí (Obrázek 16) spočívá v elektrofilní substituci molekuly DMTMM na karboxylovou skupinu HA za vzniku esteru HA a 2-hydroxy-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazinu (HMT), přičemž odpadním produktem je kyselina chlorovodíková s *N*-methylmorpholinem. Záporně nabitý kyslík v karboxylové skupině ochotně reaguje s elektronově-deficitním atomem uhlíku C2 v DMTMM, jenž je díky sousedícím dusíkům v molekule silně ovlivněn záporným indukčním efektem a je na něm přítomen kladný parciální náboj. Dojde k vytvoření kovalentní vazby mezi karboxylovým kyslíkem HA a uhlíkem C2 DMTMM za

současného odstoupení molekuly *N*-methylmorpholinu. Nově vzniklý ester HA a 4,6-dimethoxy-1,3,5-triazinu podstupuje v přítomnosti látky obsahující amin nukleofilní substituci na karboxylový uhlík esterové skupiny prostřednictvím volného elektronového páru v aminové funkční skupině. Volný elektronový pár z terminální aminové skupiny pNIPAMu tak může atakovat kladně nabitý uhlík esterové skupiny za vzniku amidové vazby. Za současného odstoupení HMT vzniká finální konjugát HA a pNIPAMu [31]. Množství navázaného pNIPAMu na uhlíku C6 HA určuje stupeň substituce (DS) či tzv. graftingové číslo (G, grafting) [31]. Toto číslo vyjadřuje molární poměr monomeru pNIPAMu vůči monomeru HA a lze zjistit např. při porovnání integrálních intenzit signálů funkčních skupin pNIPAMu a HA z  $^1\text{H-NMR}$  spekter [31].



Obrázek 16: Chemismus biokonjugační reakce HA a pNIPAMu za využití aktivačního činidla DMTMM (pNIPAMace) [31].

## 5 SELEKTIVNÍ OXIDACE POLYSACHARIDŮ

Oxidace polysacharidů je v současnosti žádaná především kvůli modifikaci jejich finálních vlastností jako jsou např. ovlivnění rozpustnosti ve vodném prostředí [33], vyšší množství reaktivních míst pro navázání druhotných látek [18, 26] či zvýšení flexibility a zkracování řetězců u některých typů polysacharidů, což ovlivňuje jejich viskoelastické vlastnosti. Obecně lze rozdělit oxidaci na neselektivní a selektivní. Neselektivní oxidace je charakteristická reakcí s různými funkčními skupinami na jakémkoliv místě polysacharidového řetězce za předpokladu dostupnosti tohoto místa oxidačnímu činidlu, přičemž se většinou jedná především o hydroxylové a karbonylové funkční skupiny v polysacharidu. Typickými oxidačními činidly pro neselektivní oxidaci polysacharidů mohou být: chlornan ( $\text{ClO}^-$ ), peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) nebo ultrafialové (UV) záření. Například u celulózy tato neselektivní oxidační činidla oxidují různé hydroxylové skupiny v monomeru na ketonové, aldehydické či karboxylové skupiny [25, 34]. Selektivní oxidace naopak cílí na specifické místo v polysacharidu s využitím struktury monomeru nebo reaktivity daných funkčních skupin. Opět se i v tomto případě oxidace zaměřuje na hydroxylové a karbonylové funkční skupiny pro dosažení žádaných konečných vlastností produktu [25].

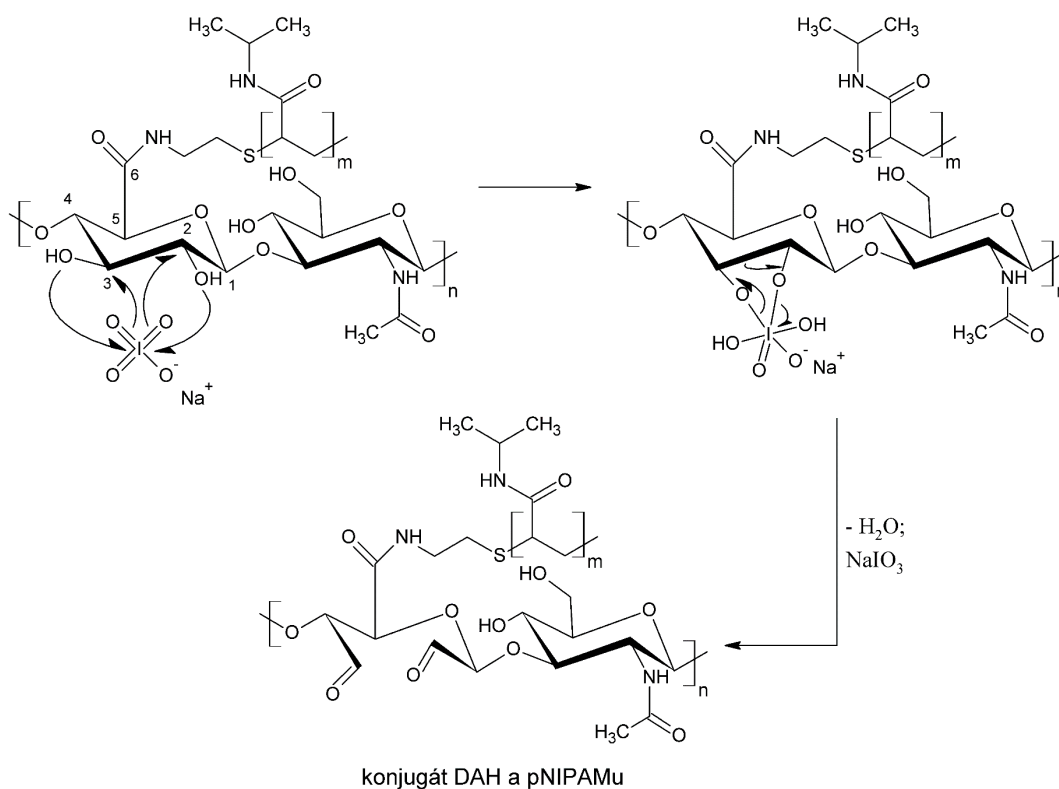
Příkladem selektivní oxidace je dvoufázová regioselektivní oxidace pomocí jodistanu sodného (periodát,  $\text{NaIO}_4$ ) a chloritanu sodného ( $\text{NaClO}_2$ ) u polysacharidů obsahujících vhodně orientované vicinální hydroxylové skupiny v rámci monomeru. V rámci práce se konkrétně bude jednat o konjugát HA a pNIPAMu z Kapitoly 4.

### 5.1 Selektivní oxidace polysacharidů – Primární fáze

V primární fázi (primární oxidace, POX) dochází k oxidaci vicinálních hydroxylových funkčních skupin na karbonylové funkční skupiny pomocí periodátu ve vodném prostředí za absence světla [18, 24, 35]. Jestliže monomery polysacharidu obsahují pouze jeden pár vicinálních hydroxylových skupin, hovoříme o vysoce regioselektivní oxidaci, avšak obsahují-li monomerní jednotky více sousedních vicinálních hydroxylových skupin, může dojít ke vzniku různých derivátů takových monomerů. Oxidace je také možná pouze u polysacharidů, jejichž vicinální hydroxylové skupiny se nacházejí v ekvatoriální – ekvatoriální nebo v axiální – ekvatoriální konformaci. Pokud jsou obě tyto funkční skupiny v axiálních



pozicích, POX nebude probíhat, jelikož periodát se nemůže efektivně navázat na takto uspořádané vicinální hydroxylové skupiny [36]. Mechanismus POX (Obrázek 17) začíná obecně atakem molekuly  $\text{NaIO}_4$  na uhlíky obsahující vicinální hydroxylové skupiny. Díky vhodné orientaci hydroxylových skupin mohou kyslíky z periodátu atakovat kladné parciální náboje na těchto uhlících za vzniku kovalentní vazby, přičemž atom jódu ochotně vytváří další kovalentní vazby s těmito hydroxylovými skupinami a dochází k jejich odštěpení z monomeru polysacharidu. Vzniklý intermediát je nestabilní a následně dojde k rozštěpení kovalentní vazby mezi uhlíky C2 a C3 ve prospěch vzniku aldehydické skupiny na jednom z nich a k současnému přerušení kovalentní vazby mezi vzniklým aldehydickým kyslíkem a atomem jódu. Zároveň dojde k přerušení kovalentní vazby mezi druhým kyslíkem a atomem jódu za vzniku druhé aldehydické skupiny na druhém uhlíku. Jako odpadní produkt vzniká molekula dihydrogenjodičnanu sodného ( $\text{NaH}_2\text{IO}_4$ ), jenž je nestabilní a rozpadá se na jodičnan sodný ( $\text{NaIO}_3$ ) a vodu [18, 25, 36]. Na Obrázku 17 je konkrétní případ oxidace konjugátu HA a pNIPAMu, kdy vzniká termoresponzivní primárně-oxidovaný konjugát 2,3-dialdehydhyaluronové kyseliny a pNIPAMu (konjugát DAH a pNIPAMu).



Obrázek 17: Primární oxidace konjugátu HA a pNIPAMu oxidačním činidlem jodistanem sodným ve vodném prostředí [25].

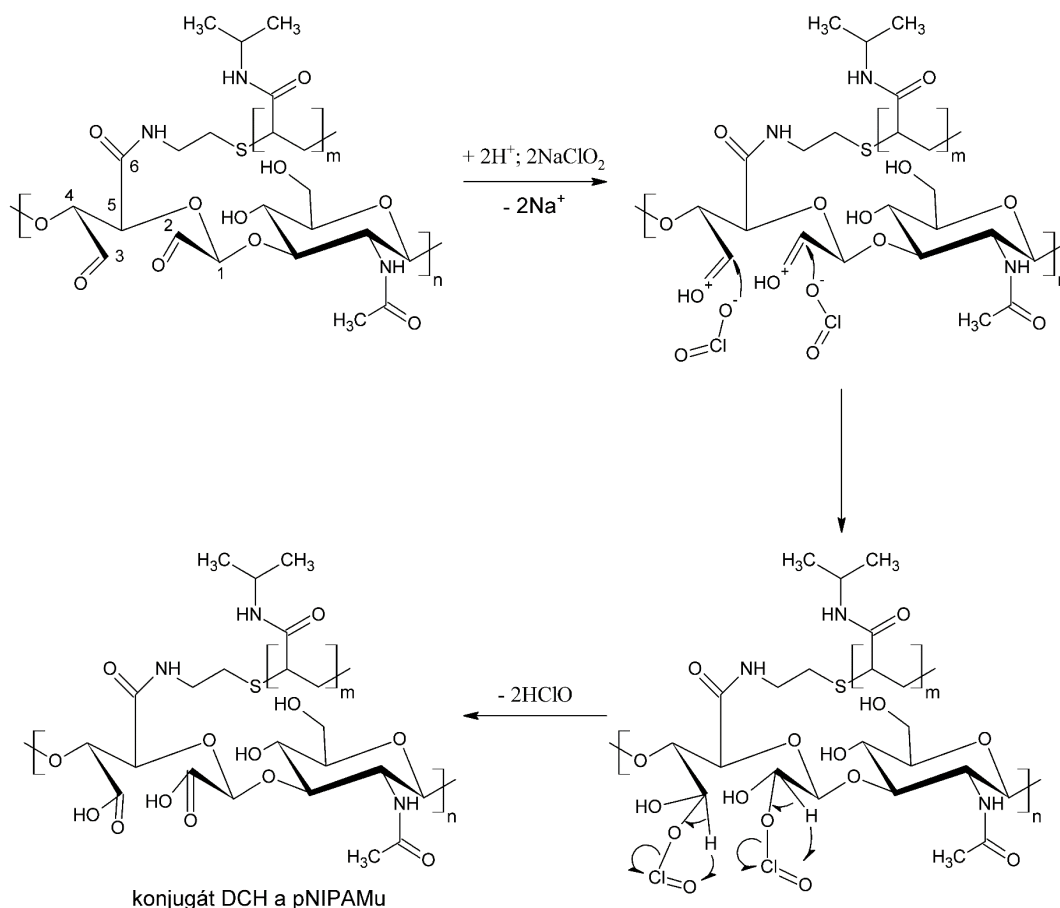
Stupeň oxidace (DO) lze řídit pomocí změny délky reakční doby POX a koncentrace oxidačního činidla (periodátu) [18]. Nicméně u HA dochází při delší POX k degradaci řetězců a snížení molární hmotnosti produktu 2,3-dialdehydhyaluronové kyseliny (DAH), zatímco zvýšení koncentrace periodátu má v porovnání s vlivem reakčního času menší vliv. Nižší koncentrace  $\text{NaIO}_4$  ale vede k nižšímu DO oproti vyšší koncentraci periodátu během stejné reakční doby. Také je samozřejmostí, že s delším reakčním časem roste DO [18].

## 5.2 Selektivní oxidace polysacharidů – Sekundární fáze

V sekundární fázi (sekundární oxidace, SOX) dochází k selektivní oxidaci aldehydických funkčních skupin vzniklých z POX na karboxylové funkční skupiny pomocí oxidačního činidla chloritanu sodného v kyselém vodném prostředí za absence světla [18, 35]. Při sekundární oxidaci konjugátu DAH a pNIPAMu (Obrázek 18) je vhodné tuto reakci provádět v pufrovaném prostředí, protože podobně jako u HA [18] by v nepufrovaném prostředí mohlo dojít ke značné degradaci molární hmotnosti. Během SOX nejdříve dochází k protonaci aldehydického kyslíku v monomeru polysacharidu, na němž se vytvoří kladný náboj. Přesunem elektronové hustoty z aldehydického uhlíku, díky vysoké elektronegativitě kyslíku, se vzniklý kladný náboj částečně kompenzuje, přičemž na zmíněném uhlíku vzniká v důsledku snížení elektronové hustoty také silný parciální kladný náboj a tento uhlík je atakován záporně nabitým kyslíkem molekuly chloritanu (nukleofilní adice). Nekyselý aldehydický vodík je odštěpen z uhlíku aldehydické skupiny a vytváří vazbu s kyslíkem v molekule k. chlorné, která se odštěpí jako chlornan za současného vzniku karboxylové skupiny na původním aldehydickém uhlíku [24, 35]. Produktem SOX je v tomto případě termoresponzivní oxidovaný konjugát 2,3-dikarboxyhyaluronové kyseliny a pNIPAMu (konjugát DCH a pNIPAMu).

Během SOX by mohly být ovlivňovány určité vlastnosti vzniklých produktů polysacharidů. Například u 2,3-dikarboxyhyaluronové kyseliny (DCH) [18], která byla poprvé připravena teprve nedávno, se jedná primárně o změnu molární hmotnosti či stupně konverze aldehydických skupin na karboxylové skupiny. Tyto vlastnosti ovlivňuje zejména reakční doba a koncentrace oxidačního činidla. Pokud je reakční doba SOX delší, dochází k nárůstu DO, resp. k vyšší konverzi aldehydických skupin na karboxylové, což vede i k nárůstu molární hmotnosti, jelikož v monomerech

přibývají atomy kyslíku a sodíku ve funkčních skupinách. Při zvyšování molární koncentrace chloritanu dochází naopak k poklesu molární hmotnosti, protože u HA převládají degradační procesy, přičemž vliv rostoucí koncentrace oxidačního činidla na DO není znatelný [18, 29].



Obrázek 18: Sekundární oxidace konjugátu DAH a pNIPAMu pomocí oxidačního činidla chloritanu sodného v pufovaném prostředí [24].

Zásadní výhodou tohoto postupu přípravy je vysoká selektivita vycházející z vhodné posloupnosti chemických reakcí. Pokud by byla nejdříve provedena selektivní oxidace HA a následně biokonjugace pNIPAMu na DCH, nedošlo by k selektivní reakci pNIPAMu jen na C6, ale i s nově vytvořenými karboxylovými skupinami na C2 a C3 DCH. To by znamenalo, že některé monomery by mohly primárně obsahovat pNIPAM na karboxylových skupinách na uhlících C2 nebo C3, avšak na karboxylátu uhlíku C6 by z důvodu sterického bránění nemuselo dojít k vytvoření vazby s pNIPAMem [18, 29]. Dále by karboxylové skupiny byly blokovány pro další aplikace.

Další výhodou je, že na rozdíl od HA, jejíž karboxylové skupiny jsou z velké části využity pro vazbu pNIPAM, vzniklý DCH-pNIPAM obsahuje velké množství

volných karboxylových skupin vhodných pro navázání různých bioaktivních látek nebo léčiv a lze je tak využít jako nosič. Jedna z možných látek vhodných pro navázání na takto připravený produkt selektivní oxidace je protirakovinové léčivo [29] dusičnan *cis*-diammin-dichloro-phenanthridinplatnatý. Je tak možné připravit termoresponzivní systém s potenciálně vysokou efektivitou vázání léčiv a značnou přenosovou kapacitou, což je cílem této práce. Dle dostupných zdrojů se také jedná o možná první syntézu spojující výhody DCH a termoresponzivních polymerů.

## 6 TERMORESPONZIVNÍ NOSIČE PLATINOVÝCH PROTIRAKOVINOVÝCH LÉČIV

Léčba rakoviny a nádorových onemocnění byla, je a pravděpodobně i bude obrovská výzva pro lidskou společnost, jelikož tato onemocnění bývají náročná na úplné vyléčení a pacient mnohdy fyzicky i psychicky samotnou léčbu těžce snáší. Už jen samotný fakt, že určitá protirakovinová léčiva bývají vysoce toxická nejen pro rakovinové buňky, ale i pro zdravé buňky, tuto situaci nijak nezlehčuje. Pro různé typy rakovinových onemocnění se používají jiné léčebné terapie nebo dochází k jejich kombinacím, např. v podobě chemoterapie, ozařování nádorů či chirurgická excize. Základem léčby je často právě chemoterapie, protože chemické látky se mohou dostat přes krevní řečiště až k samotným rakovinovým buňkám bez významného fyzického zásahu do těla pacienta [37].

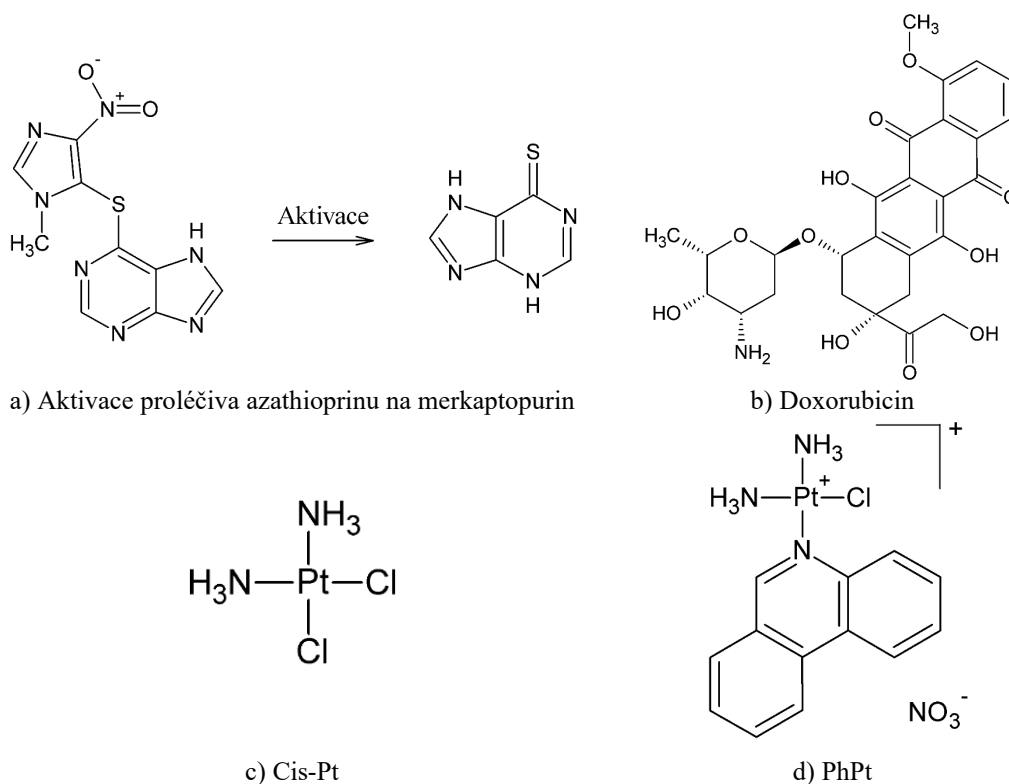
Ideální chemoterapie by pravděpodobně spočívala v neinvazivním orálním podání léčiv či použití prostředků uvolňujících protirakovinové látky přes kůži, přičemž by se léčivo dostalo řízeně jen do rakovinových buněk a došlo by k jejich apoptóze (buněčné smrti). V současnosti je ale většina léčiv podávána nitrožilně a po jejich podání zpravidla dochází k průniku do veškerých buněk, včetně těch zdravých, protože léčiva si v nativní formě neumí vybírat mezi zdravými nebo rakovinovými buňkami a tak jsou podřízeny biochemickým procesům těla pacienta. Existují však i tzv. proléčiva (z angl. prodrugs), která jsou pro buňky netoxická, avšak po aktivaci určitým enzymem v nádoru se toxickými pro buňky stanou [38].

Je tedy žádoucí dostat léčiva či proléčiva vhodnou cestou až k rakovinovým buňkám, kdy by během transportního procesu nedocházelo k nechtěnému rozpadu protirakovinové látky či její koncentrování v jiných buňkách než rakovinových. Zde by ideálně mělo dojít k pozvolnému a žádanému působení na tyto buňky, což by postupně vedlo k jejich zániku a uzdravení pacienta. Pro transport léčiva k rakovinovým buňkám a jeho řízené uvolňování se dnes čím dál častěji využívají nanostrukturované systémy, které mohou vykazovat vyšší efektivitu proti těmto onemocněním. V případě sférických částic se nejčastěji bere v úvahu hydrodynamický průměr jako vhodný parametr velikosti částicových nosičů protirakovinových léčiv v nanoměřítku. Názory na efektivní či ideální hydrodynamický průměr takových částic se různí, avšak možným a poměrně uznávaným je interval <10–100> nm [39].

Pokud je velikost částicových nosičů protirakovinových léčiv v tomto intervalu, dochází k velmi efektivnímu průniku takových částic do rakovinových buněk, přičemž u částic s vyšším hydrodynamickým průměrem tato efektivita klesá. Zároveň tuto efektivitu ovlivňuje i zeta-potenciál  $\zeta$  částic, kdy kladný  $\zeta$  má vyšší efektivitu než záporný [39]. Typickými příklady pro nanonosiče protirakovinových léčiv mohou být: dendrimery, lipozómy nebo různé druhy micel [40], přičemž samotné nosiče často abstraktně připomínají koncept Trojského koně.

V současnosti také roste zájem o modifikované polysacharidy [18, 29, 41], jejichž výhoda spočívá zejména v biokompatibilitě s biologickým prostředím organismu, biodegradabilitě jejich struktury na relativně netoxické produkty po uvolnění léčiva a jejich původu z udržitelných zdrojů. Jejich modifikací lze také optimalizovat vlastnosti nosiče, jakou jsou rychlost uvolňování léčiva, maximální možné množství navázaného léčiva nebo toxicita nosiče. Tyto vlastnosti lze ovlivnit např. změnou molární hmotnosti polysacharidu nebo množstvím reaktivních funkčních skupin schopných tvořit vazbu s léčivem. Jeden z vhodných polysacharidů pro přenos protirakovinových léčiv je HA [18, 41]. HA a její deriváty nevykazují zvýšenou toxicitu, jsou biodegradovatelné a biokompatibilní v lidském těle. Zároveň se tento polysacharid velmi ochotně váže na některé receptory nadměrně exprimované u rakovinových buněk, jako jsou CD44, RHAMM, nebo LYVE-1, čímž napomáhá k lepšímu cílení na tyto buňky [37].

Existuje řada druhů protirakovinových léčiv, např. imunosupresivní antimetabolity, mezi něž lze zařadit proléčivo azathioprin (Obrázek 19a), jehož aktivací vznikne léčivo merkaptopurin proti akutní lymfoblastické leukémii [38]. Dalším typem protirakovinových léčiv jsou antracykliny, kde lze zařadit velmi známé léčivo doxorubicin (Obrázek 19b) určené nejen proti leukémii a rakovině prsu [38]. V neposlední řadě zde patří protirakovinová léčiva na bázi komplexů platiny, jsou jimi například diammin-dichloroplatnatý komplex (cis-Pt) nebo dusičnan *cis*-diammin-dichloro-phenanthridinplatnatý (PhPt) (Obrázek 19c, d), jež se využívají proti rakovině vaječníků, krku, prostaty, varlat a proti mnoha dalším [38].



Obrázek 19: Přehled protirakovinových léčiv [38].

Úkolem protirakovinových léčiv je vyvolání buněčné smrti prostřednictvím negativního ovlivnění stěžejních životních funkcí nádorové buňky. Nejčastěji dochází k ataku léčiva na makromolekulu DNA v jádře buňky, což vede k znemožnění replikace DNA či transkripce na mRNA a buněčné smrti [42]. Další možností je zvýšení oxidačního stresu v rakovinové buňce díky produkci zvýšeného množství reaktivní formy kyslíku z mitochondrií [43]. Oba výše zmíněné mechanismy relativně dobře zvládají platinová léčiva, konkrétně cis-Pt a PhPt. U cis-Pt je prokázán vliv na vytvoření vyššího množství reaktivní formy kyslíku v rakovinové buňce, kdy dochází k vytváření aduktu cis-PT na mitochondriální DNA. Dochází k okyselení mitochondrie a cytosolu v buňce, což vede k potlačení metabolismu rakovinových buněk v podobě glykolýzy a podpoře oxidativní fosforylace v mitochondriích. Vzniká tak vyšší množství reaktivní formy kyslíku, jež poškozuje struktury rakovinové buňky. Změna metabolismu rakovinových buněk, kdy dochází k potlačení oxidativní fosforylace prostřednictvím glykolýzy, je u rakovinových buněk známý jev zvaný Warburgův efekt [43]. Obě tato léčiva vytváří ochotně kovalentní vazbu s nukleofilními funkčními skupinami v bázích molekuly DNA, např. s aminovými skupinami v guaninu. Po vytvoření vazby léčiva na DNA vznikají tzv. adukty, které znemožní replikaci DNA či její transkripci na makromolekulu mRNA,

přičemž PhPt je daleko efektivnější v porovnání s cis-Pt z hlediska úspěšného vyvolání buněčné smrti, odolnosti vůči opravným systémům DNA a rezistivity vůči chemickým látkám neutralizujícím platinové léčivo, tzv. scavengers [42–44].

## 6.1 Příprava termoresponzivního polysacharidového nosiče s léčivem na bázi platiny

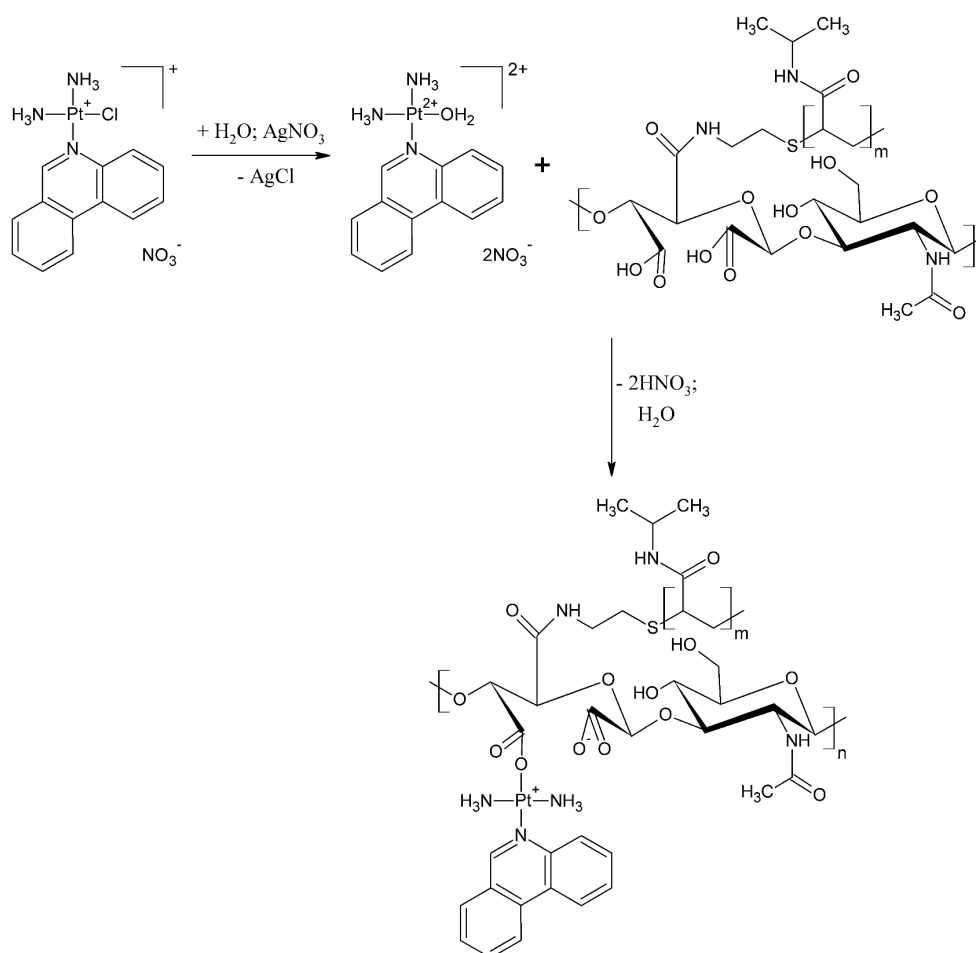
Termoresponzivní polysacharidový nosič s protirakovinovým platinovým léčivem s teplotou přechodu vykazující LCST může být vhodný kandidát pro transport takového léčiva k rakovinovým buňkám. V této práci byla zvolena HA jako polysacharidový nosič, protože vykazuje nízkou toxicitu, je biodegradovatelná a biokompatibilní v lidském těle [18]. Po modifikaci tohoto polysacharidu pomocí termoresponzivního pNIPAMu, dojde ke změně celkové konformace nově vzniklého termoresponzivního nosiče při teplotě nad LCST [31]. Obecně platí, že teplota v okolí rakovinových buněk je mírně zvýšená oproti tělesné teplotě, a proto je vhodné použít systém vykazující LCST, jejíž hodnota je nižší než 37 °C. Proto byl zvolen termoresponzivní pNIPAM, jelikož jeho LCST se pohybuje okolo 32 °C [3, 16], a zároveň nevykazuje zvýšenou toxicitu vůči buňkám [3]. Nad touto teplotou pNIPAM vykazuje hydrofobní charakter a vypuzuje ze své struktury molekuly rozpouštědla (Kapitola 2.2), což je v tělesném prostředí voda, za změny konformace.

Příprava konjugátů DCH a pNIPAMu s platinovým léčivem v podobě PhPt (loading) začíná nejdříve „aktivací“ tohoto léčiva (Obrázek 20), tj. eliminací odstupujících ligandů pro zvýšení efektivity vázání samotného léčiva na karboxylové skupiny. Dusičnan stříbrný ( $\text{AgNO}_3$ ) atakuje chloridové ionty na platinovém komplexu ve vodném prostředí za vzniku sraženiny chloridu stříbrného ( $\text{AgCl}$ ), která se odstraní filtrací a vzniklý platinový komplex vytváří koordinačně kovalentní vazby s adekvátním množstvím aqua ligandů. Takto aktivované platinové léčivo ochotně reaguje s karboxylovými skupinami konjugátu DCH a pNIPAMu. PhPt bude vytvářet monovalentní vazbu s tímto konjugátem s největší pravděpodobností na uhlíku C2 nebo C3, které jsou stericky nejlépe dostupné, přičemž kladný náboj PhPt bude dále stabilizovat záporný náboj na karboxylové skupině sousedícího uhlíku. S karboxylovou skupinou uhlíku C6 nebude PhPt ochotně vytvářet monovalentní vazbu, protože je zde už z části navázán pNIPAM, ale také kvůli sterickému bránění



mezi velkým phenanthridinovým ligandem a bočními řetězci sousedních, neoxidovaných N-acetylglukosaminových jednotek [18, 29].

Odpadními produkty reakce aktivovaného PhPt s konjugátem DCH a pNIPAMu je odpovídající množství molekul vody a k. dusičné či dusičnanů v adekvátním množství.



Obrázek 20: Loading PhPt na konjugát DCH a pNIPAMu vykazující LCST včetně aktivační reakce PhPt.

U takto připravených termoresponzivních oxidovaných konjugátů s navázaným platinovým léčivem lze uvažovat spontánní uspořádání polymerů do nanočástic či mikročástic obsahujících hydrofobní léčivo v jádře, za předpokladu jeho vyšší hydrofobicity než má pNIPAM. Tyto částice se dají považovat za hydrogelové nanočástice, tedy nanogely, síťované pomocí slabých hydrofobních interakcí. Pokud totiž bude pNIPAM na základním řetězci DCH také na povrchu těchto částic, dojde při teplotě vyšší než LCST ke změně jeho konformace vedoucí ke smrštění celkového konjugátu díky hydrofobnímu charakteru tohoto termoresponzivního polymeru nad LCST [3, 13]. Během transportu k rakovinovým buňkám by tak léčivo

mělo být chráněno a mohlo by dojít k jeho pozvolnému uvolnění až uvnitř těchto buněk či v jejich bezprostřední blízkosti, kde budou zadrženy v důsledku interakce s receptory. Nicméně může nastat i situace, kdy hydrofilní léčivo bude na povrchu takového nosiče a pNIPAM se může koncentrovat uvnitř supramolekulární struktury díky vyšší hydrofobicitě, než má samotné léčivo.

## 7 POUŽITÉ METODY

Charakterizace chemické struktury produktů DCH-pNIPAM byla provedena pomocí infračervené spektrometrie s Fourierovou transformací (FT-IR) a nukleární magnetické rezonance (NMR). FT-IR byla využita pro ověření obsahu očekávaných funkčních skupin v monomerech produktů a zda-li skutečně dochází ke vzniku konjugátu DCH-pNIPAM. Pomocí NMR bylo možné stanovit graftingové číslo (G), stupeň substituce (DS) pNIPAMu na DCH a stupeň oxidace (DO), přičemž z této metody bylo také možné ověřit strukturu vzniklých produktů. Pro určení distribuce molárních hmotností vzniklých produktů z pNIPAMace a selektivní oxidace byla využita metoda gelové permeační chromatografie (GPC). Pro stanovení distribuce velikostí částic vzniklých produktů v oxidované formě bez navázaného platinového léčiva, a také u odpovídajících produktů s navázaným léčivem, byly použity techniky dynamického rozptylu světla (DLS) společně s elektroforetickým rozptylem světla (ELS) na zjištění stability částic, jež je v rozpouštědle definována pomocí zeta-potenciálu  $\zeta$ . Důkaz termoresponzivity vzniklých konjugátů DCH-pNIPAM lze provést vizuálně, kdy po zahřátí směsi těchto konjugátů ve vodném rozpouštědle dochází ke změně transparentnosti této směsi, avšak pro podrobnější analýzu LCST byl využit rotační reometr s geometrií válec-válec, přičemž sledovanými parametry při změně teploty byla viskozita rozpuštěných konjugátů DCH-pNIPAM. Vybrané vzniklé produkty byly vizuálně analyzovány pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM). Nakonec byla stanovena efektivita loadingu platinového léčiva na vybrané termoresponzivní oxidované konjugáty a bylo zkoumáno uvolňování léčiva z těchto konjugátů pomocí metody rentgenově-fluorescenční spektrometrie (XRF).

### 7.1 Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie je separační a analytická nedestruktivní metoda, která většinou slouží pro stanovení středních molárních hmotností látek, především polymerů. Principem této metody je separace makromolekulárních frakcí polymeru v koloně, jež se skládá ze stacionární fáze (gel s póry) a mobilní fáze (rozpouštědlo), a to na základě rozdílné velikosti polymerního klubka, která je charakterizována pomocí gyračního poloměru  $s^2$ . Na začátku kolony je polymerní směs s rozpouštědlem vpravena do kolony a za konstantního průtoku dochází

k pohybu polymerních klubek. Velké makromolekuly mají velký  $s^2$ , do pórů stacionární fáze se nezachytávají a díky průtoku rozpouštědla jsou snadno unášeny dále. Malé makromolekuly s malým  $s^2$  se snadno zachytí v pórech stacionární fáze, kde i přes průtok rozpouštědla zůstávají déle než makromolekuly s velkým  $s^2$ . Eluce velkých makromolekul s vyšším  $s^2$ , a tedy i s vyšší molární hmotností, bude rychlejší než u malých makromolekul. Prošlé frakce makromolekul zaznamenává často spektrofotometrický nebo fluorescenční detektor na konci kolony, přičemž pomocí signálu z detektoru dochází k vytvoření chromatogramu, což je u kapalinové GPC závislost intenzity signálu na retenčním čase. Díky vhodné kalibrační křivce vytvořené pomocí vhodných standardů lze stanovit požadované veličiny pro daný polymer, např. střední molární hmotnosti ( $\bar{M}_n$ ,  $\bar{M}_w$ ) hmotnostní distribuce [45, 46].

## 7.2 Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací

Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FT-IR) je analytická nedestruktivní metoda pro zjišťování struktury pevných, kapalných i plyných látek. Hlavním principem této metody je interakce infračerveného (IR) záření s molekulami analytu, přičemž dochází k vibračním přechodům chemických vazeb, případně lze sledovat i vliv některých slabých nevazebných interakcí (např. vodíkové můstky). Signál v IR spektru poskytují zejména molekuly skládající se z různých atomů a obsahující polární vazby charakteristické dipólovým momentem, např. CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, polymery. Molekuly, jež nevykazují dipólový moment, což jsou často látky v molekulovém či krystalickém stavu, nelze pomocí FT-IR charakterizovat, např. O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, grafit, diamant. Nejčastěji využívané interakce této metody bývají absorpce a transmise IR, kdy nedochází k měření na celé šířce IR spektra, ale v daných oblastech. V blízké infračervené oblasti (NIR) je možné sledovat vyšší harmonické vibrační přechody chemických vazeb. Ve střední infračervené oblasti (MIR) lze pozorovat valenční nebo deformační vibrace vazeb a vzdálená infračervená oblast (FIR) je charakteristická sledováním mřížkových frekvencí či vibrací vazeb těžkých atomů a slabých vazeb. Detektor zaznamenává IR záření po interakci s analytem a vzniká tzv. interferogram, který se převádí pomocí Fourierovy transformace na IR spektrum, což je nejčastěji závislost absorbance  $A$  nebo transmitance na vlnočtu  $\tilde{\nu}$ . V IR spektru polymerních látek jsou především studovány valenční a deformační vibrace chemických vazeb daných funkčních skupin při určitém vlnočtu [47, 48].

### 7.3 Nukleární magnetická rezonance

Jedná se o fyzikálně-chemickou nedestruktivní analytickou metodu pevných a kapalných látek, jejíž princip spočívá v interakci atomových jader s vnějším magnetickým polem, přičemž jádra atomů mají nenulový magnetický moment. Magnetický moment jádra atomu  $\vec{\mu}$  je důsledek spinu a náboje atomového jádra, kde jaderný spin definuje spinové kvantové číslo  $l$ . Pokud je tedy  $l = 0$ , pak i  $\vec{\mu} = 0$  a takový atom je tzv. NMR neaktivní. Když  $l > 0$ , potom  $\vec{\mu} \neq 0$  a atom je NMR aktivní, přičemž „ideální“ jádra pro NMR měření nabývají hodnot  $l = \frac{1}{2}$  jako jsou např. jedny z nejčastěji zkoumaných nuklidů  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  v chemii. Po vložení zkoumaných atomů do magnetického pole dojde k orientaci jaderných spinů dle vektoru magnetické indukce  $\vec{B}$ , avšak jaderné spiny jsou kvantovány, a tedy dochází pouze k vybraným orientacím dle Vztahu 1.0. Konkrétně u  $l = \frac{1}{2}$  dochází ke dvěma možným orientacím, tedy k severnímu magnetickému pólu a jižnímu magnetickému pólu.

$$M = 2 \cdot l + 1 \quad (1.0)$$

$M$  ... Počet orientací spinů atomových jader ve vnějším magnetickém poli / 1

$l$  ... Spinové kvantové číslo / 1

V magnetickém poli jaderné spiny dosáhnou rovnovážného stavu a pokud jádra ozáříme radiofrekvenčním pulzem (RFP) o vhodné rezonanční frekvenci, dojde ke změně orientace vektoru jaderného spinu, tedy pokud byly orientovány vektory těchto spinů pro  $l = \frac{1}{2}$  ve směru osy  $z$ , pak po působení RFP dojde ke stočení vektorů spinu do roviny  $xy$ . Po absenci RFP dojde k relaxaci orientace spinů do rovnovážného stavu (do osy  $z$ ), což je snímáno pomocí cívky v podobě časové závislosti indukovaného proudového signálu (z angl. Free induction decay). FID spektrum lze poté pomocí Fourierovy transformace převést na NMR spektrum [47].

### 7.4 Fotonová korelační spektrometrie

Fotonová korelační spektrometrie (PCS) je fyzikální nedestruktivní metoda založena na principu techniky dynamického rozptylu světla (DLS). Využívá se zejména pro stanovení distribuce velikostí částic, molární hmotnosti a u daných přístrojů lze stanovit i zeta-potenciál  $\zeta$  částic, zejména u koloidních roztoků a suspenzí. Technika DLS využívá interakce (rozptylu) laserového paprsku s pohybujícími se

částicemi v roztoku, koloidu či suspenzi za vzniku konstruktivních a destruktivních interferencí. Přítomné částice se pohybují pomocí Brownova tepelného pohybu, přičemž vzniká Dopplerův jev ovlivňující vlnové chování laserového paprsku po interakci s částicemi. Díky tomuto pohybu není rozptyl světla stálý (statický), ale neustále se mění (dynamický), přičemž přítomný detektor toto dynamické rozptýlení světla neustále zaznamenává v čase. Pokud tyto záznamy porovnáváme v krátkém časovém úseku, jsou tyto záznamy podobné a korelují spolu, avšak při delší době pozorování dochází k podstatnému odlišení od prvotních záznamů a korelace vymizí. Tyto odlišnosti mají vliv na následující korelaci pomocí tzv. autokorelační funkce (AKF), kdy výsledkem této korelace je závislost korelačního koeficientu v čase. Podobnost (korelace) zjištěných záznamů z rozptýleného světla se v delším časovém úseku mění, až nakonec není přítomna žádná korelace v určité době, což se projevuje poklesem korelačního koeficientu v čase. U malých částic s rychlým difúzním pohybem je pokles korelačního koeficientu rychlý, kdežto u velkých částic je tento pokles pomalý. Z AKF lze poté zjistit difúzní translační koeficient  $D_t$ , ze kterého je možné stanovit v závislosti na tvaru částic charakteristický rozměr analyzovaných částic. Např. u kulových částic lze pomocí Stokes-Einsteinovy rovnice (Vztah 1.1) stanovit hydrodynamický průměr. Díky tomu je následně možné vyhodnotit distribuci charakteristických rozměrů částic v měřeném analytu, typicky u výše zmíněného příkladu se jedná o závislost intenzity signálu na velikosti hydrodynamického průměru [49, 50].

$$d_H = \frac{k_B \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D_t} \quad (1.1)$$

$d_H$  ... Hydrodynamický průměr / m

$k_B$  ... Boltzmannova konstanta ( $\sim 1,38 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$ )

$T$  ... Termodynamická teplota / K

$\eta$  ... Dynamická viskozita /  $\text{Pa} \cdot \text{s}$

$D_t$  ... Translační difúzní koeficient /  $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$

#### 7.4.1 Stanovení zeta-potenciálu koloidních částic

Zeta-potenciál  $\zeta$  je fyzikální veličina udávající stabilitu koloidních částic. Defínuje elektrokinetický potenciál, jež se nachází mezi Sternovou dvojrivrstvou a Gouy-Champmanovou difúzní vrstvou. Mezi těmito vrstvami je tzv. rovina skluzu, přičemž ve Sternově dvojrivrstvě, skládající se z vnitřní a vnější Helmholtzovy vrstvy, se nachází nepohyblivé ionty přichycené na povrchu částice a v difúzní vrstvě se

vyskytují pohyblivé ionty. Pokud  $|\zeta| \geq 30$  mV, lze považovat částice v koloidu za stabilní.

Jedna z možných technik umožňující stanovení této fyzikální veličiny se nazývá elektroforetický rozptyl světla (ELS), která je většinou součástí u přístrojů s technikou DLS. Dělí se na dva podtypy: laser-Dopplerová elektroforéza (LDE) a fázová analýza rozptylu světla (PALS). Princip ELS je podobný jako u DLS, kdy opět dochází k interakci laserového paprsku s částicemi koloidu, avšak jejich zkoumaný pohyb není zprostředkovan Brownovým pohybem, ale pomocí střídavého elektrického pole. U LDE se laserový paprsek před analytem rozdělí díky děliči laserového svazku (z angl. beam splitter) na měřicí a referenční paprsek. Měřicí paprsek interaguje s pohybujícími se (dynamickými) částicemi za vzniku Dopplerova efektu rozptýleného paprsku, přičemž opět dochází k záznamu intenzity rozptýleného světla v čase detektorem, a zároveň je zaznamenáván referenční paprsek. Pomocí spektrálního analyzátoru lze zjistit frekvence  $f$  a její distribuce Dopplerova jevu rozptýlených paprsků a referenčního paprsku, zároveň díky znalosti geometrie přístroje lze převést distribuce frekvencí na distribuce rychlostí  $v$ . Ze znalosti přítomného elektrického pole, které definuje intenzita elektrického pole  $E$ , je možné stanovit distribuci elektroforetické pohyblivosti částic  $u$ . Nyní lze pomocí Henryho rovnice (Vztah 1.2) vypočítat distribuci  $\zeta$ . U PALS se využívá zase střídavé elektrické pole s vyšší frekvencí než u LDE, kdy částice v koloidu jsou nuceny oscilovat. Pomocí velikosti oscilace a fázového posunu střídavého elektrického proudu po průchodu koloidem je stanovena rychlost částic, ze které se obdobně jako u LDE zjistí  $\zeta$  [51–53].

$$u = \frac{2 \cdot \varepsilon_R \cdot \varepsilon_0 \cdot \zeta \cdot f(K_a)}{3\eta} \quad (1.2)$$

$u$  ... Elektroforetická pohyblivost částic /  $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$

$\varepsilon_R$  ... Relativní permitivita prostředí / 1

$\varepsilon_0$  ... Permitivita vakua ( $\sim 8,85 \cdot 10^{-12} \text{F} \cdot \text{m}^{-1}$ )

$\zeta$  ... Zeta-potenciál / V

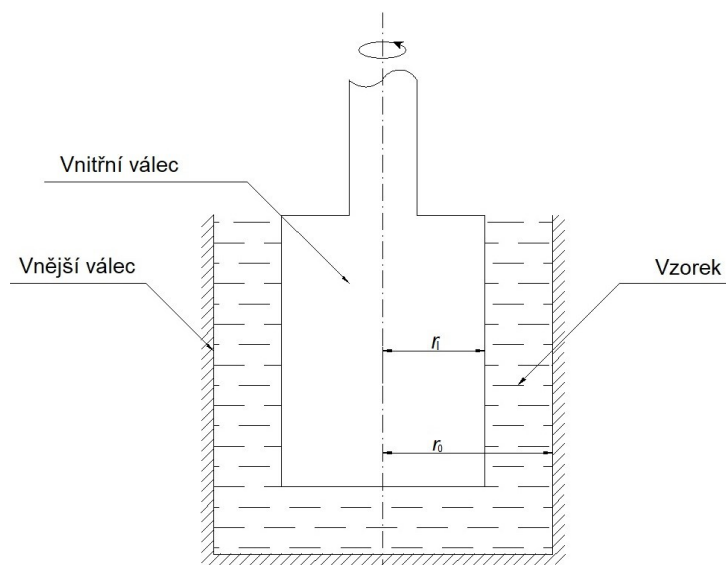
$f(K_a)$  ... Henryho funkce / 1

$\eta$  ... Dynamická viskozita prostředí /  $\text{Pa} \cdot \text{s}$

## 7.5 Rotační reometrie s geometrií válec-válec

Rotační reometrie společně s kapilární reometrií se řadí mezi fyzikální metody měřící tokové vlastnosti látek. Lze je považovat za nedestruktivní metody, někdy však dochází k měření při vysokých teplotách, kdy může docházet zejména u polymerních

látek k degradaci makromolekul, a tudíž může být takové měření i destruktivní. Kapilární reometry se využívají v oblasti středních až vysokých rychlostí smykové deformace, konkrétně v rozmezí  $(10-10^3) \text{ s}^{-1}$ . Rotační reometry se používají pro nízké rychlosti smykové deformace, tedy v rozmezí  $(10^{-2}-10^2) \text{ s}^{-1}$ . Rotační reometry se primárně liší v měřicí geometrii, přičemž mezi nejčastější geometrie se řadí např. geometrie kužel-deska, deska-deska nebo válec-válec. Pro koloidy, coby relativně nízko-viskózní systémy, je vhodné použít geometrii válec-válec (Obrázek 21). Polymerní koloidní systém či směs je v této geometrii podrobena smykovému namáhání mezi stacionárním (vnějším) válcem a pohyblivým (vnitřním) válcem. Tyto válce musí mít geometrii přesně definovanou a bývají soustředné, přičemž jejich charakteristický rozměr je ten, který vhodně definuje smáčené těleso tekutinou, zde vnější  $r_0$ , resp. vnitřní poloměr  $r_1$ . Vnitřní válec se pohybuje konstantní úhlovou rychlostí  $\omega$ . Díky otáčivému pohybu vnitřního válce lze stanovit viskoelastické parametry jako jsou např. komplexní viskozita, dynamické moduly či smykové napětí. U této metody nesmí analyzované tekutiny vykazovat sedimentaci částic, jelikož by docházelo ke zkreslení viskoelastických parametrů, tudíž je nevhodné měřit na takovém přístroji například suspenze [54].



Obrázek 21: Schéma rotačního reometru s geometrií válec-válec ( $r_1$ ... Poloměr vnitřního válce;  $r_0$  ... Poloměr vnějšího válce).

## 7.6 Rentgenově-fluorescenční spektrometrie

Rentgenově-fluorescenční spektrometrie (XRF) je nedestruktivní analytická metoda sloužící pro kvalitativní a kvantitativní stanovení atomů daného prvku



v analytu. Principiálně se jedná o interakci rentgenového (RTG) záření s tzv. core elektrony ( $e^-$ ) v atomech analyzovaného vzorku. Tyto  $e^-$  jsou excitovány z elektronového obalu atomu, přičemž volnou hladinu excitovaných  $e^-$  nahradí jiný  $e^-$  z vyšší elektronové hladiny. Při deexcitaci  $e^-$  z vyšší elektronové vrstvy do nižší dojde k vyzáření fotonů. Záření fotonů je charakteristické pro dané přechody a dané atomy, přičemž díky spektrometru jsou energie fotonových záření přeneseny do energetického spektra a konkrétním skupinám píků je ve spektru přiřazen konkrétní prvek. Pomocí kalibračních křivek pro dané látky lze poté kvantitativně stanovit množství daných atomů prvku zastoupených v analyzované látce. Tato metoda se primárně využívá pro kvalitativní, ale i kvantitativní, stanovení množství těžkých kovů, např. v odpadních vodách nebo kontaminované zemině [55, 56].

## 7.7 Transmisní elektronová mikroskopie

Transmisní elektronová mikroskopie (TEM) je převážně destruktivní zobrazovací metoda, kdy základním principem je průchod (odtud transmisní) elektronů tenkým vzorkem, přičemž tyto prošlé  $e^-$  jsou detekovány a získává se tak informace o vnitřní struktuře vzorku. Tím se podstatně liší od skenovací elektronové mikroskopie (SEM), která je primárně založena na zkoumání povrchu vzorku. V základu se elektronový mikroskop pro TEM nejčastěji skládá z elektronového děla (zdroj primárního elektronového svazku) v podobě vlákna/hrotu wolframu nebo boridu lanthanového ( $\text{LaB}_6$ ). Proud  $e^-$  je hnán pomocí anody při urychlovacím napětí v řádech kV a díky elektromagnetickým čočkám je fokusován na vzorek, který musí být tenký, uvádí se přibližně v rozmezí (10–100) nm. Elektromagnetické čočky bývají z velmi čistého Fe. Vzorkem prošlé elektrony jsou dále přes objektiv a clonu pomocí elektromagnetických čoček usměrněny na detektor v podobě fluorescenčního stínítka, pod kterým bývá fotovrstva i videokamera, a dochází tak k vytvoření obrazu. Získáváme tak informaci o vzorku v tzv. zobrazovacím módu, přičemž se nejčastěji využívá technika světlého pole, kdy světlá místa jsou vytvořena prošlými  $e^-$  a tmavá místa či místa výskytu těžkých atomů naznačují menší množství  $e^-$  až jejich absenci. Pomocí TEM lze sledovat i prošlé difraktované  $e^-$  (pružný rozptyl  $e^-$ ) používané např. na sledování mezivzrostových vzdáleností nebo amorfních a semikrystalických oblastí v polymeru. Nad vzorkem může být přítomen i detektor na sekundární  $e^-$  nebo RTG záření, čímž lze získat informaci o chemickém složení vzorku [51, 57, 58].

## 8 CÍL PRÁCE

Cílem této práce je příprava mikrogelových až nanogelových částic termoresponzivního konjugátu 2,3-dikarboxyhyaluronové kyseliny a poly(*N*-isopropylakrylamidu), přičemž po ověření struktury bude sledována změna molární hmotnosti kyseliny hyaluronové během dílčích reakcí. Zároveň bude sledován vliv několika parametrů na výsledné velikosti částic vzniklých produktů. Mezi sledovanými parametry budou: molární hmotnost vstupní kyseliny hyaluronové a vstupního poly(*N*-isopropylakrylamidu), reakční poměry těchto látek při biokonjugační reakci a stupně oxidace u vzniklých oxidovaných konjugátů. U vzniklých částic bude rovněž sledována stabilita ve vodném prostředí a bude odhadnuta dolní kritická teplota přechodu sol-gel (LCST) u termoresponzivních oxidovaných konjugátů. Vhodné konjugáty DCH-pNIPAM vyznačující se malými rozměry částic při teplotě nad LCST budou podrobeny konjugačním reakcím s platinovým léčivem v podobě dusičnanu *cis*-diammin-dichloro-phenanthridinplatnatého (PhPt), kde následně budou opět stanoveny velikosti nově vzniklých částic. Vybraný termoresponzivní oxidovaný konjugát bude bez a s navázaným platinovým léčivem pozorován pomocí transmisní elektronové mikroskopie pod a nad LCST. U vybraných konjugátů DCH-pNIPAM s navázaným léčivem bude stanovena efektivita vázání tohoto léčiva a bude sledováno jeho uvolňování v čase z těchto konjugátů ve fyziologickém roztoku nad LCST. Nejvhodnější konjugát DCH-pNIPAM s navázaným PhPt, kdy rozhodujícím kritériem bude malá velikost, vysoká efektivita vázání léčiva a relativně pomalé uvolňování nad LCST, bude vybrán pro potenciální biologické testování v budoucnosti.

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 9 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V experimentální části je popsána příprava konjugátů HA a pNIPAMu (pNIPAMace, Kapitola 9.2.1) s následnou regioselektivní oxidací skládající se z primární oxidace (POX, Kapitola 9.2.2) a sekundární oxidace (SOX, Kapitola 9.2.3) těchto konjugátů. U vybraných oxidovaných konjugátů bylo navázáno protirakovinové léčivo PhPt.

### 9.1 Materiály a přístroje

Není-li uvedeno jinak, všechny chemikálie byly analyticky čisté. Ve všech reakcích ve vodném prostředí byla použita ultračistá voda (UPW; z angl. ultra pure water; 18,2 M $\Omega$  · cm). Veškeré nastavování pH bylo provedeno pomocí hydroxidu sodného (NaOH;  $\geq 98$  %; Lachner, Česká republika) a kyseliny chlorovodíkové (HCl; 35%; Penta, Česká republika). Pro pNIPAMaci a POX byla použita k. hyaluronová (HA) ve formě sodné soli ( $\bar{M}_w \approx 260$  kDa;  $\bar{M}_w \approx 2780$  kDa; Tech, Grade; Contipro a. s.; Česká republika). V pNIPAMaci byl dále použit poly(*N*-isopropylakrylamid) terminovaný aminovou skupinou (pNIPAM;  $\bar{M}_n \sim 5,5$  kDa;  $\bar{M}_n \sim 2,5$  kDa; Aldrich chemistry), chlorid 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinia (DMTMM; 97 %; Fisher Scientific). Pro POX byly použity vzniklé konjugáty HA a pNIPAMu, jako oxidační činidlo sloužil jodistan sodný (NaIO<sub>4</sub>; p.a.; Penta, Česká republika) a na zastavení POX byl použit ethylenglykol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>; čistý; Penta, Česká republika). V SOX reagovaly produkty vzniklé z POX, přičemž reakce probíhala ve vodném pufrovaném roztoku z kyseliny octové (CH<sub>3</sub>COOH; p.a.;  $\geq 99,8$  %; Sigma-Aldrich) a octanu sodného trihydrátu (CH<sub>3</sub>COONa · 3H<sub>2</sub>O; p.a.; Penta, Česká republika) v přítomnosti oxidačního činidla chloritanu sodného (NaClO<sub>2</sub>; 80 %; Honeywell | Fluka). Pro dialýzu rozpustných produktů pNIPAMace, POX a SOX byly využity dialyzační membrány se 14 kDa MWCO parametrem (z angl. molecular weight cut off; Thermofisher Scientific) a případný solný roztok dialýzy byl vytvořen pomocí chloridu sodného (NaCl; ACS; Supelco, Merck). Případné sterilizace rozpuštěných produktů byly provedeny pomocí filtrů s póry o velikosti 0,45  $\mu$ m. Loading byl proveden převážně u produktů získaných ze SOX, kde jako platínové léčivo byl použit dusičnan *cis*-diammin-dichloro-phenanthridinplatnatý (PhPt), který byl syntetizován z diammin-dichloroplatnatého komplexu (*cis*-Pt) a phenanthridinu (98 %; Sigma-Aldrich), přičemž i *cis*-Pt byl syntetizován, a to z tetrachloroplatnatanu

draselného ( $K_2[PtCl_4]$ ; 99,9 %; Alfa Aesar). PhPt byl aktivován pomocí dusičnanu stříbrného ( $AgNO_3$ ;  $\geq 99,0$  %; Honeywell | Fluka) a vysrážení stříbrných iontů bylo provedeno pomocí NaCl (ACS; Supelco, Merck). Pro filtraci sraženiny chloridu stříbrného ( $AgCl$ ) byly použity filtry o velikostech pórů 0,45  $\mu m$  a 0,22  $\mu m$ . Jako dialyzační membrána byla použita s parametrem MWCO 3,5 kDa (snakeskin membrána, Thermo Fisher; předem ošetřená membrána, Spectrum, Inc.). Pro rozpuštění oxidovaných konjugátů s navázaným PhPt byl kromě UPW použit fosfátem pufovaný solný roztok o pH = 7,4 (PBS 7,4; Corning, USA).

UPW byla získána přečištěním demineralizované vody z demineralizačních filtrů (Aqual 29-2, Verkon) pomocí přístroje na úpravu vody Simplicity UV (Millipore). Odstranění vody ze vzniklých produktů bylo provedeno pomocí lyofilizátoru Scanvac CoolSafe 110-4 PRO (Labogene) [59]. Dispergace částic v roztoku byla provedena pomocí homogenizátoru UZ Sonopuls HD2070 kit [60]. Uvolňování léčiv bylo prováděno v inkubované orbitální třepače 3500 (VWR). Pro studium struktury pomocí FT-IR byl použit spektrometr Nicolet 6700 (Thermo Scientific, USA) [61] vybavený diamantovým hranolem a využívající metodu zeslabené úplné reflektance (ATR z angl. Attenuated total reflectance) a dále také NMR spektrometr JEOL ECZ400R/S3 (JEOL) [62], kdy vzorky byly rozpuštěny v oxidu deuteria ( $D_2O$ ) a spektra měřena při 298K. Stanovení molární hmotnosti bylo provedeno metodou GPC pomocí přístroje HPLC Waters Digital Breeze (Waters, USA) s využitím detektoru indexu lomu Waters 2414, kolony Tosoh TSK GMPW<sub>XL</sub> o rozměrech: 300 mm; 7,8 mm a 13  $\mu m$  obsahující stacionární gel [63]. Jako mobilní fáze pro metodu GPC byl použit 0,1M roztok dusičnanu sodného ( $NaNO_3$ ; 99,8 %; Lachner, Česká republika) a 0,05M hydrogenfosforečnanu sodného dodekahydrátu ( $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ; 99,6 %; VWR, Česká republika). Jako kalibrační řada byla využita souprava z polysacharidu pullulanu SAC-10 (Agilent technologies, Inc.) o intervalu  $\bar{M}_w \in <0,342-805>$  kDa. Pro analýzu velikosti částic a jejich stability byl použit přístroj ZETA NANO ZS ZEN3601 (Malvern Panalytical) [64]. Pro stanovení LCST byly sledovány viskoelastické vlastnosti rozpuštěných oxidovaných konjugátů prostřednictvím rotačního viskozimetru Anton-Paar MCR 502 (Anton-Paar) [65]. Pro kvantitativní analýzu PhPt obsaženého v oxidovaných konjugátech a při jeho uvolnění byla použita metoda XRF prostřednictvím EDX-XRF analyzátoru ARL Quant'X (Thermo Scientific) [66]. Pro pozorování termoresponzivního oxidovaného konjugátu

a jeho derivátu s navázaným PhPt byla použita metoda TEM pomocí mikroskopu JEOL JEM 2100 (JEOL) [67].

## 9.2 Příprava vzorků DCH-pNIPAM

Byly vytvořeny série vzorků s charakteristickými kódy, u kterých byly sledovány vlivy různých parametrů na vlastnosti finálních oxidovaných konjugátů. Legendu pro zkratky u jednotlivých vzorků lze vidět v Tabulce 1. Pro sledování vlivu molární hmotnosti vstupní HA jsou vzorky značeny 01 ( $\bar{M}_w \approx 260$  kDa) a 02, 03 ( $\bar{M}_w \approx 2780$  kDa). Toto značení bylo využito také pro série sledující vliv stupně oxidace na vlastnosti výsledných oxidovaných konjugátů, 01, 02 (úplná oxidace konjugátů) a 03 (parciální oxidace konjugátů). Série sledující vliv reakčních poměrů HA : pNIPAM (množství roubovaného pNIPAMu) jsou značeny písmeny A, C ( $m_{HA} : m_{pNIPAM} = 1 : 1$ ) a B ( $m_{HA} : m_{pNIPAM} = 1 : 2$ ) a tyto byly využity také pro sledování vlivu molární hmotnosti vstupního pNIPAMu – A, B ( $\bar{M}_n \sim 5,5$  kDa) a C ( $\bar{M}_n \sim 2,5$  kDa). Pro sledování změn molární hmotnosti vzniklých produktů napříč všemi reakcemi (pNIPAMace, POX, SOX) byly vytvořeny tzv. blank série, jež neobsahují pNIPAM a značí se písmenem D.

Tabulka 1: Legenda pro kódy vzorků vzniklých produktů pNIPAMace a selektivní oxidace.

01	Vstupní HA o $\bar{M}_w \approx 260$ kDa pro úplnou oxidaci
02	Vstupní HA o $\bar{M}_w \approx 2780$ kDa pro úplnou oxidaci
03	Vstupní HA o $\bar{M}_w \approx 2780$ kDa pro parciální oxidaci
A	$m_{HA} : m_{pNIPAM} = 1 : 1$ a $\bar{M}_{npNIPAM} \sim 5,5$ kDa
B	$m_{HA} : m_{pNIPAM} = 1 : 2$ a $\bar{M}_{npNIPAM} \sim 5,5$ kDa
C	$m_{HA} : m_{pNIPAM} = 1 : 1$ a $\bar{M}_{npNIPAM} \sim 2,5$ kDa
D	Blank, vzorek prochází všemi reakcemi bez pNIPAMu
HA	Kyselina hyaluronová
DAH	2,3-dialdehydhyaluronové kyseliny
DCH	2,3-dikarboxyhyaluronová kyselina

### 9.2.1 pNIPAMace

Přehled jednotlivých vzorků, navážek a reakčních parametrů pro pNIPAMaci lze najít v Tabulce 2. Pro série A/B byla navážka HA 500 mg s odpovídajícím množstvím pNIPAMu a pro série C/D byla navážka HA 100 mg s odpovídajícím množstvím dalších reaktantů, přičemž u série D pNIPAM nebyl. Vzorky série C a D byly připravovány z nižšího množství reaktantů, jelikož sloužily pouze pro charakterizace a porovnávání se sériemi A/B. Před reakcí probíhalo rozpouštění výše zmíněných reaktantů v UPW po dobu 24 hod za laboratorní teploty a 250 RPM, kdy hmotnostní koncentrace pro HA i pNIPAM činila  $25 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  pro série A/B, hmotnostní koncentrace pro HA i pNIPAM u série C byla  $20 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Hmotnostní koncentrace HA pro sérii D byla stejná jako u série C. Po rozpuštění reaktantů byly polymerní směsi smíchány, a rozpuštěný pNIPAM byl vždy přidáván do rozpuštěné HA kvůli jeho menší viskozitě. U smíchaných polymerních směsí bylo nastaveno pH reakčního prostředí na hodnotu  $6,5 \pm 0,2$  pomocí NaOH či HCl.

Tabulka 2: Přehled jednotlivých vzorků, navážek a reakčních parametrů pro pNIPAMaci ( $m_{\text{HA}}$  ... Hmotnost navážky dané k. hyaluronové;  $c_{\text{HA}}$  ... Hmotnostní koncentrace HA v celkovém objemu reakční směsi;  $m_{\text{HA}}:m_{\text{pNIPAM}}$  ... Hmotnostní poměr HA ku pNIPAMu;  $n_{\text{HA}}:n_{\text{DMTMM}}$  ... Molární poměr HA ku DMTMM;  $V_{\text{c}}$  ... Celkový reakční objem).

Kód vzorku	$\frac{m_{\text{HA}}}{\text{mg}}$	$\frac{c_{\text{HA}}}{\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}}$	$\frac{m_{\text{HA}}:m_{\text{pNIPAM}}}{\text{mg:mg}}$	$\frac{n_{\text{HA}}:n_{\text{DMTMM}}}{\text{mol:mol}}$	$\frac{V_{\text{c}}}{\text{ml}}$
01_HA_A	500	12,5	1:1	1:1	40
01_HA_B	500	8,3	1:2	1:1	60
01_HA_C	100	10	1:1	1:1	10
01_HA_D	100	20	-	1:1	5
02_HA_A	500	12,5	1:1	1:1	40
02_HA_B	500	8,3	1:2	1:1	60
02_HA_C	100	10	1:1	1:1	10
02_HA_D	100	20	-	1:1	5
03_HA_A	500	12,5	1:1	1:1	40
03_HA_B	500	8,3	1:2	1:1	60
03_HA_D	100	20	-	1:1	5

Po nastavení hodnoty požadovaného pH reakčního prostředí bylo přidáno adekvátní množství DMTMM coby aktivačního činidla v molárním poměru  $n_{\text{HA}}:n_{\text{DMTMM}} = 1:1$ . Reakce probíhala za laboratorní teploty, při 250 RPM

a s přístupem světla po dobu 120 hod. Po skončení reakce byly reakční směsi přečištěny dialýzou pomocí dialyzačních membrán o MWCO 14 kDa po dobu 72 hod, kdy 48 hod probíhala dialýza v 0,01M roztoku NaCl a následujících 24 hod byla použita pro dialýzu pouze UPW. Dialyzát byl měněn dvakrát denně. Výsledné produkty byly po nakapání do krystalizačních misek a zmrazení pomocí ethanolové ledové lázně při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  získány pomocí lyofilizace. Veškeré výtěžky byly ze všech sérií téměř kvantitativní, což odpovídá hodnotám výtěžku nad 90 %.

### 9.2.2 Primární oxidace

Pomocí molárního poměru  $n_{\text{HA}}:n_{\text{NaIO}_4} = 1:3,1$ , zvoleného na základě předchozích prací [18], bylo stanoveno množství reaktantů pro všechny konjugáty HA-pNIPAM, přičemž u sérií A/B se vycházelo z navážky HA-pNIPAM odpovídající 450 mg HA, u série C byla navážka vstupních reaktantů odvozena z 90 mg HA a u série D se vycházelo z 80 mg HA (Tabulka 3). Ke zmíněným hmotnostem HA těchto sérií se vztahují i ostatní nastavované parametry POX. Konjugáty sérií A/B/C i HA ze série D byly rozpouštěny za laboratorní teploty a při 250 RPM v UPW po dobu 24 hod, kdy hmotnostní koncentrace HA byla  $20\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Po rozpuštění vzorků všech sérií bylo přidáno adekvátní množství roztoku periodátu a začala POX. Reakce probíhala ve vodní lázni při teplotě  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  a 300 RPM za absence světla po dobu 24 hod u sérií 01/02 (úplná oxidace) a po dobu 4 hod u série 03 (parciální oxidace). Zastavení POX proběhlo přidávkem adekvátního množství ethylenglykolu, tj.  $1\text{ }\mu\text{l}$  ethylenglykolu na 1 mg HA. Přebytečný periodát v reakční směsi reagoval s ethylenglykolem po dobu 10 min za laboratorní teploty, absence světla a při 300 RPM. Přečištění produktů z reakční směsi bylo provedeno pomocí dialýzy přes dialyzační membrány s MWCO 14 kDa oproti 0,01M roztoku NaCl po dobu 48 hod, kdy byl dialyzát měněn dvakrát za den a následně po dobu 24 hod s obdobnou výměnou dialyzátu oproti UPW. Retenáty z dialýzy byly filtrovány přes filtry s póry o velikosti  $0,45\text{ }\mu\text{m}$ , nakapány do krystalizačních misek v ethanolové ledové lázni při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  a lyofilizovány. Veškeré výtěžky ze všech sérií byly opět téměř kvantitativní, což odpovídá hodnotám výtěžku nad 90 %.



Tabulka 3: Přehled jednotlivých vzorků a reakčních parametrů pro POX ( $m_{\text{T}_{\text{HA}}}$  ... Předpokládaná hmotnost HA přítomné v navážce HA-PNIPAM;  $c_{\text{HA}}$  ... Hmotnostní koncentrace teoretické HA v celkovém objemu reakční směsi;  $n_{\text{HA}}:n_{\text{NaIO}_4}$  ... Molární poměr HA ku periodátu;  $t_{\text{POX}}$  ... Reakční doba primární oxidace;  $V_{\text{c}}$  ... Celkový reakční objem).

Kód vzorku	$\frac{m_{\text{T}_{\text{HA}}}}{\text{mg}}$	$\frac{c_{\text{HA}}}{\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}}$	$\frac{n_{\text{HA}}:n_{\text{NaIO}_4}}{\text{mol}:\text{mol}}$	$\frac{t_{\text{POX}}}{\text{hod}}$	$\frac{V_{\text{c}}}{\text{ml}}$
01_DAH_A	450	10	1:3,1	24	45
01_DAH_B	450	10	1:3,1	24	45
01_DAH_C	90	10	1:3,1	24	9
01_DAH_D	80	10	1:3,1	24	8
02_DAH_A	450	10	1:3,1	24	45
02_DAH_B	450	10	1:3,1	24	45
02_DAH_C	90	10	1:3,1	24	9
02_DAH_D	80	10	1:3,1	24	8
03_DAH_A	450	10	1:3,1	4	45
03_DAH_B	450	10	1:3,1	4	45
03_DAH_D	80	10	1:3,1	4	8

### 9.2.3 Sekundární oxidace

Během SOX opět vycházíme kvůli snadnějšímu stanovení množství reaktantů z předpokladu, že ztráty během POX jsou zanedbatelné a u vzniklých konjugátů DAH-pNIPAM došlo ke 100% konverzi hydroxylových skupin na aldehydické. Tedy vzniklé primárně-oxidované konjugáty obsahují množství DAH ekvivalentní k původně přidané HA. I pokud by byl stupeň oxidace o něco nižší, nemělo by to vzhledem k nadbytku oxidačního činidla a vysokým reálným výtěžkům ovlivnit reakci. Množství  $\text{NaClO}_2$  bylo stanoveno pro jednotlivé vzorky na základě zvoleného molárního poměru aldehydických skupin v DAH-pNIPAM ku  $\text{NaClO}_2$   $n_{\text{-CHO}}:n_{\text{NaClO}_2} = 1:4$  [18], přičemž se předpokládá 100% konverze hydroxylových skupin na aldehydické, což u DAH odpovídá  $5,01 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ . Celková koncentrace oxidačního činidla v pufrovaném roztoku byla  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . U sérií A/B se vycházelo z 400 mg DAH a u sérií C/D se vycházelo z 50 mg DAH (Tabulka 4). Jako rozpouštědlo v SOX byl použit pufr o  $\text{pH} = 4,5$ , který je tvořen z roztoku  $0,045\text{M CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  a  $0,055\text{M}$  k. octové. Konjugáty DAH-pNIPAM a DAH (série D) byly napřed rozpuštěny v pufrovaného roztoku během 30 min při 300 RPM a laboratorní teploty. Do rozpuštěných primárně-oxidovaných konjugátů bylo přidáno adekvátní množství oxidačního činidla v digestoři (uvolňování chlóru

během reakce), které bylo rovněž předem rozpuštěno v pufrovaném roztoku, čímž byla reakční směs doředěna na požadovaný reakční objem. SOX probíhala za laboratorní teploty, při 300 RPM v digestoři po dobu 24 hod. Ukončení SOX bylo provedeno nastavením pH reakční směsi na hodnotu v rozmezí  $\text{pH} \in \langle 8,00-8,20 \rangle$ . Reakční směsi byly přefiltrovány dialýzou pomocí dialyzačních membrán s MWCO 14 kDa proti 0,01M roztoku NaCl dobu 48 hod, přičemž dialyzát byl měněn dvakrát za den a následně byl dialyzát nahrazen UPW po dobu 24 hod s obdobnou výměnou dialyzátu. Po dialýze bylo prostředí retenátu nastaveno na  $\text{pH} = 7,40 \pm 0,05$ , následovala jeho filtrace přes 0,45 $\mu\text{m}$  filtry, nakapání do krystalizačních misek v ethanolové ledové lázni při  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ . Produkty všech sérií byly získány lyofilizací, přičemž výtěžky byly opět kvantitativní.

Tabulka 4: Přehled jednotlivých vzorků a reakčních parametrů pro SOX  
 $m_{\text{TDAH}}$  ... Předpokládaná hmotnost DAH přítomné v navážce DAH-PNIPAM;  
 $n_{\text{-CHO}}$  ... Látkové množství aldehydických skupin v adekvátním množství DAH;  
 $n_{\text{-CHO}}:n_{\text{NaClO}_2}$  ... Molární poměr aldehydických skupin DAH ku  $\text{NaClO}_2$ ;  $c_{\text{NaClO}_2}$  ... Látková koncentrace  $\text{NaClO}_2$  v celkovém objemu reakční směsi;  $V_c$  ... Celkový reakční objem).

Kód vzorku	$\frac{m_{\text{TDAH}}}{\text{mg}}$	$\frac{n_{\text{-CHO}}}{\text{mol}}$	$\frac{n_{\text{-CHO}}:n_{\text{NaClO}_2}}{\text{mol}:\text{mol}}$	$\frac{c_{\text{NaClO}_2}}{\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}}$	$\frac{V_c}{\text{ml}}$
01_DCH_A	400	2	1:4	0,1	80,144
01_DCH_B	400	2	1:4	0,1	80,144
01_DCH_C	50	0,25	1:4	0,1	10,018
01_DCH_D	50	0,25	1:4	0,1	10,018
02_DCH_A	400	2	1:4	0,1	80,144
02_DCH_B	400	2	1:4	0,1	80,144
02_DCH_C	50	0,25	1:4	0,1	10,018
02_DCH_D	50	0,25	1:4	0,1	10,018
03_DCH_A	400	2	1:4	0,1	80,144
03_DCH_B	400	2	1:4	0,1	80,144
03_DCH_D	50	0,25	1:4	0,1	10,018

### 9.3 Příprava oxidovaných konjugátů s PhPt

U vybraných termoresponzivních oxidovaných konjugátů (01\_DCH\_B, 02\_DCH\_A, 02\_DCH\_B) byly vytvořeny série vzorků P1-P3 s odpovídajícími kódy (Tabulky 5 a 6), přičemž jednotlivé série vznikaly chronologicky a lišily se změnami daných reakčních parametrů při loadingu platinového léčiva za účelem optimalizace

této reakce a vytvoření termoresponzivních částic s vysokým obsahem PhPt a nízkými rozměry, blížícími se nanoměřítku, a relativně pomalým uvolňováním tohoto léčiva. Reakční parametry jsou v Tabulce 6.

Tabulka 5: Legenda pro kódy vzorků vzniklých produktů loadingu.

01	DCH-pNIPAM vzniklý ze vstupní HA o $\bar{M}_w \approx 260$ kDa a plně oxidovaný
02	DCH-pNIPAM vzniklý ze vstupní HA o $\bar{M}_w \approx 2780$ kDa a plně oxidovaný
A	DCH-pNIPAM vzniklý z reakčních poměrů $m_{HA}:m_{pNIPAM} = 1:1$ a $\bar{M}_{npNIPAM} \sim 5,5$ kDa
B	DCH-pNIPAM vzniklý z reakčních poměrů $m_{HA}:m_{pNIPAM} = 1:2$ a $\bar{M}_{npNIPAM} \sim 5,5$ kDa
DCH	2,3-dikarboxyhyaluronová kyselina
P	Nosič s navázaným PhPt

Pro aktivaci PhPt bylo nejdříve rozpuštěno adekvátní množství této látky v UPW po dobu 45 min při 55 °C, přičemž hmotností koncentrace PhPt v roztoku pro jednotlivé série činila 1 mg·ml<sup>-1</sup>. Po rozpuštění léčiva bylo přidáno odpovídající množství AgNO<sub>3</sub> dle molárního poměru  $n_{PhPt}:n_{AgNO_3} = 1:1$ , čímž začala aktivační reakce PhPt, která probíhala na třepačce za absence světla ve vodní lázni při 150 RPM při různé teplotě a po dobu danou pro jednotlivé série (Tabulka 6). Po skončení aktivační reakce byla reakční směs zchlazena na přibližně 4 °C po dobu 1 hod. Zchlazené reakční směsi všech sérií byly filtrovány pomocí 0,45μm a 0,22μm filtrů, přičemž po každé filtraci bylo přidáno malé množství NaCl v řádech miligramů kvůli ověření přítomnosti ↓AgCl. Pokud směs „aktivovaného“ PhPt obsahovala po přidavku NaCl náznaky bílého zákalu (suspenze), tj. výskyt ↓AgCl, byla suspenze filtrována, dokud po přidavku NaCl nezůstal bezbarvý roztok. U série P3 se nastavilo pH = 7,00 ± 0,05 pomocí NaOH, jelikož prostředí roztoku „aktivovaného“ PhPt vykazovalo kyselé pH, což částečně brání navázání na karboxyláty DCH. Roztoky „aktivované“ PhPt byly v daném množství nakapány do příslušných rozpuštěných koloidů DCH-pNIPAM o pH 7,4 při rychlosti míchání 400 RPM, přičemž hmotnostní poměry reaktantů v reakční směsi odpovídaly  $m_{PhPt}:m_{DCH-pNIPAM} = 1:1$ . Vázání PhPt probíhalo za absence světla na třepačce při rychlosti třepání 100 RPM, dané teplotě a po příslušnou dobu u jednotlivých sérií (Tabulka 6). Reakční směsi byly přečištěny pomocí dialýzy po dobu 4 hod v objemu

odpovídajícímu objemovému poměru reakční směsi ku dialyzátu  $V_{RS}:V_D = 1:20$ , přičemž složení dialyzátu a teplota dialýzy se u vzorků lišila dle příslušných sérií (Tabulka 6). Retenáty veškerých dialýz byly nakapány do krystalizačních misek v ethanolové lázni při  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  a lyofilizovány. Výtěžky výsledných produktů byly kvantitativní.

Tabulka 6: Přehled reakčních parametrů loadingu PhPt u jednotlivých vzorků sérií P1–P3 ( $m_n$  ... Navážka daného nosiče;  $t_A$  ... Doba aktivační reakce;  $T_A$  ... Teplota aktivační reakce;  $\text{pH}_L$  ... Nastavená pH hodnota reaktantů před zahájením loadingu;  $t_L$  ... Reakční doba loadingu;  $T_L$  ... Teplota loadingu;  $T_D$  ... Teplota dialýzy).

Kód vzorku	$\frac{m_n}{\text{mg}}$	$\frac{t_A}{\text{hod}}$	$\frac{T_A}{^\circ\text{C}}$	$\frac{\text{pH}_L}{1}$	$\frac{t_L}{\text{hod}}$	$\frac{T_L}{^\circ\text{C}}$	$\frac{T_D}{^\circ\text{C}}$	Roztok dialýzy	
01_DCH_B-P1	50	16	55	N/A	48	25	25	UPW	
02_DCH_B-P1	50	16	55	N/A	48	25	25	UPW	
02_DCH_A-P1	50	16	55	N/A	48	25	25	UPW	
I-02_DCH_A-P2	15	16	55	N/A	72	37	37	UPW	
II-02_DCH_A-P2	15	16	55	N/A	72	25	25	UPW	
III-02_DCH_A-P2	15	16	55	N/A	72	25	37	3 hod PBS 7,4	1 hod UPW
02_DCH_A-P3	30	72	25	7	72	25	25	UPW	
02_DCH-P3	30	72	25	7	72	25	25	UPW	

## 10 VÝSLEDKY A DISKUZE

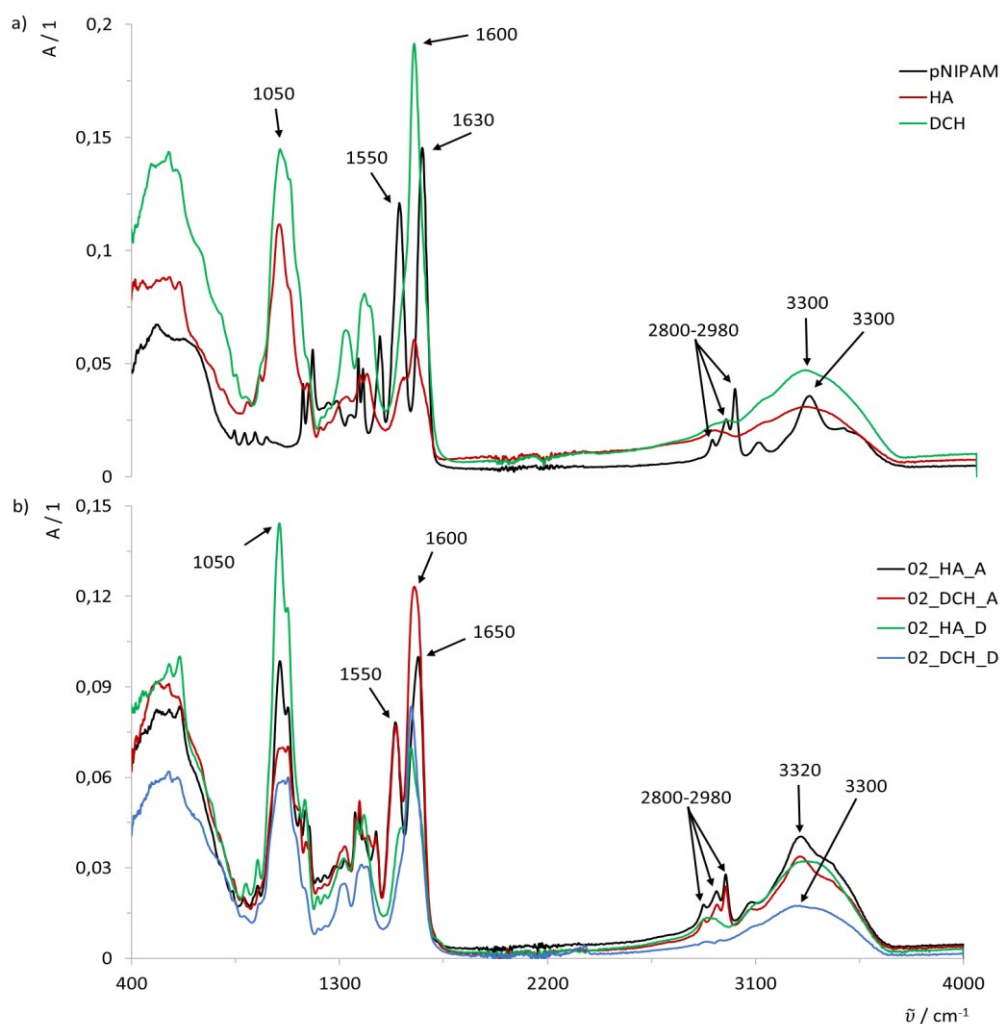
U vzniklých produktů DCH-pNIPAM byla ověřena struktura, byl stanoven stupeň oxidace DCH v základním řetězci oxidovaného konjugátu, grafting a stupeň substituce pNIPAMu na DCH. Byla zjištěna molární hmotnost a index neuniformity u vzorků série D, zároveň byla stanovena velikost částic pomocí hydrodynamického průměru  $d_H$  a jejich stabilita v koloidu pomocí zeta potenciálu  $\zeta$ . Dále byla odhadnuta LCST u termoresponzivních oxidovaných konjugátů. U vybraných konjugátů DCH-pNIPAM s navázaným platinovým léčivem byl stanoven hydrodynamický průměr a polydisperzita velikosti částic PDI, přičemž u těchto konjugátů a DCH byla sledována efektivita navázání PhPt, a zároveň jeho uvolňování z výše zmíněných konjugátů a DCH ve fyziologickém prostředí v čase. Nejvhodnější termoresponzivní oxidovaný konjugát a jeho derivát s navázaným PhPt byl pozorován pomocí TEM.

### 10.1 Struktura vzniklých produktů

IR spektra byla měřena u vzorků v pevném stavu pomocí FT-IR. Na Obrázku 22a lze vidět IR spektra vstupních materiálů pro pNIPAMaci a produkt selektivní oxidace HA. Na Obrázku 22b je možné pozorovat IR spektrum vybraných produktů pNIPAMace a selektivní oxidace. Pro přehlednost v grafu byly vybrány jen 4 produkty, jelikož spektra ostatních jsou velmi podobná.

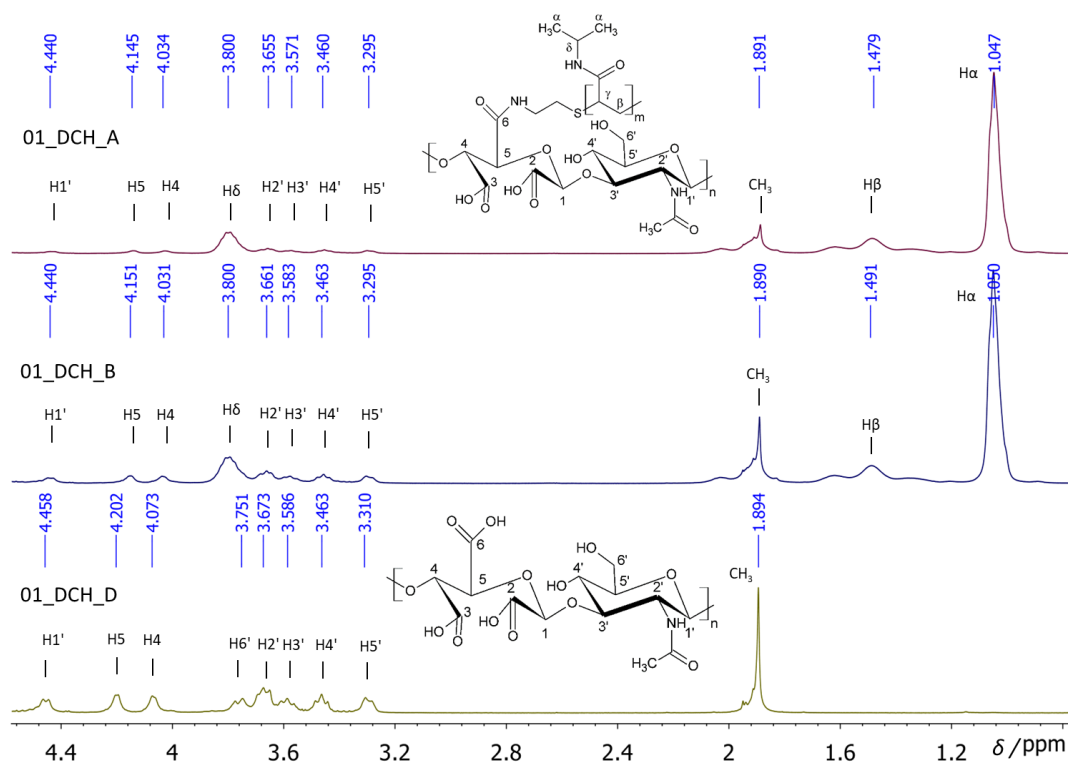
V IR spektru pNIPAMu (Obrázek 22a) lze vidět tzv. spřažené valenční vibrace amidických skupin při hodnotách vlnočtu  $\approx 3300 \text{ cm}^{-1}$  (amid A),  $\approx 1630 \text{ cm}^{-1}$  (amid I) a  $\approx 1550 \text{ cm}^{-1}$  (amid II). Tyto vibrace jsou charakteristické pro vazby O=C a N-H v amidové skupině pNIPAMu. Zároveň lze pozorovat v intervalu  $<2800\text{--}2980> \text{ cm}^{-1}$  valenční vibrace charakteristické pro vazbu C-H z uhlovodíkové řetězce pNIPAMu. Zmíněné vibrace pNIPAMu je možné vidět také u konjugátů DCH-pNIPAM na Obrázku 22b, konkrétně jsou v těchto konjugátech přítomny spřažené valenční vibrace amid A ( $\approx 3320 \text{ cm}^{-1}$ ), amid I ( $\approx 1650 \text{ cm}^{-1}$ ), amid II ( $\approx 1550 \text{ cm}^{-1}$ ) a valenční vibrace charakteristické pro uhlovodíkový řetězec v pNIPAMu v rozsahu  $<2800\text{--}2980> \text{ cm}^{-1}$ . To znamená, že výsledné produkty po pNIPAMaci a následné selektivní oxidaci obsahují pNIPAM a došlo tedy k vytvoření vazby mezi pNIPAMem a HA či DCH. V IR spektru pro HA je možné pozorovat při  $\approx 3300 \text{ cm}^{-1}$  valenční vibrace vazby O-H z hydroxylových skupin, při  $\approx 1600 \text{ cm}^{-1}$  se nachází relativně slabý pás valenční

vibrace pro vazbu O=C z karboxylové skupiny a N-acetylglukosaminové jednotky a pás při  $\approx 1050 \text{ cm}^{-1}$  odpovídá deformačním vibracím charakteristickým pro vazbu C-O-C z glykosidické vazby HA a hemiacetalového kyslíku v monomerech. Pásky při stejných hodnotách vlnočtu lze pozorovat i u DCH (Obrázek 22a), kde ale zejména při  $\approx 1600 \text{ cm}^{-1}$  došlo k značnému nárůstu intenzity píku v důsledku oxidace HA na DCH a odpovídajícího zvýšení množství karboxylových skupin v DCH. Obdobný nárůst intenzity valenční vibrace při  $\approx 1600 \text{ cm}^{-1}$ , tj. zvýšení množství karboxylových skupin v karboxylátech, je možné pozorovat i u vzniklých produktů pNIPAMace a selektivní oxidace (Obrázek 22b). Zároveň při  $\approx 3300 \text{ cm}^{-1}$  je přítomen pás charakteristický pro valenční vibraci vazby O-H hydroxylové skupiny a deformační vibrace ( $\approx 1050 \text{ cm}^{-1}$ ) vazby C-O-C, přičemž pokles intenzity tohoto pásu by mohl být způsoben degradací molární hmotnosti HA při selektivní oxidaci (Kapitola 10.2).



Obrázek 22: IR spektra s Fourierovou transformací (závislost absorpance  $A$  na vlnočtu  $\bar{\nu}$ ) pro výchozí látky (a) a vybrané produkty pNIPAMace a selektivní oxidace (b).

Po kvalitativní FT-IR analýze následovala NMR analýza, kde vzorky byly rozpuštěny v D<sub>2</sub>O o koncentraci 10 mg·ml<sup>-1</sup>. Z <sup>1</sup>H-NMR spekter naměřených při 289K (Obrázek 23) lze vidět charakteristické signály DCH a pNIPAMu, které jsou označeny odpovídajícím symbolem vodíku ze struktury DCH-pNIPAM při daných chemických posunech. Pro jednoduchost jsou ukázána jen spektra pro vzorky 01\_DCH\_A, 01\_DCH\_B a 01\_DCH\_D, protože spektra ostatních vzorků byla podobná. Graftingové číslo (G) bylo stanoveno z porovnání intenzit signálů H $\alpha$  pNIPAMu a H5 DCH. G je uvedeno na Obrázku 24a. Pro parciálně oxidované konjugáty nebylo G zkoumáno, jelikož nedosahovaly požadované malé velikosti nanogelových částic vzhledem k jejich konečné vyšší molární hmotnosti (Kapitola 10.2 a 10.3).

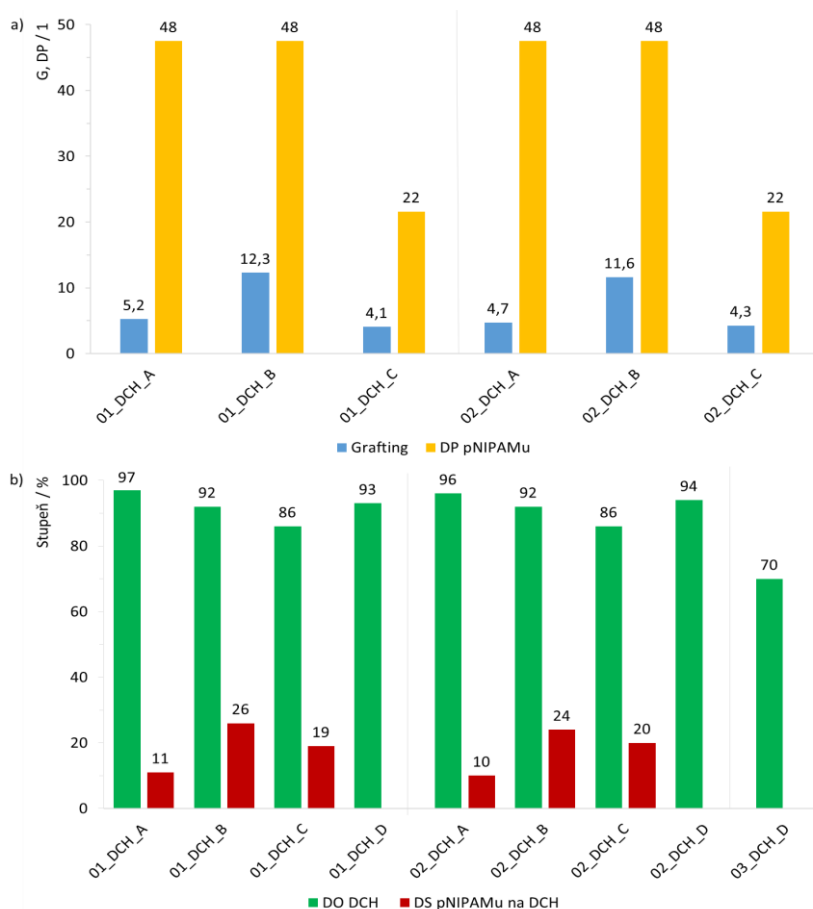


Obrázek 23: <sup>1</sup>H-NMR spektra vybraných oxidovaných konjugátů DCH-pNIPAM.

Pro přibližné stanovení substitučního stupně pNIPAMu na DCH byl vypočítán teoretický polymerační stupeň pNIPAMu (DP) jako podíl  $\bar{M}_n$  pNIPAMu uvedeného výrobcem (5,5 kDa pro vysokomolární pNIPAM a 2,5 kDa pro nízkomolární pNIPAM) a „střední“ molární hmotnosti monomerní jednotky pNIPAMu zohledňující terminující amin ( $M_{pNIPAM} = 115,778 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). DP pro použitý pNIPAM je uveden na Obrázku 24a. Podílem G a DP byl stanoven stupeň substituce (DS) pNIPAMu na DCH (Obrázek 24b). DS se u série A pohybuje okolo 10 % a u série B přibližně odpovídá 25 %, což zhruba odpovídá nastaveným

reakčním parametrům u série A/B, tj. u série B bylo přidáno dvakrát větší množství pNIPAMu než u série A. Podobný poměr mezi sériemi A/B je vidět i u G. Při porovnání DS pro série A/C, kdy reakční poměry HA ku pNIPAMu byly stejné, ale molární hmotnost pNIPAMu mezi těmito sériemi se lišila, je možné pozorovat vyšší DS u série C. Nicméně hodnoty G při porovnání série A/C byly relativně podobné. Série C vykazuje vyšší DS, jelikož pNIPAM měl nižší  $\bar{M}_n \sim 2,5$  kDa, přičemž při stejné hmotnosti navážky vstupního pNIPAMu obsahuje více makromolekul než je tomu u pNIPAMu série A, jehož  $\bar{M}_n \sim 5,5$  kDa.

Stupeň oxidace (DO) byl zjištěn z integrálních intenzit signálů H1' a H5, tedy porovnáním oxidovaných a neoxidovaných skupin u plně i parciálně oxidovaných konjugátů v NMR spektrech. DO plně oxidovaných konjugátů (série 01 a 02) odpovídal <86–97> % (Obrázek 24b). U parciálně oxidovaných konjugátů tato veličina dosahovala 70 %, což odpovídá nastaveným reakčním parametrům selektivní oxidace [18].

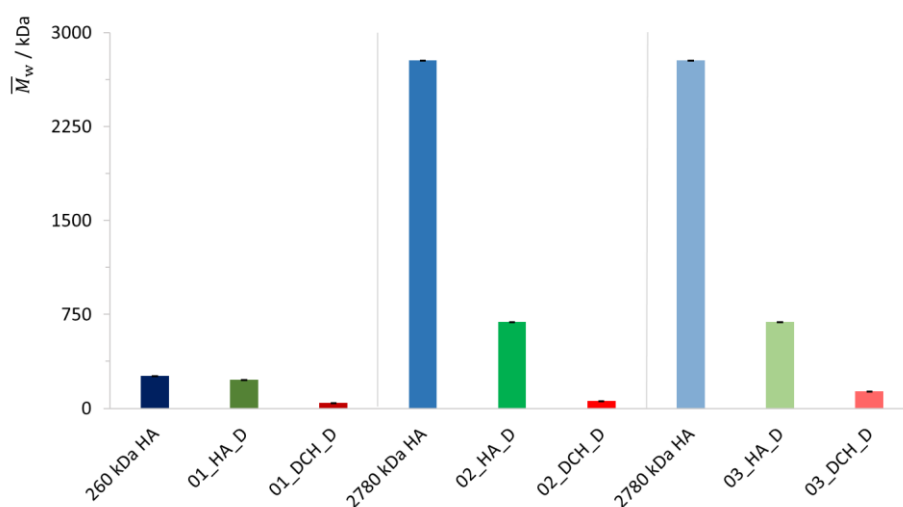


Obrázek 24: Stanovený teoretický polymerační stupeň DP a graftingové číslo G (a). Stupeň oxidace DO a stupeň substituce DS u oxidovaných konjugátů DCH-pNIPAM včetně DO parciálně oxidovaného vzorku 03\_DCH\_D (b).



## 10.2 Degradace molární hmotnosti produktů

Série obsahující pNIPAM nemohly být charakterizovány pomocí GPC, jelikož by mohlo dojít k zahřátí těchto vzorků v prostředí kolony, následnému vytvoření hydrogelových struktur a poškození kolony v podobě ucpání pórů ve stacionární fázi kolony. Molární hmotnosti byly proto stanoveny pro sérii D, která prošla všemi operacemi, ale nebyl na ni navázán pNIPAM. Vzorky série D byly rozpuštěny v mobilní fázi o koncentraci  $2,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  pro charakterizaci pomocí GPC metody. Z Obrázku 25 a Tabulky 7 lze vidět, že během pNIPAMace nízkomolární HA (série 01) dochází k zanedbatelné degradaci o hodnotě přibližně 12 %, a zároveň dochází ke zlepšení indexu neuniformity o necelých 6 %, avšak u vysokomolární HA dochází ke značné degradaci řetězce HA odpovídající hodnotě 75 % u série 02 i 03. Tato degradace je pravděpodobně způsobena díky dlouhodobému působení (5 dnů) slabě kyselého prostředí [68] během pNIPAMace, kdy může u HA docházet k protonaci glykosidických vazeb v řetězci a jejich následnému hydrolytickému rozštěpení. U vysokomolární HA dochází ke statisticky mnohem pravděpodobnějšímu štěpení makromolekul na více místech a následnému značnému poklesu molární hmotnosti oproti nízkomolární HA, kde je pravděpodobnost rozštěpení malých řetězců menší, protože je řetězec kratší. Tomu nasvědčuje i skutečnost, že index neuniformity u nízkomolární HA se zmenšil (Tabulka 7), ale u vysokomolární HA se u sérií 02 a 03 podstatně zvýšil, a tudíž dochází k náhodnému štěpení na různých místech makromolekuly HA.



Obrázek 25: Hmotnostní střed molární hmotnosti  $\bar{M}_w$  vstupních HA a produktů pNIPAMace a selektivní oxidace.

Degradace molární hmotnosti během selektivní oxidace je u obou vstupních materiálů přibližně stejně vysoká a odpovídá u plně oxidovaných produktů hodnotám v rozsahu <80–90> % a i u parciálně oxidovaných produktů dosahuje degradace  $\approx 80$  %. Zároveň u všech sérií dochází ke zvýšení uniformity molární hmotnosti (Tabulka 7). Tato degradace byla pozorována i u obdobně připravovaných DCH [18] při stejných reakčních parametrech. Vzhledem k požadovaným cílům této diplomové práce, tedy dosažení mikrorozměrných či nanorozměrných termoresponzivních oxidovaných konjugátů, je nízká molární hmotnost výsledných produktů pravděpodobně lepší, protože lze očekávat tvorbu menších náhodných klubek a vyšší tendenci k tvorbě uspořádaných (nano)struktur.

Tabulka 7: Přehled hmotnostních středů molární hmotnosti  $\bar{M}_w$  a indexů neuniformity  $X$  s odpovídajícími odchylkami  $\widehat{\sigma}_{\bar{M}_w}$  a  $\widehat{\sigma}_X$  pro odpovídající vstupní HA, produkty pNIPAMace a selektivní oxidace.

Název vzorku	$\bar{M}_w \pm \widehat{\sigma}_{\bar{M}_w}$	$X \pm \widehat{\sigma}_X$
260 kDa HA	259,3 $\pm$ 0,4	2,56 $\pm$ 0,01
01_HA_D	229,1 $\pm$ 0,3	2,41 $\pm$ 0,01
01_DCH_D	43,0 $\pm$ 0,1	2,02 $\pm$ 0,01
2780 kDa HA	2775,8 $\pm$ 0,5	3,81 $\pm$ 0,01
02_HA_D	690,9 $\pm$ 0,4	4,28 $\pm$ 0,01
02_DCH_D	60,5 $\pm$ 0,2	2,17 $\pm$ 0,01
2780 kDa HA	2775,8 $\pm$ 0,5	3,81 $\pm$ 0,01
03_HA_D	691,6 $\pm$ 0,3	5,15 $\pm$ 0,01
03_DCH_D	136,4 $\pm$ 0,4	2,33 $\pm$ 0,01

### 10.3 Velikost částic a stabilita oxidovaných konjugátů

Pro stanovení hydrodynamického průměru hydrogelových částic a jejich  $\zeta$  byly oxidované konjugáty rozpuštěny v UPW při koncentraci 0,05 mg·ml<sup>-1</sup>, přičemž dispergace hydrogelových částic v roztoku byla dosažena pomocí sonifikace v ledové lázni po dobu 2 min za 40% intenzity.

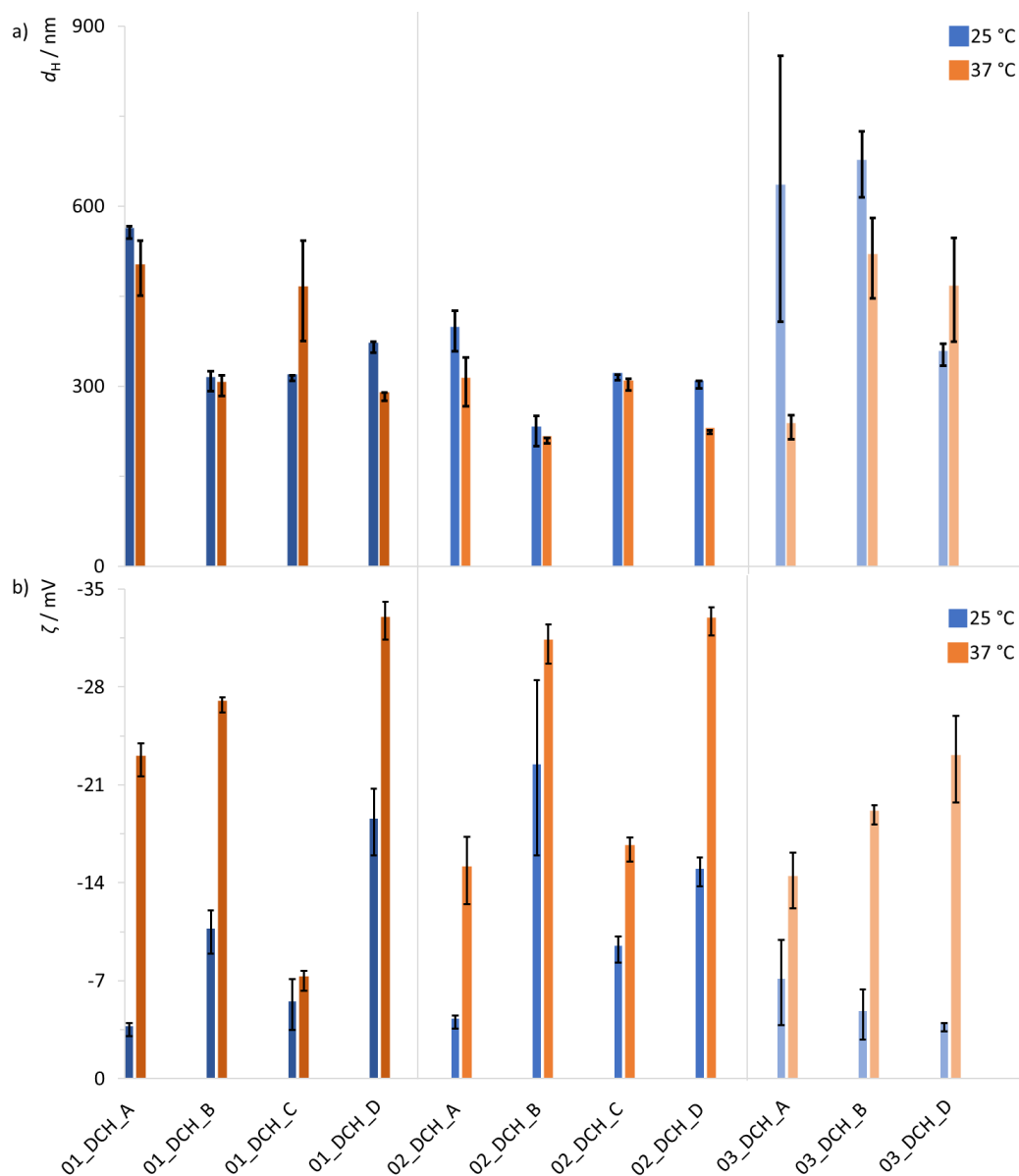
Z Obrázku 26a a Tabulky 8 je možné vidět, že při teplotě 25 °C u termoresponzivních konjugátů připravených z vysokomolární HA při úplné oxidaci dochází k vytvoření menších částic, než je tomu u termoresponzivních konjugátů připravených z nízkomolární HA. Částice z vysokomolární HA jsou i nepatrně

stabilnější oproti částicím z nízkomolární HA (Obrázek 26b). U termoresponzivních parciálně oxidovaných konjugátů (série 03) naopak dochází obecně ke zvětšení rozměrů těchto konjugátů při laboratorní teplotě, a to jak oproti nízkomolární HA (série 01), tak oproti HA o stejné vstupní molární hmotnosti (série 02).

Plně oxidované konjugáty s vyšším obsahem pNIPAMu (série B) vykazují nižší velikosti, a zároveň vyšší stabilitu částic při 25 °C i 37 °C oproti sérii A, která obsahuje méně pNIPAMu. Avšak u termoresponzivních parciálně oxidovaných konjugátů (série 03) je tomu přesně naopak, kdy jsou zpravidla při vyšším množství pNIPAMu hydrogelové částice větší než částice s menším obsahem pNIPAMu (03\_DCH\_B vs. 03\_DCH\_A), a zároveň při 25 °C jsou částice s vyšším obsahem pNIPAMu méně stabilní. Naopak nižší množství pNIPAMu vytvoří v kombinaci s parciální oxidací menší náhodné klubko s nepatrně vyšší stabilitou v rámci odchylek.

Vysokomolární pNIPAM má vliv na vytvoření malých částic jen v případě jeho vyššího množství (série B). Naopak výsledky série A jsou při porovnání s nízkomolárním pNIPAMem (série C) podobné. Nicméně vzorky série C vykazují nižší stabilitu oproti sérii B a také mnohem vyšší odchylky měření poukazující na vyšší polydisperzitu částic ze série C.

Na druhou stranu relativně nízkých velikostí dosahují vzorky, jenž neobsahují pNIPAM ve své struktuře.



Obrázek 26: Hydrodynamické průměry  $d_H$  konjugátů DCH-pNIPAM a DCH (série D) při 25 °C a 37 °C (a). Zeta potenciály  $\zeta$  konjugátů DCH-pNIPAM a DCH (série D) při 25 °C a 37 °C rozpuštěných v UPW (b).

Obecně lze říci, že po zvýšení teploty z 25 °C na 37 °C v rámci odchylek měření nedochází k očekávanému významnému poklesu velikostí částic napříč všemi sériemi kvůli smrštění řetězců pNIPAMu. U 01\_DCH\_C dokonce dochází k nárůstu velikosti částic. Nicméně u všech vzorků dochází po zahřátí k navýšení stability částic, kdy nejvyšší nárůst stability vykazují vzorky série D oproti vzorkům obsahujícím pNIPAM. U plně oxidovaných vzorků s pNIPAMem potom dochází k nejvyššímu nárůstu stability u 01\_DCH\_A, 01\_DCH\_B a 02\_DCH\_A.

Tabulka 8: Přehled hydrodynamických průměrů  $d_H$  a zeta potenciálů  $\zeta$  s odpovídajícími odchylkami  $\widehat{\sigma}_{d_H} / \widehat{\sigma}_{\zeta}$  pro odpovídající produkty pNIPAMace-selektivní oxidace při teplotách měření 25 °C a 37°C rozpuštěných v UPW.

Název vzorku	25 °C		37 °C	
	$\frac{d_H \pm \widehat{\sigma}_{d_H}}{\text{nm}}$	$\frac{\zeta \pm \widehat{\sigma}_{\zeta}}{\text{mV}}$	$\frac{d_H \pm \widehat{\sigma}_{d_H}}{\text{nm}}$	$\frac{\zeta \pm \widehat{\sigma}_{\zeta}}{\text{mV}}$
01_DCH_A	560 ± 10	-3,5 ± 0,5	500 ± 50	-22,8 ± 1,2
01_DCH_B	310 ± 20	-10 ± 2	300 ± 20	-26,7 ± 0,6
01_DCH_C	313 ± 5	-5 ± 2	460 ± 90	-7,0 ± 0,7
01_DCH_D	370 ± 10	-18 ± 3	283 ± 7	-32,7 ± 1,4
02_DCH_A	390 ± 40	-4,1 ± 0,5	310 ± 40	-15 ± 3
02_DCH_B	230 ± 30	-22 ± 7	209 ± 5	-31,1 ± 1,4
02_DCH_C	315 ± 5	-9,2 ± 1,0	300 ± 10	-16,4 ± 0,9
02_DCH_D	303 ± 6	-14,8 ± 1,1	224 ± 3	-32,7 ± 1,0
03_DCH_A	600 ± 300	-7 ± 3	230 ± 20	-14 ± 2
03_DCH_B	670 ± 60	-5 ± 2	510 ± 70	-18,9 ± 0,7
03_DCH_D	350 ± 20	-3,7 ± 0,3	460 ± 90	-23 ± 4

### 10.3.1 Důvody změny velikosti a stability konjugátů

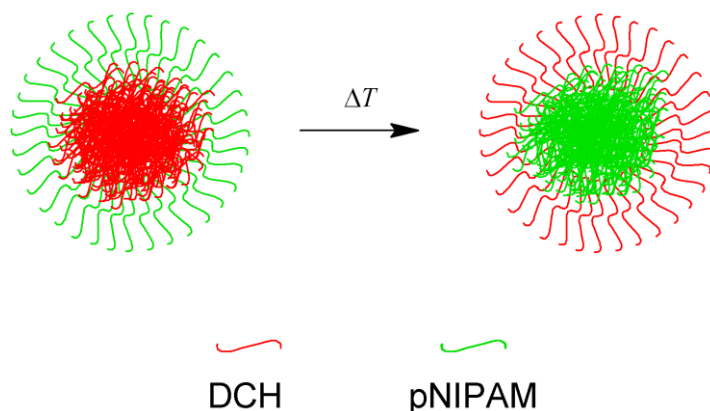
Na základě zjištěných výsledků lze předpokládat, že vzniklé částice DCH-pNIPAM se zřejmě formují ve vodném rozpouštědle při 25 °C do náhodného polymerního klubka, avšak po zahřátí na 37 °C dochází k reorientaci makromolekul takového klubka, přičemž nyní hydrofobní pNIPAM se pravděpodobně orientuje směrem do geometrického středu částic a hydrofilní karboxylové skupiny se orientují na povrchu částic. Tento závěr podporuje, kromě malé změny velikosti částic, také zvýšení hodnoty  $\zeta$  částic při vyšší teplotě. Při reorientaci pNIPAMu do středu částic se totiž na povrch dostává vyšší množství karboxylových skupin, zvyšuje se záporný náboj, a to vede k nárůstu absolutní hodnoty  $\zeta$  při 37 °C.

Toto nezvyklé chování je umožněno díky vyšší flexibilitě řetězců DCH v porovnání s HA. Při oxidaci totiž dochází k přerušení kovalentních vazeb mezi uhlíky C2 a C3 v D-glukoronové jednotce HA a makromolekula je v tomto místě ohebnější [19]. Toto chování také vysvětluje podstatný vliv stupně oxidace DCH na změnu velikosti částic patrný z Kapitoly 10.3. U parciálně oxidovaných konjugátů totiž k přerušení vazeb a „otevření“ některých D-glukoronových jednotek nedojde, a tudíž zůstávají zachovány méně ohebné – rigidnější segmenty v makromolekule.

Proto série 03 vykazuje větší částice s poměrně velkým hydrodynamickým průměrem (makromolekuly se nemohou jednoduše uspořádat do malých klubek) a nízkou stabilitou i navzdory vyššímu množství pNIPAMu. Při 37 °C pak nedochází k reorganizaci částic a reorientaci hydrofobních „sbalených“ řetězců pNIPAMu směrem do středu právě kvůli přítomnosti rigidních segmentů. Naopak u flexibilních segmentů plně oxidovaného konjugátu dochází k ochotnější tvorbě malých částic při vyšším množství navázaného pNIPAMu.

Dalším faktorem podporujícím teorii reorganizace částic je chování konjugátů série C. Nízkomolární pNIPAM totiž vytvořil malé částice jen u nízkomolární HA (01\_DCH\_C), jelikož u řetězců DCH s vyšší molární hmotností (02\_DCH\_C) nedochází k efektivní reorganizaci náhodného klubka, zřejmě kvůli nízkomolární povaze pNIPAMu, jehož hydrofobicita není dostatečná k překonání volného objemu DCH řetězců a vytvoření pomyslného jádra částice termoresponzivního oxidovaného konjugátu.

Ve výsledku tedy lze konstatovat, že po zvýšení teploty nad LCST u plně oxidovaných konjugátů obsahujících pNIPAM nedochází ke změně velikosti pravděpodobně kvůli flexibilním řetězcům DCH ve spojení s reorganizací vnitřních struktur nanočástic. Zatímco při 25 °C je polymerní klubko u těchto konjugátů orientováno náhodně bez významnějších interakcí vyvolávajících smrštění tohoto klubka, po zahřátí nad LCST (37 °C) dojde ke zvýšení hydrofobicity pNIPAMu a k jeho reorientaci do pomyslného středu termoresponzivního oxidovaného konjugátu díky hydrofobním silám, přičemž hydrofilní karboxylové skupiny směřují do vodného prostředí (Obrázek 27). Takto dojde k reorganizaci konjugátu DCH-pNIPAM, aniž by došlo k významné změně velikosti.



Obrázek 27: Ilustrace možného teplotního přechodu (reorganizace) konjugátů DCH-pNIPAM.

## 10.4 Stanovení LCST

Pro stanovení LCST byly plně oxidované konjugáty rozpuštěny v UPW o koncentraci  $20 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ , přičemž byla sledována závislost komplexní viskozity na rostoucí teplotě na rotačním reometru při 1% deformaci vzorku, frekvenci  $0,1 \text{ Hz}$  při rychlosti ohřevu  $0,5 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ . U termoresponzivních plně oxidovaných konjugátů byly pozorovány rozdílné LCST (Tabulka 9), přičemž u vzorků série C nebyla LCST stanovena, protože nebyl pozorován dostatečně výrazný nárůst komplexní viskozity v závislosti na teplotě. U vzorků série D nedochází k žádnému nárůstu viskozity během rostoucí teploty, a tudíž viskoelastické změny způsobuje přítomnost pNIPAMu (Obrázek 28).

Tabulka 9: Přehled LCST pro plně oxidované konjugáty DCH-pNIPAM stanovené z rotační reometrie.

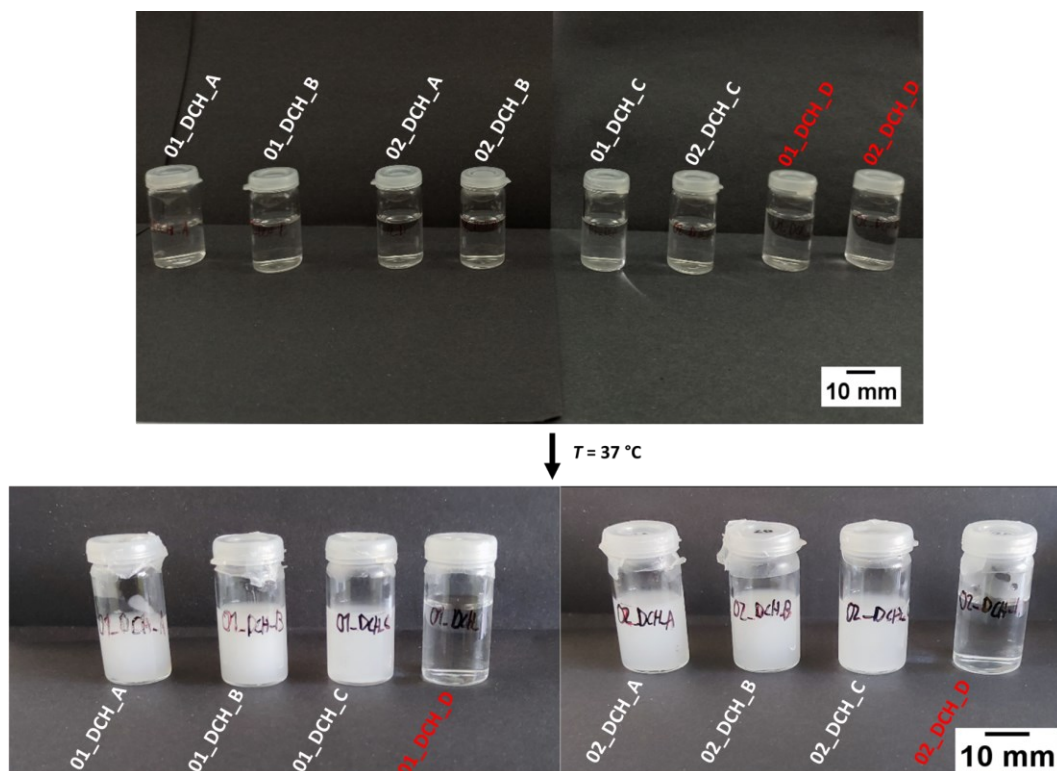
Název vzorku	$\frac{\text{LCST}}{^\circ\text{C}}$
01_DCH_A	$31,1 \pm 0,1$
01_DCH_B	$33,0 \pm 0,1$
02_DCH_A	$31,6 \pm 0,2$
02_DCH_B	$31,3 \pm 0,2$



Obrázek 28: Závislost komplexní viskozity  $\eta^*$  na rostoucí teplotě  $T$  pro plně oxidované konjugáty (parametry měření:  $c = 20 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ;  $\gamma = 1 \%$ ,  $f = 0,1 \text{ Hz}$ ,  $\Delta T = 0,5 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ).

Pro vizuální důkaz termoresponzivity vzniklých oxidovaných konjugátů byly rozpuštěné vzorky z reologického měření zahřáty z laboratorní teploty na  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  v inkubátoru (Obrázek 29). Tato teplota byla zvolena, jelikož simuluje teplotu lidského těla. Rozpuštěné oxidované konjugáty obsahující pNIPAM se zakalily, zatímco vzorky ze série D žádné zakalení nevykazovaly. Jde tedy o další důkaz úspěšné přípravy termoresponzivních derivátů DCH.



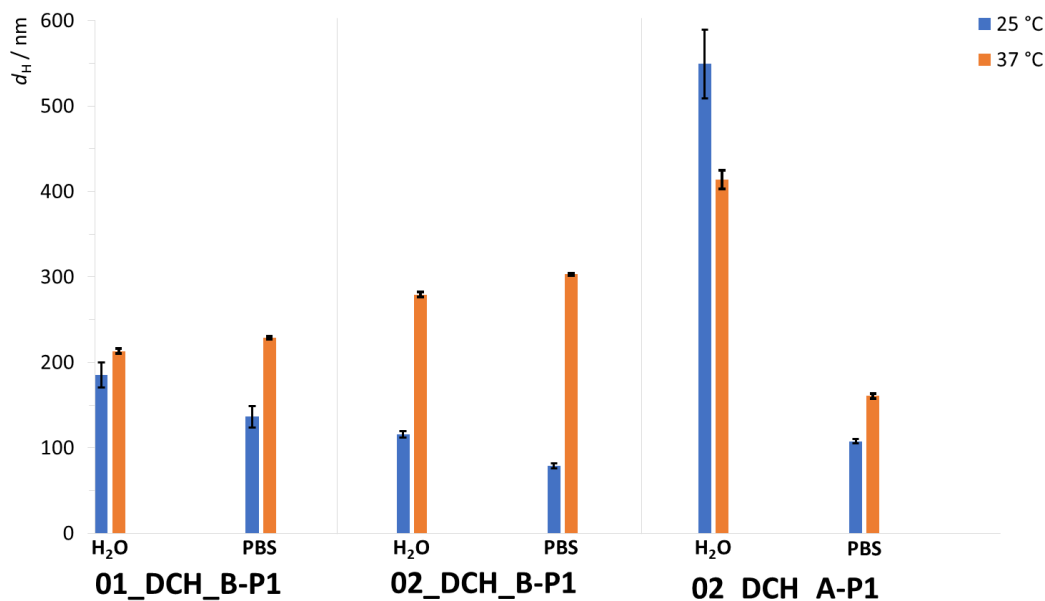


Obrázek 29: Vizuální důkaz termoresponsivity konjugátů DCH-pNIPAM, červeně jsou vzorky neobsahující pNIPAM.

## 10.5 Vliv reakčních parametrů na velikost částic a PDI konjugátů DCH-pNIPAM s navázaným PhPt

Na základě dat získaných v Kapitole 10.3 byly pro loading PhPt vybrány 3 vzorky vzhledem k jejich velikostem a stabilitě při 25 °C a 37 °C v UPW. U vybraných konjugátů DCH-pNIPAM, tj. 01\_DCH\_B, 02\_DCH\_B a 02\_DCH\_A (série P1) byl proveden loading PhPt (Kapitola 9.3), přičemž produkty této reakce byly rozpuštěny o koncentraci 5 mg·ml<sup>-1</sup> a dispergovány pomocí sonifikace v ledové lázni po dobu 2 min při 40% intenzitě v UPW i ve fosfátem pufrované soli o pH = 7,4 (PBS 7,4). Zde je nutné uvést, že vzhledem k hydrofobicitě velkého phenanthridinového ligandu se předpokládá, že by se PhPt měl nacházet v jádře vzniklých částic, což je u léčiv na bázi platiny a derivátů HA dobře zdokumentované chování [69].

Termoresponzivní oxidované konjugáty s navázaným platinovým léčivem série P1 při 25 °C v PBS 7,4 vykazovaly nižší velikosti částic než v UPW (Obrázek 30), což by mohlo být způsobeno přítomností fosforečnanů v PBS 7,4, které se řadí mezi kosmotropní anionty stabilizující strukturu HA [51].



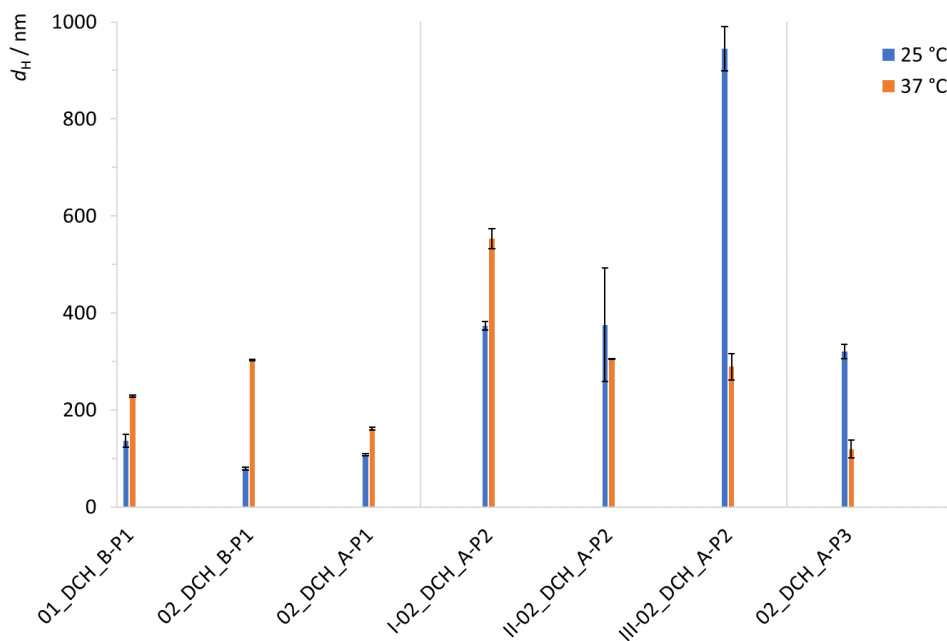
Obrázek 30: Hydrodynamický průměr  $d_H$  u konjugátů DCH-pNIPAM s navázaným PhPt ze série P1 rozpuštěných v UPW (H<sub>2</sub>O) a fosfátovém pufované soli o pH = 7 (PBS 7,4) o koncentraci 0,05 mg·ml<sup>-1</sup> při teplotách měření 25 °C a 37 °C.

Avšak po zvýšení teploty na 37 °C dochází ke zvětšení velikosti těchto konjugátů, což by mohlo být způsobeno (částečným) vypuzením PhPt z nitra konjugátů na jejich povrch a uvnitř může docházet ke koncentraci pNIPAMu. Při zvýšení teploty rovněž vykazují tyto konjugáty v PBS 7,4 nižší hodnoty PDI, tj. částice konjugátů DCH-pNIPAM s navázaným PhPt série P1 vykazují vyšší míru uniformity (Tabulka 10). Při 25 °C v prostředí PBS 7,4 dosahuje nejmenšího hydrodynamického průměru o velikosti  $(79 \pm 3)$  nm vzorek 02\_DCH\_B-P1 (Tabulka 10), ale při teplotě 37 °C u něj dochází k relativně vysokému nárůstu velikosti až na přibližně 300 nm, což je nežádoucí. Nejnižší hodnota hydrodynamického průměru ( $161 \pm 3$ ) nm v PBS při teplotě 37 °C je u vzorku 02\_DCH\_A-P1. Pro plánované aplikace je tato teplota stěžejní, jelikož tato teplota a složení prostředí je blízké lidskému tělu. Tento vzorek také vykazuje nejnižší PDI, pouze 0,141, a také nejmenší změnu objemu, což indikuje menší míru reorganizace nanočástic.

Tabulka 10: Přehled hydrodynamických průměrů  $d_H$  a indexu polydisperzity částic PDI s odpovídajícími odchylkami  $\widehat{\sigma}_{d_H}$  a  $\widehat{\sigma}_{PDI}$  pro oxidované termoresponzivní konjugáty s navázaným PhPt ze série P1 při teplotách měření 25 °C a 37 °C v rozdílných rozpouštědlech: voda (H<sub>2</sub>O) a fosfátem pufované soli o pH = 7,4 (PBS 7,4) .

Název vzorku	Rozpouštědlo	25 °C		37 °C	
		$\frac{d_H \pm \widehat{\sigma}_{d_H}}{\text{nm}}$	$\frac{PDI \pm \widehat{\sigma}_{PDI}}{1}$	$\frac{d_H \pm \widehat{\sigma}_{d_H}}{\text{nm}}$	$\frac{PDI \pm \widehat{\sigma}_{PDI}}{1}$
01_DCH_B-P1	H <sub>2</sub> O	190 ± 20	0,360 ± 0,009	213 ± 3	0,357 ± 0,007
	PBS 7,4	136 ± 13	0,76 ± 0,07	228,7 ± 1,9	0,141 ± 0,006
02_DCH_B-P1	H <sub>2</sub> O	116 ± 4	0,322 ± 0,005	279 ± 3	0,401 ± 0,006
	PBS 7,4	79 ± 3	0,52 ± 0,03	303,2 ± 1,3	0,129 ± 0,006
02_DCH_A-P1	H <sub>2</sub> O	550 ± 40	0,411 ± 0,012	414 ± 11	0,34 ± 0,03
	PBS 7,4	108 ± 3	0,55 ± 0,08	161 ± 3	0,124 ± 0,012

Jako další byl zkoumán vliv různých reakčních parametrů a dialýzy (teplota, médium) na loading PhPt (série P2). Nejnižší hydrodynamický průměr pro obě teploty byl pozorován u vzorku II-02\_DCH\_A-P2 (Obrázek 31 a Tabulka 11), přičemž jako stěžejní byla brána velikost při teplotě 37 °C.



Obrázek 31: Hydrodynamický průměr  $d_H$  u termoresponzivních oxidovaných konjugátů s navázaným PhPt ze sérií P1–P3 rozpuštěných ve fosfátovém pufované soli o pH = 7 při teplotách měření 25 °C a 37 °C.

Stěžejní reakční parametry vzorku II-02\_DCH\_A-P2 (teplota loadingu a dialýzy byla 25 °C, dialýza 4 hod v UPW) byly použity pro sérii P3, zahrnující nastavení pH prostředí PhPt a konjugátu DCH-pNIPAM na neutrální

hodnotu 7. U odpovídajícího vzorku této série, tj. 02\_DCH\_A-P3 byl hydrodynamický průměr při 37 °C v PBS 7,4 nejnižší z termoresponzivních oxidovaných konjugátů s navázaným PhPt, a to  $(119 \pm 19)$  nm. Nicméně polydisperzita tohoto systému byla při 37 °C nejvyšší ze všech vybraných, a to  $(0,40 \pm 0,06)$ , přičemž docházelo k relativně vysoké změně velikosti v porovnání s 25 °C.

Tabulka 11: Celkový přehled hydrodynamických průměrů  $d_H$  a indexu polydisperzity částic PDI s odpovídajícími odchylkami  $\widehat{\sigma}_{d_H}$  a  $\widehat{\sigma}_{PDI}$  pro termoresponzivní oxidované konjugáty s navázaným PhPt ze sérií P1–P3 při teplotách měření 25 °C a 37°C rozpuštěných ve fosfátem pufované soli o pH = 7,4 (PBS 7,4).

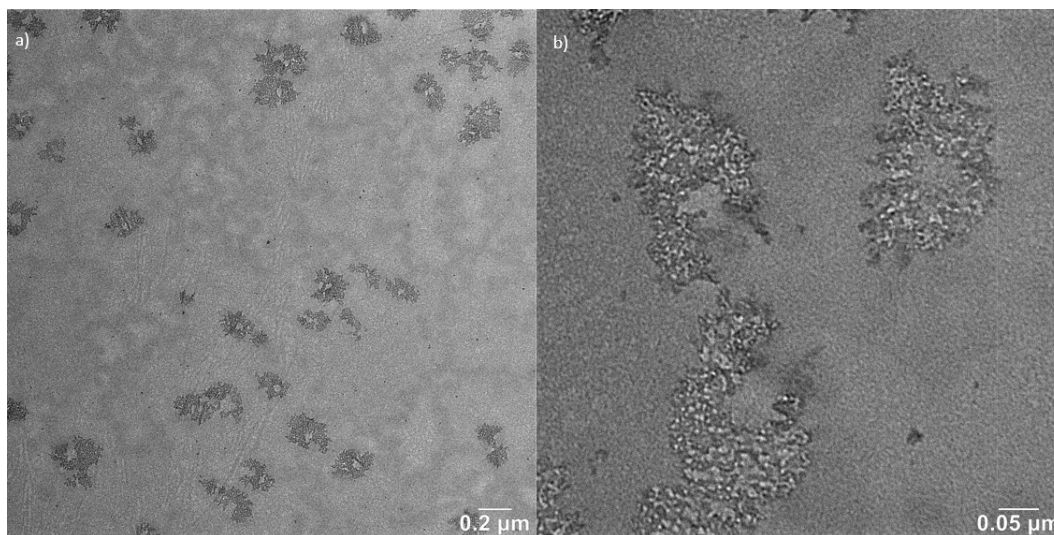
Název vzorku	25 °C		37 °C	
	$\frac{d_H \pm \widehat{\sigma}_{d_H}}{\text{nm}}$	$\frac{PDI \pm \widehat{\sigma}_{PDI}}{1}$	$\frac{d_H \pm \widehat{\sigma}_{d_H}}{\text{nm}}$	$\frac{PDI \pm \widehat{\sigma}_{PDI}}{1}$
01_DCH_B-P1	$136 \pm 13$	$0,76 \pm 0,07$	$228,7 \pm 1,9$	$0,141 \pm 0,006$
02_DCH_B-P1	$79 \pm 3$	$0,52 \pm 0,03$	$303,2 \pm 1,3$	$0,129 \pm 0,006$
02_DCH_A-P1	$108 \pm 3$	$0,55 \pm 0,08$	$161 \pm 3$	$0,124 \pm 0,012$
I-02DCH_A-P2	$373 \pm 9$	$0,391 \pm 0,005$	$550 \pm 20$	$0,315 \pm 0,013$
II-02DCH_A-P2	$380 \pm 120$	$0,997 \pm 0,004$	$304,9 \pm 1,0$	$0,23 \pm 0,02$
III-02DCH_A-P2	$940 \pm 50$	$0,94 \pm 0,04$	$290 \pm 30$	$0,37 \pm 0,04$
02_DCH_A-P3	$321 \pm 15$	$0,90 \pm 0,10$	$119 \pm 19$	$0,40 \pm 0,06$

## 10.6 TEM analýza

Pro TEM analýzu byly vybrány vzorky dosahující nejlepších parametrů v daných sériích, tedy termoresponzivní oxidovaný konjugát bez navázaného PhPt (02\_DCH\_A) a tentýž konjugát s navázaným PhPt (02\_DCH\_A-P3). Vzorky byly rozpuštěny v UPW o koncentraci  $0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  a dispergovány pomocí sonifikace v ledové lázni po dobu 2 min, 40% intenzitě bez pulzu. Koloidy byly nakápnuty na TEM terče, přičemž vzorek 02\_DCH\_A byl vysušen pouze při laboratorní teplotě a vzorek 02\_DCH\_A-P3 byl vysušen při laboratorní teplotě a při 40 °C v sušárně. Urychlovací napětí mikroskopu bylo 15 kV.

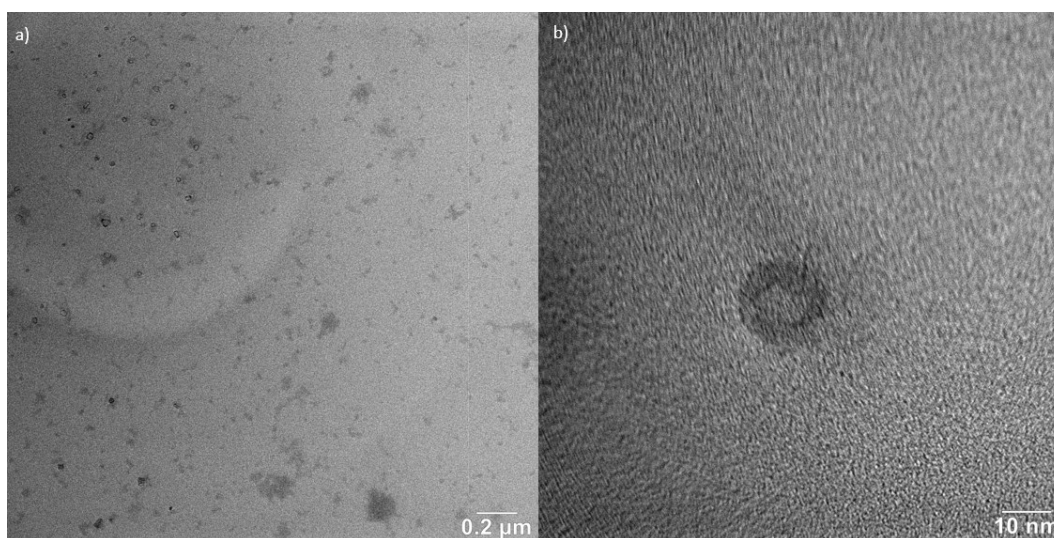
Na Obrázku 32a lze vidět nepravidelné struktury termoresponzivního oxidovaného konjugátu 02\_DCH\_A. V detailu snímku TEM (Obrázek 32b) lze ale vidět i malé částice o rozměru přibližně 20 nm, které jsou agregovány do vyšších struktur tvořících vzorek 02\_DCH\_A. Některé útvary dosahují velikosti až 300 nm, což zhruba odpovídá výsledkům měření z DLS při 25 °C v rámci odchylek. Malý

rozdíl od DLS je způsobeno vysušením vzorku před analýzou TEM. Během DLS měření je vzorek hydratovaný a zahrnuje také iontovou korunu, tudíž se jeví nepatrně větší.



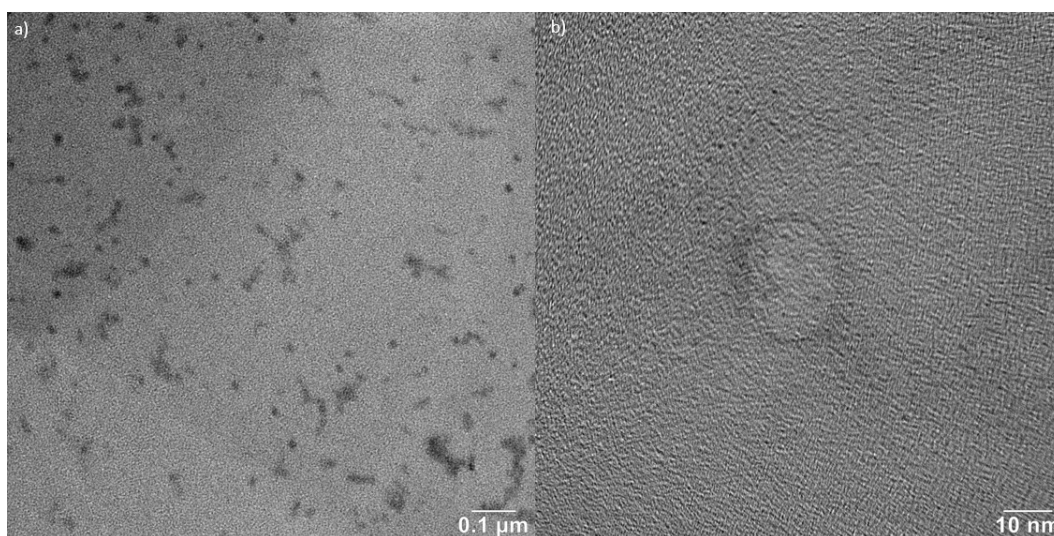
Obrázek 32: Snímky z TEM termoresponzivního oxidovaného konjugátu (02\_DCH\_A) vysušeného při 25 °C.

Na Obrázku 33a lze vidět termoresponzivní oxidovaný konjugát s navázaným PhPt (02\_DCH\_A-P3) vysušený při 25 °C. Je zde možné pozorovat vyšší uniformitu částic v porovnání se vzorkem 02\_DCH\_A. Nicméně tvary těchto částic jsou opět spíše nepravidelné, kde však lze vidět uvnitř těchto tvarů tmavé zbarvení, které pravděpodobně odpovídá platině. Na Obrázku 33b je možné vidět detail jedné nanočástice s kulovitým tvarem o rozměru přibližně 10 nm. Ve středu této částice je možné vidět pravidelnou mřížkovou strukturu o rozměru nižším než 10 nm.



Obrázek 33: Snímky z TEM termoresponzivního oxidovaného konjugátu s navázaným PhPt (02\_DCH\_A-P3) vysušeného při 25 °C.

Na Obrázku 34a je vidět struktura částic termoresponzivního oxidovaného konjugátu (02\_DCH\_A-P3) vysušeného při 40 °C. I po zahřátí nad LCST vzniklé částice nemají po vysušení pravidelnou strukturu. To je možná způsobeno tím, že částice jsou vnitřně síťovány pouze slabými interakcemi, a při jejich sušení dochází k nepravidelnému zborcení struktury. Přítomnost tmavých míst uvnitř částic zmíněného konjugátu opět odpovídá přítomnosti platiny. Na Obrázku 34b je možné vidět detail jedné z částic konjugátu 02\_DCH\_A-P3, přičemž tato částice dosahuje rozměrů necelých 20 nm.



Obrázek 34: Snímky z TEM termoresponzivního oxidovaného konjugátu s navázaným PhPt (02\_DCH\_A-P3) vysušeného při 40 °C.

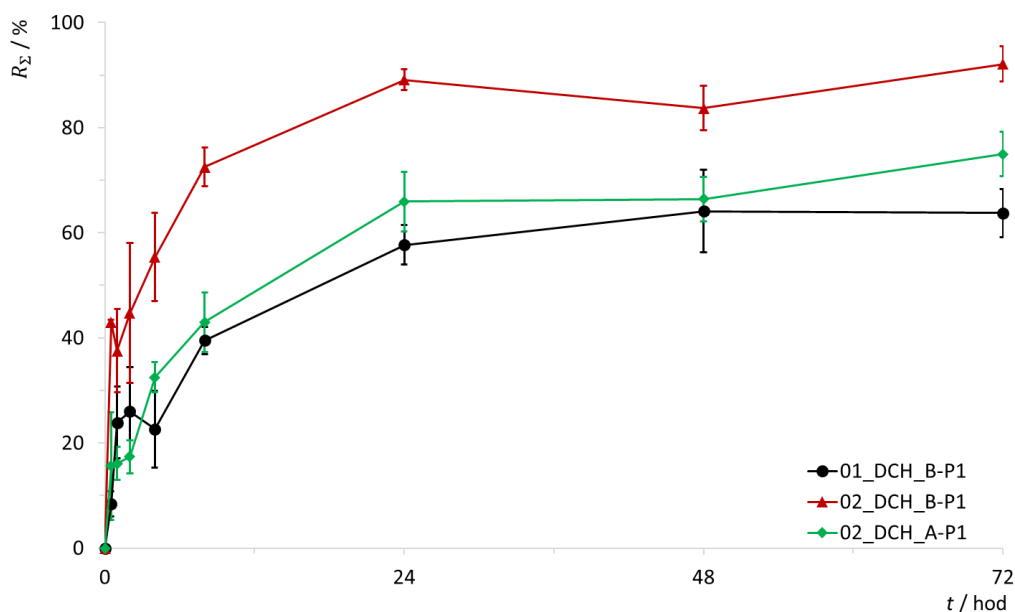
## 10.7 Uvolňování PhPt z konjugátů DCH-pNIPAM a DCH

Uvolňování PhPt z konjugátů DCH-pNIPAM a DCH bylo provedeno v podmínkách simulujících prostředí *in vitro*. Každý vzorek byl rozpuštěn o koncentraci  $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  v PBS 7,4 a dispergován pomocí sonifikace v ledové lázni po dobu 2 min při 40% intenzitě. Připravený koloid byl převeden do dialyzační membrány s 3,5 kDa MWCO, jež byla vložena do stejného média o objemu 95 ml. Uvolňování probíhalo za absence světla při teplotě 37 °C a 100 RPM třepání v inkubátoru, kdy v daných časech {0,5; 1; 2; 4; 8; 24; 48; 72} hod byly odebrány alikvótní podíly z dialyzátu o objemu 5 ml, a zároveň odebrané podíly byly nahrazeny čistým PBS 7,4, aby výsledný objem celého systému (retenát + dialyzát) vždy činil 100 ml. Odebrané podíly v daných časech byly charakterizovány pomocí XRF metody.

Uvolňování PhPt z konjugátů DCH-pNIPAM série P1 lze vidět na Obrázku 35 a celkový přehled uvolňování PhPt včetně efektivity loadingu této látky je zaznačen

v Tabulce 12. Nejpomalejší uvolňování probíhá z 01\_DCH\_B a z 02\_DCH\_A, tj. ze vzorků, jejichž změna velikosti po zahřátí byla relativně nízká. Efektivita loadingu se u těchto vzorků pohybují v intervalu <85–95> %. Naopak vzorek 02\_DCH\_B-P1 vykazuje efektivitu loadingu ( $81,4 \pm 0,3$ ) % a rychlé uvolňování PhPt. Možným důvodem, proč dochází k tak rychlému uvolňování platinového léčiva z 02\_DCH\_B-P1, je zřejmě velká změna velikosti částic z 25 °C na 37 °C, související zřejmě s reorganizací částic, vypuzením PhPt na povrch a intenzivním uvolněním PhPt v brzkých časech procesu uvolňování.

Vzhledem k relativně pomalému uvolňování, vysoké efektivitě loadingu a malému hydrodynamickému průměru v PBS 7,4 při 37 °C (Obrázek 35) byla další pozornost věnována konjugátu 02\_DCH\_A, který se jeví jako nejvhodnější.

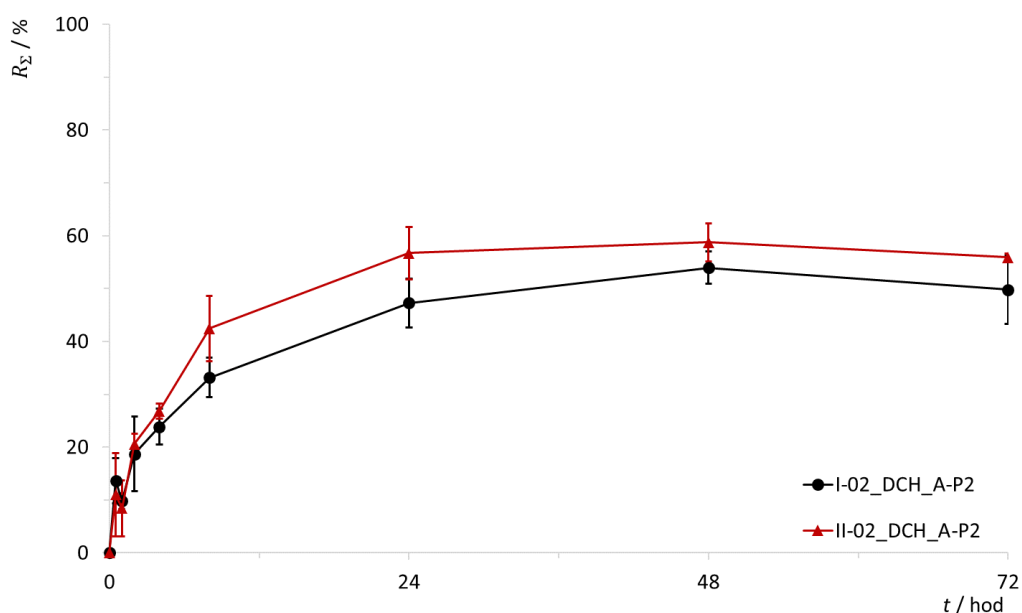


Obrázek 35: Kumulativní uvolňování  $R_{\Sigma}$  PhPt v závislosti na čase  $t$  pro vzorky série P1.

Uvolňování PhPt ze vzorků série P2 je možné vidět na Obrázku 36 a celkový přehled je v Tabulce 12. Vzorek III-03\_DCH\_A-P2 uvedený není, protože jeho efektivita loadingu dosáhla necelých 15 %, přičemž u tohoto vzorku pravděpodobně nedošlo k efektivnímu navázání PhPt. Efektivita loadingu u ostatních vzorků série se pohybují nad 90 %.

U vzorků I-02\_DCH\_A-P2 a II-02\_DCH\_A-P2 dochází k podobně pomalému uvolňování PhPt v rámci odchylek, avšak velikost částic II-02\_DCH\_A-P2 je při teplotě 37 °C nižší než u částic I-02\_DCH\_A-P2 (Tabulka 11). Vzhledem k velikosti částic, jejich indexu polydisperzity a relativně pomalému uvolňování PhPt je nejlepším

ze série P2 vzorek II-02\_DCH\_A-P2 a postup jeho přípravy byl využit pro další optimalizaci loadingu v sérii P3.

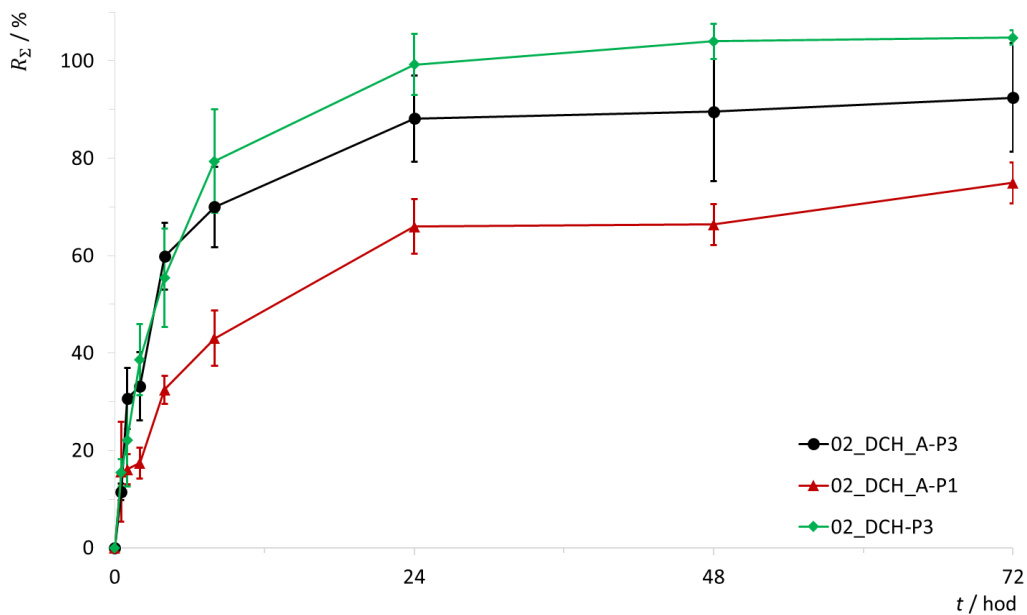


Obrázek 36: Kumulativní uvolňování  $R_{\Sigma}$  PhPt v závislosti na čase  $t$  pro vzorky série P2.

Nastavením hodnoty pH prostředí aktivovaného PhPt a nosiče na hodnotu 7 byl připraven vzorek 02\_DCH\_A-P3 s efektivitou loadingu ( $81,3 \pm 0,9$ ) %. Uvolňování PhPt z tohoto termoresponzivního oxidovaného konjugátu bylo porovnáno s uvolňováním platinového léčiva z nosiče 02\_DCH-P3, jež byl připraven dle stejného postupu loadingu jako vzorek 02\_DCH\_A-P3, ale neobsahoval pNIPAM. Zároveň pro lepší srovnání je v grafu Obrázku 37 uvedeno uvolňování PhPt z 02\_DCH\_A-P1. V grafu je patrné stejně rychlé uvolňování PhPt z 02\_DCH\_A-P3 jako z pNIPAMem nemodifikované DCH v rámci odchylek. Nicméně prvotně připravený 02\_DCH\_A-P1 vykazuje daleko pomalejší uvolňování platinového léčiva oproti 02\_DCH\_A-P3. Důvodem je zřejmě nastavované pH prostředí během loadingu u vzorků série P3, kdy dochází ke ztrátě aktivovaných PhPt komplexů, tj. aqua ligandy jsou nahrazeny při zvyšování pH za hydroxylové anionty z vodného prostředí, které PhPt opět „pasivují“ vůči reakci s karboxylovými skupinami nosiče. To vede k vyššímu podílu iontově vázaného PhPt, který je z nosiče uvolněn rychleji než v případě jeho kovalentního navázání.



I přes potlačenou aktivaci PhPt je hydrodynamický průměr vzorku 02\_DCH\_A-P3 nejmenší ze všech termoresponzivních oxidovaných konjugátů s navázaným PhPt měřených v PBS 7,4, avšak jeho index polydisperzity je poměrně vysoký. Díky malým rozměrům částic a relativně pomalému uvolňování lze vzorky 02\_DCH\_A-P1 a 02\_DCH\_A-P3 považovat za vhodné pro potenciální biologické testování na rakovinových liniích *in vitro*.



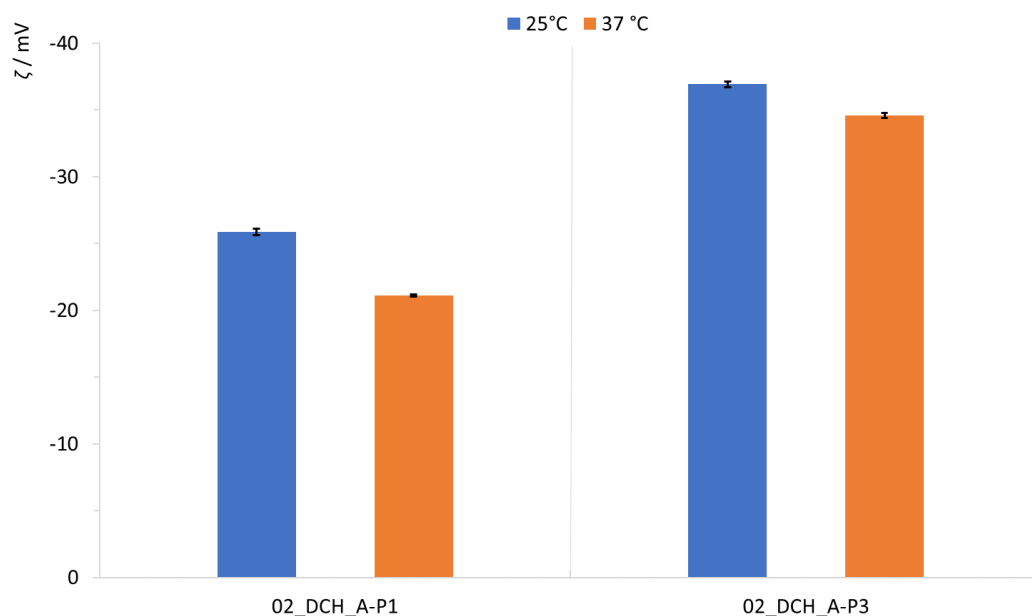
Obrázek 37: Kumulativní uvolňování  $R_{\Sigma}$  PhPt v závislosti na čase  $t$  pro vzorek 02\_DCH\_A-P3 při porovnání uvolňování PhPt z 2,3-dikarboxyhyaluronové kyseliny (02\_DCH-P3) a z 02\_DCH\_A-P1.

Tabulka 12: Přehled efektivity loadingu  $\eta_L$ , kumulativního uvolňování  $R_\Sigma$  s odpovídající odchylkou  $\widehat{\sigma}_{R_\Sigma}$  v daných časech odběru uvolněného platinového léčiva u produktů loadingu.

Název vzorku	01_DCH_B-P1	02_DCH_B-P1	02_DCH_A-P1	I-02_DCH_A-P2	II-02_DCH_A-P2	02_DCH_A-P3	02_DCH-P3
$\frac{\eta_L}{\%}$	85,6 ± 0,3	81,4 ± 0,3	93,8 ± 0,7	93,2 ± 1,3	99,6 ± 1,2	81,3 ± 0,9	80,0 ± 0,7
$\frac{R_{\Sigma 0,5 h} \pm \widehat{\sigma}_{R_{\Sigma 0,5 h}}}{\%}$	8 ± 3	43 ± 0,6	16 ± 11	14 ± 5	11 ± 8	11 ± 2	15 ± 3
$\frac{R_{\Sigma 1 h} \pm \widehat{\sigma}_{R_{\Sigma 1 h}}}{\%}$	24 ± 7	38 ± 8	16 ± 4	10 ± 2	8 ± 6	31 ± 7	22 ± 10
$\frac{R_{\Sigma 2 h} \pm \widehat{\sigma}_{R_{\Sigma 2 h}}}{\%}$	26 ± 9	45 ± 14	17 ± 4	19 ± 7	21 ± 2	33 ± 7	39 ± 8
$\frac{R_{\Sigma 4 h} \pm \widehat{\sigma}_{R_{\Sigma 4 h}}}{\%}$	23 ± 8	55 ± 9	33 ± 3	24 ± 4	27 ± 2	60 ± 7	56 ± 10
$\frac{R_{\Sigma 8 h} \pm \widehat{\sigma}_{R_{\Sigma 8 h}}}{\%}$	40 ± 3	73 ± 4	43 ± 6	33 ± 4	42 ± 7	70 ± 9	80 ± 11
$\frac{R_{\Sigma 24 h} \pm \widehat{\sigma}_{R_{\Sigma 24 h}}}{\%}$	58 ± 4	89 ± 2	66 ± 7	47 ± 5	57 ± 5	88 ± 9	99 ± 7
$\frac{R_{\Sigma 48 h} \pm \widehat{\sigma}_{R_{\Sigma 48 h}}}{\%}$	64 ± 8	84 ± 5	66 ± 5	54 ± 3	59 ± 4	90 ± 15	104 ± 4
$\frac{R_{\Sigma 72 h} \pm \widehat{\sigma}_{R_{\Sigma 72 h}}}{\%}$	64 ± 5	92 ± 4	75 ± 5	50 ± 7	55,9 ± 0,8	93 ± 12	104,8 ± 1,5

Jako poslední bylo provedeno stanovení stability v podobě  $\zeta$  pro vzorky rozpuštěné v UPW o koncentraci 0,05 mg·ml<sup>-1</sup>, přičemž vzorky byly dispergovány pomocí sonifikace v ledové lázni po dobu 2 min a 40% intenzity. V PBS 7,4 měření nebylo možné provést, jelikož by díky iontovému prostředí mohlo dojít k poškození a znehodnocení elektrod měřící kyvety/cely. Naměřené hodnoty  $\zeta$  při 25 °C a 37 °C je možné vidět na Obrázku 38 a v Tabulce 13. Absolutní hodnota  $\zeta$  vzorku 02\_DCH\_A-P1 je při 25 °C nižší než u vzorku ze série P3 a po zahřátí na 37 °C dojde ještě ke snížení této hodnoty. To odpovídá předpokládanému vyššímu podílu kovalentního vázání PhPt u vzorku ze série P1 oproti vzorku ze série P3, u kterého je absolutní hodnota  $\zeta$  vyšší, pravděpodobně v důsledku vyššího podílu volných karboxylových skupin, a snížení  $\zeta$  není tolik významné. V obou případech lze ale konstatovat, že stabilita částic je dostatečná pro jejich zamýšlené aplikace, protože

nebyl pozorován významný nárůst jejich velikostí, a tedy ani agregace, a to ani v PBS 7,4, které do značné míry simuluje iontové prostředí krve či mízy.



Obrázek 38: Zeta-potenciál  $\zeta$  vybraných konjugátů DCH-pNIPAM s navázaným PhPt měřené v UPW při 25 °C a 37 °C.

Tabulka 13: Konkrétní hodnoty zeta potenciálu  $\zeta$  s odpovídajícími odchylkami  $\widehat{\sigma}_{\zeta}$  pro nejvhodnější termoresponzivní oxidované konjugáty s navázaným PhPt při 25 °C a 37 °C v UPW.

Název vzorku	25 °C	37 °C
	$\frac{\zeta \pm \widehat{\sigma}_{\zeta}}{\text{mV}}$	$\frac{\zeta \pm \widehat{\sigma}_{\zeta}}{\text{mV}}$
O2_DCH_A-P1	-25,9 ± 0,3	-21,13 ± 0,08
O2_DCH_A-P3	-36,9 ± 0,3	-35,2 ± 0,2

## ZÁVĚR

Tato práce se zabývala přípravou termoresponzivních nanogelů a mikrogelů na bázi 2,3-dikarboxyhyaluronové kyseliny s potenciálním využitím pro přenos protinádorového léčiva dusičnanu *cis*-diammin-dichloro-phenanthridinplatnatého (PhPt). Podařilo se připravit konjugáty kyseliny hyaluronové a poly(N-isopropylakrylamidu) (pNIPAM) pomocí biokonjugační reakce za pomoci aktivačního činidla chloridu 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinia, přičemž tyto konjugáty byly dále oxidovány pomocí regioselektivní oxidace.

Byla zkoumána degradace molární hmotnosti produktů napříč všemi dílčími reakcemi, a zároveň byl sledován vliv různých reakčních parametrů na výsledné velikosti a stabilitu termoresponzivních oxidovaných konjugátů stanovených pomocí hydrodynamického průměru a zeta-potenciálu. Zároveň byla stanovena LCST pro plně oxidované termoresponzivní konjugáty –  $LCST_{01\_DCH\_A} = (31,1 \pm 0,1) ^\circ C$ ;  $LCST_{01\_DCH\_B} = (33,0 \pm 0,1) ^\circ C$ ;  $LCST_{02\_DCH\_A} = (31,6 \pm 0,2) ^\circ C$  a  $LCST_{02\_DCH\_B} = (31,3 \pm 0,2) ^\circ C$ . Ze vzniklých produktů byly vybrány 3 vhodné termoresponzivní oxidované konjugáty – 01\_DCH\_B, 02\_DCH\_B a 02\_DCH\_A, které vykazovaly uspokojivé malé velikosti i zvýšenou stabilitu, a byly loadovány PhPt.

U těchto vybraných konjugátů DCH-pNIPAM s navázaným PhPt byl sledován vliv dvou různých médií – vody a fosfátem pufrované soli o  $pH = 7$  (PBS 7,4). Druhé médium lépe reprezentuje biologické podmínky a také se projevilo jako vhodné z hlediska dosažení malých rozměrů vzniklých termoresponzivních oxidovaných konjugátů s navázaným platinovým léčivem. V tomtéž rozpouštědle probíhalo uvolňování PhPt z vybraných vzorků.

Pomocí TEM analýzy bylo zjištěno, že částice konjugátu 02\_DCH\_A jsou nepravidelné a distribuce jejich velikosti široká, avšak po loadingu u 02\_DCH\_A-P3 dojde ke zvýšení uniformity výsledných částic tohoto termoresponzivního oxidovaného konjugátu s navázaným PhPt, přičemž je možné pozorovat i kulovité částice vzniklého nanogelu.

Vzorek 02\_DCH\_A-P1 vykazoval vysokou efektivitu loadingu PhPt ( $93,8 \pm 0,7$  %), relativně nízký hydrodynamický průměr v prostředí PBS 7,4 o velikosti ( $161 \pm 3$ ) nm při teplotě  $37 ^\circ C$  a velmi nízký index polydisperzity  $0,124 \pm 0,012$ . Uvolňování PhPt bylo v porovnání s ostatními výrazně pomalejší ve

stejném prostředí a zeta potenciál činil  $(-21,13 \pm 0,08)$  mV při 37 °C ve vodě. Druhý vybraný vzorek 02\_DCH\_A-P3 byl připravený optimalizací reakčních podmínek vázání PhPt na konjugát 02\_DCH\_A, tj. nastavením hodnoty pH = 7 u roztoku aktivovaného PhPt, dále teplotou loadingu a dialýzy 25 °C v ultra čisté vodě (UPW). Tento termoresponzivní oxidovaný konjugát s navázaným PhPt vykazoval nižší efektivitu loadingu PhPt  $(81,3 \pm 0,9)$  %, dosáhl v prostředí PBS 7,4 při 37 °C hydrodynamického průměru  $(119 \pm 19)$  nm a jeho index polydisperzity částic byl  $0,40 \pm 0,06$ . Rychlost uvolňování PhPt ve stejném iontovém prostředí oproti 02\_DCH\_A-P1 byla vyšší a zeta potenciál ve vodě dosáhl hodnot  $(-35,2 \pm 0,2)$  mV při 37 °C.

Vzorky 02\_DCH\_A-P1 a 02\_DCH\_A-P3 byly vyhodnoceny jako nejvhodnější nosiče pro potenciální biologické testování na rakovinových liniích *in vitro* zejména kvůli jejich malým hydrodynamickým průměrům, poměrně nízké polydisperzitě částic a pomalému uvolňování platinového léčiva v PBS 7,4, a také díky jejich vysokým absolutním hodnotám zeta potenciálů při 37 °C ve vodě.

Předběžné výsledky biologického testování provedeného na spolupracujícím pracovišti potvrdily potenciál zvolených vzorků, jelikož jejich efektivita vůči nádorovým liniím byla až několikanásobně vyšší než u čisté PhPt.

Závěrem lze konstatovat, že se podařilo připravit a charakterizovat termoresponzivní deriváty oxidované kyseliny hyaluronové, které jsou schopny s vysokou efektivitou vázat a následně uvolňovat protinádorová léčiva na bázi platiny.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] MRLÍK, M. *Smart Materials*. Zlín, 2022. Přednášky. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.
- [2] KOCAK, G., C. TUNCER, V. BÜTÜN. pH-Responsive polymers. *Polymer Chemistry* [online]. 2017, 8(1), 144–176 [cit. 2022-10-23]. Dostupné z: doi:10.1039/C6PY01872F
- [3] SPONCHIONI, M., U. CAPASSO PALMIERO, D. MOSCATELLI. Thermo-responsive polymers: Applications of smart materials in drug delivery and tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2019, 102, 589–605 [cit. 2022-10-28]. ISSN 0928-4931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2019.04.069
- [4] SEDLÁČEK, T. *Nekovové materiály a technologie*. Zlín, 2022. Přednášky. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.
- [5] LIU, Y. et al. pH-sensitive polymeric micelles triggered drug release for extracellular and intracellular drug targeting delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2013, 8(3), 159–167 [cit. 2022-10-28]. ISSN 1818-0876. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajps.2013.07.021
- [6] QUINTERO SIERRA, L. A. et al. Tissue-Material Integration and Biostimulation Study of Collagen Acellular Matrices. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* [online]. 2022, 19(3), 477–490 [cit. 2022-10-29]. ISSN 2212-5469. Dostupné z: doi:10.1007/s13770-021-00420-6
- [7] DONG, X. et al. *Electrorheological Elastomers* [online]. B.m.: IntechOpen, 2017 [cit. 2022-11-02]. ISBN 978-953-51-3488-6. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.68396
- [8] TAO, R. *Application of Electrorheology to Improve Crude Oil Flowing Properties Through Pipeline* [online]. IntechOpen, 2016 [cit. 2022-11-02]. ISBN 978-953-51-2701-7. Dostupné z: doi:10.5772/64858
- [9] TAO, R. et al. Electrorheology leads to healthier and tastier chocolate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2016, 113(27), 7399–7402 [cit. 2022-11-02]. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1605416113
- [10] FerroFluids and Magnetorheological Fluids. *rmcybernetics.com* [online]. [cit. 2022-02-11]. Dostupné z: <https://www.rmcybernetics.com/science/diy-experiments/ferrofluids>
- [11] KANG, S. S. et al. Magnetorheological Elastomers: Fabrication, Characteristics, and Applications. *Materials* [online]. 2020, 13(20), 4597 [cit. 2022-11-10]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma13204597
- [12] WARNER, M., E. M. TERENTJEV. Nematic elastomers—A new state of matter? *Progress in Polymer Science* [online]. 1996, 21(5), Liquid Crystalline

- Polymers Part 1, 853–891 [cit. 2022-11-10]. ISSN 0079-6700. Dostupné z: doi:10.1016/S0079-6700(96)00013-5
- [13] WARD, M. A., T. K. GEORGIU. Thermoresponsive Polymers for Biomedical Applications. *Polymers* [online]. 2011, 3(3), 1215–1242 [cit. 2022-11-10]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym3031215
- [14] Cell Culture Environment. *thermofisher.com* [online]. [cit. 2022-11-30]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-environment.html>
- [15] CALIARI, S. R., J. A. BURDICK. A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nature Methods* [online]. 2016, 13(5), 405–414 [cit. 2022-11-30]. ISSN 1548-7105. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth.3839
- [16] CHEN, J.-P., et al. Thermosensitive Hydrogels Composed of Hyaluronic Acid and Gelatin as Carriers for the Intravesical Administration of Cisplatin. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2011, 100(2), 655–666 [cit. 2022-11-30]. ISSN 0022-3549. Dostupné z: doi:10.1002/jps.22309
- [17] LI, Z. et al. Drug delivery for bioactive polysaccharides to improve their drug-like properties and curative efficacy. *Drug Delivery* [online]. 2017, 24(2), 70-80 [cit. 2022-11-30]. ISSN 1071-7544, 1521-0464. Dostupné z: doi:10.1080/10717544.2017.1396383
- [18] MÜNSTER, L. et al. Dicarboxylated hyaluronate: Synthesis of a new, highly functionalized and biocompatible derivative. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2022, 292, 119661 [cit. 2022-11-30]. ISSN 0144-8617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2022.119661
- [19] KRISTIANSEN, K. A., M. Ø. DALHEIM a B. E. CHRISTENSEN. Periodate oxidation and macromolecular compaction of hyaluronan. *Pure and Applied Chemistry* [online]. 2013, 85(9), 1893–1900 [cit. 2022-12-02]. ISSN 1365-3075. Dostupné z: doi:10.1351/pac-con-13-01-05
- [20] MAYES, P. A. Fysiologicky významné sacharidy. In: R. K. MURRAY, *Harperova biochemie*. 4. vyd. v ČR. Praha, Jinočany: Nakladatelství H & H, Vyšehradská, s.r.o., 2002. ISBN 978-80-7319-013-2.
- [21] ASHENHURST, J. Pyranoses and Furanoses: Ring-Chain Tautomerism In Sugars. *masterorganicchemistry.com* [online]. 13. 7. 2017 [cit. 2022-12-15]. Dostupné z: <https://www.masterorganicchemistry.com/2017/07/13/pyranoses-and-furanoses-ring-chain-tautomerism-in-sugars/>
- [22] BARTNIK, M., P. C. FACEY. Chapter 8 - Glycosides. In: BADAL, S., R. DELGODA, ed. *Pharmacognosy* [online]. Boston: Academic Press, 2017, 101–161 [cit. 2022-12-16]. ISBN 978-0-12-802104-0. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-802104-0.00008-1
- [23] VOSMANSKÁ, V. et al. Chemické a fyzikální modifikace biomateriálů na bázi celulosy. *Chemické listy*. 2017, 111(10), 614–621 [cit. 2023-01-05]. ISSN 1213-7103.

- [24] MÜNSTER, L. et al. Mechanism of sulfonation-induced chain scission of selectively oxidized polysaccharides. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2020, 229 [cit. 2023-01-10]. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2019.115503
- [25] MÜNSTER, L. *Dialdehyde cellulose preparation, characterization and utilization as crosslinking agent for PVA* [online]. Zlín, 2018 [cit. 2023-01-15]. Doctoral thesis. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/10563/43723>
- [26] MUCHOVÁ, M. *Příprava hydrogelů na bázi polyvinylalkoholu pro kosmetické aplikace* [online]. Zlín, 2019 [cit. 2023-01-15]. Diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/10563/45620>
- [27] BURDICK, J. A., G. D. PRESTWICH. Hyaluronic Acid Hydrogels for Biomedical Applications. *Advanced materials* [online]. 2011, 23(12), 41-56 [cit. 2023-01-17]. Dostupné z: doi:10.1002/adma.201003963
- [28] KAREL, S. et al. Využití polysacharidů v syntéze peptidů na pevné fázi. *Chemické listy*. 2021, 115(5), 266–273 [cit. 2023-01-18]. ISSN 1213-7103.
- [29] MÜNSTER, L. et al. Oxidized polysaccharides for anticancer-drug delivery: What is the role of structure? *Carbohydrate Polymers* [online]. 2021, 257, 117562 [cit. 2023-01-19]. ISSN 0144-8617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2020.117562
- [30] Introduction to Bioconjugation. *chem.libretexts.org* [online]. 11. 8. 2016 [cit. 2023-01-25]. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic\\_Chemistry/Supplemental\\_Modules\\_\(Organic\\_Chemistry\)/Reactions/Introduction\\_to\\_Bioconjugation](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Supplemental_Modules_(Organic_Chemistry)/Reactions/Introduction_to_Bioconjugation)
- [31] D'ESTE, M., D. EGLIN, M. ALINI. A systematic analysis of DMTMM vs EDC/NHS for ligation of amines to Hyaluronan in water. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2014, 108, 239–246 [cit. 2023-01-30]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2014.02.070
- [32] EDC Bioconjugation Protocol, Mechanism, And Tips. *blog.papyrusbio.com* [online]. 20. 5. 2022 [cit. 2023-02-08]. Dostupné z: <https://blog.papyrusbio.com/edc-bioconjugation/>
- [33] KIM, U.-J., M. WADA, S. KUGA. Solubilization of dialdehyde cellulose by hot water. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2004, 56(1), 7-10 [cit. 2023-02-08]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2003.10.013
- [34] EPSTEIN, J. A. a M. LEWIN. Kinetics of the oxidation of cotton with hypochlorite in the pH range 5–10. *Journal of Polymer Science* [online]. 1962, 58(166), 991–1008 [cit. 2023-02-10]. ISSN 1542-6238. Dostupné z: doi:10.1002/pol.1962.1205816661
- [35] MÜNSTER, L. et al. Selectively Oxidized Cellulose with Adjustable Molecular Weight for Controlled Release of Platinum Anticancer Drugs. *Biomacromolecules* [online]. 2019, 20(4), 1623-1634 [cit. 2023-02-15]. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/acs.biomac.8b01807



- [36] KRISTIANSEN, K. A., A. POTTHAST, B. E. CHRISTENSEN. Periodate oxidation of polysaccharides for modification of chemical and physical properties. *Carbohydrate Research* [online]. 2010, 345(10), 1264-1271 [cit. 2023-02-21]. ISSN 00086215. Dostupné z: doi:10.1016/j.carres.2010.02.011
- [37] BABA, A. I., C. CĂTOI. PRINCIPLES OF ANTICANCER THERAPY. *Comparative Oncology* [online]. Bucharest: The Publishing House of the Romanian Academy, 2007 [cit. 2023-02-21]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9546/>
- [38] IOELE, G. et al. Anticancer Drugs: Recent Strategies to Improve Stability Profile, Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties. *Molecules* [online]. 2022, 27(17) [cit. 2023-02-22]. Dostupné z: doi:10.3390/molecules27175436
- [39] WILHELM, S. et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nature Reviews Materials* [online]. 2016, 1(5), 1–12 [cit. 2023-03-01]. ISSN 2058-8437. Dostupné z: doi:10.1038/natrevmats.2016.14
- [40] EDIS, Z. et al. Nanocarriers-Mediated Drug Delivery Systems for Anticancer Agents: An Overview and Perspectives. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2021, 16, 1313–1330 [cit. 2023-03-01]. ISSN 1176-9114. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S289443
- [41] YADAV, N. et al. Polysaccharide-Drug Conjugates: A Tool for Enhanced Cancer Therapy. *Polymers* [online]. 2022, 14(5), 950 [cit. 2023-03-01]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym14050950
- [42] PARK, G. Y. et al. Phenanthriplatin, a monofunctional DNA-binding platinum anticancer drug candidate with unusual potency and cellular activity profile. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2012, 109(30), 11987–11992 [cit. 2023-03-02]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1207670109
- [43] DASARI, S., P. B. TCHOUNWOU. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology* [online]. 2014, 740, 364–378 [cit. 2023-03-05]. ISSN 0014-2999. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.025
- [44] ALMAQWASHI, A. A. et al. DNA Intercalation Facilitates Efficient DNA-Targeted Covalent Binding of Phenanthriplatin. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2019, 141(4), 1537–1545 [cit. 2023-03-20]. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/jacs.8b10252
- [45] Molecular weight [online]. [cit. 2023-03-20]. Dostupné z: <https://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/polymerbasics/mw.php>
- [46] INGR, M. *Separáční metody*. Zlín, 2021. Přednášky. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.
- [47] VÍCHA, R. *Teorie a metody strukturní analýzy*. Zlín, 2022. Přednášky. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.

- [48] KOPLÍK, R. Infračervená spektrometrie. *Přednášky z předmětu Speciální analýza potravin* [online]. Praha, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze [cit. 2023-03-22]. Dostupné z: <https://web.vscht.cz/~koplikr/>
- [49] Dynamic Light Scattering DLS. *malvernpanalytical.com* [online]. [cit. 2023-03-22]. Dostupné z: <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/technology/light-scattering/dynamic-light-scattering>
- [50] BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release* [online]. 2016, 235, 337–351 [cit. 2023-03-22]. ISSN 0168-3659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.017
- [51] MRÁČEK, A., BARTOŠÍK, M. *Aplikovaná fyzika povrchů*. Zlín, 2022. Přednášky. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.
- [52] MILLER, J. Measuring zeta potential - electrophoretic light scattering. *youtube.com* [online]. 21. 3. 2019 [cit. 2023-03-29]. Dostupné z: [https://www.youtube.com/watch?v=aOZMX\\_1OG\\_4](https://www.youtube.com/watch?v=aOZMX_1OG_4)
- [53] Zeta potenciál. *anamet.cz* [online]. [cit. 2023-04-09]. Dostupné z: <https://www.anamet.cz/zeta-potencial/>
- [54] HAUSNEROVÁ, B. Měření tokových vlastností. *Fyzika Polymerů* [online]. Zlín, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně [cit. 2023-04-10]. Dostupné z: [https://ufmi.ft.utb.cz/index.php?page=fyzika\\_pol](https://ufmi.ft.utb.cz/index.php?page=fyzika_pol)
- [55] X-Ray Fluorescence Spectroscopy (XRF) – Basics. *xrf-spectroscopy.com* [online]. [cit. 2023-04-16]. Dostupné z: <https://xrf-spectroscopy.com/>
- [56] ZIKMUNDOVÁ, E. Teorie k analýze XRF a LIBS. *Chemie a metodiky konzervování předmětů vyrobených z anorg.materiálů II* [online]. Brno, Masarykova univerzita [cit. 2023-04-16]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/el/sci/podzim2017/C6920/um/>
- [57] MAZÁČOVÁ, V. Transmisní elektronový mikroskop (TEM). *matca.cz* [online]. Praha, Fyzikální Ústav Akademie věd České republiky [cit. 2023-04-16]. Dostupné z: <https://matca.cz/technologie/analyticke-metody/tem/>
- [58] MATĚJKA, P. TEM\_SEM\_STEM\_AFM\_STM. *Metody strukturní a povrchové analýzy* [online]. Praha, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze [cit. 2023-04-16]. Dostupné z: <https://old.vscht.cz/anl/matejka/#povrch>
- [59] Lyofilizátor CoolSafe 110-4 PRO. *cps.utb.cz* [online]. [cit. 2023-04-27]. Dostupné z: <https://cps.utb.cz/cs/veda-a-vyzkum/pristrojove-vybaveni/kondicionovani-tepelne-upravy/98-lyofilizator-coolsafe-110-4-pro>
- [60] Homogenizátor UZ Sonopuls HD 2070 kit. *cps.utb.cz* [online]. [cit. 2023-04-27]. Dostupné z: <http://cps.utb.cz/cs/veda-a-vyzkum/pristrojove-vybaveni/mechanicke-upravy-michani/88-homogenizator-uz-sonopuls-hd-2070-kit>

- [61] FT-IR spektrometr Nicolet 6700. *cps.utb.cz* [online]. [cit. 2023-04-27]. Dostupné z: <http://cps.utb.cz/cs/veda-a-vyzkum/pristrojove-vybaveni/spektroskopie/162-ft-ir-spektrometr-nicolet-6700>
- [62] Přístrojové vybavení. *ft.utb.cz* [online]. [cit. 2023-04-27]. Dostupné z: <https://ft.utb.cz/ustav-chemie/veda-a-vyzkum/pristrojove-vybaveni/>
- [63] Liquid chromatograph Breeze. *cps.utb.cz* [online]. [cit. 2023-04-27]. Dostupné z: <http://cps.utb.cz/cs/veda-a-vyzkum/pristrojove-vybaveni/separacni-metody-chromatografy/708-chromatograf-kapalinovy-breeze>
- [64] Analyzátor částic ZETA NANO ZS ZEN3601 [online]. [cit. 2023-04-27]. Dostupné z: <http://cps.utb.cz/cs/veda-a-vyzkum/pristrojove-vybaveni/analyzator-velikosti-castic/797-analyzator-castic-zeta-nano-zs-zen3601>
- [65] Rotační viskozimetr Anton-Paar MCR 502. *cps.utb.cz* [online]. [cit. 2023-04-27]. Dostupné z: <http://cps.utb.cz/cs/veda-a-vyzkum/pristrojove-vybaveni/reologie/137-rotacni-viskozimetr-anton-paar-mcr-502>
- [66] Elementární analýza. *cps.utb.cz* [online]. [cit. 2023-04-27]. Dostupné z: <http://cps.utb.cz/cs/veda-a-vyzkum/pristrojove-vybaveni/spektroskopie/156-elementarni-analyza>
- [67] TEM mikroskop. *cps.utb.cz* [online]. [cit. 2023-04-27]. Dostupné z: <http://cps.utb.cz/cs/veda-a-vyzkum/pristrojove-vybaveni/zobrazovaci-techniky/149-tem-mikroskop>
- [68] TOKITA, Y., A. OKAMOTO. Hydrolytic degradation of hyaluronic acid. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 1995, 48(2), 269–273 [cit. 2023-05-01]. ISSN 0141-3910. Dostupné z: doi:10.1016/0141-3910(95)00041-J
- [69] JEONG, Y.-I. et al. Cisplatin-incorporated hyaluronic acid nanoparticles based on ion-complex formation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2008, 97(3), 1268–1276 [cit. 2023-05-01]. ISSN 0022-3549. Dostupné z: doi:10.1002/jps.21103

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

01	Produkt vzniklý z nízkomolární kyseliny hyaluronové a plně oxidovaný
02	Produkt vzniklý z vysokomolární kyseliny hyaluronové a plně oxidovaný
03	Produkt vzniklý z vysokomolární kyseliny hyaluronové a parciálně oxidovaný
$\gamma$	Deformace
$\Delta T$	Rychlost změny teploty
$\zeta$	Zeta(-potenciál)
$\eta$	Dynamická viskozita
$\eta^*$	Komplexní viskozita
$\eta_L$	Efektivita loadovací reakce
$\vec{\mu}$	Magnetický moment jádra atomu
$\widehat{\sigma}_\zeta$	Odchylka průměru zeta-potenciálu
$\widehat{\sigma}_{d_H}$	Odchylka průměru hydrodynamického průměru
$\widehat{\sigma}_{M_w}$	Odchylka průměru hmotnostního středu molární hmotnosti
$\widehat{\sigma}_{PDI}$	Odchylka průměru indexu polydisperzity částic
$\widehat{\sigma}_\chi$	Odchylka průměru indexu neuniformity polymeru
$\Phi$	Objemový zlomek
$\Phi_0$	Objemový zlomek při ideálním obsahu polymeru
$\omega$	Úhlová rychlost
A	Produkt vzniklý z hmotnostního poměru kyseliny hyaluronové ku vysokomolárnímu poly( <i>N</i> -isopropylakrylamidu) 1 : 1
A	Absorbance
AKF	Autokorelační funkce
B	Produkt vzniklý z hmotnostního poměru kyseliny hyaluronové ku vysokomolárnímu poly( <i>N</i> -isopropylakrylamidu) 1 : 2

$\vec{B}$	Vektor intenzity magnetického pole
C	Produkt vzniklý z hmotnostního poměru kyseliny hyaluronové ku nízkomolárnímu poly( <i>N</i> -isopropylakrylamidu) 1 : 1
<i>c</i>	Hmotnostní koncentrace vzorku měřeného pomocí rotačního reometru
<i>c</i> <sub>HA</sub>	Hmotnostní koncentrace kyseliny hyaluronové v celkovém objemu reakční směsi
cis-Pt	Diammin-dichloroplatnatý komplex
CMC	Kritická micelární koncentrace
<i>c</i> <sub>NaClO<sub>2</sub></sub>	Hmotnostní koncentrace chloritanu sodného
D	Produkt bez poly( <i>N</i> -isopropylakrylamidu)
DAH	2,3-dialdehydhyaluronové kyseliny
DCH	2,3-dikarboxyhyaluronová kyselina
<i>d</i> <sub>H</sub>	Hydrodynamický průměr
DLS	Dynamický rozptyl světla (z angl. direct light scattering)
DMTMM	Chlorid 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium
DNA	K. deoxyribonukleová (z angl. deoxyribonucleic acid)
DO	Stupeň oxidace (z angl. degree of oxidation)
DP	Polymerační stupeň
DS	Stupeň substituce (z angl. degree of substitution)
<i>D</i> <sub>t</sub>	Translační difúzní koeficient
$\vec{E}$	Vektor intenzity elektrického pole
EDC	Hydrochlorid 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu
ELS	Elektroforetický rozptyl světla
ERS	Elektroreologická suspenze
<i>f</i>	Frekvence
$\vec{F}$	Vektor vnější síly

FID	Indukovaný proudový signál (z angl. Free induction decay)
FIR	Vzdálená infračervená oblast (z angl. Far infrared region)
FT-IR	Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací
G	Graftingové číslo
GPC	Gelová permeační chromatografie
HA	K. hyaluronová (z angl. Hyaluronic Acid)
HMT	2-hydroxy-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin
$k_B$	Boltzmannova konstanta
$l$	Spinové kvantové číslo
LCST	Dolní kritická teplota přechodu sol-gel (z angl. lower critical solution temperature)
LDE	Laser-Dopplerova elektroforéza
Loading	Konjugální reakce daného nosiče a platinové komplexně-koordinální molekuly (loadovací reakce)
$M$	Počet orientací spinů atomových jader ve vnějším magnetickém poli
$m_{\text{DCH-pNIPAM}}$	Hmotnost konjugátu 2,3-dikarboxyhyaluronové kyseliny a poly( <i>N</i> -isopropylakrylamidu)
$m_{\text{HA}}$	Hmotnost kyseliny hyaluronové
MIR	Střední infračervená oblast (z angl. Middle infrared region)
$m_n$	Navážka daného nosiče
$\bar{M}_n$	Číselný střed molární hmotnosti
$\bar{M}_{n\text{pNIPAM}}$	Číselný střed molární hmotnosti poly( <i>N</i> -isopropylakrylamidu)
$m_{\text{PhPt}}$	Hmotnost dusičnanu <i>cis</i> -diammin-dichloro-phenanthridinplatnatého
$m_{\text{pNIPAM}}$	Hmotnost poly( <i>N</i> -isopropylakrylamidu)
$M_{\text{pNIPAM}}$	Střední hodnota molární hmotnosti monomeru poly( <i>N</i> -isopropylakrylamidu)

MRE	Magnetoreologický elastomer
MRK	Magnetoreologická kapalina
mRNA	Messengerová k. ribonukleová (z angl. messenger ribonucleic acid)
$m_{T_{DAH}}$	Předpokládaná hmotnost 23-dialdehydhyaluronátu přítomném v navážce
$m_{T_{HA}}$	Předpokládaná hmotnost kyseliny hyaluronové přítomné v navážce
$\bar{M}_w$	Hmotnostní střed molární hmotnosti
MWCO	Molecular weight cut off
$n_{AgNO_3}$	Látkové množství dusičnanu stříbrného
$n_{CHO}$	Látkové množství aldehydických skupin
$n_{DMTMM}$	Látkové množství chloridu 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinia
$n_{HA}$	Látkové množství kyseliny hyaluronové
NHS	1-hydroxypyrrolidin-2,5-dion
NIR	Blízká infračervená oblast (z angl. Near infrared region)
NMR	Nukleární magnetická rezonance
$n_{NaClO_2}$	Látkové množství chloritanu sodného
$n_{NaIO_4}$	Látkové množství jodistanu sodného
$n_{PhPt}$	Látkové množství dusičnanu <i>cis</i> -diammin-dichloro-phenanthridinplatnatého
P	Produkt s navázaným protirakovinovým léčivem dusičnanem <i>cis</i> -diammin-dichloro-phenanthridinplatnatým
PALS	Fázová analýza rozptylu světla
PBS 7,4	Fosfátem pufovaná sůl o pH = 7,4
PCS	Fotonová korelační spektrometrie
PDI	Index polydisperzity částic
Periodát	Jodistan sodný

pH <sub>L</sub>	Nastavená pH hodnota reaktantů před zahájením loadovací reakce
PhPt	Dusičnan <i>cis</i> -diammin-dichloro-phenanthridinplatnatý
pNIPAM	Poly(N-isopropylakrylamid)
pNIPAMace	Biokonjugační reakce za využití oxidačního činidla chloridu 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinia
POX	Primární oxidace
PVA	Polyvinylalkohol
$R_{\Sigma}$	Kumulativní uvolňování
$R_{\Sigma t}$	Kumulativní uvolňování v dané době uvolňovacího procesu
RFP	Radiofrekvenční pulz
$r_1$	Vnitřní poloměr
RPM	Otáčky za minutu (z angl. revolutions per minute)
$r_o$	Vnější poloměr
$s^2$	Gyrační poloměr
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
SOX	Sekundární oxidace
Sulfo-NHS	1-hydroxy-2,5-dioxopyrrolidin-3-sulfonát sodný
$t$	Doba uvolňování dusičnanu <i>cis</i> -diammin-dichloro-phenanthridinplatnatého z nosiče
$T$	Teplota
$T_0$	Ideální teplota při ideálním obsahu polymeru
$t_A$	Doba aktivační reakce
$T_A$	Teplota aktivační reakce
$T_D$	Teplota dialýzy
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
TEMPO	2,2,6,6,-tetramethylpiperidin-1-oxyl
$t_L$	Reakční doba loadovací reakce



---

$T_L$	Teplota loadovací reakce
$t_{POX}$	Doba primární oxidace
$u$	Elektroforetická pohyblivost iontu
UCST	Horní kritická teplota přechodu gel-sol (z angl. upper critical solution temperature)
UPW	Ultra čistá voda (z angl. ultra pure water)
$\check{v}$	Vlnočet
$V_c$	Celkový reakční objem
$V_D$	Objem dialyzátu
$V_{RS}$	Objem reakční směsi
$X$	Index neuniformity polymeru
XRF	Rentgenově-fluorescenční spektrometrie (z angl. X-ray fluorescence)

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Ilustrace možného uvolnění léčiva z pH-responzivních systémů. Rozpad micely a následné uvolnění léčiva (a), protonace funkční skupiny s navázaným léčivem s jeho následným uvolněním (b). .....	12
Obrázek 2: Příklady pH-responzivních a multi-responzivního polymeru. ....	14
Obrázek 3: Ilustrace vytvoření řetězkových struktur z částic prostřednictvím elektrického pole a jejich deformace pomocí externí síly ( $\vec{E}$ je vektor intenzity elektrického pole a $\vec{F}$ je vektor vnější síly). ....	15
Obrázek 4: Ilustrace vytvoření organizovaných struktur z částic podléhajících magnetizaci prostřednictvím magnetického pole a jejich deformace pomocí externí síly ( $\vec{B}$ je vektor intenzity magnetického pole a $\vec{F}$ je vektor vnější síly). ....	16
Obrázek 5: Hydratace polymeru vykazující UCST pomocí zvýšení teploty nad hodnotu UCST. ....	20
Obrázek 6: Dehydratace polymeru vykazující LCST pomocí zvýšení teploty nad hodnotu LCST. ....	20
Obrázek 7: Fázový diagram (závislost teploty $T$ na objemovém zlomku polymeru $\phi$ ) pro polymer vykazující UCST, kde $T_0$ představuje ideální teplotu při ideálním obsahu $\phi_0$ termoresponzivního polymeru vykazující UCST. ....	21
Obrázek 8: Polymery vykazující UCST. ....	22
Obrázek 9: Fázový diagram (závislost teploty $T$ na objemovém zlomku polymeru $\phi$ ) pro polymer vykazující LCST, kde $T_0$ představuje ideální teplotu při ideálním obsahu $\phi_0$ termoresponzivního polymeru vykazující LCST. ....	23
Obrázek 10: Polymery vykazující LCST. ....	24
Obrázek 11: Haworthovy vzorce některých pyranózových monosacharidů. ....	25
Obrázek 12: Haworthovy vzorce některých furanózových monosacharidů. ....	26
Obrázek 13: Celulóza (D-anhydroglukopyranóza). ....	26
Obrázek 14: Monomerní jednotka k. hyaluronové složená z D-glukoronové kyseliny (vlevo) a N-acetylglukosaminu (vpravo). ....	28
Obrázek 15: Chemismus biokonjugační reakce HA a pNIPAMu za využití aktivačních činidel EDC/sulfo-NHS. ....	30
Obrázek 16: Chemismus biokonjugační reakce HA a pNIPAMu za využití aktivačního činidla DMTMM (pNIPAMace). ....	31
Obrázek 17: Primární oxidace konjugátu HA a pNIPAMu oxidačním činidlem jodistanem sodným ve vodném prostředí. ....	33
Obrázek 18: Sekundární oxidace konjugátu DAH a pNIPAMu pomocí oxidačního činidla chloritanu sodného v pufrovaném prostředí. ....	35
Obrázek 19: Přehled protirakovinových léčiv. ....	39
Obrázek 20: Loading PhPt na konjugát DCH a pNIPAMu vykazující LCST včetně aktivační reakce PhPt. ....	41

Obrázek 21: Schéma rotačního reometru s geometrií válec-válec ( $r_1$ ... Poloměr vnitřního válce; $r_0$ ... Poloměr vnějšího válce).....	48
Obrázek 22: IR spektra s Fourierovou transformací (závislost absorpance $A$ na vlnočtu $\tilde{\nu}$ ) pro výchozí látky (a) a vybrané produkty pNIPAMace a selektivní oxidace (b)..	62
Obrázek 23: $^1\text{H-NMR}$ spektra vybraných oxidovaných konjugátů DCH-pNIPAM.	63
Obrázek 24: Stanovený teoretický polymerační stupeň DP a graftingové číslo G (a). Stupeň oxidace DO a stupeň substituce DS u oxidovaných konjugátů DCH-pNIPAM včetně DO parciálně oxidovaného vzorku 03_DCH_D (b).....	64
Obrázek 25: Hmotnostní střed molární hmotnosti $\bar{M}_w$ vstupních HA a produktů pNIPAMace a selektivní oxidace. ....	65
Obrázek 26: Hydrodynamické průměry $d_H$ konjugátů DCH-pNIPAM a DCH (série D) při 25 °C a 37 °C (a). Zeta potenciály $\zeta$ konjugátů DCH-pNIPAM a DCH (série D) při 25 °C a 37 °C rozpuštěných v UPW (b). ....	68
Obrázek 27: Ilustrace možného teplotního přechodu (reorganizace) konjugátů DCH-pNIPAM.....	71
Obrázek 28: Závislost komplexní viskozity $\eta^*$ na rostoucí teplotě $T$ pro plně oxidované konjugáty (parametry měření: $c = 20 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; $\gamma = 1 \%$ , $f = 0,1 \text{ Hz}$ , $\Delta T = 0,5 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ). ....	72
Obrázek 29: Vizuální důkaz termoresponzivity konjugátů DCH-pNIPAM, červeně jsou vzorky neobsahující pNIPAM. ....	73
Obrázek 30: Hydrodynamický průměr $d_H$ u konjugátů DCH-pNIPAM s navázaným PhPt ze série P1 rozpuštěných v UPW ( $\text{H}_2\text{O}$ ) a fosfátovém pufované soli o pH = 7 (PBS 7,4) o koncentraci $0,05 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ při teplotách měření 25 °C a 37 °C.....	74
Obrázek 31: Hydrodynamický průměr $d_H$ u termoresponzivních oxidovaných konjugátů s navázaným PhPt ze sérií P1–P3 rozpuštěných ve fosfátovém pufované soli o pH = 7 při teplotách měření 25 °C a 37 °C.....	75
Obrázek 32: Snímky z TEM termoresponzivního oxidovaného konjugátu (02_DCH_A) vysušeného při 25 °C. ....	77
Obrázek 33: Snímky z TEM termoresponzivního oxidovaného konjugátu s navázaným PhPt (02_DCH_A-P3) vysušeného při 25 °C.....	77
Obrázek 34: Snímky z TEM termoresponzivního oxidovaného konjugátu s navázaným PhPt (02_DCH_A-P3) vysušeného při 40 °C.....	78
Obrázek 35: Kumulativní uvolňování $R_\Sigma$ PhPt v závislosti na čase $t$ pro vzorky série P1. ....	79
Obrázek 36: Kumulativní uvolňování $R_\Sigma$ PhPt v závislosti na čase $t$ pro vzorky série P2. ....	80
Obrázek 37: Kumulativní uvolňování $R_\Sigma$ PhPt v závislosti na čase $t$ pro vzorek 02_DCH_A-P3 při porovnání uvolňování PhPt z 2,3-dikarboxyhyaluronové kyseliny (02_DCH-P3) a z 02_DCH_A-P1 .....	81
Obrázek 38: Zeta-potenciál $\zeta$ vybraných konjugátů DCH-pNIPAM s navázaným PhPt měřené v UPW při 25 °C a 37 °C.....	83

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Legenda pro kódy vzorků vzniklých produktů pNIPAMace a selektivní oxidace.....	54
Tabulka 2: Přehled jednotlivých vzorků, navážek a reakčních parametrů pro pNIPAMaci ( $m_{HA}$ ... Hmotnost navážky dané k. hyaluronové; $c_{HA}$ ... Hmotnostní koncentrace HA v celkovém objemu reakční směsi; $m_{HA}:m_{pNIPAM}$ ... Hmotnostní poměr HA ku pNIPAMu; $n_{HA}:n_{DMTMM}$ ... Molární poměr HA ku DMTMM; $V_c$ ... Celkový reakční objem).....	55
Tabulka 3: Přehled jednotlivých vzorků a reakčních parametrů pro POX ( $m_{T_{HA}}$ ... Předpokládaná hmotnost HA přítomné v navážce HA-PNIPAM; $c_{HA}$ ... Hmotnostní koncentrace teoretické HA v celkovém objemu reakční směsi; $n_{HA}:n_{NaIO_4}$ ... Molární poměr HA ku periodátu; $t_{POX}$ ... Reakční doba primární oxidace; $V_c$ ... Celkový reakční objem).....	57
Tabulka 4: Přehled jednotlivých vzorků a reakčních parametrů pro SOX ( $m_{T_{DAH}}$ ... Předpokládaná hmotnost DAH přítomné v navážce DAH-PNIPAM; $n_{-CHO}$ ... Látkové množství aldehydických skupin v adekvátním množství DAH; $n_{-CHO}:n_{NaClO_2}$ ... Molární poměr aldehydických skupin DAH ku NaClO <sub>2</sub> ; $c_{NaClO_2}$ ... Látková koncentrace NaClO <sub>2</sub> v celkovém objemu reakční směsi; $V_c$ ... Celkový reakční objem).....	58
Tabulka 5: Legenda pro kódy vzorků vzniklých produktů loadingu.....	59
Tabulka 6: Přehled reakčních parametrů loadingu PhPt u jednotlivých vzorků sérií P1–P3 ( $m_n$ ... Navážka daného nosiče; $t_A$ ... Doba aktivační reakce; $T_A$ ... Teplota aktivační reakce; $pH_L$ ... Nastavená pH hodnota reaktantů před zahájením loadingu; $t_L$ ... Reakční doba loadingu; $T_L$ ... Teplota loadingu; $T_D$ ... Teplota dialýzy).....	60
Tabulka 7: Přehled hmotnostních středů molární hmotnosti $\bar{M}_w$ a indexů neuniformity $X$ s odpovídajícími odchylkami $\widehat{\sigma}_{\bar{M}_w}$ a $\widehat{\sigma}_X$ pro odpovídající vstupní HA, produkty pNIPAMace a selektivní oxidace. ....	66
Tabulka 8: Přehled hydrodynamických průměrů $d_H$ a zeta potenciálů $\zeta$ s odpovídajícími odchylkami $\widehat{\sigma}_{d_H}$ / $\widehat{\sigma}_\zeta$ pro odpovídající produkty pNIPAMace-selektivní oxidace při teplotách měření 25 °C a 37°C rozpuštěných v UPW.....	69
Tabulka 9: Přehled LCST pro plně oxidované konjugáty DCH-pNIPAM stanovené z rotační reometrie. ....	71
Tabulka 10: Přehled hydrodynamických průměrů $d_H$ a indexu polydisperzity částic PDI s odpovídajícími odchylkami $\widehat{\sigma}_{d_H}$ a $\widehat{\sigma}_{PDI}$ pro oxidované termoresponzivní konjugáty s navázaným PhPt ze série P1 při teplotách měření 25 °C a 37°C v rozdílných rozpouštědlech – voda (H <sub>2</sub> O) a fosfátem pufrované soli o pH = 7,4 (PBS 7,4) .....	75
Tabulka 11: Celkový přehled hydrodynamických průměrů $d_H$ a indexu polydisperzity částic PDI s odpovídajícími odchylkami $\widehat{\sigma}_{d_H}$ a $\widehat{\sigma}_{PDI}$ pro termoresponzivní oxidované konjugáty s navázaným PhPt ze sérií P1–P3 při teplotách měření 25 °C a 37°C rozpuštěných ve fosfátem pufrované soli o pH = 7,4 (PBS 7,4) . ....	76

Tabulka 12: Přehled efektivity loadingu  $\eta_L$ , kumulativního uvolňování  $R_\Sigma$  s odpovídající odchylkou  $\widehat{\sigma}_{R_\Sigma}$  v daných časech odběru uvolněného platinového léčiva u produktů loadingu. .... 82

Tabulka 13: Konkrétní hodnoty zeta potenciálu  $\zeta$  s odpovídajícími odchylkami  $\widehat{\sigma}_\zeta$  pro nejvhodnější termoresponzivní oxidované konjugáty s navázaným PhPt při 25 °C a 37 °C v UPW..... 83