

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2021

Bc. Kateřina Krupová

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Příprava fluorescenčně značených nanočástic na bázi kyseliny hyaluronové
pro *in vivo* aplikace

Diplomová práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina Krupová**
Osobní číslo: **C18499**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Téma práce: **Příprava fluorescenčně značených nanočástic na bázi kyseliny hyaluronové pro *in vivo* aplikace**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

V teoretické části diplomové práce shrňte dostupné informace o:

- 1) radioaktivitě, o vlivu radioaktivního záření na lidský organismus, jaké jsou klinické projevy ozáření a jaké tkáně jsou postižené radioaktivním zářením postiženy nejvíce;
- 2) o látkách, které vykazují radioprotektivní účinek a o mechanismu jejich působení;
- 3) o struktuře a biologickém významu kyseliny hyaluronové (HA), jaký má kyselina hyaluronová vztah ke složkám imunitního systému a jak zasahuje do procesů zánětu a hojení ran; Vypracujte teoretickou část na dané téma minimálně v délce 30 normovaných stran včetně obrázků a schémat. Při vyhledávání literárních údajů využijte všech dostupných databází NCBI, PubMed, Scopus, WOS a dalších dle pokynů školitele.

Experimentální část:

- 1) Zaveďte různé postupy k výrobě nanočástic z biopolymerních molekul kyseliny hyaluronové (HA-NPs), reakční podmínky modifikujte s cílem připravit nanočástice definovaných velikostí s minimální disperzitou. K výrobě HA-NPs použijte různé délky řetězců biopolymerní HA, různá „cross-linking“ činidla. Charakterizaci připravených HA-NPs proveďte pomocí základních parametrů jako je povrchový náboj (zeta potenciál), hydrodynamický průměr a míra disperzity (PDI).
- 2) Zaveďte metodu pro značení nanočástic fluorescenční značkou a částice charakterizujte dle pokynů uvedených výše. K vyhodnocení účinnosti značení použijte spektrofotometr značky TECAN. Dosažené výsledky zhodnoťte a porovnejte vliv délky řetězců biopolymerní HA, různá „cross-linking“ činidla na velikost částic, zhodnoťte stabilitu fluorescenčního značení HA-NPs.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **20. prosince 2019**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prohlašuji:

Práci s názvem „Příprava fluorescenčně značených nanočástic na bázi kyseliny hyaluronové pro *in vivo* aplikace“ jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 16. července 2021

Bc. Kateřina Krupová v. r.

PODĚKOVÁNÍ

Těmito řádky bych chtěla poděkovat vedoucí mé diplomové práce prof. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D., za vedení, rady a podnětné připomínky při psaní diplomové práce, konzultantce RNDr. Lucii Korecké, Ph.D., za vstřícný přístup, cenné rady a vedení při práci v laboratoři a v neposlední řadě také Mgr. Nikole Mannové za ochotu a pomoc při vyhodnocování výsledků. Nesmím zapomenou také poděkovat mé rodině, která mě v dobách studia podporovala.

ANOTACE

Cílem práce bylo stanovit optimální podmínky pro přípravu nanočástic kyseliny hyaluronové, včetně jejich značení fluorescenčními značkami. Dále bylo cílem získat nanočástice na bázi degradovatelného biopolymerního materiálu pro *in vivo* aplikace s možností detekce jejich distribuce a rozkladu v živém organismu. Podařilo se například prokázat vliv délky inkubační doby mezi přidavky acetonu při přípravě nanočástic karbodiimidovou metodou či vliv dialyzačního roztoku na velikost nanočástic.

KLÍČOVÁ SLOVA

radioaktivita, kyselina hyaluronová, radioprotektivní látky, nanočástice

TITLE

Preparation of fluorescently labeled nanoparticles based on hyaluronic acid for *in vivo* applications

ANNOTATION

The aim of the work was to establish optimal conditions for the preparation of hyaluronic acid nanoparticles, including their marking with fluorescent markers. The idea was to obtain nanoparticles based on degradable biopolymer material for *in vivo* applications, with the possibility of detecting their distribution and degradation in a living organism. The effect of incubation time between the addition of acetone by carbodiimide preparation of nanoparticles or the influence of dialysis solution on the size of nanoparticles was demonstrated.

KEYWORDS

radioactivity, hyaluronic acid, radioprotective agents, nanoparticles

Obsah

ÚVOD	1
TEORETICKÁ ČÁST	2
1. RADIOAKTIVITA.....	2
1.1 Historie radioaktivity	2
1.2 Ionizující záření.....	3
1.2.1 Zdroje ionizujícího záření	4
1.2.2 Charakteristika radioaktivní přeměny	4
1.2.3 Přirozená a umělá radioaktivita.....	5
1.2.4 Charakteristika jednotlivých druhů ionizujícího záření	5
1.2.5 Vybrané veličiny a jednotky radioaktivity.....	7
1.3 Vliv ionizujícího záření na lidský organismus.....	8
1.3.1 Mechanismy účinku (fáze dějů).....	9
1.3.2 Přímé a nepřímé účinky	9
1.3.3 Radiosenzitivita.....	10
1.3.4 Biologické účinky záření na lidský organismus	10
1.3.5 Vliv nízkých dávek a radiační hormese	15
2. KYSELINA HYALURONOVÁ	17
2.1 Historie.....	17
2.2 Obecná charakteristika	17
2.3 Chemické vlastnosti	18
2.4 Biologické vlastnosti.....	19
2.4.1 Kyselina hyaluronová v organismu.....	19
2.4.2 Syntéza a degradace HA v organismu	19
2.4.3 Specifické funkce HA dle velikosti fragmentů	21
2.4.4 Kyselina hyaluronová v tkáních.....	22
2.4.5 Hyaladheriny	24
2.4.6 Buněčné receptory.....	24
2.5 Biologická funkce v hojení ran a zánětů, angiogenezi a reepitelizaci	25
2.5.1 HA a buňky imunitního systému	28
3. RADIOPROTEKTIVNÍ LÁTKY	30

3.1	Mechanismy působení radioprotektivních látek	30
3.1.1	Opravné a informační mechanismy v tkáních.....	30
3.2	Rozdělení radioprotektivních látek	32
3.2.1	Příklady radioprotektivních látek – přírodní	33
3.2.2	Příklady radioprotektivních látek – syntetické.....	36
3.3	Kyselina hyaluronová jako radioprotektivní látka	37
	CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	39
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40
4.1	Přístrojové vybavení a pomůcky	40
4.2	Příprava dialyzačních membrán	41
4.3	Příprava nanočástic kyseliny hyaluronové.....	42
4.3.1	Příprava nanočástic kyseliny hyaluronové karbodiimidovou metodou	42
4.3.2	Příprava nanočástic kyseliny hyaluronové pomocí zesíťení bis(3-aminopropyl)aminem	44
4.4	Značení nanočástic	45
4.4.1	Značení nanočástic fluoresceinem	45
4.4.2	Značení nanočástic neoxidovaným FITC	47
4.4.3	Značení nanočástic oxidovaným FITC	48
4.5	Měření hydrodynamického průměru a zeta potenciálu připravených nanočástic	49
4.6	Měření intenzity fluorescence	50
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	51
5.1	Princip měření analyzátoru Horiba SZ-100	51
5.2	Výsledky a diskuze pro modifikace postupu přípravy nanočástic karbodiimidovou metodou	52
5.2.1	Podmínky přípravy nanočástic kyseliny hyaluronové	52
5.2.2	Zesíťení HA-nanočástic karbodiimidovou metodou – modifikace postupu – poměr reagií EDC a AAD – 1 : 1	53
5.2.3	Zesíťení HA-nanočástic karbodiimidovou metodou – modifikace postupu – poměr reagií EDC a AAD – ½ : 1	59

5.2.4	Zesítnění HA-nanočástic karbodiimidovou metodou – modifikace postupu – poměr reagensů EDC a AAD – 1 : ½.....	62
5.2.5	Příprava nanočástic kyseliny hyaluronové s různou délkou řetězce.....	65
5.2.6	Vliv poměru reagensů EDC a AAD na parametry nanočástic	69
5.2.7	Vliv inkubační doby na velikost nanočástic	70
5.2.8	Ověření stability hodnot měřených parametrů nanočástic	73
5.2.9	Zhodnocení stability hodnot měřených parametrů nanočástic.....	78
5.2.10	Zeta potenciál připravených nanočástic kyseliny hyaluronové	80
5.2.11	Vliv změny dialyzačního roztoku	82
5.3	Výsledky a diskuze k přípravě nanočástic zesítněných pomocí činidla bis(3-aminopropyl)amin.....	85
5.4	Výsledky pro značení nanočástic fluorescenčními značkami.....	89
5.4.1	Výsledky pro značení nanočástic fluoresceinem	90
5.4.2	Výsledky pro značení nanočástic FITC a FITC-ox	95
5.5	Diskuze výsledků	100
	ZÁVĚR	102
	POUŽITÁ LITERATURA	103

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1: Průnik jednotlivých druhů záření různými materiály</i>	<i>7</i>
<i>Obrázek 2: Sodná sůl kyseliny hyaluronové</i>	<i>18</i>
<i>Obrázek 3: Molekuly kyseliny hyaluronové o různé molekulové hmotnosti vylučovány skrze hyaluronan syntasy do mezibuněčného prostoru</i>	<i>20</i>
<i>Obrázek 4: Gelovité shluky kys. hyaluronové vzniklé nesprávným přidavkem acetonu.....</i>	<i>52</i>
<i>Obrázek 5: N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochloridu (vlevo) a dihydrazidu kyseliny adipové (vpravo)</i>	<i>69</i>
<i>Obrázek 6: Bis(3-aminopropyl)amin</i>	<i>88</i>
<i>Obrázek 7: Fluorescein sodná sůl.....</i>	<i>94</i>
<i>Obrázek 8: Fluorescein isothiokyanát</i>	<i>98</i>
<i>Obrázek 9: Obrazový záznam fluorescenčního značení nanočástic s fluoresceinem, fluorescein isothiokyanátem a oxidovaným fluorescein isothiokyanátem při vyhodnocování intenzity fluorescenčního záření pomocí stanice ChemiDoc.....</i>	<i>99</i>

SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic připravených s 10minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu se poměrem reagensů EDC a AAD 1:1.....</i>	<i>54</i>
<i>Tabulka 2: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek hyaluronanových nanočástic připravených s 15minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu se poměrem reagensů EDC a AAD 1:1</i>	<i>55</i>
<i>Tabulka 3: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic připravených s 20minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu se poměrem reagensů EDC a AAD 1:1.....</i>	<i>56</i>
<i>Tabulka 4: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic připravených s 30minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu se poměrem reagensů EDC a AAD 1:1.....</i>	<i>58</i>
<i>Tabulka 5: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic připravených s 15minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu a upraveným množstvím EDC</i>	<i>59</i>
<i>Tabulka 6: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic připravených s 20minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu a upraveným množstvím EDC</i>	<i>60</i>
<i>Tabulka 7: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic připravených s 30minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu a upraveným množstvím EDC</i>	<i>61</i>
<i>Tabulka 8: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic připravených s 15minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu a upraveným množstvím AAD</i>	<i>62</i>
<i>Tabulka 9: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic připravených s 20minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu a upraveným množstvím AAD.....</i>	<i>63</i>
<i>Tabulka 10: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic připravených s 30minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu a upraveným množstvím AAD</i>	<i>64</i>
<i>Tabulka 11: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic připravených z HA o původní velikosti 30 kDa a s 30minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu</i>	<i>66</i>
<i>Tabulka 12: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic připravených z HA o původní velikosti 170 kDa a s 30minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu</i>	<i>67</i>
<i>Tabulka 13: Výsledky průměrných velikostí získaných analýzou DLS s ohledem na délku inkubační doby mezi krokovými přidavky acetonu a poměrem reagensů.....</i>	<i>71</i>
<i>Tabulka 14: Výsledky průměrných indexů polydisperzity získaných analýzou DLS s ohledem na délku inkubační doby mezi krokovými přidavky acetonu a poměrem reagensů.....</i>	<i>72</i>
<i>Tabulka 15: Výsledné hodnoty DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic – ověření stability hodnot parametrů – první vzorek.....</i>	<i>74</i>
<i>Tabulka 16: Výsledné hodnoty DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic – ověření stability hodnot parametrů – druhý vzorek.....</i>	<i>75</i>
<i>Tabulka 17: Výsledné hodnoty DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic – ověření stability hodnot parametrů – třetí vzorek.....</i>	<i>77</i>
<i>Tabulka 18: Výsledky DLS měření zeta potenciálu pro HA-NPs dialyzované do 0,9% NaCl, před měřením ředěné redestilovanou H₂O</i>	<i>81</i>

<i>Tabulka 19: Výsledky DLS měření zeta potenciálu pro HA-NPs dialyzované do destilované H₂O (2 hod), před měřením ředěné redestilovanou H₂O.....</i>	<i>81</i>
<i>Tabulka 20: Výsledky DLS měření zeta potenciálu pro HA-NPs dialyzované do destilované H₂O (přes noc), před měřením ředěné redestilovanou H₂O.....</i>	<i>81</i>
<i>Tabulka 21: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic při změnách dialyzačního roztoku pro vzorek 1.....</i>	<i>83</i>
<i>Tabulka 22: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic při změnách dialyzačního roztoku pro vzorek 2.....</i>	<i>83</i>
<i>Tabulka 23: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic při změnách dialyzačního roztoku pro vzorek 2.....</i>	<i>83</i>
<i>Tabulka 24: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic připravené pomocí činidla BAPA (1%, 94 μl, pH 5,5) a inkubační dobou 60 minut po přidání zesíťovacího činidla.....</i>	<i>85</i>
<i>Tabulka 25: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic připravené pomocí činidla BAPA (1%, 188 μl, pH 5,5) a inkubační dobou 60 minut po přidání zesíťovacího činidla.....</i>	<i>86</i>
<i>Tabulka 26: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic připravené pomocí činidla BAPA (1%, 188 μl, pH 5,5) a inkubační dobou 60 minut po přidání zesíťovacího činidla.....</i>	<i>87</i>
<i>Tabulka 27: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic značených fluoresceinem včetně vypočítané hmotnosti fluoresceinu na 1 mg nanočástic – vzorek 1.....</i>	<i>91</i>
<i>Tabulka 28: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic značených fluoresceinem včetně vypočítané hmotnosti fluoresceinu na 1 mg nanočástic – vzorek 2.....</i>	<i>92</i>
<i>Tabulka 29: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic značených fluoresceinem včetně vypočítané hmotnosti fluoresceinu na 1 mg nanočástic – vzorek 3.....</i>	<i>93</i>
<i>Tabulka 30: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic značených FITC a FITC-ox včetně vypočítané hmotnosti FITC a FITC-ox na 1 mg nanočástic – vzorek 1.....</i>	<i>96</i>
<i>Tabulka 31: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic značených FITC a FITC-ox včetně vypočítané hmotnosti FITC a FITC-ox na 1 mg nanočástic – vzorek 2.....</i>	<i>96</i>
<i>Tabulka 32: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic značených FITC a FITC-ox včetně vypočítané hmotnosti FITC a FITC-ox na 1 mg nanočástic – vzorek 3.....</i>	<i>97</i>

SEZNAM GRAFŮ

<i>Graf 1: Výsledky DLS měření HA-nanočástic připravených s 10minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu se poměrem reagentů EDC a AAD 1:1.....</i>	<i>54</i>
<i>Graf 2: Výsledky DLS měření HA-nanočástic připravených s 15minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu se poměrem reagentů EDC a AAD 1:1.....</i>	<i>55</i>
<i>Graf 3: Výsledky DLS měření HA-nanočástic připravených s 20minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu se poměrem reagentů EDC a AAD 1:1.....</i>	<i>56</i>
<i>Graf 4: Výsledky DLS měření HA-nanočástic připravených s 30minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu se poměrem reagentů EDC a AAD 1:1.....</i>	<i>57</i>
<i>Graf 5: Výsledky DLS měření HA-nanočástic připravených s 15minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu a upraveným množstvím EDC</i>	<i>59</i>
<i>Graf 6: Výsledky DLS měření HA-nanočástic připravených s 20minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu a upraveným množstvím EDC</i>	<i>60</i>
<i>Graf 7: Výsledky měření DLS měření HA-nanočástic připravených s 30minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu a upraveným množstvím EDC</i>	<i>61</i>
<i>Graf 8: Výsledky DLS měření HA-nanočástic připravených s 15minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu a upraveným množstvím EDC</i>	<i>62</i>
<i>Graf 9: Výsledky DLS měření HA-nanočástic připravených s 20minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu a upraveným množstvím EDC</i>	<i>63</i>
<i>Graf 10: Výsledky DLS měření HA-nanočástic připravených s 30minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu a upraveným množstvím EDC</i>	<i>64</i>
<i>Graf 11: Výsledky DLS měření HA-nanočástic připravených z HA o původní velikosti 30 kDa a s 30minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu.....</i>	<i>66</i>
<i>Graf 12: Výsledky DLS měření HA-nanočástic připravených z HA o původní velikosti 170 kDa a s 30minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu.....</i>	<i>68</i>
<i>Graf 13: Grafické znázornění vlivu délky inkubační doby na hydrodynamické průměry připravených nanočástic</i>	<i>70</i>
<i>Graf 14: Výsledné hodnoty DLS měření HA-nanočástic – ověřování stability měřených parametrů – první vzorek</i>	<i>78</i>
<i>Graf 15: Výsledné hodnoty DLS měření HA-nanočástic – ověřování stability měřených parametrů – druhý vzorek</i>	<i>79</i>
<i>Graf 16: Výsledné hodnoty DLS měření HA-nanočástic – ověřování stability měřených parametrů – třetí vzorek</i>	<i>79</i>
<i>Graf 17: Výsledky DLS měření HA-nanočástic dialyzované do 0,9% NaCl, před měřením ředěné redestilovanou H₂O.....</i>	<i>80</i>
<i>Graf 18: Výsledky DLS měření HA-nanočástic dialyzované do destilované H₂O, před měřením ředěné redestilovanou H₂O</i>	<i>80</i>
<i>Graf 19: Výsledky DLS měření HA nanočástic při změně dialyzačního roztoku – vzorek 1.....</i>	<i>84</i>
<i>Graf 20: Výsledky DLS měření HA nanočástic při změně dialyzačního roztoku – vzorek 2.....</i>	<i>84</i>
<i>Graf 21: Výsledky DLS měření HA nanočástic při změně dialyzačního roztoku – vzorek 3.....</i>	<i>84</i>

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

A – nukleonové číslo

AAD – dihydrazid kyseliny adipové (z angl. „Adipic Acid Dihydrazide“)

BAPA – bis(3-aminopropyl)amin

CD44 – buněčný povrchový glykoprotein 44 (z. angl. „Cluster of Differentiation 44“)

COX-2 – cyklooxygenasa 2

DLS – dynamický rozptyl světla (z angl. „Dynamic Light scattering“)

DMF – dimethylformamid

DNA – deoxyribonukleová kyselina (z angl. „Deoxyribonucleic Acid“)

ECM – extracelulární matrix

EDC – *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimid hydrochlorid

Fas – transmembránový protein typu I z rodiny TNF receptorů

FITC – fluorescein isothiokyanát

GAG – glykosaminoglykan

HA – kyselina hyaluronová, popř. hyaluronan (z angl. „Hyaluronic Acid“)

HA-NPs – nanočástice kyseliny hyaluronové (z angl. „Hyaluronic Acid Nanoparticles“)

HARE – hyaluronový receptor pro endocytózu (z angl. „Hyaluronic Acid Receptor for Endocytosis“)

HAS – hyaluronan syntasa (z angl. „Hyaluronan Synthase“)

ICAM-1 – intracelulární adhezivní molekula (z angl. „Intercellular Adhesion Molecule 1“)

I α I – inter- α -trypsin-inhibitor

Lck – tyrosin kinasa (z angl. „Lymphocyte-specific tyrosine kinase“)

LYVE – extracelulární vazebná doména (z angl. „Lymphatic Vessel Endothelial Receptor“)

N – neutronové číslo

NK buňky – přirození zabíječi (z angl. „Natural Killer cells“)

NPs – nanočástice (z angl. „Nanoparticles“)

PI – index polydisperzity

PMN – polymorfonukleární buňky

RHAMM – hyaluronanem zprostředkovaný receptor pohyblivosti (z angl. „Receptor for Hyaluronan Mediated Motility“)

RILI – poškození plic vyvolané zářením (z angl. „Radiation-Induced Lung Injury“)

RNS – reaktivní formy dusíku (z angl. „Reactive Nitrogen Species“)

ROS – reaktivní formy kyslíku (z angl. „Reactive Oxygen Species“)

SD – směrodatná odchylka

SOD – superoxiddismutasa

TCR – T-buněčný receptor (z angl. „T-cells Receptor“)

TLR – „Toll-like“ receptory

TNF- α – tumor nekrotizující faktor α (z angl. „Tumor Necrosis Factor α “)

Treg – regulační T-lymfocyty

TSG-6 – protein genu 6 stimulovaný TNF (z angl. „TNF-Stimulated Gene 6 Protein“)

UDP – uridindifosfát

Z – protonové číslo

ZAP 70 – zeta asociovaný protein (z angl. „Zeta-chain-Associated Protein Kinase 70“)

ÚVOD

Ionizující záření je neoddelitelnou součástí životního prostředí kolem nás. Aniž bychom si to uvědomovali, každým okamžikem na nás toto neviditelné záření působí, protože prochází různými materiály.

Uměle vytvořené ionizující záření se v dnešní době uplatňuje ve spoustě odvětví, mezi které můžeme zařadit průmysl, zemědělství, archeologii a také zdravotnictví.

V medicíně se záření využívá v širokém rozmezí – od sterilizace nástrojů a materiálů, přes diagnostiku, až po léčbu. Léčba ionizujícím zářením kromě benefitů může přinášet i problémy v podobě nežádoucích účinků poškození buněk. Předcházením negativních účinků by se zlepšil zdravotní stav pacientů podstupující radioterapii a nedocházelo by v takové míře k sekundárně vyvolaným onemocněním (např.: radiodermatitida).

Ochrana zdravé tkáně před ionizujícím zářením je jedním z hlavních důvodů, proč se hledají biokompatibilní materiály s radioprotektivními účinky. Předpokladem pro tyto materiály je jejich biokompatibilita a biodegradace v organismu bez větší zátěže na organismus pacienta.

Kyselina hyaluronová je biokompatibilní materiál, který je lidskému tělu vlastní, proto se předpokládá její velice dobrá snášenlivost. Nanočástice kyseliny hyaluronové dokonce vykazují vyšší stabilitu při působení ionizujícím záření oproti nativní HA. Takovéto poznatky vedou k dalšímu zkoumání radioprotektivních účinků aplikovaných nanočástic *in vivo*.

O nanočásticích kyseliny hyaluronové jako radioprotektivní látce je málo publikovaných studií – toto téma není ještě dostatečně prostudováno a stále se hledají nové možnosti aplikace a využití. Uvádí se např. její využití k léčbě po radioterapii, kdy urychluje hojení tkání nebo byla použita jako zprostředkovatel distribuce jiných látek s radioprotektivními účinky. Ve studii [1] použili kys. hyaluronovou jako oddalovací raménko, aby vytvořili větší prostor mezi zdravou tkání a nádorem, který měl být ozářen. Další studie prokázala vliv receptorů na radioprotektivní účinky kyseliny hyaluronové [2].

Aby se distribuce a degradace nanočástic dala v organismech sledovat, je vhodné je značit fluorescenčními látkami. Jak u nanočástic, tak i u značek je důležité vybrat ty, které mají vhodné vlastnosti – nejsou toxické či mají optimální stabilitu.

Obecně by tedy radioprotektivní látky měly být biokompatibilní, snadno aplikovatelné a v neposlední řadě také cenově dostupné.

TEORETICKÁ ČÁST

1. RADIOAKTIVITA

1.1 Historie radioaktivity

Za objevem přírodní radioaktivity stojí francouzský fyzik Henri Becquerel. Jeho původní výzkum byl zaměřen na polarizaci světla, fosforescenci či absorpci světla krystaly. Po objevu rentgenového záření se rozhodl prozkoumat souvislost právě mezi nově objeveným rentgenovým zářením a přirozenou fosforescencí. Když po svém otci zdědil uranové soli, které při vystavení na světlo fosforeskují, umístil je do blízkosti fotografické desky pokryté neprůhledným papírem. Přestože fotografická deska nebyla ozářena světlem, došlo k jejímu zčernání. Po dalších pokusech došel k závěru, že tyto uranové soli vyzařují neviditelné záření [3]. Na jeho prvotní objevy z roku 1896 navázala Marie Curie-Sklodovská, která o rok později toto záření zkoumala a nazvala jej radioaktivita [4]. Spolu se svým manželem Pierrem Curie a Gustavem Bémontem poté zkoumali radioaktivitu i u dalších prvků, které nově objevili – polonia a radia, oba prvky jsou silnějšími zářiči než uran [5]. Za tyto objevy byla v roce 1903 udělena Nobelova cena za fyziku. Henri Becquerel ji získal za objev spontánní (přirozené) radioaktivity, manželé Curie ji získali za studium Becquerelova záření [3].

Ernest Rutherford, novozélandský fyzik, se zabýval v roce 1899 vlastnostmi radioaktivního záření. Na základě rozdílného pronikání záření různými látkami, jej rozdělil na složky. První složkou je tzv. měkká složka, jejíž záření dokáže pohltit i list papíru a délka doletu je pouze několik centimetrů. Patří zde paprsky α . Paprsky β se řadí do tzv. tvrdší složky, jejíž záření je pronikavější než záření α a proniká i tenkým hliníkovým plechem. O rok později, tj. v roce 1900, Paul Ulrich Villard, francouzský fyzik, objevil dosud nepojmenované záření. E. Rutherford si uvědomil, že toto záření je mnohem pronikavější než předchozí objevené paprsky α a β . Poslední z objevených záření bylo pojmenováno jako záření γ . Mimo jiné si také E. Rutherford všiml, že za stejný čas se v radioaktivním vzorku rozpadne právě polovina jader. Určil tak poločas rozpadu [6].

Další experimenty manželů Curie a H. Becquerela určily, že záření β je proud elektronů. E. Rutherford pomocí magnetického pole zjistil, že záření α je proud heliových jader, a že záření γ není magnetickým působením nijak ovlivňováno [6].

V roce 1908 E. Rutherford pomocí spektroskopie dokázal, že radioaktivita je samovolný rozpad atomových jader, při němž dochází k transmutaci. Transmutace je děj, při kterém se původní jádro přemění na jádro jiného prvku s málo odlišným protonovým číslem.

O jedenáct let později, tj. v roce 1919 E. Rutherford dospěl k umělé transmutaci u neradioaktivního jádra [6].

Irène Joliot-Curie (dcera M. a P. Curie) spolu se svým manželem Frédéricem Joliotem získali v roce 1935 Nobelovu cenu za chemii, konkrétně za syntézu nových radioaktivních prvků. Experimentálně zjistili, že při bombardování tenkého kusu hliníku zářením α , se objevilo dosud neznámé záření, které zanechávalo stopy podobně jako ve Wilsonově mlžné komoře. I poté, co byl zdroj záření α částic odstraněn z blízkosti tenkého hliníkového plátu, záření z kovu, i přesto, že intenzita slábla, pokračovalo. Důvodem byla přeměna atomů hliníku na radioaktivní izotop fosforu. Tímto postupem byl poprvé uměle vytvořen radioaktivní prvek [7, 8].

1.2 Ionizující záření

Ionizující záření je uvolňováno během samovolného procesu, ve kterém dochází ke změně energetického stavu jader atomů. Při tomto ději – radioaktivitě či též radioaktivní přeměně – se jádro nestabilního prvku přeměňuje na jádro prvku stabilnějšího [9].

Ionizující záření je všude kolem nás. Problémem je, že člověk pomocí svých smyslů přítomnost záření není schopen vnímat, protože je neviditelné a prochází skrz různá prostředí [10]. Kvanta ionizujícího záření mají dostatek energie na to, aby při průchodu dokázala atomy prostředí ionizovat, tzn., že z elektronového obalu atomů jsou vytrženy elektrony. Ionizaci tak vznikají z původních neutrálních atomů kladně nebo záporně nabití ionty [11]. Ionizující záření se může dle charakteru ionizace rozdělit na přímé ionizující záření a nepřímé ionizující záření [12]. Kvanta přímo ionizujícího záření nesou elektrický náboj (elektrony, protony, pozitrony, ad.), a jsou schopna vytrhnout z atomového obalu elektrony pomocí Coulombických elektrických sil. Mezi přímo ionizující záření patří záření α , β^+ , β^- a další [13]. Záření nepřímo ionizující, jehož kvanta nenesou žádný elektrický náboj (neutrony, fotony, ad.), předávají svou energii elektricky nabitým částicím. Tyto nabitě částice (nejčastěji se jedná o elektrony) až po přijetí energie jsou schopné atomy prostředí ionizovat [12]. Do této skupiny patří záření γ , rentgenové či neutronové záření. Dále můžeme ionizující záření rozdělit dle účinků na ozařovanou látku – záření řídké ionizující a záření hustě ionizující. Do první zmíněné skupiny můžeme zařadit záření β a γ , do druhé patří záření α , protonové a neutronové záření [10].

1.2.1 Zdroje ionizujícího záření

Vše, co emituje ionizující záření je označeno jako zdroj ionizujícího záření. Ať jde o předmět, preparát nebo látku. Nejčastěji se jedná o přirozené nebo umělé radionuklidy, jejichž jádro je nestabilní a rozpadem jádra je emitováno ionizující záření nebo generátory záření (urychlovače, rentgenové lampy a další) [12].

Zdroje ionizujícího záření můžeme také rozdělit podle způsobu vzniku záření na dvě skupiny: radionuklidové zdroje a aparaturní. Radionuklidové jsou ty, kde důsledkem radioaktivní přeměny je emise ionizujícího záření neustálá, ve srovnání s aparaturním zdrojem, kde ionizující záření je emitováno pouze při užívání přístroje [12].

Dále zdroje můžeme rozdělit na přírodní a uměle vytvořené. Přírodní záření je neustále všude kolem nás a není spojeno lidskou činností. Pochází z přírodních radionuklidů a z vesmíru (kosmické záření). Umělými zdroji jsou přístroje využívající se ve zdravotnictví a v průmyslu a radionuklidy po haváriích jaderných elektráren či zkouškách jaderných zbraní. Podle původu můžeme záření rozdělit na záření vesmírné, pozemské a vnitřní. Vesmírné záření na nás působí z vesmíru, pozemské pochází z půdy a hornin a vnitřní je to, které vyzařují živé organismy [14].

1.2.2 Charakteristika radioaktivní přeměny

Radioaktivita (též radioaktivní přeměna) je děj, při kterém se z jádra nestabilního prvku stává jádro prvku stabilnějšího. Dochází k tomu díky změně energetického stavu jader atomů nebo vnitřní přeměně. Tento proces probíhá samovolně a je během něj uvolňováno ionizující záření.

Radioaktivní rozpad se vyznačuje typickými charakteristickými vlastnostmi. První vlastností je nezávislost na vnějších podmínkách, jako je tlak, vlhkost, teplota a další. Druhou je schopnost měnit chemickou podstatu látky a třetí vlastností je emitování ionizujícího záření [9].

Všechny atomy jsou tvořeny jádrem a obalem. Atomové jádro je kladně nabitě, oproti obalu, který je nabitý záporně. Jádro tvoří kladně nabitě částice – protony a částice bez elektrického náboje (neutrální) – neutrony. Protony a neutrony jsou k sobě vzájemně přitahovány jadernou silou, protony jsou od sebe odpuzovány silou elektromagnetickou, protože mají stejný (kladný) náboj. Na rozdíl od jádra se v obalu nachází pouze jeden druh částic – elektrony. Ty jsou nabitě záporně a jejich počet se rovná počtu protonů. Proto ve výsledku jsou atomy jako celek elektricky neutrální. Počet protonů v atomovém jádře nám udává *protonové číslo*. Značí se písmenem *Z*. Kromě toho, že udává počet protonů, tak nám

také jednoznačně určuje prvek, kterému daný atom náleží. Proto bylo dříve toto číslo nazýváno číslem atomovým. Počet neutronů v atomovém jádře nám určuje *neutronové číslo*. Značí se písmenem N . Výsledkem součtu těchto dvou čísel (protonového a neutronového) je číslo *nukleonové*. Dříve bylo nazýváno číslem hmotnostním, protože nám určuje hmotnost atomu a je značeno písmenem A [9, 12].

Skupina atomů, které mají totožná nukleonová čísla, se nazývají *nuklidy*. Nuklidy jsou látky, které jsou složeny z jednoho prvku. *Izotopy* jsou nuklidy, které mají stejné protonové číslo, ale liší se číslem neutronovým, proto mají i rozdílnou hmotnost. V jádře izotopů konkrétních prvků je tedy stejný počet protonů, ale izotopy se vzájemně od sebe odlišují počtem neutronů. Jako *radionuklidy* jsou označovány ty nuklidy, jejichž jádro má nadbytek energie. Nejsou stabilní a podléhají samovolnému radioaktivnímu rozpadu. Původní jádro se nejčastěji přemění na jádro jiné a na malou částici. Při tomto rozpadu je uvolňována energie – jedná se tedy o exergonický děj [10].

1.2.3 Přirozená a umělá radioaktivita

V lehčích jádrech prvků, jejichž nukleonové číslo je menší než 20, se počty protonů a neutronů rovnají. Naopak u těžších jader prvků je nutné, aby se podíl neutronů v jádře zvyšoval. Je to z toho důvodu, že kladně nabitě protony jsou od sebe vzájemně odpuzovány a přebytek neutronů v jádře tyto odpudivé síly kompenzuje [12]. Proto těžká jádra považujeme za nestabilní. Samovolnou přeměnu jader nestabilních prvků na stabilní nazýváme přirozenou radioaktivitou. Umělou radioaktivitou nazýváme děj, při kterém je nestabilita jádra vyvolána uměle (příkladem je jaderná reakce) [13].

1.2.4 Charakteristika jednotlivých druhů ionizujícího záření

K radioaktivnímu rozpadu dochází, když nestabilní atom ztratí energii emitováním ionizujícího záření. Jsou popsány a definovány tři základní způsoby (záření), kterými se jádro může rozpadat. Jedná se o záření α , β , a γ . Záření β je navíc ještě rozdělováno na β^+ a β^- .

Záření α

Při tomto záření se rozpadá původní mateřské jádro na nově vzniklé – dceřiné, jehož nukleonové číslo bude o čtyři menší a protonové číslo o dvě menší. Při této přeměně dochází k vyzáření částice α , která je složena ze dvou protonů a dvou neutronů (je jádrem hélia). Zdrojem tohoto záření jsou těžké radionuklidy [15]. Přestože je důsledkem velikosti vyzářené částice a jejímu dvojnásobnému kladnému náboji dolet těchto částic velice omezený, při průchodu materiálem mají částice silné ionizační a excitační účinky, díky čemu u nich

dochází k rychlé ztrátě energie [12]. Záření α dokážeme odstínit papírem, tenkou fólií z plexiskla, popř. i oděvem (Obrázek 1). Letící částice lze také díky jejich náboji vychýlit i elektrickým nebo magnetickým polem [13, 15].

Záření β

Dělení záření β je závislé na částici, která je vyzařována. Částice β^+ jsou rychle letící pozitrony, což jsou antičástice elektronů. Výskyt záření β^+ je především u těch radionuklidů, u nichž v jádře protony převládají nad neutrony. Nukleonové číslo se u dceřiného jádra oproti mateřskému nezmění, protonové číslo bude o jednu menší. Částice β^- jsou opakem částic β^+ [15]. Jedná se o rychle letící elektrony a výskyt záření je u radionuklidů s přebytkem neutronů. Nukleonové číslo dceřiného jádra se podobně jako u β^+ záření nemění, protonové číslo bude o jednu větší. Záření β je emitováno u přírodní i umělé radioaktivity. Částice β jsou oproti částicím α lehčí, což má za důsledek vyšší rychlost. I když mají stejnou energii jako částice α , mají menší ionizační a excitační účinky. Proto částice β mají při průletu větší dolet a jsou pronikavější [10]. Ochranu před zářením nám zajistí plexisklo nebo materiál z prvků s nízkým protonovým číslem (Obrázek 1). Při kolizi s prostředím mohou nastat tři jevy: pružný rozptyl (změna směru záření), ionizace nebo vznik brzdného záření (rentgenové záření). Brzdné rentgenové záření, které vzniká při průletu částic β , je pronikavější než prvotní záření. Pro jeho odstínění musíme použít materiál z prvků s vysokým protonovým číslem. V magnetickém poli jsou částice β vychylovány opačným směrem, než částice α [12, 15].

Záření γ

Záření γ je elektromagnetické záření. Nevzniká při radioaktivní přeměně samostatně, ale často doprovází výše popsaná záření. Důvodem jeho vzniku je energeticky excitovaný stav nově vzniklého (dceřiného) jádra, které vzniklo radioaktivní přeměnou z jádra mateřského. V takovém stavu ale nově vzniklé jádro není stabilní, a proto je nutné, aby u něj došlo k deexcitaci [15]. Nadbytečná energie je z jádra emitována ve formě záření γ , které je představováno fotony s vysokou energií i vysokou frekvencí. Vyzářením energie se dceřiné jádro dostane do základního stavu a je stabilní. Částice γ , fotony, se pohybují rychlostí světla. Při průchodu materiálem se fotony srážejí s atomy, vyrážejí z těchto atomů elektrony a předávají jim energii. Vyražené elektrony jsou schopny ionizovat okolí. Proto je záření γ nepřímou ionizující záření a jeho ionizační účinky jsou nízké [13, 15]. Fotony jsou částice elektricky neutrální, a proto je nelze pomocí elektrického nebo magnetického pole vychýlit.

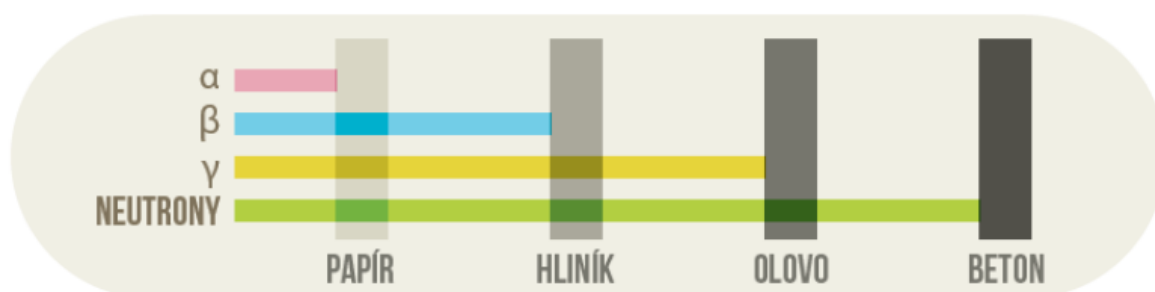
Další druhy záření

- *Neutronové záření*

Neutrony jsou částice z jádra atomu a nenesou žádný náboj (elektricky neutrální). Vznikají při spontánním štěpení atomů či při jaderných reakcích. Při interakcích se z důvodu neutrality částice uplatňují síly jaderné (nikoliv elektrické jako u záření α nebo β) [10].

- *Rentgenové záření*

Podobně jako záření γ je i rentgenové záření elektromagnetické. Je charakterizováno krátkými vlnovými délkami a vzniká interakcí elektronů a těžkých kovů. Je rozdělováno na dva druhy – brzděné a charakteristické. Vzniká buď brzděním rychle letících elektronů v elektrostatickém poli anody, nebo přímo dopadem elektronu na anodu. Energie elektronu je přeměněna na fotony o různé vlnové délce dle druhu rentgenového záření [10].



Obrázek 1: Průnik jednotlivých druhů záření různými materiály
Převzato z [16]

1.2.5 Vybrané veličiny a jednotky radioaktivity

Dávka, dávkový příkon

Biologické účinky ionizujícího záření jsou ovlivňovány také fyzikálními faktory [11]. Částice ionizujícího záření se pohybují po určitých trajektoriích a s určitou energií. Dávka záření je celková energie, kterou emitované ionizující záření předalo cílovému prostředí (která dané prostředí zasáhla). Nazýváme ji také *absorbovanou dávkou*. Značí se písmenem D a jednotkou je Gy (gray) s rozměrem $J \cdot kg^{-1}$. Jedná se o množství energie vyjádřené v joulech, které absorboval 1 kg cílového prostředí (organismus, člověk, tkáň).

Obdobnou veličinou je dávkový příkon, který se také značí písmenem D , ale jeho jednotkou je $Gy \cdot s^{-1}$. Jedná se o poměr přírůstku dávky za jednotku času [17, 18].

Dávkový ekvivalent

Dávkový ekvivalent, jehož jednotkou je Sv (sievert), vyjadřuje biologický účinek záření. Je definován jako součin dávky a jakostní činitel (vyjadřuje účinnost konkrétních druhů záření) [17, 18].

Ekvivalentní dávka

Ekvivalentní dávka se rovná dávce absorbované, jejíž hodnota je radiační váhový faktor vynásobený střední absorbovanou dávkou dané tkáně či orgánu pro konkrétní druh záření. Výsledná hodnota zahrnuje druh záření (α , β a γ), množství záření a hmotnost cílového prostředí, které záření absorbovalo [18, 19].

Efektivní dávka

Efektivní dávka, jejíž jednotkou je také Sv (sievert) a rozměrem jednotky je také $J \cdot kg^{-1}$, je definována jak součet středních hodnot ekvivalentních dávek (H_T) násobených tkáňovým váhovým faktorem (w_T). Tkáňový váhový faktor v sobě zahrnuje typ orgánu nebo tkáně a udává, jak moc jsou konkrétní tkáně poškozeny ionizujícím zářením, vzhledem k celému organismu (pravděpodobnost vzniku stochastických účinků) [18, 19].

1.3 Vliv ionizujícího záření na lidský organismus

I když se téměř všude můžeme dočíst o vlivu záření na buňky, částice záření pouze reagují s atomy, ze kterých jsou buňky složeny. Záření vyvolává v živých organismech podobnou kaskádu procesů, jaká nastává u látek neživých. Po ionizaci prostředí (v tomto případě buněčných atomů) zde dochází i následné excitaci a poté absorpci energie [13].

Poškození buněk mimo jiné souvisí také s jejich proliferačními schopnostmi. Čím má buňka schopnost proliferace vyšší, tím větší vliv na ni záření má [20]. Záření na buňky může mít několik účinků. Může dojít k buněčné smrti, buňka ztratí schopnost proliferace nebo záření změní genetickou informaci a dojde k mutaci [21]. V lékařství se při ozařování využívá stínění, kdy je ta část těla pacienta, která nemá být ozářena, chráněna materiálem, který zcela, nebo aspoň částečně, absorbuje záření. Takto se mohou chránit niche kmenových buněk, které mají velice vysokou proliferační schopnost a jsou důležité pro reparaci [21].

Biologické účinky závisí na několika faktorech. Jedním z klíčových fyzikálních faktorů je dávka záření (energie), kterou buňky absorbovaly. I když jsou buňky schopné reparačních mechanismů, při vyšších dávkách (větší přísun energie zářením) se tento mechanismus nemusí

projevit. Dalším je dávkový příkon, který ovlivňuje celkový účinek záření. Je-li dávka frakcionována (rozdělena na více menších dávek s časovým rozestupem), je poškození menší než při stejně velké dávce absorbované najednou. Účinek ovlivňuje druh ionizujícího záření. Tento parametr je zahrnut obecně v ekvivalentní dávce a pro jednotlivé tkáně v efektivní dávce. Celkový účinek záření je ovlivňován i prostorovým rozložením dávky. Můžeme rozlišit celotělové ozáření (havárie, nehody, prostředí) a lokální (postižení jen určitých tkání) [22].

Ke kontaminaci radioaktivními látkami a nerovnoměrnému ozáření může dojít interní nebo externí expozicí. Interní expozice nastává při vdechnutí, požití či při průniku látek přes poraněnou kůži, externí expozice je skrze prostředí [13].

1.3.1 Mechanismy účinku (fáze dějů)

Účinky ionizujícího záření na živou tkáň můžeme rozdělit podle probíhajících dějů do několik fází. První fází je fyzikální stadium. Trvá velice krátce a v tomto stadiu probíhá ionizace, excitace a absorpce energie záření. Následující fází je chemické stadium, kdy jsou uplatňovány především nepřímé účinky záření. Vznikají a zanikají radikály, které interagují s biomolekulami, a tím se dostáváme do poslední fáze – biologického stadia. U buněk jsou vyvolány reparační mechanismy nebo patofyziologické změny, které mohou zapříčinit nádorové transformace i buněčnou smrt [20, 21].

1.3.2 Přímé a nepřímé účinky

Účinky ionizujícího záření můžeme rozdělit na dva typy podle mechanismů jejich působení. Prvním typem jsou *přímé účinky* záření. Jsou způsobeny zářením, kdy záření interaguje bezprostředně s atomy nebo molekulami v živém prostředí: bílkoviny, enzymy, nebo jinou buněčnou složkou důležitou pro buňku [11]. Díky skutečnosti, že je jádro jednou z největších organel v buňce, je považováno za hlavní cíl působení ionizujícího záření. Přímé účinky se vyskytují především v těch buňkách, které mají nízký obsah vody. Zářením se poruší chemické vazby a jsou vyvolány chemické změny vedoucí od inaktivace, až po rozpad molekuly a buněčnou smrt [21]. Pravděpodobnost interakce záření s molekulou nukleonové kyseliny je velmi malá, protože tyto složky tvoří velmi malou část buňky. Pokud ale dojde ke střetu nukleonové kyseliny s částicí, účinky záření jsou velice závažné [20]. Mezi komplementárními bázemi dojde ke štěpení vodíkových vazeb a nukleonové kyseliny se mohou denaturovat. U buněk s vyšším obsahem vody je častější výskyt *nepřímých účinků* záření. Důvodem je ionizace molekul vody. Vzniklé primární produkty ionizace jsou hydroxylové (H[•]) a hydroxylové (OH[•]) radikály. Protože jsou volné radikály velice reaktivní,

ovlivňují další fyziologické i patofyziologické procesy. Vedou ke změnám struktur biologicky významných molekul, čímž může být narušena aktivita enzymů nebo syntéza bílkovin či nukleonových kyselin [23].

1.3.3 Radiosenzitivita

Radiosenzitivita neboli citlivost na účinky ionizujícího záření, je dána celkovým stavem organismu. Organismus – jako celek – je složen z různých orgánů a tkání, jejichž senzitivita k ionizujícímu záření se vzájemně liší [11]. I když bude absorbovaná dávka totožná, účinky na jednotlivé tkáně a orgány se budou lišit. Nejcitlivější tkáně jsou takové, jejichž buňky se rychle množí i diferenciují a mají krátkou životnost. Dokážou rychle reagovat na ionizující záření. Patří zde lymfatická tkáň, střevní epitel či krvetvorná tkáň (kostní dřeň). Naopak tkáně, u kterých je obnova buněk pomalá a životnost buněk dlouhá, jsou málo radiosenzitivní. Mezi tkáně, které pomalu reagují na ionizující záření, můžeme zařadit pojivovou či nervovou tkáň. Z jiného hlediska můžeme citlivost tkání rozdělit dle destrukce tkáně (lymfatická tkáň, střeva) a cytogenetického efektu (plíce) [21].

Obecně, mezi nejnáchylnější na vznik nádorů po expozici zářením, se řadí kostní dřeň, gastrointestiální trakt (především žaludek a tlusté střevo), plíce a u žen mléčná žláza.

Senzitivita a účinky ionizujícího záření u plodu se odvíjí od stupně jeho vývoje. V raných stádiích těhotenství, v období embryogeneze (především v období 3. - 8. týdne), je plod nejvíce radiosenzitivní a může dojít ke smrti embrya. V následném stádiu organogeneze může docházet k anomáliím vývoje (mentální retardace). Při ozáření plodu ke konci vývoje, se v dětském věku může objevit leukemie či maligní nádory [20, 24].

V souvislosti s růstem a vývojem, jsou děti proti dospělým jedincům radiosenzitivnější.

1.3.4 Biologické účinky záření na lidský organismus

Biologické účinky záření mají za následek změny vyvolané ionizujícím zářením. To působí na molekulární úrovni organismů a způsobuje uvnitř i vně buněk ionizaci biologicky důležitých molekul.

Protože je ionizující záření stále kolem nás, bylo empiricky zjištěno, že velice nízké dávky toho záření lidskému organismu nevadí. U nízkých dávek jsou dokonce pozorovány i pozitivní účinky na organismus. Jedná se o tzv. radiační hormese [25, 26]. Pokud ovšem živý organismus je vystaven vysokým dávkám, účinky záření mohou nenávratně poškodit tkáně, orgány a vést až ke smrti. Obecně biologické účinky závisí na druhu záření, energii, dávce a dávkovém příkonu a na charakteru a vlastnostech ozářené tkáně [11].

Dalším faktorem ovlivňujícím účinky záření je doba expozice. Podle doby jej můžeme rozdělit na akutní dávku a dávku chronickou. Akutní dávka má expozici krátkou, časově ohraničenou, a dávka záření je velmi vysoká. Dávka chronická má expozici dlouhou a dávku záření nízkou. Velice důležitým faktorem je mimo jiné i intenzita záření, která jeho účinky ovlivňuje [11].

Podstatným rozdílem mezi vysokou a nízkou dávkou je ten, že zatímco vysoká dávka dokáže zabít buňky, nízká dávka je pouze poškozující. U vysokých dávek je velice pravděpodobný vznik popálenin, nebo akutní nemoc z ozáření vedoucí ke smrti. Akutní dávka do 250 mGy pravděpodobně nebude mít žádné pozorovatelné účinky, oproti tomu dávka 3–5 mGy může být pro člověka bez lékařského ošetření smrtelná. Nízké dávky nezpůsobují u člověka žádná výrazná, okem viditelná zranění. Působí na buněčné úrovni a účinky nemusí být pozorovatelné i několik let [25].

Biologické účinky můžeme rozdělit dle několika kritérií na časné a pozdní, somatické a genetické a na deterministické a stochastické. Časné účinky se projeví již během působení záření či v krátké době po expozici, často během čtyř až šesti týdnů, pozdní účinky po delší časové prodlevě, která může trvat několik měsíců až let a tyto nepříznivé účinky mohou být i trvalé [19, 21]. U pacientů, kteří podstoupili radiační léčbu, se mohou vyskytnout po deseti až patnácti letech po ukončení léčby sekundární malignity. Somatické účinky se projeví jako účinky na daném jedinci, genetické se projeví až na potomcích ozářeného jedince. Deterministické (také nestochastické, prahové) souvisí s neschopností organismu reparačních mechanismů z důvodu vysokých dávek záření a stochastické účinky jsou náhodné, nepředvídatelné a bezprahové. Podrobněji jsou rozepsány dále [27].

Deterministické účinky záření

Deterministické neboli též nestochastické účinky se projevují po překročení prahové dávky záření. V novějších člancích můžeme také narazit na název akutní tkáňové reakce. Z tohoto důvodu je lze také označit jako účinky prahové. Prahová dávka se liší dle senzitivity jednotlivých orgánů a tkání. I když průměrná orientační prahová dávka organismu jako celku se pohybuje okolo 1 Gy, prahová hodnota může být velice nízká, a to okolo 0,1 Gy [12]. Při malém překročení mohou nastat změny v krevním obrazu, při vyšším překročení se mohou objevit příznaky nevolnosti a zvracení. Poškození a závažnost účinků roste lineárně v závislosti na velikosti (nejčastěji jednorázové) dávky absorbovaného záření. Často se vyskytují tam, kde byla dávka absorbována (pomineme-li celotělové ozáření), takže se dá říct, že deterministické účinky jsou lokální a předvídatelné. Mají charakteristický klinický průběh

a dají se pozorovat po krátké době po vystavení záření. Kvůli vysokým dávkám, a tím i vysokému stupni poškození, je schopnost reparativních procesů organismu značně omezena. Dochází k postižení nejen velkého množství buněk, ale i k poškození biologicky důležitých molekul a látek, a ke vzniku škodlivých toxických látek [21].

Mezi deterministické účinky můžeme zařadit například akutní nemoc z ozáření (radiční syndrom), poruchy oční čočky (katarakta), poškození plodu, poruchy plodnosti (fertility) či radiodermatitida [12].

- *Akutní nemoc z ozáření*

Akutní nemoc z ozáření, též označována jako postradiační syndrom, patří mezi typické deterministické účinky. Při jednorázové dávce do 2 Gy jsou příznaky nejasné a nepatrné, nad dávku 2 Gy se klinické příznaky liší dle velikosti dávky na tři formy – krevní (hematologickou), střevní (gastrointestiální) a nervovou. Krevní forma vzniká po ozáření dávkou mezi 2 a 6 Gy, střevní při ozáření dávkou 6–15 Gy a nervová při dávce 15 Gy a výše [24, 28].

- *Katarakta (šedý zákal)*

Čočka je vaskulární tkáň, která je vyživována komorovou vodou a sklívcem. Odpovědi čočky na expozici ionizujícímu záření, mají zásadní význam a rovnají se mutagenním procesům v jiných tkáních. Předpokládá se, že šedý zákal vzniká poškozením oxidačním stresem (radikály) nebo přímým fotochemickým působením ultrafialového světla. Dalším důvodem může být špatná reparace DNA a následné chyby v kontrole buněčného cyklu, dělení a diferenciaci. Zákal oční čočky může být indikován již při jednorázové dávce o velikosti 1 Gy [24, 29].

- *Poruchy fertility*

Ionizující záření má gonadotoxický účinek s dlouhodobým trváním. Postižení plodnosti závisí na pohlaví. Při ozáření mužských pohlavních orgánů při dávce 0,25 Gy dochází k dočasnému snížení počtu spermií, při dávce nad 3 Gy může dojít až k přechodné sterilitě (neplodnosti) [24]. Mimo samotného záření je mužná plodnost ovlivňována také ROS. Nerovnováhou mezi reaktivními formami kyslíku a antioxidační kapacitou je vyvolán oxidační stres. Za fyziologických podmínek ROS zprostředkovává roli v zajištění správných funkcí reprodukce, mezi které se řadí např. životaschopnost a zrání spermií, motilita či akrozomová

reakce. Naopak přebytek ROS a oxidační stres vede k patofyziologické morfologii spermií. Důsledkem je jejich zhoršená životaschopnost, snižuje jejich počet a zhoršuje pohyblivost [30].

Mnoho žen je v průběhu svého života vystavováno ionizujícímu záření – ať už se jedná o terapeutické či diagnostické důvody. Vystavením ionizujícímu záření ženských pohlavních orgánů v dětství, může vést k vaskularizaci dělohy, snížení jejímu objemu a pružnosti. K trvalé ženské sterilitě může dojít již při dávce o velikosti kolem 3 Gy, přičemž záleží na věku (oproti mužským pohlavním buňkám již nedochází k tvorbě nových ženských pohlavních buněk – oocytů) [31]. Ozáření pohlavních buněk může docházet i ke genetickým mutacím. Mutace se může například projevit neúspěšným oplodněním, zaniknutím embrya, potratem, či vrozenými vadami novorozence [32].

- *Poškození plodu*

Důsledkem zasažení makromolekuly DNA ionizujícím zářením bývá často apoptóza buňky či vznik mutací DNA. Při poškození jednoho vlákna DNA dochází k jeho opravě. Pokud je ionizačním zářením zasažena větší část makromolekuly, k opravám již nedochází a vznikají tak genetické mutace. Mimo přímého působení na DNA ionizující záření působí také nepřímě. Tvorbou volných radikálů může deaktivovat buněčné mechanismy a měnit funkce proteinů, sacharidů a lipidů, což může vést k defektům DNA. Obecně jsou embryo i plod vysoce radiosenzitivní. Důvodem je, že jsou tvořeny buňkami, které se rychle dělí. Velikost poškození také závisí na absorbované dávce a stupni vývoje. Záření může vyvolat spontánní potrat či malformace. Vystavení plodu ionizujícímu záření může mít za následek těžké mentální retardace [33].

- *Radiodermatitida*

Je to radiačně indukované kožní onemocnění vyvolané vedlejšími účinky ionizujícího záření. Dříve se vyskytovalo častěji u pracovníků využívajících ionizující záření (rentgenologové, chirurgové, stomatologové, ad.), dnes se vyskytuje jako nežádoucí účinek při a po radiační léčbě (ozařování). Mezi faktory ovlivňujícími stupeň poškození patří dávka, druh záření, ozářená plocha a lokalizace ozářené části [24]. Poškození kůže rozdělujeme na dvě formy – akutní a chronickou. Akutní radiační dermatitida má tři stupně a závisí na dávce absorbovaného záření. Dle stupně se mohou objevit příznaky od zarudnutí kůže, ztrátě ochlupení, vznikem puchýřů až po vředy a nekrózy. Chronická radiační dermatitida se objevuje po opakujících se expozicích záření. Má dvě formy – atrofickou a hypertrofickou.

Kůže u atrofické formy je suchá a tenká, bez ochlupení, u hypertrofické formy je kůže zhrubělá a více pigmentovaná. [34].

- *Radiační poškození plic*

Poškození plic vyvolané zářením (RILI – Radiation-Induced Lung Injury), zahrnuje jakékoli poškození plicní tkáně způsobeného ionizujícím zářením. V tkáni vystavené záření dochází k řadě změn – molekulárních i buněčných. Poškozeny jsou alveolární epiteliální buňky a vaskulární endoteliální buňky [35]. To má za následek uvolnění zánětlivých mediátorů a chemotaxi monocytů, lymfocytů a granulocytů shromažďujících se v místě poškození tkáně. Ozařováním vznikají ROS a RNS, které mají za následek poškození tkáně. To je způsobeno přímým cytotoxickým účinkem, oxidačním stresem a imunitně vyvolaným poškozením. Velice často se s ním můžeme setkat u pacientů, kteří podstoupili radioterapii u nádorových onemocnění plic, jícnu a dalších nádorů lokalizovaných v hrudníku [36]. Klinickými příznaky RILI jsou suchý kašel, dušnost, bolest na hrudi a horečka. RILI může být zařazeno mezi časné i pozdní účinky záření a je rozděleno do dvou fází: časnou – radiační pneumonitida, která je charakterizována akutním zánětem plic a pozdní – radiační fibrózu, která je důsledkem chronického poškození plic [37].

Stochastické účinky záření

Důsledkem poškození malého množství buněk jsou stochastické účinky záření. Jsou považované za bezprahové a náhodné, protože se objevují i při nízkých dávkách záření, kdy minimální dávka není stanovena [24]. Oproti deterministickým účinkům, u těchto s rostoucí dávkou neroste závažnost, ale pravděpodobnost výskytu. Projevit se mohou i při jedné dávce, ale častěji k nim dochází při chronickém ozařování podprahovými dávkami. Účinky nebývají pozorovatelné v krátké době po expozici a mohou se vyskytovat po odeznění účinků deterministických. Mezi stochastické účinky můžeme zařadit leukémie a různé maligní nádory či genetické mutace [28]. Zvláštností je, že ke vzniku nádoru nemusí dojít v místě ozáření, ale kdekoliv v jiné části organismu. Kvůli nejasným klinickým projevům nelze rozeznat, zda patologické změny jsou následkem ozáření či nikoli. I když se může zdát, že stochastické účinky nejsou tak závažné jako deterministické, nelze jednoznačně říct, které jsou pro organismus nebezpečnější [24].

Dávkové limity

V radiační ochraně jsou dávkové limity nastaveny tak, aby omezily stochastické účinky na přijatelnou úroveň a zcela zabránily deterministickým účinkům. Limity dávky představují maximální dávky, kterými mohou být lidé vystaveni. Rozdělujeme je na obecné limity (obyvatelstvo) a na limity pro radiační pracovníky (jsou vyšší, než pro obyvatelstvo). Nejsou zde zahrnuty dávky záření, kterým je člověk vystaven při mimořádných situacích (havárie a nehody), při lékařském ošetření či dávky přirozeného záření [24].

1.3.5 Vliv nízkých dávek a radiační hormese

Nízké dávky se využívají i v medicíně. Příkladem může být rentgenové záření, které slouží k diagnostice vnitřní stavby těla (především kostí, ale také např. plic).

Ozařování vysokými dávkami obecně způsobuje potlačení imunity, nízkodávkové záření naopak dokáže imunitu stimulovat. Toto je typický případ hormese [24]. Lze jej klinicky použít při radiační léčbě řady nemocí. Ozařování nízkou dávkou zvyšuje proliferaci imunitních buněk, příznivě ovlivňuje řadu buněčných typů imunitního systému, jako jsou NK buňky, dendritické buňky, T lymfocyty, B lymfocyty, i makrofágy a stimuluje produkci cytokinů. Také byla pozorována zvýšená proliferace hematopoetických buněk [25]. Objevuje se to například u lidí, kteří žijí v blízkosti jaderných elektráren. Pokud jsou leukocyty vystavovány roční dávce nepřekračující dvojnásobek přirozeného záření, vlivem záření u nich dochází k pozitivnímu vlivu na opravy poškozené DNA.

Bylo zjištěno, že nízké dávky ionizujícího záření mohou způsobit snížení vývoje nádoru. V pokusech na zvířatech (potkanech) byla potlačena tvorba metastáz, pravděpodobně stimulací funkcí NK buněk. Pozorování na lidech ukazují, že ozařování nízkými dávkami záření snižuje výskyt a úmrtnost lidí na nádorová onemocnění tím, že zvyšuje protinádorovou imunitu [25].

Léčebné účinky ionizujícího záření

Léčba ionizujícím zářením může být využita v několika formách: kurativní (úplné vyléčení), adjuvantní a neadjuvantní (chemoterapie po a před operací) a paliativní (zlepšení stavu).

Jako příklad využití nízkých dávek záření při léčbě a rekonvalescenci můžeme použít radonové lázně. V České republice se nacházejí v Jáchymově, kde se nachází i jeden z nejstarších uranových dolů – Svornost. Z tohoto dolu je čerpána voda, která obsahuje radon (izotop ^{222}Rn). Radonová voda, která se užívá ke koupelím, je zdrojem α záření, které neproniká

do krevního oběhu a záření je tedy vystaven pouze povrch těla. Pozitivní účinky radonové vody se v Jáchymovských lázních využívají u léčby onemocnění kůže, kloubů, či periferního nervového systému a páteře. Jezdí se zde také léčit pacienti po úrazech a operacích či pacienti s Bechtěrevovou chorobou [26].

Dalším příkladem využití záření při léčbě může být jev známý jako *kyslíkový efekt* (reoxygenace). Souvisí s tvorbou hydroperoxylových ($\text{HO}_2\cdot$) a superoxidových anion-radikálů ($\text{O}_2\cdot^-$), které poškozují DNA v buňkách. Produkce radikálů je zajišťována nepřímým účinkem záření. Vznikají reakcí elektronů anebo hydroxylových radikálů ($\text{H}\cdot$) s molekulou kyslíku (O_2). Využívá se u léčby hypoxických nádorů, u kterých je rychlejší růst tkáně. Vyvíjí se řidší kapilární síť, což má za následek menší prokrvení, nižší koncentraci kyslíku a s tím související nižší tvorbu radikálů. Proto jsou hypoxické nádory radioprotektivnější a hůř odpovídají na léčbu než nádory dobře prokysličené. Ozářením nádorů se zvýší produkce radikálů a usmrcením části nádorových buněk selepší prokrvení zbývající tkáně. To vede ke zvýšení senzitivity tkáně na ionizující záření, protože nádorové buňky v přítomnosti vyšší koncentrace kyslíku přecházejí do růstové fáze buněčného cyklu a stávají se tak citlivější na ionizující záření [38].

2. KYSELINA HYALURONOVÁ

2.1 Historie

Již v roce 1880 francouzský chemik Portes uvedl, že mucin objevený ve sklivci, který pojmenoval jako *hyalomucin*, má odlišné chování od ostatních mukoidů v rohovce a chrupavce. V této práci pak pokračoval Carl Marner, který zkoumal elementární složení očních tekutin a zaměřoval se především na obsah dusíku a síry. První izolaci kyseliny hyaluronové provedli Karl Meyer a John Palmer v roce 1934 ze sklivce skotu. Zjistili, že kyselina hyaluronová je složena ze dvou molekul cukrů. Název *kyseliny hyaluronové* je odvozen od řeckého slova pro sklo – *hyalos* + kyselinu uronovou. Jako kyselina byla označena z důvodu, že při první izolaci vykazovala známky slabé kyseliny. O osm let později, tj. v roce 1942, Endre Alexander Balazs jako první patentoval kyselinu hyaluronovou v pekárenství, jako náhradu vaječného bílku. V medicíně byla kyselina hyaluronová z počátku využívána především jako sklovitá náhrada při operaci očí [39].

Dříve se kyselina hyaluronová získávala např. z pupeční šňůry, z kohoutích hřebínků či z očí zvířat. Nyní (v době moderních technologií) se získává z buněčných stěn bakterií (např. z bakterií rodu *Streptococcus*) [40].

2.2 Obecná charakteristika

Kyselina hyaluronová (HA) je přirozeně vyskytující se biopolymer. Protože se za fyziologických podmínek kyselina hyaluronová nejčastěji vyskytuje ve formě solí, užívá se název hyaluronát. Setkáváme se ale i s pojmem hyaluronan, který zahrnuje všechny formy molekuly kyseliny hyaluronové. V živých organismech se vyskytuje především ve formě soli – hyaluronátu sodného, protože samotný roztok kyseliny hyaluronové je velice kyselý a dochází i k rychlé degradaci kyseliny. Hyaluronan je syntetizován v plazmatické membráně buněk a patří mezi hlavní složky tvořící extracelulární matrix tkáně obratlovců [41]. Hyaluronan je přítomný i u bakterií, ale v rostlinách, houbách a hmyzu přítomný není [40]. Vysoké koncentrace hyaluronanu můžeme najít v pojivových tkáních (např. v pupeční šňůře), synoviální tekutině, sklivci či v kůži [42]. Nezanedbatelné množství můžeme nalézt také v orgánech (v plicích či v ledvinách), mozku a svalové tkáni. Malé množství se nachází v játrech a nejnižší koncentrace je v krevním séru [43]. Protože kyselina hyaluronová, resp. hyaluronan je pro organismus nativní, neimunogenní, biokompatibilní a biodegradabilní, jeho využití je velice široké. Pro své rozličné biologické účinky je používán nejen v medicíně

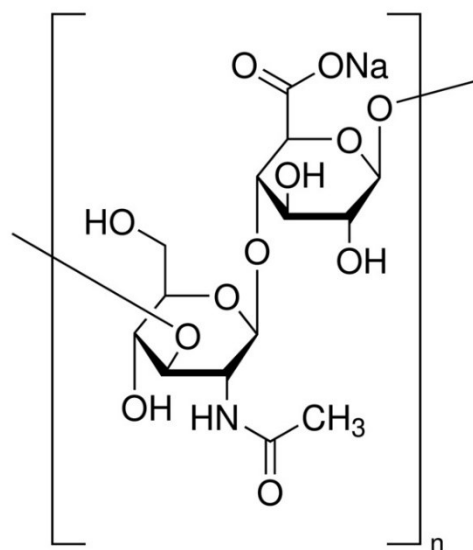
(oftalmologie, dermatologie) a biomedicině (tkáňové inženýrství), ale také farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Biologické účinky hyaluronanu závisí na jeho molekulové hmotnosti [40].

2.3 Chemické vlastnosti

Chemicky se jedná o lineární nerozvětvený polysacharid, konkrétněji jde o nesulfátovaný glykosaminoglykan (Obrázek 2). Jako jediný není tento glykosaminoglykan syntetizován v Golgiho aparátu. Je složen z dlouhého řetězce opakujících se disacharidových jednotek N-acetylglukosaminu a kyseliny glukuronové [39].

Tyto dvě pravidelně se střídající složky jsou vázány pomocí glykosidických vazeb $\beta 1 \rightarrow 4$ a $\beta 1 \rightarrow 3$. Kyselina glukuronová je oxidovaným derivátem glukózy. Podobně i N-acetylglukosamin je derivátem glukózy a vzniká přenosem acetylové skupiny na glukosamin. Kyselina hyaluronová se řadí mezi polyanionty (anionty obsahující více než jeden centrální atom). Proto se může disociovat a vázat na sebe molekuly vody (HA je vysoce hygroskopická), čímž získá gelovitou strukturu [39].

Ve vodě je kyselina hyaluronová rozpustná nezávisle na její molekulové hmotnosti [40]. Viskozita a strukturální vlastnosti roztoku kyseliny hyaluronové (popř. i hyaluronanu) závisí jak na koncentraci roztoku, tak na molekulové hmotnosti. Při nízkých koncentracích se sice jednotlivé řetězce vzájemně zamotávají, ale vede to pouze k mírné viskozitě. Koncentrovanější roztoky jsou viskóznější, než se očekává, protože řetězce mají větší šanci se zamotat [39]. Výhodou kyseliny hyaluronové je i její viskoelastická, což je schopnost materiálu tlumit mechanické vibrace [40].



Obrázek 2: Sodná sůl kyseliny hyaluronové
Převzato z [44]

2.4 Biologické vlastnosti

2.4.1 Kyselina hyaluronová v organismu

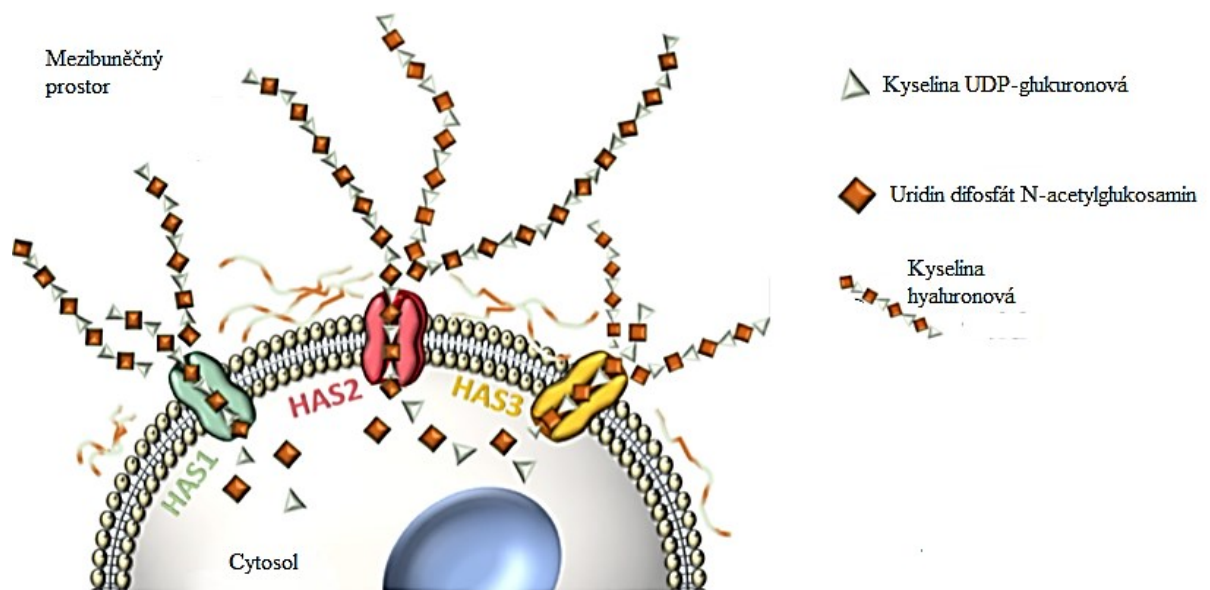
Kyselina hyaluronová (či hyaluronan) je jednou z hlavních složek extracelulární matrix (ECM). HA s vysokou molekulovou hmotností slouží v ECM jako strukturální podpora a „lešení“ [39]. Polymery vyskytující se v ECM tak využívají HA navázaná na buněčné povrchy k uspořádání struktur. Můžeme je najít v menších i větších koncentracích téměř ve všech tělních tekutinách a tkáních, protože skrze specifických a nespecifických interakcí se váže na buňky a další buněčné či biologické složky. Díky svým vlastnostem přispívá kyselina hyaluronová k udržování tkáňové homeostasy a biomechaniky [45]. Interakcí se specifickými molekulami a receptory se zapojuje i do přenosu buněčného signálu. Glykokalyx je ochranný obal povrchu buněk. Je tvořen především glykoproteiny a proteoglykany. Nachází se bezprostředně u plazmatické membrány a chrání buňky před chemickým a mechanickým poškozením [40]. Obsahuje HA a heparansulfát (GAG, účastní se procesu angiogeneze a koagulace). Pravděpodobně se zde nachází růstové faktory a extracelulární molekuly kritické pro buněčnou signalizaci. Detekována byla i intracelulární HA. Ta se nachází v několika buněčných kompartmentech – endoplazmatickém retikulu, jádru či v centrozomech [46]. Dokáže ovlivňovat regulaci buněk (adhezi a pohyb, diferenciaci a proliferaci) a zapojuje se i do procesu regenerace ran či hojení zánětu. V makrofázích, endotelových buňkách, eozinofilech a v některých epitelových buňkách kyselina hyaluronová s nízkou/střední molekulovou hmotností stimuluje genovou expresi. Je zodpovědná za hydrataci tkání a transport vody [39]. V synoviální tekutině funguje jako kloubní mazivo. Pokud je volnými radikály nebo enzymy hyaluronan degradován, synoviální tekutina ztrácí mazací schopnost. To vede ke zvýšenému opotřebování kloubů. Vysoce viskózní povaha hyaluronanu rovněž přispívá k zpomalení virového a bakteriálního průchodu pericelulární zónou, ve které je koncentrace hyaluronanu vysoká [42].

2.4.2 Syntéza a degradace HA v organismu

Syntéza, regulace a degradace HA probíhá v multiproteinovém komplexu, tzv. *hyaluronasomu*, který je spojený s membránou buněk obratlovců. Obsahuje substrát, enzymy a proteiny, které jsou potřeba jak pro syntézu, tak pro katabolismus i pro regulaci metabolismu [40].

Syntéza HA je regulovaná také geny. V lidském genomu se nachází tři geny HAS na třech různých chromozomech. Jedná se o gen *HAS1* s chromozomální lokací na 19q13.41, gen *HAS2* s lokací na 8q24.13 a gen *HAS3* s lokací 16q22.1. Tyto geny jsou částečně tkáňově a buněčně specifické [4, 47]. Gen *HAS1* (Hyaluronan syntasa 1) katalyzuje přidání monosacharidů k syntetizujícímu se polymeru. Udržuje nízké bazální hladiny syntézy HA [40]. Je vysoce exprimován ve vaječnicích, dále ve slezině, brzlíku, prostatě, varlatech a v tlustém střevě. Málo je exprimován v tenkém střevě. Gen *HAS2* katalyzuje, podobně jako *HAS1*, přidání monosacharidů k rostoucímu řetězci. Je zvláště zodpovědný za syntézu hyaluronanů s vysokou molekulovou hmotností. Je důležitý při embryonální morfogenezi srdce a může hrát roli i ve vaskulogenezi [43]. Vysoce exprimován je ve fibroblastech. Gen *HAS3*, stejně jako předchozí dva geny, i tento katalyzuje připojování monosacharidů k rostoucími řetězci [39].

Hladiny exprese *HAS* se liší během morfogeneze a při chorobných stavech. Různorodá distribuce kyseliny hyaluronové v tkáních je rozdílná během morfogeneze v jednotlivých vývojových stádiích a za patologických podmínek při chorobných stavech [48].



Obrázek 3: Molekuly kyseliny hyaluronové o různé molekulové hmotnosti vylučovány skrze hyaluronan syntasy do mezibuněčného prostoru
Převzato a upraveno z [45]

Hyaluronan je produkován především fibroblasty, keratinocyty a chondrocyty. Jeho syntéza ale také probíhá i v buňkách hladkého svalstva. Je syntetizována enzymaticky pomocí hyaluronansyntasy. Mechanismem syntézy zahrnuje prodlužování řetězce pravidelným přidáváním střídajících se jednotek N-acetylglukosaminu a kyseliny glukuronové. Pozoruhodné na syntéze HA je to, že se jedná o glykosaminoglykan u obratlovců, který není

syntetizován v Golgiho aparátu. Syntéza probíhá v cytoplazmě na vnitřním povrchu cytoplazmatické membrány, skrz kterou je protlačována do extracelulárního prostoru. Pravidelně se střídající sacharidy se poté přidávají na konec řetězce. Protože je polymer neustále protlačován skrze membránu do EMC a neshromažďuje se intracelulárně, může být syntetizován téměř neomezeně [49].

Při zánětlivých onemocněních (revmatoidní artritida) nebo degenerativních chorobách kloubů (osteoartritida) je koncentrace a molekulární velikost HA omezená. Expres *HAS1* a *HAS2* poklesla, zatímco koncentrace hyaluronidasy jsou zvýšené. S tím souvisí i průměrná molekulová velikost HA, která je nižší [39].

K degradaci kyseliny hyaluronové může docházet enzymaticky nebo neenzymaticky. Enzymatické degradace se účastní tři enzymy – hyaluronidasa, β -D-glukuronidasa a β -N-acetyl-hexosaminidasa nacházející se extracelulárním prostoru a v séru [40]. Hyaluronidasa, která spolu s ROS degraduje přibližně 30 % z 15 g hyaluronanu nacházejícího se v těle dospělého člověka, štěpí kyselinu hyaluronovou o vysoké molekulové hmotnosti na menší fragmenty. β -D-glukuronidasa a β -N-acetyl-hexosaminidasa odštěpují koncové sacharidy. Neenzymaticky dochází k degradaci chemickými reakcemi (alkalická nebo kyselá hydrolyza), ultrazvukem či změnou teploty [40].

Zbývajících 70 % hyaluronanu je lymfou přenášeno do lymfatických uzlin. Zde je HA degradován endotelovými buňkami lymfatických cév. Po vazbě hyaluronanovým receptorem LYVE-1 je pouze malá část přenesena do krevního řečiště, z nichž většina je degradována jaterními endoteliálními buňkami. Hyaluronan nacházející se v krevním řečišti je degradován v játrech, zatímco tkáňový hyaluronan je mimo buňky degradován hyaluronidasou a ROS. V buňkách jsou za degradaci zodpovědné lysosomy [50, 51].

Syntéza a degradace HA je regulována jak během embryonálního vývoje, tak u homeostatických procesů [43]. Obrat molekul HA probíhá různě rychle v závislosti místa výskytu. Poločas HA v krevním řečišti se pohybuje do několika minut, v kůži se mezi 12–24 hodinami a v chrupavce i dva až tři týdny. Degradace může probíhat enzymaticky, nebo reaktivními formami kyslíku [50].

2.4.3 Specifické funkce HA dle velikosti fragmentů

Přestože je primární struktura HA jednoduchá, její rozsah biologických funkcí je velice rozsáhlý a často i protichůdný. Většina těchto imunologických funkcí je závislá na velikosti fragmentu HA. Buňky syntetizují převážně HA o vysoké molekulové hmotnosti (2×10^5 do 2×10^6 Da). Vysokomolekulární HA je poté katabolizována či fragmentována

na kratší HA polymery. Velikost nových fragmentů je závislá na jejich zprostředkovatelích – hyaluronidázách, mechanické síle nebo oxidačním stresu. Tato činidla degradují původní HA na polymery o různých velikostech, včetně HA o nízké molekulové hmotnosti a HA oligomery [40, 52].

Za homeostatických podmínek se vyskytuje kyselina hyaluronová o větší molekulové hmotnosti ($10^4 - 10^7$ Da). Má antiangiogenní a imunosupresivní účinky a brání diferenciaci pravděpodobně potlačením mezibuněčných interakcí nebo přístupem ligandu k buněčným receptorům [52].

Středně velké a menší fragmenty bývají generovány při různých stavech poranění či v důsledku dalšího katabolismu. Vysokomolekulární HA je štěpena na molekuly o nižší hmotnosti pomocí hyaluronidáz, které jsou uvolněny umírajícími buňkami. Jsou zánětlivé, imunostimulační, vysoce angiogenní a podporují regeneraci tkání. Účinky těchto polymerů jsou přičítány signalizaci skrze HA receptor RHAMM [53].

Menší fragmenty (kratší polymery) jsou antiapoptické a slouží také jako induktory tepelného šoku. Jejich výskyt bývá v místech aktivního zánětu. Nízkomolekulární HA pravděpodobně podporuje aktivaci a zrání dendritických buněk, řídí uvolňování prozánětlivých cytokinů (TNF- α , IL-1 β , IL-6 a IL-12) [54]. Z tohoto důvodu můžeme považovat malé fragmenty HA (o velikosti oligosacharidů) jako signalizátory nebezpečí [40]. V infekčních stavech může být vysokomolekulární HA katabolizována mikrobiálními hyaluronidasami. Po odeznění zánětu a zahojení rány, jsou malé fragmenty HA odstraněny a opět začne převažovat forma HA o vysoké molekulární hmotnosti. Při chronických zánětech přetrvávají menší fragmenty HA. Nedávné studie ovšem ukazují, že nízkomolekulární HA bez endotoxinů není zánětlivá, což naznačuje, že mnoho z doposud známých faktů, které jsou přičítány HA o nízké molekulové hmotnosti, mohou náležet bakteriální kontaminaci hyaluronidas, které byly aplikovány k vytvoření menších fragmentů [40].

2.4.4 Kyselina hyaluronová v tkáních

Cirkulující kyselina hyaluronová v krvi má velice nízkou koncentraci, přibližně mezi 4-40 $\mu\text{g/l}$, nejčastěji je koncentrace okolo 15 $\mu\text{g/l}$. Zvýšené hladiny indikují různá onemocnění, včetně malignit, artritid, lupénky, a septikémie. Dále byla vyšší koncentrace zjištěna u pacientů s popáleninami, při selhání jater nebo ledvin či s nádorovým onemocněním [39].

Matrice bohatá na HA může buď usnadnit migraci buněk, nebo naopak migraci inhibovat. Výrazný účinek má na kmenové buňky (hematopoetické, embryonální

a mezenchymové) sídlící v niché. Niché je specifické mikroprostředí, které má vysokou koncentraci HA a kmenové buňky jsou zde uchovávány v klidovém stavu s nízkou proliferací.

Při embryogenezi dochází k diferenciaci buněk po odstranění HA hyaluronidasami, protože kyselina hyaluronová pomáhá udržet buňkám při embryogenezi jejich nediferenciovaný stav. Během vývoje je částečně nahrazena kolagenovými vlákny a proteoglykany. Kyselina hyaluronová může být také částečně odpovědná za imunosupresi plodu, protože její vysoké koncentrace se nacházejí jak ve fetálním oběhu a tkáních, tak v plodové vodě. Důležitou roli zde hrají receptory RHAMM, které udržují v embryonálních tkáních pluripotenci a životaschopnost kmenových buněk [43].

Důležitou funkci zastává kyselina hyaluronová v kůži. Je zodpovědná za správnou hydrataci a homeostasu [39].

Kyselina hyaluronová slouží jako základní strukturální prvek v matrici kolagenní sítě kloubní chrupavky. V matrici ale vyšší koncentrace zabírá agrekan. Je to proteoglykan, který je specificky vázán na řetězce HA pomocí speciálních proteinů. Tato komplexní struktura matrice je zodpovědná za strukturální i mechanické vlastnosti této polotuhé tkáně. Z toho důvodu volná kyselina hyaluronová není pro kloubní chrupavku příliš důležitá [42].

Jako mazivo i tlumič nárazů slouží HA obsažená v synoviální tekutině v kloubním pouzdru. V závislosti na koncentraci a molekulové hmotnosti snižuje zánětlivé a degenerativní formy artritidy. Toho se využívá i v léčbě – modifikovanou formou HA se nahradí degenerovaná HA kloubu [39].

Kyselina hyaluronová, která obklopuje nádorové buňky, souvisí s agresivitou nádoru. HA nemusí být nutně produkována samotnými nádorovými buňkami, ale často pochází z okolí nádoru. Tato kyselina hyaluronová tak chrání nádorové buňky před cytotoxickými T-lymfocyty. Dále podporuje migraci buněk a napomáhá metastatickému šíření. Udržováním mezibuněčného prostoru je usnadněna difuze živin a je stimulován růst nádorových buněk. Pokud povrchové receptory nádorových buněk interagují s HA, invazivita těchto buněk a jejich šance na přežití se ještě zvyšuje [43].

Kyselina hyaluronová vyskytující se okolo buněk (pericelulárně), např. kolem chondrocytů a epiteliálních buněk, chrání tyto buňky před lymfocyty a viry. Předpokládá se, že chondrocyty jsou chráněny HA obalem i před reaktivními formami kyslíku a dusíku (ROS a RNS), které hrají důležitou roli při zánětu. Podobně hyaluronový obal využívají i bakterie rodu *Streptococcus*, které se takto chrání před makrofágy. Zajímavostí je, že produkce HA může být v buňkách s HA receptory indukována přidáním exogenní HA [55].

2.4.5 Hyaladheriny

V místech zánětu, kde dochází i k degradaci HA, dochází k interakci mezi HA a hyaladheriny. Tyto proteiny chrání HA před katabolismem a degradací. Aby tento makromolekulární komplex mohl modulovat adhezi a aktivaci zánětlivých buněk, je nutné, aby interagoval s dalšími povrchovými proteiny, chemokiny, proteasami či růstovými faktory. Mezi hyaladheriny se řadí Inter- α -trypsin-inhibitor (I α I), TSG-6 a versikan (proteoglykan chondroitin sulfátu). Při zánětu TSG-6 katalyzuje přenos těžkých řetězců z I α I na HA. Vytvoří se tak komplex, který podporuje adhezi leukocytů a tím ovlivňuje odpověď organismu na zánět, potlačuje prozánětlivé makrofágy M1 a podporuje protizánětlivé makrofágy M2 [53].

2.4.6 Buněčné receptory

Hyaluronan se váže na buňky prostřednictvím několika receptorů – CD44, RHAMM, LYVE1 a HARE. Receptor CD44 je obvykle exprimován na lymfocytech, zatímco ostatní zmíněné receptory jsou exprimovány na jiných typech buněk. Dříve byl uváděn jako HA receptor také ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1). Bylo uváděno, že je exprimován na endoteliálních buňkách a buňkách imunitního systému a že vazba HA na ICAM-1 může ovlivnit jeho vazbu na další receptory (např. integriny). Po čase bylo vysvětleno, že identifikace ICAM-1 jako HA receptoru je chybná, protože byla založena na chybném testu ligandové vazby [53].

Receptor CD44 je brán jako hlavní receptor pro hyaluronan. Je to polymorfní transmembránový glykoprotein vázající HA na buněčném povrchu. Je v těle velice rozšířený, protože zprostředkovává buněčné interakce s HA a hraje důležitou roli ve vývoji zánětu, protože zprostředkovává migraci lymfocytů. Také se zapojuje do adheze, migrace a proliferace buněk [54].

Receptor RHAMM (Receptor for HyaluronAn Mediated Motility), známý také jako CD168, jehož prostřednictvím hyaluronan moduluje motilitu buněk a je spojován s jejich pohybem. Obvykle je RHAMM lokalizován, oproti jiným receptorům, uvnitř buňky. Váže se na biotinylovaný hyaluronan a napomáhá migrujícím fibroblastům a metastatickým nádorovým buňkám. Fibroblasy s deficitem RHAMM jsou při hojení ran neúčinné [54].

HARE (HA receptor pro endocytózu), je exprimován na buněčném povrchu sinusodiálních endoteliálních buněk. Protein HARE interaguje s HA, dermatan sulfátem a chondroitin sulfátem. K interakcím nedochází např. mezi HARE a chondroitinem

či heparinem. Protein HARE může být detekována v mnoha tkáních (játra, lymfatické uzliny, slezina či kostní dřev). HARE eliminuje GAG z oběhového a lymfatického systému [53].

LYVE-1 (extracelulární vazebná doména) je lymfaticky specifický receptor HA u lidí. Je to integrální membránový glykoprotein vázající solubilní i imobilizovaný HA. Zprostředkovává transport HA z extracelulární matrix tkáně do lymfy. Jeho přítomnost je také na endoteliálních buňkách lymfatického sinu a retikulárních buňkách v lymfatických uzlinách [43].

2.5 Biologická funkce v hojení ran a zánětů, angiogenezi a reepitelizaci

Kyselina hyaluronová (hyaluronan), je využívána také při procesu hojení ran a tvorbě jizev. Bylo zjištěno, že dlouhodobá přítomnost hyaluronanu je spojena se vzácnou kvalitou opravy fetální tkáně. Při poranění plodu zůstává v tkáni delší dobu vyšší koncentrace hyaluronanu, než je tomu při poranění u dospělých. To vede k tomu, že hyaluronan může částečně snížit ukládání kolagenu a tím vede ke snížení zjizvení [56].

Degradační produkty kyseliny hyaluronové s malou molekulovou hmotností přispívají k tvorbě jizvy. Pokud při procesu hojení byla v tekutině nacházející se v ráně nalezena kyselina hyaluronová s vysokou molekulovou hmotností, byla tvorba jizev menší [56]. To nám naznačuje, že kyselina hyaluronová s vysokou molekulovou hmotností podporuje klidový stav buněk, zatímco molekuly o nízké hmotnosti signalizují poškození tkáně a tím se zahájí odpověď organismu skrze zánět [39]. Toho se využívá i u léčby ran. Léčivé přípravky obsahující HA s vysokou molekulovou hmotností, jež jsou aplikovány lokálně v místě poškození, podporují hojení čerstvých kožních ran. Opačný účinek nastane, pokud hyaluronan odebereme (u dospělých lidí a u plodu v pozdním těhotenství), kdy nedostatek hyaluronanu povede k fibrotickému zjizvení rány [53].

Aplikace hyaluronanu podporuje nejen hojení akutních ran, ale i chronických (např. bércové vředy). Je známo, že ve většině chronických ran je přímé poškození tkáně jedním z důsledků dlouhodobého zánětu zprostředkovaného ROS a degradujícími enzymy. V takto poškozené tkáni hyaluronan zabraňuje volným radikálům v dalším poškození tkáně [56].

Protože je hyaluronan nedílnou součástí ECM, tvoří páteřní strukturu pro organizaci proteoglykanů [56]. Také tvoří asociace s kolagenem, fibrinem a dalšími molekulami. Včasná reakce na poškození tkáně zahrnuje vytvoření dočasné matrice bohaté na hyaluronan a fibrin, která podporuje příliv fibroblastů a endoteliálních buněk do místa poranění a následnou

tvorbu granulační tkáně. Jeho hydrofilní povaha napomáhá vytvořit prostředí vhodné pro migraci buněk, zatímco těmto buňkám poskytuje ochranu před volnými radikály a proteolytickým poškozením. Toto je jednou z fyzikálně-chemických vlastností polyaniontových polymerů, díky které zprostředkovává hojení akutních i chronických ran [56].

S aktivací zánětlivých mechanismů se aktivuje i mechanismus reparací. Je potřeba, aby se eliminovalo množství poškozených buněk a aktivovaly se fibroblastické mechanismy (vyvolávající tvorbu vaziva), angiogeneze, remodelace a regenerace poškozené tkáně [54]. Syntéza HA se tak podstatně zvyšuje v místech poškození nebo infekce a koncentrace HA jsou v zánětlivých tkáních značně zvýšené. K akumulaci leukocytů v místě zánětu vedou fragmenty HA, které slouží jako chemoreaktanty. Z toho důvodu se zvýší migrace zánětlivých buněk. Fyziologicky je produkce HA zvýšena v zánětlivé tkáni, patologicky je vyšší koncentrace při chronických onemocnění (nádorová onemocnění, Diabetes mellitus 2. typu, chronická zánětlivá onemocnění aj.). Akumulace HA, resp. vyšší koncentrace, je spojována s větším množstvím ECM. HA v místech poškození přispívá k migraci leukocytů, jejich proliferaci a diferenciaci [53].

Při zánětu je produkováno mnoho faktorů potřebných k hojení ran, mezi které se řadí růstové faktory, cytokiny, eikosanoidy aj. Ty podporují migraci zánětlivých buněk (T a B lymfocytů), fibroblastů a endoteliálních buněk do místa poškození tkáně [56]. TNF- α (Tumor Necrosis Factor α) je důležitý cytokin generovaný při zánětu. Tento endogenní pyrogen patří mezi reaktanty akutní fáze. Stimuluje expresi TSG-6 (TNF-Stimulated Gene 6 protein) ve fibroblastech, chondrocytech a synoviálních buňkách. TSG-6 je protein vázající hyaluronan, který hraje důležitou roli při zánětu a mj. i při ovulaci. S inhibítozem serinové proteasy I α I (Inter- α -trypsin inhibitors) vytváří stabilní komplex a zesiluje inhibiční účinek I α I na proteasovou aktivitu plasminu [56, 57]. Plasmin se podílí na aktivaci proteas vedoucí k zánětlivému poškození tkáně. Přestože je zánět nedílnou součástí při tvorbě granulační tkáně, pro fyziologickou regeneraci tkáně musí být zánět zmírněn, aby se granulační tkáň stabilizovala. Kromě toho, že hyaluronan v pozdějších fázích zánětu chrání tkáň před účinkem volných radikálů, může také působit, prostřednictvím interakcí s biologickými složkami, jako negativní zpětná vazba zánětlivé aktivace. Působení komplexu TSG-6/I α I, který může být navázán v ECM na hyaluronan, slouží jako silná negativní zpětná vazba vedoucí ke zmírnění zánětu a stabilizaci granulační tkáně v průběhu hojení [56].

Exprese CD44 a jeho interakce s HA ovlivňuje migraci polymorfonukleárních buněk (PMN) do místa zánětu. TSG-6 inhibuje odtok PMN a invazi neutrofilů do zanícených tkání.

Přestože CD44 zprostředkovává adhezi a migraci buněk do místa zánětu, jejich migraci přímo v zanícených tkáních neovlivňuje [42].

Zjistilo se, že za stav a vývoj zánětů jsou zodpovědné i další receptory HA. Konkrétně receptor RHAMM je rozhodující pro migraci makrofágů do oblasti poranění tkáně, receptor CD44 je rozhodující pro ukončení zánětlivé reakce a s ním spolupracující Toll-like receptory ovlivňují aktivaci vrozeného imunitního systému. Během zánětu je hyaluronan navázán na receptor CD44 anebo RHAMM. Poté se hyaluronan naváže na TSG-6 (Tumor nekrotizující faktor stimulovaný genem 6), který je vyvolaný zánětem a na který je navázán i I α I Inter- α -trypsin-inhibitor). To vede k ukládání hyaluronanu. Takto strukturně uložený hyaluronan spolu s versikanem dále mohou sloužit jako základna pro zánětlivé buňky [51].

Mnoho nemocí je doprovázeno zánětlivými procesy, do kterých je zapojena i degradace HA o vysoké molekulové hmotnosti. Mezi tato onemocnění patří např. osteoartróza, kožní poranění, astma či urologické malignity. Postižený pacient vykazuje často známky typické pro zánět – zčervenání, otok, teplota a bolest. To naznačuje, že postižená část těla je bolestivá, oteklá, zarudlá a je teplejší vzhledem k okolní tkáni. K těmto příznakům přispívá mimo aktivace proteolytickými enzymy i ROS. Protože HA je složena ze střídajících se monosacharidů spojených glykosidickou vazbou, je právě glykosidická vazba mezi dvěma sacharidovými pyranosylovými kruhy výhodným reakčním místem pro hydroxylový radikál (OH \cdot), což vede k depolymerizaci HA [40].

Hyaluronan může také hrát roli při kontrole angiogeneze. Bylo prokázáno, že hyaluronan s vysokou molekulovou hmotností v ECM inhibuje angiogenezi, na rozdíl od hyaluronanu o nízké molekulové hmotnosti, který podporuje angiogenezi a zvyšuje produkci kolagenu endoteliálními buňkami [43].

Důležitou funkci zastává hyaluronan i v epidermis. Jako součást ECM keratinocytů snižuje účinek volných radikálů a zajišťuje průchod živin (díky hydratovanému prostředí). Za fyziologických podmínek se zapojuje do kontroly proliferace keratinocytů stejně jako při reepitelizaci a opravy tkáně [56]. Při hojení je hyaluronan syntetizován v okrajích rány především v migrujících keratinocytech s exprimovaným receptorem CD44. Při patologických změnách, např. potlačení exprese CD44, může dojít k akumulaci HA v povrchové dermis, k morfologickým změnám a defektní proliferaci keratinocytů. Může také dojít ke zhoršení elasticity kůže či opravným mechanismům [58].

2.5.1 HA a buňky imunitního systému

Základem dobře fungujícího imunitního systému je schopnost lymfocytů adherovat a volně migrovat prostřednictvím pojivových tkání. Jednou z klíčových složek vrozeného imunitního systému je i TLR (Toll-like receptor), který rozpoznává mikrobiální i nemikrobiální molekuly. Kyselinu hyaluronovou, glykosaminoglykan v extracelulární matrix, rozpoznávají především TLR2 a TLR4 [48].

Aktivované B-lymfocyty exprimují znak CD44, čím se přímo mohou vázat na HA. Nízkomolekulární HA právě prostřednictvím CD44 podporuje chemotaxi B-lymfocytů, expresi cytokinů a hraje roli při zrání a následné produkci protilátek [53].

Aktivované T-lymfocyty mají na svém povrchu zvýšenou expresi znaku CD44, a tím i zvýšenou vazbu s HA. Je to zprostředkováno prostřednictvím aktivace p56(lck) a následnou fosforylací ZAP-70 [53]. Nereceptorová tyrosin-protein kinasa (p56(lck); Lck) hraje zásadní roli při výběru a zrání vyvíjejících se T-lymfocytů v brzlíku a ve funkci zralých T-lymfocytů. Je důležitá v signálních transdukčních drahách vázaných na T-buněčný antigen (TCR). ZAP 70 reguluje motilitu, adhezi a cytokinovou expresi zralých T-buněk. Přispívá také k vývoji a aktivaci primárních B-lymfocytů [59]. Interakce CD44 s HA také ovlivňují přežití buněk pomocí mechanismů závislých a nezávislých na Fas. Receptor Fas po vazbě s ligandem vede k apoptóze buňky. Exprese CD44 na T-lymfocytech hraje klíčovou roli v citlivosti T-lymfocytů na specifické antigeny [53].

Dalším způsobem, jakým HA přispívá k aktivaci B a T-lymfocytů, je účinek na prezentaci antigenu. Nízkomolekulární HA podporuje zrání dendritických buněk prostřednictvím účinků na signalizaci TLR (Toll-like receptor), čímž zefektivňuje funkci dendritických buněk při prezentaci antigenu [53]. Mezibuněčné interakce jsou podporovány lokalizací HA do míst imunitní synapse, což je místo kontaktu T-lymfocytu a antigen prezentující buňky. Vyšší koncentrace HA v těchto místech má za následek modulaci prezentace antigenu, zvýšení proliferace, migrace a adheze imunitních buněk. To vede zesílení imunitních odpovědí [53].

Funkcí *Treg* (regulačních T-lymfocytů) je potlačení imunity. Vysokomolekulární HA může nejen podporovat homeostasu *Treg*, zlepšovat jejich funkci a životaschopnost v nepřítomnosti antigenní aktivace, ale také může inhibovat jejich indukci v místech aktivního zánětu. Funkce HA v tomto případě závisí na fázi imunitní odpovědi. Rovnováha mezi vysoko – a nízkomolekulární HA tak ovlivňuje funkci *Treg* v zánětlivých místech tkáně. To vysvětluje, proč je v nezraněné a hojící se tkáni potlačená imunita a nezvyšuje se počet lymfocytů [60].

Receptor CD44 ovlivňuje nejen T-lymfocyty, ale také granulární buňky. Závisí na něm migrace neutrofilů do místa zánětu [42].

Navázání monoklonálních protilátek na CD44 u makrofágů, zvyšuje jejich kapacitu pro fagocytózu apoptických neutrofilů *in vitro*. Na myším modelu bylo dokázáno, že nedostatek CD44 zhoršuje odstranění apoptických neutrofilů. Smrt myši byla zapříčiněna přetrvávajícím zánětem po neinfekčním poškození plic [61]. CD44 reguluje fagocytózu zprostředkovanou lidskými makrofágy apoptických neutrofilních granulocytů, nikoli však apoptických lymfocytů [62].

3. RADIOPROTEKTIVNÍ LÁTKY

Přímé i nepřímé působení záření na buňky a tkáně způsobuje jejich poškození. Díky znalosti mechanismu působení záření je možné zkoumat, vyvíjet a dále používat různé látky, které by buňky a tkáně alespoň částečně chránily nejen před tímto zářením, ale především před jeho škodlivým působením [63].

3.1 Mechanismy působení radioprotektivních látek

Mimo radioprotekce fyzikální, kde je zahrnuto stínění záření, zvýšení vzdálenosti od zdroje záření či frakcionace dávky, máme i radioprotekci biologickou a chemickou.

Fyziologické a patofyziologické děje spolu s netoxickými látkami se využívají v radioprotekci biologické. Záměrem je navození vyšší rezistence organismu vůči ionizujícímu záření. V radioterapii se běžně využívá hypoxie, dále se do biologické radioprotekce řadí antibiotika [64, 65], vitaminy [66, 67], hormony [66] aj. Bohužel, v současnosti rozsáhlé využití biologických radioprotektiv není možné. Důvodem je nejen doba podání, která je velice rozlišná, ale i nižší účinnost oproti chemickým radioprotektivním látkám.

Účelem aplikace radioprotektivních látek je buď zvýšení odolnosti organismu vůči ionizujícímu záření, nebo naopak snížení absorpce záření. Velice důležitou roli hrají radioprotektiva při radioterapii. Radioprotektivní aktivita je závislá na mechanismech účinků i na jejich účinku na konkrétní úrovni v organismu – na molekulární úrovni, fyziologicko-biochemické a na organické úrovni [68]. Obecně radioprotektivní látky mohou snižovat tvorbu volných radikálů, vyvolávají hypoxii a aktivují buněčné radioprotektivní látky, mezi které se řadí například superoxidodismutasa. Mimo to také radioprotektivní látky posilují opravné mechanismy na úrovni DNA či inhibují signální dráhy [63].

3.1.1 Opravné a informační mechanismy v tkáních

Tkáň, která je okysličená, je náchylnější k poškození indukovaného zářením, protože přítomnost a koncentrace kyslíku ovlivňuje množství vytvoření reaktivních forem kyslíku. Hypoxie v tkáních snižuje možnost vzniku těchto reaktivních forem a tím i klesá riziko poškození indukovaného zářením. I dočasné vytvoření lokálního hypoxického prostředí dokáže před poškozením buňku ochránit. Hypoxické prostředí můžou navodit vazoaktivní aminy a jejich deriváty (serotonin a histamin), thioly (WR2721) i látky bez thiolové skupiny (5-hydroxytryptamin) [69].

Velice náchylná na poškození je deoxyribonukleová kyselina (DNA). Její poškození může vést k mutacím, vzniku nádorů a buněčné smrti. Poškození DNA se může týkat zlomů řetězce DNA, poškození bází a jejich modifikace nebo také tvorba aduktů (pozměněných nukleotidů). V buňkách funguje několik opravných mechanismů, jenž mají za úkol poškozenou DNA opravit. Patří sem přímá oprava, různé excize bází, nukleotidů, opravy zlomů ad. [63].

Dalším mechanismem působení radioprotektivních látek je jejich působení na dráhy signalizující buněčnou smrt. Po ozáření radiosenzitivních tkáních dochází k obrovské ztrátě buněk. Důvodem je aktivace signálních a apoptických drah. Signalizace proteinu p53 (funguje jako senzor poškození DNA) zvyšuje hladinu proteinu p21 (protein inhibující činnost kinas regulující buněčný cyklus), čímž je zastaven buněčný cyklus a nastává buněčná smrt (apoptóza) [63]. Látky inhibující protein p53 tedy zabraňují nadměrné apoptóze buněk, čímž je prokázán jejich radioprotektivní účinek. Mezi tyto látky se řadí orthovanadičnan sodný ($\text{Na}_3\text{VO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), který inhibuje apoptózu závislou na p53, chránil myší modely před hematopoetickým syndromem, pifithrin, který chrání před γ – zářením, aj. [70].

Zvláště je, že neozářené buňky vykazují poškození indukované ozářením – radiačně indukovaný vedlejší efekt. Předpokládá se, že důvodem je mezibuněčná, tzv. parakrinní signalizace, kdy ozářené buňky „vysílají signály“ buňkám v blízkém okolí, které ozářeny nebyly, pomocí těsných spojů. Tento typ spojení se nachází v místě, kde dochází k přiblížení membrán buněk. Konexony (poloviční kanály), které jsou tvořeny šesti konexiny (proteiny), mohou protékat ionty, organické látky či metabolity. Blokadí těchto kanálů dojde k přerušení signalizace a spojení buněk. Tím se může zastavit přenos signálu z poškozených buněk k nepoškozeným a dojde k významnému přerušení radiačně indukovaného vedlejšího efektu. Mezi látky inhibující tvorbu těsných spojů se řadí Lindan (chlorovaný cyklický uhlovodík, $\text{C}_6\text{H}_6\text{Cl}_6$), který působí endocytoticky a methylproamin, který poskytuje radioprotektivní ochranu daným i okolním buňkám [63].

3.2 Rozdělení radioprotektivních látek

Radioprotektivní látky můžeme rozdělit podle několika různých kritérií – doby účinku, mechanismu účinku, původu aj.

Dle doby účinku je rozdělujeme na krátkodobé, které účinkují pouze několik minut či hodin a dlouhodobé. Látky krátkodobé se užívají jednorázově a jejich aplikaci je možné provést opakovaně. Mohou se uplatnit při lokální radioterapii či před expozicí zářením v kontaminovaném prostředí. Látky s dlouhodobým účinkem, jejichž ochranný účinek nastupuje později, chrání organismus delší dobu. Tyto látky mohou pro dosažení optimálního účinku často vyžadovat i opakovanou aplikaci [68].

Látky můžeme rozdělit podle účinků a doby podání do tří větších skupin – radioprotektory, mitigátory záření a terapeutika. Radioprotektory jsou takové látky, které jsou dodávány před ozářením nebo v době ozáření, mitigátory jsou látky, které zmírňují účinek záření, a jsou podávány již během ozáření, či krátce po něm a terapeutika jsou aplikována po prvních příznacích [63].

Jiná klasifikace rozděluje radioprotektivní látky na radioprotektory, adaptogeny a absorbenty. Radioprotektory jsou látky, které chrání. Obvykle jsou to antioxidanty nebo sulfhydrylové sloučeniny. Adaptogeny se vyskytují přirozeně a jsou extrahovány z rostlin nebo zvířat. Ochranný účinek těchto látek se projevuje při nízkých úrovních ionizujícího záření. Jejich výhodou je malá toxicita. Mohou ovlivnit regulační systém exponovaných organismů a zesílit celkovou nespecifickou rezistenci organismu. Absorbenty chrání organismus před vnitřním zářením. Patří sem např. léky, které brání začlenění radioaktivního jódu do štítné žlázy [71].

Podle původu můžeme látky rozdělit do dvou skupin – na přírodní a syntetická. Do skupiny přírodních radioprotektivních látek můžeme zařadit například vitamíny, hormony či extrakty z bylin a rostlin. Mezi syntetické radioprotektivní látky můžeme zařadit syntetické sloučeniny s thiolovou skupinou (SH), která má radioprotektivní aktivitu, stejně jako látky bez thiolové skupiny [63].

3.2.1 Příklady radioprotektivních látek – přírodní

Vitaminy a prvky

Obecně jsou vitamíny A, C a E považovány, stejně i jako selen, za antioxidanty. Jako radioprotektivní látky fungují díky blokování šíření reakcí, jež byly iniciovány volnými radikály (ROS a RNS). Vitamin A, který je rozpuštěn v sójovém oleji [72], chrání před biologickými účinky vnitřního záření (vnitřními radionuklidy) a užívá se při léčbě radionuklidu jódem (^{131}I) u nádorového onemocnění štítné žlázy [63]. Podobně i vitamin C působí proti vnitřní expozici záření při aplikaci ^{131}I . Některé studie uvádí, že vitamin C, díky zhášení volných radikálů, snižuje frekvence výskytu chromozomálních aberací, které byly (u myši) způsobeny zářením γ [63].

Vitamin E u potkanů částečně zabraňuje enteritidě způsobenou ozářením. Samostatný vitamin E, popř. jeho kombinace s WR-3689 (aminofosforothioát), u myši zvyšuje po ozáření šanci na přežití [63]. Nedostatek stopového prvku – selenu – má za následek zvýšenou šanci na vznik různých onemocnění a chorob (nádorová onemocnění, srdeční choroby). Ve formě selenoproteinu působí, podobně jako výše zmíněné vitaminy, jako antioxidant [73]. Tím chrání před oxidačním stresem způsobeným reaktivními formami kyslíku a dusíku. Bylo pozorováno, že u pacientů s nádorovým onemocněním prsu, kterým byla indikována radioterapie, došlo ke snížení plazmatických hladin selenu a tím ke zvýšení nežádoucích vedlejších účinků záření [69].

Glutamin

Glutamin je neesenciální aminokyselina. Jeho antioxidantní účinky úzce souvisí s tvorbou glutathionu. Ten je znám svými ochrannými účinky před poškozením buněk reaktivními formami kyslíku. Terapie glutaminem napomáhá pacientům s radiační toxicitou tím, že snižuje její projevy. Mezi časté projevy radiační toxicity patří mukositida, radiační dermatitida či esofagitida. Mukositida je definována jako zánětlivé a vředové onemocnění sliznice dutiny ústní, dermatitida je onemocnění kůže a esofagitida se týká jícnu. Všechna tato onemocnění se často vyskytují u pacientů podstupující radioterapii a chemoterapii [23, 74].

Hormony

- *Melatonin*

Hormon melatonin je produkován epifýzou a je i syntetizován v rostlinách. Velice účinně zháší reaktivní formy kyslíku – konkrétně hydroxylové a peroxylové radikály. U myši zvyšuje po ozáření šanci na přežití, u potkanů zabraňuje oxidačnímu poškození jater způsobeného zářením γ snížením hladiny malondialdehydu a zvýšením hladiny glutathionu. Podobné pozitivní účinky měl melatonin i u pacientů s nádorovým onemocněním, kterým byl indikován samostatně, či v kombinaci s radioterapií [63, 66].

- *Prostaglandiny*

Prostaglandiny patří mezi látky podobné hormonům. Jsou syntetizovány téměř ve všech orgánech těla, ale oproti hormonům se nepřenášejí krví a působí pouze parakrinně. Jejich syntéze bývá často podněcována např. záněty, hormony či alergickými reakcemi. Své radioprotektivní účinky poskytují např. i kostní dřeni či zárodečným epiteliálním buňkám [63].

Metylxantin

Purinová báze xantin, se běžně nachází v různých tělesných tekutinách a tkáních (krev, moč, svaly). Mimo to jej také můžeme nalézt na v některých rostlinách. Mezi metyloxantiny se řadí kofein, theobromin, theofylin a pentoxifylin. Ve vodě rozpustná léčivá látka pentoxifylin, má velice silnou protinádorovou aktivitu. Jako samostatná látka, popř. v kombinaci s vitamínem E, zmírňuje fibrózu indukovanou ozářením [63, 75].

Fytoradioprotektivní látky

Mnoho rostlin, či sloučenin z těchto rostlin získaných, mají radioprotektivní účinky. Jejich výhodou je velice nízká toxicita a vysoká snášenlivost. Látky produkované rostlinami působí jako radioprotektiva pomocí různých mechanismů. Převážně se jedná o látky s antioxidačními účinky, dále o látky zabraňující poškození DNA, napomáhající opravám DNA nebo látky s protizánětlivým účinkem.

Fytoradioprotektivní látkami jsou např. polyfenoly, které dokážou chránit před radiační toxicitou [76]. Mezi polyfenoly se řadí polyfenoly z černého a zeleného čaje, extrakty z jinanu dvoulaločného (*Ginkgo biloba*), citrusů, máty a zázvoru. Dále zde patří i kurkumin či kyselina kávová, jenž je prekurzorem kyseliny ferulové. Flavonoidy a jejich deriváty, jsou přirozeně se

vyskytující polyfenolické sloučeniny. Tato ve vodě rozpustná barviva jsou syntetizována pouze v rostlinách. Nalezneme je především ve vyšších rostlinách a jsou zodpovědné za zbarvení květů. Mimo to je také nalezneme i v listech a kůře stromů, také v ovoci a zelenině. Působí podobně jako vitaminy – mají silné antioxidační účinky. Jejich radioprotektivní funkce tkví ve zhášení ROS, především hydroxylového radikálu. Kurkumin [77] snižuje peroxidaci lipidů a zvyšuje antioxidační účinky v lymfocytech. Má ochranné účinky proti akutní i toxické radiační dermatitidě. Kyselina kávová (3,4-dihydroxykyselinová kyselina) a její estery také dokážou chránit organismus před radiační toxicitou. Podobně jako kurkumin snižují peroxidaci lipidů, dále bylo prokázáno, že kyselina kávová chrání před poškozením DNA vyvolaným zářením a peroxidací lipidů v lidských lymfocytech periferní krve. Kyselina ferulová má protizánětlivé účinky a jako kurkumin a kyselina kávová antioxidační účinky. Významně snižuje peroxidaci lipidů a poškození DNA po expozici γ -zářením. Další přírodní látkou s radioprotektivními účinky je lykopen. Tento karotenoid patří mezi tetraterpeny a je jedním z provitaminů vitamínu A [23].

Buněčné enzymy

Za stresových podmínek se v buňkách aktivují endogenní zhášeče volných radikálů. Řadí se mezi ně superoxiddismutasa a glutathion, což jsou enzymy přeměňující volné radikály kyslíku na peroxid vodíku. Touto přeměnou chrání buňku před vlivem kyslíkových radikálů a působí tak jako radioprotektiva. Konkrétně superoxiddismutasa s kofaktorem Mn (MnSOD), která je přítomna v mitochondriích, zhásí superoxidové radikály. Ty jsou generovány během oxidační fosforylace a oxidačního stresu. Dalším krokem po převedení superoxidových radikálů na peroxid vodíku je reakce peroxidu vodíku s katalasou. Tento enzym rozkládá peroxid vodíku na vodu a kyslík – $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$.

- *Superoxiddismutasa (SOD) a komplexy kovů*

Superoxiddismutasa je přirozeně se vyskytující enzym s antioxidačními účinky. V eukaryotických buňkách používá superoxiddismutasa jako kofaktor Cu nebo Zn. Existují také varianty s Mn či Ni. Všechny formy SOD dokážou zhášet volné radikály. Řadí se mezi významné antioxidanty buněk, které chrání před reaktivními formami kyslíku [23]. SOD dokáže zhášet superoxidový radikál, který je jejím působením přeměněn na méně toxický peroxid vodíku. Nově vzniklý peroxid vodíku je přeměněn katalasou na další, méně toxické sloučeniny. Ačkoliv je SOD považována na velice silnou radioprotekční látku, její klinické

použití je velice omezené. Důvodem je krátký poločas rozpadu, vysoká molekulová hmotnost a neschopnost volného přechodu skrze buněčnou membránu [70].

- *Glutathion*

Dalším endogenním zhášedčem je glutathion. Zvýšená aktivita enzymu glutathion-S-transferasy vede ke zvýšené koncentraci redukovaného glutathionu. Ten se řadí mezi hlavní intracelulární antioxidanty, a mimo jiné také podílí na detoxifikaci některých xenobiotik Jeho syntéza probíhá v erythrocytech, kde je jeho přítomnost nezbytná pro zhášení reaktivních forem kyslíku. Glutathion jako redukční činidlo také udržuje v erythrocytech stabilitu membrány a správné oxido-redukční prostředí [63].

3.2.2 Příklady radioprotektivních látek – syntetické

Radioprotektivní látky syntetické s thiolovou skupinou

Zjistilo se, aminokyselina cystein, obsahuje thiolovou skupinu (SH), která má radioprotektivní účinky. Toho poznatku se využilo a začaly se vyvíjet syntetické sloučeniny, které právě thiolovou skupinu obsahují. Mezi vysoce účinnou sloučeninu s amino-thiolovou skupinou patří amifostin (WR-2721) [78]. Toto neaktivní proléčivo se defosforylací převede na aktivní metabolit amifostinu značeného jako WR-1065. Podle preklinických studií amifostin selektivně chrání normální buňky primárně zhášením ROS, urychlením regenerace poškozené DNA darováním vodíku a indukci buněčné hypoxie. Klinickými zkouškami se jeví tato sloučenina jako velice slibná, protože je bezpečná a nedochází u ní k žádnému toxickému hromadění v organismu. Podání této látky musí být bezprostředně před radioterapií, protože jeho poločas v plazmě nedosahuje téměř ani deseti minut. Podobně účinkuje i aminothiolový analog – PrC-210 [63].

Nitroxidy

Jako radioprotektivní látky bez thiolové skupiny se uvádějí nitroxidy s nízkou molekulovou hmotností. Nitroxid a jeho redukční produkt, hydroxylamin, chrání buňky reakcemi s jinými volnými radikály (např. ROS) před oxidačním poškozením [70]. Příkladem použití nitroxidů je tempol (TMPN, MTS-01) [79]. Díky nízké molekulové hmotnosti je schopen volně prostupovat buněčnou membránou a napodobuje působení superoxiddismutasy. Jako stabilní sloučenina může být MTS-01 schopen chránit buňky před škodlivými účinky ROS po vystavení ionizujícímu záření a poté i oxidačnímu stresu.

Lokálně aplikovaný MTS-01 může během radioterapie chránit normální tkáň před radiačně indukovanou toxicitou a vznikem např. radiační dermatitidy.

Bis-benzimidazoly

Bis-benzimidazoly jsou heterocyklické aromatické sloučeniny obsahující dvě bezimidazolové skupiny a jednu fenolovou skupinu. Radioprotetivního účinku je dosaženo skrze navázání této sloučeniny do malého žlábků šroubovice DNA. Odvozený bis-benzimidazolový DNA ligand (Hoechst-33342), který je aplikovaný intravenózně, potlačuje apoptickou odpověď a chrání i před časnou ztrátou endoteliálních buněk indukovanou zářením [63].

Fullereny

Fullereny se řadí mezi alotropy uhlíku a jsou složeny pouze ze sudého počtu uhlíkových atomů. Protože jsou prostorově svinuté do tvarů koulí či elipsoid, jsou velice odolné vůči vnějším fyzikálním vlivům. Nejstabilnějším fulleren obsahuje 60 atomů uhlíku. Tento typ má v savčím systému větší radioprotektivitu bez toxických účinků např. oproti amifostinu. Ve vodě rozpustné fullereny umí zachytit volné radikály (hydroxylové či superaniontové) a reaktivní formy kyslíku (ROS) [80].

3.3 Kyselina hyaluronová jako radioprotektivní látka

Radioprotektivní účinky HA jsou ovlivněny receptory. Patří mezi ně TLR4 a COX-2. Ve studii [2] bylo testováno poškození střevního epitele u myší. Reakcí na záření byla zvýšená exprese *HAS-1*, *HAS-2* i *HAS-3*. Tím se zvedly i plazmatické hladiny HA. Některým byla vpravena intraperitoneálně HA. Z pozorování vyplynulo, že u myší, kterým byla aplikována exogenní HA, zvyšovalo přežití krypt a snížilo apoptózu vyvolanou zářením. Dále bylo prokázáno, že při podání exogenní HA myším s deficitem COX-2, nedošlo ke zvýšení přežití krypt, ani ke snížení radiačně indukované apoptózy [2].

V jiné studii [1] byl použit zesíťovaný hyaluronanový gel. Byl použit jako oddalovací raménko při radioterapii u nádorového onemocnění prostaty. Gel byl aplikován injekčně do perirektálního tuku a jeho úkolem bylo zvýšení vzdálenosti prostaty od konečníku. Ten je na účinky radioterapie velice citlivý a následná akutní rektální toxicita se projevuje

průjmem. Závěrem této studie bylo, že zesítený hyaluronanový gel zvětšením vzdálenosti mezi rektem a prostatou snížil akutní rektální toxicitu způsobenou radioterapií [1].

Pro vývoj tkáňového inženýrství jsou důležité výsledky ve studii vlivu zesíťovacích činidel. V této studii bylo prokázáno, že při zesítení houbovitě struktury kolagen-hyaluronan pomocí EDC bylo zmírněno strukturální poškození způsobené gama zářením při sterilizaci. Také bylo dosaženo lepších fyzikálních vlastností a enzymatické stability [81].

Ve studii je prokázána radioprotektivní vlastnost zesítených HA-NPs v plicní tkáni aplikovaných před ozářením. Mimo jiné se zde také prokázala dlouhodobá stabilita nanočástic při různých teplotách i při vlivu ionizujícího záření [70].

Konjugovaná kyselina hyaluronová byla také využívána ve studii [82] jako nosič pro radioprotektivní látku – fenylester kyseliny kávové.

CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Hlavním cílem diplomové práce bylo zavedení postupů pro přípravu nanočástic na bázi kyseliny hyaluronové pro *in vivo* aplikace, včetně jejich fluorescenčního značení.

- 1) Příprava nanočástic kyseliny hyaluronové o definovaných velikostech s minimální disperzitou s využitím různé délky řetězců kyseliny hyaluronové a zesilovacích činidel.
- 2) Charakterizace připravených nanočástic pomocí základních parametrů – hydrodynamický průměr, index polydisperzity a zeta potenciál.
- 3) Zavedení metody pro značení nanočástic kyseliny hyaluronové fluorescenčními značkami včetně charakterizace nanočástic pomocí základních parametrů a intenzity záření.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Přístrojové vybavení a pomůcky

- Analyzátor velikosti nanočástic, potenciálu zeta a molekulové hmotnosti HORIBA SZ-100 včetně software (HORIBA, Ltd., Kjóto, Japonsko)
- Automatické pipety Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Denzitometrická stanice ChemiDocTM XRS+ System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Orbitální třepačka Multi Bio-3D (Biosan, Grant Instruments Ltd., Litva)
- Orbitální třepačka PSU-20i (Biosan, Grant Instruments Ltd., Litva)
- pH metr model BOECO BT-600 (BOECO, Hamburg, Německo)
- Software ImageLabTM (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Software MATLAB (The MathWorks, Inc., Massachusetts, USA)
- Stanice pro produkci redestilované vody TKA Smart2Pure (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Váhy analytické Kern ATB 220-5DM (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- Váhy analytické Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments, GmbH, Göttingen, Německo)
- Váhy laboratorní Kern 440-33N (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- Vakuový koncentrátor Christ RVC 2-18 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Německo)
- Vortex (Grant-bio, Cambrige, Velká Británie; VELP Scientifica Srl, Usmate Velate, Itálie)

4.2 Příprava dialyzačních membrán

Chemikálie:

- Kyselina sírová p. a. 96% (H_2SO_4 , Penta, Chrudim, ČR)
- Sulfid sodný ($\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Destilovaná voda

Použité roztoky:

- Roztok kyseliny sírové 0,2%
- Roztok sulfidu sodného 0,3%
- Destilovaná voda

Potřeby:

- Dialyzační membrána z regenerované celulosy (cut-off 12,5 – 13 kDa, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Postup:

Dialyzační membrány byly nastříhány na větší kusy (dle potřeby). Membrány byly ponořeny do destilované vody, ve které se nechaly minimálně 1,5 hodiny, popř. do druhého dne. V průběhu bobtnání byly připraveny roztoky, které jsou potřebné k úpravě membrán – 0,3% roztok sulfidu sodného a roztok 0,2% kyseliny sírové. Roztok sulfidu sodného byl zahříván a poté udržován při teplotě ± 80 °C. Roztok kyseliny sírové se nezahřívá. Dále byly připraveny dvě nádoby s dostatečným množstvím destilované vody, která byla zahřáta a udržována při teplotě ± 60 °C.

Po nabobtnání dialyzačních membrán v destilované vodě, se opatrně skleněnou tyčinkou přendaly do připraveného roztoku sulfidu sodného. Po jedné minutě byly membrány skleněnou tyčinkou přendány do nádoby s horkou destilovanou vodou, kde se dvě minuty proplachovaly od nadbytečného sulfidu.

Následovalo přenesení membrán do roztoku kyseliny sírové, ve kterém byly ponechány přibližně minutu. Poslední propláchnutí membrán probíhalo v horké destilované vodě.

Nakonec byly takto připravené dialyzační membrány opatrně přeneseny do redestilované vody a uchovávány v lednici při 4-8 °C.

4.3 Příprava nanočástic kyseliny hyaluronové

4.3.1 Příprava nanočástic kyseliny hyaluronové karbodiimidovou metodou

Chemikálie:

- Kyselina hyaluronová ze *Streptococcus equi* (HA, Mw 1,8 MDa, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina hyaluronová ze *Streptococcus zooepidemicus* (HA, Mw 30 kDa, Contipro a.s., Dolní Dobrouč, ČR)
- Kyselina hyaluronová ze *Streptococcus zooepidemicus* (HA, Mw 170 kDa, Contipro a.s., Dolní Dobrouč, ČR)
- N-(3- dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid (EDC, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Dihydrazid kyseliny adipové (AAD, Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- Aceton p. a. (Penta, Chrudim, ČR)
- Chlorid sodný (NaCl, lach:ner, Neratovice, ČR)
- Redestilovaná voda

Použité roztoky:

- Roztok kyseliny hyaluronové (2,5 mg/ml)
- Roztok EDC (koncentrace dle potřeby, připravit vždy čerstvý)
- Roztok AAD (koncentrace dle potřeby)
- Roztok NaCl (0,9%)

Základní postup:

Do skleněné lahvičky s teflonovým víčkem bylo pipetováno 1,2 ml zásobního roztoku HA. Toto množství odpovídalo přibližně 3 mg HA. Za stálého míchání bylo postupně přikapáváno 2,04 ml acetonu. Po tomto přídávku acetonu se směs nechala za stálého míchání na orbitální třepačce inkubovat 15 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí inkubační doby byl postupně přidán roztok EDC a roztok AAD, oba o původní koncentraci 1,2 mg/30 μ l. V modifikovaných postupech se koncentrace a poměr roztoků měnil. Za každým nově přidaným roztokem musela být směs dobře homogenizována. Po promíchání se směs nechala inkubovat 30 minut na orbitální třepačce při laboratorní teplotě. Následovaly tři jednotlivé přídávky acetonu o objemech 1,22 ml. Aceton byl přidáván ke směsi po kapkách za stálého

míchání, a po každém přídavku následovala inkubace (10 – 30 minut). Po poslední inkubaci byl obsah lahvičky převeden do plastových zkumavek. Zkumavky byly vloženy do vakuového koncentrátoru, kde byl odpařením odstraněn přebytečný aceton při teplotě 50 °C o časovém intervalu závislém na objemu roztoku. Koncentrovaná směs, již zbavená většiny acetonu, byla převedena do předem připravených dialyzačních membrán, které byly opatřeny svorkami. Dialyzační membrány byly vloženy do dialyzačního roztoku (0,9% NaCl). Dialýza probíhala přes noc do druhého dne při laboratorní teplotě za stálého míchání na orbitální třepačce. Výměna dialyzačního roztoku proběhla cca po 3-4 hodinách od počátku dialýzy. Druhý den byla dialýza ukončena a obsah membrán byl převeden do plastových zkumavek. Zaznamenal se objem jednotlivých vzorků a vypočítala se předpokládaná koncentrace nanočástic. Zkumavky byly popsány a uchovávány v lednici při 4-8 °C. U takto připravených částic byly měřeny zadané parametry.

4.3.2 Příprava nanočástic kyseliny hyaluronové pomocí zesíťení bis(3-aminopropyl)aminem

Chemikálie:

- Kyselina hyaluronová (HA, Mw 1,8 MDa, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- bis(3-aminopropyl)amin (BAPA) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N-(3- dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid (EDC, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Hydroxid sodný p. a. (NaOH, Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina chlorovodíková p. a. (HCl, Penta, Chrudim, ČR)
- Chlorid sodný (NaCl, lach:ner, Neratovice, ČR)

Použité roztoky:

- Roztok kyseliny hyaluronové (Mw 1,8 MDa, 2,5 mg/ml)
- Roztok 1% bis-(3-aminopropyl)amin (pH 5,5; upravit 10M NaOH popř. 6M HCl)
- Roztok EDC (2,4 mg/30 μ l, připravit vždy čerstvý)
- Roztok 0,1M hydroxidu sodného
- Roztok 6M kyseliny chlorovodíkové
- Roztok NaCl (0,9%)

Postup:

Do skleněné vialky s teflonovým víčkem bylo odpipetováno 1,2 ml předpřipraveného zásobního roztoku kyseliny hyaluronové (Mw 1,8 MDa) o koncentraci 2,5 mg/ml. Toto množství odpovídá přibližně 3 mg kyseliny hyaluronové. K zásobnímu roztoku byl přidán ředící roztok (redestilovaná voda nebo acetátový pufr o pH 5,5) o objemu 1,8 ml. K roztoku byl za stálého míchání po kapkách přidán roztok EDC (2,4 mg/30 μ l) a směs byla dobře promíchána. Poté byl po kapkách přidán roztok BAPA, který zde fungoval jako zesítovací činidlo (pH upraveno 10M NaOH popř. 6M HCl na pH 5,5). Opět byla směs promíchána a inkubována na orbitální třepačce při laboratorní teplotě. Délka inkubace byla zvolena od 30 do 90 minut. Vznikl opaleskující roztok, který byl dialyzován v dialyzačních membránách do 0,9% NaCl. Dialýza probíhala přes noc s jednou výměnou dialyzačního roztoku. Po ukončení dialýzy byl obsah membrán převeden do plastových zkumavek, zaznamenal se objem jednotlivých vzorků, vypočítala se předpokládaná koncentrace nanočástic kyseliny hyaluronové. Následně byly vzorky uchovávány v lednici při teplotě 4-8 °C.

4.4 Značení nanočástic

4.4.1 Značení nanočástic fluoresceinem

Chemikálie:

- Fluorescein sodná sůl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N-(3- dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid (EDC, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Dihydrazid kyseliny adipové (AAD, Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- Chlorid sodný (NaCl, lach:ner, Neratovice, ČR)

Použité roztoky:

- Suspenze nanočástic kyseliny hyaluronové
- Roztok fluoresceinu 1 mg/ml
- Roztok EDC (koncentrace dle potřeby, připravit vždy čerstvý)
- Roztok AAD (koncentrace dle potřeby, vždy připravit čerstvý)
- Roztok NaCl (0,9%)

Postup:

Množství fluoresceinu bylo zvoleno dle množství nanočástic tak, aby byl zachován jejich poměr. Na deset dílů nanočástic připadl jeden díl fluoresceinu.

Nejdříve byl k roztoku fluoresceinu přidán roztok EDC, aby došlo k jeho preaktivaci. Množství EDC se odvíjelo od množství fluoresceinu. Používalo se stejné množství EDC, jako bylo množství nanočástic, aby i zde byl zachován poměr, kde na jeden díl fluoresceinu připadlo deset dílů EDC.

Z důvodu zachování stability fluoresceinu byly všechny roztoky uchovávány ve tmě. Směs fluoresceinu a EDC byla promíchána a poté následovala 10minutová inkubace na orbitální třepačce při laboratorní teplotě.

Po skončení inkubace se k roztoku přidal roztok AAD. Množství AAD bylo stejné, jako množství EDC. Připravená směs se opět dobře promíchala a nechala inkubovat na orbitální třepačce při laboratorní teplotě 5 minut.

Jako se pomocí EDC preaktivoval fluorescein, bylo nutné obdobným způsobem preaktivovat i připravené nanočástice. Dle zvoleného množství nanočástic se přidal roztok EDC tak, aby byl zachován poměr 1 : 4 – na jeden díl nanočástic připadly čtyři díly EDC, směs se promíchala a opět se nechala inkubovat na orbitální třepačce při laboratorní teplotě.

K takto preaktivovaným nanočásticím se přidal fluorescein. Nová směs nanočástic a fluoresceinu se hodinu inkubovala na orbitální třepačce při laboratorní teplotě.

Po ukončení inkubace byly fluorescenčně značené nanočástice dialyzovány do roztoku 0,9% NaCl přes noc na orbitální třepačce při laboratorní teplotě ve tmě, s výměnou dialyzačního roztoku po 3-4 hodinách. Následující den byl dialyzovaný roztok převeden do plastových zkumavek, zaznamenal se objem a značené částice byly dále uchovávány ve tmě v lednici při teplotě 4-8 °C.

Poměry reagensů a nanočástic (NPs):

NPs : fluorescein	10:1
EDC : fluorescein	10:1
AAD : fluorescein	10:1
NPs : EDC	1:4

4.4.2 Značení nanočástic neoxidovaným FITC

Chemikálie:

- Fluorescein isothiokyanát isomer I (FITC, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N,N-dimethylformamid (DMF, Penta, Chrudim, ČR)
- N-(3- dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid (EDC, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Dihydrazid kyseliny adipové (AAD, Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- Chlorid sodný (NaCl, lach:ner, Neratovice, ČR)

Použité roztoky:

- Suspenze nanočástic kyseliny hyaluronové
- Roztok FITC (1 mg/1ml DMF)
- Roztok EDC (0,5 mg /40 µl, připravit vždy čerstvý)
- Roztok AAD (0,5 mg /40 µl, připravit vždy čerstvý)
- Roztok 0,9% NaCl

Postup:

Byl připraven zásobní roztok FITC koncentrací 1 mg/ml DMF.

Nanočástice se preaktivovaly přidáním roztoku EDC (0,5 mg /40 µl). Směs se nechala inkubovat 10 minut na orbitální třepačce při laboratorní teplotě. Poté byl k nanočásticím přidán roztok AAD (0,5 mg /40 µl) a následná inkubace trvala 5 minut za stálého promíchávání na orbitální třepačce a za laboratorní teploty.

K připraveným částicím byl přidán FITC v poměru 1 : 10 (jeden díl FITC a deset dílů nanočástic) a nově vzniklá směs se inkubovala přes noc ve tmě na orbitální třepačce při laboratorní teplotě. Po ukončené inkubaci byly nanočástice přepipetovány do dialyzačních membrán a dialyzovány do 0,9% NaCl. Dialýza probíhala jako u předchozích značených nanočástic přes noc ve tmě na orbitální třepačce při laboratorní teplotě. Roztok značených nanočástic po ukončení dialýzy byl přepipetován do plastových zkumavek. Objem byl zaznamenán a značené nanočástice byly dále uchovávány v lednici při teplotě 4-8 °C.

4.4.3 Značení nanočástic oxidovaným FITC

Chemikálie:

- Fluorescein isothiokyanát isomer I (FITC, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N,N-dimethylformamid (DMF, Penta, Chrudim, ČR)
- Jodistan sodný (NaIO_4 , lach:ner, Neratovice, Česká republika)
- N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid (EDC, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Dihydrazid kyseliny adipové (AAD, Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- Chlorid sodný (NaCl , lach:ner, Neratovice, ČR)

Použité roztoky:

- Suspenze nanočástic kyseliny hyaluronové
- Roztok FITC (1 mg/1ml DMF)
- Roztok EDC (0,5 mg /40 μl , připravit vždy čerstvý)
- Roztok AAD (0,5 mg /40 μl , připravit vždy čerstvý)
- Roztok 0,2M NaIO_4
- Roztok 0,9% NaCl

Postup:

Postup v případě značení nanočástic oxidovaným FITC je obdobný, jako u neoxidovaného. Preaktivace nanočástic pomocí EDC (0,5 mg /40 μl) a následného přidavku AAD (0,5 mg /40 μl) probíhala stejným postupem a za stejných podmínek. Rozdíl je pouze v oxidaci FITC pomocí jodistanu sodného.

Do plastové mikrozkušavky bylo k danému množství zásobního roztoku FITC přidáno stejné množství 0,2M NaIO_4 , aby výsledná koncentrace NaIO_4 byla 0,1M. Tato směs byla inkubována 15 minut ve tmě na orbitální třepačce při laboratorní teplotě.

Oxidovaný FITC se přidal k nanočásticím (opět poměr 1:10) a směs byla inkubována přes noc ve tmě za stálého promíchávání na orbitální třepačce při laboratorní teplotě. Po ukončení inkubace následovala jako v předchozích případech dialýza do 0,9% roztoku NaCl . Roztok nanočástic byl po dialýze převeden do zkumavek. Zaznamenal se objem a roztok značených nanočástic byl ve tmě uchován v lednici při 4-8 °C.

4.5 Měření hydrodynamického průměru a zeta potenciálu připravených nanočástic

Roztoky:

- Suspenze nanočástic kyseliny hyaluronové
- Roztok 0,9% NaCl
- Redestilovaná voda

Postup:

Pro měření parametrů nanočástic bylo nutné připravit si roztok nanočástic o koncentraci 250 µg/1,5 ml. Potřebný objem roztoku pro měření hydrodynamického průměru nanočástic byl pipetován do plastových kyvet a doplněn 0,9% roztokem NaCl do konečného objemu 1,5 ml. Pro měření zeta potenciálu byl použit roztok nanočástic ředěný redestilovanou vodou z důvodu ovlivnění výsledků při použití roztoku NaCl a byly použity speciální kyvety určené pro měření zeta potenciálu. Byly nastaveny parametry analýzy dle návodu vzhledem k matici vzorku a jeho charakteristice.

4.6 Měření intenzity fluorescence

Použité roztoky:

- Roztoky značených nanočástic kyseliny hyaluronové
- Roztok fluoresceinu (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
- Roztok fluorescein isothiokyanátu (FITC, 2 $\mu\text{g}/1\text{ml DMF}$ nebo 1 $\mu\text{g}/1\text{ml DMF}$)
- Roztok 0,9% NaCl
- Redestilovaná voda

Postup:

Do mikrotitrační destičky pro osmibodovou kalibrační řadu byl do jamek napipetován roztok fluoresceinu (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) o objemech od 0,63 μl , do 50 μl , což odpovídá množství od 1,25 ng do 100 ng fluoresceinu v jedné jamce. Pro kalibrační řadu fluorescein isothiokyanátu se pipetoval roztok od 1,25 μl do 100 μl FITC (1 $\mu\text{g}/\text{ml DMF}$), což odpovídá množství od 2,5 ng do 100 ng FITC v jedné jamce. V případě potřeby vyšších koncentrací u FITC se užilo rozmezí od 2,5 μl do 100 μl roztoku FITC (1 $\mu\text{g}/\text{ml DMF}$) a do jamky navíc bylo pipetováno 100 μl roztoku FITC o koncentraci 2 $\mu\text{g}/1\text{ml DMF}$, což odpovídá koncentraci 200 ng FITC na jamku. Každá tato jamka byl doplněna fyziologickým roztokem do konečného objemu 100 μl .

Z rovnice regrese se nejdříve vypočítalo množství fluorescenční značky na určité množství částic. Tento poměr se dále přepočítal jako hmotnost značky na 1 mg nanočástic kyseliny hyaluronové.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Princip měření analyzátoru Horiba SZ-100

- *Hydrodynamický průměr*

Analýza velikosti částic se provádí dynamickým rozptylem světla (DLS, Dynamic Light scattering). Rozsah měřitelných velikostí se pohybuje mezi 0,3 nm – 8 μm. Dolní hranice je ovlivněna koncentrací roztoku, intenzitou rozptylu světla procházejícího vzorkem a přítomností velkých částic. Horní hranice je ovlivněna hustotou. Měření dynamickým rozptylem světla není ovlivněno gravitační silou, protože výsledky vychází z Brownova pohybu částic. Ten je náhodný a závisí na velikosti částic. Čím jsou částice větší, tím je jejich pohyb pomalejší. Hydrodynamický průměr je veličina získaná z výpočtu a ukazuje, jakou mají částice velikost [85].

Aby bylo dosaženo přesnějších výsledků, každý vzorek byl proměřován analyzátozem ve 12 až 15 opakováních. Z naměřených hodnot se vypočítal jejich průměr a směrodatná odchylka.

- *Index polydisperzity (PI)*

Disperzita je definována jako míra neuniformity. Její velikost se dá vypočítat z poměru hmotnostně střední molární hmotnosti a číselně (početně) střední molární hmotnosti. Udává rozdělení molekulových hmotností v daném vzorku.

- *Zeta potenciál*

Zeta potenciál označuje elektrokinetický potenciál působící mezi povrchem částic a okolním roztokem. Využívá se jako indikátor stability koloidních disperzí. Měření zeta potenciálu analyzátozem Horiba SZ-100 probíhá skrze vstřík vzorku do jednorázového článku. Poté následuje měření elektroforetické mobility částic a z hodnot se vypočítá zeta potenciál [86].

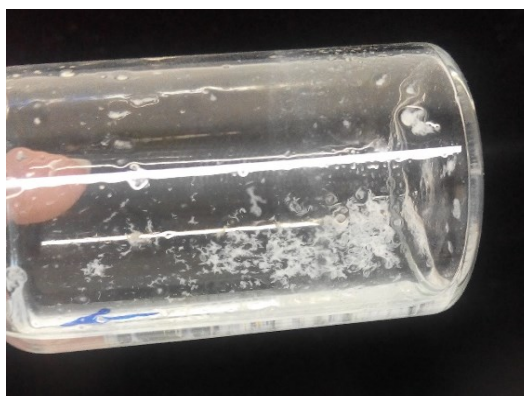
5.2 Výsledky a diskuze pro modifikace postupu přípravy nanočástic karbodiimidovou metodou

5.2.1 Podmínky přípravy nanočástic kyseliny hyaluronové

Principem přípravy nanočástic je zesítnění kyseliny hyaluronové pomocí různých chemických látek. Vhodným provedením je zesítnění skrze karboxylové skupiny hlavního řetězce kyseliny hyaluronové karbodiimidem a dihydrazidem kyseliny adipové [83, 84].

Protože je kyselina hyaluronová rozpustná ve vodě, k precipitaci nanočástic docházelo v organickém rozpouštědle, v tomto případě v acetonu. Proces byl proveden ve skleněné vialce s víčkem, který měl teflonovou vložkou. Teplota, stejně jako tlak, vlhkost, či saturace prostředí kyslíkem nebyla nijak regulována, takže je pravděpodobné, že i tyto parametry mohou ovlivňovat konečné výsledky. Pro přípravu zásobního roztoku kyseliny hyaluronové o koncentraci 2,5 mg/ml byl použit hyaluronan sodný o molekulové hmotnosti 1,8 MDa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Po prvním přidavku acetonu a homogenizaci směsi s kyselinou hyaluronovou, se po inkubační době opatrně po kapkách přidal roztok EDC a následně roztok AAD. Jejich množství je konkrétně rozvedeno níže. Roztok karbodiimidu preaktivoval karboxylové skupiny na hlavním řetězci kyseliny hyaluronové, na které se poté navázal dihydrazid kyseliny adipové.

Důležitou částí byly krokové přidavky acetonu. Jednotlivé objemy se musely přidávat po kapkách za stálého míchání. Pokud se celý objem přidavku acetonu přidal najednou popř. rychle, kyselina hyaluronová nezačala dle předpokladů nanoprecipitovat, ale vytvořily shluky precipitované kyseliny hyaluronové – od malých, okem téměř nepostřehnutelných vláken podobných lidskému vlasu, až po bílé shluky gelovité struktury (Obrázek 4).



Obrázek 4: Gelovité shluky kys. hyaluronové vzniklé nesprávným přidavkem acetonu
Foto: K. Krupová

5.2.2 Zesíťení HA-nanočástic karbodiimidovou metodou – modifikace postupu – poměr reagičí EDC a AAD – 1 : 1

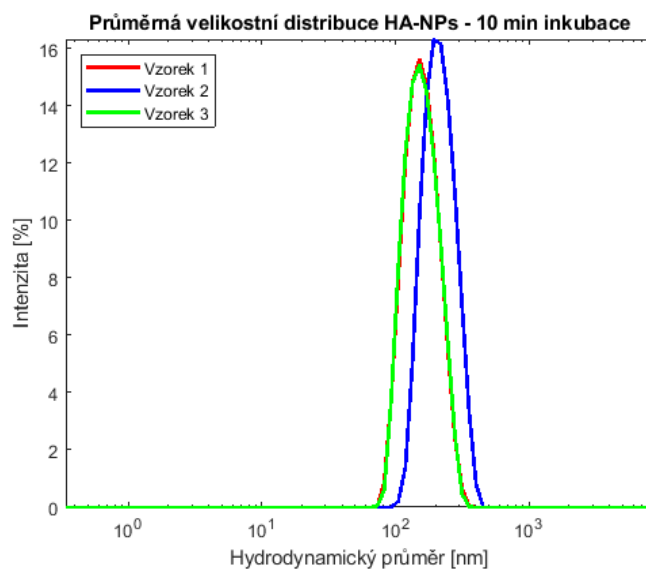
- *Inkubační doba mezi přídavky acetonu – 10 minut*

Vzorky nanočástic kyseliny hyaluronové byly připraveny ve třech provedeníích podle základního postupu s poměrem reagičí EDC a AAD 1 : 1. Na přípravu 3 mg částic bylo potřeba 1,2 mg/ 30 μ l roztoku EDC a 1,2 mg/ 30 μ l roztoku AAD. Mezi krokovými přídavky acetonu byla zvolena inkubační doba o délce trvání 10 minut, což je nejkratší zvolený interval délky inkubace. Jednotlivé vzorky byly připraveny nezávisle na sobě. Naměřené hodnoty pro tyto nanočástice byly získány analýzou DLS a jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 1 a Graf 1). Velikosti nanočástic připravených s 10minutovou inkubační dobou mezi krokovými přídavky acetonu mají průměrnou hodnotu 130,48 nm se směrodatnou odchylku 2,84 nm. Průměrná hodnota indexu polydisperzity je 0,35. Do průměrů nebyly započítány hodnoty vzorku 2, protože jeho velikost je v porovnání s hodnotami vzorku 1 a 3 mnohem větší.

Tabulka 1: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic připravených s 10minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu se poměrem reagentů EDC a AAD 1:1

	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Průměrné hodnoty
Hydrodynamický průměr[nm]	132,95	170,74	128,00	130,48
SD hydr. průměru [nm]	2,34	3,70	3,34	2,84
Index polydisperzity	0,33	0,36	0,36	0,35
SD indexu polydisperzity	0,039	0,069	0,031	0,035

Graf 1: Výsledky DLS měření HA-nanočástic připravených s 10minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu se poměrem reagentů EDC a AAD 1:1



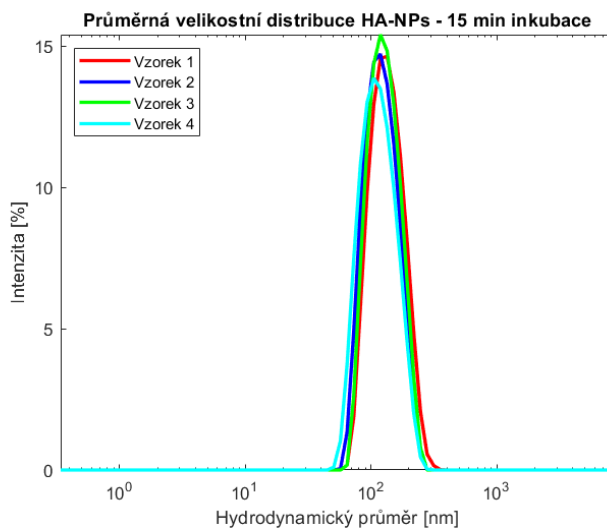
- *Inkubační doba mezi přidavky acetonu - 15 minut*

Nanočástice kyseliny hyaluronové byly podle tohoto modifikovaného postupu – prodloužení inkubační doby mezi krokovými přidavky acetonu na 15 minut – připraveny ve čtyřech provedeních. Příprava jednotlivých vzorků probíhala nezávisle na sobě podle základního postupu. Poměr reagentů EDC a AAD byl 1 : 1. Podle záznamů z DLS měření (Tabulka 2 a Graf 2) se experimentálně zjistilo, že prodloužením inkubační doby se zmenšil průměr připravených nanočástic na 109,41 nm. Snižil se i index polydisperzity na průměrnou hodnotu 0,29.

Tabulka 2: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek hyaluronanových nanočástic připravených s 15minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu se poměrem reagentů EDC a AAD 1:1

	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Průměrné hodnoty
Hydrodynamický průměr[nm]	115,15	107,83	115,02	99,66	109,41
SD hydr. průměru [nm]	3,50	1,13	1,29	9,88	3,95
Index polydisperzity	0,37	0,23	0,25	0,29	0,29
SD indexu polydisperzity	0,032	0,031	0,037	0,025	0,031

Graf 2: Výsledky DLS měření HA-nanočástic připravených s 15minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu se poměrem reagentů EDC a AAD 1:1



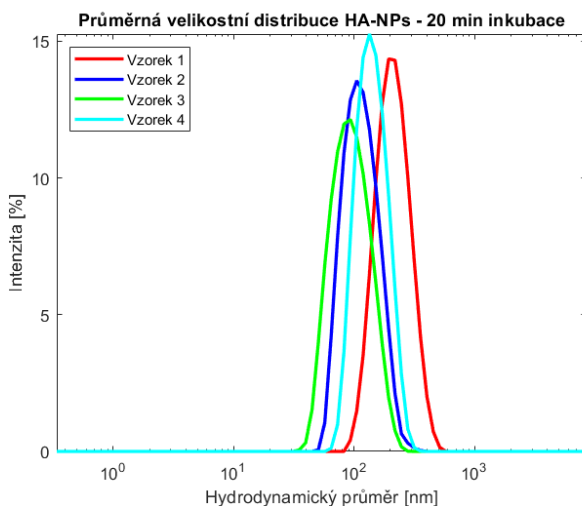
- Inkubační doba mezi přidavky acetonu - 20 minut

Další modifikací základního postupu, prodloužení inkubační doby mezi krokovými přidavky acetonu na 20 minut, se připravily na sobě nezávisle čtyři vzorky. Byl dodržen stanovený poměr reagensů EDC a AAD 1 : 1. Dle analýzy DLS (Tabulka 3 a Graf 3) se takto modifikovaným postupem podařilo připravit vzorky s rozlišnými velikostmi přibližně od 78,13 nm do 148,24 nm s indexy polydisperzity od 0,29 do 0,51. Přestože byl vzorek 4 připravován v šestinásobném množství, velikost nanočástic byla k průměrným hodnotám 110,39 nejbliže.

Tabulka 3: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic připravených s 20minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu se poměrem reagensů EDC a AAD 1:1

	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Průměrné hodnoty
Hydrodynamický průměr[nm]	148,24	93,68	78,13	121,49	110,39
SD hydr. průměru [nm]	4,53	2,37	2,69	2,13	2,93
Index polydisperzity	0,51	0,32	0,29	0,32	0,36
SD indexu polydisperzity	0,027	0,028	0,037	0,039	0,033

Graf 3: Výsledky DLS měření HA-nanočástic připravených s 20minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu se poměrem reagensů EDC a AAD 1:1



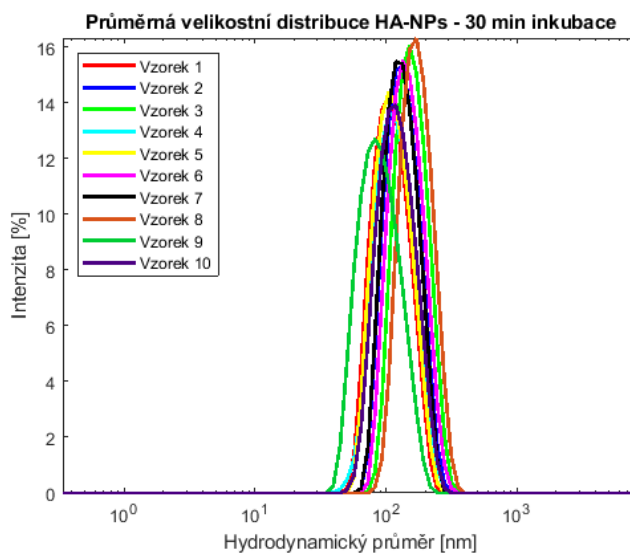
- *Inkubační doba mezi přidavky acetonu - 30 minut*

Nejvyšší počet opakování přípravy nanočástic proběhl u experimentu s modifikovaným základním postupem, ve kterém byla inkubační doba mezi krokovými přidavky acetonu prodloužena na 30 minut. Celkově bylo s touto délkou inkubační doby a poměrem EDC a AAD 1 : 1 připraveno deset vzorků.

Podle tohoto postupu se podařilo připravit nanočástice s hydrodynamickým průměrem přibližně od 80 nm do 151 nm a indexem polydisperzity od 0,25 do 0,37. Tyto hodnoty PI se dají považovat za srovnatelné. Vzorky nanočástic byly podrobeny analýze DLS. Konkrétní hodnoty pro jednotlivé vzorky jsou uvedeny v záznamech výsledků DLS (Tabulka 4A, 4B a Graf 4).

Předpokládalo se, že prodloužením inkubační doby mezi přidavky acetonu se velikost nanočástic zmenší. Těmito experimenty se tento předpoklad u všech vzorků nepotvrdil. Důvodem může být příprava nanočástic ve větším měřítku (scale-up), kdy pro větší objemy musí být upraveny a nalezeny nové optimální podmínky.

Graf 4: Výsledky DLS měření HA-nanočástic připravených s 30minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu se poměrem reagentů EDC a AAD 1:1



Tabulka 4A: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic připravených s 30minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu se poměrem reagensů EDC a AAD 1:1

	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Vzorek 5	Vzorek 6
Hydrodynamický průměr[nm]	98,68	122,80	141,01	108,33	102,11	126,42
SD hydr. průměru [nm]	1,37	4,68	4,22	22,56	1,01	2,46
Index polydisperzity	0,25	0,34	0,34	0,33	0,33	0,33
SD indexu polydisperzity	0,028	0,037	0,037	0,042	0,022	0,035

Tabulka 4B: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic připravených s 30minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu se poměrem reagensů EDC a AAD 1:1

	Vzorek 7	Vzorek 8	Vzorek 9	Vzorek 10	Průměrné hodnoty
Hydrodynamický průměr[nm]	121,33	150,81	80,52	104,08	115,61
SD hydr. průměru [nm]	3,21	4,61	2,07	10,00	5,62
Index polydisperzity	0,31	0,37	0,25	0,31	0,32
SD indexu polydisperzity	0,037	0,028	0,033	0,024	0,032

Vzorky 1, 2, 3 a 4 byly připraveny podle modifikovaného postupu nezávisle na sobě. Vzorky 5-6, 7-8 a 9-10 byly připraveny v doubletech, přičemž každá dvojice byla připravena nezávisle na ostatních.

Vzorek 1 byl připraven v množství podle základního postupu (předpokládaný výtěžek 3 mg HA-NPs), vzorek 4 byl připraven ve trojnásobném množství (předpokládaný výtěžek 9 mg HA-NPs). Vzorky 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 a 10 byly připraveny v množství 7x větším oproti základnímu postupu.

5.2.3 Zesíťení HA-nanočástic karbodiimidovou metodou – modifikace postupu – poměr reagií EDC a AAD – ½ : 1

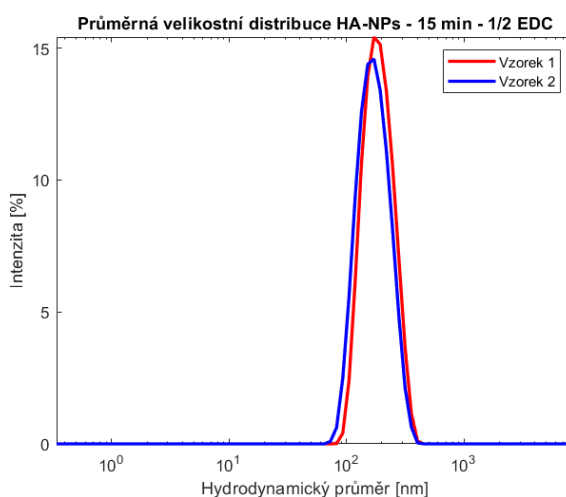
- Inkubační doba mezi přidavky acetonu nanočástic připravených s upraveným množstvím EDC - 15 minut

Pro zjištění vlivu jednotlivých reagií na parametry připravovaných nanočástic se měnil poměr činidel EDC a AAD. Pro tento modifikovaný postup bylo zvoleno poloviční množství EDC oproti původnímu. Množství AAD na přípravu 3 mg nanočástic bylo zachováno. Poloviční množství EDC tedy činilo 0,6 mg/ 30 μ l, množství zesíťovacího činidla AAD bylo 1,2 mg/ 30 μ l. Inkubační doba mezi třemi krokovými přidavky acetonu byla zvolena 15 minut. Vzorky nanočástic byly analyzovány metodou DLS a výsledné hodnoty jsou uvedeny v záznamech (Tabulka 5 a Graf 5). Přestože byly nanočástice připraveny pouze ve dvou na sobě nezávislých provedeních, výsledné velikosti nanočástic jsou srovnatelné.

Tabulka 5: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydispersity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic připravených s 15minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu a upraveným množstvím EDC

	Vzorek 1	Vzorek 2	Průměrné hodnoty
Hydrodynamický průměr[nm]	143,38	136,65	140,02
SD hydr. průměru [nm]	6,81	21,72	14,26
Index polydispersity	0,53	0,44	0,48
SD indexu polydispersity	0,090	0,042	0,066

Graf 5: Výsledky DLS měření HA-nanočástic připravených s 15minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu a upraveným množstvím EDC



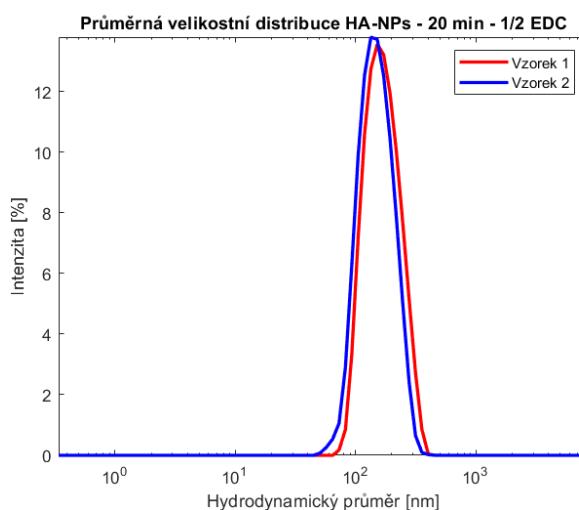
- Inkubační doba mezi přidavky acetonu nanočástic připravených s upraveným množstvím EDC - 20 minut

Další modifikací u přípravy nanočástic s polovičním množstvím EDC bylo prodloužení inkubační doby mezi krokovými přidavky acetonu o 5 minut na délku 20 minut. Experiment byl proveden ve dvou na sobě nezávislých vzorcích, které byly následně analyzovány metodou DLS. Tou se zjistila velikost a index polydisperzity nanočástic včetně směrodatných odchylek (Tabulka 6 a Graf 6). Naměřené hydrodynamické průměry nanočástic jsou srovnatelné. Oproti částicím připravovaným s inkubační dobou 15 a 30 minut jsou indexy polydisperzity vyšší.

Tabulka 6: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic připravených s 20minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu a upraveným množstvím EDC

	Vzorek 1	Vzorek 2	Průměrné hodnoty
Hydrodynamický průměr[nm]	126,28	116,32	121,30
SD hydr. průměru [nm]	6,06	10,14	8,10
Index polydisperzity	0,76	0,56	0,66
SD indexu polydisperzity	0,111	0,134	0,122

Graf 6: Výsledky DLS měření HA-nanočástic připravených s 20minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu a upraveným množstvím EDC



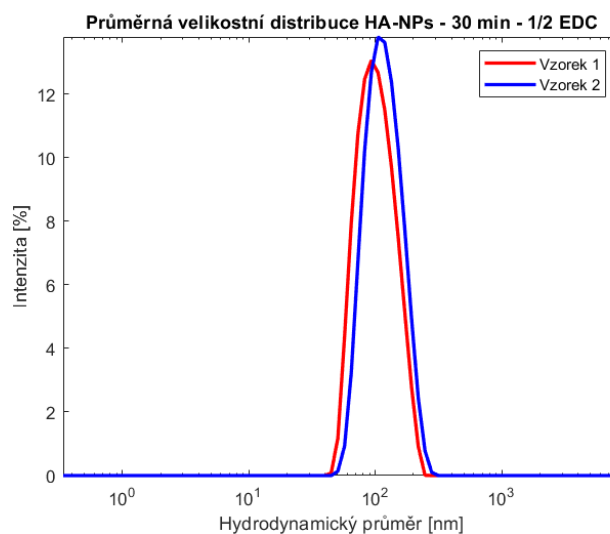
- Inkubační doba mezi přidavky acetonu nanočástic připravených s upraveným množstvím EDC - 30 minut

Poslední zvolenou inkubací mezi jednotlivými přidavky acetonu byla inkubační doba 30 minut. Dva na sobě nezávisle připravené vzorky nanočástic byly analyzovány metodou DLS, jejíž výsledky jsou uvedeny v záznamech níže (Tabulka 7 a Graf 7). Oba vzorky vykazovaly naměřené hodnoty velikosti pod 100 nm a indexy polydisperzity pod hodnotu 0,34.

Tabulka 7: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic připravených s 30minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu a upraveným množstvím EDC

	Vzorek 1	Vzorek 2	Průměrné hodnoty
Hydrodynamický průměr[nm]	83,78	98,03	90,90
SD hydr. průměru [nm]	3,31	2,31	2,81
Index polydisperzity	0,30	0,34	0,32
SD indexu polydisperzity	0,039	0,017	0,028

Graf 7: Výsledky měření DLS měření HA-nanočástic připravených s 30minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu a upraveným množstvím EDC



5.2.4 Zesítnění HA-nanočástic karbodiimidovou metodou – modifikace postupu – poměr reagensů EDC a AAD – 1 : ½

- Inkubační doba mezi přidávkou acetonu nanočástic připravených s upraveným množstvím AAD - 15 minut

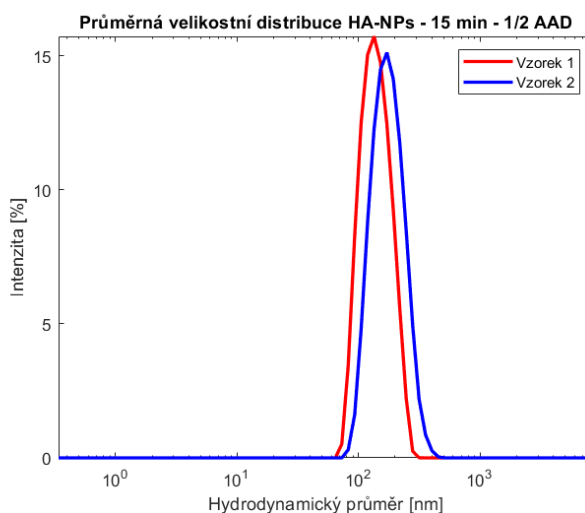
Po experimentech s upraveným množstvím EDC se nanočástice připravovaly i s upraveným množstvím AAD. Zvoleno bylo poloviční množství AAD oproti původnímu. Množství EDC na přípravu 3 mg nanočástic bylo zachováno. Množství EDC, které bylo potřeba pro přípravu 3 mg nanočástic tedy činilo 1,2mg/ 30 µl a upravené množství AAD činilo 1,2 mg/ 30 µl. Zvolená inkubace mezi třemi krokovými přidávkou acetonu byla 15 minut. Experiment byl pro tuto inkubační dobu a upravené množství AAD realizován nezávisle ve dvou provedeních. Výsledné hodnoty z analýzy DLS jak pro jednotlivé vzorky, tak pro průměr těchto hodnot, jsou uvedeny v záznamech včetně směrodatných odchylek (Tabulka 8 a Graf 8).

Tabulka 8: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic

	Vzorek 1	Vzorek 2	Průměrné hodnoty
Hydrodynamický průměr[nm]	123,10	154,48	138,79
SD hydr. průměru [nm]	1,35	22,37	11,86
Index polydisperzity	0,27	0,40	0,33
SD indexu polydisperzity	0,028	0,052	0,040

připravených s 15minutovou inkubační dobou mezi přidávkou acetonu a upraveným množstvím AAD

Graf 8: Výsledky DLS měření HA-nanočástic připravených s 15minutovou inkubační dobou mezi přidávkou acetonu a upraveným množstvím EDC



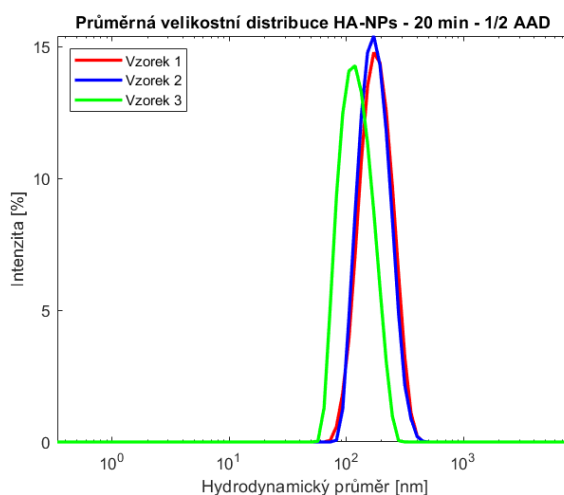
- *Inkubační doba mezi přidavky acetonu nanočástic připravených s upraveným množstvím AAD - 20 minut*

Další modifikací základního postupu bylo dosaženo mimo úpravy na poloviční množství AAD potřebného k přípravě nanočástic i upravenou délkou inkubace. Po experimentech s inkubační dobou délky 15 minut následovala příprava nanočástic s inkubační dobou prodlouženou na 20 minut – včetně použití upraveného množství zesilovacího činidla AAD. Protože se výsledné hodnoty prvních dvou na sobě nezávislých provedení neshodovaly, byl připraven podle tohoto postupu vzorek 3. Ze záznamů výsledných hodnot zjištěných metodou DLS můžeme tvrdit, že tyto vzorky nemají sice srovnatelnou velikost, nicméně byly připraveny s téměř shodným indexem polydisperzity (Tabulka 9 a Graf 9).

Tabulka 9: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic připravených s 20minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu a upraveným množstvím AAD

	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Průměrné hodnoty
Hydrodynamický průměr[nm]	179,40	140,49	103,44	141,11
SD hydr. průměru [nm]	61,84	3,14	1,09	22,02
Index polydisperzity	0,40	0,37	0,32	0,36
SD indexu polydisperzity	0,045	0,042	0,036	0,041

Graf 9: Výsledky DLS měření HA-nanočástic připravených s 20minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu a upraveným množstvím EDC



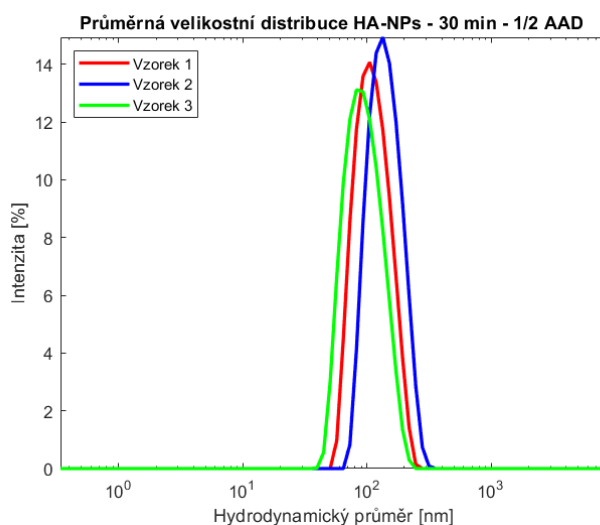
- Inkubační doba mezi přidavky acetonu nanočástic připravených s upraveným množstvím AAD - 30 minut

Poslední modifikací základního postupu pro přípravu nanočástic karbodiimidovou metodou a polovičním množstvím AAD bylo připravení HA-NPs s inkubací trvající 30 minut. Podobně jako u přípravy nanočástic s upraveným množstvím AAD a inkubační dobou 20 minut, ani v tomto případě se nezávisle na sobě připravené vzorky 1 a 2 v naměřených velikostech neshodovaly. Dodatečně byly tedy připraveny další nanočástice (Vzorek 3), které se dle analýzy DLS svými hodnotami přibližovali vzorku 1 (Tabulka 10 a Graf 10).

Tabulka 10: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic připravených s 30minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu a upraveným množstvím AAD

	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Průměrné hodnoty
Hydrodynamický průměr[nm]	95,93	115,74	82,61	98,09
SD hydr. průměru [nm]	1,75	4,30	0,98	2,35
Index polydisperzity	0,24	0,40	0,22	0,29
SD indexu polydisperzity	0,038	0,045	0,033	0,039

Graf 10: Výsledky DLS měření HA-nanočástic připravených s 30minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu a upraveným množstvím EDC



5.2.5 Příprava nanočástic kyseliny hyaluronové s různou délkou řetězce

Dalším předmětem zkoumání bylo zjištění vlivu a příprava nanočástic z kyseliny hyaluronové s různou délkou řetězce. Pro tento experiment byla použita kyselina hyaluronová o molekulové hmotnosti 30 kDa a 170kDa (obě od Contipro a.s., Dolní Dobrouč, ČR). Příprava zásobních roztoků byla stejná, jako u přípravy zásobního roztoku HA o $M_w = 1,8$ MDa. Rozdíly v jednotlivých roztocích byly patrné již na první pohled. Čím menší byla její molekulová hmotnost, tím byl připravený vodní roztok tekutější a naopak. Nejvyšší viskozitu vykazoval roztok HA o $M_w = 1,8$ MDa.

Aby se dal vliv původních molekulových hmotností porovnat, příprava nanočástic byla provedena dle modifikace v kapitole 5.2.2 - *Inkubační doba mezi přidavky acetonu - 30 minut*.

Porovnáním průměrných hodnot ze záznamů analýzy DLS se zjistilo, že původní velikost HA má vliv na velikost připravených nanočástic. Čím větší je původní velikost kyseliny hyaluronové (resp hyaluronanu), tím menší se dají připravit částice.

- *Příprava nanočástic z HA o původní velikosti 30 kDa*

Nanočástice byly připraveny podle modifikace uvedené v kap. 5.2.2 - *Inkubační doba mezi přidavky acetonu - 30 minut*. Místo zásobního roztoku kyseliny hyaluronové o velikosti 1,8 MDa byla použita kyselina hyaluronová o velikosti 30 kDa. Byl zachován poměr i množství reagensů EDC a AAD potřebných pro přípravu 3 mg nanočástic. Inkubační doba mezi jednotlivými přidavky acetonu byla zvolena 30 minut. Nanočástice byly připraveny ve třech na sobě nezávislých provedeních vždy v doubletu (Vzorek 1+2, Vzorek 3+4, Vzorek 5+6). Přestože byly vzorky v doubletech připraveny za stejných podmínek, výsledné hodnoty byly rozdílné. Při srovnání s hodnotami parametrů nanočástic připravených z kyseliny hyaluronové o původní velikosti 1,8 MDa stejným postupem, se u těchto nanočástic naměřila větší průměrná velikost a nižší index polydisperzity (Tabulka 11A, Tabulka 11B, Graf 11).

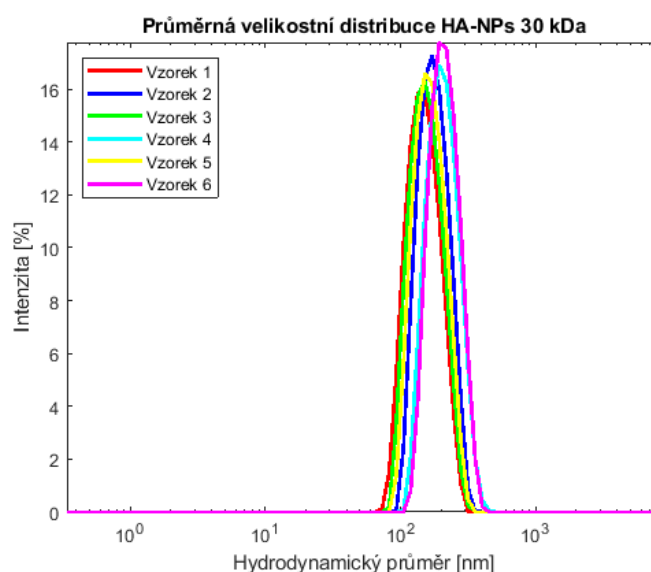
Tabulka 11A: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic připravených z HA o původní velikosti 30 kDa a s 30minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu

	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4
Hydrodynamický průměr[nm]	136,20	164,08	142,55	200,66
SD hydr. průměru [nm]	2,11	2,55	2,20	32,54
Index polydisperzity	0,34	0,27	0,22	0,30
SD indexu polydisperzity	0,025	0,034	0,056	0,050

Tabulka 11B: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic připravených z HA o původní velikosti 30 kDa a s 30minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu

	Vzorek 5	Vzorek 6	Průměrné hodnoty
Hydrodynamický průměr[nm]	149,40	201,34	165,70
SD hydr. průměru [nm]	1,86	6,27	7,92
Index polydisperzity	0,21	0,17	0,25
SD indexu polydisperzity	0,024	0,033	0,037

Graf 11: Výsledky DLS měření HA-nanočástic připravených z HA o původní velikosti 30 kDa a s 30minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu



- *Příprava nanočástic z HA o původní velikosti 170 kDa*

Další zvolenou kyselinou hyaluronovou s různou délkou řetězce byla HA o původní velikosti 170 kDa. Stejně jako v předchozím případě i zde byl zachován poměr reagensů EDC i AAD, včetně jejich množství. Taktéž byla zachována délka inkubační doby – 30 minut. Nanočástice byly připraveny také ve třech doubletech (Vzorek 1+2, Vzorek 3 a Vzorek 4+5). Důvodem uvedení pouze pěti výsledků je předčasná precipitace a vznik gelovitých shluků při přípravě jednoho ze vzorků nanočástic. V případě zjištění této skutečnosti byla příprava nanočástic ukončena. Byly připraveny nanočástice o menší průměrné velikosti, než byla naměřena u nanočástic z kys. hyaluronové o původní velikosti 30 kDa a částice taktéž vykazovaly i menší index polydisperzity (Tabulka 12A, Tabulka 12B Graf 12).

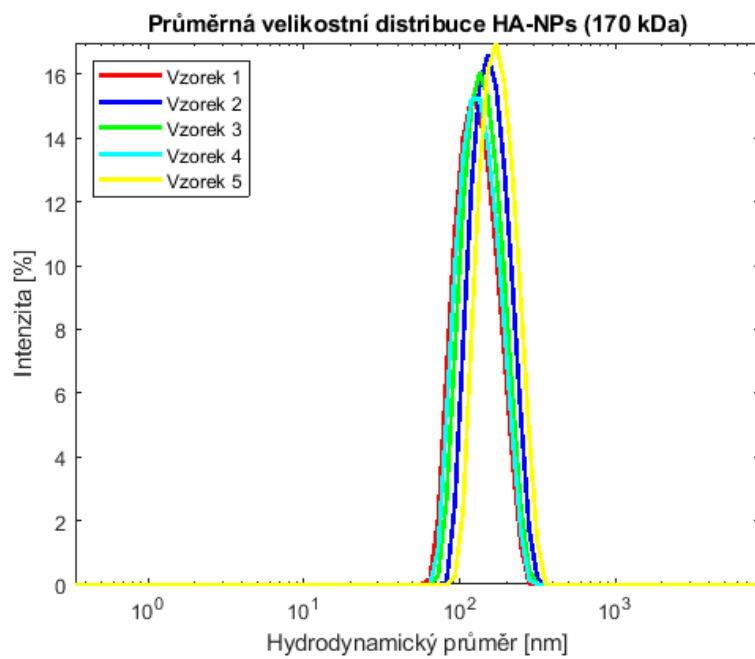
Tabulka 12A: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic připravených z HA o původní velikosti 170 kDa a s 30minutovou inkubační dobou mezi přidávkou acetonu

	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3
Hydrodynamický průměr[nm]	114,61	143,91	130,00
SD hydr. průměru [nm]	1,29	2,50	4,47
Index polydisperzity	0,15	0,27	0,26
SD indexu polydisperzity	0,042	0,028	0,056

Tabulka 12B: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic připravených z HA o původní velikosti 170 kDa a s 30minutovou inkubační dobou mezi přidávkou acetonu

	Vzorek 4	Vzorek 5	Průměrné hodnoty
Hydrodynamický průměr[nm]	118,04	158,60	133,03
SD hydr. průměru [nm]	1,48	1,41	2,23
Index polydisperzity	0,14	0,13	0,19
SD indexu polydisperzity	0,030	0,028	0,037

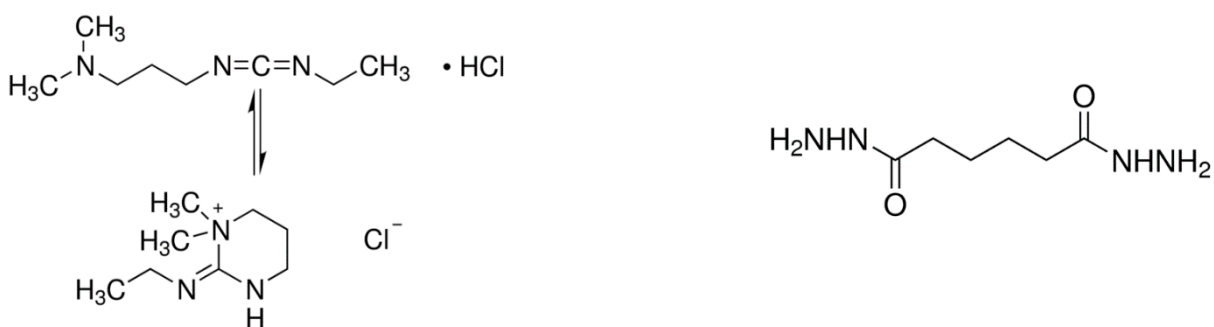
Graf 12: Výsledky DLS měření HA-nanočástic připravených z HA o původní velikosti 170 kDa a s 30minutovou inkubační dobou mezi přidavky acetonu



5.2.6 Vliv poměru reagensů EDC a AAD na parametry nanočástic

Aby se zjistil vliv EDC a AAD (Obrázek 5) na velikost a parametry nanočástic kyseliny hyaluronové připravené nanoprecipitací v acetonu, bylo nutné jejich poměry při přípravě částic měnit. Všechny připravené nanočástice byly analyzovány metodou DLS a jejich výsledky byly porovnávány. Na přípravu cca 3 mg nanočástic podle základního postupu, bylo potřeba 1,2 ml zásobního roztoku HA o koncentraci 2,5 mg/ml a roztoky činidel EDC a AAD o koncentraci 1,2 mg/30 μ l.

Modifikacemi experimentu nebyl zachován poměr reagensů EDC a AAD 1 : 1, ale množství EDC nebo AAD bylo zmenšeno na polovinu oproti původnímu množství – tj. na 0,6 mg/30 μ l. Porovnáním průměrných hodnot získaných analýzou DLS (Tabulka 11) bylo potvrzeno, že velikosti připravených nanočástic nebyly ovlivněny danými poměry jednotlivých roztoků. Dle dostupných výsledků analýzy DLS a jejich porovnáním se experimentálně zjistilo, že při použití polovičního množství aktivačního činidla EDC, nanočástice vykazovaly vyšší hodnotu indexu polydisperzity (Tabulka 12).



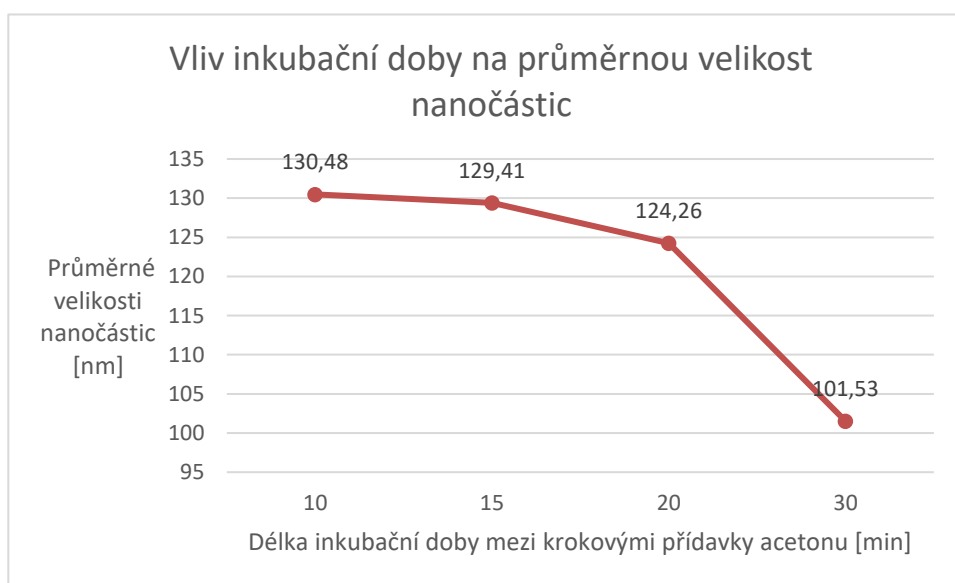
Obrázek 5: N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochloridu (vlevo) a dihydrazidu kyseliny adipové (vpravo)
Převzato z [60; 61]

5.2.7 Vliv inkubační doby na velikost nanočástic

Aby se zjistil vliv délky doby inkubace mezi třemi krokovými přidavky acetonu, byla délka stanovena u jednotlivých experimentů na 10, 15, 20 a 30 minut. Nanočástice byly připraveny dle modifikace postupu přípravy nanočástic v kapitole 5.2.2 - *Inkubační doba mezi přidavky acetonu – 30 minut*.

Porovnáním průměrných hodnot získaných analýzou DLS (Tabulka 13) bylo experimentálně zjištěno, že nejmenší nanočástice byly připraveny s inkubační dobou o délce 30 minut. Hodnoty hydrodynamických průměrů u nanočástic připravených s inkubačními dobami mezi krokovými přidavky acetonu 10, 15 a 20 minut nevykazovaly velké rozdíly. Aby byl potvrzen trend klesající velikosti nanočástic (Graf 13) s prodlužující se inkubační dobou, bylo by nutné provést experimenty dle příslušných modifikovaných postupů. Dále se porovnával vliv inkubační doby mezi krokovými přidavky acetonu na hodnoty indexů polydisperzity. Podle uvedených hodnot (Tabulka 14) na index polydisperzity nemá inkubační doba vliv. Přestože je u 20minutové inkubační doby výsledná hodnota indexu polydisperzity nejvyšší (PI = 0,46), je tato hodnota ovlivněna vysokým indexem polydisperzity u vzorku připraveného s polovičním množstvím EDC.

Graf 13: Grafické znázornění vlivu délky inkubační doby na hydrodynamické průměry připravených nanočástic



Tabulka 13: Výsledky průměrných velikostí získaných analýzou DLS s ohledem na délku inkubační doby mezi krokovými přidávkami acetonu a poměrem reagensů

Inkubace mezi krokovými přidávkami acetonu	10 minut	15 minut	20 minut	30 minut	Průměrné velikosti nanočástic [nm]
Poměr reagensů EDC a AAD při přípravě nanočástic					
1 EDC 1 AAD	130,48	109,41	110,39	115,61	116,47
½ EDC 1 AAD	-	140,02	121,30	90,90	117,41
1 EDC ½ AAD	-	138,79	141,11	98,09	126,00
Průměrné velikosti nanočástic [nm]	130,48	129,41	124,26	101,53	-

Tabulka 14: Výsledky průměrných indexů polydisperzity získaných analýzou DLS s ohledem na délku inkubační doby mezi krokovými přidavky acetonu a poměrem reagensů

Inkubace mezi krokovými přidavky acetonu					
Poměr reagensů EDC a AAD při přípravě nanočástic	10 minut	15 minut	20 minut	30 minut	Průměrné indexy polydisperzity
1 EDC 1 AAD	0,35	0,29	0,36	0,32	0,33
½ EDC 1 AAD	-	0,48	0,66	0,32	0,49
1 EDC ½ AAD	-	0,33	0,36	0,29	0,33
Průměrné indexy polydisperzity	0,35	0,37	0,46	0,31	-

5.2.8 Ověření stability hodnot měřených parametrů nanočástic

Aby se mohlo s nanočásticemi nadále pracovat (např. značit fluorescenčními značkami), popř. aby mohly být využité i v klinické praxi, je nutné zjistit, zdali se hodnoty u parametrů (hydrodynamický průměr a index polydisperzity) těchto nanočástic neměnily. Ověřovaly se hodnoty u nanočástic uchovávaných v lednici při teplotě 4-8 °C a měření se provádělo v průběhu 6 měsíců v různých časových intervalech.

Stabilita hodnot parametrů se ověřovala u třech vybraných vzorků nanočástic připravených s různými postupy jejich přípravy.

- *Ověření stability hodnot měřených parametrů nanočástic – první vzorek*

Jako první se ověřoval vzorek nanočástic, který byl připravován podle modifikovaného postupu v kapitole 5.2.2 - *Inkubační doba mezi přidavky acetonu - 30 minut*. Konkrétně se jednalo z této kapitoly o vzorek 3. Tento vzorek byl připravován s 30minutovou inkubační dobou mezi jednotlivými přidavky acetonu. Poměr reagensů EDC a AAD byl 1 : 1. Mezi jednotlivými měřeními byl vzorek uchovávan v lednici o teplotě mezi 4 – 8 °C. Pro každé měření bylo odebráno určité množství ze zásobního vzorku – měřil se tedy vždy čerstvě naředěný vzorek.

Tento vzorek byl měřen celkem třináctkrát. První hodnota v tabulce (Tabulka 15A) a grafu (Graf 14) je původní hodnota hydrodynamického průměru a indexu polydisperzity naměřená po ukončení dialýzy. Následující hodnoty byly analyzovány metodou DLS (Tabulka 15A, Tabulka 15B a Tabulka 15C) v různých časových intervalech.

Dle grafu můžeme předpokládat, po prvním měření ještě na částice mohlo působit zbytkové množství organického rozpouštědla – acetonu, a z toho důvodu se jejich velikost nadále zmenšovala.

Tabulka 15A: Výsledné hodnoty DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic – ověření stability hodnot parametrů – první vzorek

	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Vzorek 5
Hydrodynamický průměr[nm]	141,01	124,48	101,91	106,39	104,88
SD hydr. průměru [nm]	4,22	2,67	2,25	0,93	1,59
Index polydisperzity	0,34	0,37	0,29	0,32	0,30
SD indexu polydisperzity	0,037	0,031	0,016	0,020	0,021

Tabulka 15B: Výsledné hodnoty DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic – ověření stability hodnot parametrů – první vzorek

	Vzorek 6	Vzorek 7	Vzorek 8	Vzorek 9	Vzorek 10
Hydrodynamický průměr[nm]	94,61	90,06	92,44	100,92	103,52
SD hydr. průměru [nm]	2,01	4,13	1,40	1,75	3,97
Index polydisperzity	0,23	0,25	0,21	0,29	0,30
SD indexu polydisperzity	0,040	0,148	0,029	0,017	0,035

Tabulka 15C: Výsledné hodnoty DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic – ověření stability hodnot parametrů – první vzorek

	Vzorek 11	Vzorek 12	Vzorek 13
Hydrodynamický průměr[nm]	100,86	106,43	101,74
SD hydr. průměru [nm]	4,71	2,04	1,50
Index polydisperzity	0,32	0,32	0,26
SD indexu polydisperzity	0,052	0,031	0,037

- *Ověření stability hodnot měřených parametrů nanočástic – druhý vzorek*

Druhým vzorkem, u něž se ověřovala stabilita, byl vzorek z kapitoly 5.2.3 - *Inkubační doba mezi přidavky acetonu nanočástic připravených s upraveným množstvím EDC - 20 minut* – vzorek 1, uchovávaný při teplotě 4-8 °C. Aby se ověřil i vliv jednotlivých činidel, byl vybrán vzorek roztoku nanočástic, který byl připraven s polovičním množstvím EDC. Poměr reagentů EDC a AAD byl tedy ½ EDC : 1 AAD. Inkubační doba mezi jednotlivými přidavky acetonu byla 20 minut. Tento zásobní roztok připravených nanočástic se uchovával v lednici při teplotě 4–8 °C. Pro každé měření byl připravován nově naředěný vzorek ze zásobního vzorku.

Tento vzorek byl analyzován metodou DLS celkem jedenáctkrát. První hodnota v tabulce (Tabulka 16A) a grafu (Graf 15) je původní hodnota hydrodynamického průměru a indexu polydisperzity se směrodatnými odchylkami, které byly naměřeny po ukončení dialýzy. Následující hodnoty byly měřeny (Tabulka 16A a Tabulka 16B) v různých časových intervalech. Dle hodnot v tabulkách můžeme tvrdit, že parametry částic byly stabilní. Výjimku představují hodnoty naměřené u vzorku 3 a 6, jejichž velikost je nadprůměrná. Této velikosti mohlo být dosaženo špatnou homogenizací před pipetováním vzorku do měřicí kyvety či dlouhou prodlevou mezi pipetováním vzorku do kyvety a následným měřením.

Tabulka 16A: Výsledné hodnoty DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic – ověření stability hodnot parametrů – druhý vzorek

	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Vzorek 5	Vzorek 6
Hydrodynamický průměr[nm]	126,28	123,82	170,93	114,40	142,93	189,40
SD hydr. průměru [nm]	6,06	4,35	60,87	2,91	55,27	129,22
Index polydisperzity	0,76	0,62	0,49	0,45	0,60	0,44
SD indexu polydisperzity	0,111	0,128	0,088	0,032	0,066	0,080

Tabulka 16B: Výsledné hodnoty DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic – ověření stability hodnot parametrů – druhý vzorek

	Vzorek 7	Vzorek 8	Vzorek 9	Vzorek 10	Vzorek 11
Hydrodynamický průměr[nm]	118,21	112,58	115,42	117,18	119,46
SD hydr. průměru [nm]	8,62	2,85	4,84	7,38	11,81
Index polydisperzity	0,53	0,47	0,49	0,77	0,80
SD indexu polydisperzity	0,059	0,048	0,063	0,076	0,087

- *Ověření stability hodnot měřených parametrů nanočástic – třetí vzorek*

Třetím, a zároveň posledním vzorkem, u nějž se ověřovala stabilita, při uchování při teplotě 4-8 °C, byl vzorek z kapitoly 5.2.4 - *Inkubační doba mezi přidávkou acetonu nanočástic připravených s upraveným množstvím AAD - 20 minut* – vzorek 1.

Tento vzorek byl vybrán z důvodu upraveného poměru reagentů – na přípravu těchto nanočástic bylo použito poloviční množství AAD. Poměr činidel EDC : AAD byl 1 EDC: ½. AAD. Inkubační doba mezi jednotlivými přidávkami acetonu trvala 20 minut. Připravené nanočástice se uchovávaly mezi měřeními v lednici při teplotě 4–8 °C a pro každé ověření hydrodynamického průměru a indexu polydisperzity bylo z tohoto vzorku odebráno množství potřebné pro dané měření.

Měření pro ověření stability se opakovalo celkem jedenáctkrát v různých časových intervalech. První hodnota v tabulce (Tabulka 17A) a grafu (Graf 16) je původní hodnota velikosti nanočástic a indexu polydisperzity se směrodatnými odchylkami. Přestože byla u vzorku 1 naměřena velikost přes 179,4 nm, následující hodnoty se pohybovaly okolo hodnot 120 nm (Tabulka 17A a Tabulka 17B). Výjimku tvoří vzorek 5, jehož velikost převyšuje (mimo vzorek 1) všechny naměřené hodnoty získané analýzou DLS.

Tabulka 17A: Výsledné hodnoty DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic – ověření stability hodnot parametrů – třetí vzorek

	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Vzorek 5	Vzorek 6
Hydrodynamický průměr[nm]	179,40	117,53	114,63	113,20	153,58	115,87
SD hydr. průměru [nm]	61,84	0,72	2,24	2,47	2,22	1,83
Index polydisperzity	0,39	0,29	0,28	0,26	0,43	0,27
SD indexu polydisperzity	0,045	0,018	0,048	0,045	0,027	0,030

Tabulka 17B: Výsledné hodnoty DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic – ověření stability hodnot parametrů – třetí vzorek

	Vzorek 7	Vzorek 8	Vzorek 9	Vzorek 10	Vzorek 11
Hydrodynamický průměr[nm]	120,75	116,13	121,64	132,11	126,68
SD hydr. průměru [nm]	4,86	4,76	9,97	2,07	9,65
Index polydisperzity	0,31	0,30	0,30	0,37	0,31
SD indexu polydisperzity	0,055	0,031	0,040	0,039	0,022

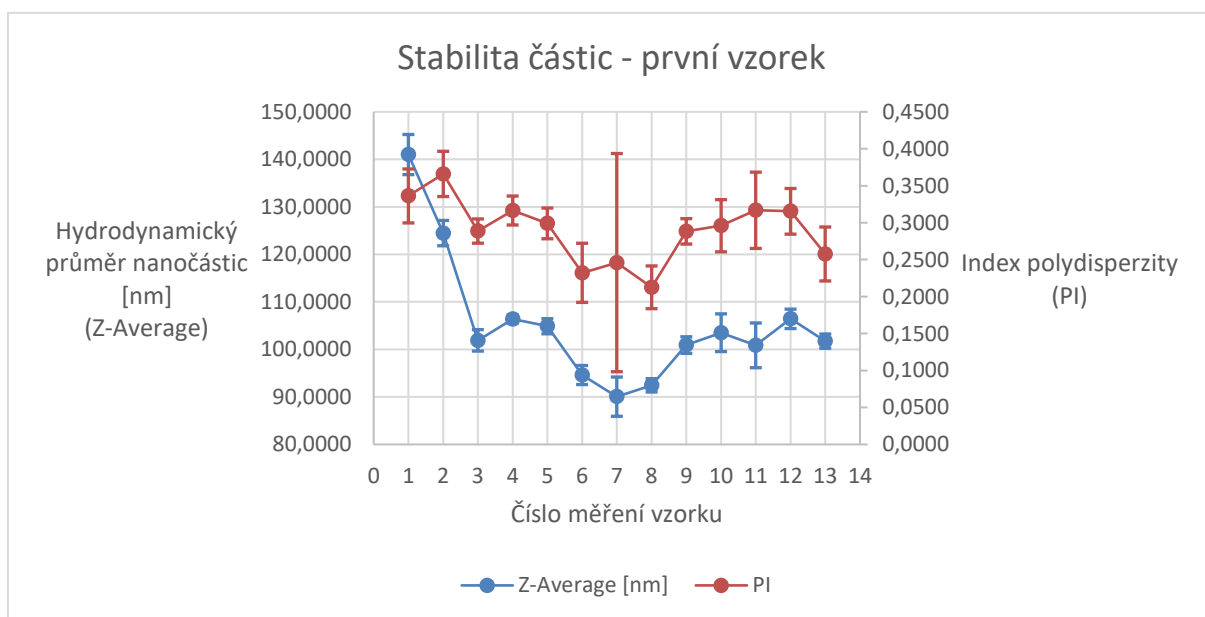
5.2.9 Zhodnocení stability hodnot měřených parametrů nanočástic

Byly vybrány tři vzorky, jejichž příprava probíhala rozdílným způsobem. Druhou podmínkou pro výběr vzorku bylo jejich množství. Důvodem bylo, že pro každé měření bylo ze zásobního vzorku odebráno určité množství, které se ředilo těsně před měřením.

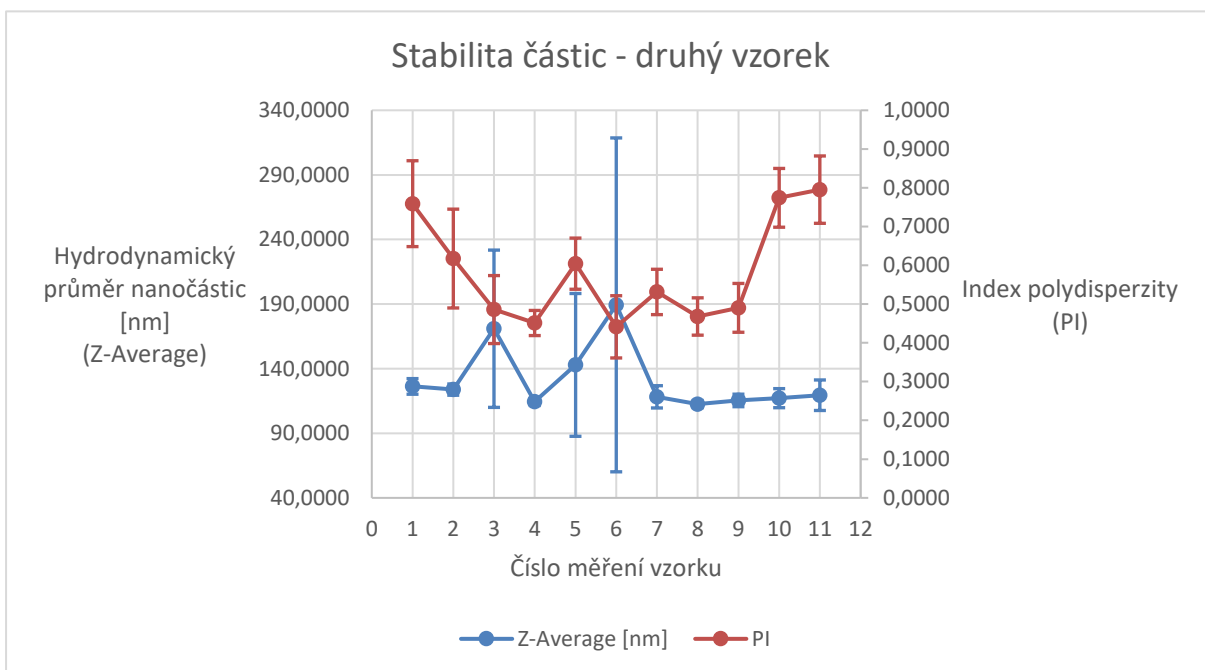
Protože první naměřené hodnoty převyšují následující naměřené hodnoty získané analýzou DLS, lze předpokládat, že na částice ještě mohlo působit zbytkové množství acetonu. Větší naměřené velikosti mohly být způsobeny nedostatečnou homogenizací vzorků před pipetováním potřebného objemu do kyvet či dlouhá prodleva mezi dávkováním vzorků do kyvet a následujícím měřením.

Protože v průběhu celého intervalu ověřování se hodnoty měřených parametrů nijak výrazně neměnily a dle grafů (Graf 14, Graf 15 a Graf 16) zde nebyl naznačen trend stoupajících či klesajících hodnot velikostí a indexů polydisperzity, je možné tyto parametry nanočástic kyseliny hyaluronové považovat za stabilní.

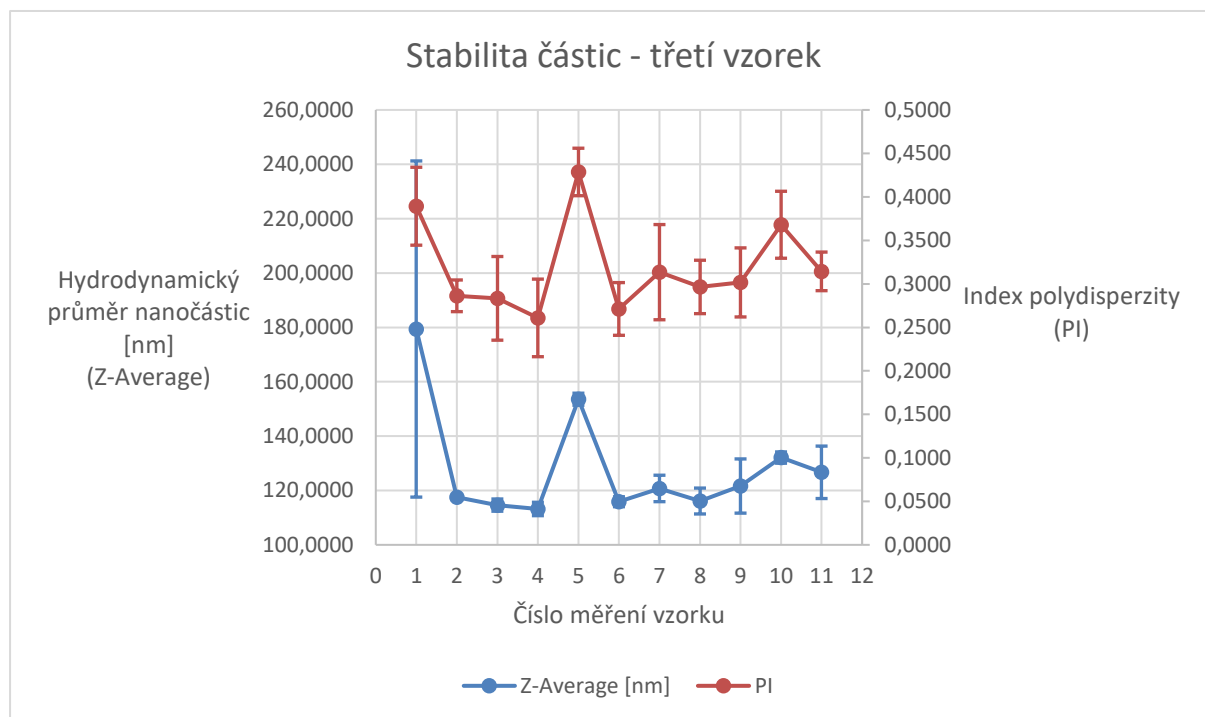
Graf 14: Výsledné hodnoty DLS měření HA-nanočástic – ověřování stability měřených parametrů – první vzorek



Graf 15: Výsledné hodnoty DLS měření HA-nanočástic – ověřování stability měřených parametrů – druhý vzorek



Graf 16: Výsledné hodnoty DLS měření HA-nanočástic – ověřování stability měřených parametrů – třetí vzorek

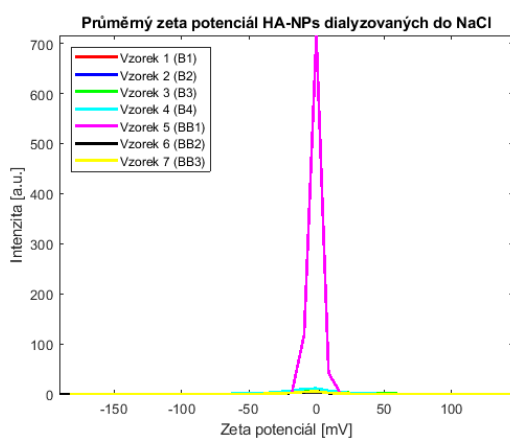


5.2.10 Zeta potenciál připravených nanočástic kyseliny hyaluronové

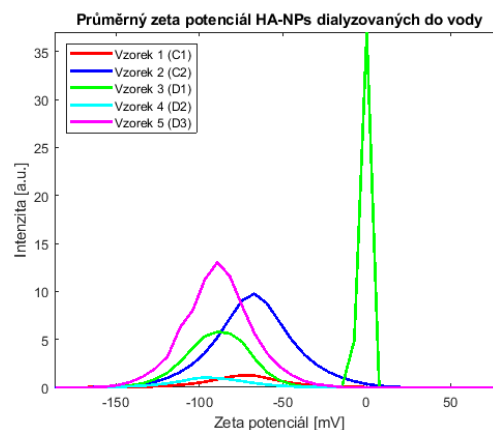
Pro ověření potenciální stability roztoků s nanočásticemi kyseliny hyaluronové, je vhodné znát zeta potenciál. Důležitým faktorem, který ovlivňuje hodnotu zeta potenciálu, je pH. Protože nanočástice by měly být určeny pro užití *in vivo*, jejich dialýza probíhala do fyziologického roztoku.

Za neutrální jsou považovány ty nanočástice, jejichž zeta potenciál je mezi hodnotami -10 mV a +10 mV. Nanočástice, u kterých byl stanoven zeta potenciál pod -30 mV a nad +30 mV se řadí mezi silně anionické či kationické [86]. Bylo experimentálně zjištěno, že médium, ve kterém se měřené nanočástice nachází, by měl mít nízkou iontovou sílu. Pro roztok NaCl se doporučuje koncentrace 10 mM [86]. V tomto případě (Vzorky B a BB) byly uchovávány ve fyziologickém roztoku, což je 0,9% roztok NaCl. To odpovídá koncentraci 154 mM. Přítomnost chloridových a sodných iontů ovlivňovala měření hodnot zeta potenciálu, proto bylo nutné nanočástice podrobit dialýze do destilované vody trávající dvě hodiny (Vzorky C) nebo přes noc (Vzorky D). Pro porovnání hodnot jsou v tabulkách data naměřená u vzorků dialyzovaných do fyziologického roztoku a před měřením ředěná redestilovanou vodou (Tabulka 18A, Tabulka 18B, Graf 17) a vzorky dialyzované do destilované vody a před měřením ředěné redestilovanou vodou (Tabulka 19, Tabulka 20 a Graf 18). Z výsledků lze vyčíst, že zápornější zeta potenciál byl stanoven u vzorků dialyzovaných do vody.

Graf 17: Výsledky DLS měření HA-nanočástic dialyzované do 0,9% NaCl, před měřením ředěné redestilovanou H₂O



Graf 18: Výsledky DLS měření HA-nanočástic dialyzované do destilované H₂O, před měřením ředěné redestilovanou H₂O



Tabulka 18A: Výsledky DLS měření zeta potenciálu pro HA-NPs dialyzované do 0,9% NaCl, před měřením ředěné redestilovanou H₂O

	Vzorek 1 B1	Vzorek 2 B2	Vzorek 3 B3	Vzorek 4 B4
Zeta potenciál [mV]	-10,43	-2,48	-2,48	-15,89
SD Zeta potenciálu [mV]	11,482	9,746	9,746	27,881

Tabulka 18B: Výsledky DLS měření zeta potenciálu pro HA-NPs dialyzované do 0,9% NaCl, před měřením ředěné redestilovanou H₂O

	Vzorek 5 BB1	Vzorek 6 BB2	Vzorek 7 BB3	Průměrné hodnoty
Zeta potenciál [mV]	-1,34	-6,03	-4,40	-3,92
SD Zeta potenciálu [mV]	0,755	8,370	5,104	4,743

Tabulka 19: Výsledky DLS měření zeta potenciálu pro HA-NPs dialyzované do destilované H₂O (2 hod), před měřením ředěné redestilovanou H₂O

	Vzorek 1 C1	Vzorek 2 C2	Průměrné hodnoty
Zeta potenciál [mV]	-77,95	-65,73	-71,84
SD Zeta potenciálu [mV]	29,792	11,512	20,652

Tabulka 20: Výsledky DLS měření zeta potenciálu pro HA-NPs dialyzované do destilované H₂O (přes noc), před měřením ředěné redestilovanou H₂O

	Vzorek 1 D1	Vzorek 2 D2	Vzorek 3 D3	Průměrné hodnoty
Zeta potenciál [mV]	-61,48	-88,01	-90,89	-80,13
SD Zeta potenciálu [mV]	44,372	21,977	7,429	24,593

5.2.11 Vliv změny dialyzačního roztoku

Z důvodu ovlivnění zeta potenciálu dialyzačním roztokem (0,9% NaCl) bylo nutné částice znova dialyzovat a zbavit se tak chloridových a sodných iontů. Pro kontrolu byly vzorky dialyzované do destilované vody podrobeny analýze DLS. Tři vybrané vzorky (u kterých byl měřen zeta potenciál) byly dialyzované do 0,9% roztoku NaCl, poté do destilované vody a opět do fyziologického roztoku. Každá dialýza probíhala přes noc a po ukončení každé dialýzy byl u vzorků měřen hydrodynamický průměr a index polydisperzity. Všechny vzorky byly připraveny dle základního postupu s inkubační dobou 30 minut mezi krokovými přídávky acetonu a poměrem reagentů EDC a AAD 1 : 1.

Jako vzorek 1 byl vybrán vzorek 9 z kapitoly 5.2.2 - *Inkubační doba mezi přídávky acetonu – 30 minut*. V tabulce (Tabulka 21) jsou uvedeny hodnoty získané analýzou DLS po použití různých dialyzačních roztoků.

Vzorkem 2 byl zvolen vzorek 10 z kapitoly 5.2.2 - *Inkubační doba mezi přídávky acetonu – 30 minut*, vzorku 10. V tabulce (Tabulka 22) jsou uvedeny hodnoty parametrů získaných analýzou DLS při užití rozdílných dialyzačních roztoků.

Poslední vzorek, který byl vybrán pro zjištění vlivu rozdílných dialyzačních roztoků na parametry nanočástic byl vzorek 3. Zdrojem původních hodnot parametrů jsou hodnoty naměřené u vzorku 13 z kapitoly 5.2.8 - *Ověření stability hodnot měřených parametrů nanočástic – první vzorek*. U tohoto vzorku byla ověřována stabilita parametrů nanočástic, z toho důvodu zde uvedená velikost neodpovídá velikosti čerstvě připravených částic. V tabulce (Tabulka 23) jsou výsledné hodnoty parametrů.

Z hodnot parametrů získaných analýzou DLS (Tabulka 21, Tabulka 22 a Tabulka 23) je zřejmé, že dialyzační roztok má vliv na velikost nanočástic. U všech tří vzorků, které byly po dialýze do fyziologického roztoku dialyzovány do vody, byl naměřený větší hydrodynamický průměr oproti částicím dialyzovaným do 0,9% NaCl. Také se u všech tří vzorků prokázalo, že po dialýze do vody a opětovné dialýze do NaCl se velikost nanočástic vrátila téměř na svou původní velikost podobně jako jejich index polydisperzity (Graf 20, Graf 21 a Graf 22)

Tabulka 21: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic při změnách dialyzačního roztoku pro vzorek 1

Vzorek 1	První dialýza - 0,9% NaCl	Druhá dialýza - dH ₂ O	Třetí dialýza - 0,9% NaCl
Hydrodynamický průměr[nm]	80,52	120,41	79,73
SD hydr. průměru [nm]	2,07	2,62	0,80
Index polydisperzity	0,25	0,31	0,24
SD indexu polydisperzity	0,033	0,036	0,028

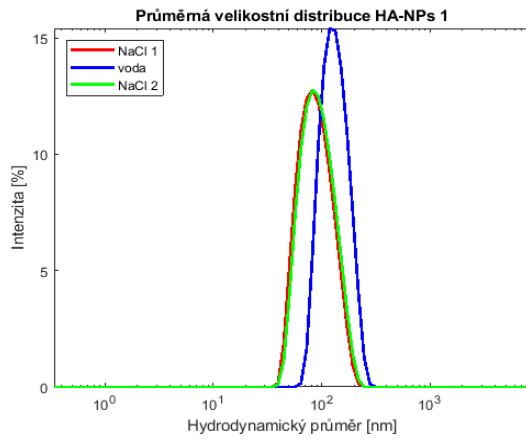
Tabulka 22: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic při změnách dialyzačního roztoku pro vzorek 2

Vzorek 2	První dialýza - 0,9% NaCl	Druhá dialýza - dH ₂ O	Třetí dialýza - 0,9% NaCl
Hydrodynamický průměr[nm]	104,08	148,93	99,75
SD hydr. průměru [nm]	10,00	2,10	1,65
Index polydisperzity	0,31	0,37	0,32
SD indexu polydisperzity	0,024	0,026	0,026

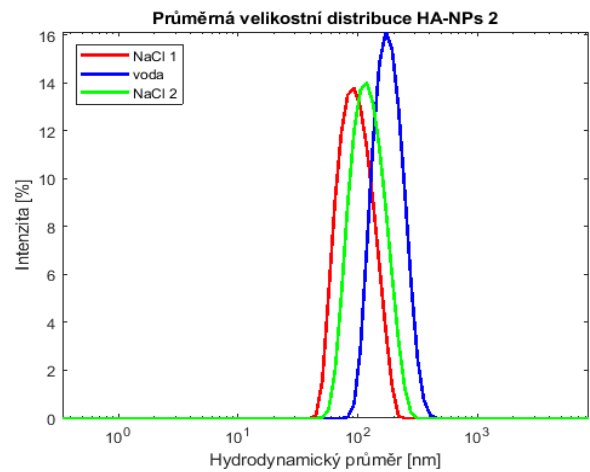
Tabulka 23: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic při změnách dialyzačního roztoku pro vzorek 3

Vzorek 3	První dialýza - 0,9% NaCl	Druhá dialýza - dH ₂ O	Třetí dialýza - 0,9% NaCl
Hydrodynamický průměr[nm]	101,74	164,18	111,28
SD hydr. průměru [nm]	1,50	3,19	2,48
Index polydisperzity	0,26	0,32	0,32
SD indexu polydisperzity	0,037	0,030	0,025

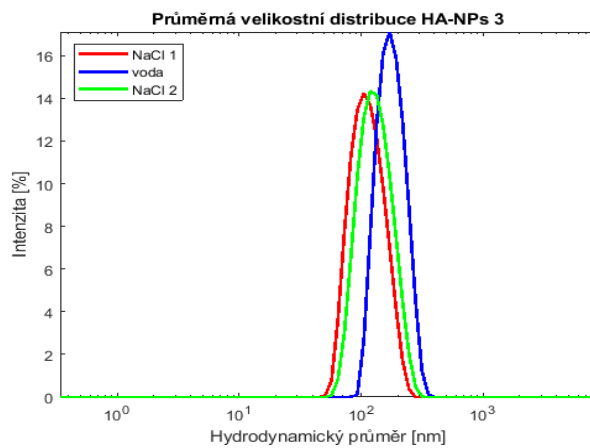
Graf 19: Výsledky DLS měření měření HA nanočástic při změně dialyzačního roztoku – vzorek 1



Graf 20: Výsledky DLS měření měření HA nanočástic při změně dialyzačního roztoku – vzorek 2



Graf 21: Výsledky DLS měření měření HA nanočástic při změně dialyzačního roztoku – vzorek 3



5.3 Výsledky a diskuze k přípravě nanočástic zesíťených pomocí činidla bis(3-aminopropyl)amin

- *Příprava HA-NPs pomocí zesíťovacího činidla BAPA (1%, 94 μ l, pH 5,5) a inkubační dobou 60 minut po přidání zesíťovacího činidla*

Nezávisle na sobě byly připraveny pomocí zesíťovacího činidla BAPA tři vzorky nanočástic, podle postupu uvedeného v kapitole 4.3.2. Pro přípravu těchto nanočástic byl použit jako ředící roztok redestilovaná voda. Zesíťovacím činidlem byl 1% roztok BAPA o objemu 94 μ l, jehož pH bylo upraveno na hodnotu 5,5. Inkubační doba po přidání zesíťovacího činidla trvala 60 minut. Dle výsledných hodnot v tabulce (Tabulka 24) je zřejmé, že velikost nanočástic ve vzorcích měla velice rozdílné velikosti. Protože se nepodařilo připravit nanočástice s podobnými velikostmi, a jejich směrodatné odchylky jak u hydrodynamického průměru, tak u indexu polydisperzity jsou velké, nebyly u těchto nanočástic vypočítané průměrné hodnoty parametrů.

Tabulka 24: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic připravené pomocí činidla BAPA (1%, 94 μ l, pH 5,5) a inkubační dobou 60 minut po přidání zesíťovacího činidla

	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3
Hydrodynamický průměr[nm]	717,10	635,20	2006,60
SD hydr. průměru [nm]	2194,90	793,10	2000,80
Index polydisperzity	2,41	5,59	6,72
SD indexu polydisperzity	1,607	3,118	2,647

- *Příprava HA-NPs pomocí zesíťovacího činidla BAPA (1%, 188 μ l, pH 5,5) a inkubační dobou 60 minut po přidání zesíťovacího činidla*

Modifikací postupu byly připraveny nezávisle na sobě čtyři vzorky nanočástic kyseliny hyaluronové. Při přípravě nanočástic byl použit jako ředící roztok redestilovaná voda. Modifikace v přípravě nanočástic spočívala ve zdvojnásobení množství zesíťovacího činidla BAPA z původního množství 94 μ l na 188 μ l. Inkubační doba po přidavku činidla BAPA zůstala stejná – 60 minut. Z hodnot získaných analýzou DLS (Tabulka 25) by zřejmé, že zvýšením koncentrace činidla BAPA se nepodařilo připravit nanočástice s podobnými hodnotami parametrů. Směrodatné odchylky měření i v tomto případě téměř u všech vzorků převyšují průměrné hodnoty velikosti a PI.

Tabulka 25: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic připravené pomocí činidla BAPA (1%, 188 μ l, pH 5,5) a inkubační dobou 60 minut po přidání zesíťovacího činidla

	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4
Hydrodynamický průměr[nm]	499,90	720,10	1190,20	2528,20
SD hydr. průměru [nm]	494,90	1077,70	1895,20	1530,80
Index polydisperzity	3,62	2,49	2,86	6,08
SD indexu polydisperzity	2,368	2,266	2,2735	3,370

- *Příprava HA-NPs pomocí zesíťovacího činidla BAPA (1%, 94 μ l, pH 5,5) a různou inkubační dobou po přidání zesíťovacího činidla*

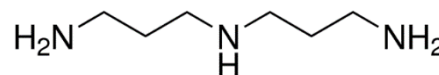
Dále byly připraveny nezávisle na sobě vzorky (podle postupu v kapitole 4.3.2) při jejichž přípravě byl použit jako ředící roztok acetátový pufr o pH 5,5. Nanočástice byly zesíťovány pomocí činidla BAPA o koncentraci 1 %, které bylo u těchto vzorků použito v objemu 94 μ l. Výjimku tvoří vzorek 5*⁾, při jehož přípravě byl použit koncentrovaný 98% roztok BAPA bez úpravy pH. Inkubační doba po přidání zesíťovacího činidla, stejně jako výsledky získané analýzou DLS, je uvedena u konkrétních vzorků (Tabulka 26).

Ani použitím acetátového pufru jako ředícího roztoku místo redestilované vody nevedlo k přípravě nanočástic o přibližně stejné velikosti.

Tabulka 26: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic připravené pomocí činidla BAPA (1%, 188 μ l, pH 5,5) a inkubační dobou 60 minut po přidání zesíťovacího činidla

	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Vzorek 5* ⁾
Hydrodynamický průměr[nm]	338,80	3518,60	1339,70	4133,20	4077,90
SD hydr. průměru [nm]	139,00	1625,50	1982,00	2076,30	1572,00
Index polydisperzity	5,45	6,55	7,98	7,66	6,55
SD indexu polydisperzity	2,512	1,869	14,912	3,766	2,833
Inkubační doba po přidání zesíťovacího činidla	30 min	60 min	90 min	30 min	30 min

Obdobně jako u přípravy nanočástic karbodiimidovou metodou s AAD, i zde je potřeba preaktivace karboxylové skupiny na hlavních řetězcích kyseliny hyaluronové. K roztoku kyseliny hyaluronové



Obrázek 6: Bis(3-aminopropyl)amin
Převzato z [87]

byl přidán roztok EDC o koncentraci 2,4 mg/30 μ l za stálého míchání na orbitální třepače. Po homogenizaci směsi byl použit roztok BAPA (Obrázek 6). Původní roztok BAPA o koncentraci 98 % byl naředěn redestilovanou vodou na 1% roztok, u něhož bylo upraveno pH na hodnotu přibližně okolo 5,5 pomocí hydroxidu sodného či kyseliny chlorovodíkové. Takto upravený roztok byl o objem 94 μ l. po kapkách za stálého míchání přidáván k 1,2 ml zásobního roztoku kyseliny hyaluronové o $M_w = 1,8$ MDa. Nově vzniklá směs byla inkubována na orbitální třepače při laboratorní teplotě. Po ukončení inkubační doby byl opaleskující roztok přepipetován do dialyzačních membrán. Jako dialyzační roztok byl použit 0,9% NaCl. Dialýza probíhala přes noc na orbitální třepače při laboratorní teplotě. Druhý den byla dialýza ukončena a roztok nanočástic byl z dialyzačních membrán převeden do plastových zkumavek. Byl zaznamenán objem vzorků po dialýze a zkumavky byly skladovány při teplotě 4-8 $^{\circ}$ C v lednici.

Pro nanočástice připravené s činidlem BAPA nebyl vytvořen graf pro průměrnou velikostní distribuci, protože u jednotlivých vzorků nanočástic byly naměřeny velice rozdílné hydrodynamické průměry i hodnoty polydisperzity včetně směrodatných odchylek. U několika vzorků (které zde nejsou uvedeny) se parametry metodou DLS vyhodnotit nepodařilo.

Při přípravě nanočástic se neprokázal vliv délky inkubační době po přidání činidla BAPA.

5.4 Výsledky pro značení nanočástic fluorescenčními značkami

Měření intenzity záření fluorescenčně značených nanočástic probíhalo ve stanici pro vyhodnocení fluorescenčního značení ChemiDocTM XRS+. Následný výpočet intenzity fluorescence a množství fluorescenčních značek se počítalo z rovnice regrese. Ta byla získána dosazením hodnot a vytvořením grafu pro kalibrační řadu. Řada kalibračních roztoků byla sestavena zvlášť pro nanočástice značené fluoresceinem a zvlášť pro nanočástice značené FITC. Rozmezí koncentrací kalibračních roztoků bylo voleno podle předpokládané koncentrace fluorescenčních značek v analyzovaných vzorcích (viz kapitola 4.6).

Před samostatným měřením bylo nutné si nejprve napipetovat příslušné roztoky do jamek mikrotitrační destičky. Protože roztoky obsahovaly fluorescenční značky, muselo se se vzorky pracovat velice rychle a připravená mikrotitrační destička se musela do okamžiku měření uchovávat ve tmě.

Kalibrační řada roztoků pro nanočástice značených fluoresceinem byla připravena ze zásobního roztoku fluoresceinu o původní koncentraci 1 mg/ml. Zásobní roztok byl naředěn redestilovanou vodou na koncentraci 2 µg/ml. Pro nanočástice značených neoxidovaným i oxidovaným FITC byla připravena jedna kalibrační řada, na kterou byl použit zásobní roztok FITC o původní koncentraci 1 mg/ml DMF. Aby bylo možné kalibrační řadu sestavit, bylo nutné původní zásobní roztok FITC naředit redestilovanou vodou. Nová koncentrace roztoku pro přípravu kalibrační řady byla 1 µg/1 ml DMF. Protože dialýza značených nanočástic probíhala do 0,9% NaCl, byl tento roztok zvolen jako ředící roztok pro jednotlivé kalibrační roztoky v jamkách mikrotitrační destičky (viz kapitola 4.6).

Vzorky značených nanočástic, u nichž jsme potřebovali změřit intenzitu fluorescence a vypočítat množství fluorescenčních značek, byly do mikrotitrační destičky pipetovány o třech, popř. čtyřech různých objemech (100 µl, 75 µl, 50 µl a 25 µl). Důvodem byl přesnější výpočet průměrných hodnot. Ředícím roztokem vzorků byl opět zvolen 0,9% NaCl (Obrázek 9).

5.4.1 Výsledky pro značení nanočástic fluoresceinem

- *Značení nanočástic fluoresceinem – vzorek 1*

Nanočástice značené fluoresceinem byly připraveny podle modifikace postupu přípravy v kapitole 5.2.2 - *Inkubační doba mezi přidavky acetonu - 30 minut*. Při jejich přípravě byl tedy zachován poměr reagentů EDC a AAD 1 : 1, inkubační doba mezi jednotlivými přidavky acetonu činila 30 minut. Inkubace s EDC aktivovanými nanočásticemi a fluoresceinem trvala 1 hodinu. Následná dialýza probíhala do fyziologického roztoku přes noc na orbitální třepačce při laboratorní teplotě. Nádoby s dialyzačním roztokem byly zabaleny do alobalu, aby u fluoresceinu nedocházelo k jeho samovolnému rozkladu.

Parametry nanočástic byly stanoveny metodou DLS. Množství fluoresceinu v $\mu\text{g}/1 \text{ mg}$ nanočástic bylo vypočítáno z rovnice regrese kalibrační řady, která vycházela ze závislosti intenzity záření na množství fluoresceinu (Tabulka 27). Intenzita záření nebyla dle zadání měřena na spektrofotometru TECAN, ale při vyhodnocování intenzity byla použita denzitometrická stanice ChemiDoc.

Předpoklad, že po navázání fluoresceinu se velikost nanočástic zvětší, se v tomto případě nepotvrdil. Důvodem může být nedostatečná dialýza roztoku nanočástice ještě před značením, a tudíž i vliv acetonu na nanočástice. Další možností je nedostatečné navázání fluoresceinu na nanočástice, což by znamenalo, že intenzita, která byla naměřena nebyla z navázaného fluoresceinu, ale z rozpuštěného volného fluoresceinu přítomného v suspenzi nanočástic. Aby se této falešně naměřené intenzitě předešlo a z roztoku se nenavázaný fluorescein odstranil, u dalších experimentů byla zavedena druhá dialýza a častější výměna dialyzačního roztoku.

Tabulka 27: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic značených fluoresceinem včetně vypočítané hmotnosti fluoresceinu na 1 mg nanočástic – vzorek 1

	Vzorek 1	
	Původní NPs	Značené NPs
Hydrodynamický průměr[nm]	108,32	106,50
SD hydr. průměru [nm]	22,56	2,10
Index polydisperzity	0,33	0,39
SD indexu polydisperzity	0,042	0,034
Hmotnost fluoresceinu na 1 mg nanočástic	-	1,446 µg

- *Znační nanočástic fluoresceinem – vzorek 2*

Nanočástice pro vzorek 2 byly připraveny podle postupu přípravy v kapitole 5.2.2 - *Inkubační doba mezi přidavky acetonu - 30 minut*. Inkubace fluoresceinu s nanočásticemi trvala 1 hodinu, poté následovala dialýza. První dialýza probíhala do 0,9% roztoku NaCl, ve tmě na orbitální třepače při laboratorní teplotě a trvala přes noc. Po ukončení dialýzy se část vzorku uchovala pro následující měření parametrů značených nanočástic – hydrodynamického průměru, indexu polydisperzity a velikosti intenzity záření. Zbylá část vzorku byla podrobena druhé dialýze – taktéž do 0,9% roztoku NaCl. I tato dialýza probíhala ve tmě na orbitální třepače přes noc při laboratorní teplotě. U vzorků byly po ukončení dialýzy analýzou DLS měřeny již zmíněné parametry nanočástic.

Dle rovnice regrese kalibrační řady závislosti intenzity záření na množství fluoresceinu se vypočítalo průměrné množství fluoresceinu na 1 mg nanočástic (Tabulka 28).

Měřením intenzity po druhé dialýze byla její hodnota nižší. Můžeme tedy předpokládat, že díky dvojnásobné dialýze jsme se zbavili téměř veškerého nenavázaného fluoresceinu.

Tabulka 28: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic značených fluoresceinem včetně vypočítané hmotnosti fluoresceinu na 1 mg nanočástic – vzorek 2

	Vzorek 2		
	Původní	Značené – I. dialýza	Značené – II. dialýza
Hydrodynamický průměr[nm]	103,70	110,90	116,20
SD hydr. průměru [nm]	4,20	4,80	2,10
Index polydisperzity	0,33	0,40	0,36
SD indexu polydisperzity	0,023	0,037	0,039
Hmotnost fluoresceinu na 1 mg nanočástic	-	0,48 µg	58,57 ng

- *Znační nanočástic fluoresceinem – vzorek 3*

Původní nanočástice byly připraveny dle stejného postupu jako předchozí dva vzorky nanočástic (kapitola 5.2.2 - *Inkubační doba mezi přidavky acetonu - 30 minut*), a také byl dodržen stejný postup pro značení nanočástic, jako u předchozích dvou vzorků. Obměnou v postupu při přípravě vzorku 3 bylo pouze prodloužení inkubační doby roztoku nanočástic s fluoresceinem. Nanočástice vzorku 3A byly značeny fluoresceinem s inkubační dobou 1 hodinu, oproti vzorku 3B, kdy inkubace nanočástic s fluoresceinem byla přes noc. Oba tyto vzorky byly dialyzovány dvakrát za stejných podmínek jako u vzorků 1 a 2 z této kapitoly. Po každé ukončené dialýze následovalo měření parametrů – velikost značených nanočástic, PI a intenzita fluorescence (Tabulka 29).

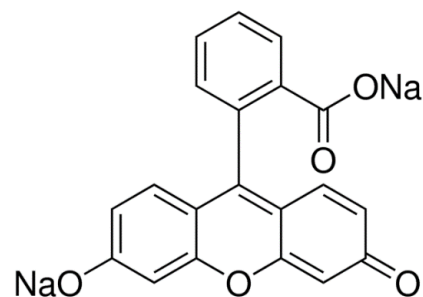
Dle naměřených hodnot intenzity se bylo pravděpodobně druhou dialýzou zbaveno nenavázaného fluoresceinu.

Tabulka 29: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic značených fluoresceinem včetně vypočítané hmotnosti fluoresceinu na 1 mg nanočástic – vzorek 3

	Vzorek 3				
	Původní	Vzorek 3A		Vzorek 3B	
		Značené I. dialýza	Značené II. dialýza	Značené I. dialýza	Značené II. dialýza
Hydrodynamický průměr[nm]	126,90	97,70	98,00	135,90	102,80
SD hydr. průměru [nm]	2,90	2,30	2,60	5,70	2,60
Index polydisperzity	0,33	0,24	0,20	0,40	0,23
SD indexu polydisperzity	0,034	0,031	0,040	0,053	0,037
Hmotnost fluoresceinu na 1 mg nanočástic	-	0,27 µg	7,52 ng	0,36 µg	1,84 ng

- *Zhodnocení značení nanočástic fluoresceinem*

Fluoresceinem (Obrázek 7) byly značeny částice připravené pouze karbodiimidovou metodou o původní velikosti 1,8 MDa. Nejdříve se k rozpuštěnému fluoresceinu přidal roztok EDC, aby se aktivovaly karboxylové skupiny, totéž se provedlo u nanočástic. K preaktivovanému fluoresceinu přidán roztok AAD. Po pečlivém promíchání a další 5minutové inkubaci byla tato směs přidána k preaktivovaným nanočásticím. V rámci nastavení optimálních podmínek navázání fluoresceinu na nanočástice, byly vyzkoušeny dvě různě dlouhé inkubace nanočástic s fluoresceinem – kratší, která byla pouze hodinová a delší, kdy inkubace trvala přes noc (cca 24 hodin). Za tímto úkonem opět následovala dialýza nanočástic, pomocí které se z roztoku odstranil přebytečný nenavázaný fluorescein.



Obrázek 7: Fluorescein sodná sůl
Převzato z [88]

Po dialýze bylo na řadě kontrolní měření hydrodynamického průměru a indexu polydisperzity částic. Značené nanočástice měly po opatření značkou vykazovat větší velikost, což se u všech vzorků neprokázalo.

Další kontrolou navázání fluoresceinu bylo měření intenzity fluorescence nanočástic značených fluoresceinem na denzitometrické stanici Bio-Rad ChemiDoc™ XRS a dle výsledků se vypočítala jeho koncentrace v daném vzorku nanočástic.

Pro průkaz navázání fluoresceinu na nanočástice byla provedena další dialýza, a poté opět měření intenzity záření. Při měření vzorků po druhé dialýze byla intenzita mnohokrát menší. Důvodem mohla být nedostatečná první dialýza, kdy se ve vzorku nacházelo ještě velké množství volného fluoresceinu. Nenavázaný fluorescein, který byl rozpuštěn v roztoku nanočástic, tak mohl ovlivňovat velikost intenzity záření.

Při práci s fluoresceinem bylo velice důležité, aby všechny zkumavky a dialyzační nádoby stále udržované v temnu a manipulace na světle byla co nejkratší.

5.4.2 Výsledky pro značení nanočástic FITC a FITC-ox

- *Značení nanočástic FITC a FITC-ox – vzorek 1, vzorek 2 a vzorek 3*

Nanočástice ke značení byly připraveny podle modifikace postupu v kapitole 5.2.2. - *Inkubační doba mezi přidavky acetonu - 30 minut.* Při přípravě byl tedy dodržen poměr EDC a AAD 1 : 1, inkubační doba mezi třemi přidavky acetonu trvala 30 minut.

Částice byly značeny jak neupraveným, tedy neoxidovaným, tak oxidovaným FITC. V obou případech byl k nanočásticím přidán roztok EDC (0,5 mg/3 mg NPs) a AAD (0,5 mg/3mg NPs). Po přidavku roztoku EDC následovala 10minutová inkubace, po přidavku roztoku AAD trvala inkubační doba 5 minut.

U značení neoxidovaným FITC se k preaktivovaným nanočásticím přidal roztok FITC (1mg/1ml DMF) o objemu 0,3 ml (použito na 3mg NPs). Směs se důkladně homogenizovala a nechala inkubovat ve tmě na orbitální třepačce.

Na rozdíl od značení neupraveným FITC, se při značení upraveným FITC oxidoval 0,1M NaIO₄. Požadované koncentrace se dosáhlo přidáním 0,3 ml 0,2M NaIO₄ k 0,3 ml FITC (1mg/1 ml DMF). Směs těchto dvou roztoků se dobře homogenizovala a nechala inkubovat minimálně 15 minut ve tmě na třepačce. Po uplynutí inkubační doby se oxidovaný FITC přidal k roztoku nanočástic, a stejně jako u předchozího značení se po důkladném promíchání směs inkubovala přes noc na orbitální třepačce.

Následovala dialýza, čímž se z roztoku nanočástic odstranila přebytečná fluorescenční značka. Dialyzačním roztokem byl opět 0,9% NaCl a dialýza probíhala přes noc na orbitální třepačce ve tmě s několikerou výměnou dialyzačního roztoku. Po ukončení dialýzy byla u nanočástic měřena jejich velikost, index polydisperzity a intenzita záření, z níž se výpočtem z rovnice regrese kalibrační křivky stanovilo množství navázaného FITC a FITC-ox na 1 mg nanočástic (Tabulka 30). U vzorku 2 a 3 navíc byla zavedena druhá dialýza, která probíhala přes noc na orbitální třepačce při laboratorní teplotě a ve tmě. I po druhé dialýze následovalo měření parametrů pomocí analýzy DLS a stanovení intenzity záření na stanici Bio-Rad (Tabulka 31 a Tabulka 32).

Nanočástice byly značeny stejným postupem nezávisle na sobě, vzorek 3 byl značen jak FITC, tak FITC-ox v duplikátu (Vzorek A1+A2, Vzorek B1+B2).

Tabulka 30: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic značených FITC a FITC-ox včetně vypočítané hmotnosti FITC a FITC-ox na 1 mg nanočástic – vzorek 1

	Vzorek 1		
	Původní	FITC	FITC-ox
Hydrodynamický průměr[nm]	103,70	540,00	335,80
SD hydr. průměru [nm]	4,20	29,60	28,40
Index polydisperzity	0,33	1,52	0,66
SD indexu polydisperzity	0,023	0,114	0,123
Hmotnost FITC na 1 mg nanočástic	-	2,26 µg	0,81 µg

Tabulka 31: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic značených FITC a FITC-ox včetně vypočítané hmotnosti FITC a FITC-ox na 1 mg nanočástic – vzorek 2

	Vzorek 2				
	Původní	FITC		FITC-ox	
		I. dialýza	II. dialýza	I. dialýza	II. dialýza
Hydrodynamický průměr[nm]	126,90	751,20	X	669,40	244,70
SD hydr. průměru [nm]	2,90	512,30	X	391,20	13,10
Index polydisperzity	0,33	1,51	X	0,64	0,67
SD indexu polydisperzity	0,034	0,573	X	0,050	0,053
Hmotnost FITC na 1 mg nanočástic	-	2,29 µg	1,05 µg	1,48 µg	0,38 µg

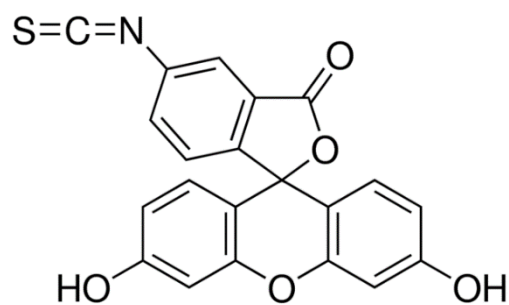
X – nevyhodnoceno, analýzou DLS se hodnoty nepodařilo stanovit

Tabulka 32: Výsledky DLS měření velikosti a indexu polydisperzity včetně směrodatných odchylek HA-nanočástic značených FITC a FITC-ox včetně vypočítané hmotnosti FITC a FITC-ox na 1 mg nanočástic – vzorek 3

	Vzorek 3				
	Původní	FITC		FITC-ox	
		A1	A2	B1	B2
Hydrodynamický průměr[nm]	75,20	1718,30	2125,40	2633,90	2359,90
SD hydr. průměru [nm]	2,200	169,096	698,620	1327,500	1788,000
Index polydisperzity	0,21	2,61	3,12	2,03	1,95
SD indexu polydisperzity	0,032	1,273	1,438	0,464	1,219
Hmotnost FITC na 1 mg nanočástic - I. dialýza		2,32 µg	2,30 µg	7,50 µg	2,56 µg
Hmotnost FITC na 1 mg nanočástic - II. dialýza		1,93 µg	1,93 µg	2,21 µg	2,76 µg

- *Zhodnocení značení nanočástic FITC a FITC-ox*

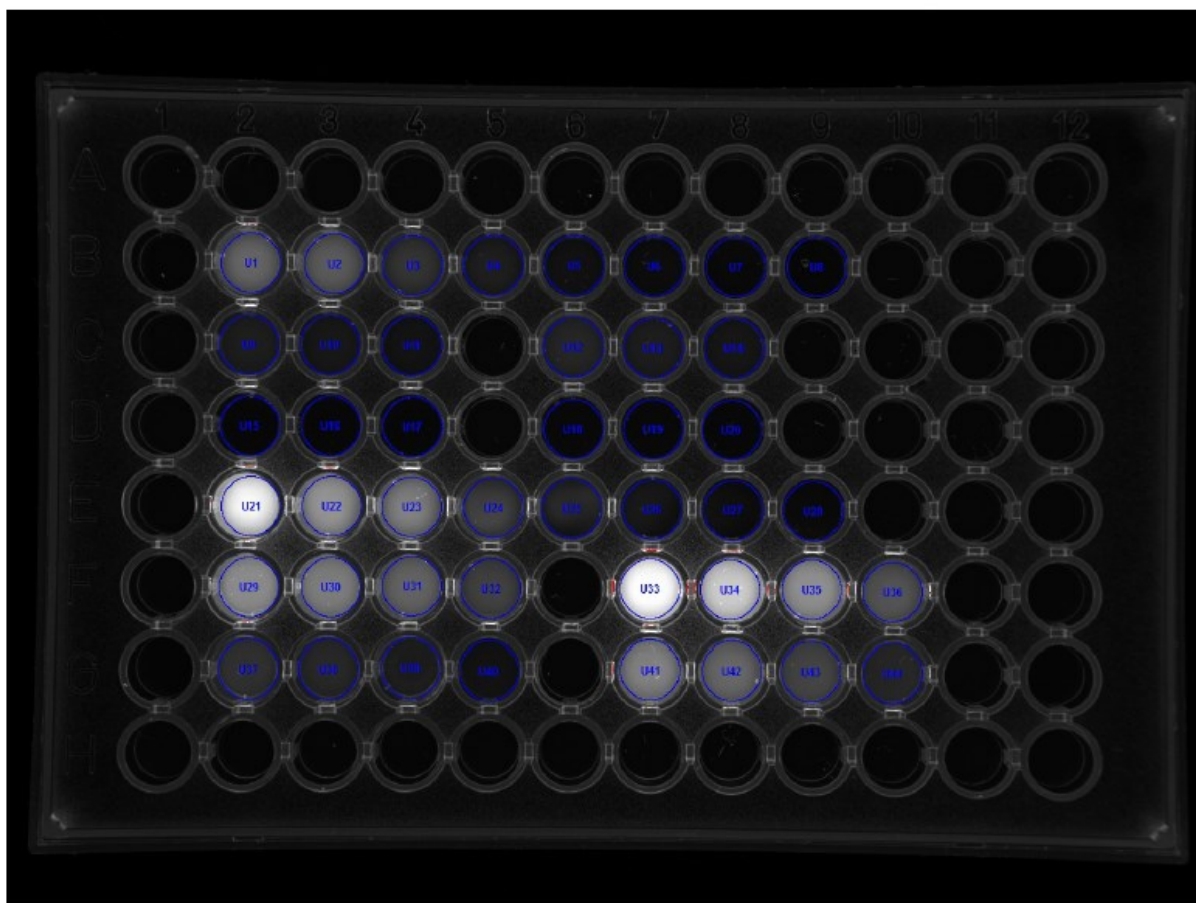
Pro značení nanočástic fluorescein isothiokyanátem byl použit buď neupravený FITC (Obrázek 8), nebo FITC oxidovaný jodistanem sodným. Zásobní roztok FITC byl připraven rozpuštěním naváženého množství v určitém množství dimethylformamidu, aby konečný roztok měl koncentraci 1 mg FITC /1 ml DMF.



*Obrázek 8: Fluorescein isothiokyanát
Převzato z [89]*

Přestože byl experiment se značením nanočástic FITC nebo FITC-ox prováděn několikrát, nepodařilo se připravit značené nanočástice tak, aby byly považovány za uniformní. U nanočástic značených jak neoxidovaným, tak i oxidovaným FITC se hydrodynamický průměr pohyboval vysoko nad velikostmi částic značených fluoresceinem. Průkazem neuniformity značených nanočástic jsou hodnoty směrodatných odchylek velikostí nanočástic a hodnoty indexu polydisperzity.

Podle obrázku 9 je na první pohled zřejmé, že větší intenzitu vykazovaly nanočástice značené neoxidovaným FITC.



Obrázek 9: Obrazový záznam fluorescenčního značení nanočástic s fluoresceinem, fluorescein isothiokyanátem a oxidovaným fluorescein isothiokyanátem při vyhodnocování intenzity fluorescenčního záření pomocí stanice ChemiDoc

Pořízeno stanicí ChemiDoc

V mikrotitrační destičce jsou pipetovány roztoky:

- Řada B – kalibrační řada roztoků pro nanočástice značené fluoresceinem
- Řada C – vzorky nanočástic značených fluoresceinem po první dialýze
- Řada D – vzorky nanočástic značených fluoresceinem po druhé dialýze
- Řada E – kalibrační řada roztoků pro nanočástice značené FITC
- Řada F – vzorky nanočástic značených FITC a FITC-ox po první dialýze
- Řada G – vzorky nanočástic značených FITC a FITC-ox po druhé dialýze

5.5 Diskuze výsledků

Výsledky experimentů a jednotlivých modifikací postupů pro přípravu nanočástic ukázaly, že jednotlivé parametry závisí na různých podmínkách. Nanočástice byly připravovány dle patentu [90]. Podmínky, za kterých byly experimenty prováděny, byly proměnlivé. Nebylo možné dodržet při jejich přípravě konstantní teplotu, tlak, vlhkost a další parametry, jako např. při experimentech ve studiích [84, 91].

Při přípravě nanočástic karbodiimidovou metodou s použitím zesíťovacího činidla AAD (kapitola 5.2) se zjistilo, že jejich velikost závisí na podmínkách, při jakých jsou připravovány. Nejvýrazněji hydrodynamický průměr a index polydisperzity ovlivňuje délka inkubační doby mezi jednotlivými krokovými přidavky acetonu (organické rozpouštědlo, ve kterém kyselina hyaluronová nanoprecipitovala) [84]. Čím déle aceton na nanočástice působil, tím menší byla jejich velikost. Dalším způsobem, kterým lze ovlivnit velikost nanočástic, je volba dialyzačního roztoku. Velikost nanočástic po dialýze do fyziologického roztoku vykazovaly menší hydrodynamický průměr proti stejným roztokům nanočástic, které byly dialyzovány do vody.

Při měření zeta-potenciálu bylo zjištěno, že pokud je použit jako dialyzační a ředící roztok 0,9% NaCl, hodnoty potenciálu predikují shlukování částic. Důvodem jsou chloridové a sodné ionty obsažené v tomto roztoku. Nejjednodušším možným řešením bylo provedení dialýzy částic do destilované vody. Pomocí osmózy se dialýzou vyrovnávala koncentrace iontů v dialyzační membráně a v dialyzačním roztoku. Několikerou výměnou dialyzačního roztoku (destilované vody) se nejen dialýza urychlila, ale bylo také dosaženo velice nízké koncentrace původních sodných a chloridových iontů.

Pro použití druhého zesíťovacího činidla – BAPA – se podmínky pro přípravu nanočástic stanovit nepodařilo. I přes veškeré modifikace a úpravy postupu nebyly připraveny takové nanočástice, které by byly vhodné pro fluorescenční značení. Hydrodynamický průměr připravených částic téměř nikdy neshodoval a index polydisperzity byl velice vysoký. Přestože analyzátor každý vzorek analyzoval minimálně 12x a výsledné velikosti jsou tedy průměrné hodnoty těchto 12 měření, u několika experimentů se hydrodynamický průměr a index polydisperzity nepodařilo stanovit. Z toho důvodu nejsou výsledky připravených nanočástic s činidlem BAPA zhodnocené do grafů a v tabulkách jsou pouze výsledky získané analýzou DLS.

Ke značení nanočástic fluorescenční značkou byly použity dvě činidla – fluorescein sodná sůl a fluorescein isothiokyanát (FITC). Ten byl použit ke značení nanočástic ve dvou provedeních – oxidovaný a neoxidovaný. Nanočástice značené fluoresceinem si i po označení

zachovaly téměř svou původní velikost. Ovšem při experimentu provedení druhé dialýzy nastaly pochybnosti. Nanočástice značené fluoresceinem vykazovaly mnohem menší intenzitu fluorescence oproti předchozímu měření a vypočítané množství fluoresceinu na 1 mg nanočástic klesl téměř o tři řády. Proto jsou nutné další výzkumy, které by ukázaly, zdali i toto množství fluoresceinu je pro aplikaci *in vivo* a následné zobrazení dostatečné. Při porovnání oxidovaného a neoxidovaného FITC vyšlo lépe značení neoxidovaným FITC. Na nanočástice se jej podle výsledné intenzity navázalo více než neoxidovaného. U obou skupin nanočástic značených FITC (oxidovaným i neoxidovaným) byl index polydisperzity vysoký a hydrodynamický průměr vycházel nepředvídatelně. V jednom případě se velikost naměřit nepodařila.

ZÁVĚR

Pomocí optimalizačních kroků byly ověřeny protokoly vhodné pro přípravu nanočástic kyseliny hyaluronové o rozdílných velikostech. Bylo zjištěno, že hydrodynamický průměr nanočástic je ovlivnitelný délkou působení precipitačního roztoku (v tomto případě acetonu) i volbou dialyzačního roztoku (vodou či fyziologickým roztokem).

Vliv na velikost nanočástic má také v neposlední řadě zesíťovací činidlo. Při přípravě nanočástic s EDC a AAD bylo provedeno několik experimentů, kde se zjišťoval vliv těchto činidel na velikost nanočástic i jejich index polydisperzity. Hodnoty indexu polydisperzity byly nízké a naměřené velikosti vykazovaly jen minimální směrodatné odchylky. Z toho důvodu by se nanočástice ve výše uvedených roztocích daly považovat za uniformní.

Protokol, kde bylo pro zesíťení použito činidlo BAPA, se neosvědčil. Optimální podmínky se nalézt nepodařilo. Naměřené velikosti měly velké směrodatné odchylky, indexy polydisperzity byly také velmi vysoké. S takovými částicemi není vhodné provádět další experimenty.

Rozporuplné výsledky přineslo měření intenzity nanočástic, na které byly navázány fluorescenční značky – fluorescein a FITC nativní i oxidovaný. Měřením intenzity po druhé dialýze značených nanočástic se ukázalo, že její hodnota velice klesla a není proto jisté, zda fluorescenční značka byla na nanočásticích dostatečně navázána.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] WILDER, R. B., G. A. BARME, R. F. GILBERT, et al. Cross-Linked Hyaluronan Gel Reduces the Acute Rectal Toxicity of Radiotherapy for Prostate Cancer. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* .2010, 77(3), 824-830. DOI 10.1016/j.ijrobp.2009.05.069
- [2] RIEHL, T. E., L FOSTER a W. F. STENSON. Hyaluronic acid is radioprotective in the intestine through a TLR4 and COX-2-mediated mechanism. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2012, 302(3), G309-G316. DOI 10.1152/ajpgi.00248.2011
- [3] Henri Becquerel: Biographical. *The Nobel Prize* [online]. Nobel Media [cit. 2020-04-28]. Dostupné z: <https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1903/becquerel/biographical/>
- [4] Marie Curie: Biographical. *The Nobel Prize* [online]. Nobel Media [cit. 2020-04-28]. Dostupné z: <https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1903/marie-curie/biographical/>
- [5] Pierre Curie: Biographical. *The Nobel Prize* [online]. Nobel Media [cit. 2020-04-28]. Dostupné z: <https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1903/pierre-curie/biographical/>
- [6] Ernest Rutherford: Biographical. *The Nobel Prize* [online]. Nobel Media [cit. 2020-04-28]. Dostupné z: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1908/rutherford/biographical>
- [7] Frédéric Joliot: Facts. *The Nobel Prize* [online]. Nobel Media [cit. 2020-04-28]. Dostupné z: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1935/joliot-fred/facts>
- [8] Irène Joliot-Curie: Facts. *The Nobel Prize* [online]. Nobel Media [cit. 2020-04-28]. Dostupné z: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1935/joliot-curie/facts>
- [9] ULLMANN, V. *Jaderná a radiační fyzika*. Ostrava: Ostravská univerzita v Ostravě, Fakulta zdravotnických studií, 2009. ISBN 978-80-7368-669-7.
- [10] HÁLA, J. *Radioaktivita, ionizující záření, jaderná energie*. Brno: Konvoj, 1998, 311 s. ISBN 80-856-1556-8.
- [11] ROSINA, J. *Biofyzika: pro zdravotnické a biomedicínské obory*. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4237-3.
- [12] ŠVEC, J. *Radioaktivita a ionizující záření: Doplnující učební text pro předměty Bakalářská fyzika, Aplikovaná fyzika, Ochrana před zářením* [online]. Ostrava: Sdružení požárního a bezpečnostního inženýrství, 2005 [cit. 2020-01-03]. ISBN 80-86634-62-0
- [13] *Nuclear power* [online]. Shutdown Margin – SDM [cit. 2020-04-28]. Dostupné z: <https://www.nuclear-power.net/nuclear-power/reactor-physics/atomic-nuclear-physics/radioactive-decay/>

- [14] RUANO-RAVINA, A. a R. WAKEFORD. The Increasing Exposure of the Global Population to Ionizing Radiation. *Epidemiology*. 2020, 31(2), 155-159. DOI 10.1097/EDE.0000000000001148
- [15] KARMAKER, N., K. M. MARAZ, et al. Fundamental characteristics and application of radiation. *GSC Advanced Research and Reviews*. 2021, 7(1), 064-072. DOI 10.30574/gscarr.2021.7.1.0043
- [16] Průnik záření různými druhy materiálů. In: *Aktivní zóna: On-line časopis Jaderné elektrárny Dukovany* [online]. [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: <https://www.aktivnizona.cz/cs/havarijni-prirucka/o-radioaktivite-23123>
- [17] BENEŠ, J., J. KYMPLOVÁ a F. VÍTEK. *Základy fyziky pro lékařské a zdravotnické obory: pro studium i praxi*. Praha: Grada, 2015. ISBN 978-802-4747-125.
- [18] BENEŠ, J., P. STRÁNSKÝ a F. VÍTEK. *Základy lékařské biofyziky*. 2., přeprac. vyd. Praha: Karolinum, 2007. ISBN 978-802-4613-864.
- [19] EAKINS, J. S. a E. A. AINSBURY. Quantities for assessing high doses to the body: a short review of the current status. *Journal of Radiological Protection*. 2018, 38(2), 731-742. DOI 10.1088/1361-6498/aabffe
- [20] RAJARAMAN, P., M. HAUPTMANN, et al. Human individual radiation sensitivity and prospects for prediction. *Annals of the ICRP*. 2018, 47(3-4), 126-141. DOI 10.1177/0146645318764091
- [21] FORAY, N., M. BOURGUIGNON a N. HAMADA. Individual response to ionizing radiation. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2016, 770, 369-386. DOI 10.1016/j.mrrev.2016.09.001
- [22] DESOUKY, O., N. DING a G. ZHOU. Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 2019, 8(2), 247-254. DOI 10.1016/j.jrras.2015.03.003
- [23] HALL, S., S. RUDRAWAR, et. al. *Protection against Radiotherapy-Induced Toxicity. Antioxidants*. 5 July 2016, 5(3). DOI: 10.3390/antiox5030022
- [24] Stručný přehled biologických účinků záření. *SÚJB: Státní úřad pro jadernou bezpečnost* [online]. [cit. 2021-3-18]. Dostupné z: <https://www.sujb.cz/radiacni-ochrana/oznameni-a-informace/strucny-prehled-biologickych-ucinku-zareni/>
- [25] CSABA, G.. Hormesis and immunity: *A review. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 2019, 66(2), 155-168. DOI 10.1556/030.65.2018.036
- [26] LÁZNĚ JÁCHYMOV. *Léčebné lázně Jáchymov a.s* [online]. [cit. 2021-03-24]. Dostupné z: <https://www.laznejachymov.cz/>
- [27] ZAKARIYA, N. I. a M. T. E. KAHN. Benefits and Biological Effects of Ionizing Radiation. *Scholars Academic Journal of Biosciences* [online]. 2014, 2(9), 583-591 [cit. 2021-5-31]. ISSN 2321-6883

- [28] MACIÀ I G. M., A. LUCAS CALDUCH a E. C. LÓPEZ. *Radiobiology of the acute radiation syndrome*. 2011, 16(4), 123-130. DOI 10.1016/j.rpor.2011.06.001
- [29] KLEIMAN, N.J. Radiation cataract. *Annals of the ICRP*. 2012, 41(3-4), 80-97. DOI 10.1016/j.icrp.2012.06.018
- [30] AGARWAL, A. a P. SENGUPTA. Oxidative Stress and Its Association with Male Infertility. *Male Infertility*. Cham: Springer International Publishing, 2020, 2020-01-25, , 57-68. DOI 10.1007/978-3-030-32300-4_6
- [31] MARCI, R., M. MALLOZZI, et al. Radiations and female fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2018, 16(1). DOI 10.1186/s12958-018-0432-0
- [32] LAMBROT, R., H. COFFIGNY, et al. *High Radiosensitivity of Germ Cells in Human Male Fetus*. 2007, 92(7), 2632-2639. DOI: 10.1210/jc.2006-2652
- [33] GULERIA, R.. Harmful Effects of Ionizing Radiation. *International Journal for Research in Applied Science and Engineering Technology*. 2019, 7(12), 887-889. DOI 10.22214/ijraset.2019.12141
- [34] SINGH, M., A. ALAVI, et al. *Radiodermatitis: A Review of Our Current Understanding*. American Journal of Clinical Dermatology. 2016, 17(3), 277-292. DOI 10.1007/s40257-016-0186-4
- [35] HUANG, Y., W.ZHANG, et al. The Cellular and Molecular Mechanism of Radiation-Induced Lung Injury. *Medical Science Monitor*. 2017, 23, 3446-3450. DOI 10.12659/MSM.902353
- [36] HANANIA, A. N., W. MAINWARING, et al. Radiation-Induced Lung Injury. *Chest*. 2019, 156(1), 150-162. DOI 10.1016/j.chest.2019.03.033
- [37] ARROYO-HERNÁNDEZ, M., F. MALDONADO, et al. Radiation-induced lung injury: current evidence. *BMC Pulmonary Medicine*. 2021, 21(1). DOI 10.1186/s12890-020-01376-4
- [38] BROWN, J. M., Tumor Hypoxia in Cancer Therapy. *Oxygen Biology and Hypoxia*. Elsevier, 2007, 2007, 295-321. Methods in Enzymology. DOI 10.1016/S0076-6879(07)35015-5
- [39] FAKHARI, A., *Biomedical Application of Hyaluronic Acid Nanoparticles*. Kansas, 2012. Disertační práce. The University of Kansas. Dostupné také z: <https://kuscholarworks.ku.edu/handle/1808/9825>.
- [40] KOGAN, G., L. ŠOLTÉS, et al. Hyaluronic Acid: Its Function and Degradation in *in vivo* Systems. *Bioactive Natural Products (Part N)*. Elsevier, 2008, 2008, , 789-882. Studies in Natural Products Chemistry. DOI 10.1016/S1572-5995(08)80035-X
- [41] GUPTA, R. C., R. LALL, et al. Hyaluronic Acid: Molecular Mechanisms and Therapeutic Trajectory. *Frontiers in Veterinary Science*. 2019, 6. DOI 10.3389/fvets.2019.00192, ISSN 2297-1769

- [42] JIANG, D., J. LIANG a P. W. NOBLE. Hyaluronan as an Immune Regulator in Human Diseases. *Physiological Reviews*. 2011, 91(1), 221-264. DOI 10.1152/physrev.00052.2009
- [43] DICKER, K. T., L. A. GURSKI, et al. Hyaluronan: A simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta Biomaterialia*. 2014, 10(4), 1558-1570. DOI 10.1016/j.actbio.2013.12.019
- [44] Hyaluronic acid sodium salt from *Streptococcus equi*. In: *Merck KGaA: Sigma-Aldrich* [online]. Darmstadt, Germany [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/53747?lang=en&ion=CZ&cm_sp=Insite-_-caSrpResults_srpRecs_srpModel_53747-_-srpRecs3-1
- [45] AMORIM, S., C.A. REIS, et al. Extracellular Matrix Mimics Using Hyaluronan-Based Biomaterials. *Trends in Biotechnology*. 2021, 39(1), 90-104. DOI 10.1016/j.tibtech.2020.06.003
- [46] SKANDALIS, S. S., T. KARALIS a P. HELDIN. Intracellular hyaluronan: Importance for cellular functions. *Seminars in Cancer Biology*. 2020, 62, 20-30. DOI 10.1016/j.semcancer.2019.07.002
- [47] UNIPROT CONSORTIUM. *UniProt: UniProtKB* [online]. [cit. 2020-04-07]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/>
- [48] STENSON, W. F. a M. A. CIORBA. Nonmicrobial Activation of TLRs Controls Intestinal Growth, Wound Repair, and Radioprotection. *Frontiers in Immunology*. 2021, 11. DOI 10.3389/fimmu.2020.617510
- [49] KAKEHI, K., M. KINOSHITA a S. YASUEDA. Hyaluronic acid: separation and biological implications. *Journal of Chromatography B*. 2003, 797(1-2), 347-355. DOI 10.1016/S1570-0232(03)00479-3
- [50] ABATANGELO, G., V. VINDIGNI, et al. Hyaluronic Acid: Redefining Its Role. *Cells*. 2020, 9(7). DOI 10.3390/cells9071743
- [51] HELDIN, P, C.-Y. LIN, et al., Regulation of hyaluronan biosynthesis and clinical impact of excessive hyaluronan production. *Matrix Biology*. 2019, 78-79, 100-117. DOI 10.1016/j.matbio.2018.01.017
- [52] STERN, R., A. A. ASARI a K. N. SUGAHARA., Hyaluronan fragments: An information-rich system. *European Journal of Cell Biology*. 2006, 85(8), 699-715. DOI 10.1016/j.ejcb.2006.05.009
- [53] NAGY, N., H. F. KUIPERS, et al., Hyaluronan in immune dysregulation and autoimmune diseases. *Matrix Biology*. 2019, 78-79, 292-313. DOI 10.1016/j.matbio.2018.03.022
- [54] MISRA, S., V. C. HASCALL, et al., Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer. *Frontiers in Immunology*. 2015, 6. DOI 10.3389/fimmu.2015.00201

- [55] ZHU, Z., Y.-M. WANG, et al., Hyaluronic acid: a versatile biomaterial in tissue engineering. *Plastic and Aesthetic Research* [online]. 2017, 4(12), 219-27. DOI 10.20517/2347-9264.2017.71
- [56] CHEN, W. Y. J., Functions of hyaluronan in wound repair. *Hyaluronan*. Elsevier, 2002, 147-156. DOI 10.1533/9781845693121.147
- [57] BÁRDOS, T., R. V. KAMATH, et al., Anti-Inflammatory and Chondroprotective Effect of TSG-6 (Tumor Necrosis Factor- α -Stimulated Gene-6) in Murine Models of Experimental Arthritis. *The American Journal of Pathology*. 2001, 159(5), 1711-1721. DOI 10.1016/S0002-9440(10)63018-0
- [58] YASAKA, N., M. FURUE a K. TAMAKI., CD44 Expression in Normal Human Skin and Skin Tumors. *The Journal of Dermatology*. 1995, 22(2), 88-94. DOI 10.1111/j.1346-8138.1995.tb03349.x
- [59] FISCHER, A., C. PICARD, et al., ZAP70: a master regulator of adaptive immunity. *Seminars in Immunopathology*. 2010, 32(2), 107-116. DOI 10.1007/s00281-010-0196-x
- [60] SINGAMPALLI, K. L., S. BALAJI, et al. The Role of an IL-10/Hyaluronan Axis in Dermal Wound Healing. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020, 8. DOI 10.3389/fcell.2020.00636
- [61] TEDER, P. Resolution of Lung Inflammation by CD44. *Science*. 296(5565), 155-158. DOI 10.1126/science.1069659, ISSN 00368075
- [62] HART, S. P., G. J. DOUGHERTY, et al., *The Journal of Immunology: CD44 regulates phagocytosis of apoptotic neutrophil granulocytes, but not apoptotic lymphocytes, by human macrophages*. 159. 15 Jul 1997n. 1., 919-925. PMID: 9218612
- [63] KAMRAN, M. Z., A. RANJAN, et al., Radioprotective Agents: Strategies and Translational Advances. *Medicinal Research Reviews*. 2016, 36(3), 461-493. DOI 10.1002/med.21386
- [64] ALOK, A. a N.K. CHAUDHURY. Tetracycline hydrochloride: A potential clinical drug for radioprotection. *Chemico-Biological Interactions*. 2016, 245, 90-99. DOI 10.1016/j.cbi.2016.01.001
- [65] KIM, K., J. M. POLLARD, et al. High-Throughput Screening Identifies Two Classes of Antibiotics as Radioprotectors: Tetracyclines and Fluoroquinolones. *Clinical Cancer Research*. 2009, 15(23), 7238-7245. .DOI 10.1158/1078-0432.CCR-09-1964
- [66] NUSZKIEWICZ, J., A. WOŹNIAK a K. SZEWCZYK-GOLEC. Ionizing Radiation as a Source of Oxidative Stress—The Protective Role of Melatonin and Vitamin D. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, 21(16). DOI 10.3390/ijms21165804
- [67] YAMAMOTO, T. a M. KINOSHITA. Radioprotective Effect of Vitamin C as an Antioxidant. *Vitamin C*. InTech, 2017, 2017-08-02. DOI 10.5772/intechopen.68988

- [68] VELPULA, N., S. UGRAPPA a S. KODANGAL. *A role of radioprotective agents in cancer therapeutics: a review.* 2013, 2(6). DOI 10.5455/2319-2003.ijbcp20131203
- [69] MURRAY, D., E. M. ALTSCHULER, et al., *Protection by WR-3689 against γ -Ray-Induced Intestinal Damage: Comparative Effect on Clonogenic Cell Survival, Mouse Survival, and DNA Damage.* *Radiation Research.* 1989, 120(2). DOI 10.2307/3577719
- [70] JOHNKE, R. M, J. A SATTLER a R. R ALLISON. Radioprotective agents for radiation therapy: future trends. *Future Oncology.* 2014, 10(15), 2345-2357. DOI 10.2217/fon.14.175
- [71] CHERUPALLY K. K. N., DILLIP K. PARIDA a T. NOMURA. Radioprotectors in Radiotherapy. *Journal of Radiation Research.* 2001, 42(1), 21-37. DOI 10.1269/jrr.42.21
- [72] HARAPANHALLI, R. S., V.R. NARRA, V. et al., Vitamins as Radioprotectors In Vivo II. Protection by Vitamin A and Soybean Oil against Radiation Damage Caused by Internal Radionuclides. *Radiation Research.* InTech, 1994, 2017-08-02, 139(1). DOI 10.2307/3578741
- [73] MICKE, O., L. SCHOMBURG, et al., Selenium in Oncology: From Chemistry to Clinics. *Molecules.* InTech, 2009, 2017-08-02, 14(10), 3975-3988. DOI 10.3390/molecules14103975
- [74] SAVARESE, D. M. F, G. SAVY, et al., Prevention of chemotherapy and radiation toxicity with glutamine. *Cancer Treatment Reviews.* 2003, 29(6), 501-513. DOI 10.1016/S0305-7372(03)00133-6
- [75] STELZER, K. J., W.-J. KOH, et al., Caffeine consumption is associated with decreased severe late toxicity after radiation to the pelvis. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*Physics.* 1994, 30(2), 411-417. DOI 10.1016/0360-3016(94)90022-1
- [76] ADNAN, M., A. RASUL, et al. Radioprotective Role of Natural Polyphenols: From Sources to Mechanisms. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry.* 2021, 21. DOI 10.2174/1871520621666210419095829
- [77] JAGETIA, G. C., Radioprotection and radiosensitization by curcumin. *The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease.* Boston, MA: Springer US, 2007, 301-320. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* DOI 10.1007/978-0-387-46401-5_13
- [78] ANDREASSEN, C. N., C. GRAU a J. C. LINDEGAARD. Chemical radioprotection: A critical review of amifostine as a cytoprotector in radiotherapy. *Seminars in Radiation Oncology.* 2003, 13(1), 62-72. DOI 10.1053/srao.2003.50006
- [79] HOSSEINIMEHR, S. J., Trends in the development of radioprotective agents. *Drug Discovery Today.* 2007, 12(19-20), 794-805. DOI 10.1016/j.drudis.2007.07.017

- [80] XIE, J., C. WANG, et al., Application of Multifunctional Nanomaterials in Radioprotection of Healthy Tissues. *Advanced Healthcare Materials*. 2018, 7(20). DOI 10.1002/adhm.201800421
- [81] PATEL, J. M., R. C. JACKSON, et al., Carbodiimide cross-linking counteracts the detrimental effects of gamma irradiation on the physical properties of collagen-hyaluronan sponges. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2018, 29(6). DOI 10.1007/s10856-018-6056-2
- [82] CHOI, S.-H., D.-Y. LEE, et al. Caffeic Acid Phenethyl Ester-Incorporated Radio-Sensitive Nanoparticles of Phenylboronic Acid Pinacol Ester-Conjugated Hyaluronic Acid for Application in Radioprotection. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22(12). DOI 10.3390/ijms22126347
- [83] HU, Z., X. XIA a L. TANG. *Proces for synthesizing oil and surfactant-free hyaluronic acid nanoparticles and microparticles*. Feb. 23, 2006. United States. US 2006/0040892 A1. Zapsáno Feb. 23, 2006.
- [84] BICUDO, R. C. S. a M. H. A. SANTANA. Effects of Organic Solvents on Hyaluronic Acid Nanoparticles Obtained by Precipitation and Chemical Crosslinking. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2012, 12(3), 2849-2857. DOI 10.1166/jnn.2012.5814
- [85] Horiba SZ-100. In: *HORIBA* [online]. [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: https://www.horiba.com/en_en/products/detail/action/show/Product/sz-100-1356/
- [86] CLOGSTON, J. D. a A. K. PATRI. Zeta Potential Measurement. *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*. Totowa, NJ: Humana Press, 2011, 2011-10-19, 63-70. Methods in Molecular Biology. DOI 10.1007/978-1-60327-198-1_6
- [87] Bis(3-aminopropyl)amine. In: *Merck KGaA: Sigma-Aldrich* [online]. Darmstadt, Germany [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/i1006?lang=en®ion=CZ&cm_sp=Insite_-_caSrpResults_srpRecs_srpModel_i1006_-_srpRecs3-1
- [88] Fluorescein sodium salt. In: *Merck KGaA: Sigma-Aldrich* [online]. Darmstadt, Germany [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/46960?lang=en®ion=CZ&cm_sp=Insite_-_caSrpResults_srpRecs_srpModel_fluorescein%20sodium%20salt_-_srpRecs3-2
- [89] Fluorescein isothiocyanate isomer I. In: *Merck KGaA: Sigma-Aldrich* [online]. Darmstadt, Germany [cit. 2021-03-18]. Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/f7250?lang=en®ion=CZ&cm_sp=Insite_-_caSrpResults_srpRecs_srpModel_fitc_-_srpRecs3-1
- [90] ZHIBING Z., X. XIAOHU, T. LIPING, Process for synthesizing oil and surfactant-free hyaluronic acid nanoparticles and microparticles (Patent N0.: US 7,601,704 B2), 2009.

- [91] BODNÁR, M., L. DARÓCZI, et al., Preparation and characterization of cross-linked hyaluronan nanoparticles. *Colloid and Polymer Science*. 2009, 287(8), 991-1000. DOI 10.1007/s00396-009-2061-9