

# **Stanovení termodynamických parametrů vybraných komplexů s cyklodextriny pomocí isothermální titrační mikrokolorimetrie**

Andrea Jarošová

---

Bakalářská práce  
2019



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav analýzy a chemie potravin

akademický rok: 2018/2019

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Andrea Jarošová**  
Osobní číslo: **T16996**  
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie a řízení v gastronomii**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Stanovení termodynamických parametrů vybraných komplexů s cyklodextriny pomocí isothermní titrační mikrokolorimetrie**

Zásady pro vypracování:

### Teoretická část:

1. Biopolymery se zaměřením na chitosan a hyaluronan, jejich využití a aplikace v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu.
2. Stručná charakteristika cyklodextrinů a možnosti jejich využití jako modifikátorů biopolymerů.
3. Stručná charakteristika isothermní titrační mikrokolorimetrie a oblasti využití této metody.

### Praktická část:

1. Stanovit termodynamické parametry komplexačních reakcí cyklodextrinů s vybranými sloučeninami.
2. Provéřít vazebné možnosti cyklodextrinem modifikovaných biopolymerů pomocí isothermní titrační mikrokolorimetrie.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] Dodziuk, H. Cyclodextrins and Their Complexes. 2006, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. ISBN 3-527-31280-3.

[2] Venter J. P., Kotzé A. F, Auzély-Velty R, Rinaudo M. Synthesis and evaluation of the mucoadhesivity of a CD-chitosan derivative. Int J Pharm. 2006 26; 313, 36-42.

[3] Mezinárodní elektronické databáze (Scopus, SciFinder, Web of Science...)

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Zdeňka Prucková, Ph.D.**  
Ústav chemie

Datum zadání bakalářské práce: **1. února 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce: **10. května 2019**

Ve Zlíně dne 1. února 2019

L.S.

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*

doc. Ing. Jiří Miček, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: ANDREA JAROSOVÁ

Obor: TR

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 10.5.2019

<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užit či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou tvorby reverzibilních supramolekulárních gelů, jež vznikají v důsledku vazby jedno-, dvou- a třívazných ligandů na bázi adamantanu do kavity  $\beta$ -cyklodextrinu, jímž byly modifikovány biopolymery chitosan a hyaluronan. Teoretická část bakalářské práce je zaměřena na charakteristiku, zdroje a využití přírodních biopolymerů chitosanu a hyaluronanu, je zde také zmíněno jejich využití při tvorbě supramolekulárních sítí. Cílem experimentální části bylo pomocí isothermální titrační mikrokolorimetrie stanovit termodynamický profil vazby ligandů na bázi adamantanu do kavity  $\beta$ -cyklodextrinu, kterým byly biopolymery modifikovány. Důraz byl kladen na stanovení hodnot stechiometrických poměrů vazby jedno-, dvou- a třívazných ligandů při tvorbě supramolekulárních sítí. Touto studií bylo potvrzeno, že takto nekovalentně síťované gely mohou vznikat. Všechny získané výsledky byly zpracovány a vyhodnoceny v diskuzní části a z nich vyplývající úsudky byly zhodnoceny v závěru této bakalářské práce.

Klíčová slova: chitosan, hyaluronan,  $\beta$ -cyklodextrin, isothermální titrační mikrokolorimetrie

## **ABSTRACT**

The Bachelor thesis is focused on the study of reversible supramolecular gels which are created as a result of complexation between single, binary or triple bound adamantan-based ligands and the  $\beta$ -cyclodextrin cavity which has been used for modification of chitosan and hyaluronan biopolymers. The theoretical study includes characteristics, sources and the use of chitosan and hyaluronan, it also implies their role in the supramolecular net formation. The aim of the experimental study was to determine thermodynamic profile of the adamantan-based ligands binding with  $\beta$ -cyclodextrin cavity that has been used for modification of chitosan and hyaluronan biopolymers. The main task was to determine the complex stoichiometry for each interaction for all three types of ligands during supramolecular net formation. This study confirms the possibility of noncovalent gel formation, all experiments and results are discussed in the conclusion of this thesis.

Keywords: chitosan, hyaluronan,  $\beta$ -cyclodextrin, isothermal titration microcalorimetry

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí své bakalářské práce Ing. Zdeňce Pruckové, Ph.D. za veškerou ochotu, trpělivost a za pomocnou ruku, kterou mi kdykoli při přípravě práce podala. Také děkuji Ústavu chemie FT UTB za poskytnutí vzorků ligandů a roztoků biopolymerů pro svá měření. A v neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině za neutuchající podporu ve studiu a skvělé zázemí, které mi vždy doma vytvoří.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 BIOPOLYMERY CHITOSAN A HYAULURONAN</b> .....	<b>12</b>
1.1 CHITOSAN.....	12
1.1.1 Historie.....	12
1.1.2 Chemická struktura .....	12
1.1.3 Produkce.....	13
1.1.4 Biologické vlastnosti .....	14
1.1.5 Využití.....	15
1.2 HYALURONAN.....	19
1.2.1 Historie.....	19
1.2.2 Význam .....	19
1.2.3 Chemická struktura .....	20
1.2.4 Biosyntéza a degradace .....	21
1.2.5 Receptory pro hyaluronan .....	22
1.2.6 Fyzikálně-chemické vlastnosti .....	22
1.2.7 Produkce.....	23
1.2.8 Využití.....	25
<b>2 CYKLODEXTRINY</b> .....	<b>27</b>
2.1 HISTORIE.....	27
2.2 CHEMICKÁ STRUKTURA.....	27
2.2.1 Komplexace cyklodextrinů .....	28
2.2.2 Modifikace cyklodextrinů pro tvorbu polymerních sítí .....	30
2.2.3 Využití inkluzních komplexů cyklodextrinů.....	31
<b>3 ISOTERMÁLNÍ TITRAČNÍ MIKROKALORIMETRIE</b> .....	<b>32</b>
3.1 PRINCIP .....	32
3.2 APLIKACE.....	34
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>35</b>
<b>4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>36</b>
4.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE .....	36
4.1.1 VP-ITC Mikrokalorimetr .....	36
4.1.2 Thermo-Vac .....	36
4.1.3 pH-metr .....	36
4.2 POUŽITÉ MODIFIKOVANÉ BIOPOLYMERY A LIGANDY.....	37
4.3 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ PUFŘŮ A ZÁSOBNÍCH ROZTOKŮ MODIFIKOVANÝCH BIOPOLYMERŮ .....	40
<b>5 VÝSLEDKY A DISKUSE</b> .....	<b>41</b>
<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>49</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>50</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b> .....	<b>56</b>



<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>58</b>
<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>59</b>

## ÚVOD

Přírodní biopolymery chitosan a hyaluronan jsou látky sacharidové povahy, jež jsou charakteristické svou biokompatibilitou a výbornými netoxickými vlastnostmi. Jedná se tak o látky vysoce ceněné, s velkým potenciálem pro využití nejen ve farmaceutickém průmyslu, medicíně nebo v tkáňovém inženýrství, ale také v potravinářském průmyslu. Chitosan i hyaluronan lze vhodně modifikovat za účelem zlepšení či změny jejich fyzikálně-chemických vlastností. Této modifikace může být dosaženo například kovalentním navázáním cyklodextrinových jednotek, které mohou být součástí inkluzních komplexů s různými molekulami, jež slouží jako linkery umožňující vznik reversibilních supramolekulárních chitosanových, resp. hyaluronanových sítí. Prostřednictvím těchto sítí dochází ke tvorbě supramolekulárních gelů, majících potenciál uplatnit se jako nosiče léčiv či jiných biologicky aktivních molekul. Proto je velmi žádoucí zabývat se problematikou vzniku zmíněných sítí, například pomocí isothermální titrační mikrokalorimetrie, jež byla využita i pro účely této bakalářské práce zabývající se studiem supramolekulárního chování výše jmenovaných biopolymerů modifikovaných  $\beta$ -cyklodextriny.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 BIOPOLYMERY CHITOSAN A HYAULURONAN

## 1.1 CHITOSAN

Jedná se o jeden z významných přírodních polysacharidů, jenž díky své molekulové struktuře, obsahující reaktivní funkční skupiny, může být kombinován s různými bioaktivními materiály. To následně umožňuje jeho využití ve farmacii, kosmetice, tkáňovém inženýrství či v potravinářském průmyslu.<sup>1</sup>

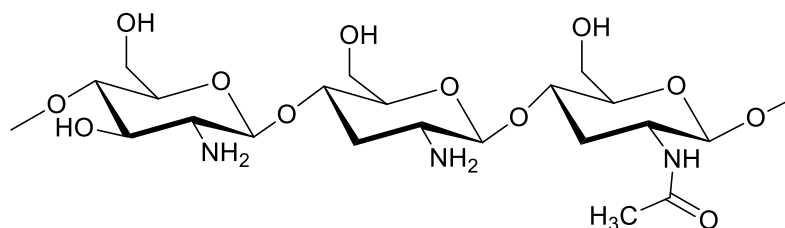
### 1.1.1 Historie

Chitosan se získává z chitinu, jenž byl poprvé identifikován a pozorován v houbách francouzským profesorem Henrim Braconnotem v roce 1811 a později byl izolován také ze schránek hmyzu a korýšů. Samotný chitosan byl objeven v roce 1859 Charlesem Rougetem, jeho chemická struktura byla však identifikována až v roce 1950 pomocí rentgenových paprsků.<sup>2</sup>

### 1.1.2 Chemická struktura

Chitosan, někdy zvaný jako deacetylovaný chitin, je přírodní polykationický lineární polysacharid upravený částečnou deacetylací chitinu, jenž je stavebním prvkem exoskeletu hmyzu, korýšů (především krevet a krabů) a buněčných stěn hub. Také je druhým nejčastějším v přírodě se vyskytujícím polysacharidem.<sup>1</sup> Skládá se z uhlíku (44,1 %), vodíku (6,84 %) a dusíku (7,97 %).<sup>2</sup>

Struktura chitosanu je tvořena z D-glukosaminu a *N*-acetyl-D-glukosaminu spojených  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glykosidickou vazbou. Vyznačuje se kationickou povahou, což je výjimečné, protože většina polysacharidů je v kyselém prostředí obvykle neutrální nebo negativně nabitá.<sup>1</sup>



Obrázek 1: Chemická struktura chitosanu

Aminové skupiny v chitosanu jsou protonovány kyselým pH a přenášejí pozitivní náboj na chitosanové řetězce, což umožňuje vytvářet elektrostatické komplexy nebo vícevrstvé struktury s jinými negativně nabitými syntetickými či přírodními polymery. Obecně platí, že chitosan má tři typy reaktivních funkčních skupin. Jeho aminoskupiny mají primární i sekundární hydroxylové skupiny v polohách C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> a C<sub>6</sub>, což umožňuje modifikaci pro využití při aplikacích v oblasti tkáňového inženýrství. Stupeň deacetylce, krystalinita a molekulová hmotnost jsou hlavními aspekty, jimiž může být provedena modifikace chitosanu, za účelem zisku specifických vlastností.<sup>2</sup>

Chitosan je nerozpustný ve vodě a organických rozpouštědlech. Rozpustným se stává, jakmile je smíchán s kyselinou octovou, dusičnou, chlorovodíkovou, chloristou nebo fosforečnými kyselinami. Rozpustnost derivátů chitosanu může být pozorována zejména v kyselých vodných roztocích, které mají pH nižší než 6,5. Současně může být rozmezí rozpustnosti měněno depolymerací.<sup>2</sup>

### 1.1.3 Produkce

Surovinou pro výrobu chitosanu je chitin, jehož hlavními zdroji jsou nejčastěji schránky korýšů, zejména krabů a krevet. Obvykle jsou schránky rozděleny podle velikosti a druhu, poté vyčištěny, vysušeny a rozemlety. Při dalších postupech se uplatňují čtyři hlavní kroky. Jsou to demineralizace, deproteinizace, změna barvy a deacetylce. Nejdříve dochází k extrakci chitinu z vnějších schránek korýšů kyselou cestou pomocí zředěné kyseliny chlorovodíkové (HCl) za účelem rozpuštění uhličitanu vápenatého. Následuje extrakce alkalickým roztokem hydroxidu sodného (NaOH), aby byly odstraněny proteiny, poté je produkt odbarven 0,5 % roztokem manganistanu draselného (KMnO<sub>4</sub>) a kyseliny šťavelové (H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) za vzniku chitinu, který je následně deacetylován. Konverze chitinu na chitosan lze dosáhnout enzymatickou nebo chemickou deacetylací, z ekonomických důvodů je však pro komerční výrobu chitosanu častěji používána chemická deacetylce v horkém, koncentrovaném NaOH. Konečné produkty musí být důkladně pročištěny, pokud mají být použity pro biomedicínské nebo farmaceutické účely, neboť případná rezidua proteinů, minerálů nebo pigmentů by mohla způsobit vážné vedlejší účinky.<sup>1,2</sup>

### 1.1.4 Biologické vlastnosti

#### Antioxidant

Antioxidační aktivity chitosanu byly rozsáhle studovány *in vitro* a *in vivo* za použití různých metod a bylo zjištěno, že souvisí s jeho strukturními charakteristikami, včetně molekulové hmotnosti a stupně deacetylace, stejně jako závisí na zdrojovém materiálu chitosanu.<sup>3</sup>

Studie přírodního chitosanu získaného ze schránek krabů a z hub shiitake prokázala, že delší *N*-deacetylační časy vedou k většímu počtu aminových skupin v polohách C<sub>2</sub>, které významně přispívají k antioxidační činnosti. U obou testovaných zdrojů bylo zjištěno, že vychytávání hydroxylových radikálů a tvorba konjugovaných dienů přispívají k nejvýraznějším antioxidačním účinkům s výslednou EC<sub>50</sub> (efektivní koncentrace, která vykazuje 50 % antioxidační účinek) nižší než 1,5 mg·ml<sup>-1</sup>. Také molekulová hmotnost má na antioxidační účinky chitosanu významný vliv, neboť nízkomolekulární chitosan vykazuje při odstraňování superoxidových a hydroxylových radikálů výraznější účinky než chitosan vysokomolekulární.<sup>3</sup>

Za účelem zlepšit antioxidační účinky chitosanu byly jeho molekuly různými způsoby modifikovány. Například u sulfatovaných chitosanů se schopnost odstraňování radikálů výrazně navýšila, oproti chitosanu nemodifikovanému.<sup>3</sup>

#### Snižování obsahu lipidů v těle

Aktivita chitosanu při snižování obsahu lipidů bez jakýchkoli vedlejších účinků v těle byla pozorována již od 80. let u zvířat a u lidí poprvé v roce 1993. Výrazná schopnost snižovat plazmu a jaterní triacylglyceroly, stejně jako celkovou hladinu cholesterolu, je dobře zdokumentována a byla pozorována u velkého počtu zvířat. V současné době se však stále více pozornosti věnuje zkoumání mechanismů, které jsou základem této hypolipidemické aktivity chitosanu. Chitosan se silně váže na tuky, cholesterol a žlučové soli, což je částečně důsledkem hydrofobních interakcí a vodíkových vazeb mezi lipidy a chitosanem, částečně elektrostatickou přitažlivostí pozitivně nabitých aminoskupin chitosanu a negativně nabitých karboxylových skupin mastných kyselin a žlučových solí. To vede k zachycení tukových kapének v žaludku a k jejich pozdějšímu srážení v tenkém střevě, čímž se zpomaluje trávení tuků. Chitosan rovněž pomáhá udržovat hladiny antioxidačních enzymů, jako jsou superoxidodismutasa, katalasa a glutathionperoxidasa, které hrají důležitou roli při peroxidaci lipidů. V neposlední řadě má výrazný vliv na plazmatické adipocytokiny a významně snižuje

index adipozity. Tím reguluje množství cirkulujících triglyceridů a působí tak proti zánětlivým onemocněním a metabolickým změnám.<sup>3</sup>

### **Další účinky chitosanu**

Chitosan má mnoho dalších dobře zdokumentovaných biologických účinků a zdravotních přínosů, včetně prevence selhání ledvin, hojení ran, redukce žaludečních vředů (protizánětlivý účinek), dále vykazuje antigenotoxickou a protinádorovou aktivitu. V posledních letech se stále více studií zabývá biologickou aktivitou derivátů chitosanu, zejména těch, které mají nízkou molekulovou hmotnost. Například chitosanové oligosacharidy připravené enzymatickou degradací/depolymerizací vykazují mnoho nových biologických funkcí, jakými jsou například imunomodulační a hemostatické účinky.<sup>3</sup>

### **1.1.5 Využití**

Díky svým jedinečným vlastnostem, jimiž jsou bioaktivita, antimikrobní a antioxidační účinky a biokompatibilita, je chitosan atraktivní jako potenciální materiál pro biologické aplikace v medicíně, potravinářství, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu.<sup>4</sup>

#### **Nosiče léčiv**

Bylo provedeno několik studií s cílem zjistit potenciál chitosanu jako orálního nosiče léčiv, neboť jeho perorální podávání není toxické. Použití takových nosičů léčiv eliminuje nežádoucí účinky systémového podávání. Sloučeniny na bázi chitosanu mohou být využity k vytvoření lokálního systému pro podávání léčiva s požadovanými mechanickými vlastnostmi, časem kontaktu a profilem s prodlouženým uvolňováním, přičemž je udržován dokonalý kontakt léčiva s ústní sliznicí. To vede ke zvýšení biologické dostupnosti orální léčby různých onemocnění. Také byly vyvinuty chitosanové mikrosféry pro aktivní uvolňování léčiva v místě onemocnění.<sup>4</sup>

#### **Antimikrobiální aplikace**

Polykationické chování chitosanu v kyselém prostředí je hlavním faktorem, který přispívá k jeho antimikrobiální aktivitě. Díky svým pozitivním povrchovým nábojům za kyselých podmínek interaguje s anionickými složkami na bakteriích, například se záporně nabitými lipopolysacharidy na vnějším povrchu membrán gramnegativních bakterií nebo s peptidoglykanem a kyselinou teikoovou v buněčných stěnách grampozitivních bakterií.<sup>3</sup>

Díky své biologické rozložitelnosti, netoxicitě a vnitřním antibakteriálním účinkům je tak chitosan široce využíván jako antimikrobiální látka sloužící pro zlepšení kvality potravin a prodloužení jejich skladovatelnosti. Požadovaných antimikrobiálních účinků lze dosáhnout použitím chitosanu a jeho derivátů buď samotných nebo smíchaných s dalšími složkami. Například kombinací chitosanu a biologicky kontrolovaných kvasinek společně s chloridem vápenatým lze řídit produkci modré plísně v hruškách. Synergický efekt všech látek dohromady zajišťuje vyšší a trvalejší účinek při redukci plísně než při použití těchto látek samostatně.<sup>3</sup>

Kromě bakteriální a antifungální aktivity byl chitosan v nedávné době testován pro svou účinnost proti virovým infekcím způsobeným potravinami včetně lidského noroviru nebo enterovirů.<sup>3</sup>

V některých případech může být chitosan modifikován tak, aby se zlepšila jeho antimikrobiální účinnost v určitých potravinářských systémech. Například vrstva komplexu chitosan-glukózy je vysoce účinná jako ochrana hub před mikrobiální degradací a zlepšuje jejich posklizňovou kvalitu. Tato vrstva udržuje pevnost houbových tkání, inhibuje zvyšování respirace, snižuje množství mikroorganismů a zpomaluje změny koncentrace kyseliny askorbové při zachování celkové smyslové kvality.<sup>3</sup>

### **Emulze na bázi chitosanu**

Chitosan je v potravinářském průmyslu považován za vynikající emulgátor hydrokoloidů a lze jej použít ke stabilizaci oleje ve vodě bez nutnosti přidání jakékoliv jiné povrchově aktivní látky. Je tomu tak proto, že za kyselých podmínek jsou aminoskupiny protonovány, což dává chitosanu pozitivní povrchový náboj. Tím se mění na amfifilní látku, která může adsorbovat bioaktivní látky na rozhraní olej/voda, čímž se usnadní tvorba emulze snížením mezifázového napětí. Emulgační schopnost chitosanu je však velmi závislá na jeho molekulové hmotnosti a stupni deacetylace. Bylo prokázáno, že chitosan s nízkou molekulovou hmotností vykazuje lepší emulgační vlastnosti než chitosan s vysokou molekulovou hmotností, stupeň deacetylace je emulgačně příznivější při nízkých (60 %) nebo výrazně vysokých hodnotách (86 %) ve srovnání s chitosanem se středně vysokou deacetylací (65 – 77 %). Účinky stabilizace emulze jsou také závislé na jeho koncentraci, zejména pokud jde o chitosan se středně vysokým stupněm deacetylace. Ačkoli je povrchová aktivita chitosanu omezená, použitím vyšších koncentrací dochází ke vzniku emulze s vyšší



viskozitou, která stabilizuje kapičky oleje tím, že vytváří hustší a silnější elektrolytickou síť na rozhraní vodné fáze.<sup>3</sup>

Jako nový přístup ke zlepšení kvality potravin byla zkoumána emulze na bázi chitosanu ve formě jedlého nátěru. Minerální emulze olej-chitosan byla studována za účelem možného využití ve formě nátěrového materiálu na slepičích vejcích, jenž by umožnil udržet kvalitu vajec a prodloužil by jejich skladovatelnost. Bylo zjištěno, že daná emulze u vajec uchovávaných při pokojové teplotě minimalizovala úbytek hmotnosti a zachovala kvalitu bílku a žloutku minimálně o 3 týdny déle oproti vejcům uchovávaných bez nátěru.<sup>3</sup>

### **Ochranné filmy na potravinách**

Během posledního desetiletí se potravinářský průmysl stále více zajímá o vývoj nových aktivních povlaků jako obalových materiálů potravin. Mezi těmito biomateriály je chitosan jedním z nejslibnějších díky kombinaci vynikajících vlastností vytvářet povrchové filmy a díky své antimikrobiální aktivitě. Protože je sám hydrofilní povahy, nevykazují tak filmy tvořené pouze chitosanem odpovídající vlastnosti, které by umožnily odolnost potravin vůči negativnímu působení vodní páry či kyslíku při dlouhodobém skladování. To vedlo k novému vývoji aktivních chitosanových filmů nebo povlaků, které jsou připraveny v kombinaci s přírodními antimikrobiálními látkami nebo vznikají včleněním jedné či více bioaktivních sloučenin. Aktivní filmy na bázi chitosanu mohou být používány k potahování různých potravin, zejména ovoce a masa. Například produkce chitosanového filmu u extraktu zeleného čaje vedla ke zlepšení jeho mechanických vlastností a odolnosti proti působení vodních par, zejména v důsledku zvýšené mezimolekulární interakce mezi fenolickými sloučeninami a chitosanem.<sup>3</sup>

### **Hydrogely na bázi chitosanu**

Hydrogely jsou definovány jako hydrofilní polymerní sítě, které mohou absorbovat značné množství vody, od 10 % do tisícinásobku jejich suché váhy, čímž se zvětšují, ale přitom se ve vodě nerozpouštějí. Když je trojrozměrná polymerní síť chemicky nebo fyzikálně propojena, vzniká hydrogel.<sup>3</sup>

Jedním z nejvíce zkoumaných typů hydrogelů je hydrogelová kulička, a to především díky své snadné přípravě. Vytváří se spontánně přidáním vysoce koncentrovaného roztoku polymeru po kapkách do síťovacího roztoku obsahujícího opačně nabitě ionty nebo polyelektrolytické polymery.<sup>3</sup>

Pro přípravu hydrogelové kuličky se k roztoku trifenyfosfátu pomocí injekční stříkačky přidá koncentrovaný roztok chitosanu (až 3 %). Použitím injekční stříkačky se zajistí malá velikost částic. Bylo prokázáno, že tyto hydrogelové kuličky jsou citlivé na bobtnání vlivem měnícího se pH. Chitosanové hydrogelové kuličky lze také připravit zesíťováním chitosanu s negativně nabitým polymery, jako jsou alginát a pektin. Hydrogely na bázi chitosanu mají různé aplikace nejen v biomedicíně a farmaceutickém průmyslu, ale také jsou potenciálně velmi slibné pro využití v potravinářství, například pro zapouzdření a doručení živin do místa určení.<sup>3</sup>

## 1.2 HYALURONAN

Přírodní mukopolysacharid nacházející se v extracelulárním matrixu živých organismů, mezi jehož biologické funkce patří údržba elastoviskozity tekutého pojivového materiálu tkání, kontrola hydratace tkání, transport vody v organismu či supramolekulární shromažďování proteoglykanů v extracelulárním matrixu. Nachází uplatnění zejména v medicíně nebo ve farmacii.<sup>5</sup>

### 1.2.1 Historie

První zmínky o hyaluronanu se vyskytly v článku, jenž v roce 1934 sepsali Karl Meyer a John Palmer. Popisují v něm polysacharid s vysokou molekulovou hmotností izolovaný z hovězího sklivce. V následujících deseti letech Meyer společně s dalšími vědci izolovali hyaluronan z různých zvířecích orgánů, například z kloubní tekutiny či pupeční šňůry a v roce 1937 izoloval F. Kendall hyaluronan z pouzder streptokoků skupiny A, B, a C. Tento objev měl velký význam, neboť dnes jsou kmeny bakterií rodu *Streptococcus* nejspolehlivějším zdrojem využívaným pro průmyslovou produkci hyaluronanu.<sup>6</sup> V té době byl také z extraktů savčích varlat izolován enzym hyaluronidasa. Úplná chemická struktura hyaluronanu však byla objevena až o dvacet let později. Během následujících let pak byly objasněny fyzikálně-chemické vlastnosti hyaluronanu. Studie prováděné pomocí elektronového mikroskopu odhalily, že se jedná o lineární polymer. Tento polymer byl charakterizován jako polydisperzní a při vyšších koncentracích vykazoval vysokou viskozitu. V roce 1970 vědci T. Hadringham a H. Muir zjistili, že proteoglykany v chrupavkách specificky reagují společně s hyaluronanem, a tento objev nastavil novou éru pro studování interakcí mezi hyaluronanem a bílkovinami. V průběhu posledních třiceti let bylo více nahlédnuto do biosyntézy a katabolismu hyaluronanu, stejně jako byly popsány jeho vlivy na biologické aspekty migrace buněk a jejich diferenciaci, při růstu metastáz a nádorů či při zánětech. Proto je hyaluronan v současné době považován za všestranný polysacharid, jenž má jedinečné fyzikální vlastnosti s mnoha strukturálními a fyziologickými funkcemi.<sup>7</sup>

### 1.2.2 Význam

Kyselina hyaluronová je nesulfátovaný polysacharid patřící mezi glykosaminoglykany. Je pojmenována pro svůj skleněný vzhled, proto má první část názvu svůj původ v řeckém slově hyalos, které znamená sklo. Druhá část názvu, uronová kyselina, značí přítomnost cukru ve struktuře.<sup>8</sup> Nejčastěji však bývá tato sloučenina

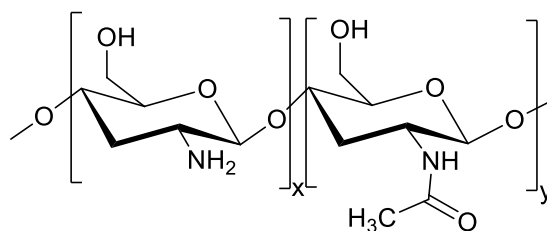
označována názvem hyaluronan, protože se vyskytuje *in vivo* jako polyanion a nikoliv ve formě protonované kyseliny.<sup>9</sup> Tato amorfnní látka vyplňuje extracelulární prostory mezi kolagenními vlákny a svazky. Ve své chemické i molekulární formě je totožná pro všechny tkáně a savce, a proto je druhově nespecifická.<sup>8</sup>

Hyaluronan je široce rozšířen mezi obratlovci a představuje součást buněčného povlaku mnoha kmenů bakterií. Původně se předpokládalo, že hlavní funkce hyaluronanu jsou mechanické, protože má v těle ochrannou úlohu, která stabilizuje strukturu a tlumí nárazy. Nedávno však bylo zjištěno, že plní významnou roli také při zprostředkování fyziologických funkcí prostřednictvím interakcí s vazebnými proteiny a receptory buněčného povrchu, včetně morfogeneze, regenerace, hojení ran a invaze nádorů, stejně jako při dynamické regulaci interakcí na úrovni buněčné signalizace.<sup>9</sup>

Rozsáhlé studie chemických a fyzikálně-chemických vlastností hyaluronanu a jeho fyziologické úlohy v lidském organismu společně s jeho všestrannými vlastnostmi, jako jsou biokompatibilita, neimunogenita, biologická odbouratelnost a viskoelastičita, dokazují, že je ideálním biomateriálem pro kosmetické, lékařské a farmaceutické aplikace.<sup>9</sup>

### 1.2.3 Chemická struktura

Hyaluronan je vysokomolekulární homogenní polysacharid široce rozšířený v savčích buňkách a tkáních. Je složen z opakujících se polymerních disacharidových jednotek tvořených D-glukuronovou kyselinou a *N*-acetyl-D-glukosaminem spojených  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) glykosidickou vazbou. Sousední disacharidové jednotky jsou pak spojeny  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glykosidickou vazbou a takto může být vázáno 200 – 20 000 disacharidových jednotek.<sup>8</sup>

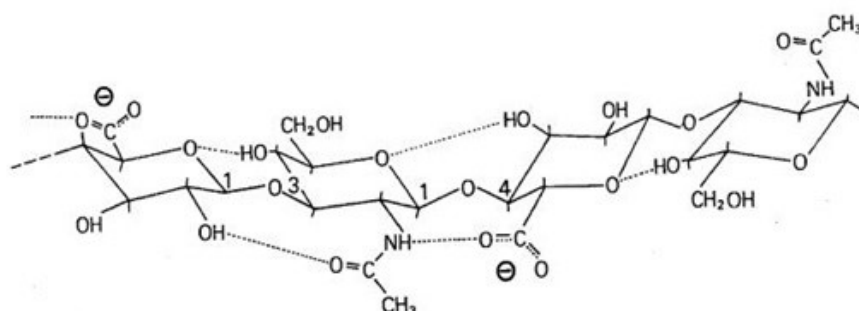


Obrázek 2: Chemická struktura hyaluronanu

Ve vodných roztocích tvoří hyaluronan specifické stabilní terciární struktury, které se vyskytují v mnoha konfiguracích a tvarech v závislosti na jejich velikosti, koncentraci soli,

pH a přidružených kationtech. Na rozdíl od ostatních glykosaminoglykanů není hyaluronan kovalentně připojen k proteinovému jádru, může však vytvářet agregáty s proteoglykanem. Je také schopný pojmout vysoký obsah vody, což dává jeho roztokům vysokou viskozitu i při nízkých koncentracích.<sup>10</sup>

Nukleární magnetická rezonance, rentgenová difrakce a molekulární modelování poskytují důkazy o existenci uspořádané struktury molekul roztoku hyaluronanu. Údaje získané z těchto technik naznačují, že mezi dvěma sousedními disacharidovými jednotkami existuje až 5 vodíkových vazeb a sekundární struktury jsou vytvořeny jako dvojnásobné šroubovice zkroucením každé disacharidové jednotky o 180 °. Uvnitř sekundární struktury existují hydrofobní interakce tvořené axiálními vodíkovými atomy přibližně osmi CH skupin rozložených střídavě po stranách sekundární struktury. Tyto hydrofobní části energeticky podporují tvorbu terciární struktury, která je rovněž stabilizována díky vodíkovým vazbám. Hydrofobní interakce společně s vodíkovými vazbami brání elektrostatickému odpuzování a umožňují agregaci velkého počtu molekul, čímž dochází k tvorbě molekulárních sítí hyaluronanu.<sup>9</sup>



Obrázek 3: Schéma terciární struktury hyaluronanu

#### 1.2.4 Biosyntéza a degradace

Hyaluronan může být produkován z mnoha zdrojů, dvěma nejběžnějšími jsou extrakty z kohoutích hřebínků a rekombinantní produkce za použití bakterií rodu *Streptococcus*, přičemž každý produkt má mírně odlišné reologické vlastnosti.<sup>5</sup> Syntéza hyaluronanu probíhá díky specifickým enzymům zvaným hyaluronan syntasy, které jsou vázány na cytoplazmatickou membránu. Tyto enzymy syntetizují hyaluronan na vnitřní straně membrány, odkud je poté transportován pomocí pórovitých struktur do extracelulárního prostoru. U savců existují tři typy těchto enzymů, a to hyaluronan syntasa I, II a III. Každý

tento enzym vykazuje odlišné enzymatické vlastnosti a syntetizuje řetězce o různých délkách.  
10

Enzymatickou degradací dochází k rozštěpení hyaluronanu na malé polymery vlivem enzymu hyaluronidasa, kdy každý z těchto polymerů je složený z různě dlouhých dimerových řetězců.<sup>5</sup> Tyto degradační produkty vykazují pro-angiogenní vlastnosti. Hyaluronidasa rovněž snižuje viskozitu hyaluronanu a tím se zvyšuje propustnost tohoto polymeru tkáněmi. Proto se hyaluronan používá v medicíně jako nosič léčiv, za účelem urychlení transportu léku v organismu a tím i jeho okamžitého dodání do místa určení.<sup>11</sup>

Je také možná degradace neenzymatickým mechanismem volnými radikály za přítomnosti redukčních činidel, jako jsou kyselina askorbová, thioly, železnaté nebo měďnaté ionty. Jedná se o proces, který vyžaduje přítomnost molekulárního kyslíku.<sup>10</sup>

### 1.2.5 Receptory pro hyaluronan

Existuje mnoho proteinů, které se váží na hyaluronan. Nazývají se hyaladheriny a jsou rozšířeny v extracelulárním matrixu, na povrchu, v cytoplasmě i v jádře buňky. Proteiny, které připojují hyaluronan k buněčnému povrchu, tak umožňují vytvářet hyaluronanové receptory. Nejvýznamnějším z těchto receptorů je transmembránový glykoprotein CD44 (cluster of differentiation 44), který se nachází prakticky na všech buněčných površích, kromě červených krvinek. Jeho funkcemi jsou regulace buněčných dějů jako jsou buněčná adheze a migrace, aktivace lymfocytů či tvorba metastáz.<sup>7</sup>

Dalším důležitým receptorem je receptor zprostředkované motility RHAMM (hyaluronan-mediated motility receptor). Jedná se o funkční receptor endoteliálních buněk a buněk hladkého svalstva v plicích artériích a dýchacích cestách. Interakce mezi hyaluronanem a RHAMM zajišťují kontrolu buněčného růstu a buněčné migrace. Silným stimulantem motility hladké svaloviny je (TGF)- $\beta$ 1 faktor (transforming growth factor beta 1), který vyvolá syntézu RHAMM a tím umožňuje pohyb svalstva.<sup>7</sup>

### 1.2.6 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Hyaluronan a jeho přidružené struktury mají mnoho fyziologických funkcí, mezi něž patří regulace vody ve tkáních a matrixu, strukturní a prostor vyplňující vlastnosti či zvlhčování. Změny uspořádané struktury však mohou vést ke změnám fyziologických funkcí, například viskoelastických a mechanických, neboť ty jsou vysoce závislé na sekundární a

terciární struktúře. Hyaluronan v pevné fázi, připravený při nízkých hodnotách pH, tak vykazuje dvojitě šroubovicovou strukturu značně odlišnou od struktur, jež hyaluronan tvoří ve vodném roztoku.

Působením vody se hyaluronan mění z newtonské kapaliny na neneutonskou, přičemž se zvyšuje jeho molekulová hmotnost a koncentrace. Viskoelasticita vodných roztoků hyaluronanu může být také ovlivněna včleněním malých molekulárních činidel, například přítomnost fosfolipidů, guanidinu nebo chloridu sodného snižuje elastické i viskózní vlastnosti.<sup>9</sup> Počet vodíkových vazeb mezi molekulami vody a atomy hyaluronanu byl stanoven pomocí molekulárních dynamických simulací na 10 až 15 pro každou disacharidovou jednotku. Díky tomu vykazuje hyaluronan mnohem vyšší schopnost vázat vodu oproti jiným polysacharidům, jako jsou například alginát nebo karagenan.<sup>9</sup> Molekuly hyaluronanu jsou dobře rozpustné ve vodě, s níž vytvářejí gel, který se chová jako lubrikant a také absorbuje vodu. To dává hyaluronanu hygroskopické a homeostatické vlastnosti.<sup>8</sup>

### 1.2.7 Produkce

V současné době je průmyslová výroba hyaluronanu založena buď na extrakci z živočišných tkání nebo na rozsáhlé bakteriální fermentaci s geneticky modifikovanými kmeny. Tyto procesy jsou široce využívány a jsou schopny poskytnout produkty s molekulovou hmotností nad  $10^6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , což je žádoucí především pro biomedicínské a kosmetické využití.<sup>12</sup>

#### Extrakce ze zvířecí tkáně

Od počátku třicátých let dvacátého století, kdy byl hyaluronan poprvé izolován ze sklivce skotu, začala být jeho produkce realizována i s použitím jiných zvířecích tkání včetně lidské pupečnickové šňůry, kohoutích hřebínků a hovězí kloubní tekutiny. Platí, že takto získaný hyaluronan má přirozeně vysokou molekulovou hmotnost.<sup>12</sup>

Ačkoli hyaluronan ze zvířecích tkání stále zůstává důležitým zdrojem pro většinu výrobků založených na jeho bázi, z mnoha důvodů byly hledány alternativní výrobní procesy. Především proto, že extrakční procesy jsou technicky limitovány náročnými podmínkami spojenými s mletím, kyselým zpracováním a opakovanou extrakcí organickými rozpouštědly. Tato nekontrolovatelná degradační technika výrazně ovlivňuje nejen výtěžnost, ale i polydisperzitu hyaluronanu. Druhým problémem je, že zvířecí hyaluronan může být stále vázán na buněčné proteiny včetně hyaluronidasy. Tyto kontaminující bílkoviny jsou

nežádoucí, neboť mohou negativně ovlivnit imunitní odpověď. Navíc existuje potenciální riziko kontaminace nukleovými kyselinami, priony a viry, které by mohly následně vést k přenosu infekčních onemocnění. Extrakce hyaluronanu ze zvířecích tkání je rovněž velmi nákladná, časově náročná a vyžaduje použití velkých technologických zařízení nutných ke shromáždění tkáně a k následné extrakci a čištění hyaluronanu. V důsledku těchto technických a bezpečnostních otázek je preferována spíše biotechnologická výroba hyaluronanu.<sup>12</sup>

### Extrakce bakteriálního hyaluronanu

V posledních dvou desetiletích se neustále vyvíjela produkce hyaluronanu prostřednictvím bakteriální fermentace. V počátečním stadiu rozvoje byly skupiny streptokoků A a C, které přirozeně produkovaly hyaluronan, pěstovány ve fermentorech a poté byl hyaluronan purifikován. Protože však tyto bakterie produkují řadu toxinů, hledala se jejich alternativa. Jakmile byly stanoveny geny kódující biosyntetickou dráhu hyaluronanu, množství bakterií (*Bacillus*, *Agrobacterium*, *E. coli* a *Lactococcus*) bylo geneticky modifikováno tak, aby exprimovalo tyto geny a produkovalo hyaluronan.<sup>12</sup>

V současnosti jsou hlavními průmyslově pěstovanými producenty hyaluronanu bakterie *Bacillus subtilis* společně s bakteriemi rodu *Streptococcus* skupiny A a C. Především *Bacillus subtilis* má vysoce rozvinutou biosyntetickou kapacitu a schopnost růstu v průmyslových fermentorech a jeho systém neobsahuje exotoxiny ani endotoxiny.<sup>12</sup>

### Produkce in vitro

Zatímco bakteriální expresní systémy mohou produkovat hyaluronan ve fermentorech malého objemu, ve větších systémech produkce hyaluronanu zvyšuje viskozitu média, což vede k špatnému mísení a nízké rychlosti přenosu kyslíku, takže je často obtížné získat výnosy větší než  $6 - 7 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Vysoká polydisperzita hyaluronanu vznikající při bakteriální fermentaci zůstává i nadále výzvou, jelikož produkce extraktu o nízké polydisperzitě nebo ideálně monodisperze se zdá být vysoce závislá na podmínkách pěstování bakteriální kultury. Navíc, stejně jako u živočišných zdrojů, může i samotná bakteriální buňka působit jako zdroj kontaminace, které mohou vyvolat imunitní odpověď. Vzhledem k omezením souvisejícím se současnou hromadnou výrobou ze zvířecích nebo bakteriálních zdrojů se jako žádoucí alternativa jeví systém výroby bez buněk (*in vitro*).<sup>12</sup>

Hyaluronan syntasa třídy II z *P. multocida* je přizpůsobená mimobuněčné produkci hyaluronanu, neboť se jedná o periferní enzym. Tyto periferní enzymy zajišťují správné



funkce bez vazby na membrány na rozdíl od hyaluronan syntasy I, jejíž funkce je bez vazby na membránové fosfolipidy narušena. Studie prokázaly, že odstranění membránových domén vytváří rozpustný enzym, který si zachovává schopnost syntetizovat hyaluronan. Pomocí tohoto bezbuněčného systému je tak možné vyrábět hyaluronan s vysokou molekulovou hmotností a s nízkou polydisperzitou.<sup>12</sup>

### 1.2.8 Využití

#### Ochrana kloubních chrupavek

Hyaluronan hraje zásadní roli při vývoji chrupavky, při udržování synoviální tekutiny a při regeneraci šlach. Jeho vysoké koncentrace byly nalezeny v extracelulárním matrixu všech dospělých kloubních tkání, včetně synoviální tekutiny a vnější vrstvy chrupavek. Díky své viskoelastické povaze a schopnosti vytvářet vysoce hydratované matrice působí hyaluronan na klouby jako mazivo a tlumič nárazů.<sup>11</sup>

Hyaluronan byl experimentálně studován jako potenciální prostředek terapeutické intervence při léčbě osteoartrózy. Vyšetření ukázala, že mezikloubní injekce hyaluronanu snižují artritické léze kloubní chrupavky.<sup>11</sup> Novým, šetrným a efektivním druhem lokální léčby osteoartrózy je viskosuplementace, tedy použití produktů s hyaluronanem za účelem zlepšení fyziologického prostředí kloubu. Důvodem využívání viskosuplementace je obnovení ochrany viskoelasticity synoviálního hyaluronanu, snížení bolesti a zlepšení mobility kloubu, přičemž okamžitým účinkem je úleva od bolesti. Předpokládá se, že dlouhodobé aplikace kloubům navrátí ztracenou mobilitu obnovením transsynoviálního toku a také nastolí metabolickou a reologickou homeostázu kloubu.<sup>11</sup>

#### Protipřílnavé účinky

Vzhledem k tomu, že je hyaluronan vysoce hydrofilní, je vhodný pro aplikace vyžadující minimální buněčnou adhezi. Pooperační adheze, které vznikají mezi sousedními tkáňovými vrstvami, brání hojení ran a často vyžadují dodatečné chirurgické zákroky. Obdobné bariéry tvořené zesíťovaným hyaluronanem byly k těmto účelům již účinně použity. Také přichycení bakterií na biomateriály může vyvolávat infekce a představuje velké riziko pro pacienta. Proto byl zkoumáno vliv esterifikovaného hyaluronanu k prevenci adheze bakterií na zubní implantáty, nitrooční čočky a katetry.<sup>11</sup>

## Oční lékařství

Jakožto přirozená složka očního sklivce, získává hyaluronan stále větší oblibu při aplikacích v očním lékařství. Zvláště užitečný je jako matrix sloužící k vyplnění prostoru oka, který se aplikuje formou injekce a používá se k udržení tvaru přední komory během chirurgického zákroku. Roztoky hyaluronanu také slouží jako složka zvyšující viskozitu očních kapek a jako adjuvans při opravě očních tkání.<sup>11</sup>

## Využití v dermatologii a při hojení ran

Protože je hyaluronan přirozeně přítomen ve vysokých koncentracích v kůži a měkkých pojivových tkáních, je vhodnou volbou pro matrici, která podporuje regeneraci a augmentaci kůže. Bylo zjištěno, že zesítené hyaluronanové hydrogelové filmy urychlují hojení hlubokých ran, pravděpodobně díky tomu, že poskytuje vysoce hydratované a neimunogenní prostředí, které napomáhá opravě tkáně. Hyaluronanové konstrukce kultivované *in vitro* s keratinocyty a fibroblasty vytváří materiály podobné kůži složené ze dvou vrstev totožných s epidermální a kožní tkáňovou vrstvou. Díky své schopnosti formovat hydratační matrice, je hyaluronan navíc úspěšně používán při kosmetických aplikacích, jako jsou výplně při zvětšování měkkých tkání.<sup>11</sup>

## Kardiovaskulární aplikace

V souvislosti se svými antiadhezivními vlastnostmi je hyaluronan efektivně využíván pro zvýšení krevní kompatibility kardiovaskulárních implantátů jako jsou vaskulární štěpy a stenty. Povrchy biomateriálů ošetřených zesíteným hyaluronanem vykazují sníženou přilnavost krevních destiček a sníženou tvorbu trombů. Sulfátované deriváty hyaluronanu také mohou mít stejné účinky jako heparin, neboť deriváty s vyšším stupněm sulfatace vykazují schopnost prevence srážení krve.<sup>11</sup>

## 2 CYKLODEXTRINY

Cyklodextriny jsou ve vodě rozpustné cyklické oligosacharidy sestávající z šesti nebo více D-glukopyranosových jednotek. Obsahují hydrofobní dutinu, do které se může reverzibilně vázat široká škála malých organických molekul, u nichž tímto dochází ke změně jejich fyzikálně-chemických vlastností, především rozpustnosti a chemické stability. Z tohoto důvodu jsou cyklodextriny zkoumány jako látkové nosiče v různých odvětvích.<sup>13</sup>

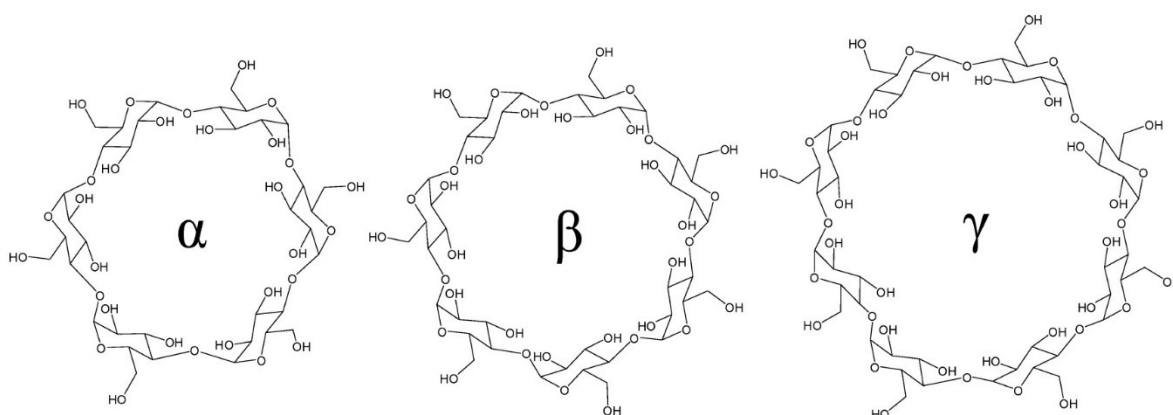
### 2.1 Historie

Cyklodextriny byly poprvé objeveny v roce 1891 A. Villiersem při snaze odstranit dextriny ze škrobu štěpeného bakterií *Bacillus amylobacter*. Tyto nové látky byly charakterizovány jako sacharidy. V roce 1904 izoloval F. Scharinger nový mikroorganismus schopný produkovat aceton a ethylalkohol z rostlinného materiálu obsahujícího škrob. V roce 1911 popsal, že kmen bakterií *Bacillus macerans* také produkuje velké množství krystalických dextrinů (25 – 30 %) ze škrobu. Scharinger tyto produkty nazval krystalickými dextriny  $\alpha$  a  $\beta$ . V roce 1935 byl izolován také dextrin  $\gamma$ . V té době byly jejich struktury ještě neznámé, ale v roce 1942 rentgenová krystalografie objasnila struktury  $\alpha$  i  $\beta$  dextrinu. O pět let později byla stanovena také struktura  $\gamma$  dextrinu a rovněž bylo zjištěno, že cyklodextriny tvoří uzavřené komplexy. Díky tomu dostaly předponu cyklo-.<sup>14</sup>

### 2.2 Chemická struktura

Tyto cyklické oligosacharidy sestávají z D-glukopyranosových jednotek spojených  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) glykosidickou vazbou.<sup>14,15</sup> V dnešní době jsou již dobře popsány cyklodextriny obsahující až 39 glukopyranosových jednotek. Mezi nejběžnější a komerčně nej dostupnější patří  $\alpha$ -cyklodextrin tvořený 6 glukopyranosovými jednotkami,  $\beta$ -cyklodextrin se 7 glukopyranosovými jednotkami a  $\gamma$ -cyklodextrin, který se skládá z 8 glukopyranosových jednotek.<sup>15</sup>

Molekula cyklodextrinu má tvar dutého komolého kuželu s hydroxylovými skupinami na okrajích.<sup>16</sup> Na C<sub>6</sub> uhlících D-glukopyranosových podjednotek se nacházejí primární hydroxylové skupiny a formují tak užší okraj cyklodextrinové dutiny, zatímco širší okraj dutiny je tvořen hydroxylovými skupinami sekundárními, umístěnými na uhlících C<sub>2</sub> a C<sub>3</sub>. Zatímco hydroxylové skupiny váží vodu, vnitřní část dutiny je hydrofobní, což umožňuje cyklodextrinům vytvářet s řadou látek inkluzivní komplexy.<sup>17</sup>

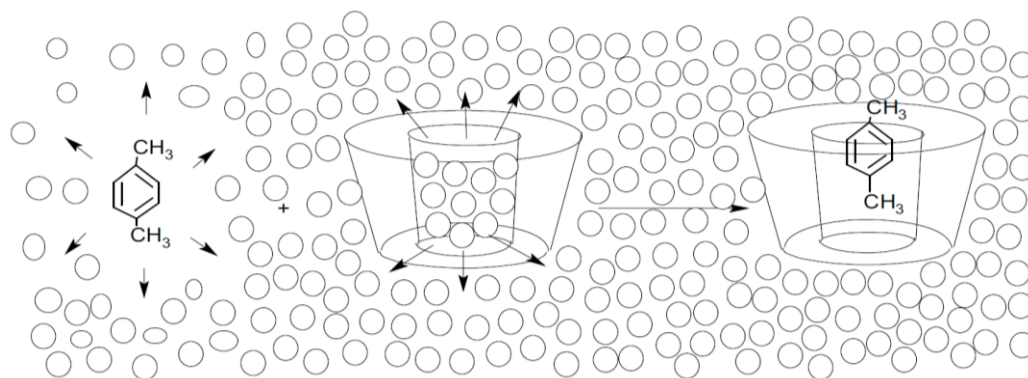


Obrázek 4: Chemická struktura  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ -cyklodextrinu<sup>19</sup>

### 2.2.1 Komplexace cyklodextrinů

Nejvýznamnější vlastností cyklodextrinů je jejich schopnost tvořit stabilní inkluzní komplexy (komplexy hostitel-host) s různými molekulami v pevném, kapalném i plynném stavu, a to pomocí molekulární komplexace. V těchto komplexech je hostující molekula zachycena v dutině cyklodextrinu hostitelské molekuly. Hnací silou tvorby komplexu v roztoku je uvolnění molekul vody z dutiny cyklodextrinu, které jsou poté nahrazeny hydrofobními molekulami z roztoku. Tím dojde ke snížení napětí v cyklodextrinovém kruhu a ke vzniku stabilního stavu s nižší energií.<sup>14</sup> Cyklodextrin a hostující molekula jsou k sobě poutány pomocí vodíkových vazeb, hydrofóbních interakcí a Van der Waalsových sil.<sup>18</sup>

Tvorba inkluzních komplexů má významný vliv na fyzikálně-chemické vlastnosti hostujících molekul, neboť ty jsou dočasně uzavřeny v cyklodextrinové dutině. Tím vzniká prostor pro modifikaci těchto včleněných molekul, která by jinak nebyla možná. Jedná se například o zvýšení rozpustnosti vysoce nerozpustných molekul, stabilizaci oxidačně labilních molekul, kontrolu těkavosti a sublimace, fyzikální izolaci nekompatibilních sloučenin, chromatografické separace, modifikace chuti maskováním chutí, nepříjemných pachů a kontrolované uvolňování léčiv a příchutí.<sup>14</sup>



Obrázek 5: Schéma vzniku inkluzního komplexu mezi *p*-xylenem a cyklodextrinem<sup>18</sup>

Schopnost cyklodextrinu vytvořit inkluzivní komplex s hostující molekulou je umožněna díky dvěma klíčovými faktorům. Prvním je poměr relativní velikosti cyklodextrinu ku velikosti hostující molekuly nebo alespoň vůči jejím klíčovým funkčním skupinám. Pokud je přidružená molekula nevyhovující velikosti, nebude do cyklodextrinové dutiny správně zapadat. Zatímco výška cyklodextrinové dutiny je pro všechny tři typy cyklodextrinů ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) stejná, její vnitřní průměr a objem jsou určeny počtem glukózových jednotek.  $\alpha$ -cyklodextriny jsou do své dutiny schopny pojmout molekuly s nízkou molekulovou hmotností nebo sloučeniny s postranními alifatickými řetězci,  $\beta$ -cyklodextriny mohou do svých komplexů vázat aromatické a heterocyklické sloučeniny, zatímco  $\gamma$ -cyklodextriny jsou schopny absorbovat velmi objemné molekuly, jakými jsou makrocikly nebo steroidy. Druhým kritickým faktorem jsou pak termodynamické interakce mezi jednotlivými složkami systému (cyklodextrin, hostující molekula, rozpouštědlo).<sup>14</sup> Molekuly včleněné do dutiny cyklodextrinu se neúčastní interakcí v roztoku, čímž se tyto komplexy stávají atraktivními pro použití ve farmaceutickém, kosmetickém či potravinářském průmyslu.<sup>16</sup>

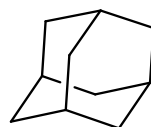
Včetně komplexů obsahujících jeden cyklodextrin a jednu hostující molekulu, byly také zaznamenány komplexy vyšších řádů, kdy je na hostující molekulu navázáno více cyklodextrinů (např. v poměru host:cyklodextrin = 1:2) nebo komplexy nižšího řádu, u nichž jeden cyklodextrin interaguje s více hostujícími molekulami (např. v poměru host:cyklodextrin = 2:1).<sup>19</sup>

### 2.2.2 Modifikace cyklodextrinů pro tvorbu polymerních sítí

Polymerní materiály jako hydrogely, mikročástice a micely jsou často využívány ve farmacii a biomedicíně jako nosiče léčiv, peptidů či proteinů. Tyto polymerní sítě mohou být síťované kovalentně (ireversibilně) nebo mohou být síťované pomocí nekovalentních interakcí (reversibilně). Právě v posledních letech jsou cyklodextriny a jejich deriváty často využívány jako modifikační prvky pro širokou škálu polymerních sítí.<sup>19</sup> Volné hydroxylové skupiny nacházející se na okrajích molekul cyklodextrinů mohou být chemicky modifikovány za účelem zakotvení cyklodextrinové jednotky do lineárního řetězce polymeru. Tyto lineární řetězce nesoucí cyklodextrinové zbytky lze pak spojovat „síťovacími“ jednotkami (hostujícími molekulami) a vytvořit tak nerozpustný gel.<sup>16</sup> Zabudování cyklodextrinů do formy gelu přináší mnohé výhody a lze jej využít pro odstranění určité látky z prostředí, stejně jako pro její uvolňování.<sup>16</sup>

Inkluzní komplexy mezi vhodnými sloučeninami a cyklodextrinovými jednotkami vázanými pomocí vhodných skupin na vybraný polymer vedou k reverzibilnímu síťování a vytváření tzv. supramolekulárních polymerů. Cyklodextrinové jednotky zde vystupují v roli hostitele a komplementární sloučeniny v roli hostů. V případě dvoufunkčních (dvou vazných) hostujících sloučenin lze očekávat utváření lineárních supramolekulárních polymerů, v případě třívazných hostů dokonce tvorbu větvených struktur.<sup>16</sup>

Při tvorbě inkluzních komplexů cyklodextrinů je jako hostitelská molekula často využíván adamantan nebo jeho deriváty, a to z důvodu relativně vysoké afinity adamantanového skeletu ke kavitě  $\beta$ -cyklodextrinu.<sup>19</sup>



Obrázek 6: Strukturální vzorec adamantanu

### 2.2.3 Využití inkluzních komplexů cyklodextrinů

#### Potravinářství

Tvorby inkluzních komplexů s cyklodextriny lze v potravinářství využít proti změně či ztrátě aromatu, či v kombinaci s umělými sladidly, například s aspartamem, pro zvýšení stability a zlepšení chuti.<sup>18, 20</sup> Komplexace se rovněž uplatňuje jako ochrana lipofilních složek potravy před jejich oxidací vlivem působení vzdušného kyslíku, tepla nebo zvýšené teploty.<sup>18</sup> Existují také potraviny se sníženým obsahem cholesterolu (například máslo), jenž je způsoben vlivem jeho komplexace s  $\beta$ -cyklodextrinem.<sup>21</sup>

#### Farmaceutický průmysl

Jedním z klasických odvětví pro aplikaci cyklodextrinů je farmaceutický průmysl. Komplexy vytvořené mezi cyklodextriny a aktivními látkami vykazují zvýšenou stabilitu, rozpustnost a biologickou dostupnost s omezením nežádoucích vedlejších účinků. Tím se nabízí nový systém pro aplikaci a dodání léčiv do místa účinku, který vede ke zlepšení nežádoucích vlastností molekul léčiv při různých způsobech jeho podávání včetně orálního, rektálního, nosního, očního či dermálního.<sup>22</sup>

#### Kosmetický průmysl

Za účelem kontroly uvolňování vonných látek mohou být cyklodextriny použity v parfémtech, pokojových osvěžovačích nebo detergentech. Nacházejí uplatnění jako složky regulující zápach v plenkách, menstruačních výrobcích či papírových ubrouscích. Také se používají v zubních pastách na bázi oxidu křemičitého, v nichž podporují využitelnost antimikrobiální látky triklosanu. Rovněž mohou být součástí opalovacích krémů, do nichž jsou přidávány za účelem snížení nežádoucích vedlejších účinků omezením interakcí mezi UV filtrem a kůží.<sup>23</sup>

#### Aplikace v životním prostředí

Cyklodextriny mohou hrát významnou úlohu při aplikacích v životním prostředí z hlediska odstraňování organických kontaminantů a těžkých kovů z půdy, vody a atmosféry. Nacházejí své uplatnění při různých úpravách vody, například při stabilizaci, enkapsulaci a adsorpci kontaminujících látek. Také díky nim lze z průmyslového odpadu odstranit vysoce toxické látky vytvořením inkluzního komplexu. V matečném louhu insekticidu trichlorfonu může být nevykryštalizovatelný trichlorfon převeden na komplex  $\beta$ -cyklodextrinu, čímž se eliminuje až 90 % tohoto toxického materiálu.<sup>24</sup>

### 3 ISOTERMÁLNÍ TITRAČNÍ MIKROKALORIMETRIE

Isotermální titrační kalorimetrie (ITC) poskytuje nejpřesnější měření všech termodynamických parametrů vazebné reakce za izotermických podmínek. Je to také jediná metoda, která je v průběhu jednoho experimentu schopná stanovit stechiometrii (N), rovnovážnou vazebnou konstantou ( $K_a$ ) a entalpii ( $\Delta H$ ).<sup>25</sup> Další termodynamické veličiny, jakými jsou entropie ( $\Delta S$ ) a volná Gibbsova energie ( $\Delta G$ ) je možno z výše jmenovaných veličin spočítat dle uvedených matematických vztahů:

$$\Delta G = RT \ln K_v$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

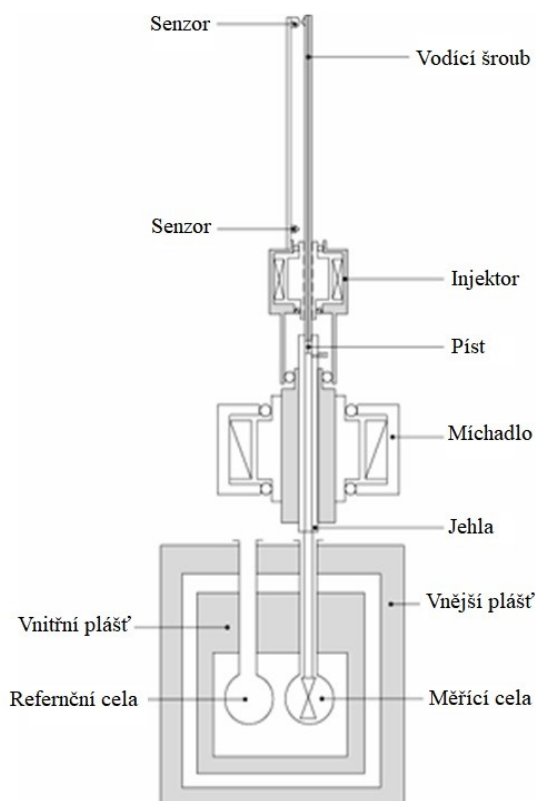
kde R je molární plynová konstanta a T je teplota v Kelvinech.<sup>26</sup>

Tato experimentální metoda funguje na principu titrace roztoku jednoho reaktantu do roztoku druhého reaktantu, kdy teplo uvolněné nebo spotřebované při interakci (vazbě) těchto dvou reaktantů je převedeno na měřený signál.<sup>27</sup>

#### 3.1 Princip

Schéma isotermálního titračního mikrokalorimetru je uvedeno na *Obrázku 7*. Dvě identické cely, měřicí a referenční, jsou uzavřeny v adiabatickém plášti. V průběhu měření je snímán jejich teplotní profil, a to díky polovodičovému Peltierovu článku, jenž je mezi celami vložen. Přístroj tak měří množství energie ( $\mu\text{cal}\cdot\text{s}^{-1}$ ), která je zapotřebí k udržení konstantního teplotního rozdílu mezi měřicí a referenční celou. Aby tohoto bylo zajištěno, systém zpětné vazby dodává energii na dohřátí či ochlazení měřicí cely tak, aby byl zajištěn konstantní rozdíl teplot mezi celami. Zpočátku, kdy ještě není zahájeno měření, systém zpětné vazby nepřetržitě dodává malou energii, což určuje základní energetickou úroveň celého měření.<sup>28</sup>



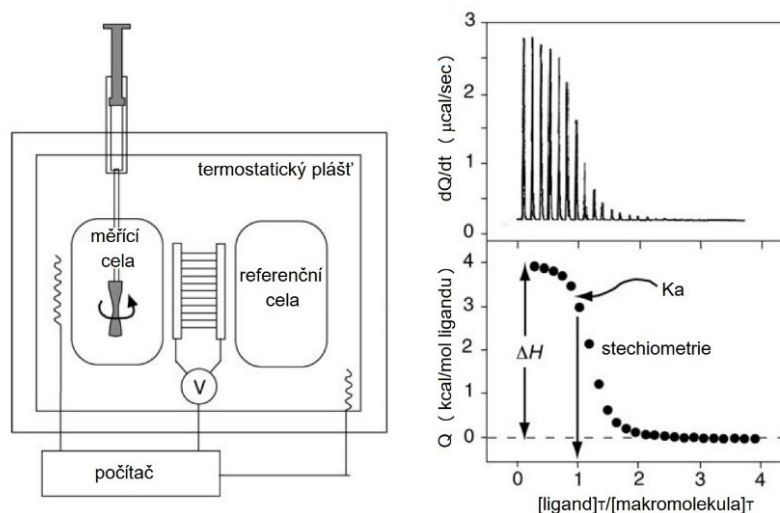


Obrázek 7: Schéma ITC

Jeden z reaktantů, většinou makromolekula (hostitel), je umístěn v roztoku měřící cely a druhý ligand (host) je umístěn v injekční jehle, resp. v byretě mikrokolorimetru. Samotné měření je prováděno titrací ligandu (hosta) do roztoku vzorku obsahujícího makromolekulu (hostitele). Pomocí injekční jehly je přidáván definovaný objem v  $\mu\text{l}$  přímo ke konstantnímu objemu roztoku makromolekuly v měřící cele. Celý systém v měřící cele je promícháván.<sup>29</sup>

Každý přídavek roztoku ligandu z jehly spouští vazebnou interakci s makromolekulami a v závislosti na vazebné afinitě a koncentraci látek v cele vzniká určité množství komplexu makromolekula/ligand.<sup>28</sup> Tvorba komplexu je doprovázena uvolňováním (exotermická reakce) nebo absorpcí (endotermická reakce) tepla, které způsobí rozdíl teplot mezi oběma celami. Potom systém zpětné vazby buď sníží, nebo zvýší tepelnou energii, aby se kompenzovala tato teplotní nerovnost. Po každé injekci ligandu se tak ustanoví rovnováha systému a obnoví se teplotní rovnováha mezi celami. Zaznamenaný signál proto vykazuje typickou odezvu ve formě píku (viz *Obrázek 8*). Hodnota signálu je největší na počátku titrace, kdy je koncentrace makromolekuly v cele nejvyšší, přídavky dalších molekul ligandu z jehly způsobí obsazení makromolekul a dojde tak ke snížení tepelného signálu až do hodnoty

ekvivalence, kdy jsou všechny makromolekuly obsazeny. Po ekvivalenci se v roztoku se nachází jen volný ligand a hodnota měřeného signálu je minimální.<sup>26</sup>



Obrázek 8: Schéma přístroje ITC a výstupní graf měření (upraveno dle<sup>28</sup>)

Celé měření je tedy zaznamenáno jako závislost změny tepelné kapacity na čase. Nutná je korelace na tepelné vlivy spojené s ředěním ligandu a mícháním při jednotlivých přidavcích, což se provádí odečtením referenční křivky dané měřením za stejných podmínek, avšak s absencí makromolekuly v měřicí cele.<sup>26</sup>

Integrací získaných píků je výsledná křivka, která udává závislost vazebné entalpie na molárním poměru ligandu a makromolekuly v cele. Vyhodnocením této křivky lze stanovit entalpii (výška sigmoidální křivky), vazebnou konstantu (směrnice tečny v inflexním bodě) a stochiometrii (poloha inflexního bodu).<sup>26</sup>

### 3.2 Aplikace

Isotermální titrační kalorimetrie je široce rozšířenou metodou v oblastech zkoumání léčiv a pro měření termodynamických parametrů jejich molekulárních interakcí včetně interakcí protein-DNA, lipid-DNA, lipid-lipid a mnoha dalších.<sup>30</sup> Kalorimetr je také jedním z nejčastějších přístrojů využívaných pro studium komplexační termodynamiky cyklodextrinů.<sup>31</sup>

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použité přístroje

#### 4.1.1 VP-ITC Mikrok calorimetr

Pro práci na experimentální části byl využit isothermální titrační kalorimetr VP-ITC firmy MicroCal, který funguje na principu měření tepla uvolněného nebo spotřebovaného důsledkem mísení přesných objemů dvou reaktantů.

Přístroj se skládá z injekční jehly, již byl nasát roztok ligandu o známé koncentraci a ze dvou cel – měřicí a referenční. Měřicí cela byla naplněna roztokem hostitelské molekuly  $\beta$ -cyklodextrinu modifikovaného chitosanem/hyaluronanem, referenční cela byla naplněna destilovanou vodou. Poté byla injekční jehla vložena do měřicí cely a počítačovým pístem bylo v rozmezí 210 sekund postupně dávkováno 29 přídavek ligandu o objemu 10  $\mu$ l do roztoku hostitelské molekuly v měřicí cele. Teplo uvolněné nebo spotřebované v průběhu jednotlivých přídavek ligandu bylo sledováno kalorimetrem a veškerá získaná data byla zpracována počítačovým programem VPViewer. Pro porovnání bylo pro každé měření stanoveno teplo zředovací, a to měřením, kdy byl původní ligand o stejné koncentraci přidáván do roztoku pufru ( $\text{CH}_3\text{COONa}$  nebo  $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ). V průběhu celého experimentu byla udržována konstantní teplota 30 °C. Zředovací teplo bylo odečteno od tepla uvolněného při jednotlivých přídavech. Experimentálně získané údaje byly nakonec počítačově vyhodnoceny pomocí programu ORIGIN 7.0, jenž díky vhodnému výpočetnímu matematickému modelu One Set of Sites umožňuje stanovit reakční stechiometrii (N), vazebnou konstantu ( $K_a$ ), entalpii ( $\Delta H$ ) a entropii ( $\Delta S$ ).

#### 4.1.2 Thermo-Vac

Všechny analyzované vzorky byly před provedením experimentu odplyněny pomocí přístroje ThermoVac, rovněž produktu značky MicroCal.

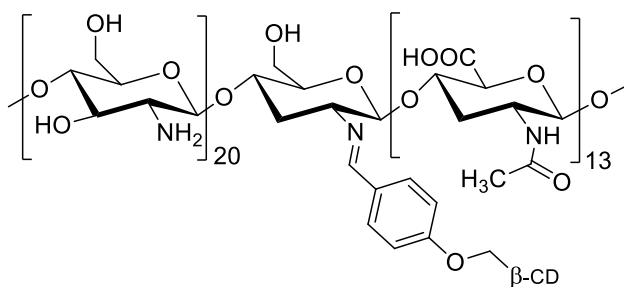
#### 4.1.3 pH-metr

pH použitých pufrů bylo měřeno pomocí pH-metru HI 2221-02 s kombinovanou pH elektrodou HI1131P dodaných společností Hanna Instruments.

## 4.2 Použité modifikované biopolymery a ligandy

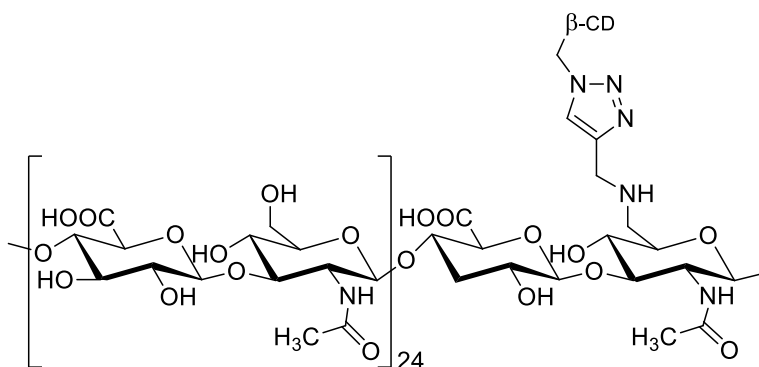
Vzorky modifikovaných biopolymerů  $\beta$ -CD a ligandů byly připraveny v laboratoři na Ústavu chemie FT UTB.

**Chitosan modifikovaný  $\beta$ -cyklodextrinem (CH- $\beta$ -CD)** byl dle stanovení nukleární magnetické rezonance modifikován ze 3 % na deacetylované jednotce hyaluronanu, jeho strukturní vzorec je uveden na *Obrázku 9*. Poměr výchozí acetylované a výsledných deacetylovaných jednotek v chitosanu byl 38 % a 62 %. CH- $\beta$ -CD měl charakter tuhých částic, které byly vlhké, a proto bylo nutno obsah  $\beta$ -CD nejdříve standardizovat. Jako standard byl zvolen ligand č. 1, který vykazuje vůči  $\beta$ -CD vysokou asociační konstantu.



*Obrázek 9: Chitosan modifikovaný  $\beta$ -cyklodextrinem*

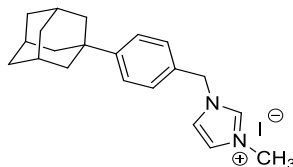
**Hyaluronan modifikovaný  $\beta$ -cyklodextrinem (HA- $\beta$ -CD)** byl dle stanovení nukleární magnetické rezonance modifikován ze 4 %, jeho strukturní vzorec je uveden na *Obrázku 10*. HA- $\beta$ -CD měl charakter bezbarvých krystalů. Stejně jako CH- $\beta$ -CD byl i tento biopolymer nejdříve standardizován na ligand č. 1.



*Obrázek 10: Hyaluronan modifikovaný  $\beta$ -cyklodextrinem*

Za účelem ověření schopnosti biopolymerů modifikovaných  $\beta$ -cyklodextrinem tvořit supramolekulární sítě byly použity ligandy, které měly ve své molekule jednu, dvě nebo tři adamantanové jednotky.

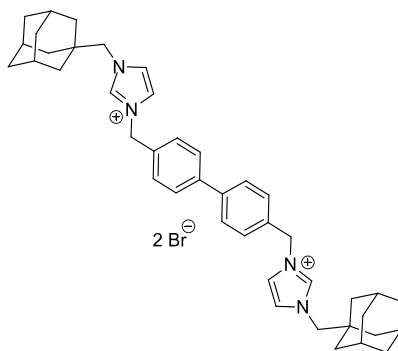
### Ligand č. 1



Obrázek 11: Chemická struktura ligandu č. 1

<b>Chemický název:</b>	1-(4-adamantan-1-yl)benzyl-1H-imidazolium-jodid
<b>Sumární vzorec:</b>	$C_{21}H_{27}IN_2$
<b>Molární hmotnost:</b>	$434,36 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
<b>Vzhled:</b>	bílý krystalický prášek

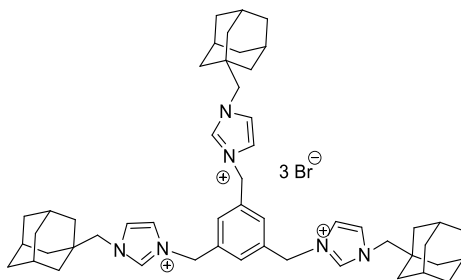
### Ligand č. 2



Obrázek 12: Chemická struktura ligandu č. 2

<b>Chemický název:</b>	4,4'-Bis-((3-(1-adamantylmethyl)-1H-imidazolium-1-yl)methyl)bifenyl-dibromid
<b>Sumární vzorec:</b>	$C_{42}H_{52}Br_2N_4$
<b>Molární hmotnost:</b>	$772,70 \text{ g/mol}$
<b>Vzhled:</b>	bílý krystalický prášek

## Ligand č. 3



Obrázek 13: Chemická struktura ligandu č. 3

<b>Chemický název:</b>	$\alpha,\alpha',\alpha''$ -tris(3-(1-(1-adamantylmethyl)imidazolium))-mesitylen-tribromid
<b>Sumární vzorec:</b>	$C_{51}H_{69}Br_3N_6$
<b>Molární hmotnost:</b>	1005,85 g.mol <sup>-1</sup>
<b>Vzhled:</b>	bílý krystalický prášek

### 4.3 Příprava roztoků pufrů a zásobních roztoků modifikovaných biopolymerů

#### Pufr $\text{CH}_3\text{COONa}$ o koncentraci $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$

- ❖ navážka 16,4069 g byla rozpuštěna v destilované vodě, kvantitativně převedena do 1000 ml odměrné baňky a doplněna destilovanou vodou po rysku
- ❖ u připraveného roztoku bylo naměřeno pH 2,84
- ❖ tento pufr byl použit pro stanovení chitosanu modifikovaného  $\beta$ -cyklodextrinem

#### Směsný pufr $\text{NaNO}_3$ a $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ v poměru 1:1 o koncentraci $\text{NaNO}_3$ $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$

- ❖ navážka 4,2449 g  $\text{NaNO}_3$  byla rozpuštěna ve 250 ml destilované vody
- ❖ navážka 0,3001 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  byla rozpuštěna ve 250 ml vody
- ❖ oba roztoky byly poté smíchány v odměrné baňce o objemu 500 ml
- ❖ u výsledného roztoku pufru bylo stanoveno pH 5,03
- ❖ tento pufr byl použit pro stanovení hyaluronanu modifikovaného  $\beta$ -cyklodextrinem

#### Roztok chitosanu modifikovaného $\beta$ -cyklodextrinem (CH- $\beta$ -CD)

- ❖ roztok byl připraven rozpuštěním 55,215 mg CH- $\beta$ -CD v pufru  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , kvantitativně převeden do 50 ml odměrné baňky a doplněn puftrem po rysku; koncentrace  $\beta$ -CD jednotek u takto připraveného roztoku byla stanovena na  $0,0560 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$

#### Roztok hyaluronanu modifikovaného $\beta$ -cyklodextrinem (HA- $\beta$ -CD)

- ❖ roztok byl připraven rozpuštěním 15,531 mg hyaluronanu modifikovaného  $\beta$ -cyklodextrinem v pufru  $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , kvantitativně převeden do 25 ml odměrné baňky a doplněn puftrem po rysku; koncentrace získaného roztoku byla stanovena na  $0,0526 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$



## 5 VÝSLEDKY A DISKUSE

### Výpočet přibližné koncentrace $\beta$ -CD jednotek u modifikovaného chitosanu

Nejprve bylo nutno vypočítat průměrnou molární hmotnost CH- $\beta$ -CD, kterou lze spočítat jako součin hmotnostního zlomku a molárních hmotností acetylované jednotky, deacetylované jednotky a  $\beta$ -cyklodextrinu:

$$M_{CH} = (0,59 \cdot 161,08) + (0,38 \cdot 203,09) + (0,03 \cdot 1382,24) = 213,68 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

V předpokládané navážce 10,000 mg byl tedy celkový počet molů:

$$n = \frac{10 \cdot 10^{-3}}{213,68} = 4,68 \cdot 10^{-5} \text{ mol}$$

Z uvedeného počtu molů tvoří  $\beta$ -CD jednotky:

$$n_{\beta\text{-CD}} = 0,03 \cdot 4,68 \cdot 10^{-5} = 1,40 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$$

Molární koncentrace roztoku připravená rozpuštěním 10 mg CH- $\beta$ -CD v 50 ml:

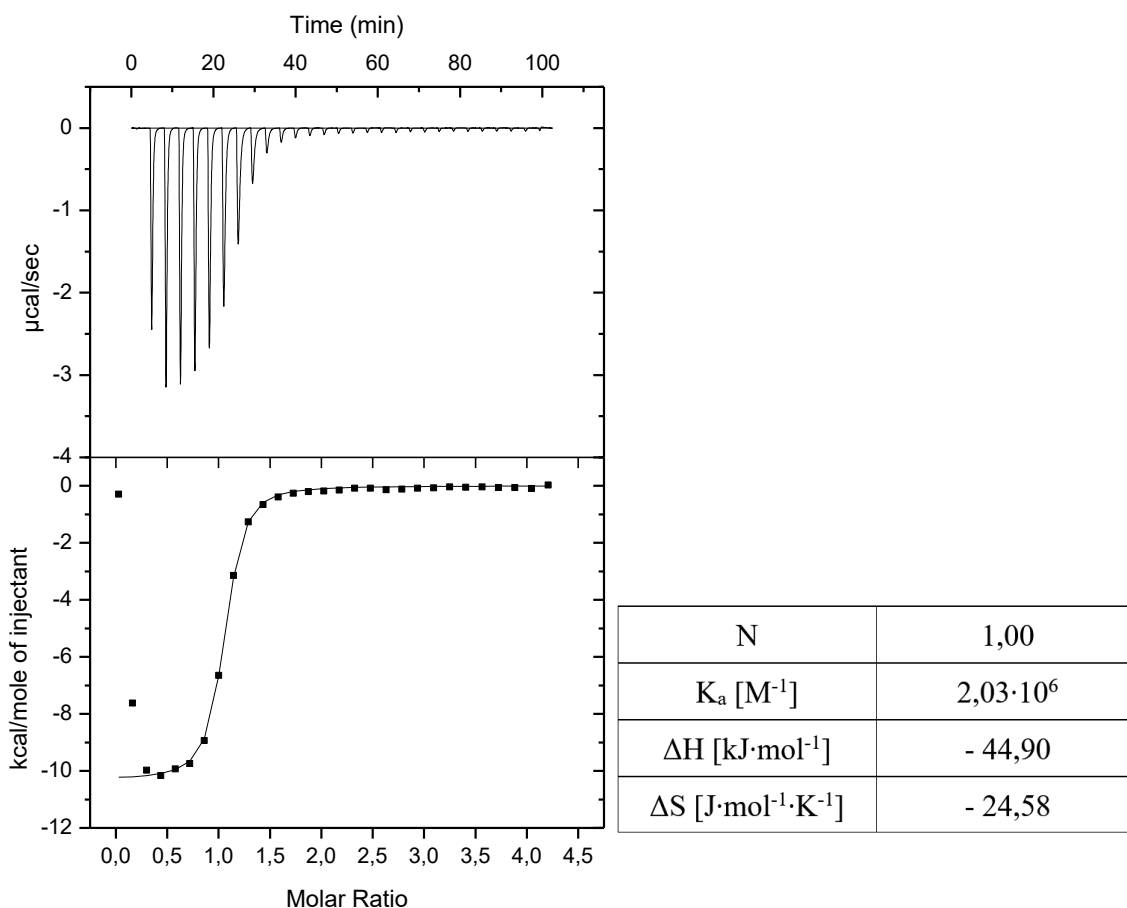
$$c = \frac{1,40 \cdot 10^{-6}}{0,05} = 2,80 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$$

Ve skutečnosti bylo rozpuštěno 55,215 mg CH- $\beta$ -CD v pufru  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , z čehož přibližně 35 % hmotnostního obsahu tvořila voda. Předpokládaná koncentrace  $\beta$ -CD jednotek byla:

$$c_{\beta\text{-CD}} = \frac{0,65 \cdot 55,215 \cdot 2,80 \cdot 10^{-5}}{10,000} = 1,005 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$$

### Měření ligandu č. 1 v roztoku CH- $\beta$ -CD

Roztok ligandu č. 1 byl připraven rozpuštěním navážky 0,661 mg v 1,50 ml pufru  $\text{CH}_3\text{COONa}$  ( $c = 1,0145 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Ke stanovení byl použit roztok CH- $\beta$ -CD přímo ze zásobního roztoku bez nutnosti dalšího ředění. Záznam průběhu měření, integrovaná křivka a výsledky stanovení jsou uvedeny na *Obrázku 12*.

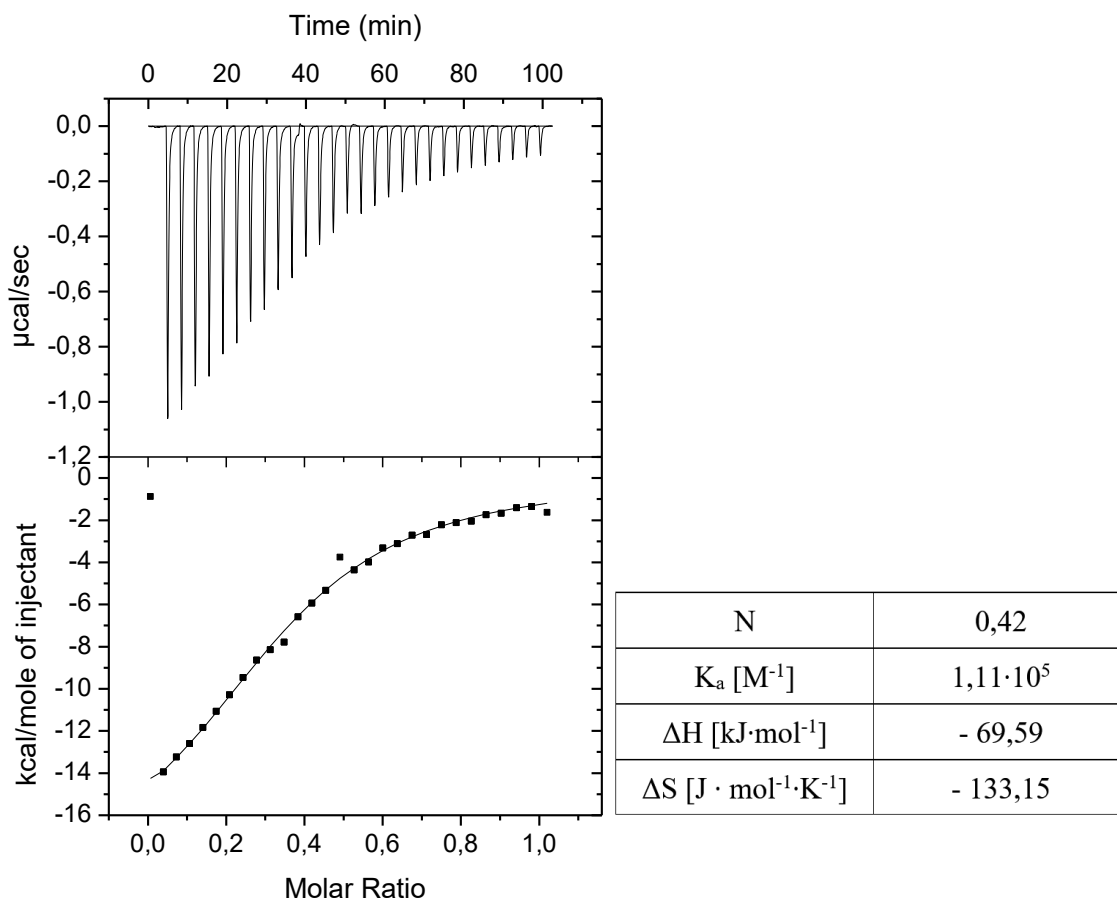


*Obrázek 14: Záznam ITC a výsledné hodnoty měření ligandu č. 1 s CH- $\beta$ -CD*

Na *Obrázku 12* je znázorněno měření tepla uvolněného při vazbě ligandu č. 1 do kavity CH- $\beta$ -CD. Toto měření zároveň sloužilo ke standardizaci koncentrace  $\beta$ -CD jednotek v zásobním roztoku chitosanu. Přesná koncentrace  $\beta$ -CD jednotek vyšla  $5,1758 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Na *Obrázku 14* jsou uvedeny konstanty pro korigovanou koncentraci  $\beta$ -CD, a proto je výsledný stechiometrický poměr roven hodnotě 1,00. Naměřená vazebná konstanta  $K_a$  pro komplex ligand1@CH- $\beta$ -CD odpovídá předpokládané hodnotě. Dle literární rešerše se jedná o doposud nejvyšší naměřenou hodnotu vazebné konstanty pro kavitu  $\beta$ -cyclodextrinu.

### Měření ligandu č. 2 v roztoku CH- $\beta$ -CD

Roztok ligandu č. 2 byl připraven rozpuštěním navážky 0,278 mg v 1,50 ml pufru  $\text{CH}_3\text{COONa}$  ( $c = 0,2399 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Roztok CH- $\beta$ -CD byl použit bez dalšího ředění, tedy s koncentrací  $\beta$ -CD  $5,1758 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

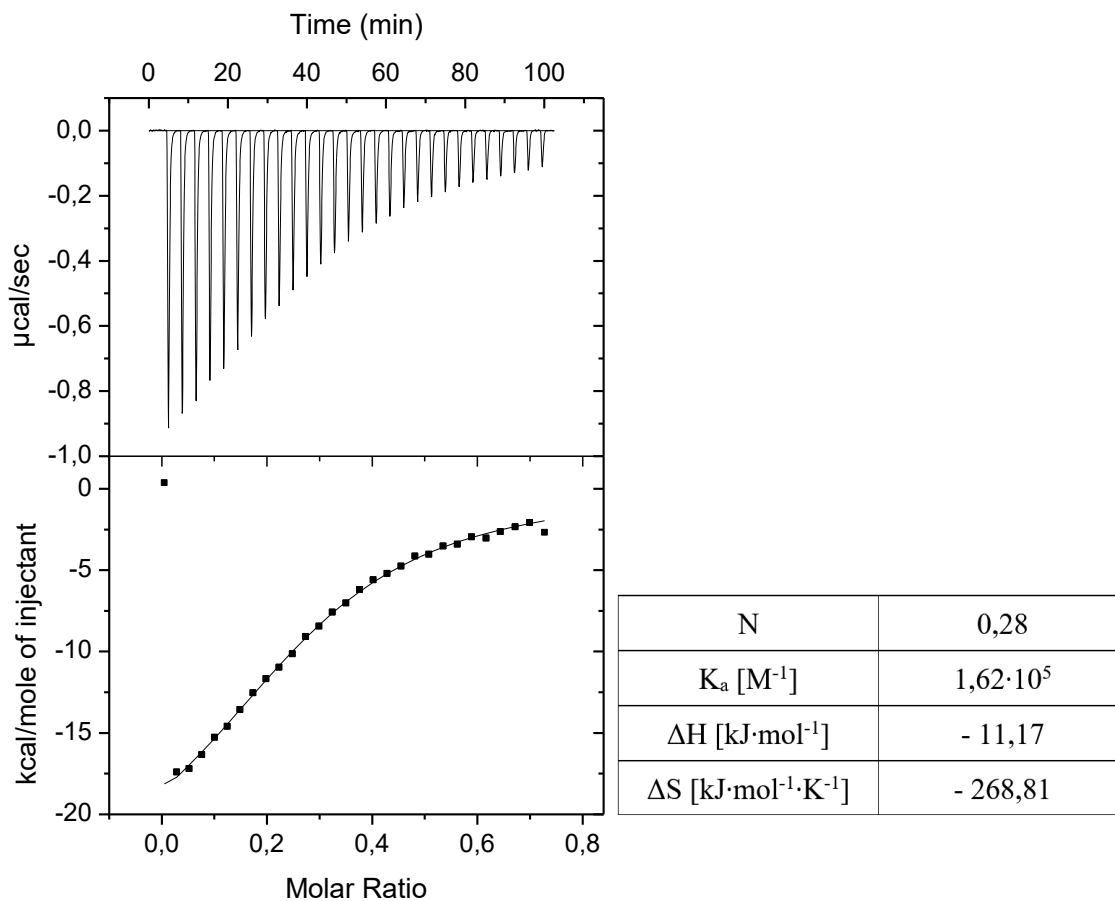


Obrázek 15: Záznam ITC a výsledné hodnoty měření ligandu č. 2 s CH- $\beta$ -CD

Na Obrázku 15 je uveden záznam změřeného tepla, které se uvolnilo během navázání ligandu č. 2 do kavity CH- $\beta$ -CD. Ekvivalence nastala při stechiometrickém poměru  $N = 0,42$ , tato hodnota se tedy blíží předpokládané hodnotě 0,5. Vazebná konstanta je blízká hodnotě vazebné konstanty komplexu ligand2@  $\beta$ -CD dle literatury <sup>32</sup>.

### Měření ligandu č. 3 v roztoku CH- $\beta$ -CD

Roztok ligandu č. 3 byl připraven rozpuštěním navážky 0,258 mg v 1,50 ml pufru  $\text{CH}_3\text{COONa}$  ( $c = 0,1710 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), roztok chitosanu byl použit bez ředění.



Obrázek 16: Záznam ITC a výsledné hodnoty měření ligandu č. 3 s  $\text{CH-}\beta\text{-CD}$

Na záznamu měření na *Obrázku 18* je znázorněno teplo uvolněné při vazbě ligandu č. 3 do kavity  $\beta\text{-CD}$ . Výsledná hodnota stechiometrického poměru 0,28 přibližně odpovídá předpokládané hodnotě 0,33, která je typická pro třívazný ligand. Hodnota vazebné konstanty  $K_a$  pak odpovídá hodnotám naměřeným při studii ligandu č. 3.<sup>33</sup>

**Výpočet přibližné koncentrace  $\beta$ -CD jednotek u modifikovaného hyaluronanu**

Nejprve bylo nutno vypočítat průměrnou molární hmotnost HA- $\beta$ -CD, která se spočítá jako součin hmotnostního zlomku a molárních hmotností hyaluronanu a modifikované triazolové jednotky s  $\beta$ -cyklodextrinem:

$$M_{HA} = (0,96 \cdot 397,33) + (0,04 \cdot 1575,39) = 444,45 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

V předpokládané navážce 10,000 mg byl tedy celkový počet molů:

$$n = \frac{10 \cdot 10^{-3}}{444,45} = 2,25 \cdot 10^{-5} \text{ mol}$$

Z uvedeného počtu molů tvoří  $\beta$ -CD jednotky:

$$n_{\beta-CD} = 0,04 \cdot 2,25 \cdot 10^{-5} = 9,00 \cdot 10^{-7} \text{ mol}$$

Molární koncentrace roztoku připravená rozpuštěním 10 mg HA- $\beta$ -CD v 25 ml:

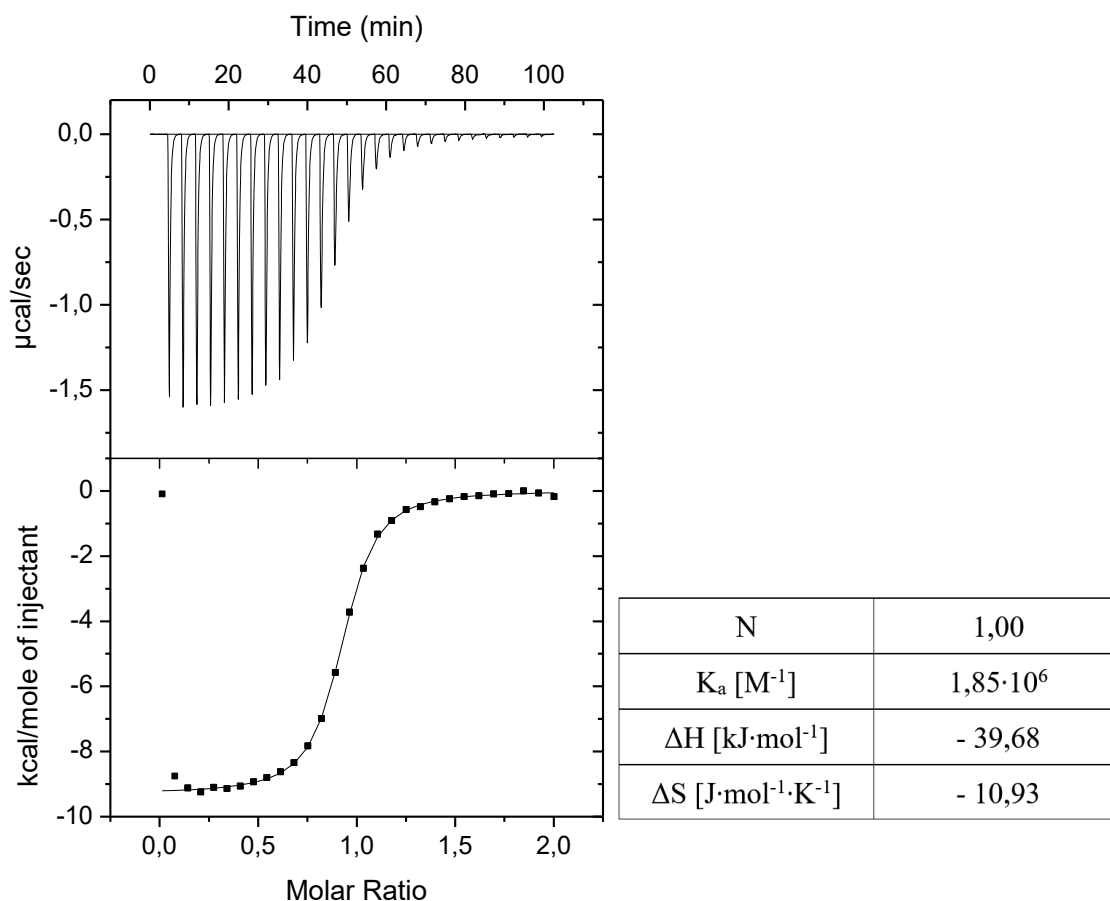
$$c = \frac{9,00 \cdot 10^{-7}}{0,025} = 3,60 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$$

Ve skutečnosti bylo rozpuštěno 15,531 mg HA- $\beta$ -CD v pufru. Předpokládaná koncentrace  $\beta$ -CD jednotek byla:

$$c_{\beta-CD} = \frac{15,531 \cdot 3,60 \cdot 10^{-5}}{10,000} = 5,59 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$$

Měření ligandu č. 1 v roztoku HA- $\beta$ -CD

Roztok ligandu č. 1 byl připraven rozpuštěním navážky 0,354 mg v 1,50 ml pufru  $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ( $c = 0,5433 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

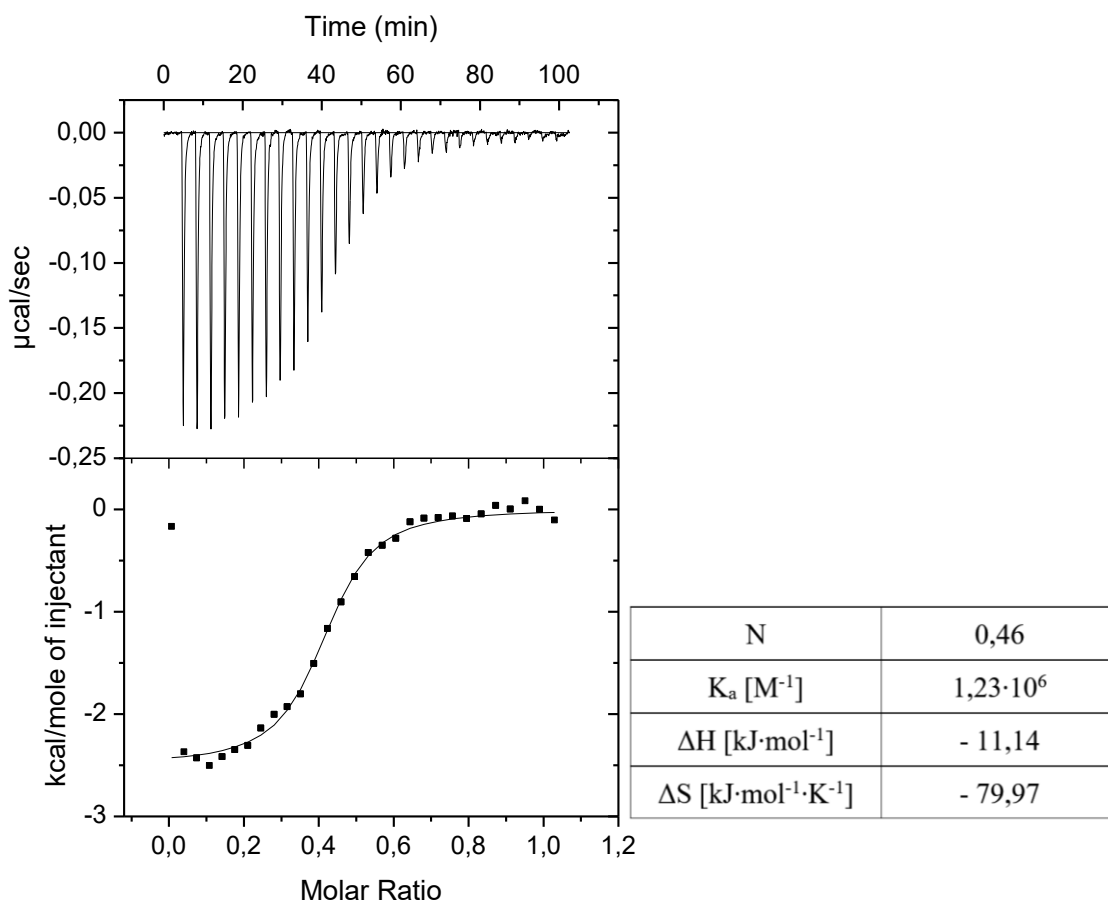


Obrázek 17: Záznam ITC a výsledné hodnoty měření ligandu č. 1 s HA- $\beta$ -CD

Obrázek 17 znázorňuje množství tepla uvolněného po navázání ligandu č. 1 do kavity  $\beta$ -CD HA- $\beta$ -CD. Jak je ze záznamu patrné,  $\beta$ -cykodextrinové jednotky byly obsazeny dříve, než molární poměr dosáhl hodnoty 1. Z toho lze usoudit, že výpočet koncentrace  $\beta$ -CD jednotek byl správný. Přesto bylo toto měření využito ke standardizaci roztoku hyaluronanu, čemuž odpovídá stechiometrický poměr 1,00, který je uveden v tabulce na Obrázku 17. Hodnota vazebné konstanty  $K_a$  zjištěná při tomto měření odpovídá předpokládané hodnotě pro komplex ligand1@ $\beta$ -CD.

Měření ligandu č. 2 v roztoku HA- $\beta$ -CD

Roztok ligandu č. 2 byl připraven rozpuštěním navážky 0,324 mg v 1,50 ml pufru  $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ( $c = 0,2795 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

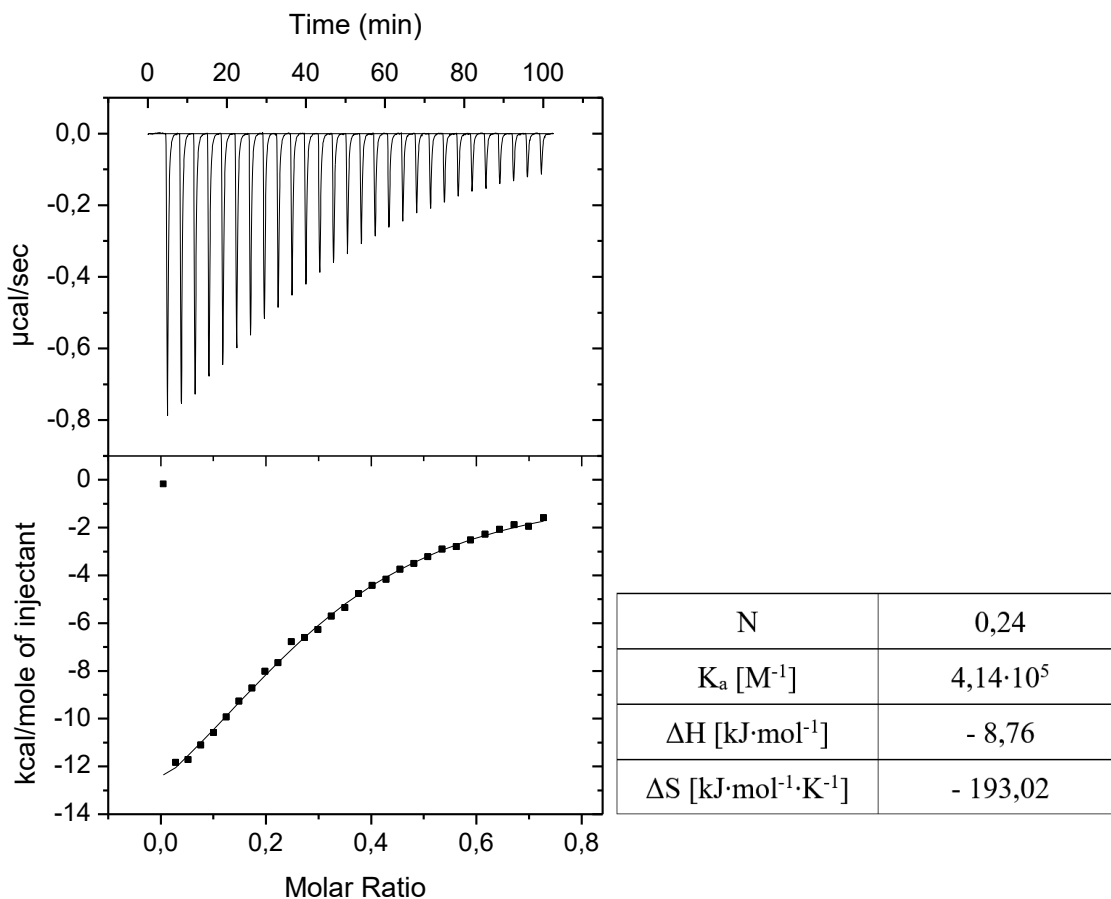


Obrázek 18: Záznam ITC a výsledné hodnoty měření ligandu č. 2 s HA- $\beta$ -CD

Graf a data na *Obrázku 16* odpovídají měření ligandu č. 2 v roztoku HA- $\beta$ -CD. Hodnota stechiometrického poměru se blíží předpokládané hodnotě 0,5. Byla změřena vazebná konstanta o řád vyšší než v případě komplexu ligand2@CH- $\beta$ -CD. Tato skutečnost mohla nastat díky stanovením v různých roztocích pufrů, v jiných případech se však nepotvrdila. Nové stanovení bohužel nemohlo být provedeno, neboť byl zásobní roztok hyaluronanu v pufru již spotřebován.

Měření ligandu č. 3 v roztoku HA- $\beta$ -CD

Roztok ligandu č. 3 byl připraven rozpuštěním navážky 0,298 mg v 1,50 ml pufru  $\text{NaNO}_3/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ( $c = 0,1975 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ).



Obrázek 19: Záznam ITC a výsledné hodnoty měření ligandu č. 3 s HA- $\beta$ -CD

Dle výsledků měření znázorněných na *Obrázku 19* byl stechiometrický poměr při vazbě ligandu č. 3 do kavity  $\beta$ -cyklodextrinu stanoven na 0,24, což je hodnota nižší než obvyklých 0,33. Hodnota vazebné konstanty však odpovídá předpokladům.



## ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo pomocí izotermální titrační mikrokolorimetrie optimalizovat vhodný postup stanovení termodynamického profilu nekovalentního vázání jedno-, dvou- a třívazných ligandů do kavity  $\beta$ -cyklodextrinu, kterým byly modifikovány biopolymery chitosan a hyaluronan. Důraz byl kladen na stanovení hodnot stechiometrických poměrů vazby mezi dvou- a třívaznými ligandy a  $\beta$ -cyklodextrinovou kavitou, díky nimž pak byla potvrzena tvorba supramolekulárních sítí. Stanovené stechiometrické poměry odpovídaly předpokladu, že by dvou vazný ligand měl vázat dvě kavity  $\beta$ -cyklodextrinu se stechiometrickým poměrem blízkým hodnotě 0,5 a třívazný ligand tři kavity  $\beta$ -cyklodextrinu v poměru blízkém hodnotě 0,33. Výsledné hodnoty stechiometrických poměrů při měření chitosanu modifikovaného  $\beta$ -cyklodextrinem byly stanoveny 0,42 pro dvou vazný ligand a 0,28 pro třívazný ligand, při měření hyaluronanu modifikovaného  $\beta$ -cyklodextrinem pak 0,46 pro dvou vazný ligand a 0,24 pro třívazný ligand.

Stanovením byly také získány hodnoty vazebných konstant, entalpií a entropií. Změřené vazebné konstanty rovněž odpovídaly předpokladům. Všechny grafy a výsledné hodnoty jsou znázorněny na *Obrázcích 14, 15, 16, 17, 18 a 19*.

Měřením tedy bylo potvrzeno, že mezi použitými ligandy a oběma zkoumanými biopolymery chitosanem a hyaluronanem, jež byly modifikovány  $\beta$ -cyklodextrinem, dochází ke vzniku supramolekulárních sítí.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- <sup>1</sup> CHEUNG, Randy, Tzi NG, Jack WONG a Wai CHAN. Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Marine Drugs*. 2015, 13(8), 5156-5186. DOI: 10.3390/md13085156. ISSN 1660-3397. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1660-3397/13/8/5156>
- <sup>2</sup> PERIAYAH, MercyHalleluyah, AhmadSukari HALIM a ArmanZaharil Mat SAAD. Chitosan: A promising marine polysaccharide for biomedical research. *Pharmacognosy Reviews*. 2016, 10(19). DOI: 10.4103/0973-7847.176545. ISSN 0973-7847. Dostupné také z: <http://www.phcogrev.com/text.asp?2016/10/19/39/176545>
- <sup>3</sup> GUTIÉRREZ, Tomy J. Chitosan Applications for the Food Industry. Chitosan. Hoboken, NJ, USA, 2017, 2017-09-15, 183-232. DOI: 10.1002/9781119364849.ch8. ISBN 9781119364849. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781119364849.ch8>
- <sup>4</sup> HUSAIN, Shehriar, Khalid H. AL-SAMADANI, Shariq NAJEEB, Muhammad S. ZAFAR, Zohaib KHURSHID, Sana ZOHAIB a Saad B. QASIM. Chitosan Biomaterials for Current and Potential Dental Applications. *Materials*. Hoboken, NJ, USA, 2017, 2017-09-15, 10(6), 183-232. DOI: 10.3390/ma10060602. ISBN 9781119364849. ISSN 1996-1944. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1996-1944/10/6/602>
- <sup>5</sup> PRICE, Richard D., M.G. BERRY a Harshad A. NAVSARIA. Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence [online]. 2007, 60(10), 1110-1119 [cit. 2019-02-20]. DOI: 10.1016/j.bjps.2007.03.005. ISSN 17486815. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1748681507001805>
- <sup>6</sup> PRICE, Richard D., M.G. BERRY a Harshad A. NAVSARIA. The History of Hyaluronic Acid Discovery, Foundational Research and Initial Use: the scientific and clinical evidence. *Hyaluronic Acid* [online]. Chichester, UK, 2015, 2015-01-09, 60(10), 1-8 [cit. 2019-02-20]. DOI: 10.1002/9781118695920.ch1. ISBN 9781118695920. ISSN 17486815. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118695920.ch1>

- <sup>7</sup> CAPILA, ISHAN, RAM SASISEKHARAN a Harshad A. NAVSARIA. Methods for Analysis of Hyaluronan and Its Fragments: the scientific and clinical evidence. Chemistry and Biology of Hyaluronan [online]. Chichester, UK: Elsevier, 2004, 2004, 60(10), 21-40 [cit. 2019-02-20]. DOI: 10.1016/B978-008044382-9/50033-9. ISBN 9780080443829. ISSN 17486815. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080443829500339>
- <sup>8</sup> MATARASSO, S, RAM SASISEKHARAN a Harshad A. NAVSARIA. Understanding and using hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. Aesthetic Surgery Journal [online]. Chichester, UK: Elsevier, 2004, 2004, 24(4), 361-364 [cit. 2019-02-20]. DOI: 10.1016/j.asj.2004.04.009. ISBN 9780080443829. ISSN 1090820X. Dostupné z: <https://academic.oup.com/asj/article-lookup/doi/10.1016/j.asj.2004.04.009>
- <sup>9</sup> LIAO, Yong-Hong, Stuart A. JONES, Ben FORBES, Gary P. MARTIN a Marc B. BROWN. Hyaluronan: Pharmaceutical Characterization and Drug Delivery. Drug Delivery [online]. Chichester, UK: Elsevier, 2008, 2004, 12(6), 327-342 [cit. 2019-02-20]. DOI: 10.1080/10717540590952555. ISBN 9780080443829. ISSN 1071-7544. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10717540590952555>
- <sup>10</sup> PAPAKONSTANTINO, Eleni, Michael ROTH a George KARAKIULAKIS. Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. Dermato-Endocrinology. 2014, 4(3), 253-258. DOI: 10.4161/derm.21923. ISSN 1938-1980. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/derm.21923>
- <sup>11</sup> NECAS, J., L. BARTOSIKOVA, P. BRAUNER a J. KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. Veterinární Medicína. 2008, [1946]-, 53(No. 8), 397-411. DOI: 10.17221/1930-VETMED. ISSN 03758427.
- <sup>12</sup> SZE, Jun Hui, Jeremy C. BROWNLIE a Christopher A. LOVE. Biotechnological production of hyaluronic acid: a mini review. 3 Biotech. 2016, 6(1), 1110-1119. DOI: 10.1007/s13205-016-0379-9. ISSN 2190-572X. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s13205-016-0379-9>
- <sup>13</sup> LECOURT, Thomas, Pierre SINAÏ, Christophe CHASSENIEUX, Marguerite RINAUDO a Rachel AUZÉLY-VELTY. Complexation between a Hydrophobically Modified Chitosan and Cyclodextrin Homodimers Singly or Doubly Connected

- through Their Primary Sides: Effects of Their Molecular Architecture on the Polymer Properties in Solution. *Macromolecules* [online]. 2004, 37(12), 4635-4642 [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.1021/ma049822x. ISSN 0024-9297. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ma049822x>
- <sup>14</sup> DEL VALLE, E.M.Martin, Pierre SINAÏ, Christophe CHASSENIEUX, Marguerite RINAUDO a Rachel AUZÉLY-VELTY. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry* [online]. 2004, 39(9), 1033-1046 [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.1016/S0032-9592(03)00258-9. ISSN 13595113. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032959203002589>
- <sup>15</sup> MARTINA, Katia, Arianna BINELLO, Dale LAWSON, Laszlo JICSINSZKY a Giancarlo CRAVOTTO. Recent Applications of Cyclodextrins as Food Additives and in Food Processing: a review. *Process Biochemistry* [online]. 2013, 9(3), 167-179 [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.2174/1573401311309030001. ISSN 15734013. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032959203002589>
- <sup>16</sup> HORSKÝ, Jiří a Jindřich JINDŘICH. Cyklodextriny ve světě polymerů [online]. Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i., Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 6, b Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Hlavova 8, 128 40 Praha 2, 2013, 23.7.2013, (107) [cit. 2019-03-27]. ISSN 769–776. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2013\\_10\\_769-776.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2013_10_769-776.pdf)
- <sup>17</sup> WANG, Yiming, Li LI, Xuhong GUO, Duc-Truc PHAM, Stephen F LINCOLN a Robert K PRUD'HOMME. Supramolecular polymer assembly in aqueous solution arising from cyclodextrin host–guest complexation. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* [online]. 2016, 23.7.2013, 12, 50-72 [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.3762/bjoc.12.7. ISSN 1860-5397. Dostupné z: <http://www.beilstein-journals.org/bjoc/content/12/1/7>
- <sup>18</sup> ASTRAY, G., C. GONZALEZ-BARREIRO, J.C. MEJUTO, R. RIAL-OTERO, J. SIMAL-GÁNDARA a Robert K PRUD'HOMME. A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids* [online]. 2009, 23.7.2013, 23(7), 1631-1640 [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2009.01.001. ISSN 0268005X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X09000022>
- <sup>19</sup> VAN DE MANAKKER, Frank, Tina VERMONDEN, Cornelus F. VAN NOSTRUM, Wim E. HENNINK, J. SIMAL-GÁNDARA a Robert K

- PRUD'HOMME. Cyclodextrin-Based Polymeric Materials: Synthesis, Properties, and Pharmaceutical/Biomedical Applications. *Biomacromolecules* [online]. 2009, 23.7.2013, 10(12), 3157-3175 [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.1021/bm901065f. ISSN 1525-7797. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm901065f>
- <sup>20</sup> MAAZAOUI, Radhouan a Raoudha ABDERRAHIM. Applications of cyclodextrins: formation of inclusion complexes and their characterization. *International -journal of Advanced Rsearch* [online]. 2015, 3(2), 762 [cit. 2019-03-27]. ISSN 2320-5407. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/321443475\\_Applications\\_of\\_cyclodextrins\\_formation\\_of\\_inclusion\\_complexes\\_and\\_their\\_characterization](https://www.researchgate.net/publication/321443475_Applications_of_cyclodextrins_formation_of_inclusion_complexes_and_their_characterization)
- <sup>21</sup> SZENTE, Lajos a Jozsef SZEJTLI. Cyclodextrins as food ingredients. 2004, 15(3-4), 137-142. DOI: 10.1016/j.tifs.2003.09.019. ISSN 09242244. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224403002589>
- <sup>22</sup> SHARMA, Neha, Ashish BALDI, Cornelus F. VAN NOSTRUM, Wim E. HENNINK, J. SIMAL-GÁNDARA a Robert K PRUD'HOMME. Exploring versatile applications of cyclodextrins: an overview. *Drug Delivery* [online]. 2014, 23.7.2013, 23(3), 729-747 [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.3109/10717544.2014.938839. ISSN 1071-7544. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10717544.2014.938839>
- <sup>23</sup> CHEIRSILP, Benjamas, Jaruporn RAKMAI, Cornelus F. VAN NOSTRUM, Wim E. HENNINK, J. SIMAL-GÁNDARA a Robert K PRUD'HOMME. Inclusion complex formation of cyclodextrin with its guest and their applications: an overview. *Biology, Engineering and Medicine* [online]. 2017, 23.7.2013, 2(1), 729-747 [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.15761/BEM.1000108. ISSN 23999632. Dostupné z: <http://oatext.com/Inclusion-complex-formation-of-cyclodextrin-with-its-guest-and-their-applications.php>
- <sup>24</sup> SINGH, Mamata, Rohit SHARMA a U.C BANERJEE. Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnology Advances* [online]. Coimbra, 2002, 20(5-6), 341-359 [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.1016/S0734-9750(02)00020-4. ISSN 07349750. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975002000204>

- <sup>25</sup> DUTTA, Amit K., Jörg RÖSGEN, Krishna RAJARATHNAM, Wim E. HENNINK, J. SIMAL-GÁNDARA a Robert K PRUD'HOMME. Using Isothermal Titration Calorimetry to Determine Thermodynamic Parameters of Protein–Glycosaminoglycan Interactions: an overview. *Glycosaminoglycans* [online]. New York, NY: Springer New York, 2015, 2015-9-24, 2(1), 315-324 [cit. 2019-03-27]. *Methods in Molecular Biology*. DOI: 10.1007/978-1-4939-1714-3\_25. ISBN 978-1-4939-1713-6. ISSN 23999632. Dostupné z: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-1714-3\\_25](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-1714-3_25)
- <sup>26</sup> HOFR, Ctrirad. Mikrokalorimetrie biologicky významných molekul. *Československý časopis pro fyziku*. Brno, 2006, 2006(56), 289.
- <sup>27</sup> DUFF, JR., Michael R., Jordan GRUBBS, Elizabeth E. HOWELL, Wim E. HENNINK, J. SIMAL-GÁNDARA a Robert K PRUD'HOMME. Isothermal Titration Calorimetry for Measuring Macromolecule-Ligand Affinity: an overview. *Journal of Visualized Experiments* [online]. New York, NY: Springer New York, 2011, 2015-9-24, 2(55), 315-324 [cit. 2019-03-27]. *Methods in Molecular Biology*. DOI: 10.3791/2796. ISBN 978-1-4939-1713-6. ISSN 1940-087X. Dostupné z: <http://www.jove.com/details.php?id=2796>
- <sup>28</sup> VELASQUEZ-CAMPOY, Adrián, Hiroyasu OHTAKA, Azin NEZAMI, Salman MUZAMMIL a Ernesto FREIRE. Isothermal Titration Calorimetry. *Current Protocols in Cell Biology* [online]. Hoboken, NJ, USA, 2001, 2004, 20(17) [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.1002/0471143030.cb1708s23. ISBN 0471143030. ISSN 1934-2616. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471143030.cb1708s23>
- <sup>29</sup> FREIRE, Ernesto, Obdulio L. MAYORGA, Martin STRAUME, Salman MUZAMMIL a Ernesto FREIRE. Isothermal titration calorimetry. *Analytical Chemistry* [online]. Hoboken, NJ, USA, 2008, 2004, 62(18), 950A-959A [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.1021/ac00217a002. ISBN 0471143030. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00217a002>
- <sup>30</sup> BARANAUSKIENĖ, Lina, Vilma PETRIKAITĖ, Jurgita MATULIENĖ a Daumantas MATULIS. Titration Calorimetry Standards and the Precision of Isothermal Titration Calorimetry Data. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2009, 10(6), 2752-2762 [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.3390/ijms10062752. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/10/6/2752>

- <sup>31</sup> DODZIUK, Helena. Cyclodextrins and their complexes: chemistry, analytical methods, applications. Weinheim: Wiley-VCH, c2006, xvii, 489 s. ISBN 3-527-31280-3
- <sup>32</sup> BRANNÁ, Petra, Michal ROUCHAL, Zdeňka PRUCKOVÁ, Lenka DASTYCHOVÁ, René LENOBEL, Tomáš POSPÍŠIL, Kamil MALÁČ a Robert VÍCHA. Rotaxanes Capped with Host Molecules: Supramolecular Behavior of Adamantylated Bisimidazolium Salts Containing a Biphenyl Centerpiece. *Chemistry - A European Journal* [online]. 2015, 21(33), 11712-11718 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1002/chem.201501353. ISSN 09476539. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/chem.201501353>
- <sup>33</sup> KULKARNI, Shantanu Ganesh, Zdeňka PRUCKOVÁ, Michal ROUCHAL, Lenka DASTYCHOVÁ a Robert VÍCHA. Adamantylated trisimidazolium-based tritopic guests and their binding properties towards cucurbit[7]uril and  $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* [online]. 2016, 84(1-2), 11-20 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1007/s10847-015-0577-9. ISSN 1388-3127. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10847-015-0577-9>

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

$\beta$ -CD	beta cyklodextrin
c	molární koncentrace
CD44	cluster of differentiation 44
$c_{\beta\text{-CD}}$	koncentrace beta-cyklodextrinových jednotek efektivní koncentrace, která vykazuje 50 % antioxidační účinek
EC50	
$\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$	kyselina šťavelová
HCl	kyselina chlorovodíková
H- $\beta$ -CD	hyaluronan modifikovaný beta-cyklodextrinem
$\text{CH}_3\text{COONa}$	octan sodný
CH- $\beta$ -CD	chitosan modifikovaný beta-cyklodextrinem
ITC	isotermální titrační mikrokolorimetrie
$K_a$	rovnovážná vazebná konstanta
$\text{KMnO}_4$	manganistan draselný
ln	přirozený logaritmus
$M_{\text{HA}}$	molární hmotnost hyaluronanu
$M_{\text{CH}}$	molární hmotnost chitosanu
N	stechiometrický koeficient
n	látkové množství
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	hydrogenfosforečnan sodný
$\text{NaNO}_3$	dusičnan sodný
NaOH	hydroxid sodný



---

$n_{\beta\text{-CD}}$	látkové množství beta-cyklodextrinových jednotek
R	molární plynová konstanta
RHAMM	hyaluronan-mediated motility receptor
T	teplota
(TGF)- $\beta$ 1	transforming growth factor beta 1
$\Delta G$	volná Gibbsova energie
$\Delta H$	entalpie
$\Delta S$	entropie

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

<i>Obrázek 1: Chemická struktura chitosanu</i> .....	12
<i>Obrázek 2: Chemická struktura hyaluronanu</i> .....	20
<i>Obrázek 3: Schéma terciární struktury hyaluronanu</i> .....	21
<i>Obrázek 4: Chemická struktura <math>\alpha</math>, <math>\beta</math> a <math>\gamma</math>-cyklodextrinu</i> .....	28
<i>Obrázek 5: Schéma vzniku inkluzního komplexu mezi <i>p</i>-xylenem a cyklodextrinem</i> .....	29
<i>Obrázek 6: Strukturní vzorec adamantanu</i> .....	30
<i>Obrázek 7: Schéma ITC</i> .....	33
<i>Obrázek 8: Schéma přístroje ITC a výstupní graf měření</i> .....	34
<i>Obrázek 9: Chitosan modifikovaný <math>\beta</math>-cyklodextrinem</i> .....	37
<i>Obrázek 10: Hyaluronan modifikovaný <math>\beta</math>-cyklodextrinem</i> .....	37
<i>Obrázek 11: Chemická struktura ligandu č. 1</i> .....	38
<i>Obrázek 12: Chemická struktura ligandu č. 2</i> .....	38
<i>Obrázek 13: Chemická struktura ligandu č. 3</i> .....	39
<i>Obrázek 14: Záznam ITC a výsledné hodnoty měření ligandu č. 1 s CH-<math>\beta</math>-CD</i> .....	42
<i>Obrázek 15: Záznam ITC a výsledné hodnoty měření ligandu č. 2 s CH-<math>\beta</math>-CD</i> .....	43
<i>Obrázek 16: Záznam ITC a výsledné hodnoty měření ligandu č. 3 s CH-<math>\beta</math>-CD</i> .....	44
<i>Obrázek 17: Záznam ITC a výsledné hodnoty měření ligandu č. 1 s HA-<math>\beta</math>-CD</i> .....	46
<i>Obrázek 18: Záznam ITC a výsledné hodnoty měření ligandu č. 2 s HA-<math>\beta</math>-CD</i> .....	47
<i>Obrázek 19: Záznam ITC a výsledné hodnoty měření ligandu č. 3 s HA-<math>\beta</math>-CD</i> .....	48

## SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: VP-ITC mikrokalořímetr

Příloha 2: Thermo-vac

Příloha 3: pH-metr

## PŘÍLOHA P I: VP-ITC MIKROKALORIMETR



**PŘÍLOHA 2: THERMO-VAC**

**PŘÍLOHA 3: PH-METR**