

Univerzita Palackého v Olomouci

**Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie**



Charakterizace derivátů kyseliny hyaluronové

DISERTAČNÍ PRÁCE

Autor práce:

Ing. Matěj Šimek

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí disertační práce:

prof. RNDr. Karel Lemr, Ph.D.

Olomouc 2021

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou v seznamu použité literatury. Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Ing. Matěj Šimek

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat svému školiteli, prof. RNDr. Karlu Lemrovi, Ph.D. za cenné rady při přípravě disertační práce a publikací.

Dále bych chtěl poděkovat svým kolegům z firmy Contipro především pak Mgr. Martině Hermannové, Ph.D. a doc. RNDr. Vladimírovi Velebnému, CSc za cenné rady a vytvoření výborných pracovních podmínek, Mgr. Tereze Foglové za pomoc s přípravou biologických vzorků a všestrannou pomoc, Mgr. Kristině Nešporové, Ph. D. za pomoc při plánování a provedení biologických *in vitro* experimentů.

Za provedení *in vivo* experimentů a konzultaci výsledků děkuji doc. Mgr. Lukáši Kubalovi, Ph.D. z Biofyzikálního ústavu AV ČR a Mgr. Martin Schwarzerovi, Ph.D. z Mikrobiologického ústavu AV ČR.

V neposlední řadě děkuji své manželce Veronice, rodičům a celé své rodině za velkou trpělivost a podporu.

SOUHRN

Disertační práce se zabývá využitím technik hmotnostní spektrometrie a kapalinové chromatografie pro strukturní charakterizaci chemicky modifikovaného hyaluronanu, a ke studium absorpce, distribuce a metabolismu nativního nebo chemicky modifikovaného hyaluronanu. Teoretická část disertační práce je věnována analytickým postupům, metodám kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie včetně metod iontové mobility a zobrazovacích metod hmotnostní spektrometrie používaných pro analýzu hyaluronanu a jiných glykosaminoglykanů.

První část výzkumné práce byla věnována vývoji metody pro charakterizaci homogenity distribuce chemických modifikací podél řetězce lauroyl-modifikovaného hyaluronanu. Byla vyvinuta metoda enzymatické degradace derivátu, při níž vznikají modifikované a nemodifikované oligosacharidy hyaluronanu. Pomocí separace na reverzních fázích a hmotnostně spektrometrické detekce bylo možné vznikající nemodifikované oligosacharidy kvantifikovat. Množství a délka vzniklých oligosacharidů jsou závislé na stupni substituce a homogenitě distribuce substituentů. Pomocí této metody je možné odhalit nestandardně připravené deriváty, které v běžně měřených parametrech, jako je stupeň substituce a molekulová hmotnost, odpovídají specifikaci, avšak jejich fyzikálně chemické vlastnosti, jako nasákavost vody, jsou v důsledku nestandardní distribuce modifikací odlišné.

Druhá část výzkumu byla zaměřena na vývoj analytické metody pro studium farmakokinetiky polymerní micely z oleyl-modifikovaného hyaluronanu nesoucí cytostatikum doxorubicin. Vyvinutá metoda umožňuje stanovit farmakokinetiku léčiva i chemicky modifikovaného hyaluronanu, který tvoří vlastní polymerní nosič. Rozdílná orgánová distribuce doxorubicinu a oleyl-modifikovaného hyaluronanu ukázala, že polymerní micely nesoucí léčivo byly po intravenózní aplikaci rychle disociovány. S využitím technik gelové permeační chromatografie, chromatografické separace na reverzních fázích a hmotnostní spektrometrie bylo možné popsat změny v molekulové hmotnosti oleyl-modifikovaného hyaluronanu, ke kterým docházelo v rámci jeho metabolizace.

Poslední část je věnována studiu absorpce, distribuce a metabolismu exogenního hyaluronanu podávaného intravenózně a orálně. V literatuře existují nekonzistentní informace týkající se jeho osudu v biologickém systému. Výsledky jsou často zkreslené špatnou kvalitou hyaluronanu a nedostatky fluorescenčního a radioisotopového značení,

jež jsou využívány pro odlišení exogenního/endogenního hyaluronanu. V rámci této práce bylo využito čistého biotechnologicky připraveného hyaluronanu, značení stabilním isotopem ^{13}C a analýzy pomocí kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Metoda umožnila jednoznačně určit vliv molekulové hmotnosti na osud intravenózně aplikovaného hyaluronanu. Hyaluronan s nízkou molekulovou hmotností byl rychle vyloučen ve formě malých fragmentů hyaluronanu v moči, zatímco hyaluronan s vysokou molekulovou hmotností vykazoval saturovatelnou kinetiku a úplnou metabolizaci během 48 hodin od podání. Stejná metoda byla využita pro studium perorálně podaného hyaluronanu. Zde bylo pomocí několika *in vivo* a *in vitro* studií prokázáno, že pro absorpci vysokomolekulárního hyaluronanu je nutná jeho metabolizace střevním mikrobiomem. Pomocí plynové a kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí bylo zjištěno, že produkty mikrobiální degradace hyaluronanu jsou nenasycené oligosacharidy, aktivované cukry a krátké mastné kyseliny.

Vysoká specifita metod kombinující enzymatickou degradaci a chromatografickou analýzu s hmotnostně-spektrometrickou detekcí umožnila jednoznačně určit farmakokinetiku oley-modifikovaného hyaluronanu, závislost eliminační účinnosti na molekulové hmotnosti hyaluronanu a popsat osud hyaluronanu v organismu po jeho požití. Uvedené analytické postupy se mohou uplatnit nejen při studiu farmakokinetiky a metabolizace chemicky modifikovaného hyaluronanu, ale i jiných glykosaminoglykanů. Případně mohou posloužit při optimalizaci fermentačních procesů při biotechnologické výrobě hyaluronanu.

SUMMARY

This work deals with the use of mass spectrometry and liquid chromatography for the structural characterization of chemically modified hyaluronic acid, and for the study of absorption, distribution and metabolism of native or chemically modified hyaluronan. The theoretical part is devoted to analytical procedures, chromatographic and mass spectrometric methods, including techniques of ion mobility and mass spectrometry imaging used for the analysis of hyaluronic acid and other glycosaminoglycans.

The first research part deals with the method development of characterization the homogeneity of chemical modification along the polymer chain of lauroyl-modified hyaluronan. An enzymatic degradation was employed to obtain mixture of native and modified oligosaccharides. The unmodified oligosaccharides were analysed by reversed phase chromatography with mass spectrometric detection. The amount and length of formed oligosaccharides depended on the degree of substitution and the homogeneity of the substituent distribution along the polymer chain. The method was used for the identification of non-standardly prepared derivatives, which met the specification in the terms of degree of substitution and molecular weight, but hygroscopic properties were different due to the non-standard distribution of chain modifications.

The second part of the work is focused on the study of the pharmacokinetics of polymeric micelles from oleyl-modified hyaluronan carrying the cytostatic doxorubicin. The unique procedure of preparation of biological samples enables to observe the pharmacokinetics of the drug and chemically modified hyaluronan. The different organ distribution of doxorubicin and oleyl-modified hyaluronan showed that the drug-bearing polymer micelles were rapidly dissociated after intravenous administration. Using gel permeation chromatography, reverse phase chromatographic separation, and mass spectrometry, it was also possible to describe the changes in the molecular weight of the oleyl-modified hyaluronan that occurred during its metabolism.

The last part is devoted to the study of the absorption, distribution, and metabolism of exogenous hyaluronan, administered intravenously and orally. So far, there is inconsistent information regarding the fate of exogenously given hyaluronan. The data are often biased by the poor quality of hyaluronan and non-ideal labelling strategies used for resolving exogenous/endogenous hyaluronan, which only monitor the label and not hyaluronan itself. To overcome these drawbacks and establish the pharmacokinetics of intravenous

hyaluronan in relation to its M_w , ^{13}C -labelled HA in combination with above mentioned method of HA quantification allowed us to show that the elimination efficiency increased with decreasing M_w . Low M_w hyaluronan was rapidly eliminated as small hyaluronan fragments in urine, while high M_w hyaluronan exhibited saturable kinetics and complete metabolization within 48 h. The same methodology was used to study orally administered hyaluronan. These *in vivo* and *in vitro* studies have shown that the presence of the intestinal microbiome is important for absorption of oral high molecular weight hyaluronan. Additionally, novel method of hyaluronan oligosaccharide analysis, and metabolomics analysis enabled to identify unsaturated oligosaccharides, activated sugars and short fatty acids as the products of hyaluronan degradation by intestinal microbiome. Developed methods combining enzymatic degradation and chromatographic analysis with mass spectrometric detection conclusively determine the pharmacokinetics of oleyl-modified hyaluronan, the dependence of elimination efficiency on the molecular weight of hyaluronan and describe the fate of hyaluronan in the body after its ingestion. These analytical procedures can be used not only to study the pharmacokinetics and metabolism of chemically modified hyaluronan, but also other glycosaminoglycans. Alternatively, they can be used to optimize fermentation processes in the biotechnological production of hyaluronan.

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1 Hyaluronan.....	2
2.1.1 Metabolismus hyaluronanu	3
2.1.2 Chemické modifikace hyaluronanu	4
2.2 Analýza hyaluronanu	5
2.2.1 Kvantifikace hyaluronanu	6
2.2.2 Degradace hyaluronanu	11
2.2.3 Metody kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostně spektrometrickou detekcí	14
2.2.4 Analýza hyaluronanu hmotnostní spektrometrií.....	21
2.3 Charakterizace derivátů hyaluronanu.....	24
2.4 Stanovení distribuce nanomateriálových nosičů léčiv <i>in vivo</i>	30
3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	32
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	33
4.1 Charakterizace lauroyl-modifikovaného hyaluronanu.....	33
4.1.1 Chemikálie	33
4.1.2 Enzymatická degradace lauroyl modifikovaného hyaluronanu.....	33
4.1.3 Stanovení oligosacharidů hyaluronanu	33
4.2 Studium farmakokinetiky polymerního nosiče z oleyl-modifikovaného hyaluronanu nesoucí cytostatikum doxorubicin	35
4.2.1 Použité chemikálie	35
4.2.2 Analýza doxorubicinu a doxorubicinolu v myší plasmě.....	35
4.2.3 Analýza oleyl-modifikovaného hyaluronanu a ¹³ C-hyaluronanu v myší plasmě ³⁶	
4.2.4 Analýza doxorubicinu, doxorubicinolu, oleyl-modifikovaného hyaluronanu a ¹³ C-hyaluronanu v homogenátech myších tkání.....	36
4.2.5 Nastavení hmotnostního spektrometru	37
4.2.6 Validace stanovení doxorubicinu, doxorubicinolu, oleyl- modifikovaného hyaluronanu a ¹³ C-hyaluronanu	38
4.2.7 Příprava a charakterizace polymerních micel z oleyl modifikovaného hyaluronanu nesoucí cytostatikum doxorubicin.....	38

4.2.8	Design <i>in vivo</i> studie farmakokinetiky polymerní micely z oleyl-modifikovaného hyaluronanu nesoucí cytostatikum doxorubicin	39
4.2.9	Stanovení molekulové hmotnosti oleyl-modifikovaného hyaluronanu	39
4.3	Studium metabolismu intravenózně a perorálně aplikovaného hyaluronanu pomocí značení stabilními isotopy	40
4.3.1	Použité chemikálie	40
4.3.2	Příprava hyaluronanu s definovanou molekulovou hmotností	40
4.3.3	Analýza ¹³ C-hyaluronanu, ¹³ C-N-acetylglukosaminu a ¹³ C-kyseliny glukuronové v myší plasmě a orgánech	41
4.3.4	Analýza metabolitů ¹³ C-hyaluronanu	41
4.3.5	Stanovení molekulové hmotnosti ¹³ C-hyaluronanu v myších tkáních	42
4.3.6	<i>In vivo</i> studie zkoumající farmakokinetiku intravenózně podaného hyaluronanu v závislosti na jeho molekulové hmotnosti	42
4.3.7	<i>In vivo</i> studie zkoumající orgánovou distribuci intravenózně podaného hyaluronanu v závislosti na jeho molekulové hmotnosti	43
4.3.8	<i>In vitro</i> studie zkoumající metabolismus hyaluronanu jaterními buňkami v závislosti na jeho molekulové hmotnosti	43
4.3.9	<i>In vivo</i> studie zkoumající farmakokinetiku perorálně podávaného hyaluronanu	44
4.3.10	<i>In vitro</i> experiment degradace hyaluronu umělou střevní šťávou	45
4.3.11	<i>Ex vivo</i> studie zkoumající degradaci hyaluronanu střevním mikrobiomem	45
4.3.12	Stanovení nenasycených oligosacharidů hyaluronanu ve střevním obsahu myší	46
4.3.13	Stanovení krátkých mastných kyselin pomocí GC-MS	48
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE	49
5.1	Charakterizace homogenity modifikací lauroyl-modifikovaného hyaluronanu	49
5.2	LC-MS analýza ¹³ C-hyaluronanu, oleyl-modifikovaného hyaluronanu a doxorubicinu v biologických vzorcích	55
5.2.1	Princip metody	55
5.2.2	Optimalizace přípravy vzorku	56
5.2.3	Chromatografická separace doxorubicinu, doxorubicinolu, nenasyceného disacharidu hyaluronanu, nenasyceného disacharidu oleyl-modifikovaného hyaluronanu	58
5.2.4	Validace LC-MS metody	60

5.3	Studium polymerních micel z oleyl-modifikovaného hyaluronanu nesoucí cytostatikum doxorubicin po intravenózní aplikaci.....	65
5.4	Studium farmakokinetiky nativního hyaluronanu pomocí značení stabilními isotopy	83
5.4.1	Charakterizace ¹³ C-značeného hyaluronanu	83
5.4.2	Farmakokinetika intravenózně aplikovaného hyaluronanu	86
5.4.3	Metabolizace intravenózně podaného hyaluronanu.....	95
5.4.4	Farmakokinetika perorálně podávaného hyaluronanu	103
5.4.5	Degradace hyaluronanu střevním mikrobiomem.....	106
6.	ZÁVĚR	119
7.	LITERATURA.....	121
8.	SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ	138
9.	ŽIVOTOPIS	140
10.	PŘÍLOHA: PUBLIKAČNÍ VÝSTUPY	I

1. ÚVOD

Pro medicínské aplikace derivátů hyaluronanu je nutné používat pouze vysoce kvalitní, čisté a deriváty s dobře definovanou strukturou, jejich správná charakterizace je proto zásadní. Struktura derivátů hyaluronanu definuje jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, které následně určují fyzikálně-chemické vlastnosti konečných produktů a mají silný vliv i na jejich na biologické funkce. Chemicky modifikovaný hyaluronan je zpravidla charakterizován molární hmotností, stupněm a polohou substituce. Distribuce modifikací podél hyaluronového řetězce nebývá standardně monitorována, avšak i tento parametr výrazně ovlivňuje vlastnosti derivátu. Z toho důvodu je důležité mít k dispozici metody, které jsou schopné odlišnou distribuci substituentů postihnout.

Jelikož nativní hyaluronan je lineární polysacharid s pravidelně se opakující monomerní jednotkou, která není modifikována žádnými funkčními skupinami, biologické funkce závisí na jeho molekulové hmotnosti. Klíčový analytický úkol tedy spočívá v jeho diferenciaci od jiných glykosaminoglykanů a stanovení distribuce molekulových hmotností. Pokud chceme studovat absorpci, distribuci, metabolismus a eliminaci exogenního hyaluronanu aplikovaného do organismu, je navíc nutné odlišit exogenní hyaluronan od endogenního. K tomuto účelu se většinou používá fluorescenční nebo radioisotopové značení. Výsledky studií využívající tyto metody značení pro studium exogenního hyaluronanu si však často odporují. V literatuře například neexistuje jednotný názor, jak molekulová hmotnost ovlivňuje rychlost eliminace aplikovaného hyaluronanu. Rovněž je k dispozici jen velmi málo informací o tom, co se v organismu děje s chemicky modifikovaným hyaluronanem, přitom tato znalost je pro medicínské využití derivátů hyaluronanu naprosto zásadní.

Cílem práce bylo vyvinout metodu umožňující charakterizovat distribuci esterifikovaných skupin podél řetězce lauroyl-modifikovaného hyaluronanu a vyvinout metodu pro analýzu exogenního/endogenního nativního hyaluronanu a chemicky modifikovaného hyaluronanu v biologických vzorcích.

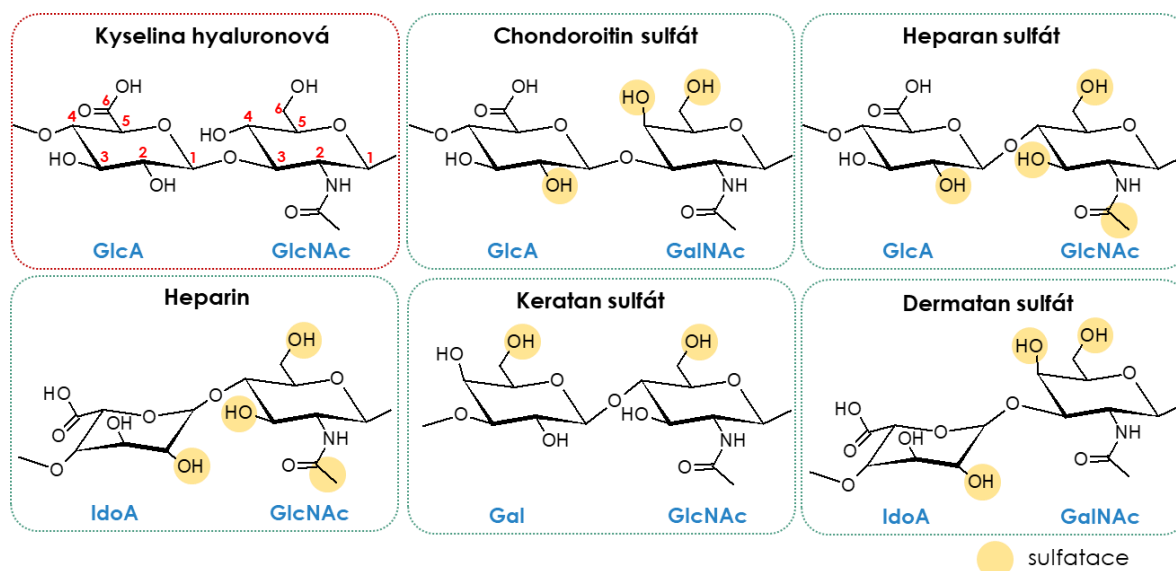
2. TEORETICKÁ ČÁST

Podstatná část teoretické části práce byla publikována ve formě rešeršního článku: „*Analysis of hyaluronan and its derivatives using chromatographic and mass spectrometric techniques*“ [1].

2.1 Hyaluronan

Hyaluronan respektive kyselina hyaluronová (HA) patří do skupiny glykosaminoglykanů (GAG). Do této skupiny se dále řadí chondroitin sulfát (CS), dermatan sulfát (DS), keratan sulfát (KS), heparan sulfát (HS) a heparin (HP). Jednotlivé GAG se mezi sebou liší monosacharidovým složením a pozicemi glykosidických vazeb, které je spojují [2]. Struktura GAG je složitá a na základě určitých strukturních motivů mají různé GAG různé biologické vlastnosti, které hrají klíčovou úlohu při adhesi buněk a v různých signálních drahách. Struktura HA je nejjednodušší ze všech GAG a jako jediný z nich není sulfatován a není kovalentně vázán na proteiny. Řetězec HA je tvořen opakující se disacharidovou jednotkou tvořenou D-kyselinou glukuronovou (GlcA) a *N*-acetylglukosaminem (GlcNAc) spojenými glykosidickou vazbou $\beta(1\rightarrow3)$. Jednotlivé disacharidy jsou mezi sebou vázány $\beta(1\rightarrow4)$ glykosidickou vazbou a tvoří lineární nevětvený řetězec [2].

HA je jednou z nejvíce hydrofilních přírodních látek, z tohoto důvodu je nepostradatelnou součástí extracelulárního prostoru a je přítomen jak ve zvířecích, tak v bakteriálních buňkách. U obratlovců se HA nachází v nejvyšší koncentraci v kůži a kloubech, kde hraje důležitou úlohu při hydrataci tkání a v případě kloubů přispívá k jejich lubrikaci a tlumení nárazů. Kromě plnicí a hydratační funkce má HA řadu biologických účinků skrze interakci s mnoha receptory přítomnými na buněčné membráně. Tyto interakce a biologické účinky HA silně závisí na jeho molekulové hmotnosti (M_w), která se v lidském těle může pohybovat od stovek Da pro oligosacharidy až po velmi dlouhé řetězce s M_w 7000 kDa [3]. Nízkomolekulární HA (LMW HA) bývá spojován se zánětlivými procesy, zatímco vysokomolekulárnímu HA jsou přisuzovány opačné biologické účinky [4].



Obr. 1 Struktury disacharidových jednotek jednotlivých GAG. Ve struktuře HA je 6 funkčních skupin, které mohou být u derivátů HA chemicky modifikovány: i) hydroxylové skupiny, ii) karboxylová skupina, iii) acetamidová skupina. Místa možné sulfatace ostatních GAG jsou označena žlutě.

2.1.1 Metabolismus hyaluronanu

Lidské tělo obsahuje kolem 15 g HA a jedna třetina tohoto množství je denně degradována a znovu nesyntetizována. Eliminace HA probíhá na dvou úrovních, a to buď lokálně v tkáních nebo systematicky na úrovni celého organismu. Při systematické eliminaci je HA metabolizován játry, lymfatickým systémem a ledvinami. Na buněčné úrovni je HA degradován dvojím způsobem: neenzymaticky účinkem volných radikálů a enzymaticky za účasti několika HA štěpících enzymů. Současný model metabolismu HA přičítá hlavní úlohu dvěma hyaluronidasám: HYAL1 a HYAL2. HYAL2 je enzymem přítomným v buněčné membráně, který štěpí HMW HA na ~20kDa fragmenty. Tyto fragmenty jsou internalizovány buňkou a v lysozomech dále štěpeny HYAL1 až na tetrasacharidy, které jsou následně degradovány exoglukoronidasami na GlcA a GlcNAc [5]. Hyaluronidasová aktivita byla prokázána rovněž u transmembránového proteinu 2 (TMEM2) a HA-vázajícího proteinu (známým pod zkratkou CEMIP nebo KIAA1199) [6].

Na úrovni systémové degradace je HA z periferních tkání uvolněn a dostává se do krevního řečiště a lymfatických cest. HA je následně endocytován především jaterními endoteliálními buňkami a v menší míře ledvinovými endoteliálními buňkami. Endocytóza HA probíhá za účasti několik membránových receptorů: HARE (hyaluronan receptor for endocytosis), LYVE (lymphatic vessel endothelial HA receptor) a laylinu [7].

HA je využíván v celé řadě aplikací od kosmetiky, přes oftalmologii až po léčbu artritidy. Metabolismus HA je velmi rychlý s poločasem eliminace v krvi 2–10 min. Avšak dávky v řádu jednotek až desítek mg HA na 1 kg tělesné hmotnosti člověka, které se využívají v medicíně při intravenózní aplikaci, mohou saturovat metabolismus HA a prodloužení poločasu eliminace až na několik hodin [8,9]. Informace ohledně metabolismu a osudu exogenního HA v organismu jsou však založeny na studiích, které k odlišení exogenního od endogenního HA využívaly značení fluorescenční nebo radioisotopovou značkou. Fluorescenční detekce HA byla umožněna navázáním fluoresceinu [10], cypátu [11] a kyaninu 5,5 [12]. Radiometrická analýza HA byla umožněna navázáním isotopů ^{99m}Tc [13], ^{111}In [14], ^{125}I [15,16], ^3H [17], ^{11}C [18] nebo ^{14}C [14,19]. Fluorescenční a radiometrické metody jsou většinou dostatečně citlivé a spolehlivě odlišují endogenní a exogenní HA v komplexních biologických vzorcích, nicméně jejich použití přináší celou řadu nevýhod. Kromě toho, že s radioaktivním materiálem je potřeba pracovat za zvláštních podmínek a pouze na specializovaném pracovišti, chemické modifikace mění strukturu HA a tím jeho vazebnou schopnost na receptory. Další nevýhodou je, že při fluorescenčním nebo radiometrickém měření je sledována pouze značka, nikoli samotný HA. Zaznamenaný osud podaného HA v organismu tak nemusí plně reflektovat skutečnou situaci [20].

2.1.2 Chemické modifikace hyaluronanu

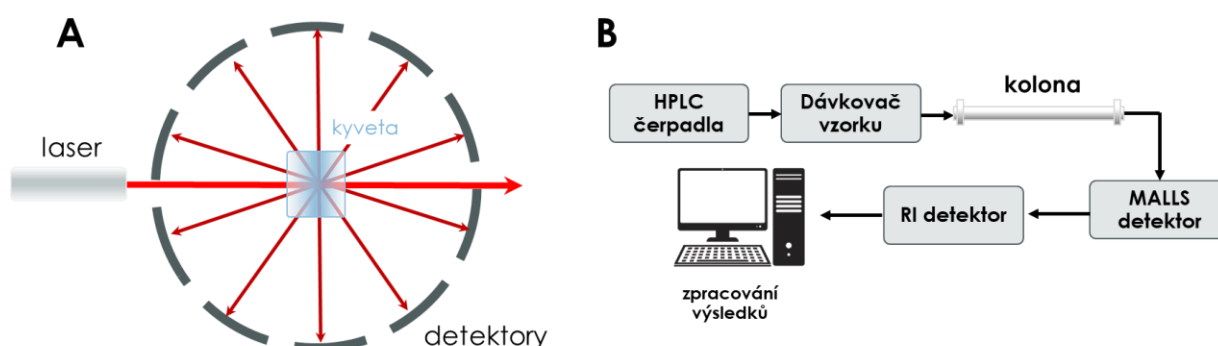
HA představuje biokompatibilní, biodegradabilní materiál s mukoadhesivními vlastnostmi, použitelný v celé řadě medicínských aplikací zahrnujících hojení ran, tkáňové inženýrství a cílený transport léčiv. Pro řadu aplikací je však žádoucí některé fyzikálně-chemické vlastnosti HA změnit. Chemická modifikace HA umožňuje přípravu nejrůznějších forem preparátů, jako jsou hydrogely, filmy, vlákna, nanomateriálové nosiče léčiv a další. HA může být modifikován na šesti funkčních skupinách: na karboxylové skupině, čtyřech hydroxy skupinách a *N*-acetylovém zbytku (Obr. 1). Karboxylová skupina může být změněna na ester nebo amid. Hydroxylové skupiny mohou být oxidovány nebo převedeny na ethery, estery nebo karbamáty. Regioselektivita derivatizačních reakcí na hydroxy skupinách není známá, avšak předpokládá se, že derivatizace probíhá především na hydroxyly C6 na GlcNAc, který je jako primární alkohol nejprístupnější derivatizačnímu činidlu. Acetylový zbytek na GlcNAc může být modifikován na amin, na který mohou být následně navázány další funkční skupiny [21]. Karboxyl a hydroxylové skupiny jsou nejčastějším místem chemické modifikace při vývoji nových derivátů HA z důvodu, že jejich modifikací je ovlivněna rozpustnost HA ve vodě a odolnost vůči hyaluronidázám, zatímco biologické vlastnosti HA bývají zachovány.

Modifikace na *N*-acetylu nebývají časté, jelikož dochází k výraznému ovlivnění biologických účinků HA a během deacetylace se značně snižuje jeho M_w [22,23].

Chemická derivatizace je stále nejpoužívanější metodou modifikace struktury HA, avšak v posledních letech byl učiněn velký pokrok v metodách chemoenzymatické syntézy a biotechnologické produkce GAG [24,25]. Kombinace postupů chemické derivatizace a enzymaticky katalyzovaných reakcí může vést k vytvoření nových derivátů s přesně definovanou a homogenní modifikací hyaluronového řetězce.

2.2 Analýza hyaluronanu

Struktura HA je poměrně jednoduchá a neobsahuje podél polysacharidového řetězce žádné modifikace ani žádná rozvětvení. Klíčovou úlohou při analýze HA tak je především odlišení HA od ostatních GAG, stanovení jeho obsahu a M_w . K odlišení HA od ostatních GAG lze využít celé řady chromatografických (2.2.3) nebo elektroforetických metod [26]. Kvantifikaci je možné provést rovněž různými metodami s využitím spektrofotometrických, LC, MS a ELISA metod, jak je podrobněji popsáno v následující kapitole (2.2.1). Ke stanovení M_w a její distribuce je v současnosti využíváno především detektorem MALLS (multi-angle laser light scattering) (Obr. 2), který měří rozptýlené světlo v několika úhlech. Na rozdíl od konvenční SEC, kdy je M_w HA vyhodnocena porovnáním chromatografických záznamů se standardy (dextran, pollulan), MALLS detektor umožňuje přímé stanovení M_w . SEC-MALLS stanovení vyžaduje stanovení koncentrace vzorku v každém elučním objemu, která se určí ze signálu diferenciálního refraktometru. [27]



Obr. 2 A) Schéma detektoru MALLS (multi-angle laser light scattering), B) Schéma zapojení MALLS detektoru. Převzato z [28] a upraveno.

2.2.1 Kvantifikace hyaluronanu

Koncentrace HA se v jednotlivých organizmech a živočišných tkáních značně liší. V lidské synoviální tekutině je HA přítomen v koncentraci 2–3 mg ml⁻¹ zatímco koncentrace HA v plasmě dosahuje pouze 40 ng ml⁻¹ a zvýšené hodnoty jsou asociovány s cirhózou, artrózou nebo rakovinným onemocněním [3]. Vzorky s vysokou koncentrací HA a nízkým zastoupením kontaminantů (jiné GAG) mohou být analyzovány pomocí jednoduchých kolorimetrických metod, jako je např. reakce s karbazolem nebo alcianovou modří [29]. Tyto metody se s úspěchem využívají při analýzách produktů obsahujících HA (tablety, gely, kultivační média ...), avšak pro studium metabolismu HA a zkoumání jeho biologických účinků jsou potřeba mnohem specifičtější a citlivější metody. Kvantitativní metody ELISA jsou vysoce specifické a mají nejnižší limit kvantifikace 0,05–30 ng ml⁻¹ v porovnání s ostatními kvantitativními metodami [3]. Jejich nevýhodou však je, že výsledek je závislý na M_w HA. Klasická ELISA v sendvičovém uspořádání špatně detekuje fragmenty HA s M_w menší než 150 kDa [30]. Naproti tomu chromatografické a elektroforetické metody kvantifikace HA, kdy HA je nejprve depolymerizován enzymatickou nebo neenzymatickou cestou, nejsou na M_w HA závislé. Při enzymatické degradaci je však potřeba brát v úvahu substrátovou specifitu použitých enzymů, jelikož hexasacharid je nejmenší jednotkou HA, kterou je schopna rozštěpit hovězí testikulární hyaluronidasa (BTH) [31] a hyaluronidasa ze slin pijavic [32]. U lyas ze *Streptococcus pneumoniae* (naše pozorování) a chondroitinasy AC I [33] je nejmenším substrátem trisacharid HA, u lyasy ze *Streptomyces hyalurolyticus* pak heptasacharid HA [33].

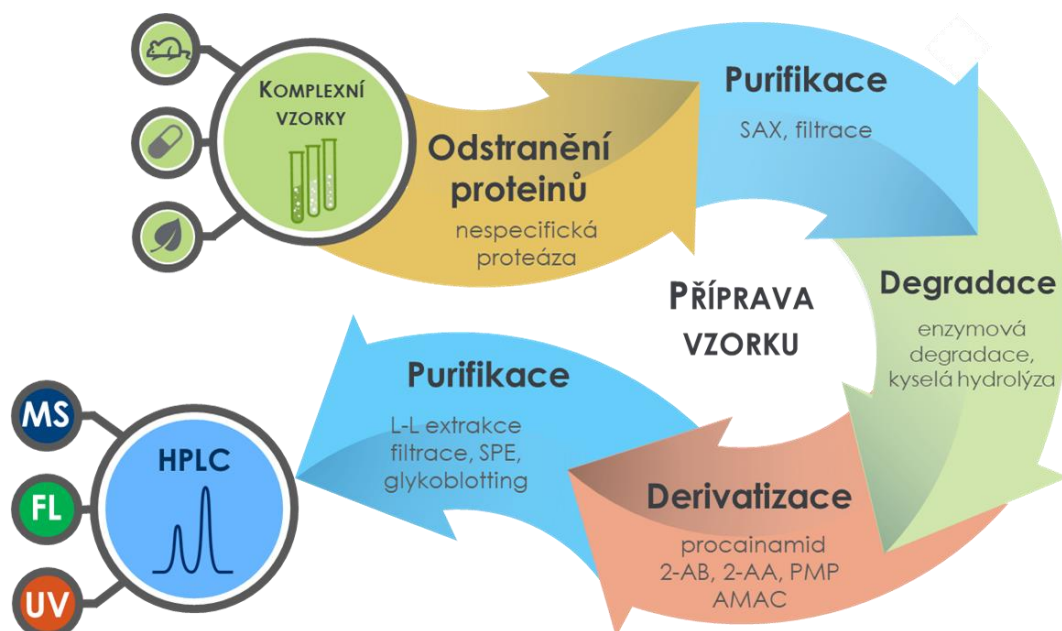
2.2.1.1 Příprava vzorku pro chromatografickou analýzu hyaluronanu

Pro kvantifikaci HA v biologických vzorcích se složitou maticí, obsahujících velké množství proteinů, lipidů a dalších složek, je určité přečištění vzorku nezbytné. Pro přípravu vzorku pro analýzu HA a jiných GAG existuje celá řada postupů. Na Obr. 3 je vyznačeno obecné schéma charakterizující jejich nejdůležitější kroky. Kromě základních kroků, které zahrnují odstranění proteinů, depolymerizaci HA, derivatizaci vzniklých oligosacharidů, obsahují některé postupy i další procedury, jako extrakci lipidů či odstranění nezreagovaného reakčního činidla, vše s cílem co nejvíce přečistit HA před samotnou chromatografickou analýzou [34].

Ačkoliv není HA na rozdíl od ostatních GAG kovalentně vázaný na proteiny, mohou proteiny s HA nekovalentně interagovat. Z tohoto důvodu je při přípravě vzorku prvním krokem odstranění proteinů, přičemž nejvyužívanějším postupem je jejich degradace nespecifickými proteasami: papainem [35] nebo aktinasou E [1,36,37]. Přerušování nekovalentních interakcí HA-

protein je zvláště důležité při analýze hydrofobizovaných derivátů HA, kde je jejich síla největší. [38]. Odstranění proteinů digescí proteasami je však i při vysokých koncentracích enzymů (~5 mg/ml) a dlouhých inkubačních časech (20 h) pouze částečné a je dosahováno účinnosti kolem 70 % [39].

Po degradaci proteinů může následovat přečištění vzorku pomocí několika metod. Pro odstranění jiných GAG může být využito srážecí reakce se cetyltrimethylamonium bromidem (CTAB) nebo cetylpyridinium chloridem [40]. HA má oproti CS, KS, HS a DS nižší negativní náboj, což umožňuje selektivně srážet sulfátované GAG pomocí CTAB v roztoku s nízkou koncentrací solí a nízkou iontovou silou a HA udržet v roztoku [41]. Nevýhodou takového postupu je negativní vliv CTAB na LC-MS analýzu, kdy může docházet k iontové supresi oligosacharidů HA. Nižší negativní náboj HA oproti ostatním GAG lze využít i při purifikaci HA pomocí kolonek se silným anexem, kdy při eluci mobilní fází s nízkou iontovou silou je HA eluován jako první a další GAG zůstávají zadržovány na koloně. Výtěžnost tohoto postupu se pohybovala v rozmezí 72–93 % [39]. HA může být dále separován od nízkomolekulárních látek pomocí membránové filtrace. Výtěžnost tohoto postupu může být pro HA vysoká, jelikož membránová filtrace CS filtrem zadržujícím molekuly s M_w vyšší než 10 kDa dosahovala 92–99 % [36]. Membránová filtrace může být rovněž použita až po depolymerizaci HA. Ze vzorku jsou pak odstraněny vysokomolekulární kontaminanty spolu s degradačními enzymy a oligosacharidy HA zůstávají ve filtrátu. Oligosacharidy HA mohou být podobně jako proteoglykany přečištěny pomocí extrakce na pevné fázi s využitím sorbentů pro hydrofilní interakční chromatografii (HILIC) nebo sorbentů na bázi porézního grafitického uhlíku (PGC) [42]. Další možností je využití glycoblottingu, kdy jsou disacharidy GAG selektivně vázány na sorbent s hydrazinovými skupinami [43]. Publikovaná výtěžnost tohoto postupu dosahovala pro glykany až 92,5 % [44].

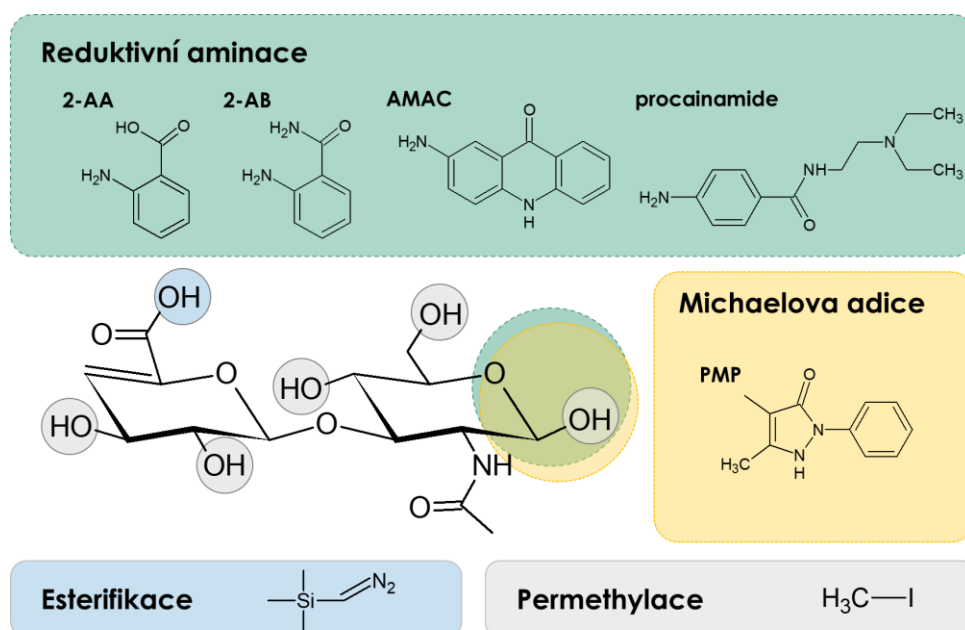


Obr. 3 Schéma přípravy vzorku pro kvantifikaci HA v komplexní matici pomocí chromatografických metod. 2-aminobenzamid (2-AB); kyselina anthranilová (2-AA); 1-fenyl-3-methyl-5-pyrazolon (PMP); 2-aminoakridon (AMAC))

2.2.1.2 Analytická derivatizace oligosacharidů

Derivatizace oHA, které vzniknou depolymerizací HA, napomáhá zlepšit jejich retenci v systému RPLC a umožňuje detekci pomocí UV/Vis nebo fluorescenčního detektoru, případně zvyšuje ionizovatelnost oHA při MS detekci [45]. Nejstaršími technikami derivatizace oHA jsou permethylace hydroxylových skupin a esterifikace karboxylové skupiny na GlcA (Obr. 4). Jelikož oHA nabízí hned několik míst pro derivatizační reakci, je produktem takovýchto derivatizačních reakcí směs různě derivatizovaných oligosacharidů, což může komplikovat kvantifikaci HA a vyhodnocení chromatografického nebo elektroforetického záznamu. Z tohoto hlediska představují derivatizační reakce na redukujícím konci výhodnější postup, jelikož k reakci dochází pouze na jednom místě v molekule oHA. Mechanismus těchto reakcí probíhá skrze redukivní aminaci (za použití kyseliny anthranilové (2-AA), 2-aminobenzamidu (2-AB), 2-aminoakridonu (AMAC) nebo prokainamidu) nebo Michaelovy adice za použití 1-fenyl-3-methyl-5-pyrazolonu (PMP). Během redukivní aminace tvoří reaktivní aldehydová skupina na redukujícím konci oHA s aminoskupinou derivatizačního činidla Schiffovu bázi, která je následně kyanoborohydridem sodným nebo 2-pikolinem redukována na sekundární amin. Pro dosažení vysokého výtěžku probíhá reakce za zvýšené teploty v bezvodém a kyselém prostředí v methanolu [46] nebo dimethylsulfoxidu [47,48]. Pokud je derivatizační činidlo 2-AB nebo AMAC přidáno v 50–100 násobném přebytku je výtěžek derivatizační

reakce téměř stoprocentní [43,49]. Derivatizace PMP, reagující skrze Michaelovu adici, probíhá naproti tomu ve vodném prostředí za bazického pH, kdy jsou na jednu molekulu oHA navázány dvě molekuly PMP. Výtěžek této reakce se rovněž blíží sto procentům. PMP na rozdíl od ostatních uvedených činidel neumožňuje fluorimetrickou detekci, ale silně absorbuje UV záření s vlnovou délkou 245 nm. Derivatizace pomocí PMP nebo AMAC jsou vhodné pro následnou separaci oHA na reverzních fázích (RPLC), jelikož tyto derivatizační reakce značně zvyšují hydrofobicitu oHA. Derivatizace oHA pomocí 2-AA nebo 2-AB se používá jak pro RPLC, tak pro HILIC. oHA derivatizované prokainamidem jsou separovány pouze na HILIC kolonách, jelikož polární povaha prokainamidu nezaručuje retenci na reverzních fázích [50].



Obr. 4 Analytická derivatizace nenasyceného disacharidu HA.

Porovnání jednotlivých derivatizačních reakcí a od nich odvozených kvantitativních metod z hlediska mezi detekce a kvantifikace je problematické, jelikož publikované metody nejsou validovány stejným způsobem. Ilustrativní přehled několika metod uvedených v Tab. tak dovoluje pouze omezené porovnání mezi detekce, popř. stanovitelností jednotlivých metod. Pomocí LC-MS s ionizací nativních disacharidů HA elektrosprejem v negativním módu bylo dosaženo limitu kvantifikace 300 ng ml^{-1} při analýze vzorků plasmy [51]. Reduktivní aminace zvyšuje ionizační účinnost v pozitivním módu a umožňuje fluorimetrickou detekci, což ve výsledku vede ke snížení meze detekce. Kvantifikace disacharidů GAG derivatizovaných AMAC, separovaných pomocí kapilární elektroforézy a detekovaných pomocí fluorescence, dosahovala přibližně 100krát nižšího limitu detekce (LOD) v porovnání s UV detekcí

nederivatizovaných GAG disacharidů při vlnové délce 232 nm [49]. Prokainamid vykazuje v porovnání s AMAC a 2-AB ještě vyšší účinnosti ionizace a intenzity fluorescence derivatizovaných oligosacharidů. Stanovení disacharidů derivatizovaných prokainamidem pomocí HILIC-MS s ESI v pozitivním módu dosahovalo 30krát nižších LOD v porovnání s analýzou disacharidů derivatizovaných AMAC, separovaných na RPLC a ionizovaných ESI v negativním módu [47]. Je však potřeba zmínit, že pozorovaný rozdíl v LOD nemusí být způsoben pouze rozdílnou účinností ionizace disacharidů, ale rovněž i způsobem chromatografické separace (HILIC vs. RPLC) a matricovými efekty. Třicetinásobný rozdíl v hodnotách LOD byl pozorován pro deriváty prokainamidu a 2-AB při fluorimetrické a ESI-MS detekci v pozitivním módu [52]. Ačkoliv deriváty prokainamidu vykazují nejvyšší ionizační účinnost, činidlo zatím nebylo využito ke stanovení HA. Bylo pouze publikováno stanovení HS, kde autoři určili velmi nízké LOD < 0,6 ng ml⁻¹ [47]. Nejnižší mez detekce při stanovení HA vykazovala metoda pro disacharidy derivatizované pomocí AMAC detekované pomocí MS [53] a pomocí fluorescenční detekce [54]. LOD pro obě metody dosahovalo shodně 0,1 ng. Metoda derivatizace PMP ve spojení s LC-MS k výraznému zvýšení ionizace a snížení LOD nevedla, LOD pro tento postup dosahuje stejně jako v případě LC-MS analýzy nativních disacharidů ~100 ng ml⁻¹ [55].

Reduktivní aminace obecně zajišťuje nižší LOD avšak za cenu náročnější a delší přípravy vzorku. Reakční čas degradace používaný i u ostatních postupů se obvykle pohybuje kolem čtyř hodin. Před samotnou derivatizací je však potřeba zařadit časově náročný krok, vysušení vzorků a rozpouštění v organickém rozpouštědle. K tomu je třeba rovněž připočítat nutnost pracovat s nebezpečnými látkami a nutnost dalšího purifikačního kroku (kapalinové extrakce nebo SPE), kdy je nutné odstranit ze vzorku nezreagované derivatizační činidlo.

Tab. I Výběr metod pro kvantifikaci HA.

vzorek	Množství vzorku	Derivatizační činidlo (mol/l)	Reakční prostředí	Reakční podmínky	Analytická metoda	LLOQ	LOD	ref.
léková forma	25 mg	ne	-	-	HILIC-MS	300 ng ml ⁻¹	100 ng ml ⁻¹	[51]
játra, střevo	1 g	PMP (0,3)	28% NH ₃ v MeOH	0,5 h, 70 °C	RPLC-MS	357 ng ml ⁻¹	107 ng ml ⁻¹	[55]
žaludek	250 µg	AMAC (0,1)	kys. octová/DMS	4 h, 45 °C	RPLC-FL	-	0,1 ng	[53]
játra, moč, buňky	-	AMAC (0,1)	NaCNBH ₃ (1 mol/l)	4 h, 45 °C	RPLC-MS	-	0,1 ng	[54]

Při kvantitativní a strukturální analýze chemicky modifikovaného HA není derivatizace obvyklá, jelikož deriváty HA jsou ze své podstaty hydrofobnější a bývají separovány RPLC [56], gelovou permeační chromatografií (SEC) [57] nebo na PGC [58].

2.2.2 Degradace hyaluronanu

Přestože MS detekce byla použita i pro fragmenty HA s M_w přesahující 40 kDa [59] a jsou publikovány metody přímého stanovení HA pomocí LC-UV [60], vysoká M_w a vysoká polydisperzita HA znemožňují přímé stanovení HA pomocí LC-MS. Kompletní depolymerizace HA na disacharidové jednotky je využívána pro kvantitativní analýzu HA, zatímco parciální degradace HA na delší oligosacharidy je vhodná pro strukturální analýzu derivátů HA. Metod, jak degradovat HA je mnoho, ale pouze degradační procesy, které jsou opakovatelné a tvořící oligosacharidy se stupněm polymerizace (DP) 2-20, jsou použitelné pro LC a MS analýzu HA a jeho derivátů

2.2.2.1 Enzymatická degradace

Hyaluronidasy označují skupinu enzymů, které jsou schopny depolymerizovat HA. Enzymy se rozdělují do tří skupin podle mechanismu depolymerizace a povahy konečných produktů. První skupinou jsou hyaluronan 4-glykanohydrolasy (EC 3,2,1,35), druhou skupinou hyaluronan 3-glykanohydrolasy (hyaluronidasy produkované pijavicemi, EC 3,2,1,36) následované bakteriálními hyaluronan lyasami (EC 4,2,2,1) [61]. U savců jsou nejdůležitějšími hyaluronidasami Hyal 1 a 2. Hyal 2 degraduje nativní HA na fragmenty dlouhé přibližně 50 disacharidových jednotek. Hyal 1 pak štěpí HA jakékoliv M_w na tetrasacharidy [62]. Analytické využití těchto enzymů je však problematické, jelikož jsou v organismu zastoupeny v nízkých koncentracích a jejich extrakce a purifikace z živočišných tkání je obtížná [63]. Ze savčích hyaluronidas je nejpoužívanějším enzymem hovězí testikulární hyaluronidasa (BTH), která je komerčně dostupná. BTH štěpí hydrolyticky glykosidickou vazbu $\beta(1\rightarrow4)$ za vzniku sudých oligosacharidů s GlcA na neredukujícím konci. Konečnými produkty degradace jsou tetra- a hexasacharidy. Kromě hydrolytické funkce vykazuje BTH i transglykosilační funkci, kdy se při depolymerizaci tvoří jako meziprodukt disacharid, který je následně přenesen a navázán na neredukující konec dalšího řetězce HA. Aktivita BTH je inhibována CS a DS [31] a chemicky sulfatovaným HA [64]. Substrátová specifita BTH však není úplná a také sulfatované GAG (HA, CS a DS) jsou do určité míry depolymerizovány, přičemž účinnost depolymerizace klesá se vzrůstajícím stupněm sulfatace [64]. Jako inhibitory BTH figurují látky různé chemické podstaty, jedná se o GAG, proteiny, polysacharidy, mastné kyseliny,

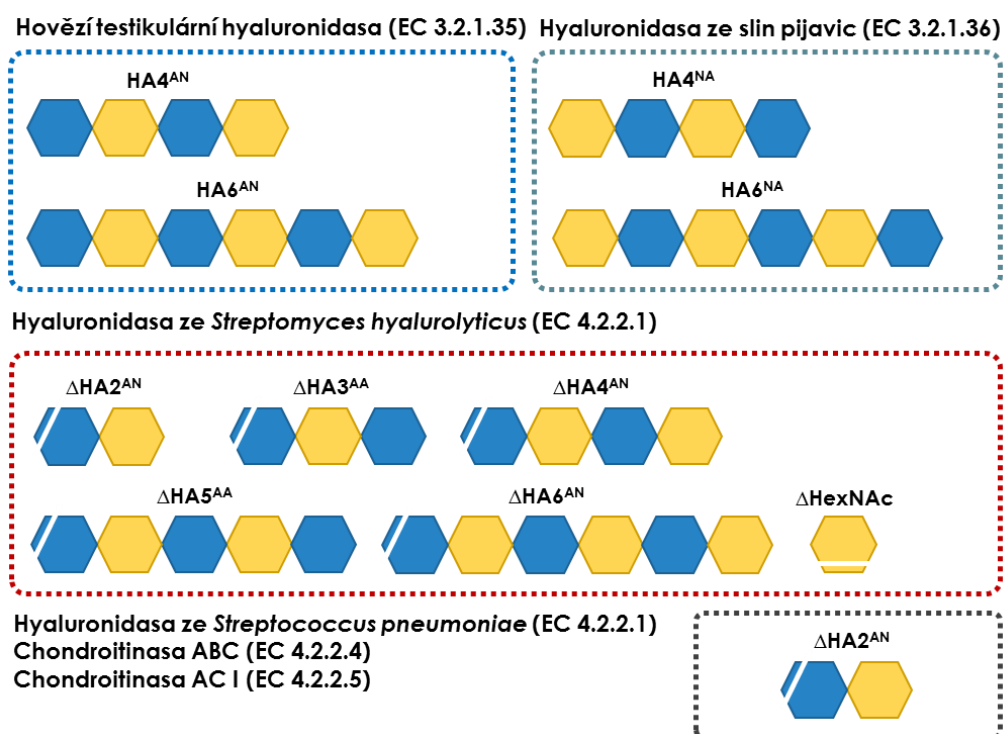
antibiotika, syntetické organické molekuly, lanostanoidy, polyfenoly, flavonoidy, terpenoidy a další [65].

Hyaluronidasy produkované pijavicemi (LHase) štěpí glykosidickou vazbu $\beta(1\rightarrow3)$ mezi GlcA a GlcNAc za vzniku sudých oligosacharidů HA s GlcNAc na neredukujícím konci. Konečnými produkty depolymerizace HA jsou tetra- a hexasacharid [66]. Na rozdíl od BTH LHase nevykazuje transglykosilační aktivitu a nedegraduje CS. Depolymerizace kombinovaným působením BTH a LHase umožňuje přípravu široké palety oHA včetně lichých oHA [32]. Využití LHase pro strukturní a kvantitativní analýzu HA však dosud nebylo publikováno. Širší využití LHase komplikuje fakt, že enzym není zatím komerčně dostupný, nicméně již byl identifikován a amplifikován gen zodpovídající za syntézu tohoto enzymu, což může v příštích letech vést k velkoobjemové produkci a komerční dostupnosti enzymu [67].

Ačkoliv byly bakteriální lyasy izolovány z velkého množství druhů bakterií včetně *Clostridium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Streptococcus* and *Streptomyces* [61] pouze lyasy získané z *Flavobacterium*, *Streptomyces* and *Streptococcus* jsou komerčně dostupné a používány pro analýzu HA. Bakteriální lyasy degradují HA β -eliminací, přičemž vznikají převážně sudé oligosacharidy s dvojnou vazbou mezi C4 a C5 na GlcA na neredukujícím konci. Jediným produktem degradace HA lyasou ze *Streptococcus pneumoniae* (SpHyl) jsou nenasycené disacharidy. Enzym se nejprve náhodně naváže na řetězec HA, který v místě navázání rozštěpí na dva fragmenty. Jeden z těchto fragmentů zůstává navázaný na enzym a dochází k postupné depolymerizaci fragmentu po disacharidech od redukujícího k neredukujícímu konci [68]. Katalytická aktivita enzymu SpHyl je velmi vysoká. Za minutu naštěpí stejné množství HA jako BTH za 24 hodin [41]. Hlavním substrátem pro SpHyl je nativní HA, avšak enzym je schopen degradovat i deriváty CS [69], acylovaný HA [70] a HA s kovalentně připojeným peptidem [56]. Jediným enzymem, který štěpí pouze HA, je HA lyasa ze *Streptomyces hyalurolyticus*. Tento enzym štěpí obě glykosidické vazby $\beta(1\rightarrow4)$ a $\beta(1\rightarrow3)$ za vzniku lichých a sudých oHA, které jsou produkovány v přibližně stejných poměrech. Dalším produktem depolymerizace je nenasycený GlcNAc - Δ HexNAc (2-acetamido-2,3-di-deoxy- β -erythro-hex-2-enopyranose) [33].

HA může být rovněž depolymerizován enzymy, pro které není primárním substrátem, jako jsou chondroitinasa AC (EC 4,2,2,5) a ABC (EC 4,2,2,4), které primárně degradují CS na nenasycené disacharidy CS. Vzhledem k rozšířené substrátové specifitě jsou tyto enzymy hojně využívány pro strukturní analýzu derivátů HA a CS [57,58,71]. Konečné produkty depolymerizace modifikovaného HA jsou často odlišné od produktů degradace nativního HA.

Enzymy nejsou často schopny rozeznat a štěpit řetězec HA v místě modifikace. Produkty depolymerizace jsou tak delší oHA, než tomu je při štěpení nativního HA [57]. V případě degradace HA modifikovaného 4-dibutandiol di-(propan-2,3-dioly) etherem (BDPE) chondroitinázou ABC jsou produkovány tetrasacharidy substituované na C4 hydroxyly na GlcNAc na redukujícím konci namísto disacharidů [72]. Hlavní produkty depolymerizace popisovaných hyaluronidas jsou uvedeny na Obr. 5.



Obr. 5 Přehled enzymů degradujících HA s přehledem konečných produktů depolymerizace HA. Oligosacharidy HA jsou označeny podle názvosloví navrženého [73], kde číslo oligosacharidu určuje počet monosacharidů, glukuronidová kyselina (A, modře), *N*-acetylglukosamin (N, žlutě). Bílá linka a Δ značí přítomnost dvojně vazby na kyselině glukuronové na nerdukujícím konci oligosacharidu.

2.2.2.2 Neenzymatická degradace

Při alkalické hydrolyze HA je z redukujícího konce odštěpen GlcNAc a vznikají fragmenty s GlcA na tomto konci. Dalšími produkty alkalické hydrolyzy jsou monosacharidy odvozené od GlcNAc s dvojnou vazbou mezi C2 a C3 nebo C3 a C4 [73]. Při kyselé degradaci HA vznikají sudé a liché oligosacharidy, saturevané a deacetylované mono- a oligosacharidy a řada nízkomolekulárních vedlejších produktů [74,75]. V závislosti na koncentraci kyseliny je štěpena buď $\beta(1\rightarrow3)$, nebo $\beta(1\rightarrow4)$ glykosidická vazba. Hydrolyza HA kyselinou o koncentraci $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ produkuje liché oligosacharidy s GlcA na nerdukujícím konci, zatímco hydrolyza s kyselinou o koncentraci 1 mol l^{-1} produkuje sudé oligosacharidy

s GlcNAc na redukujícím konci [76]. Hydrolýza HA pomocí HCl, H₂SO₄ nebo kyselinou trifluoroctovou ($\geq 1 \text{ mol l}^{-1}$) poskytuje nasycené disacharidy s GlcA na neredukujícím konci s vysokým výtěžkem, což umožňuje využití tohoto depolymerizačního postupu při kvantifikaci HA [55,77]. Kyselá hydrolýza může probíhat kromě vodného roztoku v prostředí alkoholů (methanol, ethanol, butanol), kdy vznikají alkylované disacharidy, které vykazují vyšší retenci na RPLC než nativní disacharidy [78,79].

Neenzymatická degradace obecně nebývá využita pro strukturní analýzu derivátů HA. Výjimkou je degradace HA kyselinou dusitou, která slouží ke strukturní analýze částečně deacetylovaného HA nebo HA sulfatovaného na amidové skupině GlcNAc. Při pH 4 kyselina dusitá štěpí selektivně glykosidickou vazbu mezi GlcA a deacetylovaným GlcNAc. Při pH 3 štěpí glykosidickou vazbu mezi GlcA a deacetylovaným GlcNAc i *N*-sulfatovaným glukosaminem. Při reakci vznikají sudé oligosacharidy s anhydromanosou na redukujícím konci [23,80].

Pro kvantitativní analýzu HA se využívá pouze kyselá hydrolýza. Alkalická hydrolýza nachází uplatnění zejména při výrobě různých typů oHA a jsou při ní produkovány složitější směsi oligosacharidů (liché, sudé). Naproti tomu kyselá hydrolýza HA (s vysokou koncentrací kyseliny) produkuje jednodušší směs oligosacharidů, kde dominují především disacharidy. Kyselá hydrolýza tak představuje efektivní a levný způsob depolymerizace HA, který není ovlivněn žádnými inhibitory a depolymerizuje všechny GAG v jednom kroku [81]. Na druhou stranu, je-li ve vzorku přítomno více GAG, vzniká kyselou degradací směs epimerních HA, CS a HS disacharidů, které je nutné při vlastní analýze od sebe separovat.

2.2.3 Metody kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostně spektrometrickou detekcí

Pro chromatografickou analýzu HA bylo popsáno mnoho metod využívajících RPLC, PGC, HILIC, SEC a iontově výměnné chromatografie [82]. Rovněž byla publikována řada metod pro analýzu jiných GAG nebo *N*- a *O*-glykanů [83], které potenciálně mohou být použity k chromatografické analýze HA. Cílem chromatografických analýz HA je separace různě dlouhých oHA případně různě modifikovaných oligosacharidů. oHA existují ve dvou konformacích, α nebo β anomeru v závislosti na tom, zda je monosacharid na redukujícím konci v otevřené nebo uzavřené konformaci. Kvůli tomuto jevu jsou v chromatografických záznamech oHA obvykle pozorovány rozdvojené píky [58]. Rozdvojování píků se může zamezit buď redukcí oHA na příslušné alditoly [84], bazickým pH mobilní fáze nebo vysokou

teplotou na koloně [85]. Přehled publikovaných LC-MS metod analýzy HA nebo LC metod kompatibilních s MS a potenciálně použitelných pro LC-MS analýzu HA je uveden v Tab. II.

2.2.3.1 Chromatografie na reverzních fázích

oHA jsou vysoce polární molekuly a jejich retence na nepolárních stacionárních fázích je nízká [86]. Částečné separace oHA s *DP* 4–10 bylo dosaženo na koloně s ethylovaným silikagelem [87]. Další RPLC metoda udává separaci oHA s *DP* 2–8 na stacionární fázi C12 za kyselého pH mobilní fáze [88]. Modifikace konvenčních alkylovaných fází dalšími ionizovatelnými funkčními skupinami umožňuje separovat polární oHA nejen dle hydrofobicity, ale rovněž s využitím retence na základě iontově výměnné chromatografie. Příkladem takové separace může být separace na koloně Waters XSelect CSH C18, která se při $\text{pH} < 6$ chová jako slabý anex [89] a umožňuje separovat sudé a liché oHA s *DP* 2–10 [32]. Separace disacharidů odvozených od různých GAG na RPLC probíhá úspěšně pouze po derivatizaci pomocí AMAC nebo PMP, jež zásadně zvýší jejich hydrofobicitu. Všechny 17 disacharidů GAG bylo separováno na stacionární fázi C18 při použití octanu amonného a methanolu jako složek mobilní fáze. Methanol vykazoval lepší eluční charakteristiky než méně polární acetonitril. Při neutrálním pH (6,8) jsou disacharidy odvozené od sulfatovaných GAG a modifikované pomocí AMAC eluovány podle počtu navázaných skupin, kdy jsou nejdříve eluovány disacharidy se třemi skupinami a jako poslední jsou eluovány nesulfatované disacharidy včetně disacharidů HA [54]. Pro zvýšení separační účinnosti RPLC lze do mobilní fáze přidat ion-párová činidla jako např. tributylamonium a dosáhnout separace oHA s *DP* až 40 na C18 koloně [90]. Nevýhodou ion-párových činidel je, že při MS detekci mohou potlačovat ionizaci oHA v pozitivním módu a v negativním módu tvořit adukty s oHA (komplexy s alkylamoniem) a komplikovat tak ionizaci a vyhodnocení signálů. Přidáním octanu do mobilní fáze lze negativní vliv ion-párových činidel při MS detekci do určité míry eliminovat a zároveň zachovat ion-párovou funkci při chromatografické separaci [91].

2.2.3.2 Separace na stacionárních fázích na bázi porézního grafitického uhlíku

Podobně jako při separaci na reverzních fázích je retence analytů na stacionární fázi porézního grafitického uhlíku řízena hydrofobicitou analytů, kromě toho však zahrnuje retenční mechanismus polární a iontové interakce. Retence oHA na PGC kolonách vzrůstá s rostoucí délkou řetězce HA a vyšším počtem karboxylových skupin [82,84]. Pomocí PGC lze bez jakékoliv derivatizace separovat isomerní nenasycené disacharidy AN odvozené od CS a HA [37], které se liší přítomností GlcNAc nebo GalNAc na redukujícím konci, a disacharidy

odvozené od HA a HS, které se liší pozicí glykosidické vazby mezi GlcA a GlcNAc [92]. Retence oHA na PGC kolonách klesá s rostoucím pH a iontovou silou mobilní fáze. Při nízkém pH a nízké iontové síle eluentu (0,1% kyselina mravenčí) jsou oHA s *DP* vyšším než 6 silně zadržovány na koloně a nejsou vymývány ani při použití vysokých koncentrací acetonitrilu [93]. Mobilní fáze s nízkým pH a nízkou iontovou silou byly s úspěchem použity pro analýzu krátkých oHA a chemicky modifikovaných oHA s *DP* 2–4 [58]. Naproti tomu bazické pH a vyšší koncentrace pufrů v mobilní fázi jsou vhodné pro separaci delších oHA s *DP* 4–8 [93]. Pokud je použita kapilární PGC kolona ve spojení s ESI může docházet k polarizaci stacionární fáze a úplné retenci oHA a dalších kyselých analytů. K elektrické polarizaci PGC dochází i při použití nevodivé spojky z polyether ether ketonu, která je předřazena ESI. Jedinou možností, jak elektrosorpci zabránit je uzemnění kolony [93].

2.2.3.3 Hydrofilní interakční chromatografie

Mechanismus retence na HILIC kolonách je založen na hydrofilních interakcích, z tohoto důvodu je tato technika vhodná pro separace různých polárních látek včetně oHA. Chemie stacionárních fází pro HILIC zahrnuje mnoho funkčních skupin navázaných na silikagel. Separace nativních oHA byla popsána pro stacionární fáze modifikované amidem [66], diolem [77] i tzv. zwitterionové stacionární fáze [43]. Na zwitterionové stacionární fázi bylo dosaženo separace všech 17ti disacharidů odvozených od GAG [43]. Na diolové koloně bylo při nízké koncentraci pufru (5 and 20 mmol l⁻¹) v mobilní fázi a kyselém pH dosaženo separace oHA s *DP* až 16 [77]. Pořadí eluce disacharidů GAG je u HILIC opačné než u RPLC, nejprve jsou eluovány nesulfatované disacharidy včetně těch odvozených od HA, poté jednou a dvakrát sulfatované disacharidy a až v poslední řadě disacharidy se třemi sulfo skupinami [43]. GAG disacharidy mohou být rovněž separovány za podmínek kombinujících HILIC a iontově výměnou chromatografii při použití stacionárních fází s vázanou amino skupinou, která funguje jako slabý anex. Disacharidy s nízkým negativním nábojem jsou z kolony vymývány dříve než sulfatované disacharidy nesoucí silnější negativní náboj. Pro správnou separaci sulfatovaných disacharidů je potřeba optimalizovat složení mobilní fáze, jelikož příliš nízká (10–40 mmol l⁻¹) ani příliš vysoká (80 mmol l⁻¹) koncentrace pufru nezaručí úplnou eluci sulfatovaných disacharidů z analytické kolony [94]. Amino skupiny přítomné v některých GAG disacharidech jsou při pH 4,4 protonovány a dochází k elektrostatické repulzi s kladně nabitými amino skupinami stacionární fáze. Na HILIC/anexové stacionární fázi byly separovány deacetylované, *N*-acetylované a *N*-sulfatované GAG disacharidy [95].

2.2.3.4 Gelová permeační chromatografie

SEC je nejčastěji používána pro stanovení distribuce M_w HA [96], a to obvykle s UV, refraktometrickým a především MALLS (multi-angle laser light scattering) detektorem. Pro MS detekci není konvenční SEC příliš vhodná z důvodu vysokého průtoku mobilní fáze a vysoké koncentrace netěkavých solí v mobilní fázi. Naproti tomu při využití vysokoúčinných SEC kolon a přidavku těkavých solí v mobilní fázi lze MS detekce využít. Krátké vysokoúčinné SEC kolony nedosahují při separaci vysokomolekulárního HA účinnosti konvenčních dlouhých kolon a nejsou vhodné pro přesné stanovení distribuce M_w , [86]. Avšak vysokoúčinné SEC kolony mohou být využity pro separaci nízkomolekulárních fragmentů HA. Při isokratické eluci roztokem octanu amonného s dvaceti procenty methanolu byly separovány fragmenty HA od monosacharidů až po dodekasacharid [33]. Pomocí SEC byly separovány oHA s DP 2–16, které byly zesítěné nebo modifikované jednou nebo více funkčními skupinami [57,97]. oHA jsou v SEC separovány podle hydrodynamického průměru. Z tohoto důvodu jsou oHA z kolony eluovány v opačném pořadí (od nejvyššího DP po nejnižší), než je tomu v případě RPLC a u HILIC s kyselou mobilní fází [33,77,88].

Tab. II Přehled LC-MS metod analýzy HA a LC metod potenciálně použitelných pro LC-MS analýzu oHA. [98]

kolona a průtok mobilní fáze	mobilní fáze	pH	vzorky	příprava vzorku	derivatizace	detekce	oligosacharidy	doba analýzy	separace na základní linii	ref.
<i>Chromatografie na reverzních fázích</i>										
Nucleosil 100-7, C ₂ , Macherey-Nagel, 7 µm, 2×250 mm (0,2 ml min ⁻¹)	2,5% tetrahydrofuran v methanol isokraticky	-	hydrogel, krém	srážení MeOH/H ₂ O (80:20), degradace lyasou ze <i>Streptococcus agalactiae</i>	ne	ESI-MS (-)	oHA, DP 2-8	8 min	ne	[87]
Jupiter Proteo 90 Å, C ₁₂ , Phenomenex, 4 µm, 4,6×250 mm (0,5 ml min ⁻¹)	gradient 0,1% kys. mravenčí ve vodě a acetonitrilu	kyselé	standardy	-	ne	ESI-MS (-)	redukované oHA, DP 2-6	45 min	ano	[88]
XSelect CSH C18, Waters, 1,7 µm, 2,1×50 mm; (0,3 ml min ⁻¹)	gradient 100 mmol/l mravenčanu amonného a methanolu	-	HA hydrolyzovaná LHase a BTH	-	ne	ESI-MS (-)	sudé a liché oHA, DP 2-10	10 min	ano, pro sudé oHA	[32]
Acquity BEH C ₄ , Waters, 1,7 µm, 2,1×150 mm (0,4 ml min ⁻¹)	gradient 0,1% kys. mravenčí ve vodě a acetonitrilu	kyselé	HMW standardy	degradace SpHyl	ne	ESI-MS (-)	peptidem-modifikované disacharidy HA	20 min	ano	[56]
Gemini C ₁₈ 110 Å, Phenomenex, 3 µm, 4,6×150 mm (0,3 ml min ⁻¹)	gradient vody a acetonitrilu s 15 mmol/l tributylammoniem a 50 mmol/l octanem amonným v obou eluentech	7,0	standardy	degradace BTH	ne	ESI-MS (-)	oHA, DP 2-40	90 min	ano	[90]
Acquity UPLC BEH C ₁₈ , Waters, 1,7 µm, 2,1×150 mm (0,15 ml min ⁻¹)	gradient 80 mmol/l octanu amonného a methanolu	6,8	bunečné kultury, játra, moč	přečištění silným anexem, degradace proteinů, degradace heparinázou a chondroitinázou	AMAC	UV	HS, HP, CS, DS, HA disacharidy	60 min	ano	[54]
Jupiter Proteo 90 Å, C ₁₂ , Phenomenex, 4 µm, 4,6×250 mm (1,0 ml min ⁻¹)	gradient 10 mmol/l octanu amonného a acetonitrilu	5,0	standardy	hydrolyza kys. dusitou, extrakce chloroformem	PMP	UV	GlcA, oHA 3-21	35 min	ano	[23]

Hypersil GOLD C ₁₈ , Thermo, 5 µm, 2,1×150 mm (0,5 ml min ⁻¹)	20 mmol/l octan amonný s acetonitrilem (81:19) isokraticky	kyselé	rybí játra a střeva	odstranění lipidů, degradace proteinů, hydrolyzáza kys. trifluoroctovou	PMP	ESI-MS (+)	disacharidy z CS, HA a sulfatovaného polysacharidu získaného z mušlí	~7 min	ano	[55]
Zorbax Eclipse XDB-C ₁₈ , Agilent, 4,6×150 mm (1 ml min ⁻¹)	gradient 100 mmol/l octanu amonného a acetonitrilu	kyselé	erythrocyty	degradace chondroitinázou, papírová chromatografie	2-AB	FL	CS, DS disacharidy	~22 min	ano	[99]

Chromatografie se sorbentem na bázi porézního grafitického uhlíku

Hypercarb, Thermo, 5 µm 0,32×100 mm (4-7 ml min ⁻¹)	gradient 20 mmol/l hydrogenuhlčitanu amonného a acetonitrilu	bazické	synoviální tekutina	degradace BTH digestion, odsolení na kolonkách Carbograph	ne	ESI-MS (-)	oHA, DP 4,6 (KS, HS oligosacharidy)	40 min	ano	[84]
Hypercarb, Thermo, 3 µm, 2,1×150 mm (0,15 ml min ⁻¹)	gradient 5 mmol/l hydrogenuhlčitanu amonného a acetonitrilu	11,0	prasečí chrupavka meziobratlová plotýnka	degradace proteinů, degradace HA směsí lyas zahrnujících lyasu z <i>Streptococcus dysgalactiae</i> , srážení ethanolem	ne	ESI-MS (-)	CS, HS, HA disacharidy	35 min	ano	[92]
Hypercarb, Thermo, 0,32×50 mm (8 ml min ⁻¹)	gradient 5 mmol/l kys. octové nebo 10 mmol/l hydrogenuhlčitanu amonného nebo 65 mmol/l mravenčanu amonného a acetonitrilu	3,0 8,0 9,0	standardy	-	ne	ESI-MS (-)	oHA, DP 4-8	55 min	ano	[93]
Hypercarb, Thermo, 3 µm, 4,6×100 mm (0,15 ml min ⁻¹)	gradient vody a acetonitrilu s 0,05 nebo 0,1% kys. trifluoroctovou	kyselé	standardy	degradace chondroitinázou, purifikace SEC	ne	ESI-MS (-)	BDPE- modifikované oHA, DP 2,4	~60 min	ano	[58]
Hypercarb S, Shandon, 7 µm, 4,6×100 mm (0,5 ml min ⁻¹)	gradient 0,05% kys. trifluoroctové ve vodě a acetonitrilu	kyselé	standardy glycoproteinů	degykosilace, srážení ethanolem, purifikace na katexu	2-AB	UV	CS disacharidy	~21 min	ne	[100]

Hydrofilní interakční chromatografie

TSKgel Amide-80, Tosoh Corporation, 3 µm, 2×150 mm (0,2 ml min ⁻¹)	10 mmol/l octanu amonného obsahujícím 0,05% kyseliny mravenčí isokraticky s acetonitrilem (25:75)	kyselé	lékové formy	hydrolyzáza kys. trifluoroctovou	ne	ESI-MS (+)	disacharidy z CS, HA a sulfatovaného polysacharidu získaného z mušlí	~20 min	ne	[51]
--	---	--------	--------------	-------------------------------------	----	------------	---	------------	----	------

Acquity UPLC BEH Amide, 1,7 μm , 2,1 \times 100 mm (0,3 ml min ⁻¹)	gradient 100mmol/l mravenčanu amonného and acetonitrile	-	HA hydrolyzovaný LHase	-	ne	ESI-MS (-)	oHA, DP 2-8	10 min	ano	[66]
HILIC, Phenomenex, 3 μm , 2,1 \times 75 mm (0,2 ml min ⁻¹)	gradient 20 mmol/l mravenčanu amonného a acetonitrilu	2,5	léková forma a prasečí mukózní tkáň	hydrolyza kys. sírovou	ne	ESI-MS (+)	oHA, DP 2-16	~13 min	ano	[77]
SeQuant ZIC-HILIC, Merck, 3,5 μm , 2 \times 150 mm (0,2 ml min ⁻¹)	gradient 5 mmol/l octanu amonného a acetonitrilu	kyselé	buněčné kultury a králičí oko	degradace proteinů, degradace směsí lyas, srážení ethanolem a směsí CHCl ₃ /MeOH	2-AB	FL	CS, HS, DS, HA disacharidy	60 min	ano	[43]
GlycanPac AXH ⁻¹ , Thermo, 1,9 μm , 0,1 \times 100 mm, (0,6 ml min ⁻¹)	50 mmol/l mravenčan amonný a acetonitril isokraticky (80:20)	4,4	živočišné tkáně	degradace heparinázou, extrakce 0,3% hydroxidem amonným	ne	ESI-MS (-)	HS disacharidy	~20 min	ano	[94]
<i>Gelová permeační chromatografie</i>										
Acquity UPLC BEH 125 SEC, Waters, 1,7 μm , 4,6 \times 300mm (0,1 ml min ⁻¹)	50 mmol/l octan amonný a methanol isokraticky (80:20)	kyselé	standardy	degradace lyasou z <i>Streptomyces hyalurolyticus</i>	no	ESI-MS (-)	oHA, DP 1-12	~50 min	ne	[33]
Superdex Peptide GL, GE Healthcare, 13 μm , 10 \times 300 mm (0,4 ml min ⁻¹)	12 mmol/l octan amonný isokraticky, make-up eluent acetonitril/voda (4:1)	9,0	standardy	degradace chondroitinázou	no	ESI-MS (-)	oHA-BDPE, DP 2-16	~40 min	ne	[57]

2.2.4 Analýza hyaluronanu hmotnostní spektrometrií

MS je důležitým nástrojem při kvantifikaci a strukturní analýze HA a jeho derivátů. Pomocí MS lze detekovat HA ve velmi nízkých koncentracích, odlišit HA od ostatních GAG, přímo určit M_w , výrazně zlepšit přesnost SEC při stanovení M_w a dokonce zobrazit plošnou distribuci HA ve vzorku. ESI a MALDI jsou nejčastěji využívanými ionizačními technikami při MS analýze HA. Jelikož HA neobsahuje žádné nestabilní funkční skupiny, jako je např. sulfátová skupina, fukosa nebo kyselinu sialovou, lze k ionizaci disacharidů HA využít i relativně tvrdší metodu ionizace jako je FAB (fast atom bombardment) bez toho, aby došlo k fragmentaci disacharidů [101]. Naproti tomu ionizace delších oHA vyžaduje měkké podmínky ionizace, jelikož při vysokém náboji na vstupním kónusu hmotnostního spektrometru při ionizaci pomocí ESI dochází k fragmentaci oHA [102].

2.2.4.1 Analýza oligosacharidů hyaluronanu

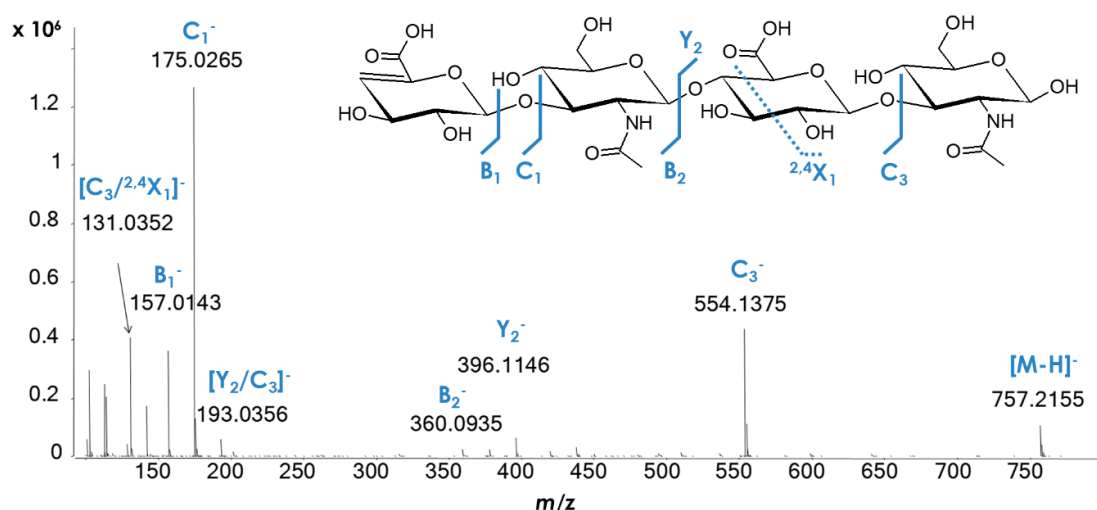
Přítomnost karboxylových skupin ve struktuře HA umožňuje tvorbu deprotonovaných molekul při ionizaci pomocí ESI. Krátké oHA s DP 2–5 tvoří především jednou a dvakrát nabitě anionty, delší oHA s DP 11–16 tvoří hlavně anionty s pěti a šesti deprotonovanými karboxylovými skupinami [103]. Dlouhé oHA s GlcNAc na redukujícím konci nejsou při ionizaci příliš stabilní a dochází k odštěpení GlcNAc z redukujícího konce [102,104]. Kvadrupólové analyzátory dokáží rozlišit oHA pouze do DP 24 [102], jelikož signály několikanásobně nabitých oHA se překrývají a pro rozlišení větších molekul je potřeba použít analyzátor s vyšší rozlišovací schopností. Tvorba vícenásobně nabitých iontů může být redukována specializovaným iontovým zdrojem se dvěma ESI kapilárami využívajícím iontových interakcí v plynné fázi. První ESI kapilára pracuje v záporném módu a proudí jí vzorek oHA, druhá kapilára v módu kladném a proudí jí roztok 1,8-bis(dimethylamino)naftalen, který tvoří protonované molekuly. Negativně nabitě ionty oHA interagují s ionty 1,8-bis(dimethylamino)naftalenu, čímž dochází ke snížení náboje oHA z -6 na -1. S využitím takto upraveného ESI zdroje a qTOF analyzátoru [105] byly při přímém nástřiku na MS měřeny oHA s DP až 41 [106].

Ionizace pomocí MALDI je vhodná spíše pro dlouhé oHA a MALDI-MS analýza umožňuje detekci oHA s DP od 4 do 34 [107]. Analýza velmi dlouhých fragmentů (>10 kDa) je ale problematická. Vzorky HA jsou často polydisperzní a obsahují určité množství nízkomolekulárních fragmentů, které jsou ionizovány přednostně a ruší ionizaci

delších fragmentů HA. Pokud ovšem je polydisperzita vzorku nižší než 1,2, lze pomocí MALDI-MS detekovat HA s M_w až 41 kDa [59]. Přímé stanovení M_w standardů HA umožňuje kalibraci SEC přímo standardy HA namísto standardů dextransu či pollulanu, a tím výrazně zpřesňuje stanovení M_w HA pomocí SEC [59]. Při ionizaci HA technikou MALDI je využívána řada matic zahrnujících 2,5-dihydroxybenzoovou kyselinu (DHB) [104], α -kyano- β -4-hydroxyskořicovou kyselinu [107], 6-aza-2-thiotymin [108], *trans*-2-[3-(4-*t*-butyl-fenyl)-2-methyl-2-propenyliden] malononitril [109] and 9-aminoakridin (9-AA) [110]. HA může být ionizován jak v pozitivním, tak v negativním módu. Při použití matrice DHB byl LOD pro tetrasacharid při obou polaritách stejný (500 pg). Při použití matrice 9-AA bylo dosaženo výrazně nižšího LOD v negativním módu (130 pg) než v pozitivním módu (LOD 5 ng) [110]. Permethylace [111] a methylesterifikace [107] před vlastní MALDI-MS analýzou vedla k vyšší účinnosti ionizace a obecně vyšší citlivosti MALDI-MS u dlouhých fragmentů.

2.2.4.2 Strukturní analýza oligosacharidů

Při strukturní analýze krátkých oHA je důležité pomocí MS rozlišit isomerní a isobarické oligosacharidy, které se obtížně separují chromatograficky a mají podobná fragmentační spektra. Nesulfatované oligosacharidy se stejným DP odvozené od CS, HS a HA mají identickou M_w . Tyto oligosacharidy se od sebe liší pozicí glykosidické vazby nebo konfigurací na pozici C4 v *N*-acetylhexosaminu (Obr. 1). Nízkoenergetická fragmentace kolizí indukovanou disociací vede k rozštěpení glykosidické vazby (Obr. 6). Takováto fragmentace pro rozlišení jednotlivých oligosacharidů není příliš přínosná, jelikož M_w příslušných monosacharidů ve struktuře je stejná ((GlcA vs. IdoA a GlcNAc vs. GalNAc). Pro strukturní analýzu je důležité především rozštěpení hexosového kruhu, tzv. „cross ring“ fragmentace. Na základě těchto fragmentací byly odlišeny oHS od oHA [112]. Fragmentační spektra oHA a oCS jsou téměř totožná, avšak byly popsány určité rozdíly v zastoupení jednotlivých fragmentů, pomocí kterých je možné tyto látky rozpoznat [113]. Dalším způsobem rozlišení oCS a oHA je měření v pozitivním módu, kdy pouze molekuly oCS tvoří ion $[(M+H)-2H_2O]^+$ [101]. Užitečným nástrojem k odlišení jednotlivých oligosacharidů je fragmentace pomocí ETD (electron transfer dissociation), při které dochází k tvorbě charakteristických „cross ring“ fragmentů např. pro oligosacharidy s GlcA nebo IdoA [114]. Fragmentační mechanismy jednotlivých GAG při různých technikách fragmentace jsou podrobněji popsány v literatuře [82,115].



Obr. 6 Fragmentační spektrum tetrasacharidu HA v negativním módu ESI-MS. Fragmentsy jsou označeny dle názvosloví navrženého [116] Převzato z [33] a upraveno.

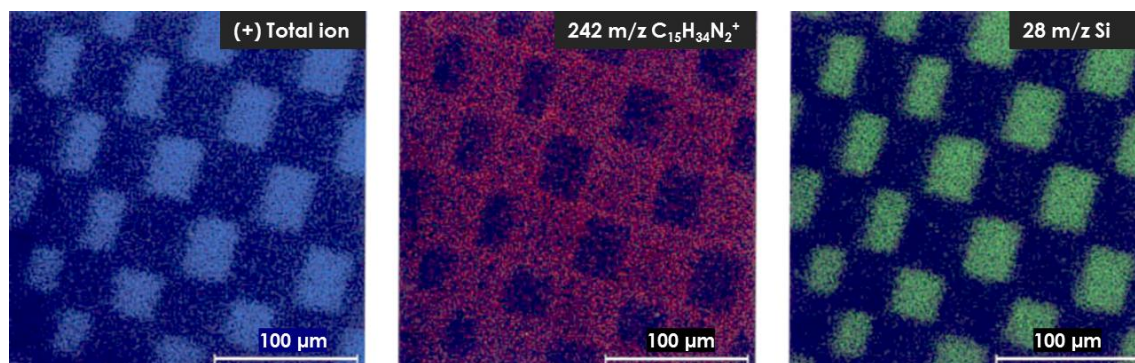
Separace isomerních oligosacharidů lze dosáhnout iontovou mobilitou. MS detekuje analyty na základě poměru mezi hmotností a nábojem analytu. Iontová mobilita (IM) závisí na hmotnosti, náboji, ale také na tvaru iontů. IM umožnila rozlišit různé epimery tetrasacharidů HS [117]. Další studie byla zaměřena na separaci směsi oHA se stejným *DP* (4 a 6), ale různým pořadím monosacharidů (AN, NA). Pomocí IM a TOF analyzátoru bylo dosaženo částečné separace izomerů. Pro kvantitativní vyhodnocení zastoupení jednotlivých typů oHA ve směsi bylo nutno provést fitování změřených píků pomocí Gaussovských funkcí. Tímto postupem bylo možné ve směsi oHA stanovit i málo zastoupené oHA (5 %) [88]. Pomocí stejné instrumentace byly rozlišeny isomerní oHA modifikované tyraminem na různých místech oligosacharidu [118].

2.2.4.3 Zobrazovací techniky hmotnostní spektrometrie

Zobrazování pomocí hmotnostní spektrometrie umožňuje určit prostorovou distribuci analytu ve vzorku bez nutnosti vzorek nějakým způsobem barvit, jak je tomu u klasické mikroskopické analýzy. Pro zobrazování metabolitů, peptidů, léčiv a proteinů bylo popsáno velké množství metod využívajících MALDI, desorpční elektrosprej (DESI) a hmotnostní spektrometrii sekundárních iontů (SIMS). Pro MS zobrazování HA a jiných GAG bylo však vyvinuto pouze několik metod. Oligosacharidy HA a dalších GAG jsou vysoce polární a vykazují silnou afinitu k materiálu, na kterém je vzorek deponován (sklo,

polymethylmethakrylát). Tento jev výrazně snižuje ionizační účinnost oligosacharidů pomocí DESI a komplikuje tak zobrazování HA v biologických vzorcích. Pokud byl standard HA deponován na sklíčko s povrchem pokrytým teflonem, ionizace DESI a MS detekce analyzátozem typu orbitrap dosahovala LOD 10 pg pro dekasacharid HA [119].

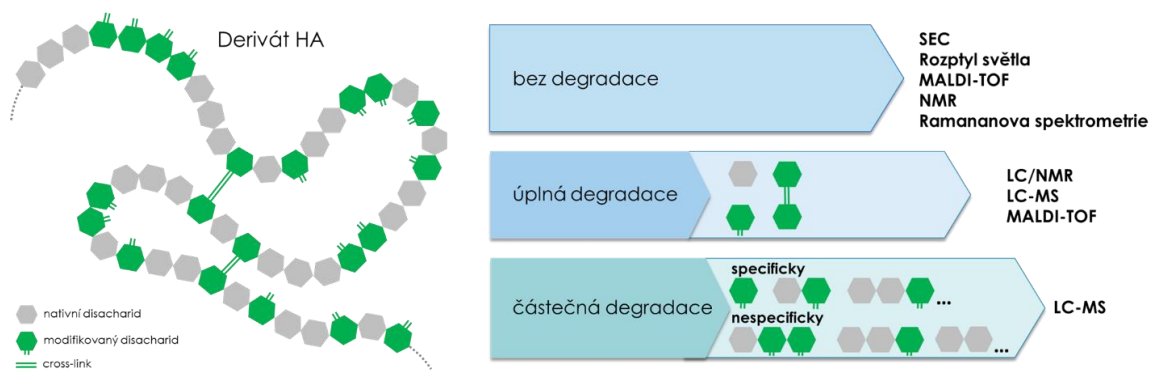
Další technikou použitou pro MS zobrazování HA [120] a acylovaných derivátů HA [121] je SIMS. Výhodou je minimální příprava vzorku pro měření, jelikož HA není potřeba depolymerizovat. SIMS způsobuje značnou fragmentaci HA při samotné ionizaci. V pozitivním módu vzniká z HA charakteristický ion s m/z 242 $C_{15}H_{34}N_2^+$. MS detekce tohoto iontu umožnila zobrazit distribuci HA na mikroskopickém sklíčku s velmi dobrým rozlišením několika mikrometrů (Obr. 7) [120]. Nevýhodou SIMS je, že produkuje pouze nízkomolekulární ionty nesoucí omezenou strukturní informaci, což znemožňuje zobrazování HA ve složitějších maticích.



Obr. 7 MS zobrazování HA na aminosilanizovaném skle pomocí TOF-SIMS v pozitivním módu. Převzato z [120] a upraveno.

2.3 Charakterizace derivátů hyaluronanu

Metody strukturní analýzy derivátů různých biopolymerů jsou shrnuty v přehledových člancích [122,123]. Strukturní analýzu derivátů HA lze rozdělit na čtyři části, a to určení: i) stupně substituce, ii) pozice substituentu na disacharidové jednotce, iii) distribuce molekulových hmotností derivátu a iv) distribuce modifikací podél hyaluronového řetězce. Pro stanovení těchto parametrů je využíváno mnoha postupů a analytických metod, které jsou shrnuty v následujícím schématu Obr. 8.



Obr. 8 Přehled používaných postupů při charakterizaci derivátů HA.

2.3.1.1 Pozice substituentu a množství navázaných funkčních skupin na hyaluronovém řetězci

Stanovení stupně substituce (*DS*) a pozice substituentu na disacharidové jednotce HA jsou základními parametry, jež jsou uváděny téměř v každé studii zabývající se deriváty HA a jejich přípravou. Oba tyto parametry totiž zásadním způsobem ovlivňují fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti derivátů HA [124]. Pro stanovení *DS* a pozice modifikace je nejčastěji používanou technikou NMR. NMR analýza vysokomolekulárního derivátu je však obtížná, jelikož deriváty jsou pouze částečně rozpustné v D₂O a viskozita roztoku komplikuje měření. Modifikace HA nejsou zpravidla uniformní a NMR spektra tak obsahují velké množství signálů, jejichž vyhodnocení je komplikované. NMR analýza oHA modifikovaných butan-1,4-diol diglycidyletherem (BDDE), které byly získány enzymatickou degradací a chromatografickou separací, odhalila přítomnost modifikací na různých místech disacharidu včetně pozic, jež byly zastoupeny velmi málo. Toho by nebylo dosaženo, pokud by byla provedena přímá NMR analýza vysokomolekulárního derivátu. Další možností, jak charakterizovat pozici modifikace v oHA, je MS analýza. V negativním módu lze detekovat C_n fragmenty zatímco v pozitivním módu lze pozorovat specifické ^{0,2}A_n „cross ring“ fragmenty [58,72].

DS charakterizuje, jak velká část HA řetězce je modifikována a jak velká část zůstává v nativní formě. Při NMR měření je *DS* definován jako poměr signálu modifikace vůči signálu disacharidové jednotky, jež je kvantifikován signálem methyly na acetylaminu skupině [125]. Vysoce modifikované deriváty HA nejsou rozpustné v samotném D₂O, nebo v CD₃OD a pro jejich solvataci je nutné použít směsná rozpouštědla jako např. CD₃CDODCD a D₂O. ¹H NMR spektra derivátů ve směsných rozpouštědlech jsou však ovlivněna rozpustností derivátů a nemusí tak plně reflektovat reálnou distribuci funkčních

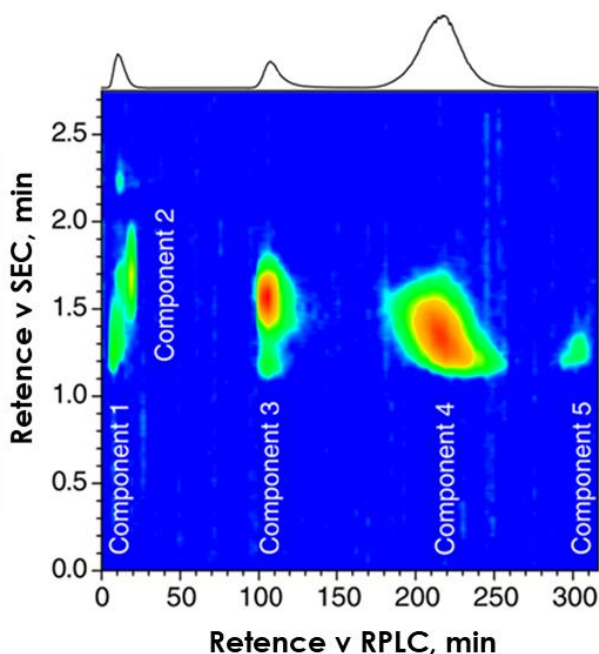
skupin ve struktuře derivátu [70]. Další možností je stanovit *DS* pomocí Ramanovy spektrometrie, čímž se omezí problémy spojené s rozpustností derivátů. Ramanova spektrometrie byla použita ke stanovení *DS* acylovaného HA. *DS* acylovaných derivátů lze stanovit i pomocí GC-MS, kdy je ve vzorku derivátů nejprve stanoveno množství volných mastných kyselin. Následně je derivát degradován alkalickou hydrolyzou, jež rozštěpí esterové vazby a je znovu stanoveno množství mastných kyselin ve vzorku. Rozdíl z obou stanovení vztážený na množství vzorku pak udává *DS* daného acylovaného derivátu [70]. Další možností je enzymatická nebo neenzymatická degradace derivátu na modifikované a nemodifikované disacharidy a následné stanovení jejich poměru pomocí LC-MS [126]. U nízkomolekulárních derivátů ($M_w < 10$ kDa) lze *DS* odhadnout přímým měřením pomocí MALDI-MS. Průměrnou hodnotu *DS* případně hodnoty *DS* jednotlivých fragmentů se stejnou M_w lze určit z poměru mezi signálem nativního a modifikovaného oligosacharidu. Tímto způsobem byl stanoven *DS* (32–35 %) u esterifikovaných oHA s *DP* 14 až 46 [109]. Porovnání s ostatními metodami (NMR, GC) však nebylo provedeno. Pro přesné stanovení *DS* pomocí přímého měření MALDI-MS je potřeba nejprve zjistit ionizační účinnost modifikovaného a nemodifikovaného oligosacharidu, jelikož např. methylesterifikace ji zvyšuje při měření v obou polaritách [107].

Modifikace řetězce HA může vést ke vzniku dvou druhů derivátů, a to derivátů konjugovaných nebo derivátů zesíťovaných. U konjugovaných derivátů jsou na řetězec HA navázány funkční skupiny, které nejsou navzájem spojeny. Naproti tomu u zesíťovaných derivátů jsou spolu jednotlivé funkční skupiny propojeny dvěma nebo více kovalentními vazbami [21]. Účinnost derivatizačních reakcí při přípravě zesíťovaných derivátů však nedosahuje 100 %. Tyto deriváty tak kromě navzájem spojených funkčních skupin (můstků) obsahují funkční skupiny, které stejně jako u konjugovaných derivátů nejsou spojeny s žádnou další funkční skupinou (Obr. 8). Pro charakterizaci je tak kromě *DS* nutno stanovit tzv. „cross-linker ratio“ (poměr mezi propojenými a volnými funkčními skupinami [57]). Pro stanovení tohoto parametru je potřeba nejprve zesíťovaný derivát depolymerizovat na směs oligosacharidů, které jsou buď nemodifikované, nebo nesou jednu nebo více funkčních skupin, případně jsou mezi sebou propojeny pomocí můstků. Jednotlivé oligosacharidy jsou následně kvantifikovány pomocí LC-MS. Tímto způsobem byly charakterizovány deriváty HA-BDDE s využitím SEC-MS [57,97] a PGC-MS [58].

2.3.1.2 Distribuce molekulových hmotností

Derivatizační reakce může měnit M_w a distribuci M_w HA. Jelikož biologické vlastnosti HA závisí z velké části na těchto parametrech, je potřeba je stanovit s vysokou mírou preciznosti a pravdivosti. SEC [127] a frakcionace tokem [128] ve spojení refraktometrickým detektorem a detektorem rozptylu světla jsou nejvyužívanějšími analytickými metodami pro stanovení M_w nativní HA. Pro analýzu chemicky modifikované HA s vysokým DS však nejsou příliš vhodné, jelikož využívají vodné mobilní fáze, ve kterých deriváty HA nebývají rozpustné. Přidání organického rozpouštědla (jako DMSO) obvykle zajišťuje úplné rozpuštění derivátu, ale může také vyvolat sekundární interakce polymeru. DMSO mění konformaci nativního HA [129], což následně ovlivňuje měření hydrodynamického objemu během SEC. Pokud je použit MALLS detektor, je třeba věnovat zvláštní pozornost přesnému stanovení přírůstku indexu lomu (dn / dc), který může značně záviset na DS . To bylo prokázáno pro akrylovaný HA [130] a HA modifikovaný propargylovanou kyselinou ferulovou [109].

Deacetylované deriváty HA s nízkým DS byly charakterizovány pomocí frakcionace SEC a následné analýzy frakcí RPLC. Touto analýzou byla stanovena distribuce M_w a zjištěno DS , které se pro jednotlivé hmotnostní frakce značně lišilo [131]. Dvoudimenzionální chromatografií (SEC-RPLC) byl charakterizována akrylovaný HA. V první dimenzi byly deriváty separovány pomocí RPLC na C8 koloně a v druhé dimenzi na vysokoúčinné SEC koloně. Výsledný 2D-LC záznam (Obr. 9) ukázal, že modifikace řetězce HA není uniformní a že různé frakce s různým DS mají odlišný chromatografický profil na SEC [132].



Obr. 9 Záznam z měření akrylovaného HA pomocí komprehensivní 2D-LC, kde byl vzorek separován v první dimenzi technikou RPLC a v druhé SEC. Převzato z [132] a upraveno.

2.3.1.3 Distribuce substituentů podél hyaluronového řetězce

Nejnáročnějším a finálním úkolem v analýze derivátů HA je určení distribuce modifikací podél glykosaminoglykanového řetězce. Nejvíce studovanou látkou v této oblasti je nízkomolekulární heparin (LMW HS), kde je specifická distribuce amino a sulfo skupin v HS řetězci spojena se specifickou vazbou na receptory a antikoagulačními účinky. FDA (Food and Drug Administration) vytvořila manuál a souhrn analýz, které jsou nezbytné při charakterizaci LMW HS nově uváděných na trh. Při charakterizaci pomocí přístupu „bottom-up“ je LMW HS nejprve podroben částečné, kompletní nebo postupné depolymerizaci enzymy s různou substrátovou specifitou. Následně jsou pomocí LC-MS analýz, podobně jak při mapování peptidů, identifikovány jednotlivé oligosacharidy, z nichž je vyhodnocena celková struktura LMW HS [133]. Mapování fragmentů probíhá pomocí speciálních počítačových programů, které při znalosti možných pozic modifikace a substrátové specifity jednotlivých HS degradujících enzymů dokáží ze struktury a zastoupení oligosacharidů vyhodnotit celkovou strukturu LMW HS [134]. Tento postup je obecně nezávislý na M_w studovaného polymeru a dokáže stanovit i modifikace, které jsou zastoupeny pouze minoritně. Na druhou stranu zahrnuje náročnou přípravu vzorku a složité vyhodnocení LC-MS dat. Přístup „bottom-up“ není vhodný pro rychlé rutinní

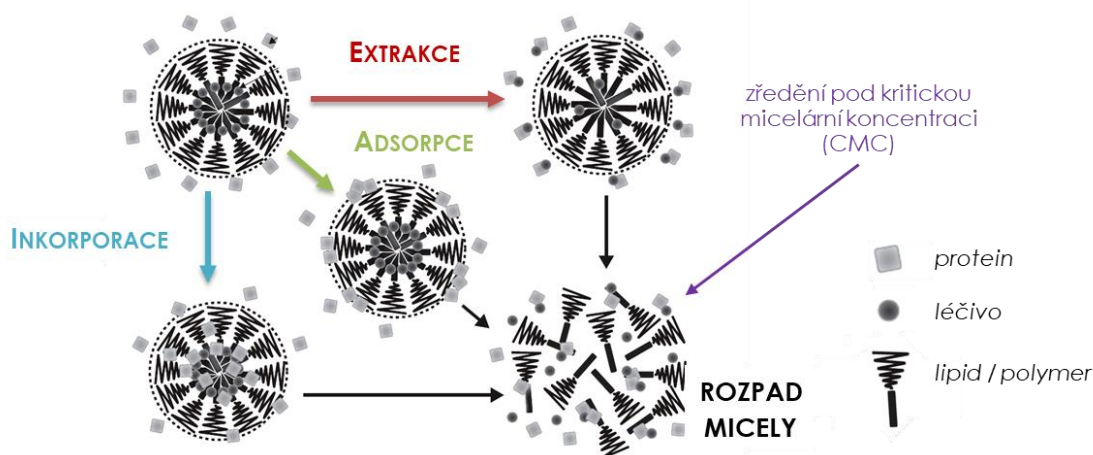
analýzy při kontrole kvality výstupního produktu. Pro tyto účely je vhodnější opačný přístup „top-down“ analýzy, kdy je polymer analyzován přímo bez předchozí degradace. Tímto postupem je však možné charakterizovat pouze nízkomolekulární deriváty, a to pouze hmotnostním spektrometrem s vysokou rozlišovací schopností. S využitím HILIC separace a MS detekce analyzátozem orbitrap byla vyhodnocena struktura LMW HS s *DP* až 26 [135].

V porovnání s HS má HA mnohem jednodušší strukturu. Strukturní analýzu derivátů HA ovšem komplikuje fakt, že na rozdíl od HS u HA neexistují enzymy, které by štěpily HA specificky v místě modifikace. Jedinou výjimkou je degradace kyselinou dusitou, která je však použitelná pouze pro strukturní analýzu deacetylovaného HA. K dispozici nejsou ani *exo*-enzymy, které by štěpily řetězec HA postupně od redukujícího nebo neredukujícího konce nezávisle na navázaných substituentech. Jedinou možností enzymatické depolymerizace derivátů HA tak zůstává použití *endo*-enzymů, které štěpí HA náhodně za vzniku směsi různě modifikovaných oligosacharidů. Avšak i pomocí nesespecifického štěpení lze částečně charakterizovat distribuci modifikací podél polymerního řetězce [123]. Deriváty HA jsou částečně depolymerizovány enzymy nebo kyselou hydrolyzou na různě modifikované oligosacharidy, které jsou následně identifikovány a kvantifikovány. Molární poměry jednotlivých oligosacharidů jsou porovnány s teoretickým matematickým modelem počítajícím s náhodnou distribucí substituentů v daném polymeru s danou délkou řetězce. Tímto porovnáním lze určit, zda distribuce modifikací odpovídá náhodnému modelu, nebo se od něj liší. Nesespecifické metody strukturní analýzy byly využity pro charakterizaci celé řady modifikovaných biopolymerů včetně methylovaného škrobu [136], hydroxyethyl(methyl) celulózy [137] a deacetylovaného HA [23]. Kombinací specifické depolymerizace kyselinou dusitou a nesespecifické degradace pomocí enzymu SpHyl byla stanovena distribuce aminoskupin podél částečně deacetylovaného HA. Distribuce vzniklých di- a oligosacharidů se výrazně lišila od modelu náhodné distribuce a výsledná distribuce aminoskupin byla rovnoměrnější. Tento jev si autoři vysvětlovali sterickým bráněním určitých částí HA řetězce, které je způsobeno vzájemným elektrostatickým odpuzováním aminoskupin na GlcN a intra- a intermolekulárními interakcemi mezi pozitivně nabitými aminoskupinami na GlcN a negativně nabitými karboxylovými skupinami na GlcA [23].

2.4 Stanovení distribuce nanomateriálových nosičů léčiv *in vivo*

Výzkum cílené distribuce léčiv v organismu probíhá již více než 30 let. Nosiče tvořené organickými nebo anorganickými sloučeninami o velikosti jednotek až stovek nanometrů nesou léčivo až do místa účinku. Nanomateriálové nosiče zlepšují farmakologické vlastnosti léčiva jako např. jeho rozpustnost, stabilitu, biodostupnost a případně snižují jeho toxické vlastnosti. V posledních letech byla vyvinuta celá řada různých typů nosičů léčiv, jako např. liposomy, polymerní micely, nanogely, nanoemulze a různé organické a anorganické částice s různým chemickým složením uvnitř a na povrchu nanočástic [138]. Přestože vývoj některých nosičů dospěl až do fáze klinických zkoušek, pouze 51 produktů bylo schváleno k medicínskému použití agenturou FDA [139]. Cílená distribuce léčiv při léčbě rakovinných onemocnění je jednou z nejstudovanějších oblastí vývoje nových nosičů. V roce 1995 byl FDA schválen a uveden na trh liposomální doxorubicin s komerčním označením Doxil[®] [140]. Jednalo se o první schválený přípravek, který kromě účinné látky obsahoval nanomateriálový nosič léčiva. Liposomální forma doxorubicinu zefektivnila léčbu různých rakovinových onemocnění tak, že došlo k redukci nežádoucích účinků doxorubicinu a zlepšila se distribuce léčiva do nádorových tkání.

Nanomateriálové nosiče dokáží dopravit do nádorové tkáně pouze kolem 0,7 % aplikované látky. Přestože v této oblasti probíhá intenzivní výzkum už desítky let, nebyl v poslední dekádě zaznamenán významnější nárůst účinnosti cílené distribuce protinádorových léčiv [141]. Malá účinnost a neporozumění osudu nosičů léčiv v *in vivo* podmínkách jsou považovány za hlavní příčiny neúspěšného zavádění nosičů do klinické praxe [138,142]. Účinnost a farmakokinetika nosiče bývá charakterizována distribucí a farmakokinetikou neseného léčiva, což však není postačující pro vyhodnocení stability a osudu léčiva v organismu. Pro ověření stability a schopnosti nosiče nést léčivo až na místo určení je třeba kromě neseného léčiva monitorovat i nosič samotný. Tyto analýzy mohou napovědět, v jakém stavu se v daném čase a tkáni léčivo nachází, zda je léčivo navázáno na nosič nebo zda již bylo z nosiče uvolněno. Nosič interaguje s celou řadou proteinů a biologických bariér, které mohou narušit strukturu nosiče a může docházet k uvolnění léčiva (Obr. 10). Další motivací, proč monitorovat osud nosiče v organismu je fakt, že polymer, který nosič zpravidla tvoří, by měl být tělem odbouratelný. Monitoring nosiče by měl potvrdit tuto vlastnost a stanovit rychlost eliminace polymeru organismem.



Obr. 10 Charakter interakce micely (liposomu) s proteiny. Převzato z [143] a upraveno

Pro stanovení farmakokinetiky a stability nosiče se využívá řady metod, které zahrnují LC-MS, fluorescenční nebo radioisotopové značení, FRET (Föster resonance energy transfer), ACQ (aggregation-caused quenching), AIE (aggregation-induced emission) fluorofory. Kovalentní navázání fluoroforů nebo funkčních skupin nesoucí radioisotopovou značku na nanomateriálový nosič mění strukturu a potažmo chování nosiče v organismu. Další nevýhodou tohoto značení je fakt, že je sledována pouze fluorescenční [144] nebo radioisotopová značka [145] a ne vlastní materiál nosiče. Pomocí enkapsulace FRET [146], AIE nebo ACQ fluoroforů [138] do nanomateriálového nosiče lze sledovat stabilitu nosiče, jelikož fluorescenční záření těchto látek je závislé na tom, v jaké blízkosti od sebe se molekuly fluoroforů v prostoru vyskytují. Avšak ani tyto metody nemohou dostatečně přesně popsat osud a stabilitu nosiče nesoucího léčivo v podmínkách *in vivo*. Struktura a stabilita nosiče totiž závisí i na enkapsulované látce a stabilita nosiče nesoucí fluorofor a léčivo může být odlišná.

Metody LC-MS naproti tomu nabízí univerzální přístup, kterým lze monitorovat jak léčivo, tak materiál nosiče a stanovit tak stabilitu a farmakokinetiku nosiče bez toho, aby byly nosič nebo léčivo, jakkoliv modifikovány nebo značeny.

3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem práce bylo vyvinout takové analytické metody kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie, jež by dovolovaly lépe popsat strukturu derivátů hyaluronanu a pochopit, co se s hyaluronanem nebo s jeho deriváty děje po aplikaci do organismu.

Konkrétně byly naplánovány následující dílčí úkoly:

1. Studium literatury a zpracování rešerše z oblasti analýzy kyseliny hyaluronové hmotnostní spektrometrií a kapalinovou chromatografií, zpracování přehledového článku HA.
2. Volba derivátů HA s ohledem na jejich možné praktické uplatnění a návrh postupů pro jejich analýzu. Studium a popis jejich hmotnostně spektrometrického chování (ionizace různými ionizačními technikami, fragmentace), studium chromatografické separace.
3. Vývoj analytické metody včetně zpracování vzorků pro vybrané deriváty při využití spojení chromatografie nebo s hmotnostní spektrometrií, interpretace naměřených dat. Návrh aplikace pro kontrolu složení derivátů hyaluronanu v návaznosti na potřeby firmy Contipro a.s.

Řešení cílů vedlo k následujícím výstupům:

M. Šimek, K. Lemr, M. Hermannová, V. Havlíček, Analysis of hyaluronan and its derivatives using chromatographic and mass spectrometric techniques, Carbohydrate Polymers. 250 (2020) 117014. (cit. [98])

M. Šimek, M. Hermannová, D. Šmejkalová, T. Foglová, K. Souček, L. Binó, V. Velebný, LC–MS/MS study of in vivo fate of hyaluronan polymeric micelles carrying doxorubicin, Carbohydrate Polymers. (2019) 181–189. (cit. [1])

M. Šimek, K. Nešporová, A. Kocurková, T. Foglová, G. Ambrožová, V. Velebný, L. Kubala, M. Hermannová, How the molecular weight affects the in vivo fate of exogenous hyaluronan delivered intravenously: A stable-isotope labelling strategy, Carbohydrate Polymers. 263 (2021) 117927. (cit. [147])

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Charakterizace lauroyl-modifikovaného hyaluronanu

4.1.1 Chemikálie

Enzym BTH byl dodán firmou Finepharm (Jelenia Góra, Polsko). Kyselina mravenčí, mravenčan amonný (LC-MS), hovězí albumin byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (Darmstadt, Německo). Propan-2-ol a methanol (LC-MS) byly zakoupeny od VWR International (Darmstadt, Německo). Standardy oligosacharidů s *DP* 4-20 a redukovaných tetra a hexasacharidů byly stejně jako vzorky lauroyl-modifikovaného HA poskytnuty firmou Contipro a.s. (Dolní Dobrouč, Česká republika).

4.1.2 Enzymatická degradace lauroyl modifikovaného hyaluronanu

Deriváty byly rozpuštěny na koncentraci 2 mg ml⁻¹ ve směsi 10 mmol l⁻¹ vodného acetátového pufru a propan-2-olu (1:1, v/v). K 75 μl tohoto roztoku bylo přidáno 2925 μl 10 mmol l⁻¹ octanového pufru obsahujícího 30 mmol l⁻¹ chloridu sodného a 1 mg ml⁻¹ hovězího albuminu (pH 5,4). Následně k tomuto roztoku bylo přidáno 12,8 μl roztoku BTH (350 IU ml⁻¹) a směs byla inkubována při 37 °C. V časech 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 270 a 330 minut od začátku inkubace byly z roztoku odebrány 100 μl podíly a ihned uskladněny při -20 °C.

4.1.3 Stanovení oligosacharidů hyaluronanu

Ke vzorkům s částečně degradovanými deriváty bylo přidáno 10 μl roztoku vnitřního standardu obsahujícího 50 μg ml⁻¹ redukovaného tetra a hexasacharidu AN (AN4 RED, AN6 RED). Vzorky byly povařeny 20 minut, aby byl albumin vysrážen a došlo k inaktivaci enzymu BTH. Následně byly vzorky centrifugovány 3 minuty při 15000 g a získaný supernatant byl použit k LC-MS kvantifikaci sudých oligosacharidů AN 4-20. K tvorbě kalibrační křivky byly použity standardy oligosacharidů, z nichž bylo namícháno deset kalibračních roztoků s koncentrací od 0,1 do 10 μg ml⁻¹.

K analýze byl použit chromatografický systém Acquity UPLC I-class s hmotnostním detektorem Xevo TQ-XS (obojí Waters, Wilmslow, Velká Británie). Chromatografická separace byla provedena na koloně Jupiter Proteo 4 μm, 90 Å (50 x 2,0 mm, Phenomenex, Torrance, USA) při 60 °C. Látky byly eluovány 3 minuty 0,1% kyselinou

mravenčí ve vodě a 7 minut gradientovou elucí acetonitrilu (0-30 %). Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,3 ml min⁻¹ na první 2 minuty, poté byl během 30 s navýšen na 0,6 ml min⁻¹. Následně byla kolona promývána 5 minut 40% acetonitrilem s průtokem 1 ml min⁻¹ a ekvilibrována 3 min 0,1% kyselinou mravenčí ve vodě s průtokem 0,3 ml min⁻¹. Dávkovaný objem vzorku byl 5 µl.

Hmotnostní spektrometr byl vybaven elektrosprejem operujícím v negativním módu s následujícími parametry: napětí na sprejovací kapiláře -1,8 kV, teplota desolvatačního plynu 600 °C, průtok plynu na konusu (N₂) 150 l h⁻¹, průtok desolvatačního plynu (N₂) 1000 l h⁻¹, tlak zamlžujícího plynu (N₂) 7,0 bar. MRM přechody pro jednotlivé oligosacharidy byly laděny s využitím standardů oligosacharidů a jsou uvedeny v Tab. III. Výsledky LC-MS analýz byly vyhodnoceny pomocí softwaru MassLynx (Waters, Wilmslow, Velká Británie).

Tab. III MRM přechody pro jednotlivé oligosacharidy s hodnotami napětí na konusu (CV) a kolizní energie (CE). Prvně uvedený fragment byl použit jako kvantifikační ion, druhý fragment pak jako kvalifikační ion.

oligosacharid	<i>m/z</i>	náboj	fragmenty	CV, V	CE, eV
AN4	775,2	1-	193,0	72	38
			572,2	72	28
AN6	576,8	2-	193,0	42	30
			475,2	42	16
AN8	766,4	2-	193,1	54	40
			664,7	54	18
AN10	956,0	2-	193,1	18	14
			854,4	18	26
AN12	764,5	3-	113,0	38	44
			695,7	38	20
AN14	1335,2	2-	193,0	64	64
			1233,6	64	34
AN16	1016,3	3-	113,0	38	64
			948,5	38	28
AN18	1142,7	3-	113,0	66	64
			1075,0	66	30
AN20	1269,2	3-	113,0	88	74
			1201,4	88	32
AN4 RED	778,3	1-	193,0	44	34
			399,1	30	30
AN6 RED	578,3	2-	113,0	50	34
			193,0	50	26

4.2 Studium farmakokinetiky polymerního nosiče z oleyl-modifikovaného hyaluronanu nesoucí cytostatikum doxorubicin

Publikováno v rámci prvoautorské publikace „*LC-MS/MS study of in vivo fate of hyaluronan polymeric micelles carrying doxorubicin*“ [1].

4.2.1 Použité chemikálie

Doxorubicin ($\geq 90\%$) byl zakoupen od Clearsynth (Mumbai, Indie). Doxorubicinol ($\geq 90\%$) byl zakoupen od Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Německo). Daunorubicin hydrochlorid ($\geq 98,5\%$), kyselina ethylendiamintetraoctová ($\geq 99\%$), kyselina mravenčí (LC-MS), HEPES a proteasa ze *Streptomyces griseus* (type XIV, $\geq 3,5$ U mg^{-1}) byly zakoupeny od Sigma Aldrich (Darmstadt, Německo). Acetonitril a methanol (LC-MS) byly zakoupeny od VWR International (Darmstadt, Německo). HA lyasa ze *Streptococcus pneumoniae* (SpHyl), nasycený disacharid HA (AN2), oleyl-modifikovaný hyaluronan (HA-C18:1, 15 kDa) se stupněm substituce (DS) 10% (poměr mezi modifikovanými disacharidy a celkovým počtem disacharidových jednotek) a nenasycený palmitoyl-modifikovaný disacharid hyaluronanu (Δ AN2-C16) byly poskytnuty firmou Contipro a.s. (Dolní Dobrouč, Česká Republika). ^{13}C -značený vysokomolekulární hyaluronan (HMW ^{13}C -HA, 1500 kDa) byl biotechnologicky připraven firmou Contipro a.s. (Dolní Dobrouč, Česká Republika) kultivací *Streptococcus zooepidemicus* s D-glukosou-1- ^{13}C ($\geq 98,5\%$) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Německo). Chloroform stabilizovaný amylenem, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (p.a.), KH_2PO_4 (p.a.), NaCl (p.a.), KCl (p.a.) byly zakoupeny od firmy Lach-Ner (Neratovice, Česká Republika).

4.2.2 Analýza doxorubicinu a doxorubicinolu v myší plasmě

Extrakce doxorubicinu (DOX) a doxorubicinolu (DOXol) v plasmě byla provedena podle publikovaného postupu [149]. Ke 100 μl plasmy bylo přidáno 10 μl roztoku vnitřního standardu daunorubicinu (DAU, 500 ng ml^{-1}) a následně bylo přidáno 900 μl směsi chloroformu a methanolu (4:1, v/v). Vzorky byly umístěny na 2 minuty na vortex a následně centrifugovány při 10000 g po 2 minuty. Organická fáze byla odebrána do čisté zkumavky a proudem dusíku bylo organické rozpouštědlo ze vzorku odstraněno. Vzorek byl následně rozpuštěn v 60 μl methanolu a analyzován pomocí LC-MS.

Chromatografická separace byla provedena na koloně Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 μm) (Waters, Wilmslow, Velká Británie) při 40 °C, průtoku mobilní fáze 0,4 ml min^{-1} a gradientové eluci 0,1% kyselinou mravenčí ve vodě a acetonitrilem. Obsah acetonitrilu při gradientové eluci byl následující: 0–1 min 5 %, 1–8 min 5–40 %, 8–11 min 60 %, 11–15 min 5 %. Objem dávkovaného vzorku byl 2 μl .

4.2.3 Analýza oleyl-modifikovaného hyaluronanu a ^{13}C -hyaluronanu v myší plasmě

Vzorky plasmy byly stokrát zředěny vodou, následně bylo ke vzorkům přidáno 10 μl roztoku vnitřního standardu (AN2 a $\Delta\text{AN2-C16}$, 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) a 40 μl 1% proteasy ze *Streptomyces griseus* v 50 mmol l^{-1} HEPES pufru o pH 7,9, Vzorky byly následně inkubovány tři hodiny při 45 °C. Následně k nim bylo přidáno po 2 μl roztoku SpHyl (7,500 IU ml^{-1}) a byly inkubovány 30 minut při 37 °C. Poté bylo ke vzorkům přidáno 900 μl směsi chloroform/methanol (4:1, v/v). Následně byly centrifugovány při 10000 g po 2 minuty, vodná fáze byla použita pro analýzu HA HA-C18:1 a ^{13}C -HA.

$\Delta\text{AN2-C18:1}$ a $\Delta\text{AN2-C16}$ byly separovány na koloně Acquity UPLC BEH C4 (150 x 2,1 mm, 1,7 μm) (Waters, Wilmslow, Velká Británie) při 40 °C, průtoku mobilní fáze 0,4 ml min^{-1} a gradientové eluci 0,1% kyselinou mravenčí ve vodě a acetonitrilem. Obsah acetonitrilu při gradientové eluci byl následující: 0–16,5 min 30–95 %, 16,5–17 min 95 %, 17–18 min 95–30 %, 18–21 min 30 %. Dávkovaný objem byl 5 μl .

Chromatografická separace ^{13}C - ΔAN2 , ΔAN2 a AN2 byla provedena na koloně Jupiter Proteo 90 Å (250 x 4,6 mm, 4 μm) (Phenomenex, Torrance, USA) při laboratorní teplotě, průtoku mobilní fáze 0,5 ml min^{-1} a gradientové eluci 0,1% kyselinou mravenčí ve vodě a methanolem. Obsah methanolu při gradientové eluci byl následující: 0–3 min 0 %, 3–15 min 0–15 %, 15–16 min 15–80 %, 16–18 min 80 %, 18–20 min 0 %. Dávkováno bylo 5 μl roztoku vzorku.

4.2.4 Analýza doxorubicinu, doxorubicinolu, oleyl-modifikovaného hyaluronanu a ^{13}C -hyaluronanu v homogenátech myších tkání

Vzorky myších orgánů byly zváženy a přeneseny do homogenizačních zkumavek a byl k nim přidán 100 mmol l^{-1} PBS s 10 mmol l^{-1} EDTA o pH 7,4 v takovém množství, aby množství vzorku v homogenátu odpovídalo 100 mg ml^{-1} . Myší tkáně byly homogenizovány na homogenizátoru Precellys 24 (Bertin Technologies, Saint-Quentin,

Francie). Ke 100 μl homogenizované tkáně bylo přidáno 20 μl roztoku vnitřního standardu (DAU, 500 ng ml^{-1} ; AN2, 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$; $\Delta\text{AN2-C16}$, 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Vzorby byly dále zpracovány a analyzovány podle postupu popsaném v 4.2.2 a 4.2.3.

4.2.5 Nastavení hmotnostního spektrometru

Chromatografický systém Acquity UPLC byl spojen s hmotnostním spektrometrem Xevo TQ-XS vybaveným trojitým kvadrupólem jako hmotnostním analyzátozem (Waters, Wilmslow, Velká Británie). Ionizace vzorku byla provedena pomocí elektrospreje v pozitivním módu při analýze DOX, DOXol a DAU. Disacharidy HA-C18:1 a ^{13}C -HA byly ionizovány v negativním módu. Měřením standardů DOX, DOXol, $\Delta\text{AN2-C18:1}$, ΔAN2 a ^{13}C - ΔAN2 , DAU, $\Delta\text{AN2-C16}$ a AN2 byly laděny MRM přechody, které jsou uvedeny v Tab. IV. Napětí na sprejovací kapiláře v pozitivním módu bylo 2,0 kV, offset zdroje 30 V, průtok plynu na konusu 150 l h^{-1} a desolvatační teplota 400 $^{\circ}\text{C}$. V negativním módu bylo napětí na kapiláře 2,7 kV, offset zdroje 30 V, průtok plynu na konusu 150 l h^{-1} a desolvatační teplota 500 $^{\circ}\text{C}$. Dusík byl použit jako zmlžující plyn při tlaku 7 bar a jako sušící plyn při průtoku 1000 l h^{-1} . Výsledky LC-MS analýz byly vyhodnoceny pomocí softwaru MassLynx (Waters, Wilmslow, Velká Británie).

Tab. IV MRM přechody s hodnotami napětí na konusu (CV) a kolizní energii (CE). ^a konfirmační ion, ^b kvantifikační ion

analyt	[M+H] ⁺	produktový ion	CV, V	CE, eV
DOX	544,0	361,0 ^c	26	26
		397,0 ^q	26	10
DOXol	546,1	363,0 ^c	28	24
		399,1 ^q	28	12
DAU	528,1	321,1 ^q	22	24
		363,0 ^c	22	14
analyt	[M-H] ⁻	produktový ion	CV, V	CE, eV
$\Delta\text{AN2-C18:1}$	642,3	87,0 ^c	52	30
		175,0 ^q	52	16
$\Delta\text{AN2-C16}$	616,1	87,0 ^c	22	14
		175,0 ^q	22	42
^{13}C - ΔAN2	380,1	87,0 ^c	22	10
		176,0 ^q	22	24
ΔAN2	378,1	87,0 ^c	22	10
		175,0 ^q	22	24
AN2	396,1	113,0 ^c	40	26
		193,0 ^q	40	16

Stanovení metabolitů v homogenátu jater bylo provedeno pomocí hmotnostního spektrometru Synapt G2-Si a softwaru UNIFI (obojí Waters, Wilmslow, Velká Británie). LC metoda a nastavení elektrospreje bylo stejné jako při kvantifikaci DOX a DOXol.

4.2.6 Validace stanovení doxorubicinu, doxorubicinolu, oleyl-modifikovaného hyaluronanu a ¹³C-hyaluronanu

Vyvinutá LC-MS analýza DOX, DOXol, HA-C18:1 a ¹³C-HA byla validována podle postupu FDA popsaného pro validaci bioanalytických metod [150]. Byly stanoveny základní validační charakteristiky včetně meze kvantifikace, preciznosti, pravdivosti a stability DOX, DOXol, HA-C18:1 a ¹³C-HA v plasmě a homogenátu jater (100 mg ml⁻¹). Selektivita metod byla otestována přidávkem analytů do sedmi různých biologických vzorů: plasmy, jater, ledvin, sleziny, srdce, mozku a plic. Stabilita HA-C18:1 a ¹³C-HA byla testována při -80 °C. Analyty byly považovány za stabilní, pokud se koncentrace čerstvě připraveného vzorku a skladovaného vzorku nelišila o více než ± 15 %. Stejně rozhodovací kritérium bylo použito při vyhodnocení meze detekce, preciznosti a pravdivosti. Pro stanovení robustnosti metod byl použit Youdenův test [151].

4.2.7 Příprava a charakterizace polymerních micel z oleyl modifikovaného hyaluronanu nesoucí cytostatikum doxorubicin

Polymerní micely z HA-C18:1 nesoucí DOX byly připraveny podle publikovaného postupu [152]. 10 mg DOX bylo rozpuštěno v chloroformu a roztok byl postupně přidáván k vodnému roztoku HA-C18:1 (10 ml, 10 mg ml⁻¹). Tato směs byla následně 10 minut sonifikována na Sonotrode S2 (výkon 200 W, amplituda 65%, délka cyklu 0.5 s) (Hielscher, Teltow, Německo) při laboratorní teplotě. Následně bylo rozpouštědlo odpařeno na rotační vakuové odparce Hei-VAP Core (Heidolph, Schwabach, Německo). Vzorek byl suspendován v několika ml vody a volný DOX byl odstraněn filtrací roztoku přes skleněný filtr s velikostí pórů 1 μm a ultrafiltrací přes membránu nepropouštějícím látky s *M_w* vyšší než 3,5 kDa. Následně byla ze vzorku lyofilizací odstraněna voda.

Hydrodynamický průměr připravených polymerních micel byl stanoven pomocí dynamického rozptylu světla přístrojem Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instrument, Malvern, Velká Británie) vybaveným He-Ne laserem s vlnovou délkou záření 633 nm.

4.2.8 Design *in vivo* studie farmakokinetiky polymerní micely z oleyl-modifikovaného hyaluronanu nesoucí cytostatikum doxorubicin

Samice myši BALB/C staré 5 týdnů byly krmeny *ad libitum*. Myši byly injektovány metastazujícími 4T1 nádorovými buňkami (50000 buněk) do čtvrté prsní bradavky. Poté byly nechány tři týdny v klidu a následně náhodně rozděleny do čtyř různých skupin. Těmto skupinám, označených jako A, B, C, D, byl aplikován DOX ve čtyřech různých formulacích. Skupina A dostala roztok DOX v PBS, skupina B roztok DOX v PBS spolu s roztokem HA-C18:1, skupina C roztok polymerních micel z HA-C18:1 s DOX a skupina D roztok vysokomolekulární ^{13}C -HA a po deseti minutách roztok polymerních micel z HA-C18:1 s DOX. Dávka DOX byla u všech skupin stejná a to $3,5 \text{ mg kg}^{-1}$. Dávka HA-C18:1 byla 50 mg kg^{-1} a ^{13}C -HA byla dávkována v množství 25 mg kg^{-1} . Myši pak byly v jedenácti časových intervalech během 72 hodin od podání usmrceny a orgány byly odebrány a uloženy při $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Krev byla odebrána pomocí srdeční punkce a plasma byla separována patnáctiminutovou centrifugací při 3000 g. Farmakokinetické parametry byly vyhodnoceny pomocí programu PK Solver [153].

4.2.9 Stanovení molekulové hmotnosti oleyl-modifikovaného hyaluronanu

Vzorky plasmy a homogenátů jater byly separovány pomocí chromatografického systému Alliance e2695 s UV-Vis detektorem Model 2489 vybaveným kolektorem frakcí (vše Waters, Wilmslow, Velká Británie) a dvěma v sérii zapojenými kolonami PL aquagel-OH 40 (300 x 7,5 mm, 8 μm) a PL aquagel-OH 20 (300 x 7,5 mm, 5 μm) (obojí Agilent, Santa Clara, USA). Teplota na koloně byla $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Jako mobilní fáze byl použit vodný roztok chloridu sodného o koncentraci $0,15 \text{ mol l}^{-1}$. Průtok mobilní fáze byl 1 ml min^{-1} . Objem vzorku dávkovaný na kolonu byl 100 μl . Kolektorem bylo sbíráno dvacet frakcí pro každou SEC analýzu mezi pátou a dvacátou pátou minutou. K získaným frakcím byl přidán roztok vnitřního standardu (AN2 a $\Delta\text{AN2-C16}$) a pomocí metody uvedené v 4.2.3 byl stanoven obsah HA a HA-C18:1.

4.3 Studium metabolismu intravenózně a perorálně aplikovaného hyaluronanu pomocí značení stabilními isotopy

Publikováno v rámci prvoautorské publikace „*How the molecular weight affects the in vivo fate of exogenous hyaluronan delivered intravenously: a stable-isotope labelling strategy*“ [147].

4.3.1 Použité chemikálie

^{13}C -značený vysokomolekulární HA (1562 kDa) byl připraven kultivací *Streptococcus zooepidemicus* s D-glukosou ($\text{U-}^{13}\text{C}$, 99%) firmou Contipro a.s. (Dolní Dobrouč, Česká Republika). D-glukosa ($\text{U-}^{13}\text{C}$, 99%), ^{13}C -*N*-acetylglukosamin (99%) a ^{13}C -kyselina glukuronová (99%) byly zakoupeny od Cambridge Isotope Laboratories (Tewksbury, USA). Diethylether (p.a.) byl zakoupen od firmy VWR international (Darmstadt, Německo). Ostatní chemikálie byly zakoupeny od stejných dodavatelů jako v případě předcházející studie 4.2.1.

4.3.2 Příprava hyaluronanu s definovanou molekulovou hmotností

^{13}C -HA o pěti různými M_w od 13,6 do 1562 kDa byl připraven a charakterizován firmou Contipro a.s. ^{13}C -HA se střední M_w byl připraven pomocí tepelné degradace vysokomolekulárního ^{13}C -HA. Vysokomolekulární ^{13}C -HA byl v tenké vrstvě nanesen na dno Petriho misky, přikryt hliníkovou folií a inkubován při 120 °C 160 minut. M_w takto připravené ^{13}C -HA byla 370 kDa. 138 kDa ^{13}C -HA byl připraven stejným způsobem, ale doba inkubace byla 340 minut. Nízkomolekulární ^{13}C -HA byl připraven pomocí kyselé hydrolýzy. Vysokomolekulární ^{13}C -HA byl rozpuštěn ve vodě na koncentraci 10 mg ml⁻¹, k roztoku byla přidána kyselina sírová (1 mol l⁻¹) v takovém množství, aby pH roztoku bylo 3,0. Roztok byl pak zahříván na 100 °C po dobu 180 minut. Po vychladnutí byl roztok neutralizován roztokem hydroxidu sodného (1 mol l⁻¹). Následně byl roztok HA zakoncentrován a přečištěn pomocí ultrafiltrace a kolonkami s grafitickým uhlíkem. M_w takto připraveného ^{13}C -HA byla 46 kDa. 13,6 kDa ^{13}C -HA byla připravena stejným způsobem, ale doba ohřevu byla 240 minut. M_w ^{13}C -HA byla charakterizována pomocí SEC-MALLS [75].

4.3.3 Analýza ^{13}C -hyaluronanu, ^{13}C -*N*-acetylglukosaminu a ^{13}C -kyseliny glukuronové v myší plasmě a orgánech

Vzorky pro kvantifikaci ^{13}C -HA (připraveného z glukosy ($\text{U-}^{13}\text{C}$, 99%)) byly zpracovány stejným způsobem jako vzorky pro stanovení ^{13}C -HA (vzniklé z $1\text{-}^{13}\text{C}$ -glukosy) (4.2.3). Chromatografická separace a nastavení hmotnostního spektrometru bylo rovněž stejné (4.2.3, 4.2.5). Jedinou změnou byly měřené MRM přechody ^{13}C - $\Delta\text{AN}2$: $392,1 \rightarrow 181,0$ a $392,1 \rightarrow 90,0$.

Příprava vzorku pro analýzu ^{13}C -monosacharidů GlcA a GlcNAc byla stejná jako při analýze ^{13}C -HA avšak s vynecháním depolymerizačního kroku (nebyl přidán enzym SpHyl). Chromatografická separace a nastavení hmotnostního spektrometru bylo stejné jako při analýze HA. Měřené MRM přechody pro ^{13}C -GlcA byly: $199,1 \rightarrow 117,9$; $84,5$ a pro ^{13}C -GlcNAc: $226,1 \rightarrow 123,0$; $60,8$.

4.3.4 Analýza metabolitů ^{13}C -hyaluronanu

Metabolity z homogenátů jater a buněčných kultur byly extrahovány podobně jako v publikované práci [154]. Ke $100\ \mu\text{l}$ buněčné suspenze nebo homogenátu jater ($250\ \text{mg}\ \text{ml}^{-1}$) bylo přidáno $400\ \mu\text{l}$ vychlazeného methanolu (-80°C). Vzorky byly následně vortexovány 30 minut při 4°C a inkubovány 2 hodiny při -80°C . Potom byly centrifugovány 10 minut při $15000\ \text{g}$ a byl odebrán methanolvý supernatant. Následně byla methanolvá extrakce opakována a supernatanty spojeny. Rozpouštědlo ze vzorku bylo pomocí proudu dusíku odpařeno a zbytek byl znovu rozpuštěn ve $100\ \mu\text{l}$ $0,1\%$ kyseliny mravenčí.

LC-MS analýza byla provedena na systému Waters Acquity UPLC spojeného s hmotnostním spektrometrem Waters Synapt G2-Si (obojí Waters, Wilmslow, Velká Británie). Chromatografická separace byla provedena podle publikovaného postupu [155] na koloně Acquity C18 column UPLC HSS T3 $1,8\ \mu\text{m}$ $2,1 \times 100\ \text{mm}$ (Waters, Wilmslow, Velká Británie) s gradientovou elucí $0,1\%$ kyselinou mravenčí ve vodě a $0,1\%$ kyselinou mravenčí v 95% acetonitrilu (Tab. V). Průtok mobilní fáze byl $0,45\ \text{ml}\ \text{min}^{-1}$ a kolona byla termostatována na 22°C . Dávkovaný objem byl $3\ \mu\text{l}$. Hmotnostní detekce probíhala v negativním módu při následujícím nastavení: napětí na sprejovací kapiláře $-1,8\ \text{kV}$, napětí na konusu $20\ \text{V}$, offset zdroje $40\ \text{V}$, teplota zdroje 120°C , teplota desolvatačního plynu 500°C , proud plynu na konusu N_2 , $20\ \text{l}\ \text{h}^{-1}$, proud desolvatačního plynu (N_2)

800 l h⁻¹, zmlžující plyn (N₂) 6 bar, rozsah měřených *m/z* 50-1200, rychlost skenování 0,5 s⁻¹. Analýza isotopové distribuce metabolitů byla vyhodnocena pomocí softwaru ELMAVEN (Elucidata, Cambridge, USA). Metabolity byly anotovány na základě hodnoty hmotnostního rozdílu (menší než 10 ppm) mezi pozorovanou hodnotou a hodnotou v databázi. Identita identifikovaných metabolitů byla ověřena porovnáním fragmentačních spekter s webovou databází METLIN [156].

Tab. V Gradientová eluce pro analýzu metabolitů na reverzních fázích.

<i>t</i> , min	0,1% kys. mravenčí ve vodě	0,1% kys. mravenčí v 95% acetonitrilu	průtok, ml min ⁻¹
0	100	0	0,45
2	100	0	0,45
4	85	15	0,45
10	55	45	0,45
13	0	100	0,45
20	0	100	0,45
25	100	0	0,45
35	100	0	0,45

4.3.5 Stanovení molekulové hmotnosti ¹³C-hyaluronanu v myších tkáních

Distribuce *M_w* ¹³C-HA v plasmě a homogenátu jater u myší, kterým byl dávkován ¹³C-HA s *M_w* 13,6, 46 a 138 kDa, byla stanovena pomocí SEC separace a následné LC-MS analýzy popsané v 4.2.9. Stejným způsobem byla stanovena distribuce *M_w* v všech vzorků moči. Distribuce *M_w* ¹³C-HA v plasmě a homogenátu jater u myší, kterým byl dávkován ¹³C-HA s *M_w* 370 a 1562 kDa, byla stanovena pomocí SEC separace s kolonami PL aquagel–OH 40 (300x7,5 mm, 8 μm) a PL aquagel–OH 20 (300x7,5 mm, 5 μm) (oboje Agilent, Santa Clara, USA). Vzorky byly eluovány 0,15 mol l⁻¹ chloridem sodným při průtoku 1 ml min⁻¹ a 40 °C.

4.3.6 *In vivo* studie zkoumající farmakokinetiku intravenózně podaného hyaluronanu v závislosti na jeho molekulové hmotnosti

Samice myší BABLC/C, staré 8–10 týdnů a vážící 20–25 g, byly dodány z Chovného a uživatelského zařízení laboratorních zvířat při Lékařské fakultě Masarykovy Univerzity v Brně. Experimenty na zvířatech byly schváleny etickou komisí Akademie věd České republiky dle protokolu č. 9/2019. Experimenty zahrnující práci se zvířaty (po odběr vzorků) byly provedeny pracovníky Biofyzikálního ústavu AV ČR v Brně.

Myši byly náhodně rozděleny do pěti skupin, pro sedaci jim byl inhalačně podán isofluran a jednotlivým skupinám zvířat byl injektován roztok ^{13}C -HA o pěti různých M_w : 13,6 kDa, 46 kDa, 138 kDa, 370 kDa a 1562 kDa. ^{13}C -HA byl rozpuštěn na koncentraci 10 mg ml^{-1} ve sterilním PBS a dávkován v dávce 50 mg kg^{-1} , výjimkou byl ^{13}C -HA s M_w 1562 kDa, který kvůli vysoké viskozitě roztoku byl rozpuštěn pouze na $1,67 \text{ mg ml}^{-1}$ a byl aplikován v poloviční dávce (25 mg kg^{-1}). Po intravenózní aplikaci ^{13}C -HA byly myši umístěny do klecí s volným přístupem k jídlu a pití. V devíti časových intervalech 5, 10, 15, 30 minut a 2, 4, 8, 24 a 48 hodin od podání byly myši z klecí vyjmuty, usmrceny isofluranem a byly jim odebrány vzorky krve srdeční punkcí a orgány. Plasma byla separována 10min centrifugací při 3000 g. Myši určené k odběru vzorků po 24 a 48 hodinách byly umístěny v metabolických klecích, ze kterých byly v časových intervalech 4, 10, 24, 32 a 48 hodin od podání odebírány vzorky moči a stolice. Na každý časový interval byla použita tři zvířata. Všechny odebrané vzorky byly uloženy při teplotě -80°C .

4.3.7 *In vivo* studie zkoumající orgánovou distribuci intravenózně podaného hyaluronanu v závislosti na jeho molekulové hmotnosti

Podobně jako v předcházející studii byly samice BALB/C myši náhodně rozděleny do čtyř skupin a byl jim injektován roztok ^{13}C -HA s M_w 13,6; 138; 370 nebo 1562 kDa. Myši byly po 2 a 8 hodinách a s výjimkou skupiny se 138 kDa ^{13}C -HA i po 10 minutách usmrceny a byla jim srdeční punkcí odebrána krev. Poté byla do levé komory zavedena venepunkční sada a do pravé síně byl proveden malý řez. Krevní řečiště bylo pomalu promyto 40 ml fosfátového pufru, který propláchl játra a ledviny. Promytí orgánů fosfátovým pufrem se projevilo změnou barvy orgánů. Fosfátový pufr spolu se zbytky krve byl jímán do 15 ml zkumavek po čtyřech frakcích o objemu 10 ml. Po promytí byly orgány odebrány a uloženy spolu s odebranou plasmou při -80°C .

4.3.8 *In vitro* studie zkoumající metabolismus hyaluronanu jaterními buňkami v závislosti na jeho molekulové hmotnosti

In vitro kultivace buněk byly provedeny pracovníky firmy Contipro a.s. Lidské jaterní endoteliální buňky (HLEC) byly zakoupeny od firmy Lonza (Kouřim, Česká republika) a jejich kultivace probíhala dle instrukcí dodavatele. Buňky byly kultivovány v EBM-2 mediu od firmy Lonza (Kouřim, Česká republika) ve 100mm miskách, jejichž povrch byl

potážen kolagenem typu I od firmy Corning (Corning, USA). Misky s 200 000 buněk byly použity pro kultivaci trvající 2-3 dny při 37 °C, 5 % CO₂ a 95% vlhkosti vzduchu, dokud nebylo dosaženo 60% konfluence.

Sterilní ¹³C-HA a ¹²C-HA (použitý jako kontrola) byly rozpuštěny v EBM-2 médiu na koncentraci 1 mg ml⁻¹ a sterilizovány filtrací přes skleněný filtr s póry o velikosti 0,2 μm. K buňkám bylo přidáno 10 ml tohoto roztoku a buňky byly kultivovány dalších 72 hodin. Kultivační médium bylo odebráno a uskladněno při -80 °C. Buňky byly promyty sterilním PBS a bylo k nim přidáno 1,5 ml methanolu vychlazeného na -80 °C. Misky s methanolem byly umístěny na 15 minut do -80 °C. Poté byly buňky spolu s methanolovou fází odebrány do zkumavek, které byly po dobu 60 s vortexovány a následně uloženy na 10 minut na ledu. Dále byly vzorky 5 minut centrifugovány při 4 °C a 6000 g. Ze vzorků byl odebrán supernatant a uložen do -80 °C. Sediment byl suspendován v 250 μl vychlazeného methanolu, vortexován (60 s) a zcentrifugován (6000 g/5 min/4 °C). Odebraný supernatant byl spojen s předešlou frakcí methanolového extraktu a byl uložen do -80 °C.

4.3.9 *In vivo* studie zkoumající farmakokinetiku perorálně podávaného hyaluronanu

Samice myši BABLC/C s normálním mikrobiomem, staré 8–10 týdnů a vážící 20–25 g, byly dodány z Chovného a uživatelského zařízení laboratorních zvířat při Lékařské fakultě Masarykovy Univerzity v Brně. Experimenty na zvířatech byly schváleny etickou komisí Akademie věd České republiky. Experimenty zahrnující práci se zvířaty (po odběr vzorků) byly provedeny pracovníky Biofyzikálního ústavu AV ČR v Brně.

Myšim byl po dodání pomocí tzv. cocagingu trvajícímu 14 dní srovnán mikrobiom. V den experimentu byly myši sedatovány isofluranem a byl jim gaváží aplikován 10 mg ml⁻¹ roztok 1562 kDa ¹³C-HA v dávce 50 mg kg⁻¹. Po aplikaci ¹³C-HA byly myši umístěny do klecí s volným přístupem k žrádlu a pití. V devíti časových intervalech 0-72 hodin od podání byly myši z klecí vyjmuty, usmrceny isofluranem a byly jim odebrány vzorky krve srdeční punkcí, orgány a obsahy střev. Plasma byla separována 10min centrifugací při 3000 g. Myši určené k odběru vzorků po 48 a 72 hodinách byly umístěny v metabolických klecích, ze kterých byly v časových intervalech 4, 10, 24, 32 a 48 hodin

od podání odebírány vzorky moči a stolice. Na každý časový interval byly použity tři zvířata. Všechny odebrané vzorky byly uloženy při teplotě -80 °C.

Experiment na bezmikrobních myších BALB/C byl proveden dle stejného protokolu jako experiment s myši s normálním mikrobiomem avšak bez využití metabolických klecí. Experimenty zahrnující práci s bezmikrobními myši a odběr vzorků byly provedeny Mgr. Martinem Schwarzerem, Ph.D. a RNDr. Dagmarou Šrůtkovou, Ph.D. z Laboratoře gnotobiologie Mikrobiologického ústavu AV ČR v Novém Hrádku.

4.3.10 *In vitro* experiment degradace hyaluronu umělou střevní šťávou

Umělá žaludeční šťáva byla připravena dle receptury v Českém lékopisu [157].

4.3.11 *Ex vivo* studie zkoumající degradaci hyaluronanu střevním mikrobiomem

Experimenty zahrnující práci se zvířaty a kultivaci střevního obsahu byly provedeny Mgr. Martinem Schwarzerem, Ph.D. a RNDr. Dagmarou Šrůtkovou, Ph.D. z Laboratoře gnotobiologie Mikrobiologického ústavu AV ČR v Novém Hrádku. Pro experimenty byly použity tři samice C57Bl6/J kolonizované neonatálně směsí 12 bakterií – OligoMM12 [158]. Myši byly odchovány v plastových izolátorech typu Trexler, krmeny sterilní dietou (25 kGy) SSNIFF (V1126 Mouse breeding extrudate). Voda byla sterilizována autoklávováním. Zvířata měla v odchovně cyklus světlo/tma 12h/12h a teplotu 22±2°C. V den experimentu byly myši usmrceny, slepé střevo vyjmuto, zváženo a bez prodlení přeloženo do anaeroboxu. Obsah slepého střeva byl přenesen do zkumavky, zbylá tkáň vyndána a zvážena. Obsah slepého střeva byl naředěn v poměru 1:1 sterilním PBS s 0,05% hydrochlorid cysteinem a s pH upraveným kyselinou sírovou (0,1 mol l⁻¹) na 6,8. Po důkladném promíchání na třepačce se skleněnými kuličkami bylo odebráno 100 µl do tekutého dusíku pro analýzu LC-MS. K 1 ml naředěného střevního obsahu bylo přidáno 200 µl vysokomolekulární ¹³C-HA (3 mg ml⁻¹ v PBS-0,05% roztok hydrochloridu cysteinu), takže výsledná koncentrace ¹³C-HA byla 500 µg ml⁻¹. V čase 15, 30, 60, 120 a 240 minut bylo odebráno 100 µl vzorku do tekutého dusíku. Vzorky byly před analýzou skladovány při -70 °C. Část vzorků byla použita pro kvantifikaci ¹³C-HA (4.3.3), část pro kvantifikaci oligosacharidů HA (4.3.12) a část byla použita ke kvantifikaci krátkých mastných kyselin (4.3.13).

4.3.12 Stanovení nenasycených oligosacharidů hyaluronanu ve střevním obsahu myši

Ve spolupráci s Bc. Miroslavem Kubátem byla v rámci jeho diplomové práce, u které jsem byl konzultantem, vyvinuta analytická metoda pro chromatografickou separaci nenasycených a nenasycených oligosacharidů HA s *DP* 2-20 a kvantifikaci ^{13}C nenasycených sudých oligosacharidů HA s *DP* 8-16. V předložené disertační práci bylo této chromatografické metody využito nejen ke studiu nasycených a nenasycených sudých oligosacharidů, ale i lichých AA a NN oligosacharidů HA.

K LC-MS analýze bylo využito stejného systému jako v případě kvantifikace DOX, HA-C18:1 a ^{13}C -HA (4.2.5). Pro chromatografickou separaci byla využita analytická kolona Atlantis Premier BEH C18 AX, 1,7 μm , 2,1x50 mm (Waters, Wilmslow, Velká Británie). Jako složka A mobilní fáze byl použit vodný 10 mmol l^{-1} octan amonný s pH 5,0 upraveným koncentrovanou kyselinou octvou, jako mobilní fáze B byl použit acetonitril. Analytická kolona byla vyhřívána na 60 $^{\circ}\text{C}$ a průtok mobilní fáze byl 0,4 ml min^{-1} . Bylo využito gradientové eluce v následujícím formátu: 0-0,5 min 5% B; 0,5-5 min 5-60 % B; 5-6 min 60 % B; 6-6,3 min 60-5 % B a 6,3-7,5 min 5 % B. Množství nastříkovaného vzorku bylo 5 μl . MS detekce oligosacharidů probíhala v MRM módu s následujícími přechody (Tab. VI).

Tab. VI MRM přechody s hodnotami napětí na konusu (CV) a kolizní energii (CE).

oligosacharid	z	m/z	Fragment 1	Fragment 2	CE F1, eV	CE F2, eV	CV, V
$\Delta\text{AN}2$	^{12}C	378,1	175,0	87,0	24	10	22
	^{13}C	392,1	181,0	90,0	24	10	22
AN2	^{12}C	396,2	113,0	193,0	26	16	40
	^{13}C	410,2	118,0	199,0	26	16	40
AA3	^{12}C	572,2	113,0	193,0	70	42	18
	^{13}C	592,2	118,0	199,0	70	42	18
NN3	^{12}C	599,2	175,0	396,0	16	6	8
	^{13}C	621,3	181,0	412,0	26	6	8
$\Delta\text{AN}4$	^{12}C	757,6	175,0	554,5	38	28	72
	^{13}C	785,3	181,0	574,0	38	28	72
AN4	^{12}C	775,2	193,0	572,1	38	28	72
	^{13}C	803,3	199,0	594,2	38	28	72
AA5	^{12}C	951,3	113,0	193,0	70	42	18
	^{13}C	985,4	118,0	199,0	70	42	18
NN5	^{12}C	488,7	175,0	387,0	16	6	8
	^{13}C	506,7	181,0	401,0	16	6	8
$\Delta\text{AN}6$	^{12}C	568,0	175,0	465,9	30	16	42
	^{13}C	588,7	181,0	482,6	30	16	42
AN6	^{12}C	576,8	193,0	475,2	30	16	42
	^{13}C	597,7	199,0	492,7	30	16	42

AA7	¹² C	2-	664,8	175,0	193,0	24	30	10
	¹³ C		688,8	181,0	199,0	24	30	10
NN7	¹² C	2-	678,3	175,0	576,5	30	20	40
	¹³ C		703,3	181,0	597,5	30	20	40
ΔAN8	¹² C	2-	757,5	175,0	655,8	40	18	54
	¹³ C		785,3	181,0	679,0	40	18	54
AN8	¹² C	2-	766,4	193,0	664,7	40	18	54
	¹³ C		794,3	199,0	689,3	40	18	54
AA9	¹² C	2-	854,4	113,0	193,0	60	46	18
	¹³ C		885,3	118,0	199,0	60	46	18
NN9	¹² C	2-	867,9	175,0	766,1	38	24	24
	¹³ C		899,9	181,0	794,1	38	24	24
ΔAN10	¹² C	2-	946,8	175,0	844,7	44	26	18
	¹³ C		981,9	181,0	875,6	44	28	18
AN10	¹² C	2-	956,0	193,0	854,4	44	26	18
	¹³ C		990,9	199,0	885,8	44	26	18
AA11	¹² C	2-	1044,0	113,0	193,0	68	48	18
	¹³ C		1081,9	118,0	199,0	68	48	18
NN11	¹² C	3-	704,7	175,0	636,8	30	20	44
	¹³ C		730,7	181,0	660,1	30	20	44
ΔAN12	¹² C	3-	757,5	695,2	175,0	20	44	38
	¹³ C		785,1	90,0	181,0	20	44	38
AN12	¹² C	3-	763,5	695,7	113,0	20	44	38
	¹³ C		791,3	721,3	118,0	20	44	38
AA13	¹² C	3-	821,9	113,0	175,0	45	24	17
	¹³ C		851,9	118,0	181,0	45	24	17
NN13	¹² C	3-	830,9	175,0	762,9	30	20	44
	¹³ C		861,7	181,0	791,6	30	20	44
ΔAN14	¹² C	3-	884,1	175,0	816,2	38	22	12
	¹³ C		916,2	181,0	875,0	38	22	12
AN14	¹² C	3-	889,6	193,0	821,6	38	22	12
	¹³ C		922,4	199,0	852,3	38	22	12
AA15	¹² C	3-	948,3	113,0	880,2	50	35	30
	¹³ C		983,0	118,0	181,0	50	35	30
NN15	¹² C	3-	957,3	175,0	889,2	40	30	55
	¹³ C		992,7	181,0	922,7	40	30	55
ΔAN16	¹² C	3-	1010,6	113,0	942,7	64	28	38
	¹³ C		1047,2	181,0	976,5	40	24	26
AN16	¹² C	3-	1016,3	113,0	948,5	64	28	38
	¹³ C		1053,4	118,0	983,4	64	28	38
AA17	¹² C	3-	1074,6	113,0	175,0	60	40	50
	¹³ C		1114,1	118,0	181,0	60	40	50
NN17	¹² C	3-	1083,7	175,0	1015,6	45	35	60
	¹³ C		1123,8	181,0	1053,8	45	35	60
ΔAN18	¹² C	3-	1136,3	175,0	1068,3	50	28	92
	¹³ C		1178,2	181,0	1107,5	50	28	92
AN18	¹² C	3-	1142,7	113,0	1074,9	64	30	66
	¹³ C		1184,5	118,0	1114,4	64	30	66
AA19	¹² C	3-	1201,0	113,0	175,0	70	50	60
	¹³ C		1245,2	118,0	181,0	70	50	60
NN19	¹² C	3-	1210,0	175,0	1142,0	50	40	65
	¹³ C		1254,8	181,0	1184,8	50	40	65
ΔAN20	¹² C	3-	1262,7	113,0	1194,7	68	26	76
	¹³ C		1309,2	118,0	1238,5	68	26	76
AN20	¹² C	3-	1269,2	113,0	1201,5	74	32	88
	¹³ C		1315,5	118,0	1245,5	74	32	88

4.3.13 Stanovení krátkých mastných kyselin pomocí GC-MS

Ke kvantifikaci krátkých mastných kyselin (kyseliny octové, propionové a butanové) bylo použito analytické metody GC-MS zavedené a běžně využívané ve firmě Contipro a.s. (Dolní Dobrouč, Česká republika). Nejprve byly vzorky (100 μl) okyseleny 10 μl HCl (5 mol l^{-1}) a bylo přidáno 300 μl diethyletheru. Vzorky byly ponechány při 4 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 minut a poté centrifugovány (15 000 g / 4 $^{\circ}\text{C}$ / 10 min). 200 μl organické fáze bylo přeneseno do nové vialky a bylo přidáno 10 μl roztoku vnitřního standardu (100 μg ml^{-1} , kyselina undekanová). Analýza extraktů byla provedena na zařízení Shimadzu GCMS-TQ8050 NX (Shimadzu, Kjóto, Japonsko). Vzorky byly nastříknuty na kapilární kolonu HP-FFAP (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) (Agilent, Santa Clara, USA) s He jako nosným plynem. Teplota injektoru byla 240 $^{\circ}\text{C}$, dělicí poměr 1:10, vstříkovaný objem 1 μl a teplota detektoru 240 $^{\circ}\text{C}$. Počáteční teplota v kolonového termostatu byla 80 $^{\circ}\text{C}$, po dvou minutách byla postupně zvýšena (20 $^{\circ}\text{C}$ min^{-1}) na 230 $^{\circ}\text{C}$ a tato teplota byla držena po 7 minut. Data byla získána v režimu MS scan (m/z 30-300). Výsledky GC-MS analýz byly vyhodnoceny pomocí softwaru GCMSsolution (Shimadzu, Kjóto, Japonsko).

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Charakterizace homogenity modifikací lauroyl-modifikovaného hyaluronanu

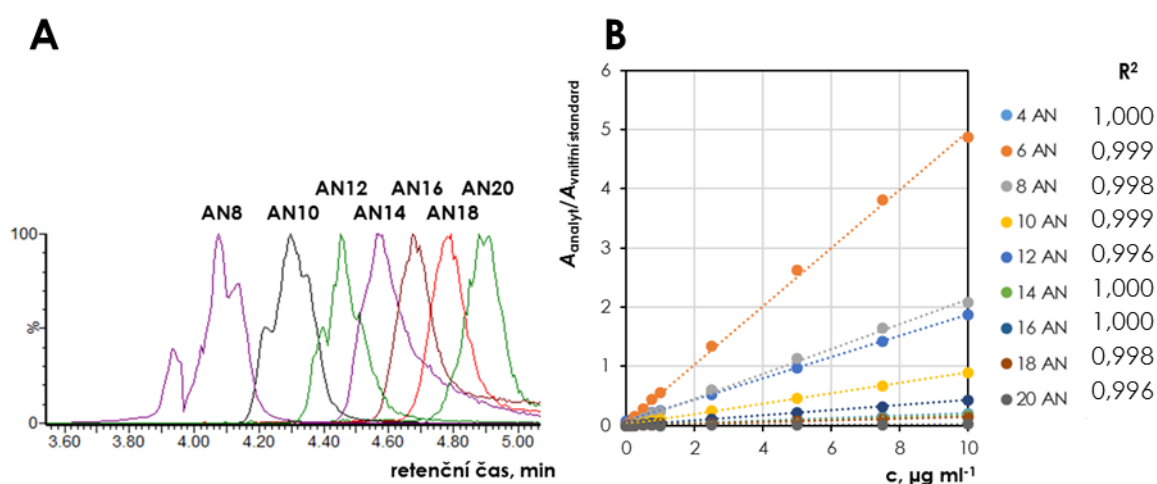
Filmy vytvořené z HA vykazují vlastnosti vhodné pro medicínské aplikace, avšak vysoká rozpustnost HA omezuje jejich použití ve vodném prostředí. Modifikací hydrofobními skupinami lze rozpustnost HA omezit a vlivem nekovalentních interakcí mezi zavedenými substituenty se tvoří samonosné ve vodě nerozpustné filmy vhodné pro řadu medicínských aplikací [159]. Mezi důležité vlastnosti těchto filmů patří tzv. bobtnavost filmu charakterizující, kolik vody je film schopen sorbovat [148]. Bobtnavost je definována jako $(m_{eq}-m_0)/m_0$, kde m_{eq} je hmotnost filmu po 24h lázni v PBS a m_0 je hmotnost suchého filmu [160]. Hodnota bobtnavosti filmu spolu s DS derivátu použitého na jeho přípravu definuje klíčové vlastnosti filmu, jako je jeho tloušťka v mokřém stavu a rychlost degradace hyaluronidasami.

Za sorpci vody filmem z lauroyl-modifikovaného HA jsou zodpovědné hydrofilní části řetězce, tedy úseky, jež nejsou modifikovány hydrofobním lauroylem. Hodnoty DS pro deriváty, ze kterých jsou filmy připraveny, přímo korelují s hodnotami bobtnavosti filmů, přičemž vyšší hodnota DS znamená zpravidla nižší hodnotu bobtnavosti filmu [159]. V praxi však tato korelace není vždy naplněna. Některé připravené filmy vykazovaly odlišné hodnoty bobtnavosti, než by odpovídaly hodnotám DS . Odchyly od očekávaného chování mohou být způsobeny nestandardním rozložením substituentů podél řetězce HA. Hodnoty DS jsou snadno měřitelným parametrem souvisejícím s fyzikálně-chemickými vlastnostmi připravených derivátů HA, avšak tento parametr nijak nereflektuje rozložení substituentů podél řetězce. Nestandardní podmínky derivatizační reakce (např. jiná teplota, pH, složení rozpouštědel v derivatizační směsi) ovlivňují konformaci molekul HA, což nemusí mít vliv na množství navázaných substituentů, ale může ovlivnit rozmístění substituentů podél řetězce. Charakterizace homogenity rozložení substituentů v acylovaných derivátech tak může ve výrobním procesu odhalit nestandardní šarže dřívě, než jsou z nich připraveny finální výrobky (tenké filmy aj.), jež nemají požadované vlastnosti.

Jak bylo zmíněno v teoretické části práce (2.3.1.3) stanovení distribuce substituentů je nejobtížnějším úkolem při charakterizaci derivátů HA. Pro charakterizaci rozložení acylů

podél řetězce derivátu HA byla v rámci této disertační práce vyvinuta metoda založená na částečné enzymatické degradaci derivátu enzymem BTH. Enzym BTH štěpí pravděpodobně spíše nemodifikované části řetězce, množství oligosacharidů, které jsou při degradaci produkovány by tak mělo souviset s množstvím navázaných acylů a jejich rozmístěním na řetězci. Pokud bude např. u derivátu s *DS* 10 % řetězec substituován homogenně, mělo by být množství detekovaných nativních oligosacharidů nižší a derivát by měl sorbovat méně vody. Naopak pokud by distribuce byla výrazně heterogenní, v řetězci by existovalo pouze několik málo míst s vysokou hustotou modifikací a zbytek HA by byl nemodifikovaný. V takovém případě by množství stanovených oligosacharidů bylo vyšší a byla by vyšší i schopnost derivátu vázat vodu.

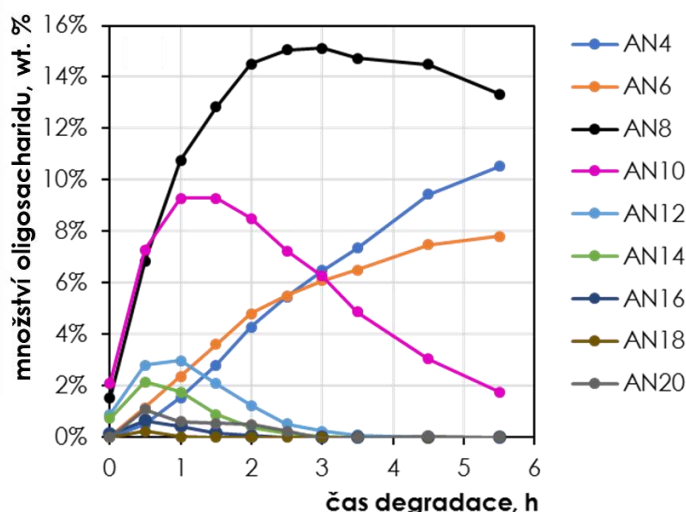
Pro analýzu nativních oligosacharidů typu AN, jež jsou produkty degradace HA enzymem BTH, byla vyvinuta LC-MS metoda. Chromatografická separace byla provedena na reverzních fázích při kyselém pH mobilní fáze. MS detekce probíhala v negativním MRM módu. Metoda umožnila analyzovat oligosacharidy s *DP* 4-20, a to již od koncentrace 0,1 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Typický chromatografický záznam a ukázky kalibračních křivek v rozsahu 0,1-10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ jsou uvedeny na Obr. 11.



Obr. 11 A) Chromatografická separace oligosacharidů typu AN, B) ukázka kalibrační křivky při stanovení oligosacharidů AN 4-20.

Podmínky degradace lauroyl-modifikovaného HA (koncentrace enzymu, koncentrace substrátu) byly optimalizovány tak, aby docházelo pouze k částečné degradaci a aby byly kromě konečných produktů depolymerizace (oligosacharidy AN4 a AN6) přítomny také vyšší oligosacharidy (AN 8-20). Přítomnost vyšších oligosacharidů ve vzorku totiž

naznačuje přítomnost dlouhých částí řetězců, jež nejsou modifikovány. Během degradace byly v určitých intervalech odebírány vzorky, ve kterých byly následně kvantifikovány oligosacharidy AN 4-20. Podmínky degradace byly nastaveny tak, aby byla v některém časovém intervalu zachyceno maximum koncentrace vyšších oligosacharidů AN 8-20. Finální metoda zahrnovala degradaci vzorku trvající 5,5 h, přičemž během degradace byly v deseti časových intervalech odebírány vzorky, které byly analyzovány na obsah oligosacharidů. Typický časový průběh experimentu je znázorněn na Obr. 12.



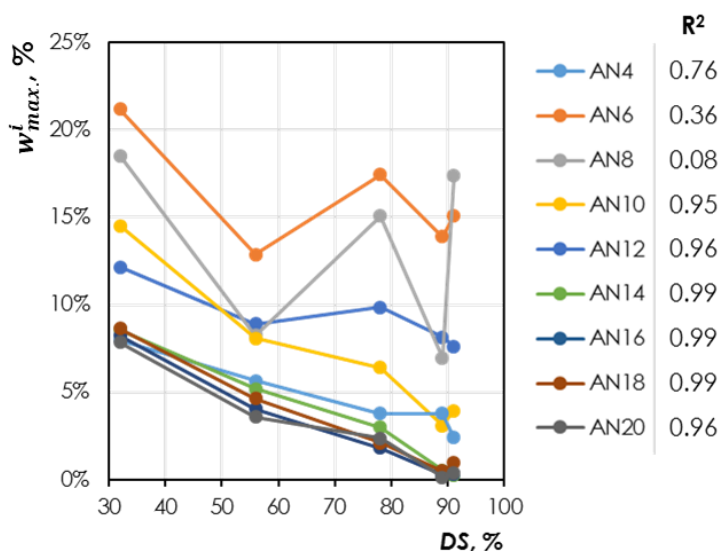
Obr. 12 Časový průběh degradace HA-C12 (*DS* 10 %) enzymem BTH. Optimalizované podmínky degradace: koncentrace derivátu ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$), množství enzymu BTH (30 U mg^{-1}), složení pufru (octan sodný 10 mmol l^{-1} , chlorid sodný 30 mmol l^{-1} , hovězí albumin 1 mg ml^{-1} , pH 5,4 (upraveno kyselinou octovou)).

Koncentrace větších HA oligosacharidů ($\geq \text{AN8}$) má tendenci se zvyšovat v první části experimentu a dosahuje maxima v časovém rozmezí 30-300 minut (v závislosti na *DS* a distribuci modifikace). Množství menších HA oligosacharidů ($\leq \text{AN6}$), konečných produktů štěpení BTH, se zvyšuje s časem po celou dobu experimentu.

Enzym BTH je v roztoku pufru inhibován řetězci s navázanými acylovými skupinami. Inhibice je pravděpodobně způsobena tím, že hydrofobizované deriváty mají silnou vazbu na proteiny [38]. Aby vyvinutá metoda byla aplikovatelná i na deriváty s vysokým *DS* a tedy s potenciálně silným inhibičním účinkem, byly deriváty degradovány v přítomnosti hovězího albuminu, který byl přítomen v násobně vyšší koncentraci než samotný enzym. Deriváty se tak spíše vázaly na albumin a jejich inhibiční efekt byl utlumen. Přítomnost

vysoké koncentrace albuminu ve vzorku je však nežádoucí pro LC-MS analýzu. Vzorky před vlastní analýzou bylo nutné upravit tak, aby z nich byl albumin odstraněn a zároveň nedošlo ke ztrátám oligosacharidů. Pro odstranění albuminu bylo vyzkoušeno několik postupů včetně srážení vychlazeným methanolem (4.3.4) nebo degradace proteinu proteasou (4.2.3). Jako nejlepší řešení se ukázalo převaření vzorku s následnou centrifugací, což zajistilo inaktivaci enzymu BTH a zároveň dostatečné odstranění albuminu jeho vysrážením.

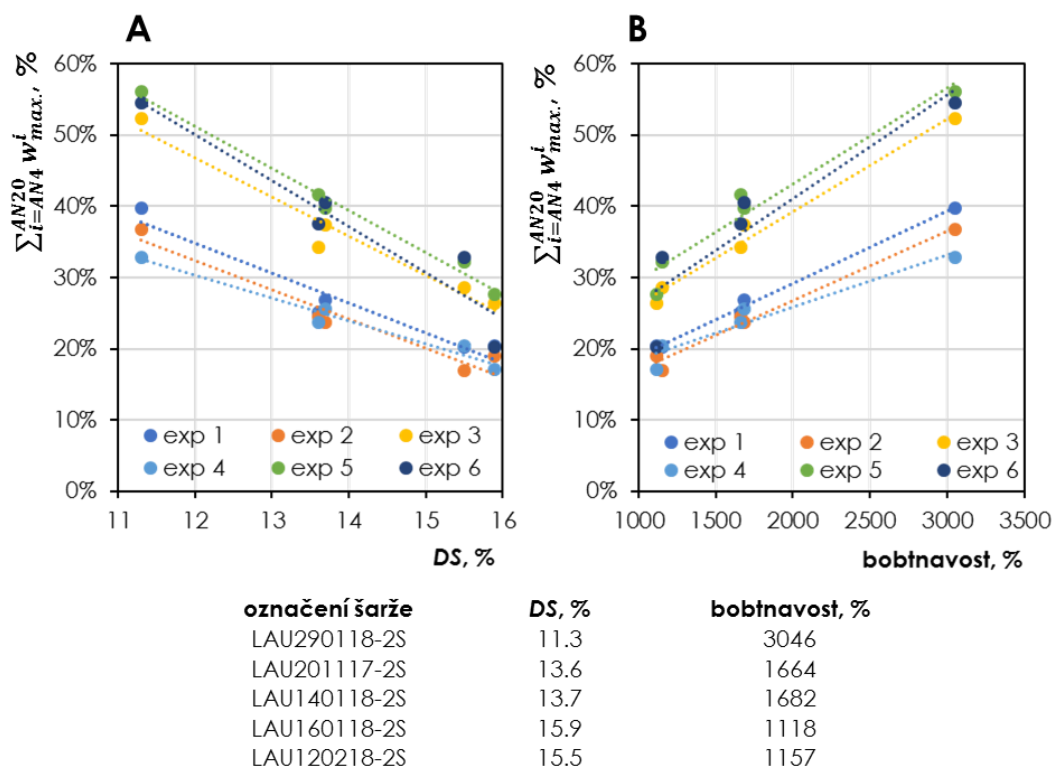
Vyvinutou LC-MS metodou pro kvantifikaci nativních oligosacharidů s optimalizovanou metodou BTH degradace bylo charakterizováno několik lauroyl-modifikovaných derivátů s různým *DS*. U zkoumaných derivátů byla změřena kinetika tvorby jednotlivých oligosacharidů, z těchto závislostí byla následně odečtena maxima a jejich hodnoty byly vyneseny do závislosti proti *DS* daného derivátu (Obr. 13). Z těchto závislostí je patrné, že naměřené množství zejména vyšších oligosacharidů velmi dobře koreluje s hodnotami *DS*, kdy se zvyšujícím se *DS* lineárně klesá množství detekovaných oligosacharidů. Výsledky reflektují fakt, že u méně substituovaných derivátů jsou přítomny delší části řetězce, které nenesou žádný substituent.



Obr. 13 Závislost množství detekovaných nativních oligosacharidů na hodnotách *DS* u lauroyl modifikovaných derivátů HA.

Jak bylo zmíněno v předcházejících odstavcích, homogenita substituentů podél lauroyl modifikovaného derivátu pravděpodobně souvisí se schopností derivátu sorbovat vodu. Pro ověření této hypotézy a ověření aplikovatelnosti vyvinuté metody byla naměřená

množství oligosacharidů při BTH degradaci posuzována v souvislosti s kritickým parametrem funkčnosti finálního výrobku – bobtnavosti filmu. Bylo vytipováno pět šarží derivátů, u kterých byl v minulosti naměřen přímý vztah mezi hodnotami DS a hodnotami bobtnavosti [159]. Deriváty byly charakterizovány vyvinutou metodou BTH degradace a zároveň byla u těchto derivátů otestována její opakovatelnost. Ze získané časové křivky byla pro jednotlivé oligosacharidy odečtena maxima, která pak byla sečtena. Tento parametr $\sum_{i=AN4}^{AN20} w_{max}^i$ byl vynesena proti hodnotám DS a bobtnavosti (Obr. 14).

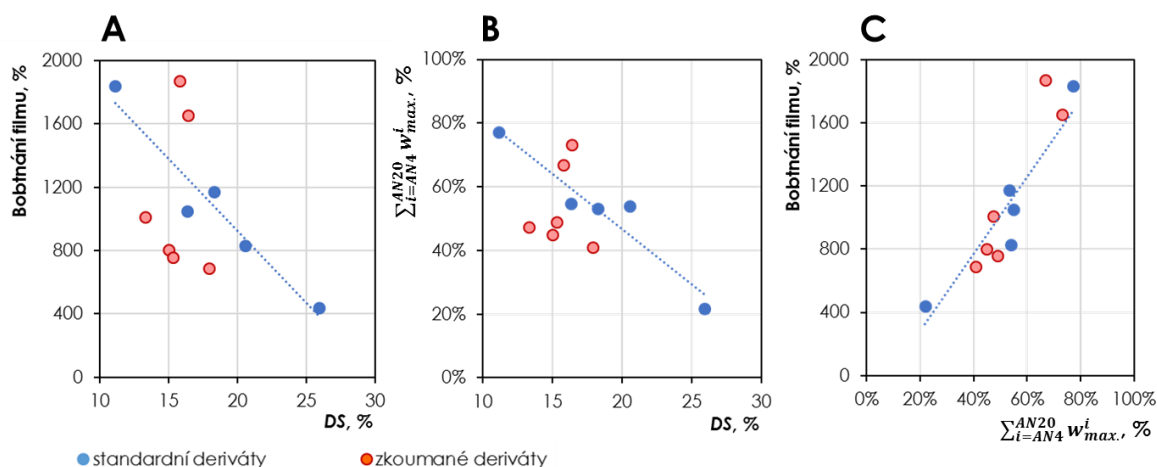


Obr. 14 Ukázka opakovatelnosti degradace pěti různých šarží lauroyl modifikovaných derivátů HA (v šesti opakováních), u kterých byla pozorována lineární závislost mezi DS a bobtnavostí připraveného filmu a zároveň lineární závislost mezi sumami maxim množství oligosacharidů AN 4-20 při BTH degradaci a hodnotami A) DS a B) bobtnavosti filmu.

BTH degradace provedená v šesti opakováních ukázala, že uvedený postup není dokonale opakovatelný. Absolutní množství detekovaných oligosacharidů charakterizovaných parametrem $\sum_{i=AN4}^{AN20} w_{max}^i$ se u jednotlivých experimentů lišilo, avšak data pro jednotlivé deriváty spolu korelovala vždy stejně. Testování neznámých derivátů nemohlo být tedy založeno na jejich samotné degradaci a kvantifikaci oligosacharidů, které by ukazovalo na standardní či nestandardní chování derivátu, resp. distribuci substituentů. Testovací

metoda pro neznámé deriváty byla upravena tak, aby se vždy porovnávala enzymatická degradace neznámého derivátu spolu s enzymatickou degradací známého standardního derivátu.

Testování dalších šarží derivátů nově zavedenou metodou odhalilo, že parametr $\sum_{i=AN4}^{AN20} w_{max}^i$ souvisí s klíčovým parametrem bobtnavosti mnohem více než DS (viz srovnání Obr. 15A a C). Zatímco možnost predikce DS na základě tohoto parametru je omezená (Obr. 15B), souvislost s bobtnavostí je zřejmá (Obr. 15C). Deriváty, které měly vyšší bobtnavost, než by odpovídalo jejich DS , měly vyšší hodnotu parametru $\sum_{i=AN4}^{AN20} w_{max}^i$, tzn. že tyto deriváty měly méně rovnoměrnou distribuci modifikací než tzv. standardní deriváty, u kterých DS odpovídá bobtnavosti.



Obr. 15 Ukázka aplikace vyvinuté metody pro predikci vlastností derivátu.

Navrženým postupem bylo možné predikovat, jaká bude bobtnavost finálního filmu mnohem lépe než pomocí DS (Tab. VII). Touto predikcí bylo vždy dosaženo lepších výsledků než v případě predikce na základě DS . Pro predikci bylo vedle $\sum_{i=AN4}^{AN20} w_{max}^i$ zvažováno využití i jiných parametrů, jako sumy maxim pouze některých oligosacharidů, sumy oligosacharidů v různých časech nebo predikce z celého souboru dat s využitím PLS analýzy. Parametr $\sum_{i=AN4}^{AN20} w_{max}^i$ však dával konzistentně lepší nebo stejné hodnoty predikce bobtnavosti než jiné zkoumané parametry. Vyvinutá metoda je nyní ve firmě Contipro a.s. rutinně využívána ve výrobním procesu filmů z lauroyl-modifikovaného HA, kdy před vlastní výrobou filmů je vstupní derivát vedle hodnoty DS charakterizován uvedenou metodou. Metoda umožňuje posoudit vstupní surovinu

(derivát HA), zda je vhodný k přípravě filmů, a odhadnout, jaká bude přibližně bobtnavost výsledného filmu.

Tab. VII Ukázka aplikace vyvinuté metody měření oligosacharidů AN pro predikci bobtnavosti filmů připravených ze zkoumaných derivátů. Bobtnavosti filmu byly naměřeny pracovníky firmy Contipro a.s. podle [159].

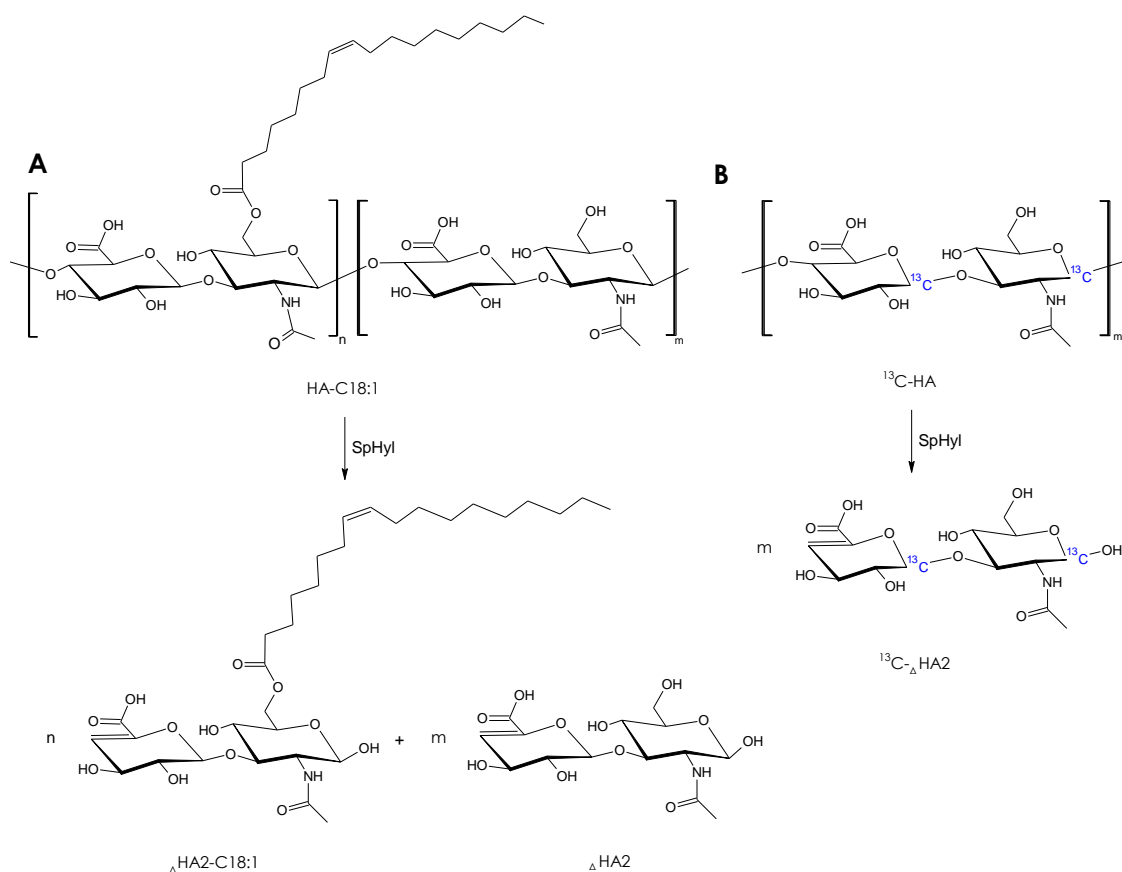
označení derivátu	DS, %	bobtnavost filmu, %			chyba predikce dle DS	chyba predikce dle $\sum_{i=AN4}^{AN20} W_{max}^i$
		naměřená	predikce dle DS	predikce dle $\sum_{i=AN4}^{AN20} W_{max}^i$		
V16-130617A	14,97	804	1382	864	72 %	8 %
V16-130617B	13,28	1011	1536	930	52 %	-8 %
V16-230417A	17,90	690	1115	753	62 %	9 %
V16-250417A	16,37	1653	1255	1652	-24 %	0 %
V16-160417A	15,77	1875	1309	1473	-30 %	-21 %
V16-100517A	15,31	758	1351	974	78 %	28 %

5.2 LC-MS analýza ^{13}C -hyaluronanu, oleyl-modifikovaného hyaluronanu a doxorubicinu v biologických vzorcích

Podstatná část kapitol 5.2 a 5.3 byla publikována v rámci prvoautorské publikace „*LC-MS/MS study of in vivo fate of hyaluronan polymeric micelles carrying doxorubicin*“ [1].

5.2.1 Princip metody

Hlavním problémem při kvantifikaci polymerních látek v komplexních biologických vzorcích je kromě velkého množství potenciálně interferujících látek (GAG, proteinů, lipidů aj.) zejména vysoká M_w a polydisperzní povaha analytů. Mezi požadovanými vlastnostmi kvantifikační metody pro nativní a chemicky modifikovaný HA byl kladen důraz na to, aby bylo dosaženo co nejnižší meze detekce. Z tohoto důvodu byla zvolena instrumentace LC-MS s MS detektorem využívajícím trojitý kvadrupól. Pro snížení M_w a polydisperzity HA a dosažení optimální ionizace byly vzorky před vlastním měřením enzymaticky depolymerizovány enzymem SpHyl (Obr. 16). Produkty depolymerizace ^{13}C -HA a HA-C18:1 byly modifikované a nemodifikované disacharidy, které byly následně podrobeny chromatografické separaci na reverzních fázích a detekovány pomocí trojitého kvadrupólu.



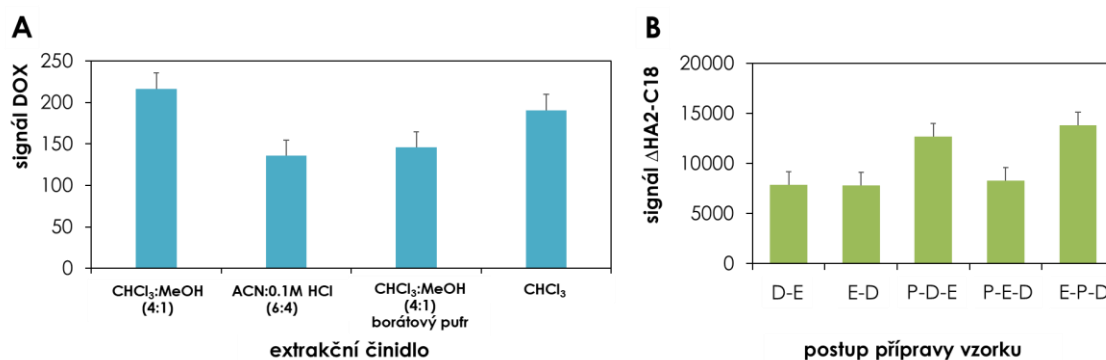
Obr. 16 Enzymatická degradace A) HA-C18:1 a B) ^{13}C -HA hyaluronidasou ze *Streptococcus pneumoniae* (SpHyl). Hlavními produkty depolymerizace jsou nenasycené modifikované (Δ AN2-C18:1) a nenasycené nedomodifikované disacharidy (Δ AN2, ^{13}C - Δ AN2)

5.2.2 Optimalizace přípravy vzorku

Jedním z omezení při analýze biologických materiálů bývá malé množství vzorku, které je pro potřeby analytického stanovení dostupné. Z tohoto důvodu byl postup přípravy vzorku optimalizován tak, aby bylo možné jedním zpracováním 100 μl vzorku stanovit, jak polární analyty (nativní a modifikovaný HA), tak nepolární látky (léčiva – DOX, DOXol). Při výběru vhodného extračního postupu se brala v úvahu jeho opakovatelnost a intenzita signálu jednotlivých analytů ve spikovaných vzorcích. Navržená příprava vzorku pro kvantifikaci ^{13}C -HA, HA-C18:1 a DOX, DOXol se sestávala ze tří kroků: degradace proteinů, depolymerizace HA a extrakce nepolárních látek. Pořadí jednotlivých kroků muselo být optimalizováno (Obr. 17). Degradace proteinů je klíčovým krokem při analýze ^{13}C -HA a HA-C18:1, jelikož zejména HA-C18:1 s nimi silně interaguje [38]. Nejvyšší signály HA-C18:1 a DOX, DOXol vykazoval postup, kdy nejprve byla provedena extrakce nepolárních látek, poté degradace proteinů a nakonec

depolymerizace ^{13}C -HA (HA-C18:1). Tento postup stejně jako postupy, kdy byl krok degradace proteinů vynechán, nevykazoval při stanovení HA-C18:1 dobrou opakovatelnost. Proto bylo vybráno pořadí, kdy jsou nejprve proteázou neštěpeny proteiny, poté je degradován HA (^{13}C -HA, HA-C18:1) a nakonec jsou extrahovány nepolární látky. Výhodou tohoto postupu byla dobrá opakovatelnost při stanovení ^{13}C -HA, HA-C18:1 i DOX, DOXol. Nevýhodou byla skutečnost, že v prvním kroku při štěpení proteinů byl DOX, jako termolabilní látka, z 30 % degradován. Kromě sníženého signálu DOX nemělo však zařazení tohoto kroku vliv na stanovení DOX. Kalibrační roztoky totiž byly připravovány ve stejné matici a zpracovány stejným způsobem jako analyzované vzorky.

Složení extrakčního činidla bylo optimalizováno tak, aby výtěžnost pro DOX byla co nejvyšší. Byla vybrána směs organických rozpouštědel (CHCl_3 :MeOH (4:1, v/v)). Přidání s vodou nemísitelného organického rozpouštědla umožnilo rozdělení vzorku na dvě fáze. Chloroformová fáze byla použita k analýze nepolárních látek (DOX, DOXol), zatímco vodná fáze byla použita pro stanovení polárních analytů (^{13}C -HA, HA-C18:1). Přídavek nepolárního rozpouštědla dále zajistil, že došlo k narušení nepolárních interakcí hydrofobních částí proteinů a HA-C18:1.



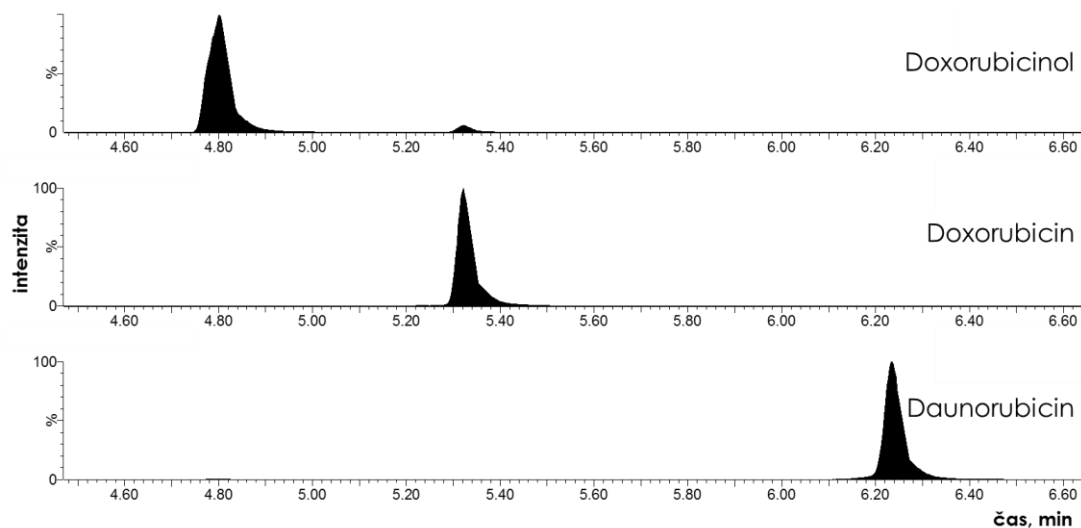
Obr. 17 Optimalizace přípravy vzorku pro analýzu DOX a HA-C18:1. (A) Výběr extrakčního činidla pro extrakci DOX z plasmy (50 μl vzorku (50 ng ml^{-1}) + 900 μl extrakčního činidla). (B) Optimalizace posloupnosti jednotlivých kroků přípravy vzorku plasmy (D – enzymatická degradace HA, E – extrakce DOX, P – štěpení proteinů proteasou).

Při depolymerizaci HA-C18:1 s *DS* 10 % enzymem SpHyl dochází k tvorbě modifikovaných a nemodifikovaných disacharidů HA v poměru 1:9 (Obr. 16). Ačkoliv nemodifikovaných disacharidů je na konci depolymerizace 9krát víc než disacharidů modifikovaných, bylo pro kvantifikaci HA-C18:1 zvolena LC-MS analýza $\Delta\text{AN}_2\text{-C18:1}$.

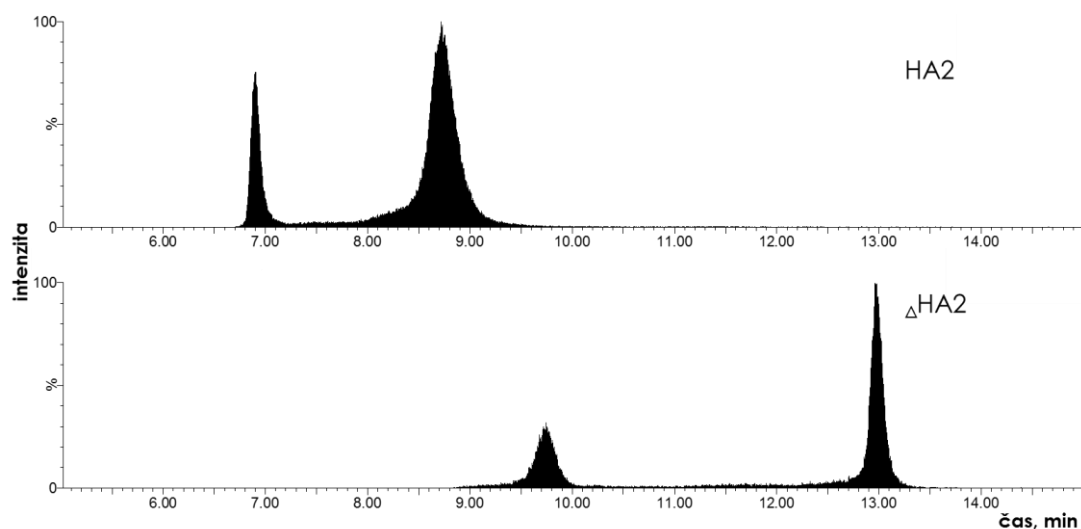
Analýza Δ AN2-C18:1 je citlivější a není zatížena interferencemi, jako analýza Δ AN2. Vzhledem k tomu, že HA je nativně přítomen ve všech živočišných tkáních, stanovení exogenní Δ AN2 je ovlivňováno endogenním HA. Δ AN2-C18:1 se v organismu nevyskytuje a LC-MS analýza tohoto fragmentu HA-C18:1 je tak specifičtější než analýza Δ AN2. Ze stejného důvodu je výhodné pro LC-MS stanovení exogenního HA využít ^{13}C -značení.

5.2.3 Chromatografická separace doxorubicinu, doxorubicinolu, nenasyceného disacharidu hyaluronanu, nenasyceného disacharidu oleyl-modifikovaného hyaluronanu

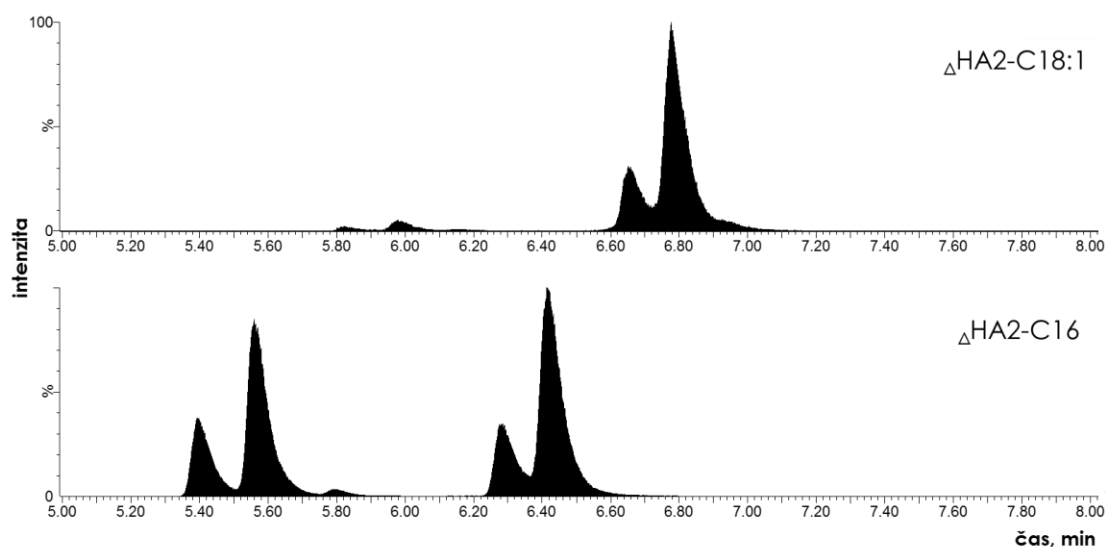
LC-MS kvantifikace DOX, DOXol, ^{13}C -HA a HA-C18:1 v biologických vzorcích byla provedena pomocí metody vnitřního standardu. Pro DOX a DOXol byl jako vnitřní standard vybrán Daunorubicin (DAU), pro Δ AN2 nasycený disacharid HA (AN2) a pro Δ AN2-C18:1 palmitoyl-modifikovaný disacharid (Δ AN2-C16). Separace byly provedeny pomocí RPLC. DOX, DOXol a DAU byly separovány na koloně C₁₈ (Obr. 18), separace nemodifikovaných disacharidů proběhla na koloně C₁₂ (Obr. 19) a modifikované disacharidy byly separovány na koloně C₄ (Obr. 20).



Obr. 18 Chromatografická separace DOX, DOXol a DAU pomocí gradientové eluce (0,1% kys. mravenčí, acetonitril) na koloně Acquity BEH C₁₈ (2,1x50 mm) (Waters, Wilmslow, Velká Británie).



Obr. 19 Chromatografická separace AN2 a Δ AN2 pomocí gradientové eluce (0,1% kys. mravenčí, methanol) na koloně Jupiter Proteo 90A C₁₂ (4,6x250 mm) (Phenomenex, Torrance, USA).



Obr. 20 Chromatografická separace Δ AN2-C18:1 a Δ AN2-C16 pomocí gradientové eluce (0,1% kys. mravenčí, acetonitril) na koloně Acquity BEH C₄ (2,1x150 mm) (Waters, Wilmslow, Velká Británie).

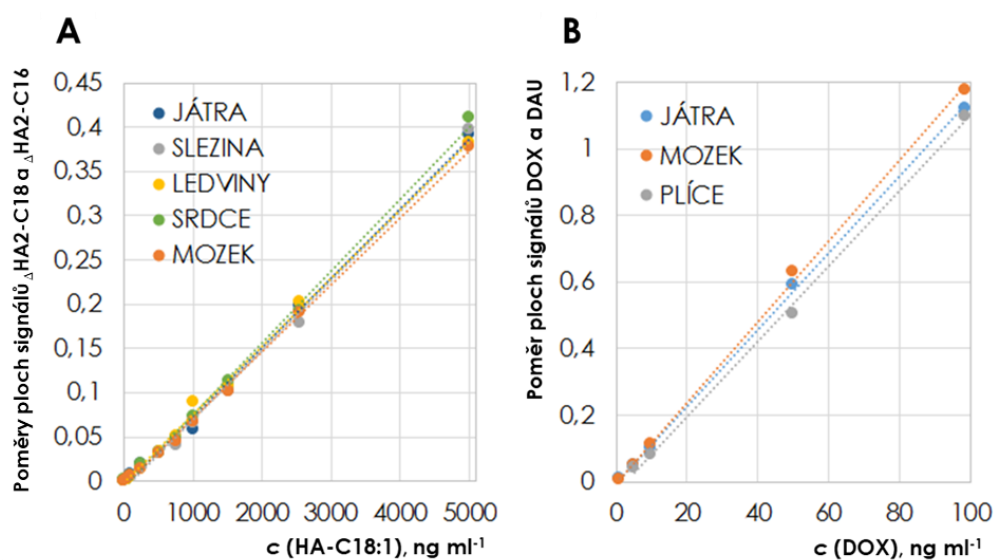
Rozdvojení píků u nativních a modifikovaných disacharidů a GlcNAc je dáno přítomností redukujícího konce, kdy u těchto analytů existují dvě populace molekul ve dvou konformacích, v otevřené nebo uzavřené konformaci. Další rozdvojení píků u modifikovaných oligosacharidů je dáno tím, že chemická modifikace oleylem a

palmitoylem není uniformní a nevyskytuje se tedy pouze na jedné konkrétní ze čtyř hydroxylových skupin.

5.2.4 Validace LC-MS metody

Vyvinutá metoda stanovení DOX, DOXol, ^{13}C -HA a HA-C18:1 měla být využitelná pro analýzu všech myších tkání, avšak validace metody je časově náročný proces. Z tohoto důvodu bylo nejprve ověřeno, jak je výsledek stanovení závislý na matrici a ředění vzorku. Bylo připraveno několik kalibračních řad v různých typech myších tkání (játra, slezina, ledviny, mozek a srdce) (Obr. 21) a při různém množství homogenátu (30, 50, 200 a 300 mg ml⁻¹) (

Tab. VIII). Naměřené kalibrační přímky se shodovaly, typ myší tkáně a koncentrace homogenátu neměly výrazný vliv na analytické stanovení. Případný vliv matrice byl navíc vždy kompenzován tím, že při kvantifikaci DOX, DOXol, ^{13}C -HA a HA-C18:1 byly kalibrační roztoky připraveny ve stejné matrici, která příslušela zkoumaným vzorkům.



Obr. 21 Ověření LC-MS metody – stanovení v různých orgánech.

Tab. VIII Ověření LC-MS metody – stanovení HA-C18:1 v různých orgánech, při rozdílném množství homogenátu provedená různými analytiky.

tkáň	množství vzorku v homogenátu, mg ml ⁻¹	směrnice	úsek	R ²
játra	30	7,85E-05	-0,006	0,9970
slezina	50	7,86E-05	-0,009	0,9940
ledviny	50	7,73E-05	-0,002	0,9970
srdce	50	8,15E-05	-0,006	0,9970
mozek	50	7,57E-05	-0,005	0,9980
plice	200	7,53E-05	-0,00037	0,9981
mozek	300	7,36E-05	-0,00140	0,9977

Validace analytické metody pro stanovení DOX, DOXol, ¹³C-HA a HA-C18:1 tak byla provedena pouze v jedné matrici, kterou byl homogenát jater dle doporučení FDA [150]. Základní validační parametry jako spodní limit kvantifikace (LLOQ), preciznost a pravdivost byly stanoveny analýzou vzorků homogenátu jater s přidavkem DOX, DOXol, ¹³C-HA a HA-C18:1 (Tab. IX). LLOQ pro DOX a DOXol byl na úrovni kolem 5 ng ml⁻¹, v případě ¹³C-HA 50 ng ml⁻¹ a HA-C18:1 100 ng ml⁻¹. Linearita byla ověřena v rozmezí koncentrací HA-C18:1 a ¹³C-HA 50-15000 ng ml⁻¹ v případě DOX, DOXol v rozmezí 5-1000 ng ml⁻¹.

Tab. IX Validační charakteristiky LC-MS stanovení DOX, DOXol, HA C18:1 a ¹³C-HA. LLOQ značí spodní limit kvantifikace, QC1-QC3 značí tři různé koncentrační hladiny vzorků plasmy se známým množstvím analytu

	LLOQ		QC1		QC2		QC3	
koncentrace, ng ml ⁻¹	5		10		100		500	
analyt	DOXol	DOX	DOXol	DOX	DOXol	DOX	DOXol	DOX
průměr ± SD (n=6)	4,94 ± 0,07	5,01 ± 0,07	10,77 ± 0,71	9,83 ± 0,48	91,3 ± 2,1	95,8 ± 1,9	505,3 ± 13,6	471,0 ± 26,4
preciznost	1,5%	1,3%	6,5%	4,9%	2,3%	2,0%	2,7%	5,6%
pravdivost	98,8%	100,3%	107,7%	98,3%	91,3%	95,8%	101,1%	94,2%

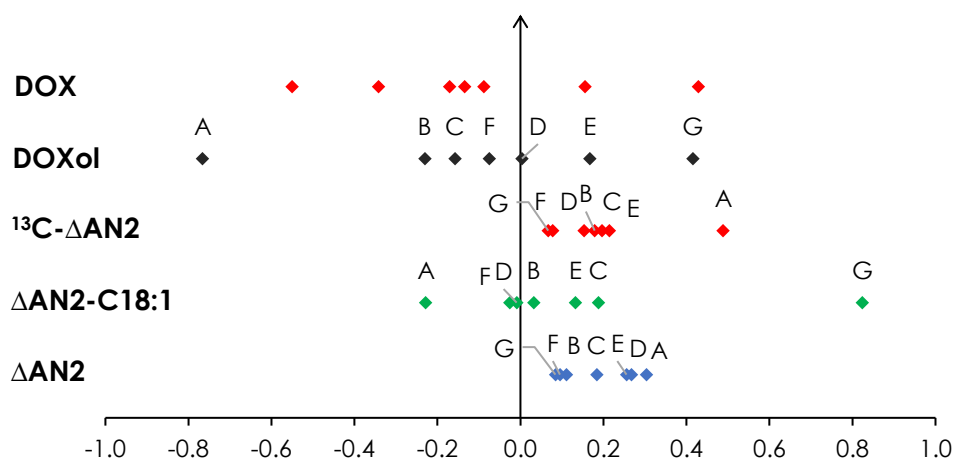
	LLOQ		QC1		QC2		QC3	
koncentrace, ng ml ⁻¹	0,10	0,05	0,25	0,10	1,0		10,7	
analyt	HA-C18:1	¹³ C-HA	HA-C18:1	¹³ C-HA	HA-C18:1	¹³ C-HA	HA-C18:1	¹³ C-HA
průměr ± SD (n=6)	0,10 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,24 ± 0,03	0,11 ± 0,01	1,09 ± 0,04	1,02 ± 0,14	11,4 ± 0,08	11,05 ± 0,51
preciznost	14,70%	11,90%	13,60%	4,96%	3,70%	13,72%	7,20%	4,59%
pravdivost	98,2%	102,0%	95,6%	107,3%	107,0%	102,0%	107,0%	103,30%

Stabilita DOX a DOXol v biologických vzorcích je v literatuře dobře popsána [161,162]. Publikovaná data uvádí, že DOX a DOXol jsou při skladování v -80°C stabilní po dobu několika měsíců, což vyhovuje potřebám plánované aplikace dané metody. Stabilita nebyla v rámci validace metody ověřována. Pro stanovení stability ¹³C-HA HA-C18:1 byly vzorky plasmy a homogenátu jater (100 mg ml⁻¹) s koncentrací 1,05; 10,5 a 1050 ng ml⁻¹ uskladněny při -80°C a po třech týdnech analyzovány. Výtěžnost HA-C18:1 ve vzorcích plasmy byla (103,5 %; 100,0 % a 92,8 %) pro ¹³C-HA pak (100,0 %; 107,0 %; 102,8 %). Podobných výsledků bylo dosaženo u vzorků homogenátu jater, kde výtěžnost pro HA-C18:1 byla 99,8 %; 85,0 % a 86,5 % a pro ¹³C-HA 99,3 %; 97,3 %; 103,9 %. Rozdíl mezi koncentrací v čerstvě připraveném a v tři týdny skladovaném vzorku nebyl vyšší než ±15% nominální koncentrace HA-C18 a ¹³C-HA. HA-C18 a ¹³C-HA v plasmě a homogenátu jater tak lze považovat při třítýdenním skladování v -80°C za dostatečně stabilní.

Robustnost metody byla testována na sedmi parametrech (množství proteasy, množství hyaluronidasy, čas degradace HA, množství extrakčního činidla, čas extrakce, pH a *DS* derivátu použitého ke kalibraci při stanovení HA-C18:1) s využitím Youdenova testu [151] (Tab. X). Metoda byla vysoce robustní pro stanovení téměř všech analytů vůči téměř všem testovaným parametrům (Obr. 22). Kritickým parametrem se ukázal být *DS* derivátu použitého ke kalibraci a stanovení koncentrace HA-C18:1. Při kvantifikaci HA-C18:1 je třeba v kalibraci využít nejlépe stejnou šarži derivátu HA, který byl zvířatům (buňkám) aplikován.

Tab. X Faktoriální design analytických parametrů při stanovení robustnosti analytické metody Youdenovým testem.

Faktory	Číslo experimentu							
	1	2	3	4	5	6	7	8
(A) množství proteasy	45 μ l	45 μ l	45 μ l	45 μ l	35 μ l	35 μ l	35 μ l	35 μ l
(B) množství hyaluronidasy	2,2 μ l	2,2 μ l	1,8 μ l	1,8 μ l	2,2 μ l	2,2 μ l	1,8 μ l	1,8 μ l
(C) čas degradace HA	35 min	25 min	35 min	25 min	35 min	25 min	35 min	25 min
(D) množství extrakčního činidla	925 μ l	925 μ l	875 μ l	875 μ l	875 μ l	875 μ l	925 μ l	925 μ l
(E) čas extrakce	2,2 min	1,8 min	2,2 min	1,8 min	1,8 min	2,2 min	1,8 min	2,2 min
(F) pH	8,2	7,6	7,6	8,2	8,2	7,6	7,6	8,2
(G) DS derivátu	12,0 %	8,0 %	8,0 %	12,0 %	8,0 %	12,0 %	12,0 %	8 %



Obr. 22 Vyhodnocení robustnosti metody. Jednotlivé body reprezentují testované parametry analytické metody a tečkované čáry vyznačují intervaly spolehlivosti ($\alpha=5\%$)

Vyvinutá metoda analýzy LC-MS umožňuje kvantifikovat při jednom zpracování velmi malého objemu vzorku (100 μ l) hydrofobní léčiva a nativní nebo chemicky modifikovaný HA. Metoda byla validována pro stanovení DOX, DOXol, ^{13}C -HA a HA-C18:1, principiálně lze však metodu použít pro analýzu jiných hydrofobních léčiv, neznačeného HA či jinak modifikované HA. Pomocí stanovení koncentrace derivátu HA, tvořícího polymerní nosič, a hydrofobního léčiva, který je na nosič navázán, lze nejen stanovit účinnost nosiče, ale lze sledovat stabilitu nosiče v organismu a jeho eliminaci.

5.3 Studium polymerních micel z oleyl-modifikovaného hyaluronanu nesoucí cytostatikum doxorubicin po intravenózní aplikaci

Vyvinutá LC-MS metoda kvantifikace DOX a HA-C18:1 byla použita pro studium polymerního nosiče tvořeného HA-C18:1 a nesoucího cytostatikum DOX. Analýza různých tkání umožnila přímo sledovat koncentraci DOX a HA-C18:1 a pomohla objasnit osud nosiče v organismu po intravenózní aplikaci. Farmakokinetika, účinnost a stabilita nosiče byla studována na myších s prsním nádorem. Studie zahrnovala celkem 132 pokusných zvířat, které byly náhodně rozděleny do čtyř skupin (A, B, C, D) a byl jim intravenózně aplikován DOX ($3,5 \text{ mg kg}^{-1}$) ve čtyřech různých formách. Myšim ze skupiny A byl injektován roztok volného DOX v PBS. Skupině B byl nejprve aplikován roztok prázdných micel HA-C18:1 v dávce 50 mg kg^{-1} a po 10 minutách roztok volného DOX v PBS. Myšim ze skupiny C byl aplikován roztok polymerních micel HA-C18:1 nesoucích DOX. Skupině D byl nejprve podán roztok HMW ^{13}C -HA a po 10 minutách stejný roztok polymerních micel jako u skupiny C.

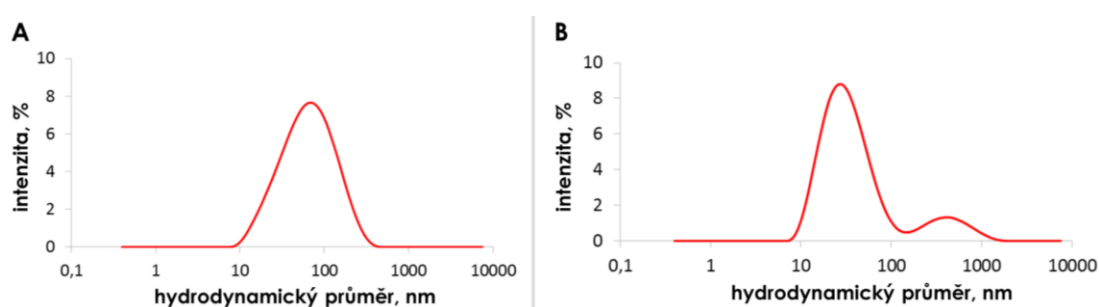
Studie byla navržena tak, aby byl posouzen pozitivní vliv polymerního nosiče na stabilitu DOX a jeho cílenou distribuci do nádorové tkáně. Ve snaze maximalizovat cílenou distribuci DOX byl skupině D aplikován HMW ^{13}C -HA, který by měl saturovat metabolismus HA v jaterních endoteliálních buňkách [163] a zpomalit tak rychlost eliminace HA-C18:1 z organismu. Dalším cílem této farmakokinetické studie bylo ověřit biodegradabilitu a stanovit rychlost eliminace HA-C18:1.

5.3.1.1 Charakterizace polymerní micely z oleyl-modifikovaného hyaluronanu nesoucí cytostatikum doxorubicin

Prsní nádor typu 4T1 vykazuje vysokou míru exprese HA receptoru CD44 [164]. Z tohoto důvodu byl pracovníky z firmy Contipro a.s. navržen polymerní nosič z hydrofobizovaného HA, který by se měl vázat na receptor CD44, čímž by mělo být dosaženo vyšší akumulace DOX v nádoru a účinnější léčby. Pro potřeby testu účinnosti *in vivo* a studia farmakokinetiky byly polymerní micely nesoucí DOX připraveny metodou odpaření rozpouštědla. DOX rozpuštěný v rozpouštědle nemísitelném s vodou a HA-C18:1 rozpuštěný ve vodě vytvořily emulzi. Po odpaření rozpouštědla vznikly polymerní micely, které ve svých hydrofobních doménách měly nekovalentně navázaný DOX. Množství navázaného DOX v HA-C18:1 micelách bylo stanoveno pomocí

vyvinuté LC-MS metody. Rozpuštěním micel v propan-2-olu byla narušena jejich struktura, uvolnil se z nich DOX, jehož koncentrace v roztoku byla stanovena. Množství navázaného DOX v micelách bylo 7,0 % (w/w).

Velikost získaných micel byla charakterizována pomocí dynamického rozptylu světla. Velikost polymerních micel s nekovalentně navázaným DOX je přibližně dvakrát menší (35 nm) než prázdné micely z HA-C18:1 (79 nm) (Obr. 23). Negativní hodnoty zeta potenciálu polymerních micel změřené ve vodném roztoku ukazují, že povrch micel nese negativní náboj, což je způsobeno přítomností karboxylových skupin ve struktuře HA.

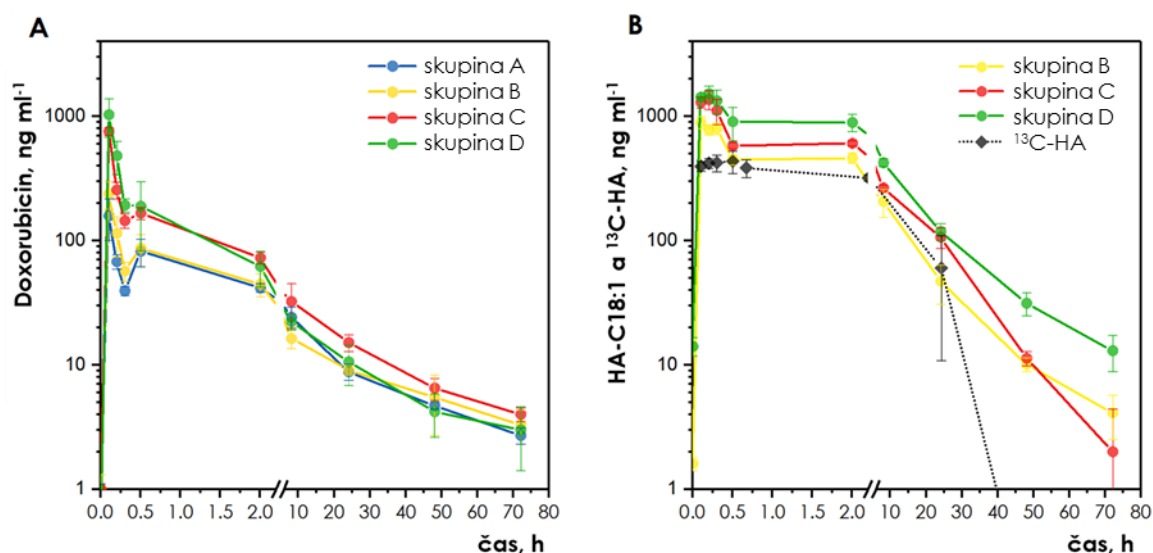


vzorek	hydrodynamický průměr, nm ^a	PDI*	zeta potenciál, mV
satmotný HA-C18:1	79	0,3	-22
micela HA-C18:1 s DOX	35 a 465 ^b	0,3	-23

Obr. 23 Distribuce hydrodynamického průměru (A) prázdných micel a (B) micel nesoucích DOX 7 % (w/w). Stanoveno při koncentraci micel 1 mg ml⁻¹, ^a stanoveno pomocí dynamického rozptylu světla, ^b Byly pozorovány dvě množiny částic s různou velikostí – množina menších částic reprezentuje micely s DOX, množina větších částic pak reprezentuje agregáty micel. * PDI (polydispersity index) definovaný jako (s.d./průměr)².

5.3.1.2 Farmakokinetika Doxorubicinu

Pomocí vyvinuté LC-MS byla kvantifikována koncentrace cytostatika v plasmě a tkáních po *i.v.* aplikaci DOX ve čtyřech různých formách (A-D). Výsledné farmakokinetické profily v plasmě a tkáních jsou uvedeny na Obr. 24A a Obr. 25. Z těchto farmakokinetických křivek byly vyhodnoceny základní farmakokinetické parametry uvedené v Tab. XI a Tab. XII.



Obr. 24 Farmakokinetické profily (A) DOX, (B) HA-C18:1 a ^{13}C -HA v plasmě. Skupina A – DOX hydrochlorid rozpuštěný v PBS; Skupina B – DOX hydrochlorid rozpuštěný v PBS aplikovaný 10 min po *i.v.* aplikaci prázdných micel HA-C18:1; Skupina C – DOX navázaný v micelách HA C18:1 a Skupina D – stejná dávka jako u Skupina C aplikovaná 10 min po *i.v.* aplikaci ^{13}C -značené HMW HA. Plné čáry reprezentují koncentraci HA-C18:1 a DOX, tečkované čáry reprezentují koncentraci ^{13}C -HA.

Tab. XI Základní farmakokinetické parametry DOX v plasmě po *i.v.* aplikaci DOX v dávce $3,5 \text{ mg kg}^{-1}$ ve čtyřech různých formách (Skupina A-D).

	Skupina A	Skupina B	Skupina C	Skupina D
c_{MAX} , ng ml $^{-1}$	159 ± 58	239 ± 60	759 ± 54	1034 ± 353
k_{initial} , h $^{-1}$	5,2 ± 1,7	5,5 ± 1,1	6,2 ± 2,4	6,5 ± 0,9
c_0 , ng ml $^{-1}$	208 ± 96	339 ± 97	1010 ± 691	1637 ± 96
$t_{1/2 \text{ initial}}$, h	7,9 ± 3,9	7,5 ± 2,0	6,7 ± 4,2	6,4 ± 0,8
$t_{1/2 \text{ terminal}}$, h	28,1 ± 1,1	34,3 ± 3,6	26,0 ± 6,3	26,2 ± 5,7
AUC, ng h ml $^{-1}$	830	790	1340	1110
CL, ml h $^{-1}$ /100 g	412	437	260	266
V_d , ml/100 g	2770 ± 1120	1330 ± 150	413 ± 41	313 ± 105

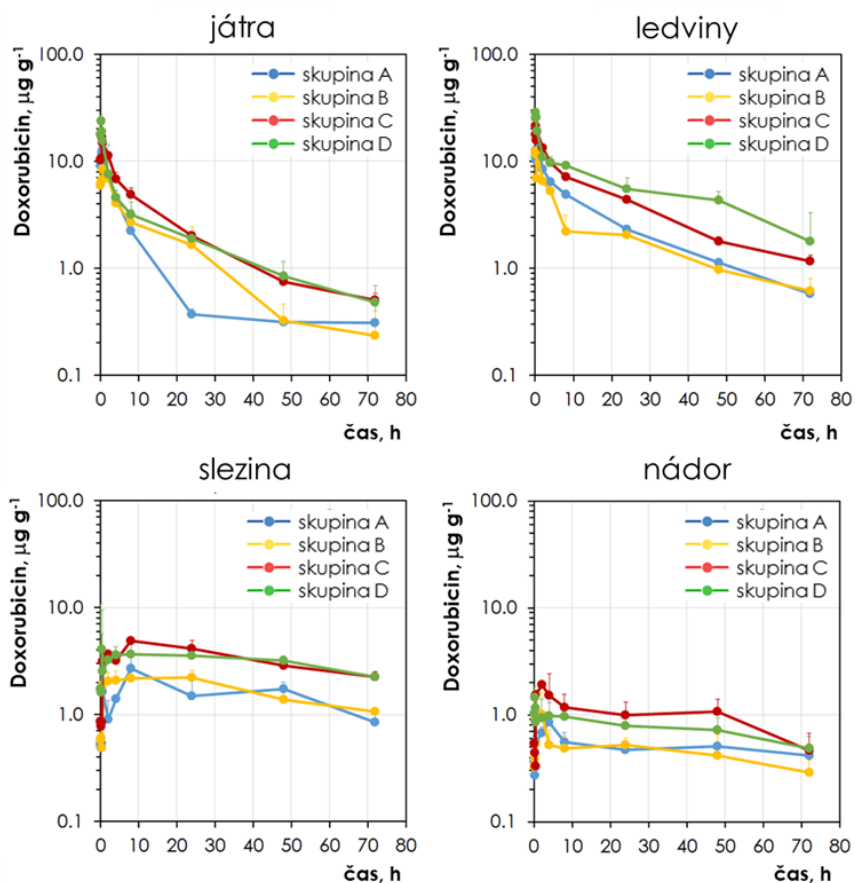
Koncentrace DOX v plasmě a tkáních klesala velmi rychle nezávisle na tom, v jaké formě byl DOX do těla myši aplikován. Nejvyšší koncentrace DOX v plasmě byla pozorována u skupiny C a D, kterým byl aplikován DOX ve formě micel. Hlavní rozdíl byl patrný během prvních deseti (Skupina C) a dvaceti minut (Skupina D) od podání, kde byly

vyhodnocené plochy pod křivkou (*AUC*) 1,6x (Skupina C) a 1,3x (Skupina D) větší ve srovnání se skupinou, které byl aplikován volný DOX v roztoku PBS (Skupina A). Kromě zvýšené koncentrace v plasmě měla aplikace DOX ve formě polymerních micel za následek pomalejší eliminaci DOX z krevního řečiště a vyšší koncentraci ve sledovaných tkáních a nádoru. Ve srovnání se skupinou B, které byl injektován volný DOX a prázdné micely HA-C18:1, vykazovaly skupiny s DOX navázaným do polymerních micel rovněž nižší hodnoty Clearance (*Cl*), tedy nižší rychlost eliminace DOX z plasmy. Tyto výsledky jednoznačně ukazují pozitivní vliv polymerní micely z HA-C18:1 na stabilitu hydrofobního léčiva, podobně jak bylo pozorováno u jiných nanomateriálových nosičů [165,166].

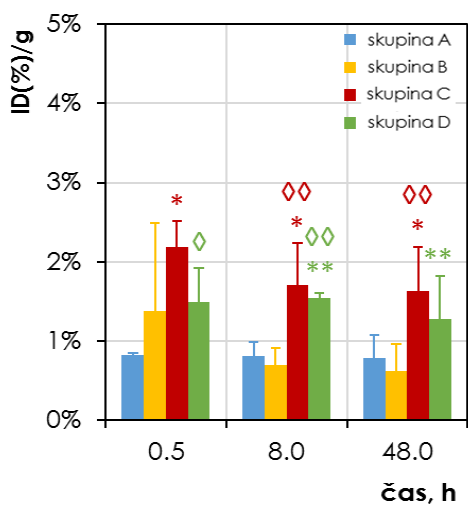
Tab. XII Poměry (h ml^{-1}) mezi $AUC_{0-72\text{h}}$ a aplikovanou dávkou DOX aplikovaného ve čtyřech různých formách (Skupina A-D).

tkáň	Skupina A	Skupina B	Skupina C	Skupina D
plasma	0,01	0,01	0,02	0,02
játra	1,18	1,57	2,53	1,95
ledviny	2,59	2,03	4,31	6,87
slezina	1,67	1,86	3,65	3,96
tumor	0,52	0,50	1,07	0,93

Nejvyšší koncentrace u všech způsobů aplikace DOX byla naměřena v ledvinách a slezině, nejnižší v nádorové tkáni. Je zajímavé, že distribuce DOX do nádorové tkáně nebyla podpořena aplikací HMW ^{13}C -HA, která saturovala metabolismus HA. Stejně tak nebyl pozorovaný statisticky významný rozdíl mezi tím, zda se podá samotný DOX nebo DOX s prázdnými micelami HA-C18:1 (Obr. 26). DOX je pravděpodobně eliminován jiným mechanismem než HA a HA-C18:1 a saturace těchto metabolických cest nemá na rychlost eliminace DOX vliv. Souhrn změřených koncentrací DOX v plasmě a v tkáních je uveden v Tab. XIV.



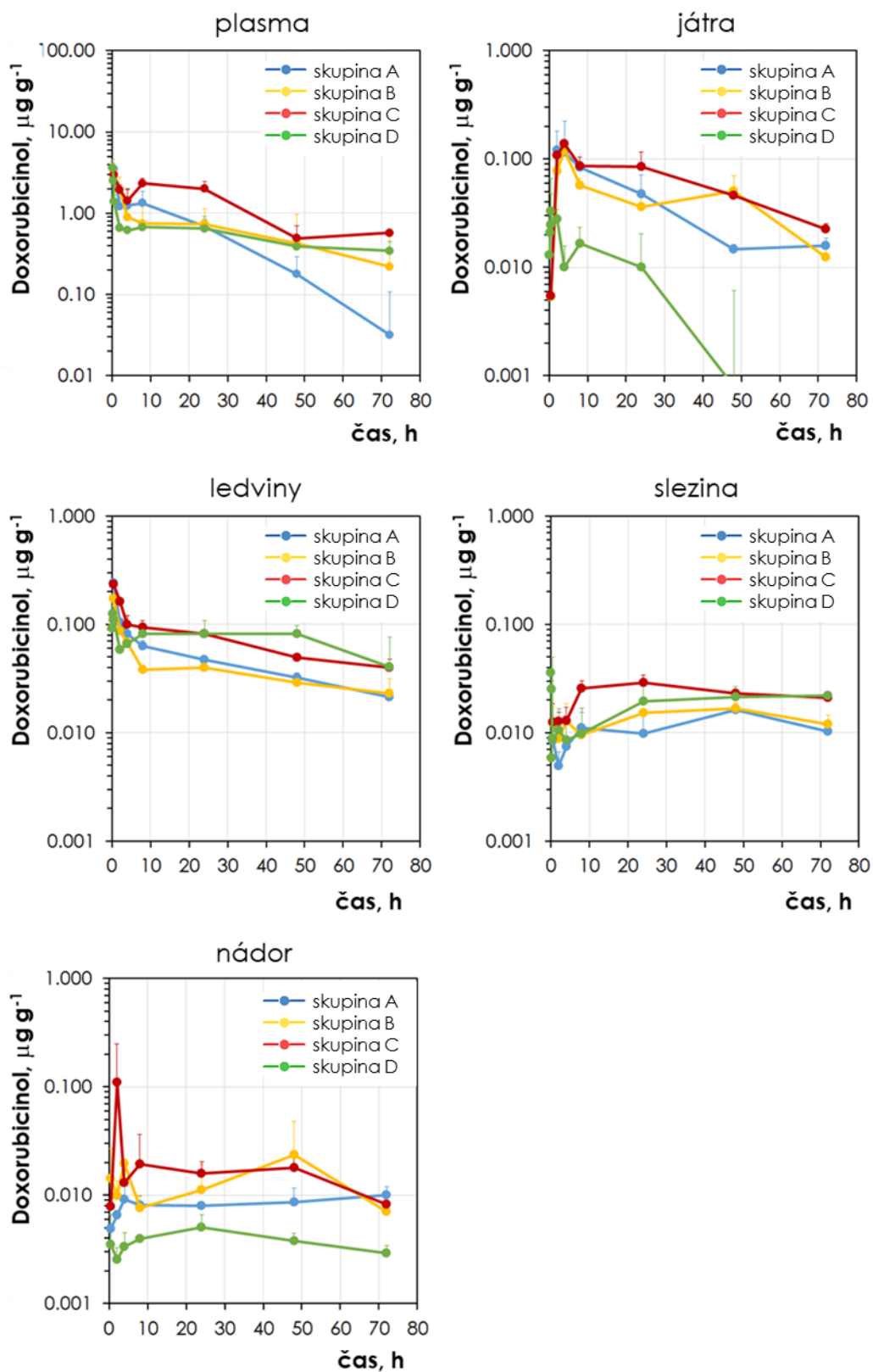
Obr. 25 Koncentrace DOX v játrech, ledvinách, slezině a nádoru po *i.v.* aplikaci DOX ve čtyřech různých formách (Skupina A-D). V každé skupině bylo 33 myší, 3 myši na každý časový interval.



Obr. 26 Akumulace DOX v nádorové tkáni. Každý sloupec označuje průměrnou hodnotu \pm směrodatná odchylka ($n=3$ pro každou skupinu). * $p < 0,1$, ** $p < 0,05$ vs. Skupina A a $\diamond p < 0,1$, $\diamond\diamond p < 0,05$ vs. Skupina B ve stejném časovém intervalu.

5.3.1.2.1 Metabolity doxorubicinu

Metabolizace DOX je v literatuře dobře popsána [167]. Uvádí se, že polovina z *i.v.* aplikovaného množství je eliminována v nezměněné formě, druhá polovina je metabolizována sérií několika metabolických procesů až na sulfatované a glukurované metabolity, které jsou vyloučeny močí [168]. V játrech nádorových myší, kterým byl aplikován volný DOX (Skupina A) nebo DOX navázaný do micel (Skupina C) byly detekovány čtyři metabolity DOX. V játrech myší ze skupiny C byl obsah metabolitů o něco vyšší, i když tento rozdíl nebyl vždy statisticky významný. Z hlediska toxikologických vlastností má smysl sledovat pouze koncentraci hlavního redukovaného metabolitu DOXol, který je jako jediný kardiotoxický [168]. Na rozdíl od DOX nebyly zaznamenány žádné významné rozdíly v eliminační kinetice a biodistribuci DOXol mezi čtyřmi skupinami myší (Obr. 27). Farmakokinetický profil DOXol je nezávislý na formě podávání DOX a polymerní micela nemá na kardiotoxické účinky léčby pomocí DOX vliv.



Obr. 27 Koncentrace DOXol v plasmě, játrech, ledvinách, slezině a nádoru po *i.v.* aplikaci DOX ve čtyřech různých formách (Skupina A-D). V každé skupině bylo 33 myši, 3 myši na každý časový interval.

5.3.1.3 Farmakokinetika oleyl-modifikovaného hyaluronanu

Charakteristika studovaných nosičů léčiv v protinádorové léčbě se většinou omezuje na stanovení farmakokinetiky neseného léčiva a vlivu nanomateriálového nosiče na distribuci léčiva do nádorové tkáně. Ojedinelost prezentované studie spočívá ve stanovení farmakokinetiky materiálu, který tvoří vlastní nanomateriálový nosič. Samotné stanovení farmakokinetiky DOX mnoho neříká o stabilitě a biokompatibilitě studovaného nosiče z modifikovaného HA. Metabolismus chemicky modifikovaného HA je navíc oblast, která v literatuře není téměř vůbec popsána a osud modifikovaného HA v organismu zůstává neobjasněn. Z těchto důvodů byla vyvinuta metoda přímé kvantifikace HA-C18:1 pomocí LC-MS. Pomocí ní byla stanovena koncentrace HA-C18:1 a ^{13}C -HA v plasmě a tkáních po *i.v.* aplikaci HA-C18:1 ve třech různých formách. Farmakokinetické profily HA-C18:1 pro jednotlivé formy aplikace jsou uvedeny na Obr. 24B. Z těchto závislostí byly vyhodnoceny základní farmakokinetické parametry uvedené v Tab. XIII. Souhrn změřených koncentrací HA-C18:1 v plasmě a v tkáních je uveden v Tab. XV.

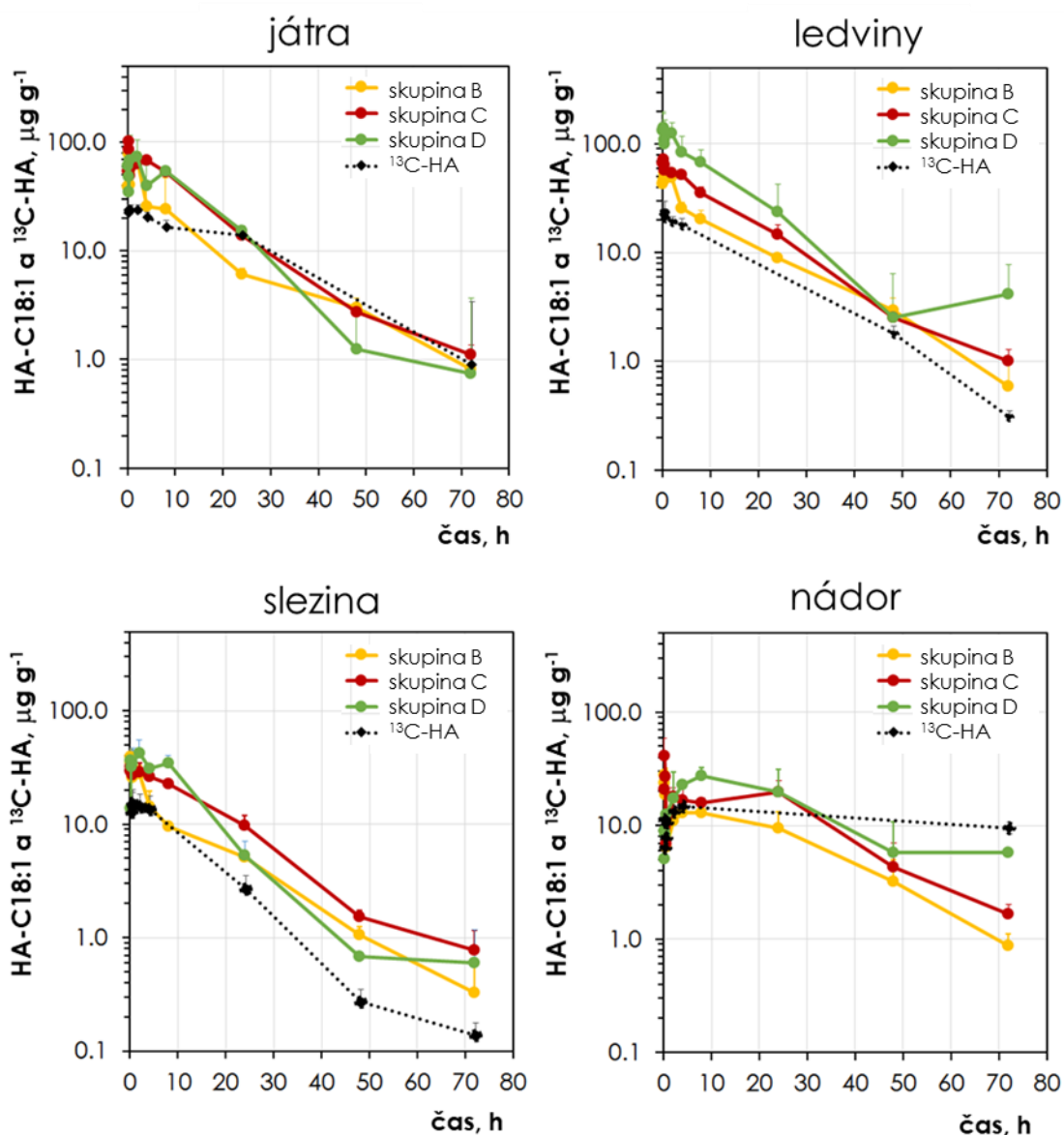
Tab. XIII Farmakokinetické parametry HA C18:1 a ^{13}C -HA v plasmě po *i.v.* aplikaci myším s prsním nádorem.

	HA-C18:1			^{13}C -HA
	Skupina B	Skupina C	Skupina D	Skupina D
C_{\max} , $\mu\text{g ml}^{-1}$	894 ± 99	1367 ± 239	1523 ± 227	436 ± 89
t_{\max} , min	5	10	10	30
$t_{1/2 \text{ terminal}}$, h	$11,0 \pm 1,1$	$8,8 \pm 0,4$	$12,0 \pm 1,1$	-
AUC , $\mu\text{g h ml}^{-1}$	5580	8470	12400	7970
Cl , $\text{ml h}^{-1}/100 \text{ g}$	0,88	0,62	0,42	0,30
V_d , $\text{ml}/100 \text{ g}$	$5,64 \pm 0,57$	$3,74 \pm 0,61$	$3,36 \pm 0,32$	$5,89 \pm 0,65$

Nejvyšší koncentrace HA-C18:1 v plasmě byla stanovena po 5-10 min od podání, kinetika eliminace byla poměrně pomalá s poločasem eliminace v řádu několika hodin (Obr. 28). V plasmě a ve všech sledovaných tkáních byl pozorován rozdíl mezi rychlostí eliminace prázdných micel a micel s navázaným DOX. Prázdné micely vykazovaly nižší koncentrace HA-C18:1 a kratší časy eliminace. Tento rozdíl je pravděpodobně dán

rozdílnou velikostí a stabilitou micel, kdy navázání hydrofobního DOX micelu pravděpodobně stabilizuje, což má za následek i její vyšší kompaktnost.

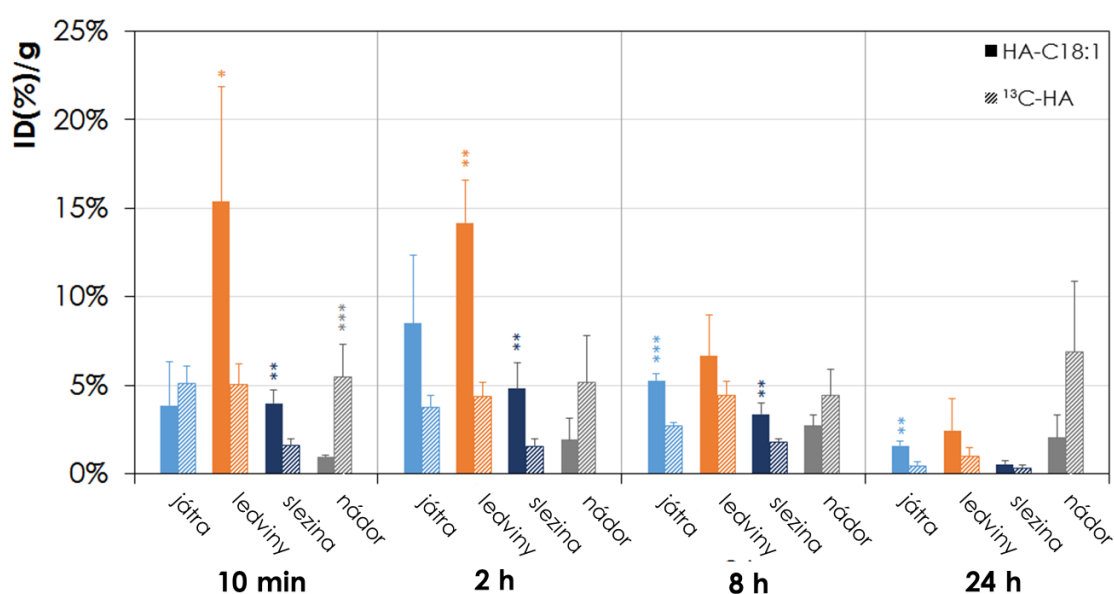
Nejvyšší akumulace HA C18:1 v tkáních byla pozorována 10 minut od podání v játrech 11,5 ID(%) /g (procenta injektované dávky na 1 gram tkáně) a ledvinách 8,2 ID(%) /g, následovaných slezinou 3,6 ID(%) /g (Obr. 29). Výsledky se liší od distribuce radioaktivity ^{99m}Tc značených HA derivátů 2 hodiny po podání. Nejvyšší koncentrace ^{99m}Tc značeného konjugátu HA s paclitaxelem (~200 kDa) byla pozorována v játrech a slezině, a to 43,0 a 40,7 ID(%) /g, zatímco akumulace v ledvinách byla malá (1,9 ID(%) /g) [169]. Scintigrafické měření ukazovalo rychlou eliminaci konjugátu esteru ^{99m}Tc -HA s kyselinou máselnou (85 kDa, DS 6%) z krevního oběhu a vysokou akumulaci v játrech (15,8 ID(%) /g) a slezině (11,7 ID(%) /g) [170]. Předpokládá se, že lipofilní látky budou distribuovány do jater a sleziny. S přihlédnutím k lipofilně navázaných substituentů (oleát, paclitaxel, butyrát). HA-C18:1 je nejvíce lipofilním konjugátem HA z výše uvedených. Navzdory této skutečnosti se však HA-C18:1 akumuloval v ledvinách místo ve slezině. Pozorování lze vysvětlit tím, že hydrofobní oleát je lokalizován v jádře micely, agregované oleylové řetězce s obalem tvořeným z hydrofilního HA pak mohou být v těle distribuovány podobně jako hydrofilní molekuly. Dalším možným vysvětlením rozporu pozorovaných výsledků s publikovanými studiemi může být různá molekulová hmotnost derivátů. Endotheliální buňky jater, které jsou považovány za hlavní místo metabolisme HA mají totiž vyšší afinitu k HA s vyšší M_w [171]. Rozdíl může být také způsoben jinou dávkou nebo použitým zvířecím modelem, případně patologickým stavem použitých zvířat [172]. Souhrn změřených koncentrací ^{13}C -HA v plasmě a v tkáních je uveden v Tab. XV.



Obr. 28 Koncentrace HA-C18:1 v játrech, ledvinách, slezině a nádoru po i.v. aplikaci HA-C18:1 ve třech různých formách. Skupina B – aplikace DOX v PBS 10 min následovaná aplikací prázdných micel HA-C18:1; Skupina C – polymerní micela HA-C18:1 nesoucí DOX a Skupina D – stejný roztok jako u skupiny C aplikován 10 min po aplikaci HMW ¹³C-HA. Souvislé čáry reprezentují HA-C18:1, tečkované čáry ¹³C-HA.

Ve snaze zpomalit eliminaci HA-C18:1 a zvýšit účinnost cílené distribuce DOX do nádoru byl metabolismus HA saturován dávkou 50 mg kg⁻¹ HMW ¹³C-HA. Zvířata pak vykazovala mírně vyšší hodnoty AUC a pomalejší eliminaci HA-C18:1 z krevního oběhu (Tab. XIII). Saturace metabolismu HA také způsobila zvýšenou koncentraci HA-C18:1 v ledvinách (Obr. 28). Podobně jako HA-C18:1 vykazoval HMW ¹³C HA nejvyšší

koncentraci v plasmě. Akumulace v játrech, ledvinách a slezině byla 5,1; 5,2 a 1,7 ID(%) /g. Je zajímavé, že HMW ^{13}C HA vykazoval o něco nižší obsahy v játrech a slezině než HA-C18:1 (Obr. 29), a to navzdory skutečnosti, že afinita endoteliálních buněk roste se zvyšující se M_w HA [171]. Stanovená kinetika eliminace HMW ^{13}C -HA byla v souladu s výsledky dřívějších studií, kde vysoké dávky (0,1-25 mg kg^{-1}) nativní HA s M_w 280 kDa [8] a 825 kDa [9] saturovaly metabolismus HA a vykazovaly stejně jako v této studii poměrně pomalou kinetiku eliminace. HA-C18:1 stejně jako HMW ^{13}C -HA byly kompletně eliminovány během 72 hodin, čímž byla potvrzena odbouratelnost HA-C18:1 a schopnost organismu odbourat relativně vysoké dávky nativního i chemicky modifikovaného HA.

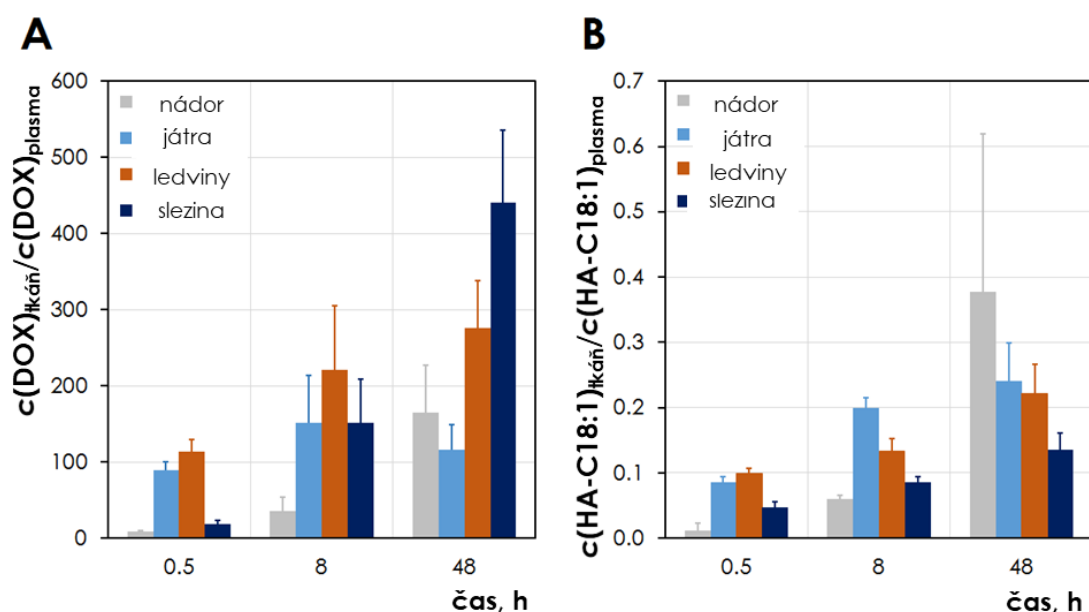


Obr. 29 Organová distribuce HA-C18:1 a ^{13}C -HA po *i.v.* aplikaci polymerních micel HA-C18:1 nesoucích DOX s předcházející aplikací HMW ^{13}C -HA (Skupina D). Každý sloupec vyjadřuje průměrnou hodnotu procenta injektované dávky na 1 gram tkáně (ID(%) /g) \pm směrodatná odchylka ($n=3$ pro každý časový interval) * $p<0,1$, ** $p<0,05$, *** $p<0,001$ HA-C18:1 vs. ^{13}C -HA ve stejném časovém intervalu.

5.3.1.4 Stabilita polymerních micel z oleyl-modifikovaného hyaluronanu nesoucí cytostatikum doxorubicin

Stanovení DOX a HA-C18:1 ukázalo, že tyto látky mají odlišnou kinetiku eliminace z krevního řečiště (Obr. 24) a jejich organová distribuce je rovněž rozdílná (Obr. 30). Množství DOX v polymerních micelách bylo 7,0 % (w/w), což odpovídá hmotnostnímu poměru DOX/HA C18:1 0,075. Nicméně již 5 minut po podání se poměr DOX/HA C18:1

snížil přibližně stokrát (Obr. 31). DOX je rychle eliminován z krevního řečiště s $t_{1/2} \sim 7$ min a rychle distribuován do tkání, oproti tomu eliminace HA-C18:1 a jeho distribuce do tkání je mnohem pomalejší. Rozdíl v distribuci DOX a HA-C18:1 je evidentní při srovnání poměrů jejich koncentrací v tkáni a plasmě (T/P), kde hodnoty T/P pro DOX jsou více než 1000krát vyšší než T/P pro HA-C18:1 (Obr. 30). Odlišná farmakokinetika DOX a HA-C18:1 je patrná rovněž při porovnání hodnot distribučních objemů (V_d), kdy V_d DOX dosahuje hodnot typických pro malé hydrofobní molekuly a naopak hodnoty V_d HA-C18:1 jsou nízké a blízké celkovému objemu plasmy v těle, což je charakteristické pro hydrofilní makromolekuly se silnou vazebnou afinitou k plasmatickým proteinům [173].

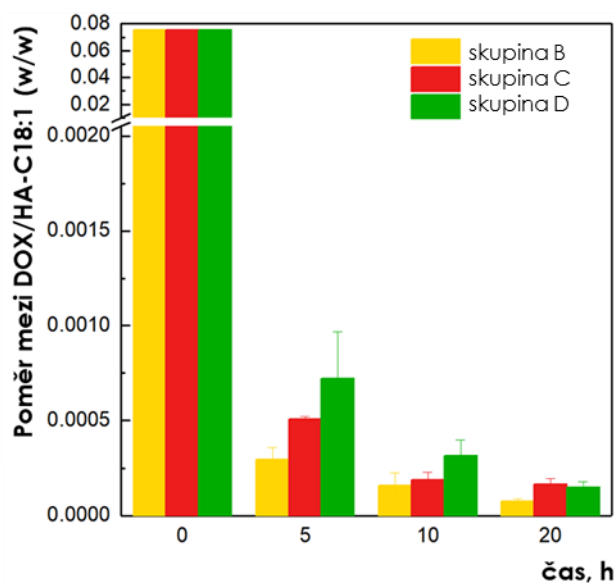


Obr. 30 Poměry mezi obsahem v tkáni a plasmě DOX (A) a HA-C18:1 (B).

Stanovení LC-MS je založena na analýze modifikovaných disacharidů, nelze tedy touto metodou rozlišit volné řetězce HA-C18:1 a řetězce HA-C18:1 vázané v micely. Uvedené výsledky nicméně naznačují špatnou *in vivo* stabilitu nanomateriálového nosiče na bázi HA a rychlé uvolňování DOX z micel HA-C18:1 po *i.v.* podání.

Pro HA-C18:1 je udávána kritická agregační koncentrace $1-3 \mu\text{g ml}^{-1}$ [38]. Koncentrace HA-C18:1 během prvních několika hodin od podání byla však podstatně vyšší, za rychlým uvolněním DOX tak nestojí rozpad micel způsobený nízkou koncentrací HA-C18:1 v roztoku. Mnohem pravděpodobněji je rychlé uvolnění DOX dáno interakcí polymerní micely s přítomnými proteiny (Obr. 10). Interakce HA s albuminem je při

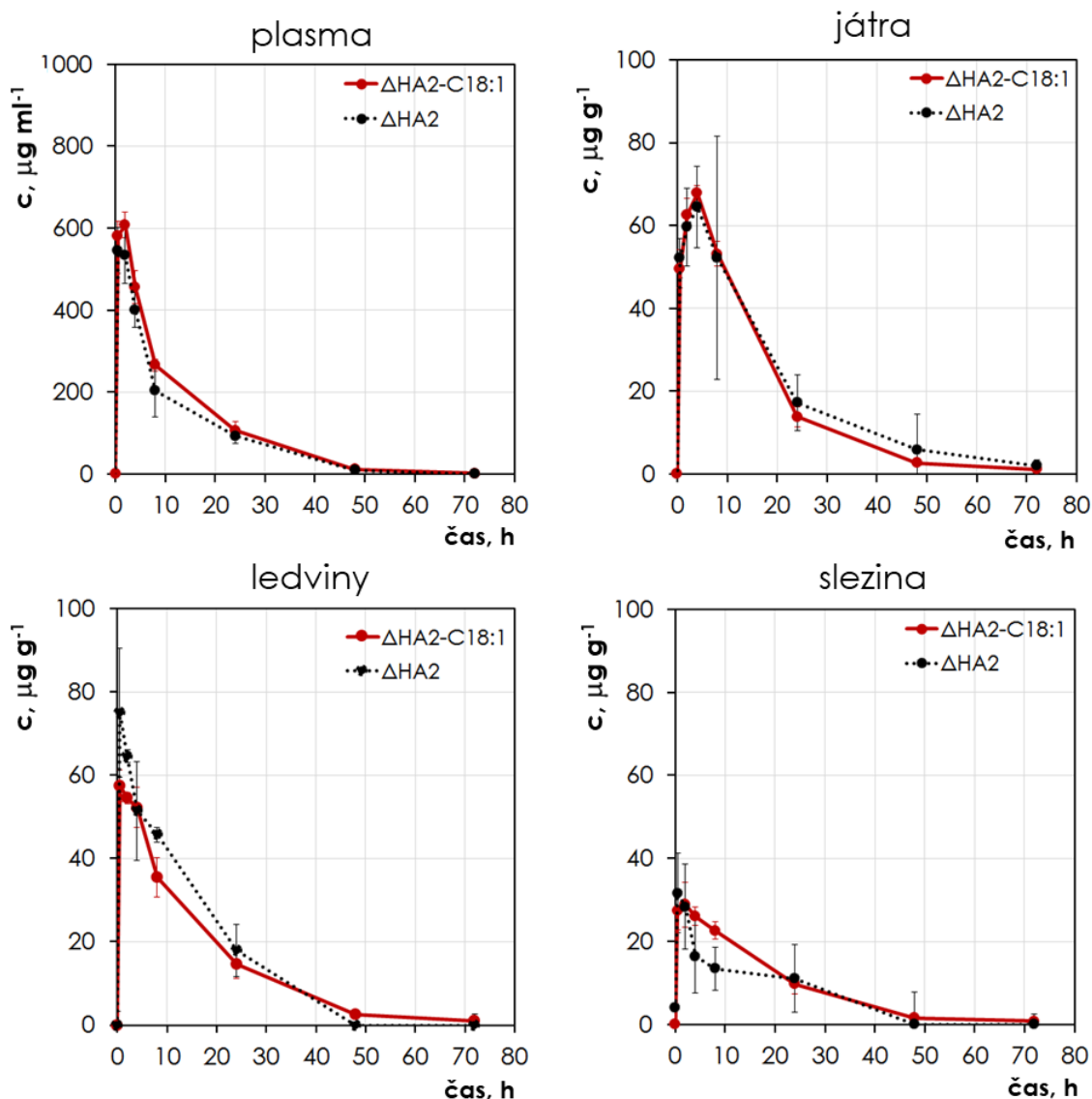
fyziologických podmínkách extrémně nízká, avšak afinita olejové kyseliny a derivátu HA-C18:1 k albuminu je mnohem vyšší [38,174]. Rozpad micely je tak způsoben interakcí hydrofobních řetězců HA-C18:1 s plasmatickými proteiny.



Obr. 31 Hmotnostní poměry mezi DOX a HA-C18:1 v plasmě po 5, 10 a 20ti min. Poměr DOX/HA-C18:1 v čase 0 min vyjadřuje hmotnostní zlomek DOX v připraveném nosiči 0,7%.

5.3.1.5 *In vivo* degradace oleyl-modifikovaného hyaluronanu

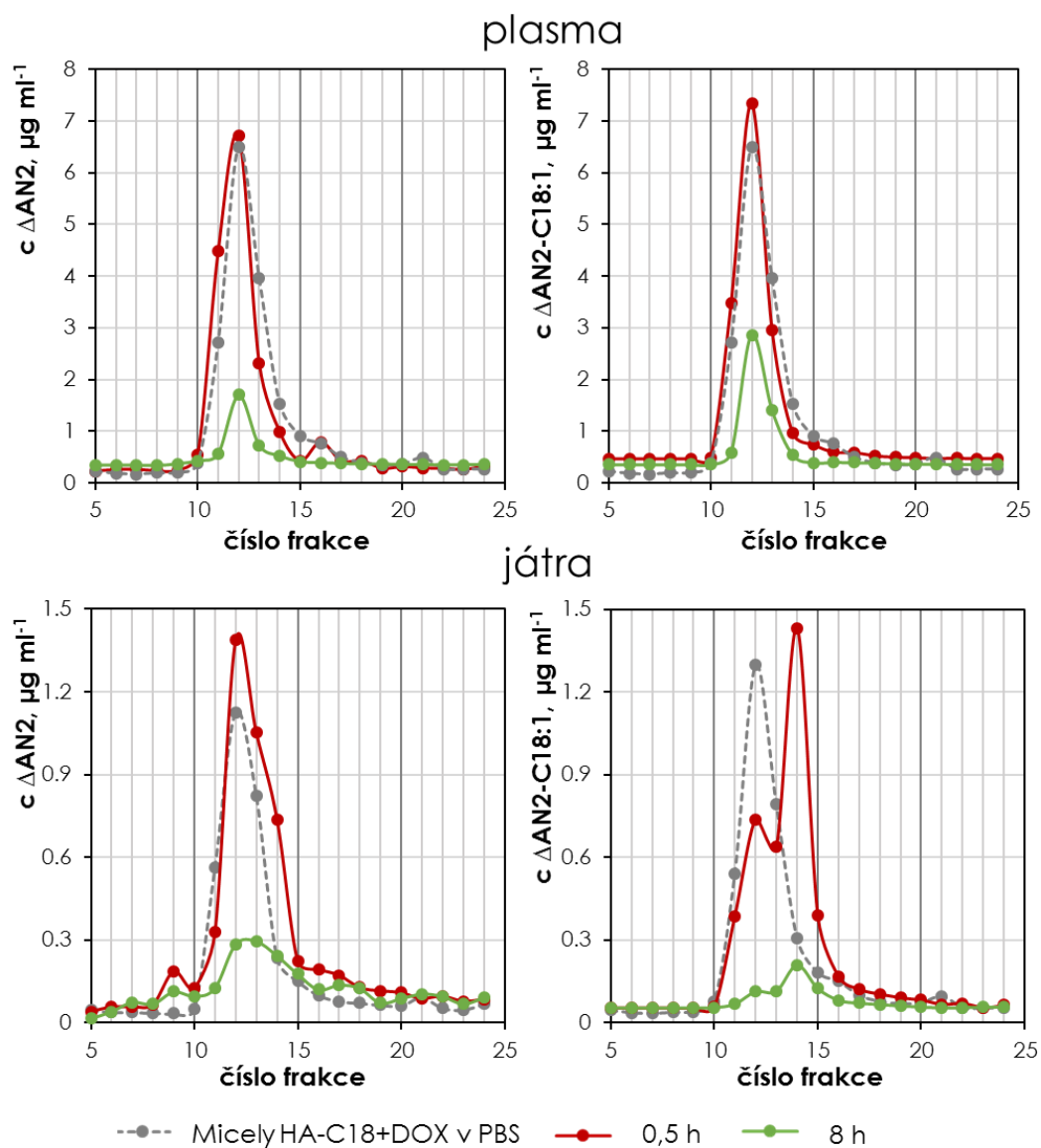
In vivo degradace HA-C18:1 může zahrnovat štěpení esterové vazby nebo štěpení glykosidické vazby. Pro zjištění, zda je esterová vazba oleylové skupiny rezistentní vůči enzymatickému nebo neenzymatickému štěpení *in vivo*, byla stanovena koncentrace HA-C18:1 v plasmě, játrech, slezině a ledvinách pomocí kvantifikace nativních (Δ AN2) nebo modifikovaných (Δ AN2-C18:1) nenasycených disacharidů. Endogenní HA je v uvedených tkáních a tělních tekutinách přítomen pouze v nízkých koncentracích [175] a odpovídající signál Δ AN2 je v porovnání s vysokým signálem pocházejícím od exogenního HA-C18:1 relativně nízký a může být zanedbán. Není-li pozorován rozdíl mezi stanovením Δ AN2 a Δ AN2-C18:1, znamená to, že relativní zastoupení modifikované a nemodifikované části řetězce HA ve vzorku se nemění a esterová vazba v derivátu je stabilní. To naznačují změřená data (Obr. 32). Výsledky jsou v souladu s předchozí *in vitro* studií [176].



Obr. 32 Stabilita HA-C18:1 *in vivo*. Obsahy HA-C18:1 v plasmě, játrech, ledvinách a slezině byly určeny kvantifikací oylel-modifikovaných (Δ AN2-C18:1) a nativních disacharidů (Δ AN2).

Stabilita derivátu a jeho degradace s ohledem na M_w a DS derivátu byla následně studována pomocí kombinace technik SEC a LC-MS. Vzorky plasmy a jater byly nejprve analyzovány na SEC koloně na LC systému s frakčním kolektorem. Sesbírané frakce byly následně analyzovány uvedenou LC-MS metodou stanovující Δ AN2 a Δ AN2-C18:1. Výsledky analýz jsou shrnuty v Obr. 33, kde je vynesena distribuce M_w HA-C18:1 přítomného v aplikovaném roztoku polymerních micel. Do 48 hodin po podání nebyly v plasmě pozorovány žádné významné změny v M_w a v relativním obsahu Δ AN2 a Δ AN2-C18:1. Zcela odlišné chování bylo pozorováno v játrech, kde byl HA-C18:1 již

částečně rozštěpen po 30 minutách od podání. Pozorované fragmenty v játrech vykazovaly odlišný poměr Δ AN2 a Δ AN2 C18:1 než HA-C18:1 v aplikovaném roztoku. Ve frakcích, jež byly eluovány dříve (frakce číslo 10-13) bylo pozorováno nižší zastoupení modifikovaných disacharidů, než odpovídá původnímu derivátu. Naopak u frakcí, jež jsou eluovány později (frakce číslo 14-15) a odpovídají fragmentům s nižší M_w bylo pozorováno vyšší zastoupení modifikovaných disacharidů než u výchozího derivátu (Obr. 33). Celkový poměr mezi Δ AN2 a Δ AN2-C18:1 v nefrakcionovaných vzorcích jater zůstal nezměněn (Obr. 32) a po 72 h klesla koncentrace obou částí Δ AN2, Δ AN2-C18:1 pod mez kvantifikace. Tyto výsledky ukazují, že nativní i hydrofobizovaný HA jsou biologicky odbouratelné a nedochází k akumulaci modifikovaných řetězců HA-C18:1 v organismu, přičemž játra jsou důležitým místem pro metabolizaci modifikovaného HA.



Obr. 33 Distribuce M_w HA-C18:1 v plasmě a játrech po *i.v.* aplikaci HA-C18:1 micel nesoucích DOX stanovená kvantifikací modifikovaných (Δ AN2-C18:1) a nativních disacharidů (Δ AN2). Čárkované čáry reprezentují distribuci M_w v dávkovaném roztoku.

Tab. XIV Obsahy DOX v plasmě (ng ml⁻¹) a tkáních (μg g⁻¹) po i.v. aplikaci DOX čtyřmi různými způsoby (Skupina A-D).

	plasma	játra	ledviny	slezina	nádor
Skupina A					
5 min	158,6 ± 58,1	9,17 ± 1,62	12,51 ± 0,91	0,53 ± 0,01	0,37 ± 0,14
10 min	67,8 ± 8,8	9,69 ± 2,88	11,01 ± 1,25	0,49 ± 0,03	0,27 ± 0,04
15 min	39,5 ± 3,3	12,01 ± 4,03	10,08 ± 1,16	0,53 ± 0,12	0,32 ± 0,1
30 min	82,2 ± 20,6	12,81 ± 5,73	15,46 ± 0,69	1,64 ± 0,52	0,56 ± 0,02
2 h	41,6 ± 3,3	7,33 ± 7,06	8,42 ± 0,32	0,9 ± 0,45	0,68 ± 0,1
4 h	32,5 ± 13	4,5 ± 0,87	6,42 ± 0,39	1,41 ± 0,12	0,85 ± 0,44
8 h	24,2 ± 4,9	2,24 ± 1,3	4,91 ± 0,46	2,7 ± 1,22	0,56 ± 0,13
24 h	8,8 ± 1,3	0,37 ± 0,05	2,3 ± 0,15	1,49 ± 0,92	0,47 ± 0,04
48 h	4,7 ± 0,3	0,31 ± 0,03	1,12 ± 0,06	1,73 ± 0,26	0,51 ± 0,16
72 h	2,7 ± 0,4	0,31 ± 0,13	0,58 ± 0,04	0,84 ± 0,16	0,41 ± 0,21
Skupina B					
5 min	238,9 ± 60,4	5,91 ± 0,5	12,41 ± 1,25	0,58 ± 0,12	0,33 ± 0,07
10 min	114,7 ± 41,4	6,29 ± 0,24	11,72 ± 0,87	0,6 ± 0,14	0,38 ± 0,28
15 min	56,9 ± 10	6,71 ± 0,9	6,97 ± 1,64	0,49 ± 0,13	0,53 ± 0,38
30 min	87,2 ± 25	8,5 ± 3,03	11,83 ± 2,92	1,87 ± 0,56	0,92 ± 0,72
2 h	44,7 ± 9,5	6,97 ± 0,64	6,5 ± 1,54	2,05 ± 0,44	1,01 ± 0,58
4 h	27,9 ± 6,3	4,07 ± 1,19	5,25 ± 1,32	2,09 ± 0,45	0,53 ± 0,2
8 h	16,3 ± 2,8	2,68 ± 0,56	2,22 ± 0,88	2,19 ± 0,38	0,48 ± 0,15
24 h	9,1 ± 0,8	1,66 ± 0,77	2,05 ± 0,16	2,2 ± 0,4	0,52 ± 0,08
48 h	5,5 ± 2,8	0,32 ± 0,14	0,97 ± 0,19	1,38 ± 0,25	0,42 ± 0,23
72 h	3,3 ± 1	0,24 ± 0,16	0,62 ± 0,19	1,06 ± 0,06	0,29 ± 0,08
Skupina C					
5 min	758,5 ± 53,5	10,25 ± 1,13	21,52 ± 2,16	0,85 ± 0,26	0,54 ± 0,18
10 min	256,3 ± 39,1	10,61 ± 2,54	17,93 ± 3,76	0,77 ± 0,2	0,44 ± 0,08
15 min	144,6 ± 19,2	16,71 ± 9,29	15,9 ± 2,49	0,85 ± 0,18	0,33 ± 0,07
30 min	166,5 ± 19,1	14,88 ± 0,89	18,93 ± 1,53	3,12 ± 0,6	1,51 ± 0,16
2 h	72,9 ± 7,9	11,22 ± 0,23	13,26 ± 0,99	3,67 ± 0,27	1,91 ± 0,12
4 h	40,6 ± 7,2	6,82 ± 1,04	9,72 ± 0,78	3,17 ± 0,56	1,51 ± 0,9
8 h	32,4 ± 12,5	4,9 ± 0,72	7,15 ± 0,07	4,9 ± 0,12	1,17 ± 0,38
24 h	15,1 ± 2,3	2,01 ± 0,04	4,35 ± 0,19	4,12 ± 0,83	0,99 ± 0,31
48 h	6,5 ± 1,3	0,75 ± 0,16	1,79 ± 0,18	2,86 ± 0,24	1,07 ± 0,34
72 h	4 ± 0,5	0,5 ± 0,08	1,17 ± 0,15	2,26 ± 0,25	0,46 ± 0,21
Skupina D					
5 min	1034 ± 353,3	17,96 ± 9,18	28,65 ± 0,63	1,72 ± 1,28	1,02 ± 0,12
10 min	483,3 ± 145,7	23,89 ± 1,1	25,4 ± 2,67	1,6 ± 0,9	1,46 ± 0,34
15 min	192,9 ± 23,4	18,95 ± 1,62	25,69 ± 3,29	4,06 ± 1,88	1,15 ± 0,56
30 min	189,6 ± 107,1	15,46 ± 6,87	19,16 ± 6,14	2,54 ± 1,65	0,85 ± 0,3
2 h	62 ± 19,8	7,54 ± 0,44	10,99 ± 0,79	3,22 ± 0,47	0,93 ± 0,46
4 h	31,8 ± 3,2	4,57 ± 0,63	9,62 ± 1,37	3,63 ± 0,54	0,97 ± 0,44
8 h	22,3 ± 3	3,17 ± 1,01	9,07 ± 0,53	3,64 ± 0,7	0,96 ± 0,02
24 h	10,6 ± 3,8	1,9 ± 0,3	5,5 ± 1,45	3,54 ± 0,7	0,79 ± 0,23
48 h	4,2 ± 1,6	0,84 ± 0,32	4,31 ± 0,93	3,19 ± 0,87	0,72 ± 0,22
72 h	3 ± 1,6	0,48 ± 0,21	1,78 ± 1,55	2,25 ± 0,17	0,49 ± 0,05

Tab. XV Obsah HA-C18:1 a ^{13}C -HA v plasmě (ng ml^{-1}) a tkáních ($\mu\text{g g}^{-1}$) po *i.v.* aplikaci HA-C18:1 ve třech různých formulacích (Skupina B-D).

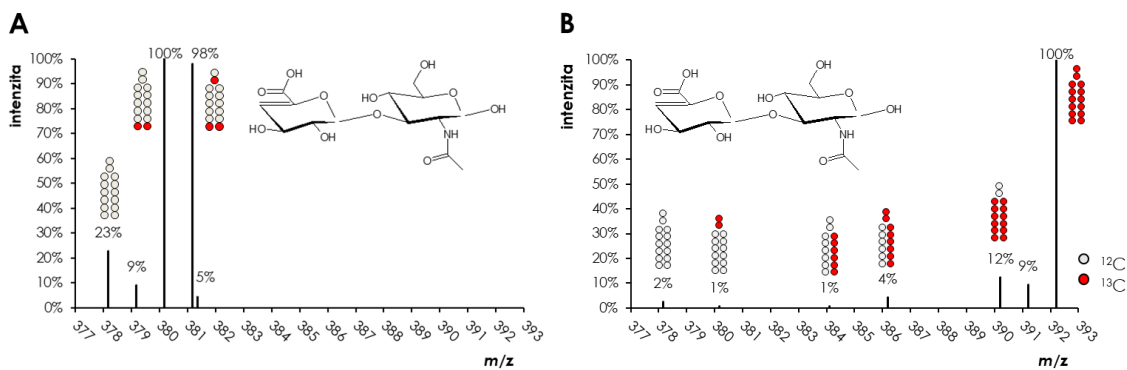
	plasma	játra	ledviny	slezina	nádor
Skupina B					
5 min	894,4 ± 99	39,3 ± 16,3	43,3 ± 11	39 ± 6,6	23,9 ± 3,9
10 min	780,4 ± 71,9	77,5 ± 17,6	46,3 ± 7,5	35,5 ± 1,5	28,2 ± 10,6
15 min	799,7 ± 86,1	56 ± 38,5	46,1 ± 8,1	37 ± 8,1	18,6 ± 13,5
30 min	451,5 ± 43	40,8 ± 17,1	52,6 ± 6	25,6 ± 1,3	6,4 ± 1,1
2 h	463,6 ± 43,5	72,6 ± 9,5	48,8 ± 11,9	27,7 ± 5,3	11,1 ± 2,6
4 h	262,6 ± 26,8	25,8 ± 11,2	25,5 ± 3,7	14,3 ± 5,2	13,1 ± 2,6
8 h	206,3 ± 51,8	24,4 ± 22,2	20,2 ± 4	9,6 ± 1	13 ± 2,2
24 h	47,1 ± 16,5	6,1 ± 0,9	9 ± 0,6	5,1 ± 0,5	9,5 ± 3,8
48 h	10,1 ± 1,3	3 ± 0,7	2,9 ± 0,9	1,1 ± 0,2	3,2 ± 1,7
72 h	4,1 ± 1,6	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,5	0,3 ± 0,2	0,9 ± 0,2
Skupina C					
5 min	1301,4 ± 131,6	53,7 ± 33,7	67,3 ± 5,1	29,1 ± 6,8	20,8 ± 4,8
10 min	1366,7 ± 239,1	102,2 ± 2	72,7 ± 2,9	31,9 ± 3,3	41,5 ± 17,1
15 min	1115,9 ± 258,4	85,3 ± 8,1	64 ± 2,7	33,6 ± 3,5	27,1 ± 13,6
30 min	581,5 ± 34,9	49,5 ± 4,6	57,5 ± 3,8	27,5 ± 4,7	7 ± 6,1
2 h	607,4 ± 31	62,7 ± 3,8	54,5 ± 1,4	28,9 ± 5,5	18 ± 3,5
4 h	455,9 ± 40,3	67,9 ± 1,7	52,2 ± 4,8	26,1 ± 2,3	16,8 ± 8
8 h	265,9 ± 13,9	53,2 ± 3	35,5 ± 4,7	22,6 ± 2,1	15,8 ± 1,6
24 h	106,8 ± 20,3	13,8 ± 2,5	14,6 ± 3,4	9,7 ± 2,3	19,8 ± 5,2
48 h	11,3 ± 1,5	2,7 ± 0,5	2,5 ± 0,4	1,5 ± 0,2	4,3 ± 2,7
72 h	2 ± 2,4	1,1 ± 0,3	1 ± 0,3	0,8 ± 0,4	1,7 ± 0,4
Skupina D					
5 min	1429,7 ± 24,2	60,3 ± 33,6	134 ± 54,7	13,8 ± 0	5,1 ± 2,8
10 min	1523,3 ± 227,1	34,9 ± 22	140,6 ± 57,6	36,4 ± 7,6	8,9 ± 0,5
15 min	1338,9 ± 295,9	48,6 ± 12,5	99,9 ± 27,7	32,4 ± 12,8	8,3 ± 2,3
30 min	908,7 ± 271,9	68,7 ± 46	109,6 ± 57,2	34,5 ± 12,3	12,6 ± 9,5
2 h	894,3 ± 141,2	73,5 ± 30,7	126 ± 29,8	42,4 ± 13,2	17,4 ± 12
4 h	675 ± 33,5	40,1 ± 20,8	84,8 ± 32,9	31 ± 1,4	22,8 ± 2,2
8 h	423,8 ± 31,6	54,4 ± 0,7	67,7 ± 20,7	34,6 ± 5,5	27,8 ± 4,8
24 h	118,6 ± 18,2	15,4 ± 1,5	23,9 ± 18,5	5,3 ± 1,7	19,9 ± 11,4
48 h	31,4 ± 6,5	3 ± 1,5	2,5 ± 3,9	0,7 ± 0	5,7 ± 5
72 h	13 ± 4,2	0,8 ± 2,9	4,2 ± 3,6	0,8 ± 0,6	5,8 ± 0,4
Skupina D - ^{13}C -HA					
10 min	396,9 ± 35,8	22,4 ± 1,2	22,3 ± 2,9	0 ± 3,8	10,1 ± 9,6
15 min	419,4 ± 36,6	23,9 ± 1,6	21,9 ± 3,5	12,8 ± 0	34 ± 9
20 min	423,3 ± 66,4	23,6 ± 1,9	24 ± 0,9	15,5 ± 3,9	26,3 ± 2,5
30 min	436,2 ± 89,3	23,7 ± 5,3	23,5 ± 6	14,7 ± 4	25,3 ± 8,2
40 min	385,1 ± 63,1	23,6 ± 4,6	24,1 ± 4,3	14,3 ± 4	25 ± 8
1,2 h	346,7 ± 36,9	20,2 ± 3	20,7 ± 0,9	10,6 ± 1,9	32,3 ± 5,8
2,2 h	320,9 ± 18,6	16,4 ± 2,2	19,1 ± 2,5	13,6 ± 3,4	22,7 ± 11,6
4,2 h	300,1 ± 31,1	13,9 ± 2,2	17,8 ± 2,6	10,7 ± 2,1	24,6 ± 4,7
8,2 h	538,9 ± 24	27,8 ± 0,6	45,5 ± 6,5	18,2 ± 1,1	45,1 ± 13,2
24,2 h	60,3 ± 47,8	3,9 ± 2,8	9,3 ± 4,8	2,7 ± 2,2	67 ± 36,5
48,2 h	0,1 ± 0,2	-0,1 ± 0	1,8 ± 0,3	0,3 ± 0,1	14,4 ± 14,3
72,2 h	0,1 ± 0,3	-0,2 ± 0	0,3 ± 0	0,1 ± 0	17,9 ± 0,3

5.4 Studium farmakokinetiky nativního hyaluronanu pomocí značení stabilními isotopy

Podstatná část této kapitoly týkající se metod a studia intravenózně podaného HA byla publikována v rámci prvoautorské publikace „*How the molecular weight affects the in vivo fate of exogenous hyaluronan delivered intravenously: a stable-isotope labelling strategy*“ [147].

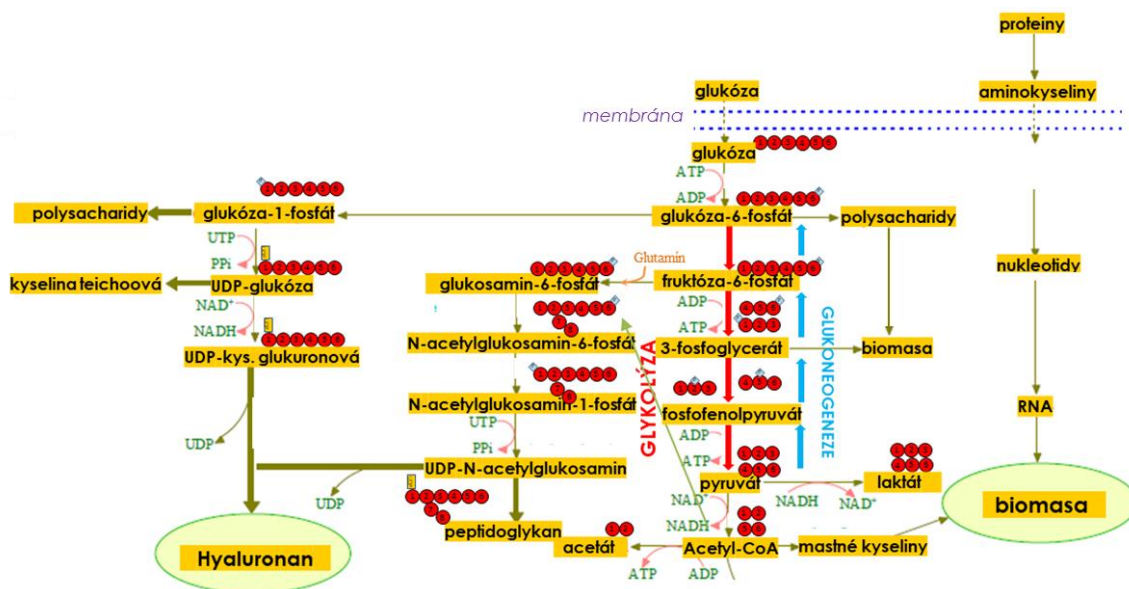
5.4.1 Charakterizace ^{13}C -značeného hyaluronanu

Isotopově značený HA byl biotechnologicky připraven pracovníky firmy Contipro a.s. kultivací *Streptococcus zooepidemicus* na $1\text{-}^{13}\text{C}$ -glukose nebo na glukose značené na všech uhlících ($\text{U-}^{13}\text{C}$ -glukosa). Získaný ^{13}C -HA byl analyzován pomocí výše zmíněné metody LC-MS (Obr. 34). U ^{13}C -HA získaného z $1\text{-}^{13}\text{C}$ -glukosy analýza odhalila, že přibližně 43 % monomerů HA nese po jednom atomu ^{13}C na monosacharidových kruzích a jeden atom ^{13}C na acetylovém zbytku. Přibližně stejné množství monomerů neslo po jednom atomu na GlcA a GlcNAc, avšak bez ^{13}C na acetylovém zbytku. Analýza ^{13}C -HA připraveného z $\text{U-}^{13}\text{C}$ -glukosy ukázala, že přibližně 70 % HA monomerů bylo značeno na všech pozicích uhlíku a kolem 9 % pouze na monosacharidových kruzích bez ^{13}C na acetylové části GlcNAc. Značení s využitím $\text{U-}^{13}\text{C}$ -glukosy produkovalo ^{13}C -HA s vyšší isotopovou čistotou a pouze velmi nízkým zastoupením neznačených monomerů. ^{13}C -HA připravený z $1\text{-}^{13}\text{C}$ -glukosy obsahoval přibližně 10 % neznačených monomerů. Avšak i přes nižší isotopovou čistotu byl takto značený HA s úspěchem využit k odlišení exogenního a endogenního HA, jak bylo ukázáno v předchozí studii (5.1). Naproti tomu značení HA $\text{U-}^{13}\text{C}$ -glukosou produkuje specifitěji značený HA, který lze využít pro studium metabolismu HA a pomocí MS případně ^{13}C -NMR sledovat, do jakých metabolitů je značka ^{13}C přenášena.



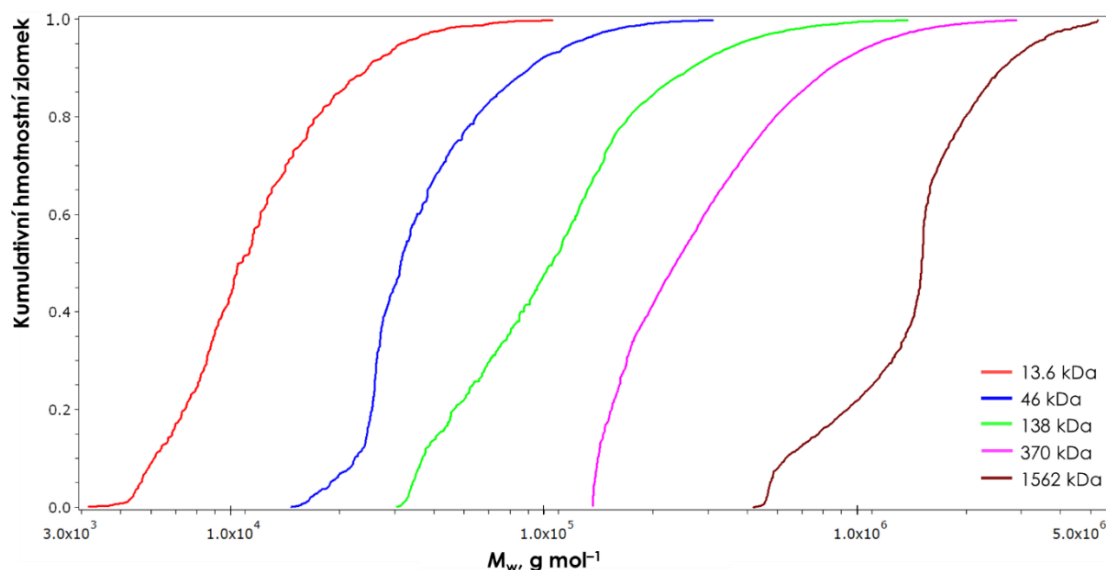
Obr. 34 Hmotnostní spektrum nenasyceného disacharidu HA získaného depolymerizací HA připravené kultivací *Streptococcus zooepidemicus* na (A) 1-¹³C-glukosu, (B) glukosu U-¹³C. Šedé a červené tečky reprezentují atomy ¹²C a ¹³C ve struktuře disacharidu.

LC-MS analýza různě značených disacharidů získaných enzymatickou degradací ¹³C-HA může být použita i ke studiu mechanismu syntézy HA (Obr. 35). Ze změřených MS spekter ¹³C-disacharidů HA je patrné, že na monosacharidových kruzích HA je přítomno buď 6 atomů ¹³C, nebo žádný. Tento specifický vzor isotopového značení ukazuje, že glukosa je přímo metabolizována do aktivovaných cukrů: uridin difosfát kyselina glukuronová (UDP-GlcA) a uridin difosfát *N*-acetylglukosamin (UDP-GlcNAc). Při syntéze ¹³C-HA tak není aktivní metabolická cesta glukoneogeneze UDP-cukrů vedoucí přes glykolýzu U-¹³C-glukosy na pyruvát a následnou syntézu UDP-hexóz. Tento mechanismus by znamenal přítomnost 3 atomů ¹³C v monosacharidových kruzích HA syntézou hexóz z ¹³C-pyruvátu (pocházející z glykolýzy ¹³C-glukosy) a ¹²C-pyruvátu (pocházejí z metabolizace jiných nutrientů v médiu např. glutamát, sójový pepton). Naopak přítomnost atomů ¹³C na acetylovém konci GlcNAc značí, že část U-¹³C-glukosy je zpracována na energii a je glykolýzou metabolizována až na acetyl koenzym A, který je následně použit při syntéze GlcNAc.



Obr. 35 Mechanismus syntézy HA *Streptococcus zooepidemicus*. Převzato z [177] a upraveno.

Pro vyhodnocení farmakokinetiky a studium metabolismu *i.v.* aplikovaného HA ve vztahu k jeho M_w byl připraven ^{13}C -HA o pěti různých M_w . Vysokomolekulární ^{13}C -HA získaný z U- ^{13}C -glukosy byl podroben kyselé a tepelné degradaci, čímž byl získán ^{13}C -HA s M_w 13,6; 46 kDa, 138 a 370 kDa. Distribuce M_w ^{13}C -HA byla stanovena pomocí SEC-MALLS (Obr. 36) a odhalila velmi úzkou distribuci M_w charakterizovanou hodnotami indexu polydisperzity (M_w/M_n) v rozmezí 1,35–1,76.

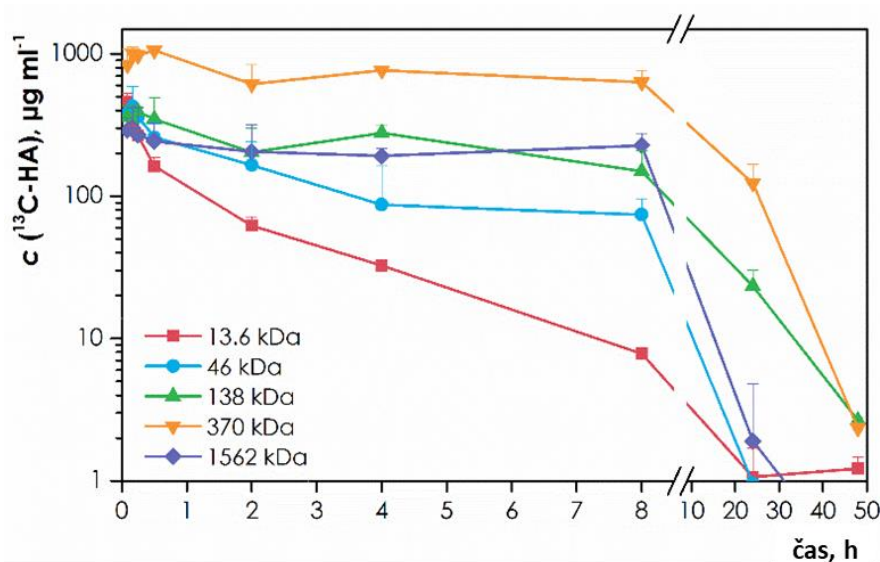


Obr. 36 Distribuce M_w ^{13}C -HA. Polydisperzita (M_w/M_n), kde M_w je hmotnostně průměrná molární hmotnost HA a M_n je početně průměrná molární hmotnost byla 1,48; 1,40; 1,76; 1,60 a 1,35 u vzorků ^{13}C -HA s M_w 13,6; 46; 138; 370 a 1562 kDa.

5.4.2 Farmakokinetika intravenózně aplikovaného hyaluronanu

Metoda popsaná v předcházející kapitole (5.1) byla využita ke stanovení farmakokinetiky intravenózně aplikovaného HA s různou molekulovou hmotností. ^{13}C -HA byl stanoven v plasmě, krevních buňkách, moči, viscerálním tuku, exkrementech a orgánech (slezina, žaludek, játra, ledviny, plíce, srdce, mozek, tenké střevo, tlusté střevo a štítná žláza) v devíti různých časových bodech od 5 minut do 48 hodin od podání (Tab. XVII). Kvantifikace ^{13}C -HA byla provedena stejným způsobem jako v případě předcházející studie s tím rozdílem, že MRM přechody ^{13}C -HA byly nastaveny na nenasycené disacharidy s ^{13}C na všech uhlíkových pozicích (392→181,90).

Stanovením koncentrace ^{13}C -HA v plasmě po *i.v.* aplikaci ^{13}C -HA bylo zjištěno, že M_w podaného ^{13}C -HA podstatně ovlivňuje jeho eliminační kinetiku (Obr. 37). Eliminace 13,6kDa ^{13}C -HA z plasmy sledovala dvoukompartmentovou kinetiku s $t_{1/2}$ 4,9 min. Eliminace ^{13}C -HA s vyšší M_w byla významně pomalejší a koncentrace ^{13}C -HA v plasmě se během prvních osmi hodin po podání výrazně neměnily. Po osmi hodinách od podání se koncentrace ^{13}C -HA lišily od c_{\max} (t_{\max} 5-30 min) o 2%, 20%, 42%, 76% a 78% pro M_w 13,6; 46; 138; 370 a 1562 kDa. Farmakokinetické parametry HA v plasmě jsou shrnuty v Tab. XVI. ^{13}C -HA všech testovaných M_w byl během 48 hodin eliminován s více než 99% účinností.

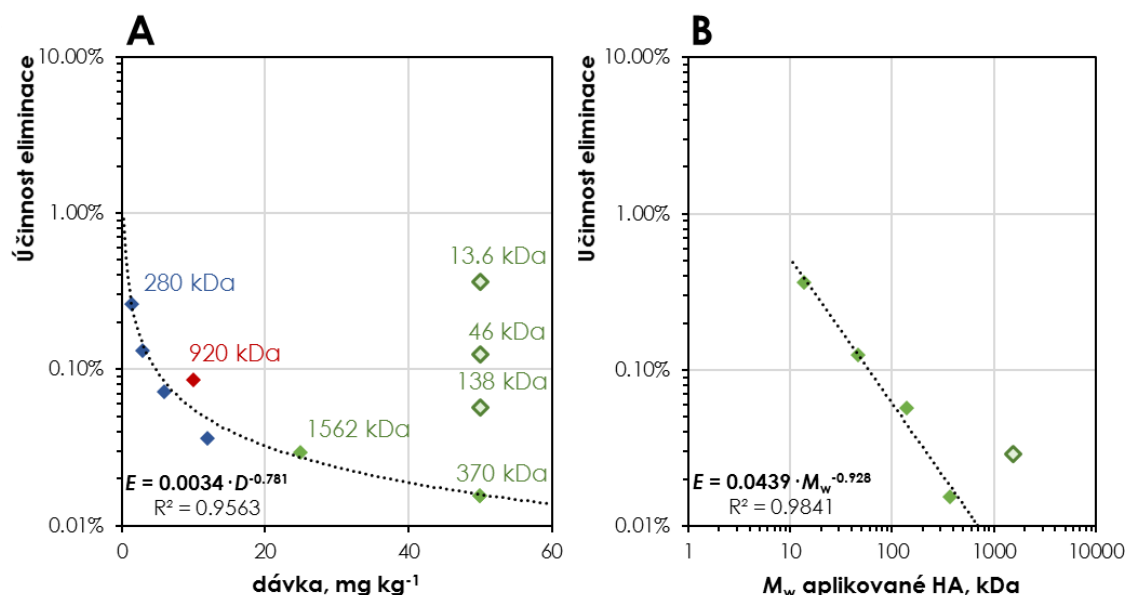


Obr. 37 Koncentrace HA v plasmě po *i.v.* aplikaci HA o pěti různých M_w (13,6; 46; 138; 370 a 1562 kDa). 1562kDa HA byl aplikována v poloviční dávce (25 mg kg⁻¹). Jednotlivé body reprezentují průměrnou hodnotu ± směrodatná odchylka ($n=3$).

Tab. XVI Farmakokinetické parametry HA v plasmě po *i.v.* aplikaci HA o pěti různých M_w

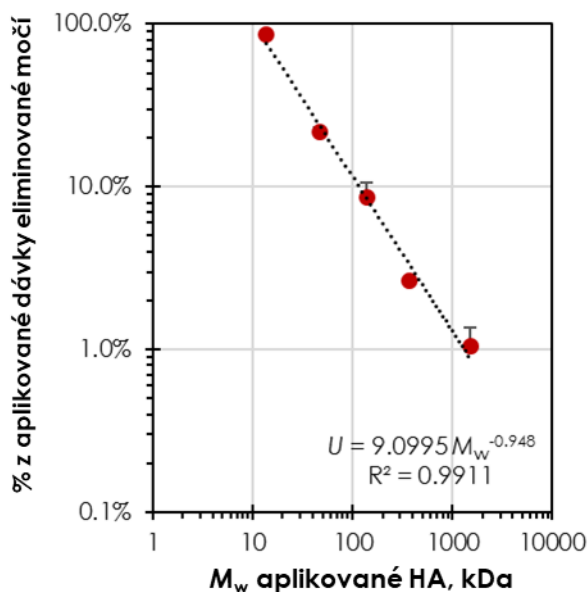
	13,6 kDa	46 kDa	138 kDa	370 kDa	1562 kDa
dávka, mg kg ⁻¹	50	50	50	50	25
AUC, µg h ml ⁻¹	570	1670	2010	13450	3570
V_d , ml/100 g	15,5 ± 1,5	13,1 ± 2,4	24,8 ± 7,4	5,5 ± 1,0	9,9 ± 3,9
Cl, ml h ⁻¹	1,75	0,60	0,28	0,07	0,14
$t_{1/2 \text{ int.}}$, min	4,9	-	-	-	-

Pozorovaný pomalý pokles koncentrace HA v plasmě je v souladu s dřívějšími studiemi [8,9,178], kdy byl HA aplikován v relativně vysokých dávkách, které satureovaly jeho metabolismus. Pro porovnání s publikovanými výsledky a pro vyhodnocení vlivu M_w a dávky aplikovaného HA byly vyhodnoceny hodnoty celkové extrakční účinnosti (E) zahrnující hodnoty Cl získané z časové závislosti koncentrace HA v plasmě a hodnoty rychlosti oběhu krve získané z publikace [179]. Vyhodnocení hodnot E dovoluje porovnat výsledky napříč různými zvířecími modely, v tomto případě myš-potkan-člověk (Obr. 38A). Hodnoty E pro 370 a 1562kDa ¹³C-HA sledují podobný trend jako 280 kDa a 920 kDa HA *i.v.* aplikovaná člověku [8] a potkanům [178]. Hodnoty E pro ¹³C-HA s nižší M_w 13,6, 46 a 138 kDa tomuto trendu neodpovídaly a tyto M_w byly eliminovány s vyšší účinností, přičemž ta rostla s klesající M_w (Obr. 38B). Je možné, že tento jev souvisí s konformací HA, která se mění právě v rozmezí 150-250 kDa. Delší fragmenty HA se překrývají ve strukturách náhodných smotků, zatímco kratší fragmenty tvoří podlouhlé tyčinkovité struktury [180]. Změna konformace může ovlivňovat i afinitu HA k různým receptorům. Lineární tvar může rovněž pomoci HA s nízkou M_w volněji procházet glomerulárními membránami [181].



Obr. 38 Účinnost eliminace (E , účinnost eliminace „extraction ratio“) vztažená k aplikované dávce (A) a M_w aplikované HA (B). Zelené body reprezentují výsledky prezentované v této studii, modré body data z farmakokinetické studie na lidech [8] a červený bod reprezentuje výsledek studie na potkanech [178]. 1562 kDa ¹³C-HA nebyla počítána do regresní analýzy, jelikož byla oproti jiným dávkována v poloviční množství.

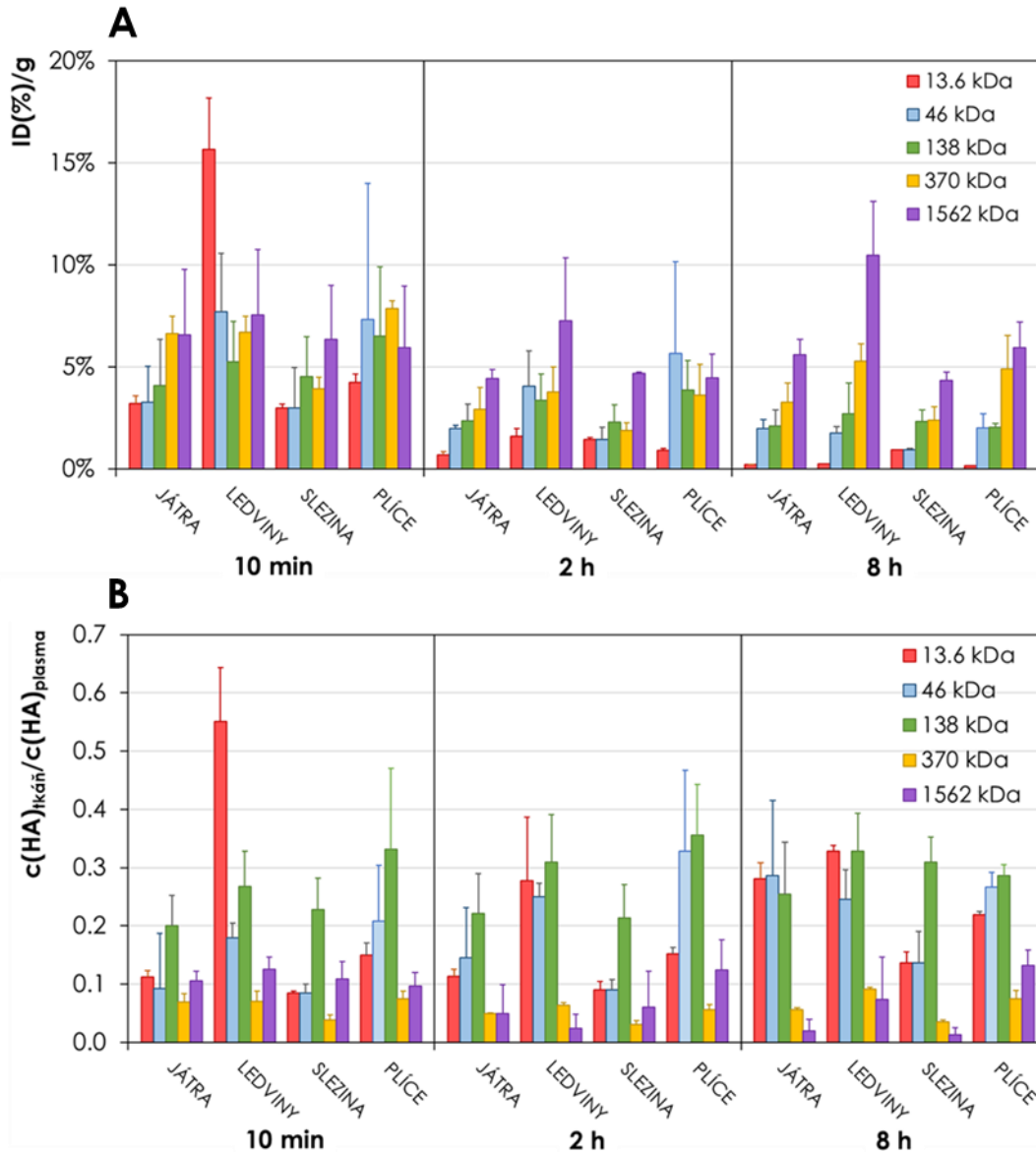
Hlavní cestou eliminace LMW¹³C-HA bylo vylučování močí (87 %ID). Množství ¹³C-HA vyloučeného močí klesalo s M_w podaného ¹³C-HA (Obr. 39). Eliminační cestou přes játra a žluč nebyl HA téměř vůbec vylučován, alespoň ne ve formě fragmentů HA. Obsah ¹³C-HA ve žluči byl nízký (<3 μg ml⁻¹) a množství ¹³C-HA ve stolici bylo <0,5 %ID pro všechny testované M_w . Horní limit M_w pro vylučování HA ledvinami je 25 kDa [182] a ¹³C-HA s podobnou M_w byl také nalezen v moči (Obr. 43). Stanovení distribuce M_w ¹³C-HA pomocí SEC-MALLS odhalilo, že z vyšších M_w pouze 46 kDa ¹³C-HA obsahoval frakci (17,7%) fragmentů nižších než 25 kDa (Obr. 36). Z tohoto důvodu je renální eliminace 138, 370 a 1562 kDa ¹³C-HA možná pouze po předchozí depolymeraci.



Obr. 39 Procentuální podíl aplikované dávky HA vyloučené močí (U) vztažený k M_w aplikovaného HA.

5.4.2.1 Orgánová distribuce intravenózně aplikovaného hyaluronanu v závislosti na jeho molekulové hmotnosti

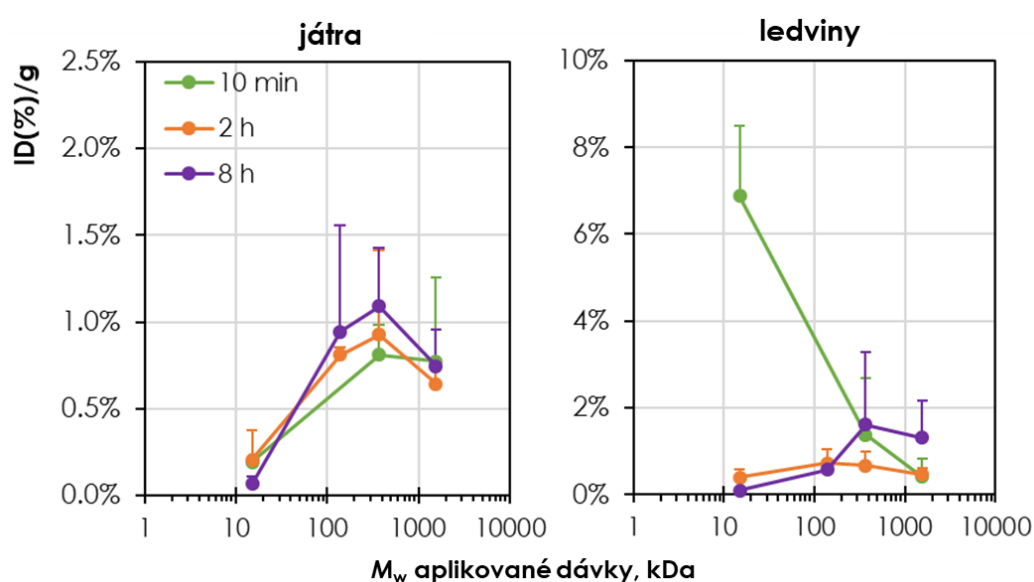
Podobně jako u jiných studií bylo stanoveno, že HA v dávkách mg kg^{-1} saturuje metabolismus a většina aplikovaného HA zůstává v krevním řečišti [8,9,19]. ^{13}C -HA byl nalezen v každé analyzované tkáni, nejvíce v játrech, ledvinách, plicích a srdci (Tab. XVII). Nejvyšší obsah ^{13}C -HA byl stanoven v ledvinách 5 minut po podání 13,6kDa ^{13}C -HA (54 %ID/g). Obsah ^{13}C -HA přítomného v tkáních koreloval s M_w podaného ^{13}C -HA (Obr. 40A), avšak pouze pokud byla distribuce HA vyjádřena jako ID(%)/g.



Obr. 40 Distribuce *i.v.* podaného HA vyjádřená jako (A) procento aplikované dávky HA přítomné v tkáni vztahené na 1 g tkáně (ID(%)/g) a jako (B) poměr mezi obsahem ¹³C-HA v tkáni a plasmě ve vztahu k jeho M_w .

Pokud se porovnají hodnoty poměru obsahů ¹³C-HA v plasmě a v tkáních (Obr. 40B), závislost orgánové distribuce ¹³C-HA na jeho M_w již není zřejmá. Pozorované rozdíly mezi těmito dvěma ukazateli jsou pravděpodobně dány tím, že většina aplikované dávky zůstává v intravaskulárním prostoru sledovaných orgánů, což ovlivňuje výsledek stanovení ¹³C-HA v jednotlivých orgánech.

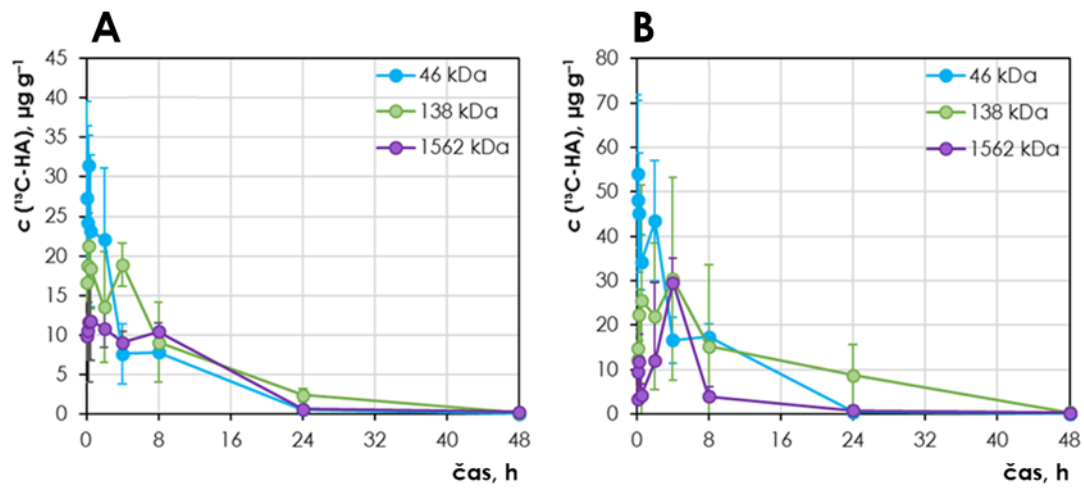
Pro vyhodnocení vlivu M_w na absorpci HA z krevního řečiště do extravaskulárního prostoru jater a ledvin byly orgány myši před vlastní LC-MS analýzou promyty PBS a bylo zjištěno, že téměř 90 % ^{13}C -HA nalezeného v játrech a ledvinách je přítomno v krevním zásobení orgánů. Množství ^{13}C -HA nalezeného v promytých ledvinách ukazuje, že nejvíce je do extravaskulárního prostoru ledvin vychytáván 13,6 kDa ^{13}C -HA, což souhlasí s tím, že ^{13}C -HA s touto M_w je ve velké míře vylučován močí. Rychlá eliminace 13,6 kDa ^{13}C -HA způsobuje nízkou distribuci do extravaskulárního prostoru jater. Pro ostatní testované M_w 138, 370 a 1562 kDa ^{13}C -HA vykazoval vyšší akumulaci v játrech, avšak bez významných rozdílů mezi jednotlivými M_w , i když afinita HA vůči jaterním endoteliálním buňkám roste se vzrůstající M_w [183,184].



Obr. 41 Distribuce *i.v.* aplikovaného ^{13}C -HA v játrech a ledvinách zbavených krve. 1562 kDa byla aplikovaná v polovičním množství (25 mg kg^{-1}).

V této studii byla dále pomocí specifické LC-MS analýzy ^{13}C -HA poprvé spolehlivě prokázána schopnost *i.v.* aplikovaného HA penetrovat až do kolenního kloubu a chrupavky (Obr. 42). Možnosti monitoringu exogenního HA v kloubech mohou mít velký

význam při studiu perorálně nebo intravenózně podávaného HA pro léčbu osteoartritidy. Mechanismus účinku této léčby totiž není dosud zcela objasněn.



Obr. 42 Distribuce ^{13}C -HA do kolenního kloubu (A) a kloubní chrupavky (B) po *i.v.* aplikaci 46, 138 a 1562 kDa ^{13}C -HA.

Tab. XVII Distribuce ¹³C-HA do myších tkání po i.v. aplikaci ¹³C-HA o pěti různých M_w (13,6, 46, 138, 370 a 1562 kDa) vyjádřená jako procento ¹³C-HA z aplikované dávky přítomné v dané tkáni na 1 g hmotnosti tkáně (%ID/g). Krev z orgánů nebyla odstraněna.

	játra	ledviny	slezina	plic	srdce	žaludek	tenké střevo	tlusté střevo	mozek	břišní tuk
13,6 kDa ¹³C-HA										
5 min	4,28% ± 0,86%	54,21% ± 11,10%	2,46% ± 0,65%	6,29% ± 0,68%	6,02% ± 0,84%	4,38% ± 0,08%	7,96% ± 1,47%	3,82% ± 3,35%	0,95% ± 0,33%	0,93% ± 0,13%
10 min	3,21% ± 0,39%	15,66% ± 2,53%	1,66% ± 0,17%	4,25% ± 0,41%	3,56% ± 0,33%	3,54% ± 0,56%	4,61% ± 0,46%	3,75% ± 0,15%	0,47% ± 0,05%	1,99% ± 1,77%
15 min	2,70% ± 0,38%	13,80% ± 1,64%	1,60% ± 0,11%	3,59% ± 0,89%	3,86% ± 0,44%	3,79% ± 0,22%	4,98% ± 0,17%	4,26% ± 0,52%	0,41% ± 0,08%	1,05% ± 0,75%
30 min	1,63% ± 0,28%	5,96% ± 1,29%	1,22% ± 0,22%	2,36% ± 0,47%	2,74% ± 0,22%	2,56% ± 0,11%	2,49% ± 0,21%	2,92% ± 0,26%	0,29% ± 0,08%	0,76% ± 0,35%
2 h	0,69% ± 0,16%	1,61% ± 0,36%	0,53% ± 0,11%	0,91% ± 0,10%	1,02% ± 0,20%	1,11% ± 0,14%	1,11% ± 0,07%	1,19% ± 0,11%	0,13% ± 0,01%	0,74% ± 0,57%
4 h	0,54% ± 0,04%	0,78% ± 0,11%	0,31% ± 0,05%	0,44% ± 0,03%	0,43% ± 0,10%	0,68% ± 0,11%	0,43% ± 0,13%	0,55% ± 0,07%	0,05% ± 0,01%	0,32% ± 0,07%
8 h	0,20% ± 0,01%	0,24% ± 0,00%	0,08% ± 0,02%	0,16% ± 0,01%	0,10% ± 0,03%	0,27% ± 0,04%	0,01% ± 0,15%	0,08% ± 0,02%	0,03% ± 0,00%	0,16% ± 0,03%
24 h	0,07% ± 0,00%	0,02% ± 0,01%	0,03% ± 0,01%	0,05% ± 0,01%	0,03% ± 0,07%	0,05% ± 0,02%	0,12% ± 0,04%	0,03% ± 0,08%	0,02% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%
48 h	0,06% ± 0,02%	0,02% ± 0,02%	0,06% ± 0,01%	0,06% ± 0,04%	0,09% ± 0,01%	0,04% ± 0,06%	0,14% ± 0,02%	0,04% ± 0,03%	0,02% ± 0,00%	0,03% ± 0,01%
46 kDa ¹³C-HA										
5 min	2,75% ± 1,42%	9,66% ± 2,83%	3,06% ± 0,86%	7,83% ± 3,13%	4,95% ± 1,46%	2,05% ± 0,66%	2,69% ± 0,53%	2,24% ± 0,84%	0,53% ± 0,14%	-
10 min	3,25% ± 1,77%	7,72% ± 2,85%	3,00% ± 1,95%	7,33% ± 6,67%	4,88% ± 1,27%	2,32% ± 0,65%	2,54% ± 1,26%	2,10% ± 1,15%	0,44% ± 0,24%	-
15 min	2,51% ± 1,88%	9,61% ± 1,86%	3,30% ± 0,38%	7,90% ± 2,09%	9,24% ± 1,35%	3,34% ± 0,66%	3,66% ± 0,09%	2,97% ± 0,12%	0,58% ± 0,06%	-
30 min	2,76% ± 0,95%	7,54% ± 1,08%	2,97% ± 0,09%	7,92% ± 0,33%	6,63% ± 2,50%	3,30% ± 0,83%	2,79% ± 0,57%	2,82% ± 0,50%	0,40% ± 0,08%	-
2 h	1,98% ± 0,16%	4,05% ± 1,74%	1,44% ± 0,61%	5,67% ± 4,49%	3,63% ± 2,35%	1,97% ± 1,04%	1,45% ± 0,40%	1,82% ± 1,13%	0,28% ± 0,18%	-
4 h	2,68% ± 0,45%	1,78% ± 1,36%	0,85% ± 0,56%	1,65% ± 1,29%	1,25% ± 1,01%	1,50% ± 1,41%	0,83% ± 0,70%	1,13% ± 0,86%	0,10% ± 0,12%	-
8 h	1,97% ± 0,44%	1,75% ± 0,32%	0,94% ± 0,08%	2,00% ± 0,71%	1,28% ± 0,18%	1,37% ± 0,30%	0,76% ± 0,24%	1,03% ± 0,23%	0,08% ± 0,05%	-
24 h	0,03% ± 0,09%	0,03% ± 0,03%	0,04% ± 0,03%	0,04% ± 0,17%	0,02% ± 0,04%	0,07% ± 0,05%	0,03% ± 0,04%	0,06% ± 0,04%	-0,01% ± 0,00%	-
48 h	0,03% ± 0,00%	0,00% ± 0,01%	0,01% ± 0,01%	0,01% ± 0,02%	-0,01% ± 0,00%	-0,01% ± 0,01%	0,01% ± 0,00%	0,00% ± 0,01%	-0,01% ± 0,00%	-
138 kDa ¹³C-HA										
5 min	3,67% ± 0,68%	5,39% ± 2,39%	5,00% ± 1,44%	6,65% ± 2,87%	4,50% ± 2,05%	2,14% ± 1,01%	0,82% ± 0,34%	0,81% ± 0,32%	0,67% ± 0,20%	-
10 min	4,08% ± 2,26%	5,25% ± 1,99%	4,52% ± 1,95%	6,50% ± 3,42%	5,32% ± 2,55%	2,09% ± 0,88%	0,89% ± 0,56%	1,05% ± 0,77%	0,67% ± 0,21%	-
15 min	5,25% ± 1,25%	6,38% ± 0,99%	5,64% ± 0,79%	7,39% ± 3,32%	3,87% ± 0,86%	3,15% ± 1,18%	0,95% ± 0,16%	1,45% ± 0,33%	0,75% ± 0,17%	-
30 min	3,10% ± 0,35%	4,15% ± 1,32%	3,84% ± 0,66%	4,92% ± 1,72%	2,45% ± 0,95%	1,84% ± 0,17%	2,73% ± 3,47%	0,86% ± 0,16%	0,55% ± 0,09%	-
2 h	2,37% ± 0,80%	3,37% ± 1,27%	2,31% ± 0,83%	3,88% ± 1,44%	2,00% ± 1,07%	2,03% ± 0,79%	0,59% ± 0,35%	0,87% ± 0,55%	0,43% ± 0,11%	-
4 h	3,32% ± 0,78%	4,51% ± 0,70%	2,97% ± 0,15%	5,02% ± 1,62%	4,71% ± 1,45%	3,39% ± 0,34%	0,71% ± 0,06%	1,37% ± 0,30%	0,54% ± 0,11%	-
8 h	2,09% ± 0,81%	2,71% ± 1,49%	2,34% ± 0,55%	2,05% ± 0,19%	2,80% ± 1,73%	3,05% ± 2,30%	0,40% ± 0,14%	1,04% ± 0,48%	0,38% ± 0,14%	-
24 h	0,56% ± 0,29%	0,68% ± 0,45%	0,65% ± 0,24%	0,53% ± 0,24%	0,40% ± 0,31%	0,85% ± 0,31%	0,15% ± 0,04%	0,18% ± 0,06%	0,10% ± 0,02%	-
48 h	0,08% ± 0,03%	0,08% ± 0,02%	0,04% ± 0,01%	0,06% ± 0,04%	0,03% ± 0,04%	0,04% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,01%	0,05% ± 0,00%	-
370 kDa ¹³C-HA										
5 min	3,53% ± 1,32%	6,50% ± 2,26%	3,09% ± 1,26%	5,25% ± 1,77%	8,60% ± 6,13%	1,26% ± 0,31%	0,64% ± 0,26%	0,70% ± 0,23%	0,48% ± 0,22%	0,39% ± 0,17%
10 min	6,64% ± 0,85%	7,14% ± 0,90%	3,93% ± 0,56%	7,88% ± 0,36%	6,14% ± 2,90%	2,27% ± 0,66%	1,28% ± 0,72%	1,20% ± 0,45%	0,57% ± 0,08%	0,59% ± 0,20%
15 min	5,62% ± 0,94%	6,72% ± 1,35%	3,06% ± 0,61%	6,75% ± 1,37%	8,99% ± 3,70%	1,58% ± 0,12%	0,92% ± 0,19%	1,08% ± 0,13%	0,52% ± 0,02%	0,58% ± 0,11%
30 min	4,38% ± 0,26%	6,70% ± 0,32%	2,96% ± 0,55%	6,92% ± 0,43%	9,46% ± 1,38%	2,20% ± 0,12%	1,14% ± 0,21%	1,16% ± 0,29%	0,76% ± 0,26%	0,47% ± 0,15%
2 h	2,93% ± 1,07%	4,05% ± 1,29%	1,88% ± 0,38%	3,62% ± 1,51%	4,09% ± 2,25%	1,89% ± 0,74%	1,15% ± 0,13%	0,95% ± 0,29%	0,33% ± 0,15%	0,43% ± 0,15%
4 h	4,10% ± 1,17%	6,22% ± 0,60%	3,13% ± 0,73%	5,52% ± 0,66%	7,20% ± 5,82%	2,73% ± 0,57%	1,32% ± 0,65%	1,74% ± 0,68%	0,44% ± 0,14%	0,78% ± 0,41%
8 h	3,28% ± 0,93%	6,07% ± 0,99%	2,40% ± 0,65%	4,90% ± 1,63%	5,27% ± 2,40%	2,63% ± 0,93%	1,15% ± 0,18%	1,22% ± 0,25%	0,43% ± 0,06%	0,56% ± 0,23%
24 h	0,79% ± 0,19%	1,28% ± 0,40%	0,59% ± 0,18%	1,08% ± 0,35%	0,70% ± 0,27%	1,29% ± 0,39%	0,26% ± 0,09%	0,47% ± 0,23%	0,11% ± 0,04%	0,18% ± 0,04%
48 h	0,09% ± 0,01%	0,08% ± 0,01%	0,02% ± 0,03%	0,03% ± 0,08%	0,00% ± 0,02%	0,04% ± 0,08%	0,00% ± 0,00%	0,09% ± 0,14%	0,03% ± 0,01%	0,02% ± 0,01%

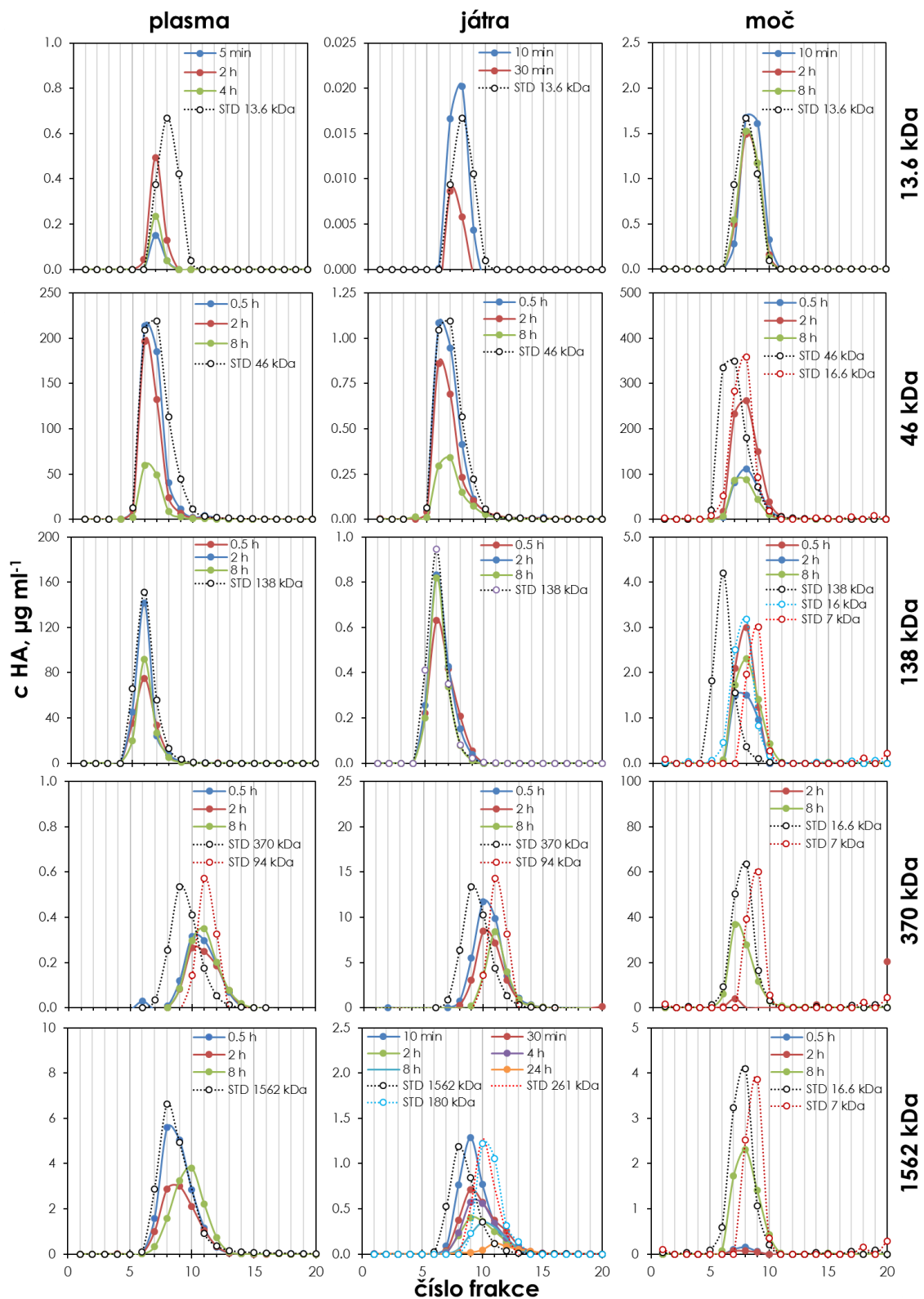
1562 kDa ¹³ C-HA										
5 min	6,42% ± 3,67%	6,60% ± 1,84%	5,02% ± 0,53%	4,56% ± 0,71%	2,85% ± 1,52%	0,74% ± 0,11%	0,42% ± 0,19%	0,56% ± 0,26%	0,63% ± 0,06%	0,49% ± 0,12%
10 min	6,57% ± 3,22%	7,55% ± 3,20%	6,35% ± 2,63%	5,96% ± 3,02%	14,81% ± 13,58%	1,26% ± 0,54%	0,51% ± 0,11%	0,57% ± 0,23%	0,75% ± 0,29%	0,42% ± 0,17%
15 min	5,44% ± 3,02%	5,53% ± 2,99%	5,42% ± 2,43%	11,06% ± 11,06%	3,69% ± 1,30%	0,82% ± 0,28%	0,45% ± 0,17%	0,61% ± 0,29%	0,65% ± 0,37%	0,41% ± 0,26%
30 min	6,94% ± 2,96%	6,66% ± 2,01%	6,10% ± 1,96%	6,08% ± 2,72%	5,52% ± 1,24%	1,10% ± 0,09%	0,68% ± 0,17%	0,59% ± 0,17%	0,82% ± 0,28%	0,47% ± 0,05%
2 h	4,43% ± 0,46%	7,27% ± 3,06%	4,68% ± 0,08%	4,45% ± 1,19%	4,17% ± 1,79%	1,05% ± 0,31%	0,79% ± 0,25%	0,63% ± 0,16%	0,18% ± 0,30%	0,45% ± 0,18%
4 h	5,43% ± 0,64%	8,92% ± 1,59%	5,00% ± 1,26%	7,05% ± 2,76%	4,91% ± 1,58%	2,06% ± 0,41%	0,71% ± 0,24%	1,16% ± 0,36%	0,00% ± 0,00%	0,50% ± 0,07%
8 h	5,61% ± 0,75%	10,46% ± 2,65%	4,35% ± 0,38%	5,93% ± 1,28%	5,15% ± 0,36%	1,51% ± 0,46%	0,96% ± 0,10%	1,48% ± 0,24%	0,36% ± 0,37%	0,62% ± 0,39%
24 h	0,15% ± 0,20%	1,35% ± 0,70%	0,08% ± 0,11%	0,18% ± 0,07%	0,13% ± 0,08%	0,18% ± 0,12%	0,00% ± 0,00%	0,11% ± 0,10%	0,00% ± 0,00%	0,06% ± 0,02%
48 h	0,02% ± 0,00%	0,37% ± 0,11%	0,01% ± 0,01%	0,07% ± 0,02%	0,02% ± 0,05%	0,07% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%	0,01% ± 0,03%

5.4.3 Metabolizace intravenózně podaného hyaluronanu

LC-MS metoda pro stanovení isotopově značeného HA byla s úspěchem využita pro určení rychlosti eliminace HA z organismu a stanovení distribuce do intra a extravaskulárního prostoru jednotlivých orgánů. Možnosti LC-MS analýzy a značení HA stabilními isotopy jsou však širší a mohou přinést informace také o metabolismu HA. Ve spojení s SEC mohou být pomocí zavedené LC-MS metody pro kvantifikaci HA monitorovány změny v distribuci M_w . Pomocí cílené LC-MS analýzy lze kvantifikovat předpokládané metabolity ^{13}C -HA nesoucí ^{13}C atomy ve svých strukturách a v neposlední řadě lze pomocí necílené LC-MS analýzy a analýzy isotopové distribuce identifikovat nové metabolity HA s ^{13}C značku pocházející z ^{13}C -HA.

5.4.3.1 Stanovení změn distribuce M_w ^{13}C -hyaluronanu

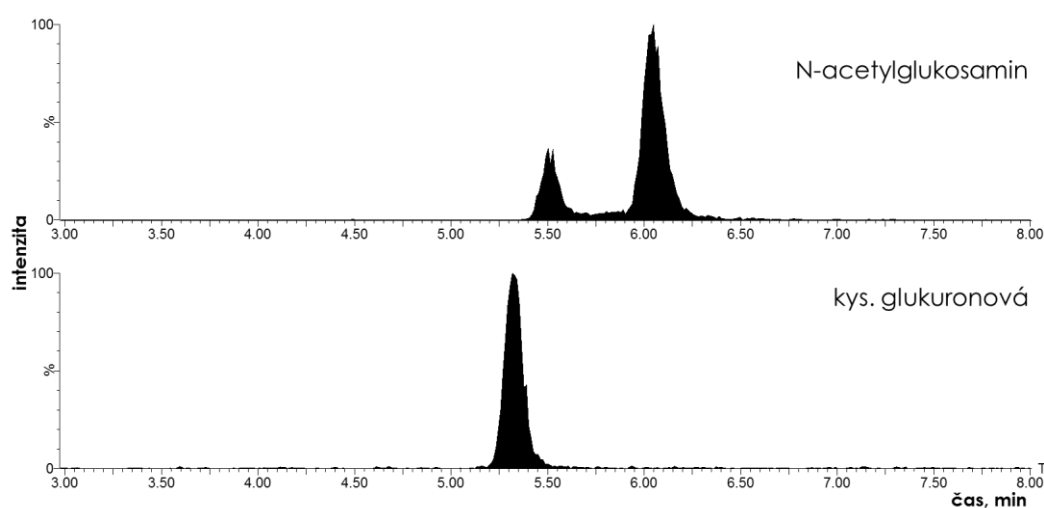
Vzorky plasmy, jater a moči byly nejprve separovány pomocí SEC. Bylo získáno vždy 20 frakcí z každého vzorku a ty byly podobně jako v předcházejícím případě (5.3.1.5) analyzovány pomocí zavedené metody LC-MS pro kvantifikaci ^{13}C -HA. Tímto způsobem bylo možné monitorovat, jak se mění M_w *i.v.* aplikovaného ^{13}C -HA v závislosti na čase a místu jeho výskytu (Obr. 43). Po aplikaci 13,6, 46 a 138 kDa ^{13}C -HA nebyly během 8 hodin po podání pozorovány žádné měřitelné změny v M_w v plasmě ani v játrech. Avšak po aplikaci 370 a 1562 kDa ^{13}C -HA se M_w v plasmě a v játrech v závislosti na čase (0,5-8 h) výrazně snižovala za vzniku fragmentů ^{13}C -HA s M_w 100-300 kDa. Po 24 hodinách byl 1562 kDa ^{13}C -HA v játrech zpracován na 50-150 kDa fragmenty. M_w ^{13}C -HA nalezeného ve vzorcích moči byla v rozmezí 10-20 kDa, což souhlasí s publikovaným limitem M_w 25 kDa při glomerulární filtraci HA [182].



Obr. 43 Distribuce M_w v plasmě, játrech a moči po *i.v.* aplikaci ^{13}C -HA o pěti různých M_w . Souvislé čáry reprezentují distribuci M_w v různých časových bodech; tečkované čáry pak distribuci M_w standardů ^{13}C -HA.

5.4.3.2 Stanovení ^{13}C -N-Acetylglukosaminu a ^{13}C -kyseliny glukuronové

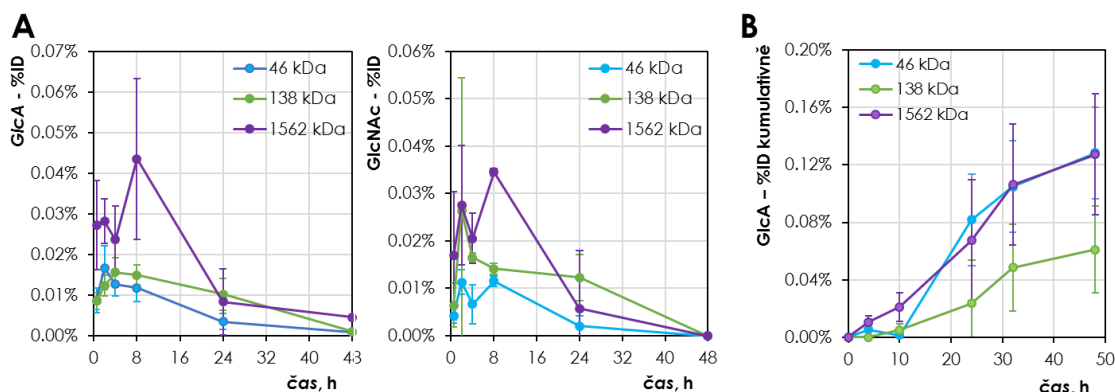
Po enzymatické depolymerizaci HA hyaluronidasami a nespecifické degradaci volnými radikály jsou dle Sternova modelu metabolismu HA [62] vzniklé nízkomolekulární fragmenty HA v lysozomech zpracovány exoglukusidasami na příslušné monosacharidy: GlcA a GlcNAc. Pro ověření této metabolické cesty a pro stanovení množství HA, jež je přeměněno na tyto metabolity, byla vyvinuta LC-MS metoda pro kvantifikaci GlcA a GlcNAc v biologických matricích. Příprava vzorku a použitá chromatografická separace (Obr. 44) byla totožná s analytickou metodou pro stanovení HA s výjimkou toho, že při stanovení monosacharidů nebyly vzorky degradovány lyasou SpHyl.



Obr. 44 Chromatografická separace GlcNAc a GlcA pomocí gradientové eluce (0,1% kys. mravenčí, methanol) na koloně Phenomenex Jupiter Proteo 90 A C12 (4,6x250 mm).

Touto metodou byly analyzovány vzorky jater a moči. Pomocí isotopově značených standardů byly kvantifikovány volné monosacharidy $^{13}\text{C}_6$ -GlcA a $^{13}\text{C}_8$ -GlcNAc. Množství $^{13}\text{C}_6$ -GlcA eliminovaného v moči odpovídalo pouze <0,2% ID a koncentrace druhého monosacharidu $^{13}\text{C}_8$ -GlcNAc v moči byla nulová. Malé množství ^{13}C -monosacharidů (<0,05% ID) bylo přítomno v játrech (Obr. 45) a podobně jako obsah ^{13}C -HA v játrech se také jejich obsah zvyšoval se zvyšující se M_w podaného ^{13}C -HA. Stanovené množství ^{13}C -monosacharidů v játrech a moči však odpovídá pouze velmi

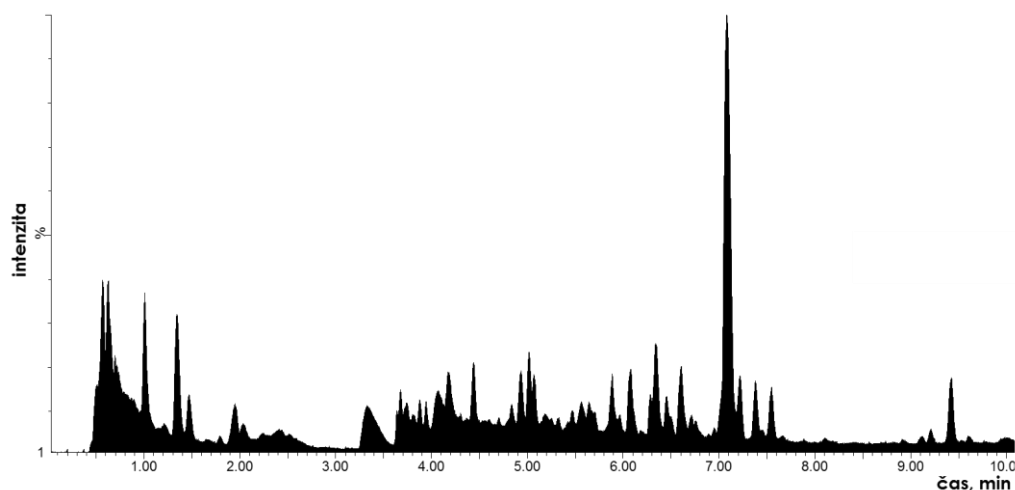
malému procentu z aplikované dávky ^{13}C -HA, což naznačuje, že ^{13}C -monosacharidy nejsou konečnými produkty metabolizace exogenního HA po intravenózní aplikaci.



Obr. 45 Množství ^{13}C -monosacharidů (GlcA a GlcNAc) přítomné v játrech (A) a vyloučené v moči (B).

5.4.3.3 Analýza polárních metabolitů

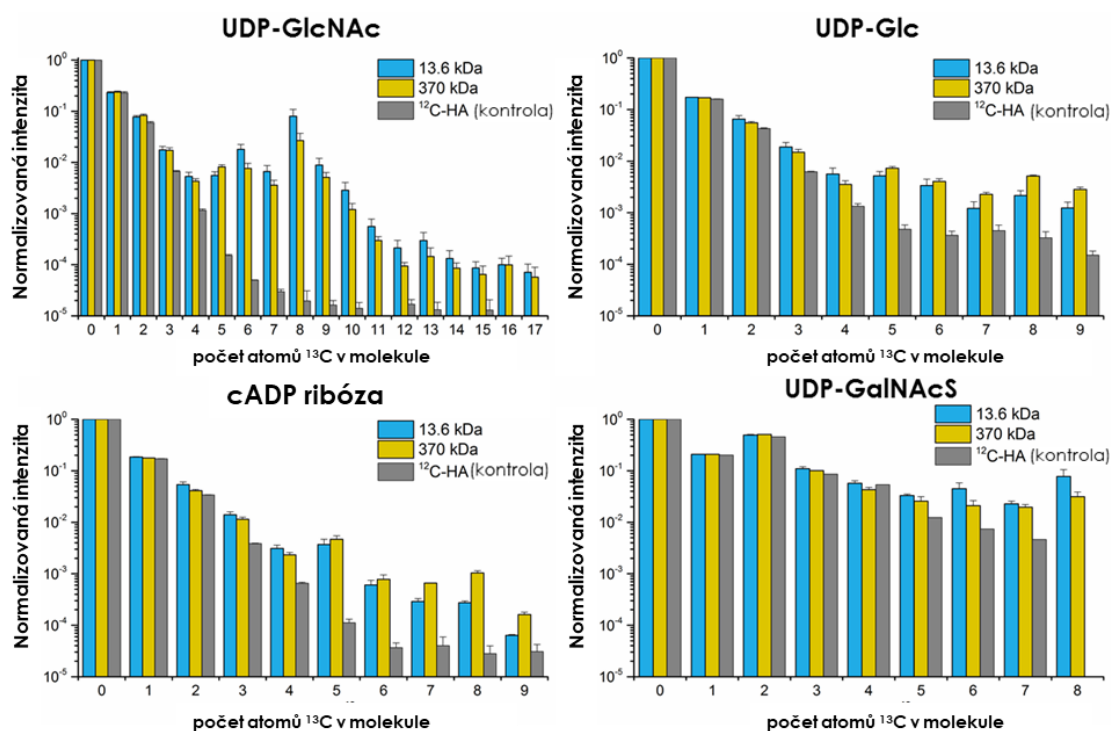
Z výsledků předcházejících analýz vyplynulo, že po *i.v.* aplikaci 370 a 1562 kDa ^{13}C -HA je většina dávky metabolizována na jiné produkty, než jsou fragmenty HA nebo GlcA a GlcNAc, jelikož množství HA a příslušných monosacharidů v moči, játrech a stolici bylo menší než 1% ID. Ve snaze najít a identifikovat metabolity HA byla adaptována chromatografická metoda separace relativně polárních látek na reverzních fázích [155] s využitím hmotnostně spektrometrické detekce ve skenovacím módu. Typický výsledný záznam z takového měření je uveden na Obr. 46. Naměřené záznamy obsahovaly velké množství signálů, v nichž nebylo možné identifikovat metabolity přímo ručním zpracováním výsledků. Program El-Maven [156] umožnil na základě hodnot m/z navrhnout možné analyty ve vzorku a na základě odchylek od přirozené isotopové distribuce identifikovat metabolity ^{13}C -HA nesoucí ve své struktuře isotop uhlíku ^{13}C .



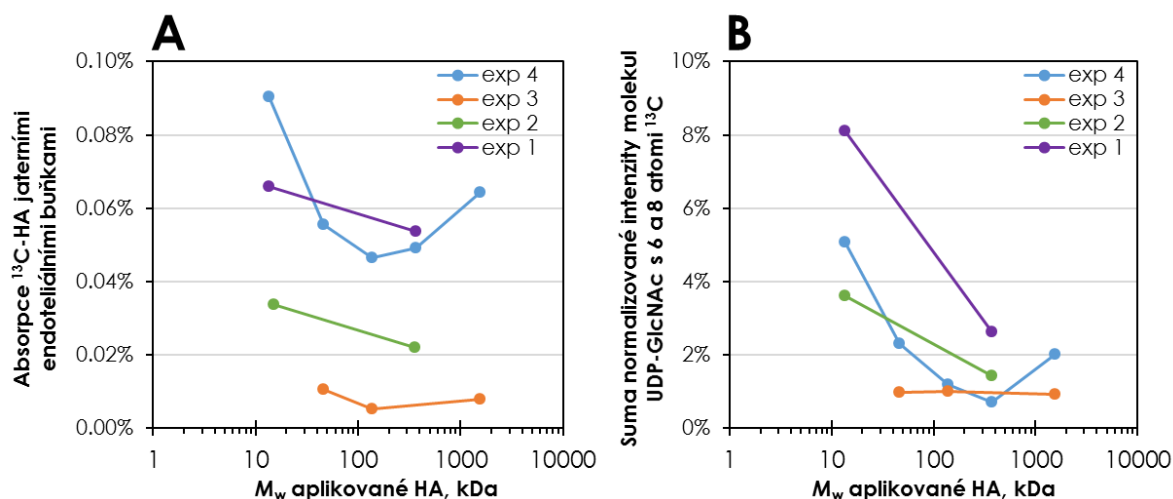
Obr. 46 Typický LC-MS záznam chromatografické separace methanolových extraktů z jaterních buněk při hledání metabolitů ^{13}C -HA.

Za účelem identifikace dalších metabolitů a vyhodnocení závislosti rychlosti metabolismu ^{13}C -HA na jeho M_w byly lidské jaterní endoteliální buňky (HLEC) kultivovány po dobu 72 hodin v médiu obsahujícím ^{13}C -HA (1 mg ml^{-1}). Množství ^{13}C -HA v kultivačním médiu po 72 hodinách u všech testovaných M_w pokleslo o méně než 15 %. Bylo však zjištěno, že značka ^{13}C je začleněna do uridindifosfát *N*-acetylglukosaminu (UDP-GlcNAc), uridindifosfát glukosy (UDP-Glc), cyklické adenosindifosfát-ribosy (cADP ribosa) a uridindifosfát *N*-acetylgalaktosamin-sulfátu (UDP-GalNAcS) (Obr. 47) Toto zjištění naznačuje rozpad ^{13}C -HA na monosacharidy a jejich následnou přeměnu na aktivované cukry. Změněná isotopová distribuce byla nejjasněji pozorována ve spektrech UDP-GlcNAc, kde nejintenzivnější signály odpovídaly molekulám s 8 a 6 atomy ^{13}C . Výrazně více byl obsažen ^{13}C -UDP-GlcNAc s osmi ^{13}C , což koresponduje s isotopovou distribucí ^{13}C -HA, ve které je rovněž více zastoupen GlcNAc s osmi ^{13}C než GlcNAc s šesti ^{13}C (Obr. 34B). To naznačuje přímou konverzi GlcNAc na UDP-GlcNAc bez glukoneogeneze, což souhlasí se závěry, které se uvádí v literatuře [185]. Začlenění ^{13}C -GlcNAc do UDP-GlcNAc bylo pozorováno pro všechny testované M_w HA (13,6-1562 kDa) a rozsah začlenění dobře koreloval s množstvím ^{13}C -HA absorbovaného HLEC (Obr. 48). Tato korelace naznačuje, že kritickým procesem při metabolizaci HA je rychlost endocytózy HA do buněk, nikoliv intracelulární metabolizace endocytované HA. Výsledky souhlasí s publikovanými *in vitro* studii s kravskými srdečními buňkami, potkaními buňkami hladkého svalstva aorty a fibroblasty kuřecích embryí, kde byla rovněž internalizace HA do buněk

identifikována jako limitující faktor [186]. Pozorovaná metabolizace HA na UDP prekurzory může vysvětlovat výsledky další studie, kdy po *i.v.* aplikaci ^{14}C -HA (potkan a králík, M_w 2,8 MDa, dávka $\sim 0,17 \text{ mg kg}^{-1}$) byla radioaktivita pozorována u vysokomolekulárních metabolitů, jež byly odolné vůči hyaluronidasám [187]. Vzhledem k prokázané metabolizaci HA do UDP-Glc, UDP-GlcNAc a UDP-GalNAcS může být HA použit nejen jako zdroj energie, ale jeho metabolity také jako stavební jednotky, ze kterých mohou být syntetizovány GAG, proteoglykany, glykolipidy a další.

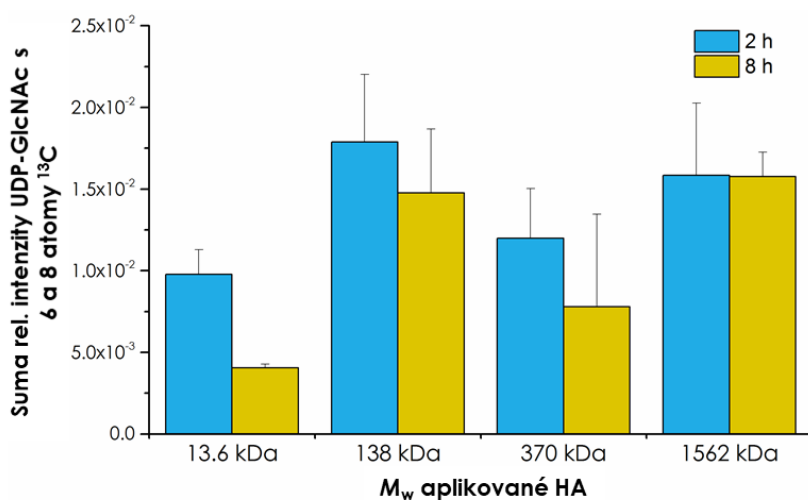


Obr. 47 Metabolizace ^{13}C -HA do uridin difosfát *N*-acetylglukosaminu (UDP-GlcNAc), uridin difosfát glukosy (UDP-Glc), cyklické adenosin difosfát ribosy (cADP ribosa) a uridin difosfát *N*-acetylgalaktosamin sulfátu (UDP-GalNAcS) jaterními endotheliálními buňkami HLEC.



Obr. 48 *In vitro* metabolismus ¹³C-HA jaterními endotheliálními buňkami: data ze čtyř experimentů – (A) Absorpce ¹³C-HA jaterními endotheliálními buňkami, (B) metabolizace ¹³C-HA do uridin difosfát *N*-acetylglukosaminu (UDP-GlcNAc).

Změněná isotopová distribuce UDP-GlcNAc byla pozorována také v *in vivo* studii v játrech, avšak ne v ledvinách nebo slezině. Po 2 a 8 hodinách od podání 138, 370 a 1562 kDa ¹³C-HA se množství ¹³C-UDP-GlcNAc v játrech významně nelišilo (Obr. 49). Po aplikaci 13,6 kDa ¹³C-HA byly signály nižší, avšak viditelné i po 8 hodinách, přestože v tomto čase bylo již 87 % ID vyloučeno močí. Po 10 minutách nebyl v játrech detekován žádný ¹³C-UDP-GlcNAc, což naznačuje, že metabolizace *i.v.* aplikovaného ¹³C-HA není nijak zvlášť rychlá.



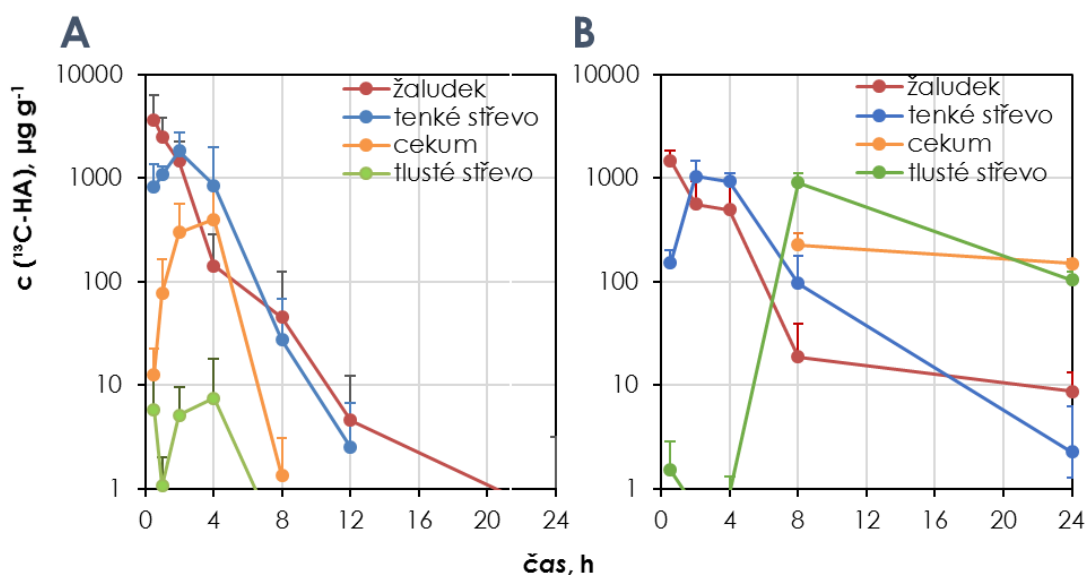
Obr. 49 Konverze ¹³C značky z *i.v.* aplikovaného ¹³C-HA do UDP-GlcNAc v játrech v závislosti na čase a M_w aplikovaného ¹³C-HA

Množství absorbovaného ^{13}C -HA a jeho přeměna na aktivované cukry metabolizací byly téměř nezávislé na M_w aplikovaného ^{13}C -HA, což odpovídá výsledkům z provedené *in vivo* studie, ale neodpovídá některým údajům z literatury pro *in vitro* [183,184]. V řadě studií je uváděno, že afinita HLEC je mnohem vyšší k vysokomolekulárnímu HA (6,4 MDa, K_m $9 \cdot 10^{-6}$ μM) než k nízkomolekulárnímu (30 kDa, K_m $5,8 \cdot 10^{-2}$ μM) [188]. Avšak v *in vivo* studii uvedené v této práci je stejně jako ve dvou dalších [189,190] *i.v.* aplikovaný nízkomolekulární HA eliminován s vyšší účinností než vysokomolekulární HA. Tento rozpor ve výsledcích lze připsat skutečnosti, že uváděná závislost absorpce HA na M_w [190] ať už pro *in vitro* nebo *in vivo* experimenty byla sledována vždy pouze při nízkých koncentracích HA a tedy za situace, kdy nebyl metabolismus HA saturován. Pokud je HA přítomen ve vysoké koncentraci, může být potlačen účinek M_w na jeho absorpci a metabolizaci. Metabolismus HA v játrech může být saturován i pro nízkomolekulární HA. Vyšší eliminační účinnost nízkomolekulární HA je potom způsobena příspěvkem renální eliminační cesty, která je dostupná pouze pro fragmenty s nízkou M_w . Podobná metabolizace a absorpce nízkomolekulárního a vysokomolekulárního HA při saturovaném metabolismu HA může také částečně vysvětlit účinnost *i.v.* podávaných přípravků s nízkomolekulárním HA, jež jsou účinné proti osteoartritidě, ačkoli po jejich *i.v.* aplikaci je většina dávky rychle eliminována ledvinami [191,192].

5.4.4 Farmakokinetika perorálně podávaného hyaluronanu

Metoda popsaná v kapitole 5.1 byla kromě stanovení farmakokinetiky *i.v.* aplikovaného HA využita ke studiu HA perorálně aplikovaného myším s normálním mikrobiomem a myším bez střevní mikroflóry. ^{13}C -HA byl stanoven v plasmě, moči, exkrementech, játrech a v jednotlivých částech gastrointestinálního traktu (GIT) (žaludek, tenké střevo, cekum, tlusté střevo) v několika časových bodech od 5 minut do 48 hodin od podání (Tab. XVIII, Tab. XIX). Cílem této studie bylo stanovit kinetiku prostupu HA střevním traktem, a především stanovit kolik *p.o.* aplikovaného HA je vstřebáno a jakou úlohu při vstřebávání HA hraje střevní mikrobiom.

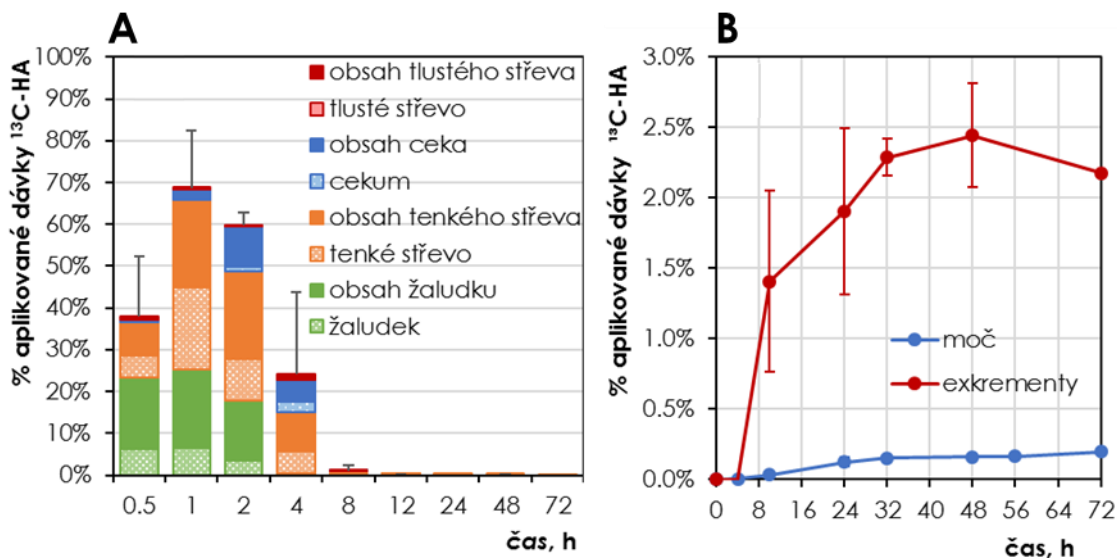
Analýza ^{13}C -HA odhalila, že u myší s normálním mikrobiomem je podaný ^{13}C -HA z GIT eliminován během 24 hodin. Eliminace ^{13}C -HA u bezmikrobních myší trvala podstatně déle, avšak tento rozdíl nelze zcela připisovat vlivu mikrobiomu, jelikož anatomie GIT bezmikrobních myší je specifická výrazně zvětšeným cekem, které je pravděpodobně hlavním důvodem zpožděného průchodu ^{13}C -HA GIT (Obr. 50).



Obr. 50 Kinetika průchodu *p.o.* aplikovaného ^{13}C -HA gastrointestinálním traktem myší s normálním mikrobiomem (A) a bezmikrobních myší (B).

Analýza vzorků stolice a moči z metabolických klecí myší s normálním mikrobiomem ukázala, že pouze kolem 7 % dávky ^{13}C -HA bylo vyloučeno ve formě ^{13}C -HA a jeho fragmentů. Z těchto dat vyplývá, že HA může být z velké části absorbován z GIT nebo metabolizován střevním mikrobiomem. (U bezmikrobních myší nebylo možné získat

vzorky z metabolických klecí.) Analýza moči dále ukázala, že kolem 0,2 % dávky ^{13}C -HA je vyloučeno močí ve formě HA a jeho fragmentů. Přítomnost ^{13}C -HA v moči jasně prokazuje, že část HA musela být z GIT vstřebána, distribuována do organismu a eliminována ledvinami. Při interpretaci těchto výsledků je třeba brát v úvahu možnou kontaminaci vzorků moči z metabolických klecí vzorky stolice. Koncentrace ^{13}C -HA v moči však byla naměřena v řádu jednotek $\mu\text{g ml}^{-1}$ a koncentrace ve vzorcích získaných ze všech tří metabolických klecí byly podobné. Navíc byly významné koncentrace HA pozorovány ve vzorcích moči u myší, které nebyly v metabolických klecích a moč jim byla odebrána přímo z močového měchýře. To potvrzuje, že HA se musí alespoň částečně absorbovat z GIT. Zajímavostí však zůstává, že v moči byly naměřeny poměrně vysoké koncentrace ^{13}C -HA, avšak v krevní plasmě nebyl nalezen žádný ^{13}C -HA. Vysvětlit tento jev je možné s využitím výsledků uvedených v předcházející kapitole věnované intravenózně podávaným HA (5.4.2). Z výsledků vyplývá, že nízkomolekulární fragmenty HA jsou z krevního řečiště velmi rychle eliminovány ledvinami s poločasem eliminace řádu několika minut. Pokud je absorpce z GIT do krevního řečiště významně pomalejší než rychlost eliminace HA z krevního řečiště do moči, koncentrace HA v krvi bude v porovnání s močí významně nižší. Nulová koncentrace ^{13}C -HA v moči a krvi bezmikrobních myší ukazuje, že pro absorpci HA z GIT je nutná přítomnost střevního mikrobiomu. Ze závěrů publikované studie [193] totiž vyplývá, že se zvyšující se M_w HA klesá jeho schopnost prostupovat střevní stěnou. Role mikrobiomu při absorpci HA by měla spočívat především v depolymerizaci HA na kratší fragmenty, jež jsou schopny střevní stěnou procházet.



Obr. 51 Stanovení podílu aplikované dávky HA přítomné v jednotlivých částech GIT (A) a vyloučeného v moči a exkrementech (B) (vzorky z metabolických klecí).

Naměřené výsledky u myši s normálním mikrobiomem souhlasí se závěry studie provedené na potkanech s $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HA (100 kDa) a ^{14}C -HA (120-150 kDa) s následnou analýzou distribuce radioisotopů [19], kdy byla pozorována pouze velmi malá aktivita $^{99\text{m}}\text{Tc}$ a ^{14}C v krvi, játrech a ledvinách. Podobné výsledky byly získány po aplikaci nativního HA (900 kDa, 200 mg/kg/den) myším [194], kdy nebyl pozorován rozdíl v koncentraci HA v plasmě (stanovené pomocí ELISA) oproti kontrole. Výsledky rovněž odpovídají studiím *s p.o.* podaným CS, kdy byl LC-MS nebo ELISA pozorován velmi nízký nebo žádný nárůst koncentrace CS v krevním řečišti [195–197]. Výsledky naopak neodpovídají studiím, kde byly sledovány distribuce radioisotopů $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HA, potkan, 300 kDa, 0,2 mg kg⁻¹) [13] a ^{14}C (^{14}C -HA, 920 kDa, 30 mg kg⁻¹) [178] a byl vysloven názor, že část perorálně podané HA prochází do organismu a kumuluje se do kloubů a kůže. Rozpor s těmito studiemi je pravděpodobně dán rozdílnou metodou měření distribuce HA. Při měření distribuce radioisotopů nebývá specificky měřen signál značeného HA, ale pouze signál radioisotopové značky, jež může být z HA odštěpena nebo může být nesena metabolitem HA. Pravděpodobně právě z tohoto důvodu nejsou závěry těchto studií a studie prezentované v této práci, kdy bylo použito velmi specifického značení a sledování HA, totožné.

Tab. XVIII Stanovení ^{13}C -HA v myších tkáních a tělních tekutinách po *p.o.* aplikaci HMW ^{13}C -HA myším s normálním mikrobiomem. Obsahy ^{13}C -HA jsou uvedeny v $\mu\text{g g}^{-1}$.

čas, h	žaludek	tenké střevo	cekum	tlusté střevo	plasma	moč	játra
0	40,9 ± 57,8	30,5 ± 50	1,4 ± 3,3	0 ± 0	0 ± 0	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,6
0,5	3636 ± 2727	817 ± 545,7	12,8 ± 9,5	5,9 ± 6,7	0 ± 0	0 ± 0	1,9 ± 3,2
1	2508 ± 1284	1076,1 ± 226,5	77,8 ± 86,6	1,1 ± 0,9	0 ± 0	0 ± 0,1	0 ± 0
2	1452 ± 807	1826,1 ± 909,2	298,6 ± 271,8	5,1 ± 4,5	0 ± 0	0,8 ± 0,9	0 ± 0
4	142,5 ± 141,3	848,9 ± 1138	397,6 ± 490,3	7,5 ± 10,6	0 ± 0	3,5 ± 5,9	0 ± 0
8	45,2 ± 80,1	27,4 ± 41,3	1,3 ± 1,8	0,3 ± 0,3	0 ± 0	6 ± 5,9	0 ± 0
12	4,6 ± 7,9	2,5 ± 4,2	0 ± 0	0 ± 0	1,5 ± 2,5	1,3 ± 1,9	0,5 ± 0,9
24	0,5 ± 2,6	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1,8 ± 3,2	0 ± 0	0 ± 0
48	-2,5 ± 0	0,6 ± 1,1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
72	-0,5 ± 2,9	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Tab. XIX Stanovení ^{13}C -HA v myších tkáních a tělních tekutinách po *p.o.* aplikaci HMW ^{13}C -HA bezmikrobním myším. Obsahy ^{13}C -HA jsou uvedeny v $\mu\text{g g}^{-1}$.

čas, h	žaludek	tenké střevo	cekum	tlusté střevo	plasma	moč	játra
0	4,1 ± 1,3	0 ± 0	0 ± 0	0,7 ± 0,1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
0,5	1471,1 ± 359,1	151,4 ± 51,9	0 ± 0	1,5 ± 1,3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
2	563,3 ± 371,7	1037,1 ± 421,3	0 ± 0	0,7 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
4	494,5 ± 495,4	922,8 ± 192,7	0 ± 0	0,9 ± 0,4	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
8	18,7 ± 20,5	96,9 ± 82,7	225,5 ± 71,1	899,3 ± 217,6	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
24	8,7 ± 4,6	2,3 ± 4	149,7 ± 13,8	103,8 ± 20,3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

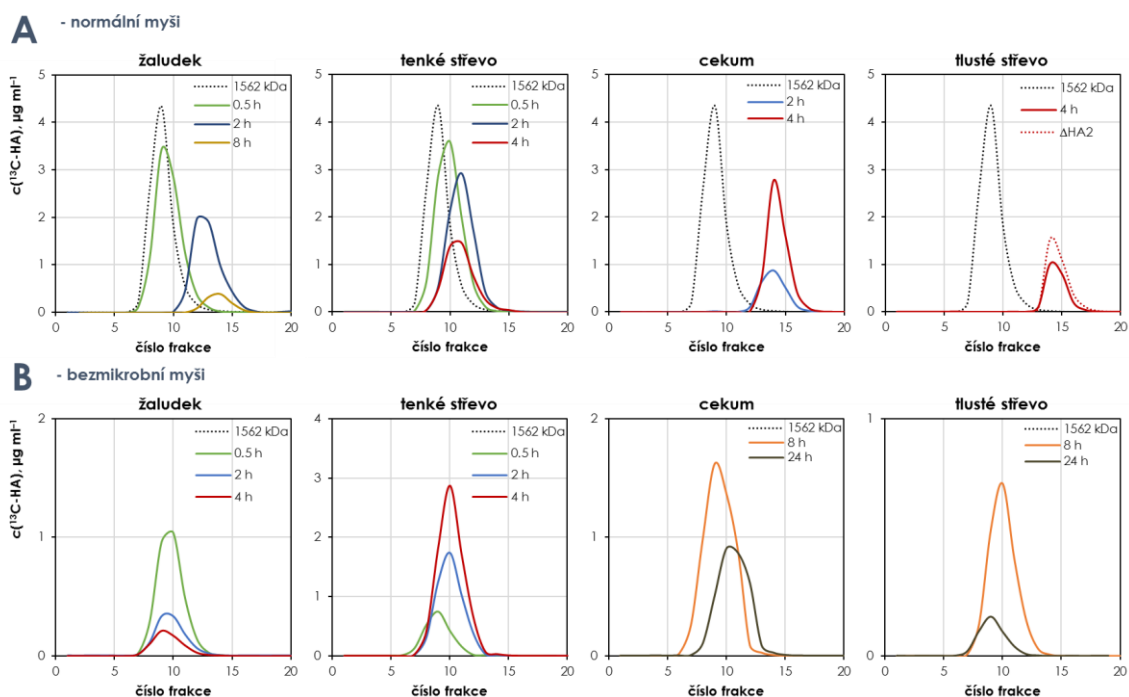
5.4.5 Degradace hyaluronanu střevním mikrobiomem

Studium farmakokinetiky HA po perorálním podání naznačuje, že v GIT myši s normálním mikrobiomem dochází k metabolizaci HA. Ke studiu metabolismu HA bylo využito analytických metod SEC a LC-MS pro charakterizaci změn M_w (4.3.5), LC-MS analýzy pro detekci metabolitů ^{13}C -HA nesoucích isotopovou značku ^{13}C (4.3.4, 4.3.13) a GC-MS analýza krátkých mastných kyselin (4.3.13), jež jsou jedny ze známých metabolitů střevního mikrobiomu s imunomodulačními vlastnostmi [198] a mohly by stát za mechanismem účinku perorálně podávaného HA na léčbu osteoartritidy. Pro studium mikrobiální degradace HA byly použity vzorky z předcházející studie s *p.o.* aplikovaným ^{13}C -HA a vzorky z *ex vivo* kultivace obsahu ceka myši se specifickým mikrobiomem OligoMM12 a ^{13}C -HA.

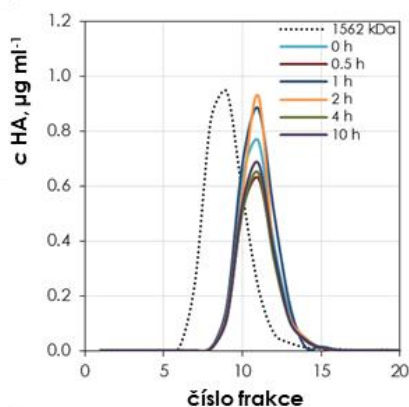
5.4.5.1 Stanovení změn distribuce M_w ^{13}C -hyaluronanu v gastrointestinálním traktu myši po jeho *p.o* aplikaci

Vyvinutá analytická metoda kombinující separaci analytů dle M_w pomocí SEC s následnou LC-MS analýzou HA v sesbíraných frakcích byla použita ke stanovení M_w perorálně podaného ^{13}C -HA v různých částech GIT a v různých časech od podání u myši s normálním mikrobiomem a u myši bezmikrobních. Analýza distribuce M_w touto metodou ukázala, že M_w ^{13}C -HA se v GIT snižuje a to u obou skupin myši (Obr. 52). Posun M_w ^{13}C -HA k nižším hodnotám byl pozorován výrazněji u myši s normálním mikrobiomem. U bezmikrobních myši byl zaznamenán pokles M_w v žaludku, v dalších částech GIT se ani s přibývajícím časem M_w dále nesnižovala. Tento pokles je pravděpodobně způsoben kyselým prostředím žaludku, jež částečně depolymerizuje řetězec HA. Pozorování bylo potvrzeno *in vitro* experimentem v umělé žaludeční šťávě (pH 1,5) (4.3.10, Obr. 53) a souhlasí s literaturou [199]. Určitý nesoulad mezi *in vivo* a *in vitro* experimentem, kdy byl pokles výraznější, je dán tím, že umělá žaludeční šťáva byla namíchána dle receptu pro simulaci lidské žaludeční šťávy. Ta má výrazně nižší pH (1,5) než žaludeční šťáva myši (3,0) [200].

Pokles M_w ^{13}C -HA u myši s normálním mikrobiomem pokračoval v dalších částech GIT. V cecku a tlustém střevě byla naměřená M_w ^{13}C -HA blízká M_w nenasyceného disacharidu HA (Obr. 52). Oligosacharidy HA mohou prostupovat střevní stěnou [193] nebo být dále metabolizovány střevním mikrobiomem [201].



Obr. 52 Distribuce M_w ^{13}C -HA v různých částech GIT po *p.o.* aplikaci 1562kDa ^{13}C -HA myším s normálním mikrobiomem (A) a bezmikrobním myším (B).

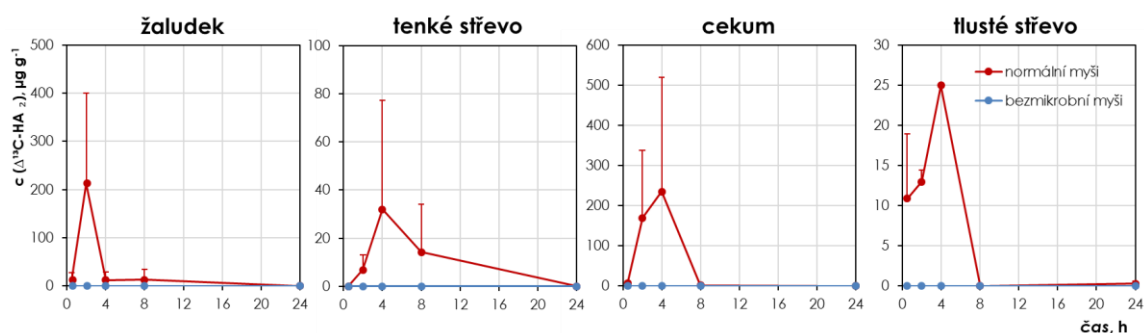


Obr. 53 Distribuce ^{13}C -HA v umělé žaludeční šťávě (pH 1,5) a inkubaci při 37 °C.

5.4.5.2 Stanovení oligosacharidů hyaluronanu v gastrointestinálním traktu myši po jeho *p.o.* aplikaci

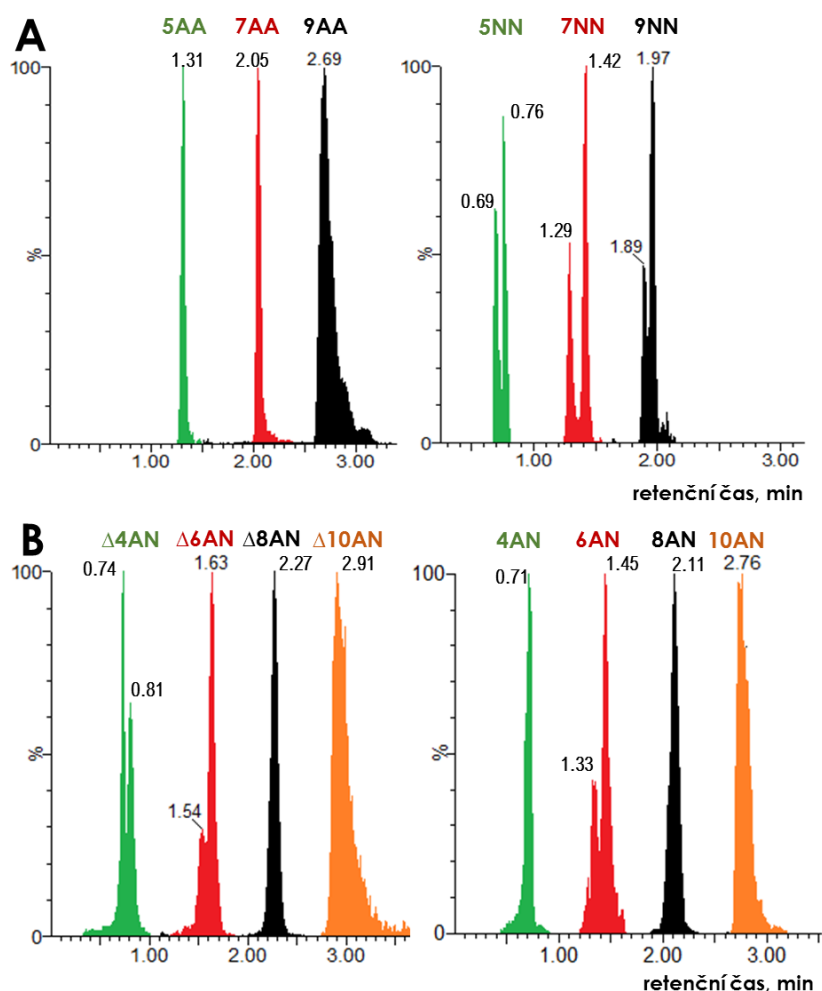
Vzorky obsahu střev z *in vivo* studie s perorálně podaným ^{13}C -HA myším s normálním mikrobiomem a myším bezmikrobním byly dále analyzovány na obsah nenasycených disacharidů. Tato analýza probíhala stejným způsobem jako stanovení celkového ^{13}C -HA ve vzorku avšak s vynecháním kroku depolymerizace ^{13}C -HA HA lyasou SpHyl. U myši s normálním mikrobiomem byl ^{13}C -HA depolymerizován na nenasycené disacharidy,

příčemž v obsahu ceka a tlustého střeva byl nenasycený disacharid dominantní formou přítomného ^{13}C -HA (Obr. 54). Depolymerizace na nenasycené disacharidy je specifická pro mikrobiální degradaci HA, jelikož při analýze vzorků z bezmikrobních myší a vzorků z *in vitro* kultivace ^{13}C -HA s umělou střevní šťávou nebyly nenasycené disacharidy pozorovány. Nenasycené disacharidy byly rovněž prokázány ve vzorcích moči u myší s normálním mikrobiomem.



Obr. 54 Množství nenasycených disacharidů ^{13}C -HA ($\Delta^{13}\text{C-AN2}$) v různých částech GIT po *p.o.* aplikaci ^{13}C -HA myším s normálním mikrobiomem a bezmikrobním myším.

Pro identifikaci dalších produktů mikrobiální depolymerizace HA bylo třeba vyvinout další analytickou metodu, které by detekovala delší oligosacharidy než disacharidy. Pro tento účel byla testována metoda původně vyvinutá pro analýzu nasycených oligosacharidů HA vznikajících enzymatickou depolymerizací BTH (4.1.3), avšak biologické vzorky se nedařilo touto metodou analyzovat. Ve spolupráci s Bc. Miroslavem Kubátem v rámci jeho diplomové práce (autor disertační práce byl konzultantem) byla vyvinuta metoda pro analýzu delších oligosacharidů. V rámci předložené disertační práce byla metoda dále rozvinuta pro analýzu sudých nasycených, sudých nenasycených, lichých AA a lichých NN oligosacharidů. Příprava vzorku a extrakce oligosacharidů probíhala stejným způsobem jako příprava vzorku pro analýzu polárních metabolitů. Ukázka separace oligosacharidů je uvedena na Obr. 55.

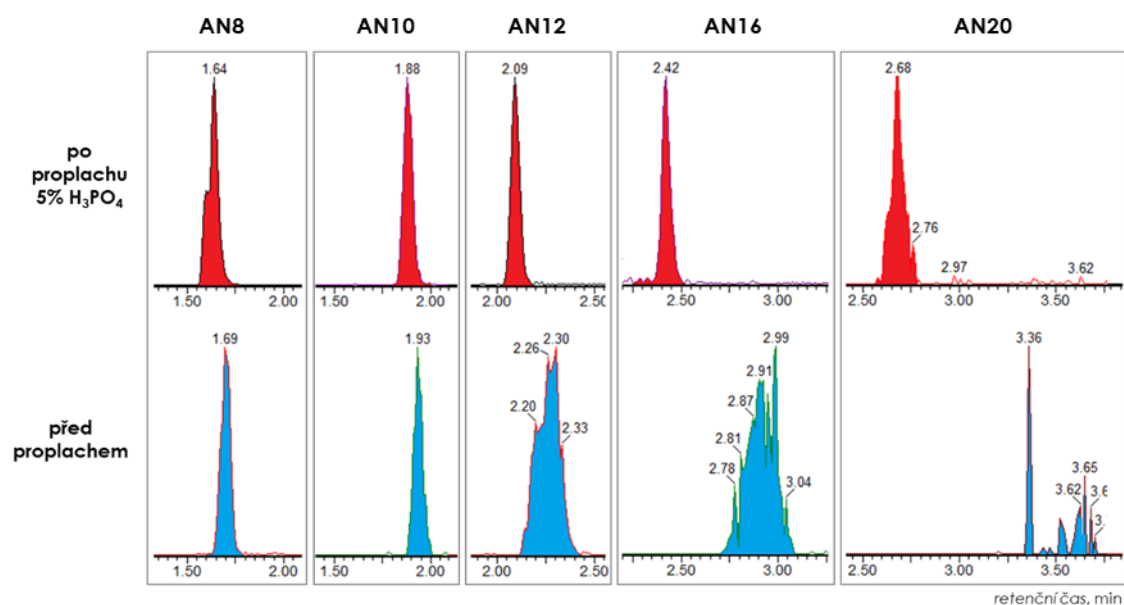


Obr. 55 Ukázka separace A) lichých oligosacharidů HA typu AA a NN, B) nasycených a nenasycených (Δ) sudých oligosacharidů HA typu AN.

Chromatografická separace probíhala na analytické koloně Waters Atlantis C18 AX (1,7 μ m, 2,1x50 mm) kombinující reverzní fáze a iontově-výměnnou chromatografii. Oligosacharidy byly eluovány dle vzrůstajícího počtu disacharidových jednotek a bylo možné separovat oligosacharidy s dvěma až dvaceti monosacharidy. Nenasycené oligosacharidy v důsledku své vyšší hydrofobicity byly eluovány později než oligosacharidy nasycené (Obr. 55B). Přítomnost více karboxylových skupin u AA oligosacharidů oproti NN sacharidům se stejným počtem monosacharidů způsobuje vyšší retenci na koloně, což je dáno větší iontovou interakcí se sorbentem (Obr. 55A).

Problémem při analýze oligosacharidů v extraktech obsahu střev byla relativně nízká opakovatelnost chromatografické separace, posun retenčních časů a rozmývání elučních zón. Příčinou byla sorpce analytů na kovové části LC systému, což bývá problémem

především při chromatografické separaci polárních látek obsahujících fosfátové skupiny [202]. Promytím HPLC systému, analytické kolony a ESI kapiláry 5% kyselinou fosforečnou byly kovové součásti systému pasivovány, což mělo za následek lepší tvary píků především pro delší oligosacharidy (AN 12-20) (Obr. 56).



Obr. 56 Chromatografický záznam ze separace oligosacharidů HA před a po pasivaci kovových částí HPLC.

Ve snaze dosáhnout co nejnižší meze detekce byly oligosacharidy detekovány v MRM módu a navíc pouze oligosacharidy, jež nesly atomy ¹³C na všech uhlíkových pozicích. Pro kvantifikaci ¹³C-oligosacharidů ve vzorcích obsahů střev však nebyly dostupné isotopově značené standardy, z tohoto důvodu byly pro kalibraci využity neznačené standardy oligosacharidů (k dispozici pouze oligosacharidy ΔAN8-ΔAN16). Kalibrační roztoky byly měřeny za stejných podmínek jako ¹³C oligosacharidy ve vzorcích, avšak při MRM měření byly sledovány pouze monoisotopové signály oligosacharidů s ¹²C atomy na všech uhlíkových pozicích. Naměřené signály ¹²C oligosacharidů z kalibrace a ¹³C oligosacharidů ze vzorků byly na základě přirozené isotopové distribuce, isotopové čistoty výchozího ¹³C-HA (Obr. 34) a isotopové čistoty výchozí D-U-¹³C-glukosy (99%) korelovány na podíly populací monoisotopových ¹²C nebo ¹³C molekul na celkovém počtu molekul. Isotopová distribuce ¹²C oligosacharů byla spočtena komerčním softwarem (Waters Masslynx 4.1), isotopová distribuce ¹³C oligosacharidů byla počítána

na základě isotopové čistoty výchozího ^{13}C -HA (91% disacharidových jednotek mělo ^{13}C atomy na všech uhlíkových pozicích) a pomocí binomického rozvoje:

$$b(x, n, p) = \binom{n}{x} p^x (1-p)^{n-x}$$

Kde x je počet ^{12}C v molekule, p pravděpodobnost, že na dané pozici je atom ^{12}C (dáno isotopovou čistotou použité U- ^{13}C -glukosy (>99%), tzn. že pravděpodobnost přítomnosti ^{12}C na dané pozici je 1 %), n značí počet atomů uhlíku v molekule. Výsledky zastoupení monoisotopových populací u ^{12}C a ^{13}C oligosacharidů jsou uvedeny v Tab. XX.

Tab. XX Zastoupení monoisotopových populací ^{12}C a ^{13}C u oligosacharidů s normální isotopovou distribucí a isotopově obohacených oligosacharidů

		% z celkové populace molekul				
		ΔAN8	ΔAN10	ΔAN12	ΔAN14	ΔAN16
^{12}C -	monoisotopová molekula ^{12}C	48,1 %	39,9 %	33,3 %	27,8 %	23,3 %
oligosacharidy						
^{13}C -	monoisotopová molekula ^{13}C	51,7 %	44,9 %	39,0 %	33,9 %	29,4 %
oligosacharidy						

Uvedená metoda byla následně použita ke kvantifikaci nenasycených oligosacharidů ve vzorcích jednotlivých částí gastrointestinálního traktu myši, kterým byl perorálně podán vysokomolekulární ^{13}C -HA. Výsledky LC-MS analýz jsou prezentovány v Tab. XXI.

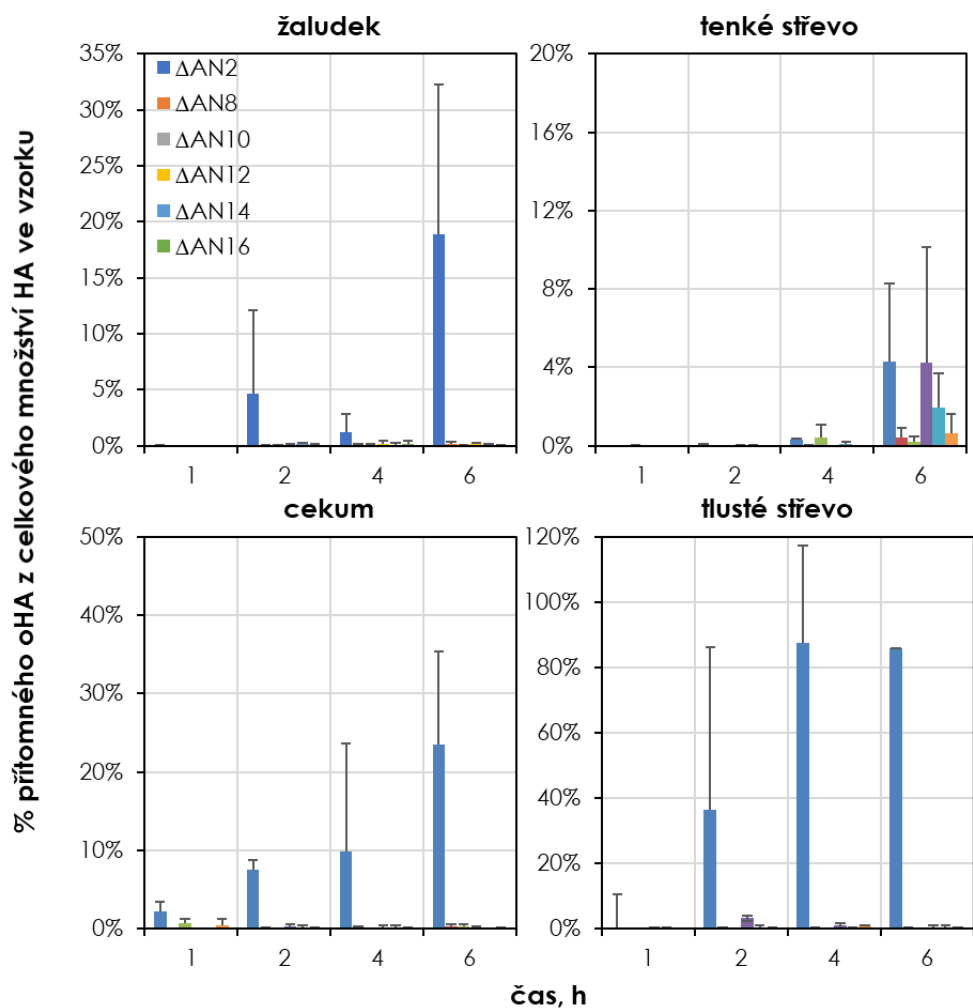
Tab. XXI Produkce nenasycených oligosacharidů mikrobiální degradací *p.o.* ^{13}C -HA v jednotlivých částech gastrointestinálního traktu. Čísla v tabulce vyjadřují množství jednotlivých oligosacharidů v $\mu\text{g g}^{-1}$.

čas, h	ΔAN2	ΔAN8	ΔAN10	ΔAN12	ΔAN14	ΔAN16
	žaludek					
1	0,2 ± 0,23	0 ± 0	0,01 ± 0,01	0 ± 0	0 ± 0,01	0 ± 0
2	7,45 ± 10,83	0,09 ± 0,02	0,08 ± 0,08	0,19 ± 0,22	0,3 ± 0,34	0,16 ± 0,22
4	2,83 ± 4,31	0,11 ± 0,12	0,11 ± 0,06	0,32 ± 0,55	0,24 ± 0,24	0,36 ± 0,63
6	27,33 ± 19,99	0,35 ± 0,12	0,09 ± 0,07	0,24 ± 0,23	0,15 ± 0,11	0,06 ± 0,06
24	0 ± 0	0 ± 0,16	0 ± 0,17	0 ± 0	0,04 ± 0,02	0 ± 0
tenké střevo						
1	0,05 ± 0,03	0 ± 0	0 ± 0,02	-	0,06 ± 0,11	0 ± 0,01
2	0,45 ± 0,34	0,02 ± 0,02	0,01 ± 0,05	-	0,02 ± 0,04	0 ± 0
4	0,46 ± 0,28	0,02 ± 0,02	0 ± 0,01	-	0 ± 0,01	0,03 ± 0,05
6	4,57 ± 3,93	0,08 ± 0,06	0,04 ± 0,06	-	0,05 ± 0,1	0,12 ± 0,21
24	-0,01 ± 0	0 ± 0	0 ± 0,01	-	0,01 ± 0,04	0 ± 0

cekum						
1	1,82 ± 2,82	0,03 ± 0,05	0,06 ± 0,05	0,01 ± 0,03	0,04 ± 0,06	0,15 ± 0,21
2	19,1 ± 16,45	0,29 ± 0,36	0,06 ± 0,06	0,92 ± 1,18	0,72 ± 0,64	0,17 ± 0,21
4	27,38 ± 15,15	0,36 ± 0,32	0,11 ± 0,06	0,72 ± 0,99	0,22 ± 0,39	0,37 ± 0,51
6	9,78 ± 8,96	0,14 ± 0,31	0,05 ± 0,07	0,06 ± 0,1	0 ± 0	0,02 ± 0,04
24	0,06 ± 0	0 ± 0,26	0,01 ± 0,16	0 ± 0	0,07 ± 0,11	0,02 ± 0,03
tlusté střevo						
1	2,45 ± 4,42	0,01 ± 0,01	0 ± 0	0,01 ± 0,04	0 ± 0,01	0,03 ± 0,06
2	15,21 ± 12	0,1 ± 0,11	0,01 ± 0,02	1,93 ± 1,68	0,28 ± 0,25	0,19 ± 0,27
4	272 ± 350,3	0,69 ± 0,39	0,31 ± 0,14	2,46 ± 0,1	1,24 ± 0,42	1,6 ± 1,14
6	45,43 ± 39,67	0,22 ± 0,2	0,02 ± 0,03	0,98 ± 0,97	0,52 ± 0,48	0,52 ± 0,67
24	0 ± 0,01	0 ± 0	0 ± 0	1,36 ± 1,61	0,13 ± 0,13	0 ± 0

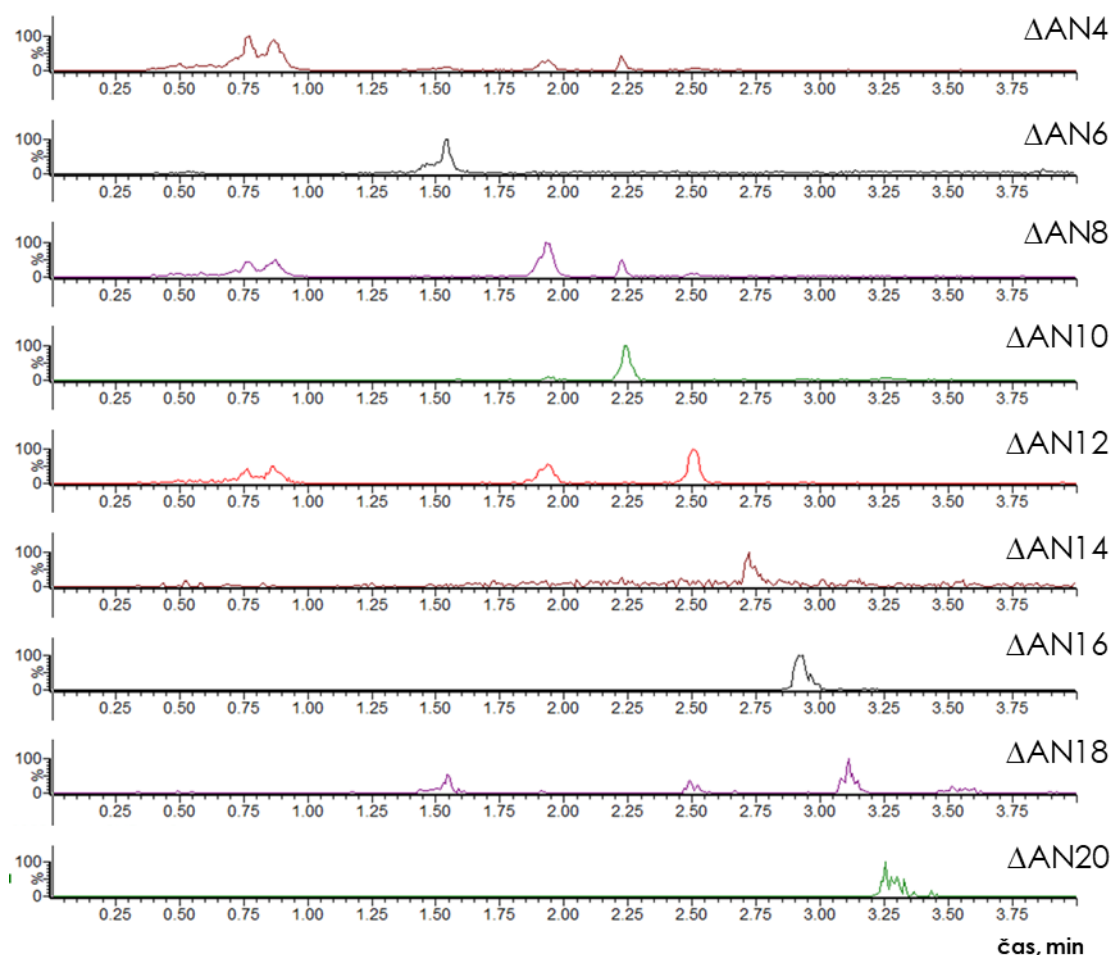
Množství nenasycených oligosacharidů Δ AN8- Δ AN16 se však ukázalo být v porovnání s množstvím nenasyceného disacharidu poměrně nízké (Obr. 58). Vyšší oligosacharidy jsou pravděpodobně pouze meziprodukty mikrobiální degradace HA s tím, že hlavním produktem je nenasycený disacharid HA. Ve spodních částech gastrointestinálního traktu je pak nenasycený disacharid dominantní formou HA. Po 4 h od podání dosahuje podíl nenasyceného disacharidu na celkovém množství přítomného HA více než 80 %.

Stanovená množství oligosacharidů se pro jednotlivá zvířata poměrně lišily. Tento fakt je pravděpodobně zapříčiněn tím, že nenasycené oligosacharidy nejsou produkty metabolisme HA střevními buňkami, ale vznikají působením střevního mikrobiomu. Po dobu 14-ti dnů před začátkem experimentu, byly myši umístěny do klecí po pěti zvířatech a ve třídních intervalech byly myši mezi jednotlivými klecemi náhodně přemísťovány. Tato technika minimalizovala variabilitu střevního mikrobiomu mezi testovanými zvířaty. Avšak je známo, že některé druhy bakterií primárně v terminálním ileu a proximálním tlustém střevu jsou touto technikou tzv. cohousingu ovlivněny jen málo [203]. Velká variabilita výsledků v Tab. XXI a na Obr. 57 tak může právě souviset s vysokou mírou variability střevního mikrobiomu u testovaných zvířat.



Obr. 58 Množství nenasyčených oligosacharidů přítomných v různých částech GIT po *p.o.* aplikaci 1562kDa ^{13}C -HA myším s normálním mikrobiomem.

Ve vzorcích, ve kterých byly kvantifikovány oligosacharidy $\Delta\text{AN}8$ - $\Delta\text{AN}16$, byly vždy přítomny všechny měřené nenasyčené oligosacharidy $\Delta\text{AN}2$ - $\Delta\text{AN}20$. Ve vzorcích naopak nebyly zjištěny žádné nasycené AN oligosacharidy ani liché oligosacharidy typu AA nebo NN. Typický chromatografický záznam je uveden na Obr. 59.



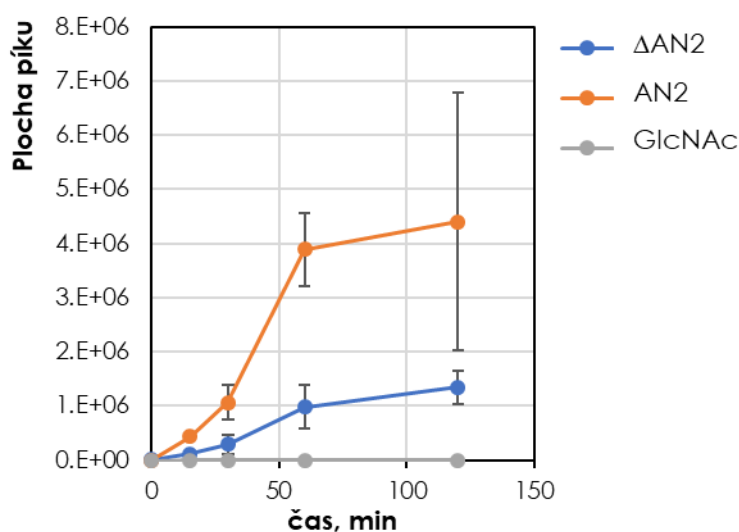
Obr. 59 Chromatografický záznam z LC-MS analýzy oligosacharidů HA v obsahu tlustého střeva 4 h po perorální aplikaci ^{13}C -HA. Záznamy pro některé oligosacharidy obsahují několik píků, to je způsobeno tím, že m/z různě nabitých oligosacharidů se shodují např. $[\Delta\text{AN}8\text{-}2\text{H}]^{2-}$ a $[\Delta\text{AN}12\text{-}3\text{H}]^{3-}$ viz Tab. VI.

5.4.5.3 LC-MS a GC-MS analýza metabolitů z kultivace obsahu ceka s ^{13}C -hyaluronanem

Pro identifikaci dalších ^{13}C metabolitů mikrobiální degradace HA bylo využito předem zavedené metody ke studiu metabolizace HA jaterními buňkami (5.4.3.3). Analyzovány byly vzorky střevního obsahu po perorální aplikaci ^{13}C -HA. Přestože bylo předcházejícími analýzami ^{13}C -HA a oligosacharidů HA prokázáno, že k metabolizaci HA ve střevech dochází, nebyly ve vzorcích obsahu střev detekovány žádné ^{13}C obohacené metabolity. Tento fakt je pravděpodobně dán tím, že metabolity HA jsou, stejně jako HA, látky organismu vlastní a pravděpodobně bude docházet k jejich tvorbě i

bez perorální suplementace HA. U metabolitů ^{13}C -HA může docházet k přílišnému „isotopovému ředění“ a nemusí být detekovatelné.

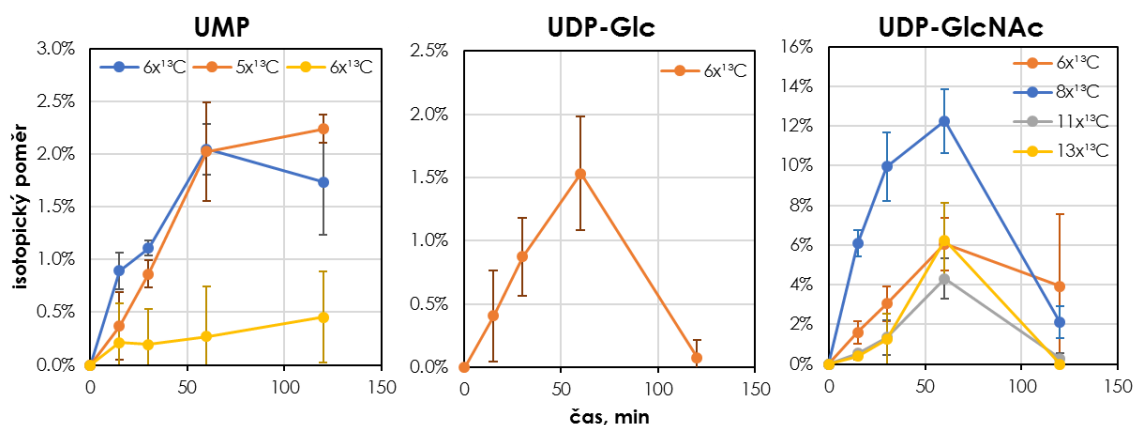
Pro zvýšení šancí na detekci metabolitů ^{13}C -HA byl proveden *ex vivo* experiment, kdy byl z myši osazených specifickým mikrobiomem OligoMM12 [158] odebrán obsah ceka, k němuž byl přidán roztok vysokomolekulární ^{13}C -HA. Následovala kultivace při anaerobních podmínkách 120 min, během kterých byly z roztoku odebrány v několika časech alikvoty. V nich byly stanovovány oligosacharidy, krátké mastné kyseliny a ^{13}C polární analyty. Analýza monosacharidů (4.3.3) a oligosacharidů (4.3.12) ukázala, že k metabolizaci ^{13}C -HA obsahem ceka OligoMM12 myši dochází, jelikož byla pozorována produkce nasycených a nenasycených disacharidů HA a v malé míře monosacharidu GlcNAc (Obr. 60).



Obr. 60 Depolymerizace ^{13}C -HA způsobená působením obsahu ceka myši osazených OligoMM12 mikrobiomem.

Necílenou LC-MS analýzou polárních metabolitů bylo dále prokázáno, že isotopová značka ^{13}C pocházející z ^{13}C -HA se, podobně jako v případě jaterních buněk, objevuje v UDP-GlcNAc a UDP-Glc. Kromě těchto dvou látek bylo isotopové obohacení pozorováno pro uridin 5-monofosfát. Nebyla pozorována metabolizace ^{13}C -HA na žádné další látky. Jelikož HA nemůže být přímo metabolizován na UMP nebo UDP-cukry, musí být ve vzorcích přítomny další ^{13}C metabolity, jež však nebyly použitou metodou detekovány. UMP a UDP-cukry vykazují dobrou ionizovatelnost a tedy vysokou odezvu v MS, dále dobrou rozlišitelnost isotopové distribuce. Hůře ionizovatelné metabolity

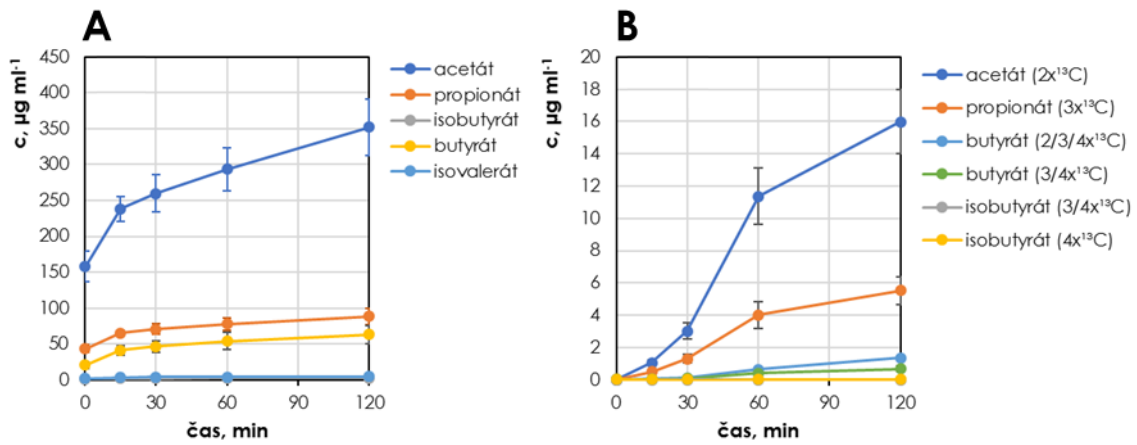
nemusí být touto metodou identifikovány. Nicméně metabolizace perorálně aplikovaného HA na UDP-GlcNAc může vést k řadě biologických účinků a může stát za terapeutickým působením perorálně aplikovaného HA. UDP-GlcNAc slouží jako signální molekula, která ovlivňuje např. postranlační modifikace proteinů (*N*- a *O*- glykosilace). Glykosilace proteinů pak ovlivňuje stabilitu a signální funkci HA syntáz (HAS3, HAS2) [204,205]. Bylo rovněž prokázáno, že perorální aplikace GlcNAc (120-600 mg/kg/den, 6 týdnů), jež se rovněž používá k léčbě osteoartrity, zvýšila koncentraci UDP-GlcNAc v játrech a zvýšila *N*-glykosilaci proteinů [206].



Obr. 61 Metabolizace ¹³C-HA na uridin 5-monofosfát (UMP), uridin difosfát glukosy (UDP-Glc) a uridin difosfát *N*-acetylglukosaminu (UDP-GlcNAc) způsobená působením obsahu ceka myši osazených OligoMM12 mikrobiomem.

Dalším potenciálně zajímavým metabolitem HA mohou být krátké mastné kyseliny (acetát, propionát a butyrát), které však necílenou LC-MS analýzou nebyly ve vzorcích zjištěny. Pro prověření metabolizace HA na krátké mastné kyseliny bylo využito cílené analýzy pomocí GC-MS. Analýza vzorků z kultivace ceka s roztokem ¹³C-HA ukázala, že v průběhu kultivace roste celkové množství krátkých mastných kyselin (Obr. 62A). Nárůst patrně souvisel s tím, že v odebraném obsahu ceka byly k dispozici kromě ¹³C-HA i jiné živiny, které myš zkonsumovala před vlastním odběrem obsahu ceka. Prokazatelným důkazem metabolizace ¹³C-HA na krátké mastné kyseliny je však pozorovaný nárůst koncentrace krátkých mastných kyselin nesoucích isotopovou značku ¹³C (Obr. 62B). Metabolizace na krátké mastné kyseliny rovněž může stát za terapeutickými účinky perorálně podávaného HA. Krátké mastné kyseliny ovlivňují jak střevní epitelální buňky, tak imunitní buňky. U epitelálních buněk podporují bariérovou funkci střevního epitelu skrze indukci exprese tight junction proteins: ZO-1, claudinů a

occulinu. U makrofágů v *lamina propria* krátké mastné kyseliny inhibují histon deacetylázy (HDACs), NF-kB prozánětlivé faktory (TNF-A, IL-6, IL-12 a iNOS) a zvyšují protizánětlivé faktory (IL-10) [207].



Obr. 62 Metabolizace ¹³C-HA na krátké mastné kyseliny způsobená působením obsahu ceka myši osazených OligoMM12 mikrobiomem.

6. ZÁVĚR

V práci byly představeny analytické přístupy využívající LC-MS metod k charakterizaci chemicky modifikovaného HA a ke studiu absorpce, distribuce, metabolismu a eliminace nativního i chemicky modifikovaného HA podaného do organismu.

Pro charakterizaci homogenity distribuce HA-C12 byla vyvinuta analytická metoda využívající enzymatické degradace enzymem BTH. Vznikající nemodifikované nasycené oligosacharidy typu AN s *DP* 4-20 byly stanoveny pomocí RPLC-MS. Množství vzniklých oligosacharidů odpovídalo jednak *DS* derivátu, avšak také distribuci chemických modifikací podél HA řetězce. Při stejné hodnotě *DS* vyšší množství oligosacharidů ukazovalo na to, že derivát měl delší nemodifikované části řetězce, tedy více heterogenní distribuci modifikací a v důsledku vyšší nasákavost vody. Metoda byla využita k odhalení šarží derivátu s nestandardní distribucí modifikací. Šarže mohly být vyřazeny z výrobního procesu ještě dříve, než se z nich stal finální výrobek např. film, nanovlákně apod.

Další metoda vyvinutá pro kvantifikaci HA a HA-C18:1 v biologických vzorcích využívala úplné degradace enzymem SpHyl s následnou LC-MS kvantifikací vzniklých nenasycených disacharidů. Umožnila vůbec poprvé stanovit biodistribuci chemicky modifikovaného HA bez nutnosti fluorescenčního nebo radioisotopového značení, která mohou vést ke sporné interpretaci výsledků zejména z důvodu změněné biologické aktivity nebo z důvodu, že fluorescence nebo scintigrafie nerozliší signál volné značky a značky navázané na HA nebo jeho metabolitu.

Vyvinutý analytický postup byl validován dle směrnice FDA [150] a následně byl použit pro studium polymerního nosiče z HA-C18:1 nesoucího cytostatikum DOX po intravenózní aplikaci myším s prsním nádorem. Různé farmakokinetické profily nosné matrice a léčiva ukázaly na rychlé narušení struktury polymerních micel v krevním řečišti. Dále byla prokázána biologická odbouratelnost HA-C18:1 a pomocí SEC byla popsána změna jeho molekulové hmotnosti vlivem metabolizace.

Uvedená metoda byla použita také k analýze nemodifikovaného HA v biologických vzorcích. S využitím HA značeného isotopem ^{13}C a analýzy LC-MS bylo možné zjistit nejen biodistribuci podaného HA, ale pomocí metabolické analýzy a studiu isotopových distribucí bylo možné rovněž identifikovat některé metabolity ^{13}C -HA. Metoda pomohla

jednoznačně popsat, jak M_w intravenózně podaného HA ovlivňuje jeho rychlost a způsob eliminace. Metody kvantifikace HA, analýza oligosacharidů HA a metabolická analýza inkorporace ^{13}C z ^{13}C -HA byly aplikovány při studium osudu perorálně podaného HA v zažívacím traktu, při zjištění změn jeho M_w a výzkumu jeho metabolismu. Pomocí *in vivo* studií na myším modelu bez a s normálním střevním mikrobiomem byla prokázána nezastupitelná role střevního mikrobiomu při absorpci HA ze zažívacího traktu. Byla vyvinuta nová metoda chromatografické separace oligosacharidů HA využívající slabých iontových interakcí a systém reverzních fází. Nenasycené oligosacharidy byly identifikovány jako hlavní produkty mikrobiální depolymerizace HA. Dalšími zjištěnými mikrobiálními metabolity degradace HA byly aktivované cukry a krátké mastné kyseliny.

Uvedené analytické postupy kombinující různé metody enzymatické degradace, isotopového značení stabilními isotopy a LC-MS analýzy různých modifikovaných a nemodifikovaných typů oligosacharidů představují unikátní soubor metod pro charakterizaci derivátů HA a studium biologických vlastností nativního a chemicky modifikovaného HA. Vyvinuté metody mohou sloužit k dalšímu studiu nanomateriálových nosičů z chemicky modifikovaného hyaluronanu, jejich farmakokinetiky a metabolizace. Případně mohou být využity ke studiu hyaluronanu na savčích modelech při zkoumání biologických účinků hyaluronanu nebo mohou být využity při optimalizaci bakteriální syntézy hyaluronanu v biotechnologické výrobě.

7. LITERATURA

- [1] M. Šimek, M. Hermannová, D. Šmejkalová, T. Foglová, K. Souček, L. Binó, V. Velebný, LC–MS/MS study of in vivo fate of hyaluronan polymeric micelles carrying doxorubicin, *Carbohydrate Polymers*. (2019) 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.104>.
- [2] N. Volpi, J. Schiller, R. Stern, L. Soltés, Role, metabolism, chemical modifications and applications of hyaluronan, *Current Medicinal Chemistry*. 16 (2009) 1718–1745. <https://doi.org/10.2174/092986709788186138>.
- [3] M.K. Cowman, Chapter One - Hyaluronan and Hyaluronan Fragments, in: D.C. Baker (Ed.), *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Academic Press, 2017: pp. 1–59. <https://doi.org/10.1016/bs.accb.2017.10.001>.
- [4] T. Chanmee, P. Ontong, N. Itano, Hyaluronan: A modulator of the tumor microenvironment, *Cancer Letters*. 375 (2016) 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.02.031>.
- [5] M. Erickson, R. Stern, Chain Gangs: New Aspects of Hyaluronan Metabolism, *Biochemistry Research International*. 2012 (2011) 893947. <https://doi.org/10.1155/2012/893947>.
- [6] Y. Yamaguchi, H. Yamamoto, Y. Tobisawa, F. Irie, TMEM2: A missing link in hyaluronan catabolism identified?, *Matrix Biology*. 78–79 (2019) 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.03.020>.
- [7] R. Stern, A.A. Asari, K.N. Sugahara, Hyaluronan fragments: An information-rich system, *European Journal of Cell Biology*. 85 (2006) 699–715. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2006.05.009>.
- [8] S.R. Hamilton, M. Veiseh, C. Tölg, R. Tirona, J. Richardson, R. Brown, M. Gonzalez, M. Vanzieleghem, P. Anderson, S. Asculai, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of hyaluronan infused into healthy human volunteers, *Open Drug Metab J*. 3 (2009) 43–55.
- [9] P. Gibbs, T.J. Brown, R. Ng, R. Jennens, E. Cinc, M. Pho, M. Michael, R.M. Fox, A pilot human evaluation of a formulation of irinotecan and hyaluronic acid in 5-fluorouracil-refractory metastatic colorectal cancer patients, *Chemotherapy*. 55 (2009) 49–59. <https://doi.org/10.1159/000180339>.
- [10] L. Jadin, L.H. Bookbinder, G.I. Frost, A comprehensive model of hyaluronan turnover in the mouse, *Matrix Biology*. 31 (2012) 81–89.
- [11] E. Achbergerová, D. Šmejkalová, G. Huerta-Angeles, K. Souček, M. Hermannová, H. Vágnerová, R. Vícha, V. Velebný, In vivo monitoring of tumor distribution of hyaluronan polymeric micelles labeled or loaded with near-infrared fluorescence dye, *Carbohydrate Polymers*. 198 (2018) 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.082>.
- [12] K.Y. Choi, K.H. Min, J.H. Na, K. Choi, K. Kim, J.H. Park, I.C. Kwon, S.Y. Jeong, Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles as a potential drug carrier for cancer therapy: synthesis, characterization, and in vivo biodistribution, *J. Mater. Chem*. 19 (2009) 4102–4107. <https://doi.org/10.1039/B900456D>.
- [13] L. Balogh, A. Polyak, D. Mathe, R. Kiraly, J. Thuroczy, M. Terez, G. Janoki, Y. Ting, L.R. Bucci, A.G. Schauss, Absorption, Uptake and Tissue Affinity of High-Molecular-Weight Hyaluronan after Oral Administration in Rats and Dogs, *J. Agric. Food Chem*. 56 (2008) 10582–10593. <https://doi.org/10.1021/jf8017029>.
- [14] D. Cozikova, A. Laznickova, M. Hermannova, E. Svanovsky, L. Palek, R. Buffa, P. Sedova, R. Koppova, M. Petrik, D. Smejkalova, M. Laznicek, V. Velebný,

- Preparation and the kinetic stability of hyaluronan radiolabeled with ^{111}In , ^{125}I and ^{14}C , *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 52 (2010) 517–524. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.02.005>.
- [15] U.B.G. Laurent, L.B. Dahl, K. Lilja, Hyaluronan Injected in the Anterior Chamber of the Eye is Catabolized in the Liver, *Experimental Eye Research*. 57 (1993) 435–440. <https://doi.org/10.1006/exer.1993.1145>.
- [16] J.A. Weigel, R.C. Raymond, C. McGary, A. Singh, P.H. Weigel, A blocking antibody to the hyaluronan receptor for endocytosis (HARE) inhibits hyaluronan clearance by perfused liver, *Journal of Biological Chemistry*. 278 (2003) 9808–9812. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211462200>.
- [17] R.K. Reed, U.B. Laurent, J.R. Fraser, T.C. Laurent, Removal rate of [^3H]hyaluronan injected subcutaneously in rabbits, *Am J Physiol*. 259 (1990) H532–535. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1990.259.2.H532>.
- [18] G. Westerberg, M. Bergström, S. Gustafson, U. Lindqvist, A. Sundin, B. Långström, Labelling of polysaccharides using [^{11}C]cyanogen bromide. In Vivo and in vitro evaluation of ^{11}C -hyaluronan uptake kinetics, *Nuclear Medicine and Biology*. 22 (1995) 251–256. [https://doi.org/10.1016/0969-8051\(94\)00091-W](https://doi.org/10.1016/0969-8051(94)00091-W).
- [19] M. Laznicek, A. Laznickova, D. Cozikova, V. Velebny, Preclinical pharmacokinetics of radiolabeled hyaluronan, *Pharmacol. Rep.* 64 (2012) 428–437. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70784-3](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70784-3).
- [20] E. Svanovsky, V. Velebny, A. Laznickova, M. Laznicek, The effect of molecular weight on the biodistribution of hyaluronic acid radiolabeled with ^{111}In after intravenous administration to rats, *Eur. J. Drug Metabol. Pharmacokinet.* 33 (2008) 149–157. <https://doi.org/10.1007/BF03191112>.
- [21] C.E. Schanté, G. Zuber, C. Herlin, T.F. Vandamme, Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications, *Carbohydrate Polymers*. 85 (2011) 469–489. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.03.019>.
- [22] D. Bhattacharya, D. Svechkarev, J. Soucek, T. Hill, M. Taylor, A. Natarajan, A. Mohs, Impact of structurally modifying hyaluronic acid on CD44 interaction, *Journal of Materials Chemistry B*. 5 (2017) 8183–8192.
- [23] J. Sedláček, M. Hermannová, J. Mrázek, R. Buffa, P. Lišková, D. Šatínský, V. Velebný, Insight into the distribution of amino groups along the chain of chemically deacetylated hyaluronan, *Carbohydrate Polymers*. 225 (2019) 115156. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115156>.
- [24] J. Li, M. Qiao, Y. Ji, L. Lin, X. Zhang, R.J. Linhardt, Chemical, enzymatic and biological synthesis of hyaluronic acids, *International Journal of Biological Macromolecules*. 152 (2020) 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.214>.
- [25] X. Zhang, L. Lin, H. Huang, R.J. Linhardt, Chemoenzymatic Synthesis of Glycosaminoglycans, *Acc. Chem. Res.* 53 (2020) 335–346. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00420>.
- [26] A.D. Zamfir, Applications of capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry in glycosaminoglycan analysis, *ELECTROPHORESIS*. 37 (2016) 973–986. <https://doi.org/10.1002/elps.201500461>.
- [27] D. Čožiková, Analýza radioaktivně značené hyaluronové kyseliny a jejich metabolitů v biologickém materiálu, (2012).

- [28] P.J. Wyatt, Light scattering and the absolute characterization of macromolecules, *Analytica Chimica Acta*. 272 (1993) 1–40. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(93\)80373-S](https://doi.org/10.1016/0003-2670(93)80373-S).
- [29] C.J. Malavaki, I. Kanakis, A.D. Theocharis, F.N.L. and N.K. Karamanos, Hyaluronan Determination: Biological Significance & Analytical Tools, *Current Pharmaceutical Analysis*. 3 (2007) 117–128. <https://www.eurekaselect.com/59111/article> (accessed December 15, 2020).
- [30] H. Yuan, M. Tank, A. Alsofyani, N. Shah, N. Talati, J.C. LoBello, J.R. Kim, Y. Oonuki, C.A. Motte, M.K. Cowman, Molecular mass dependence of hyaluronan detection by sandwich ELISA-like assay and membrane blotting using biotinylated hyaluronan binding protein, *Glycobiology*. 23 (2013) 1270–1280. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwt064>.
- [31] I. Kakizaki, N. Ibori, K. Kojima, M. Yamaguchi, M. Endo, Mechanism for the hydrolysis of hyaluronan oligosaccharides by bovine testicular hyaluronidase, *The FEBS Journal*. 277 (2010) 1776–1786.
- [32] J. He, H. Huang, X. Zou, Y. Wang, G. Du, Z. Kang, Construction of saturated odd- and even-numbered hyaluronan oligosaccharide building block library, *Carbohydrate Polymers*. 231 (2020) 115700. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115700>.
- [33] L. Tao, F. Song, N. Xu, D. Li, R.J. Linhardt, Z. Zhang, New insights into the action of bacterial chondroitinase AC I and hyaluronidase on hyaluronic acid, *Carbohydrate Polymers*. 158 (2017) 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.12.010>.
- [34] N. Volpi, High-performance liquid chromatography and on-line mass spectrometry detection for the analysis of chondroitin sulfates/hyaluronan disaccharides derivatized with 2-aminoacridone, *Analytical Biochemistry*. 397 (2010) 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.09.030>.
- [35] N. Gassler, C. Reifiner, N. Janzen, H. Kahnert, K. Kleesiek, A High Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Glycosaminoglycans in Human Blood, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 31 (1993) 503–512. <https://doi.org/10.1515/cclm.1993.31.8.503>.
- [36] S. Sakai, J. Onose, H. Nakamura, H. Toyoda, T. Toida, T. Imanari, R.J. Linhardt, Pretreatment procedure for the microdetermination of chondroitin sulfate in plasma and urine, *Analytical Biochemistry*. 302 (2002) 169–174.
- [37] H. Toyoda, F. Muraki, T. Imanari, A. Kinoshita-Toyoda, Microdetermination of hyaluronan in human plasma by high-performance liquid chromatography with a graphitized carbon column and postcolumn fluorometric detection, *Journal of Chromatography B*. 879 (2011) 950–954.
- [38] K. Nešporová, J. Šógorková, D. Šmejkalová, J. Kulhánek, G. Huerta-Angeles, L. Kubala, V. Velebný, Influence of serum albumin on intracellular delivery of drug-loaded hyaluronan polymeric micelles, *International Journal of Pharmaceutics*. 511 (2016) 638–647. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.07.057>.
- [39] X. Zhao, B. Yang, P. Datta, L. Gasmili, F. Zhang, R.J. Linhardt, Cell-Based Microscale Isolation of Glycoaminoglycans for Glycomics Study, *Journal of Carbohydrate Chemistry*. 31 (2012) 420–435. <https://doi.org/10.1080/07328303.2012.658126>.
- [40] J. Scott, Aliphatic ammonium salts in the assay of acidic polysaccharides from tissues, *Methods of Biochemical Analysis*. (1960) 145–197.

- [41] S. Pepeliaev, R. Hrudíková, J. Jílková, J. Pavlík, D. Smirnov, Z. Černý, L. Franke, Colorimetric enzyme-coupled assay for hyaluronic acid determination in complex samples, *European Polymer Journal*. 94 (2017) 460–470. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.07.036>.
- [42] Q. Zhang, H. Li, X. Feng, B.-F. Liu, X. Liu, Purification of Derivatized Oligosaccharides by Solid Phase Extraction for Glycomic Analysis, *PLOS ONE*. 9 (2014) e94232. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094232>.
- [43] Y. Takegawa, K. Araki, N. Fujitani, J. Furukawa, H. Sugiyama, H. Sakai, Y. Shinohara, Simultaneous Analysis of Heparan Sulfate, Chondroitin/Dermatan Sulfates, and Hyaluronan Disaccharides by Glycoblotting-Assisted Sample Preparation Followed by Single-Step Zwitter-Ionic-Hydrophilic Interaction Chromatography, *Anal. Chem.* 83 (2011) 9443–9449. <https://doi.org/10.1021/ac2021079>.
- [44] J. Furukawa, Y. Shinohara, H. Kuramoto, Y. Miura, H. Shimaoka, M. Kuroguchi, M. Nakano, S.-I. Nishimura, Comprehensive Approach to Structural and Functional Glycomics Based on Chemoselective Glycoblotting and Sequential Tag Conversion, *Anal. Chem.* 80 (2008) 1094–1101. <https://doi.org/10.1021/ac702124d>.
- [45] L.R. Ruhaak, G. Zauner, C. Huhn, C. Bruggink, A.M. Deelder, M. Wuhrer, Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 397 (2010) 3457–3481. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3532-z>.
- [46] K. Iwatsuka, H. Iwamoto, M. Kinoshita, K. Inada, S. Yasueda, K. Kakehi, Comparative Studies of N-Glycans and Glycosaminoglycans Present in SIRC (Statens Seruminstitut Rabbit Cornea) Cells and Corneal Epithelial Cells from Rabbit Eyes, *Current Eye Research*. 39 (2014) 686–694. <https://doi.org/10.3109/02713683.2013.863940>.
- [47] I.U. Antia, K. Mathew, D.R. Yagnik, F.A. Hills, A.J. Shah, Analysis of procainamide-derivatised heparan sulphate disaccharides in biological samples using hydrophilic interaction liquid chromatography mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 410 (2018) 131–143. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0703-1>.
- [48] C. Wang, Y. Lang, Q. Li, X. Jin, G. Li, G. Yu, Glycosaminoglycanomic profiling of human milk in different stages of lactation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food Chemistry*. 258 (2018) 231–236. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.076>.
- [49] Y. Chang, B. Yang, X. Zhao, R.J. Linhardt, Analysis of glycosaminoglycan-derived disaccharides by capillary electrophoresis using laser-induced fluorescence detection, *Analytical Biochemistry*. 427 (2012) 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.05.004>.
- [50] G.C.M. Vreeker, M. Wuhrer, Reversed-phase separation methods for glycan analysis, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 409 (2017) 359–378. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-0073-0>.
- [51] X. Xu, C. Wen, C. Ai, C. Cao, Q. Yu, F. Qu, Z. Wang, S. Song, Quantitative Analysis of Acidic Polysaccharides Using Hydrophilic Interaction Chromatography and Mass Spectrometry after Acid Hydrolysis, *Current Pharmaceutical Analysis*. 14 (2018) 443–449. <https://doi.org/10.2174/1573412913666170525163234>.

- [52] R.P. Kozak, C.B. Tortosa, D.L. Fernandes, D.I.R. Spencer, Comparison of procainamide and 2-aminobenzamide labeling for profiling and identification of glycans by liquid chromatography with fluorescence detection coupled to electrospray ionization–mass spectrometry, *Analytical Biochemistry*. 486 (2015) 38–40. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.06.006>.
- [53] A. Weyers, B. Yang, J.-H. Park, Y.-S. Kim, S.-M. Kim, S.-E. Lee, F. Zhang, K.B. Lee, R.J. Linhardt, Microanalysis of stomach cancer glycosaminoglycans, *Glycoconjugate Journal*. 30 (2013) 701–707. <https://doi.org/10.1007/s10719-013-9476-8>.
- [54] B. Yang, Y. Chang, A.M. Weyers, E. Sterner, R.J. Linhardt, Disaccharide analysis of glycosaminoglycan mixtures by ultra-high-performance liquid chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*. 1225 (2012) 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.12.063>.
- [55] S. Song, Q. Yu, B. Zhang, C. Ai, Y. Sun, Y. Fu, M. Zhao, C. Wen, Quantification and comparison of acidic polysaccharides in edible fish intestines and livers using HPLC-MS/MS, *Glycoconjugate Journal*. 34 (2017) 625–632. <https://doi.org/10.1007/s10719-017-9783-6>.
- [56] S. Karel, J. Sogorkova, M. Hermannova, K. Nesporova, L. Marholdova, K. Chmelickova, L. Bednarova, M. Flegel, P. Drasar, V. Velebny, Stabilization of hyaluronan-based materials by peptide conjugation and its use as a cell-seeded scaffold in tissue engineering, *Carbohydrate Polymers*. 201 (2018) 300–307. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.08.082>.
- [57] L. Kenne, S. Gohil, E.M. Nilsson, A. Karlsson, D. Ericsson, A. Helander Kenne, L.I. Nord, Modification and cross-linking parameters in hyaluronic acid hydrogels—Definitions and analytical methods, *Carbohydrate Polymers*. 91 (2013) 410–418. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.066>.
- [58] F.J. Wende, S. Gohil, H. Mojarradi, T. Gerfaud, L.I. Nord, A. Karlsson, J.-G. Boiteau, A.H. Kenne, C. Sandström, Determination of substitution positions in hyaluronic acid hydrogels using NMR and MS based methods, *Carbohydrate Polymers*. 136 (2016) 1348–1357. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.09.112>.
- [59] B. Yeung, D. Marecak, Molecular weight determination of hyaluronic acid by gel filtration chromatography coupled to matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*. 852 (1999) 573–581. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00647-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00647-0).
- [60] K. Ruckmani, S.Z. Shaikh, P. Khalil, M.S. Muneera, O.A. Thusleem, Determination of sodium hyaluronate in pharmaceutical formulations by HPLC–UV, *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 3 (2013) 324–329. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2013.02.001>.
- [61] N.S. El-Safory, A.E. Fazary, C.-K. Lee, Hyaluronidases, a group of glycosidases: Current and future perspectives, *Carbohydrate Polymers*. 81 (2010) 165–181. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.02.047>.
- [62] R. Stern, Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway, *European Journal of Cell Biology*. 83 (2004) 317–325. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00392>.
- [63] S.S. Nawy, A.B. Csóka, K. Mio, R. Stern, Hyaluronidase Activity and Hyaluronidase Inhibitors, in: R.V. Iozzo (Ed.), *Proteoglycan Protocols*, Humana Press, Totowa, NJ, 2001: pp. 383–389. <https://doi.org/10.1385/1-59259-209-0:383>.
- [64] K. Lemmnitzer, J. Schiller, J. Becher, S. Möller, M. Schnabelrauch, Improvement of the Digestibility of Sulfated Hyaluronans by Bovine Testicular Hyaluronidase:

- A UV Spectroscopic and Mass Spectrometric Study, *BioMed Research International*. (2014). <https://doi.org/10.1155/2014/986594>.
- [65] K.S. Girish, K. Kemparaju, S. Nagaraju, B.S. Vishwanath, Hyaluronidase Inhibitors: A Biological and Therapeutic Perspective, *Current Medicinal Chemistry*. 16 (2009) 2261–2288. <https://doi.org/10.2174/092986709788453078>.
- [66] M. Lv, M. Wang, W. Cai, W. Hao, P. Yuan, Z. Kang, Characterisation of separated end hyaluronan oligosaccharides from leech hyaluronidase and evaluation of angiogenesis, *Carbohydrate Polymers*. 142 (2016) 309–316. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.01.052>.
- [67] H. Huang, Q. Liang, Y. Wang, J. Chen, Z. Kang, High-level constitutive expression of leech hyaluronidase with combined strategies in recombinant *Pichia pastoris*, *Appl Microbiol Biotechnol*. 104 (2020) 1621–1632. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10282-7>.
- [68] V.Q. Mai, T.T. Vo, M. Meere, Modelling hyaluronan degradation by streptococcus pneumoniae hyaluronate lyase, *Mathematical Biosciences*. 303 (2018) 126–138.
- [69] T. Bobula, R. Buffa, M. Hermannová, H. Vágnerová, I. Dolečková, V. Velebný, The synthesis of a new unsaturated derivative of chondroitin sulfate with increased antioxidant properties, *Carbohydrate Polymers*. 190 (2018) 175–183.
- [70] J. Chmelář, A. Kotzianová, M. Hermannová, R. Šuláková, D. Šmejkalová, J. Kulhánek, V. Velebný, Evaluating the degree of substitution of water-insoluble acyl derivatives of hyaluronan using Raman spectroscopy: method development and comparison with gas chromatography and ¹H NMR, *Anal. Methods*. 9 (2017) 232–239. <https://doi.org/10.1039/C6AY03067J>.
- [71] K. Hirano, S. Sakai, T. Ishikawa, F.Y. Avci, R.J. Linhardt, T. Toida, Preparation of the methyl ester of hyaluronan and its enzymatic degradation, *Carbohydrate Research*. 340 (2005) 2297–2304. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.07.016>.
- [72] F.J. Wende, S. Gohil, L.I. Nord, A. Karlsson, A.H. Kenne, C. Sandström, Insights on the reactivity of chondroitin and hyaluronan toward 1,4-butanediol diglycidyl ether, *International Journal of Biological Macromolecules*. 131 (2019) 812–820. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.020>.
- [73] C.D. Blundell, A. Almond, Enzymatic and chemical methods for the generation of pure hyaluronan oligosaccharides with both odd and even numbers of monosaccharide units, *Analytical Biochemistry*. 353 (2006) 236–247. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.03.013>.
- [74] D. Šmejkalová, M. Hermannová, R. Buffa, D. Čožíková, L. Vištejnová, Z. Matulková, J. Hrabica, V. Velebný, Structural characterization and biological properties of degradation byproducts from hyaluronan after acid hydrolysis, *Carbohydrate Polymers*. 88 (2012) 1425–1434. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.02.031>.
- [75] D. Čožíková, T. Šílová, V. Moravcová, D. Šmejkalová, S. Pepeliaev, V. Velebný, M. Hermannová, Preparation and extensive characterization of hyaluronan with narrow molecular weight distribution, *Carbohydrate Polymers*. 160 (2017) 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.12.045>.
- [76] W. Han, L. Song, Y. Wang, Y. Lv, X. Chen, X. Zhao, Preparation, Characterization, and Inhibition of Hyaluronic Acid Oligosaccharides in Triple-Negative Breast Cancer, *Biomolecules*. 9 (2019) 436. <https://doi.org/10.3390/biom9090436>.
- [77] M. Vigliano, A. Bianchera, R. Bettini, L. Elviri, Determination of Hyaluronic Acid in a Chitosan-Based Formulation by RP C18 and HILIC LC–ESI–MS: an

- Evaluation of Matrix Effect, *Chromatographia*. 76 (2013) 1761–1766. <https://doi.org/10.1007/s10337-013-2533-4>.
- [78] R.W. Jeanloz, D.A. Jeanloz, The Degradation of Hyaluronic Acid by Methanolysis*, *Biochemistry*. 3 (1964) 121–123. <https://doi.org/10.1021/bi00889a019>.
- [79] P.J. Trim, J.J. Hopwood, M.F. Snel, Butanolysis Derivatization: Improved Sensitivity in LC-MS/MS Quantitation of Heparan Sulfate in Urine from Mucopolysaccharidosis Patients, *Anal. Chem.* 87 (2015) 9243–9250. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01743>.
- [80] Y. Guo, H.E. Conrad, The disaccharide composition of heparins and heparan sulfates, *Analytical Biochemistry*. 176 (1989) 96–104. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90278-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90278-9).
- [81] B. Liu, J. Lu, C. Ai, B. Zhang, L. Guo, S. Song, B. Zhu, Quick characterization of uronic acid-containing polysaccharides in 5 shellfishes by oligosaccharide analysis upon acid hydrolysis, *Carbohydrate Research*. 435 (2016) 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2016.10.001>.
- [82] G.O. Staples, J. Zaia, Analysis of Glycosaminoglycans Using Mass Spectrometry, *Curr Proteomics*. 8 (2011) 325–336. <https://doi.org/10.2174/157016411798220871>.
- [83] L. Veillon, Y. Huang, W. Peng, X. Dong, B.G. Cho, Y. Mechref, Characterization of isomeric glycan structures by LC-MS/MS, *ELECTROPHORESIS*. 38 (2017) 2100–2114. <https://doi.org/10.1002/elps.201700042>.
- [84] N.G. Karlsson, B.L. Schulz, N.H. Packer, J.M. Whitelock, Use of graphitised carbon negative ion LC-MS to analyse enzymatically digested glycosaminoglycans, *Journal of Chromatography B*. 824 (2005) 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.07.014>.
- [85] Z. El Rassi, *Carbohydrate analysis: high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis*, Elsevier, 1994.
- [86] J. Zaia, On-line separations combined with MS for analysis of glycosaminoglycans, *Mass Spectrometry Reviews*. 28 (2009) 254–272. <https://doi.org/10.1002/mas.20200>.
- [87] A.V. Kühn, K. Raith, V. Sauerland, R.H. Neubert, Quantification of hyaluronic acid fragments in pharmaceutical formulations using LC-ESI-MS, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 30 (2003) 1531–1537.
- [88] L. Borovcová, M. Hermannová, V. Pauk, M. Šimek, V. Havlíček, K. Lemr, Simple area determination of strongly overlapping ion mobility peaks, *Analytica Chimica Acta*. 981 (2017) 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.05.003>.
- [89] Z. Kadlecová, K. Kalíková, D. Folprechtová, E. Tesařová, M. Gilar, Method for evaluation of ionic interactions in liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*. 1625 (2020) 461301. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461301>.
- [90] N. Volpi, On-line HPLC/ESI-MS separation and characterization of hyaluronan oligosaccharides from 2-mers to 40-mers, *Analytical Chemistry*. 79 (2007) 6390–6397.
- [91] J. Henriksen, P. Roepstorff, L.H. Ringborg, Ion-pairing reversed-phased chromatography/mass spectrometry of heparin, *Carbohydrate Research*. 341 (2006) 382–387. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.11.030>.
- [92] H. Osago, T. Shibata, N. Hara, S. Kuwata, M. Kono, Y. Uchio, M. Tsuchiya, Quantitative analysis of glycosaminoglycans, chondroitin/dermatan sulfate,

- hyaluronic acid, heparan sulfate, and keratan sulfate by liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry, *Analytical Biochemistry*. 467 (2014) 62–74. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.08.005>.
- [93] M. Pabst, F. Altmann, Influence of Electrosorption, Solvent, Temperature, and Ion Polarity on the Performance of LC-ESI-MS Using Graphitic Carbon for Acidic Oligosaccharides, *Anal. Chem.* 80 (2008) 7534–7542. <https://doi.org/10.1021/ac801024r>.
- [94] L. Turiák, G. Tóth, O. Ozohanics, Á. Révész, A. Ács, K. Vékey, J. Zaia, L. Drahos, Sensitive method for glycosaminoglycan analysis of tissue sections, *Journal of Chromatography A*. 1544 (2018) 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.02.034>.
- [95] G. Tóth, K. Vékey, L. Drahos, V. Horváth, L. Turiák, Salt and solvent effects in the microscale chromatographic separation of heparan sulfate disaccharides, *Journal of Chromatography A*. 1610 (2020) 460548. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460548>.
- [96] S. Shanmuga Doss, N.P. Bhatt, G. Jayaraman, Improving the accuracy of hyaluronic acid molecular weight estimation by conventional size exclusion chromatography, *Journal of Chromatography B*. 1060 (2017) 255–261. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.06.006>.
- [97] B. Yang, X. Guo, H. Zang, J. Liu, Determination of modification degree in BDDE-modified hyaluronic acid hydrogel by SEC/MS, *Carbohydrate Polymers*. 131 (2015) 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.050>.
- [98] M. Šimek, K. Lemr, M. Hermannová, V. Havlíček, Analysis of hyaluronan and its derivatives using chromatographic and mass spectrometric techniques, *Carbohydrate Polymers*. 250 (2020) 117014. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117014>.
- [99] G. Kiran, C.B. Srikanth, P.V. Salimath, C.D. Nandini, Diet-induced hypercholesterolemia imparts structure–function changes to erythrocyte chondroitin sulphate/dermatan sulphate, *The Journal of Biochemistry*. 158 (2015) 217–224. <https://doi.org/10.1093/jb/mvv037>.
- [100] M.J. Davies, E.F. Hounsell, Comparison of separation modes of high-performance liquid chromatography for the analysis of glycoprotein- and proteoglycan-derived oligosaccharides, *Journal of Chromatography A*. 720 (1996) 227–233. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00221-9](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00221-9).
- [101] H. Tadashi, S. Okuda, T. Hirano, Tandem mass spectrometry for characterization of unsaturated disaccharides from chondroitin sulfate, dermatan sulfate and hyaluronan, *Glycoconjugate Journal*. 11 (1994) 123–132. <https://doi.org/10.1007/BF00731152>.
- [102] D.J. Mahoney, R.T. Aplin, A. Calabro, V.C. Hascall, A.J. Day, Novel methods for the preparation and characterization of hyaluronan oligosaccharides of defined length, *Glycobiology*. 11 (2001) 1025–1033. <https://doi.org/10.1093/glycob/11.12.1025>.
- [103] K.N. Price, A. Tuinman, D.C. Baker, C. Chisena, R.L. Cysyk, Isolation and characterization by electrospray-ionization mass spectrometry and high-performance anion-exchange chromatography of oligosaccharides derived from hyaluronic acid by hyaluronate lyase digestion: Observation of some heretofore unobserved oligosaccharides that contain an odd number of units, *Carbohydrate Research*. 303 (1997) 303–311. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(97\)00171-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(97)00171-7).

- [104] B.S. Prebyl, C. Kaczmarek, A.A. Tuinman, D.C. Baker, Characterizing the electrospray-ionization mass spectral fragmentation pattern of enzymatically derived hyaluronic acid oligomers, *Carbohydrate Research*. 338 (2003) 1381–1387. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(03\)00180-0](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(03)00180-0).
- [105] J.J. Bowers, B.D.M. Hodges, O.M. Saad, J.A. Leary, S.A. McLuckey, Proton hydrates as soft ion/ion proton transfer reagents for multiply deprotonated biomolecules, *International Journal of Mass Spectrometry*. 276 (2008) 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2008.05.038>.
- [106] M. Shih, S.A. McLuckey, Ion/ion Reactions for Hyaluronic Acid Mixture Analysis via Electrospray Ionization Mass Spectrometry, in: San Diego, CA, 2018.
- [107] S. Sakai, K. Hirano, H. Toyoda, R.J. Linhardt, T. Toida, Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis of hyaluronan oligosaccharides, *Analytica Chimica Acta*. 593 (2007) 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.05.005>.
- [108] P.H. Weigel, B.A. Baggenstoss, J.L. Washburn, Hyaluronan synthase assembles hyaluronan on a [GlcNAc(β 1,4)]_n-GlcNAc(α 1 \rightarrow)UDP primer and hyaluronan retains this residual chitin oligomer as a cap at the nonreducing end, *Glycobiology*. 27 (2017) 536–554. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwx012>.
- [109] A. Cappelli, M. Paolino, A. Reale, V. Razzano, G. Grisci, G. Giuliani, A. Donati, C. Bonechi, S. Lamponi, R. Mendichi, S. Battiato, F. Samperi, F. Makovec, M. Licciardi, L. Depau, C. Botta, Hyaluronan-based graft copolymers bearing aggregation-induced emission fluorogens, *RSC Adv*. 8 (2018) 5864–5881. <https://doi.org/10.1039/C7RA12543G>.
- [110] K. Nimptsch, R. Süß, M. Schnabelrauch, A. Nimptsch, J. Schiller, Positive ion MALDI-TOF mass spectra are more suitable than negative ion spectra to characterize sulphated glycosaminoglycan oligosaccharides, *International Journal of Mass Spectrometry*. 310 (2012) 72–76. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2011.11.003>.
- [111] P. Mischnick, Mass Spectrometric Characterization of Oligo- and Polysaccharides and Their Derivatives, in: M. Hakkarainen (Ed.), *Mass Spectrometry of Polymers – New Techniques*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2012: pp. 105–174. https://doi.org/10.1007/12_2011_134.
- [112] Z. Zhang, J. Xie, J. Liu, R.J. Linhardt, Tandem MS can distinguish hyaluronic acid from N-acetylheparosan, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 19 (2008) 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2007.10.012>.
- [113] T. Minamasawa, K. Suzuki, H. Maeda, S. Shimokata, N. Sugiura, K. Kimata, Characterization of Isomeric Unsulfated Glycosaminoglycan Oligosaccharides by Mass Spectrometry/Mass Spectrometry, *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan*. 55 (2007) 1–6. <https://doi.org/10.5702/masspec.55.1>.
- [114] J.J. Wolff, F.E. Leach, T.N. Laremore, D.A. Kaplan, M.L. Easterling, R.J. Linhardt, I.J. Amster, Negative Electron Transfer Dissociation of Glycosaminoglycans, *Anal. Chem*. 82 (2010) 3460–3466. <https://doi.org/10.1021/ac100554a>.
- [115] J. Zaia, Mass spectrometry of oligosaccharides, *Mass Spectrometry Reviews*. 23 (2004) 161–227. <https://doi.org/10.1002/mas.10073>.
- [116] B. Domon, C.E. Costello, A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates, *Glycoconjugate Journal*. 5 (1988) 397–409. <https://doi.org/10.1007/BF01049915>.

- [117] M.J. Kailemia, M. Park, D.A. Kaplan, A. Venot, G.-J. Boons, L. Li, R.J. Linhardt, I.J. Amster, High-Field Asymmetric-Waveform Ion Mobility Spectrometry and Electron Detachment Dissociation of Isobaric Mixtures of Glycosaminoglycans, *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*. 25 (2014) 258–268. <https://doi.org/10.1007/s13361-013-0771-1>.
- [118] M. Hermannová, A.-M. Iordache, K. Slováková, V. Havlíček, H. Pelantová, K. Lemr, Arrival time distributions of product ions reveal isomeric ratio of deprotonated molecules in ion mobility–mass spectrometry of hyaluronan-derived oligosaccharides, *Journal of Mass Spectrometry*. 50 (2015) 854–863. <https://doi.org/10.1002/jms.3596>.
- [119] C. Przybylski, F. Gonnet, W. Buchmann, R. Daniel, Critical parameters for the analysis of anionic oligosaccharides by desorption electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*. 47 (2012) 1047–1058. <https://doi.org/10.1002/jms.3052>.
- [120] S. Lamponi, C. Di Canio, M. Forbicioni, R. Barbucci, Heterotypic interaction of fibroblasts and endothelial cells on restricted area, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 92A (2009) 733–745. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32364>.
- [121] A.G. Shard, M.C. Davies, S.J.B. Tendler, L. Bennedetti, M.D. Purbrick, A.J. Paul, G. Beamson, X-ray Photoelectron Spectroscopy and Time-of-Flight SIMS Investigations of Hyaluronic Acid Derivatives, *Langmuir*. 13 (1997) 2808–2814. <https://doi.org/10.1021/la960050a>.
- [122] P. Mischnick, J. Heinrich, M. Gohdes, O. Wilke, N. Rogmann, Structure analysis of 1, 4-glucan derivatives, *Macromolecular Chemistry and Physics*. 201 (2000) 1985–1995.
- [123] P. Mischnick, D. Momcilovic, Chemical Structure Analysis of Starch and Cellulose Derivatives, in: D. Horton (Ed.), *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Academic Press, 2010: pp. 117–210. [https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(10\)64004-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(10)64004-8).
- [124] A. Fallacara, E. Baldini, S. Manfredini, S. Vertuani, Hyaluronic Acid in the Third Millennium, *Polymers*. 10 (2018) 701.
- [125] P. Šedová, R. Buffa, S. Kettou, G. Huerta-Angeles, M. Hermannová, V. Leierová, D. Šmejkalová, M. Moravcová, V. Velebný, Preparation of hyaluronan polyaldehyde—a precursor of biopolymer conjugates, *Carbohydrate Research*. 371 (2013) 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.01.025>.
- [126] J. Zaia, Glycosaminoglycan Glycomics Using Mass Spectrometry, *Mol Cell Proteomics*. 12 (2013) 885. <https://doi.org/10.1074/mcp.R112.026294>.
- [127] S. Podzimek, M. Hermannova, H. Bilerova, Z. Bezakova, V. Velebny, Solution properties of hyaluronic acid and comparison of SEC-MALS-VIS data with off-line capillary viscometry, *Journal of Applied Polymer Science*. 116 (2010) 3013–3020. <https://doi.org/10.1002/app.31834>.
- [128] D.Y. Kang, W.-S. Kim, I.S. Heo, Y.H. Park, S. Lee, Extraction of hyaluronic acid (HA) from rooster comb and characterization using flow field-flow fractionation (FIFFF) coupled with multiangle light scattering (MALS), *Journal of Separation Science*. 33 (2010) 3530–3536. <https://doi.org/10.1002/jssc.201000478>.
- [129] F. Heatley, J.E. Scott, A water molecule participates in the secondary structure of hyaluronan, *Biochem J*. 254 (1988) 489. <https://doi.org/10.1042/bj2540489>.
- [130] C. Botha, Z. Viktor, C. Moire, C. Farcet, F. Brothier, H. Pfukwa, H. Pasch, Separation of hydrophobically modified hyaluronic acid according to the degree of substitution by gradient elution high performance liquid chromatography,

- Analytical and Bioanalytical Chemistry. 410 (2018) 4259–4273. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1123-6>.
- [131] O. Babasola, K. Rees-Milton, S. Bebe, J. Wang, T. Anastassiades, Chemically modified N-acylated hyaluronan fragments modulate proinflammatory cytokine production by stimulated human macrophages, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 24779–24791. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.515783>.
- [132] Z. Viktor, C. Farcet, C. Moire, F. Brothier, H. Pfukwa, H. Pasch, Comprehensive two-dimensional liquid chromatography for the characterization of acrylate-modified hyaluronic acid, *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* (2019). <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01799-x>.
- [133] S. Lee, A. Raw, L. Yu, R. Lionberger, N. Ya, D. Verthelyi, A. Rosenberg, S. Kozlowski, K. Webber, J. Woodcock, Scientific considerations in the review and approval of generic enoxaparin in the United States, *Nature Biotechnology.* 31 (2013) 220.
- [134] J.L. Spencer, J.A. Bernanke, J.A. Buczek-Thomas, M.A. Nugent, A computational approach for deciphering the organization of glycosaminoglycans, *PLoS One.* 5 (2010) e9389.
- [135] L. Li, F. Zhang, J. Zaia, R.J. Linhardt, Top-Down Approach for the Direct Characterization of Low Molecular Weight Heparins Using LC-FT-MS, *Anal. Chem.* 84 (2012) 8822–8829. <https://doi.org/10.1021/ac302232c>.
- [136] Y.E.M. van der Burgt, J. Bergsma, I.P. Bleeker, P.J.H.C. Mijland, A. van der Kerk-van Hoof, J.P. Kamerling, J.F.G. Vliegthart, Distribution of methyl substituents over branched and linear regions in methylated starches, *Carbohydrate Research.* 312 (1998) 201–208. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(98\)00238-9](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(98)00238-9).
- [137] P. Mischnick, I. Unterrieser, K. Voiges, J. Cuers, M. Rincken, R. Adden, A New Method for the Analysis of the Substitution Pattern of Hydroxyethyl(methyl)-Celluloses Along the Polysaccharide Chain, *Macromolecular Chemistry and Physics.* 214 (2013) 1363–1374. <https://doi.org/10.1002/macp.201300070>.
- [138] T. Wang, D. Zhang, D. Sun, J. Gu, Current status of in vivo bioanalysis of nano drug delivery systems, *Journal of Pharmaceutical Analysis.* 10 (2020) 221–232. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.05.002>.
- [139] J.K. Patra, G. Das, L.F. Fraceto, E.V.R. Campos, M. del P. Rodriguez-Torres, L.S. Acosta-Torres, L.A. Diaz-Torres, R. Grillo, M.K. Swamy, S. Sharma, S. Habtemariam, H.-S. Shin, Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects, *Journal of Nanobiotechnology.* 16 (2018) 71. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>.
- [140] Y. (Chezy) Barenholz, Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned, *Journal of Controlled Release.* 160 (2012) 117–134. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020>.
- [141] S. Wilhelm, A.J. Tavares, Q. Dai, S. Ohta, J. Audet, H.F. Dvorak, W.C.W. Chan, Analysis of nanoparticle delivery to tumours, *Nature Reviews Materials.* 1 (2016) 16014.
- [142] Z.-R. Lu, P. Qiao, Drug Delivery in Cancer Therapy, Quo Vadis?, *Mol. Pharmaceutics.* 15 (2018) 3603–3616. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00037>.
- [143] S. Kim, Y. Shi, J.Y. Kim, K. Park, J.-X. Cheng, Overcoming the barriers in micellar drug delivery: loading efficiency, in vivo stability, and micelle–cell interaction, *Expert Opinion on Drug Delivery.* 7 (2010) 49–62. <https://doi.org/10.1517/17425240903380446>.

- [144] M. Murakami, H. Cabral, Y. Matsumoto, S. Wu, M.R. Kano, T. Yamori, N. Nishiyama, K. Kataoka, Improving Drug Potency and Efficacy by Nanocarrier-Mediated Subcellular Targeting, *Science Translational Medicine*. 3 (2011) 64ra2-64ra2. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001385>.
- [145] K. Letchford, H.M. Burt, Copolymer Micelles and Nanospheres with Different In Vitro Stability Demonstrate Similar Paclitaxel Pharmacokinetics, *Mol. Pharmaceutics*. 9 (2012) 248–260. <https://doi.org/10.1021/mp2002939>.
- [146] H. Chen, S. Kim, W. He, H. Wang, P.S. Low, K. Park, J.-X. Cheng, Fast Release of Lipophilic Agents from Circulating PEG-PDLLA Micelles Revealed by in Vivo Förster Resonance Energy Transfer Imaging, *Langmuir*. 24 (2008) 5213–5217. <https://doi.org/10.1021/la703570m>.
- [147] M. Šimek, K. Nešporová, A. Kocurková, T. Foglová, G. Ambrožová, V. Velebný, L. Kubala, M. Hermannová, How the molecular weight affects the in vivo fate of exogenous hyaluronan delivered intravenously: A stable-isotope labelling strategy, *Carbohydrate Polymers*. 263 (2021) 117927. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117927>.
- [148] G. Huerta-Angeles, M. Brandejsová, K. Kopecká, T. Drmota, M. Šimek, F. Yilmaz, J. Kulháněk, H. Vágnerová, M. Hermannová, O. Štrympl, J. Novotný, V. Velebný, Způsob přípravy esterového derivátu kyseliny hyaluronové mající rovnoměrnou distribuci substituentů, esterový derivát kyseliny hyaluronové, kompozice, která ho obsahuje a její použití, CZ2019598A3, 2021. <https://patents.google.com/patent/CZ2019598A3/en?inventor=Gloria+Huerta-Angeles&sort=new> (accessed June 12, 2021).
- [149] M. Daeihamed, A. Haeri, S. Dadashzadeh, A Simple and Sensitive HPLC Method for Fluorescence Quantitation of Doxorubicin in Micro-volume Plasma: Applications to Pharmacokinetic Studies in Rats, *Iran J Pharm Res*. 14 (2015) 33–42.
- [150] US Food and Drug Administration, FDA guidance for industry: bioanalytical method validation, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research: Rockville, MD. (2001).
- [151] W.J. Youden, W. Association of Official Analytical Chemists, E.H. Steiner, Statistical manual of the Association of Official Analytical Chemists - Statistical techniques for collaborative tests (by) W.J. Youden. Planning and analysis of results of collaborative tests (by) E.H. Steiner, (1975). <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF2015020336> (accessed December 19, 2020).
- [152] D. Šmejkalová, K. Nešporová, M. Hermannová, G. Huerta-Angeles, D. Čožíková, L. Vištejnová, B. Šafránková, J. Novotný, J. Kučerík, V. Velebný, Paclitaxel isomerisation in polymeric micelles based on hydrophobized hyaluronic acid, *International Journal of Pharmaceutics*. 466 (2014) 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.03.024>.
- [153] Y. Zhang, M. Huo, J. Zhou, S. Xie, PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel, *Computer Methods and Programs in Biomedicine*. 99 (2010) 306–314. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2010.01.007>.
- [154] M. Yuan, S.B. Breitkopf, X. Yang, J.M. Asara, A positive/negative ion-switching, targeted mass spectrometry-based metabolomics platform for bodily fluids, cells, and fresh and fixed tissue, *Nature Protocols*. 7 (2012) 872–881. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.024>.

- [155] I.M.L.W. Körver-Keularts, P. Wang, H.W.A.H. Waterval, L.A.J. Kluijtmans, R.A. Wevers, C.-D. Langhans, C. Scott, D.D.J. Habets, J. Bierau, Fast and accurate quantitative organic acid analysis with LC-QTOF/MS facilitates screening of patients for inborn errors of metabolism, *J Inherit Metab Dis.* 41 (2018) 415–424. <https://doi.org/10.1007/s10545-017-0129-0>.
- [156] C. Guijas, J.R. Montenegro-Burke, X. Domingo-Almenara, A. Palermo, B. Warth, G. Hermann, G. Koellensperger, T. Huan, W. Uritboonthai, A.E. Aisporna, D.W. Wolan, M.E. Spilker, H.P. Benton, G. Siuzdak, METLIN: A Technology Platform for Identifying Knowns and Unknowns, *Anal. Chem.* 90 (2018) 3156–3164. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04424>.
- [157] M.Z. ČR, Český lékopis 2009, Praha. Grada Publishing. CD-ROM. Kapitola. 2 (2015) 360.
- [158] C. Eberl, D. Ring, P.C. Münch, M. Beutler, M. Basic, E.C. Slack, M. Schwarzer, D. Srutkova, A. Lange, J.S. Frick, A. Bleich, B. Stecher, Reproducible Colonization of Germ-Free Mice With the Oligo-Mouse-Microbiota in Different Animal Facilities, *Front. Microbiol.* 10 (2020). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02999>.
- [159] J. Chmelař, J. Mrázek, M. Hermannová, L. Kubala, G. Ambrožová, A. Kocurková, T. Drmota, K. Nešporová, L. Grusová, V. Velebný, Biodegradable free-standing films from lauroyl derivatives of hyaluronan, *Carbohydrate Polymers.* 224 (2019) 115162. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115162>.
- [160] M. Foglarová, J. Chmelař, G. Huerta-Angeles, H. Vágnerová, J. Kulhánek, K. Bartoň Tománková, A. Minařík, V. Velebný, Water-insoluble thin films from palmitoyl hyaluronan with tunable properties, *Carbohydrate Polymers.* 144 (2016) 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.02.027>.
- [161] K.E. Maudens, C.P. Stove, W.E. Lambert, Quantitative liquid chromatographic analysis of anthracyclines in biological fluids, *Journal of Chromatography B.* 879 (2011) 2471–2486. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.07.010>.
- [162] C. Sottani, G. Poggi, F. Melchiorre, B. Montagna, C. Minoia, Simultaneous measurement of doxorubicin and reduced metabolite doxorubicinol by UHPLC–MS/MS in human plasma of HCC patients treated with TACE, *Journal of Chromatography B.* 915–916 (2013) 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.12.012>.
- [163] T.C. Laurent, J.R.E. Fraser, Hyaluronan, *The FASEB Journal.* 6 (1992) 2397–2404. <https://doi.org/10.1096/fasebj.6.7.1563592>.
- [164] S. Song, H. Qi, J. Xu, P. Guo, F. Chen, F. Li, X. Yang, N. Sheng, Y. Wu, W. Pan, Hyaluronan-Based Nanocarriers with CD44-Overexpressed Cancer Cell Targeting, *Pharm Res.* 31 (2014) 2988–3005. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1393-4>.
- [165] M.A. Dobrovolskaia, P. Aggarwal, J.B. Hall, S.E. McNeil, Preclinical Studies To Understand Nanoparticle Interaction with the Immune System and Its Potential Effects on Nanoparticle Biodistribution, *Mol. Pharmaceutics.* 5 (2008) 487–495. <https://doi.org/10.1021/mp800032f>.
- [166] S.R. Urva, B.S. Shin, V.C. Yang, J.P. Balthasar, Sensitive high performance liquid chromatographic assay for assessment of doxorubicin pharmacokinetics in mouse plasma and tissues, *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B-ANALYTICAL TECHNOLOGIES IN THE BIOMEDICAL AND LIFE SCIENCES.* 877 (2009) 837–841. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.02.018>.

- [167] Y. Wang, J.B. Katzenmeyer, E.A. Arriaga, Combination of Micellar Electrokinetic and High-Performance Liquid Chromatographies to Assess Age-Related Changes in the In Vitro Metabolism of Fischer 344 Rat Liver, *The Journals of Gerontology: Series A*. 66A (2011) 935–943. <https://doi.org/10.1093/gerona/blr074>.
- [168] C.F. Thorn, C. Oshiro, S. Marsh, T. Hernandez-Boussard, H. McLeod, T.E. Klein, R.B. Altman, Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects, *Pharmacogenetics and Genomics*. 21 (2011) 440–446. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32833ffb56>.
- [169] L. Meléndez-Alafort, M. Riondato, A. Nadali, A. Banzato, D. Camporese, P. Boccaccio, N. Uzunov, A. Rosato, U. Mazzi, Bioavailability of ^{99m}Tc-Ha-paclitaxel complex [^{99m}Tc-ONCOFID-P] in mice using four different administration routes, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. 49 (2006) 939–950. <https://doi.org/10.1002/jlcr.1107>.
- [170] D. Coradini, S. Zorzet, R. Rossin, I. Scarlata, C. Pellizzaro, C. Turrin, M. Bello, S. Cantoni, A. Speranza, G. Sava, U. Mazzi, A. Perbellini, Inhibition of Hepatocellular Carcinomas in vitro and Hepatic Metastases in vivo in Mice by the Histone Deacetylase Inhibitor HA-But, *Clin Cancer Res*. 10 (2004) 4822–4830. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0349>.
- [171] C.T. McGary, R.H. Raja, P.H. Weigel, Endocytosis of hyaluronic acid by rat liver endothelial cells. Evidence for receptor recycling, *Biochem J*. 257 (1989) 875. <https://doi.org/10.1042/bj2570875>.
- [172] L. Lebel, Clearance of hyaluronan from the circulation, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 7 (1991) 221–235. [https://doi.org/10.1016/0169-409X\(91\)90003-U](https://doi.org/10.1016/0169-409X(91)90003-U).
- [173] P.J. Davis, A. Bosenberg, A. Davidson, N. Jimenez, E. Kharasch, A.M. Lynn, S.P. Tofovic, S. Woelfel, CHAPTER 7 - Pharmacology of Pediatric Anesthesia, in: P.J. Davis, F.P. Cladis, E.K. Motoyama (Eds.), *Smith's Anesthesia for Infants and Children (Eighth Edition)*, Mosby, Philadelphia, 2011: pp. 179–261. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-06612-9.00007-9>.
- [174] A.F. Oliveira, D.A. Cunha, L. Ladriere, M. Igoillo-Esteve, M. Bugliani, P. Marchetti, M. Cnop, In vitro use of free fatty acids bound to albumin: A comparison of protocols, *BioTechniques*. 58 (2015) 228–233. <https://doi.org/10.2144/000114285>.
- [175] J.R.E. Fraser, T.C. Laurent, U.B.G. Laurent, Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover, *Journal of Internal Medicine*. 242 (1997) 27–33. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.1997.00170.x>.
- [176] D. Šmejkalová, T. Muthný, K. Nešporová, M. Hermannová, E. Achbergerová, G. Huerta-Angeles, M. Svoboda, M. Čepa, V. Machalová, D. Luptáková, V. Velebný, Hyaluronan polymeric micelles for topical drug delivery, *Carbohydrate Polymers*. 156 (2017) 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.013>.
- [177] L. Liu, Y. Liu, J. Li, G. Du, J. Chen, Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives, *Microbial Cell Factories*. 10 (2011) 99. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-99>.
- [178] M. Oe, K. Mitsugi, W. Odanaka, H. Yoshida, R. Matsuoka, S. Seino, T. Kanemitsu, Y. Masuda, Dietary Hyaluronic Acid Migrates into the Skin of Rats, *The Scientific World Journal*. 2014 (2014) 378024. <https://doi.org/10.1155/2014/378024>.
- [179] B. Davies, T. Morris, Physiological Parameters in Laboratory Animals and Humans, *Pharm Res*. 10 (1993) 1093–1095. <https://doi.org/10.1023/A:1018943613122>.

- [180] P.H. Weigel, B.A. Baggenstoss, What is special about 200 kDa hyaluronan that activates hyaluronan receptor signaling?, *Glycobiology*. 27 (2017) 868–877. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwx039>.
- [181] M. Ohlson, J. Sörensson, K. Lindström, A.M. Blom, E. Fries, B. Haraldsson, Effects of filtration rate on the glomerular barrier and clearance of four differently shaped molecules, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 281 (2001) F103–F113. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2001.281.1.F103>.
- [182] J.R.E. Fraser, T.C. Laurent, A. Engström-Laurent, U.G.B. Laurent, Elimination of hyaluronic acid from the blood stream in the human, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 11 (1984) 17–25. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1984.tb00235.x>.
- [183] T.C. Laurent, J.R.E. Fraser, H. Pertoft, B. Smedsrød, Binding of hyaluronate and chondroitin sulphate to liver endothelial cells, *Biochem J*. 234 (1986) 653–658. <https://doi.org/10.1042/bj2340653>.
- [184] L.B. Dahl, T.C. Laurent, B. Smedsrød, Preparation of biologically intact radioiodinated hyaluronan of high specific radioactivity: Coupling of 125I-tyramine-cellobiose to amino groups after partial N-deacetylation, *Analytical Biochemistry*. 175 (1988) 397–407. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90563-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90563-5).
- [185] G. Xu, M. Wong, Q. Li, D. Park, Z. Cheng, C. B. Lebrilla, Unveiling the metabolic fate of monosaccharides in cell membranes with glycomic and glycoproteomic analyses, *Chemical Science*. 10 (2019) 6992–7002. <https://doi.org/10.1039/C9SC01653H>.
- [186] P.G. McGuire, J.J. Castellot, R.W. Orkin, Size-dependent hyaluronate degradation by cultured cells, *Journal of Cellular Physiology*. 133 (1987) 267–276. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041330210>.
- [187] A. Nimrod, E. Ezra, N. Ezov, G. Nachum, B. Parisada, Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion of Bacteria-Derived Hyaluronic Acid in Rats and Rabbits, *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 8 (1992) 161–172. <https://doi.org/10.1089/jop.1992.8.161>.
- [188] B. Smedsrød, Cellular events in the uptake and degradation of hyaluronan, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 7 (1991) 265–278. [https://doi.org/10.1016/0169-409X\(91\)90006-X](https://doi.org/10.1016/0169-409X(91)90006-X).
- [189] J.R. Fraser, T.C. Laurent, Turnover and metabolism of hyaluronan, *Ciba Found Symp*. 143 (1989) 41–53; discussion 53-59, 281–285.
- [190] U. Lindqvist, T. Groth, L. Lebel, Evaluation of various models of hyaluronan kinetics for assessment of liver function, *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 57 (1997) 49–58. <https://doi.org/10.1080/00365519709057818>.
- [191] C.E. Kawcak, D.D. Frisbie, G.W. Trotter, C.W. McIlwraith, S.M. Gillette, B.E. Powers, R.M. Walton, Effects of intravenous administration of sodium hyaluronate on carpal joints in exercising horses after arthroscopic surgery and osteochondral fragmentation., *American Journal of Veterinary Research*. 58 (1997) 1132–1140.
- [192] V.S. Williams, Intraarticular Hyaluronic Acid Supplementation in the Horse: The Role of Molecular Weight, *Journal of Equine Veterinary Science*. 27 (2007) 298–303. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2007.05.006>.
- [193] N. Hisada, H. Satsu, A. Mori, M. Totsuka, J. Kamei, T. Nozawa, M. Shimizu, Low-molecular-weight hyaluronan permeates through human intestinal Caco-2 cell

- monolayers via the paracellular pathway, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. (2008) 0803040796–0803040796.
- [194] A. Asari, T. Kanemitsu, H. Kurihara, Oral Administration of High Molecular Weight Hyaluronan (900 kDa) Controls Immune System via Toll-like Receptor 4 in the Intestinal Epithelium, *Journal of Biological Chemistry*. 285 (2010) 24751–24758. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.104950>.
- [195] N. Volpi, Oral bioavailability of chondroitin sulfate (Condrosulf®) and its constituents in healthy male volunteers, *Osteoarthritis and Cartilage*. 10 (2002) 768–777. <https://doi.org/10.1053/joca.2002.0824>.
- [196] N. Volpi, Oral absorption and bioavailability of ichthyic origin chondroitin sulfate in healthy male volunteers, *Osteoarthritis and Cartilage*. 11 (2003) 433–441. [https://doi.org/10.1016/S1063-4584\(03\)00051-7](https://doi.org/10.1016/S1063-4584(03)00051-7).
- [197] C.G. Jackson, A.H. Plaas, J.D. Sandy, C. Hua, S. Kim-Rolands, J.G. Barnhill, C.L. Harris, D.O. Clegg, The human pharmacokinetics of oral ingestion of glucosamine and chondroitin sulfate taken separately or in combination, *Osteoarthritis and Cartilage*. 18 (2010) 297–302. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2009.10.013>.
- [198] R. Corrêa-Oliveira, J.L. Fachi, A. Vieira, F.T. Sato, M.A.R. Vinolo, Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids, *Clin Transl Immunology*. 5 (2016) e73. <https://doi.org/10.1038/cti.2016.17>.
- [199] S.-S. Lin, Compositions comprising hyaluronic acid for treating and preventing mucosa related diseases, EP2545925A1, 2013. <https://patents.google.com/patent/EP2545925A1/nl> (accessed March 6, 2021).
- [200] G.B. Hatton, V. Yadav, A.W. Basit, H.A. Merchant, Animal Farm: Considerations in Animal Gastrointestinal Physiology and Relevance to Drug Delivery in Humans, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 104 (2015) 2747–2776. <https://doi.org/10.1002/jps.24365>.
- [201] D. Ndeh, A. Baslé, H. Strahl, E.A. Yates, U.L. McClurgg, B. Henrissat, N. Terrapon, A. Cartmell, Metabolism of multiple glycosaminoglycans by *Bacteroides thetaiotaomicron* is orchestrated by a versatile core genetic locus, *Nature Communications*. 11 (2020) 646. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14509-4>.
- [202] R. Tuytten, F. Lemièrè, E. Witters, W.V. Dongen, H. Slegers, R.P. Newton, H.V. Onckelen, E.L. Esmans, Stainless steel electrospray probe: A dead end for phosphorylated organic compounds?, *Journal of Chromatography A*. 1104 (2006) 209–221. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.12.004>.
- [203] S.J. Robertson, P. Lemire, H. Maughan, A. Goethel, W. Turpin, L. Bedrani, D.S. Guttman, K. Croitoru, S.E. Girardin, D.J. Philpott, Comparison of Co-housing and Littermate Methods for Microbiota Standardization in Mouse Models, *Cell Reports*. 27 (2019) 1910–1919.e2. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.023>.
- [204] D. Vigetti, S. Deleonibus, P. Moretto, E. Karousou, M. Viola, B. Bartolini, V.C. Hascall, M. Tammi, G.D. Luca, A. Passi, Role of UDP-N-Acetylglucosamine (GlcNAc) and O-GlcNAcylation of Hyaluronan Synthase 2 in the Control of Chondroitin Sulfate and Hyaluronan Synthesis *, *Journal of Biological Chemistry*. 287 (2012) 35544–35555. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.402347>.
- [205] J. Biwi, C. Biot, Y. Guerardel, A.-S. Vercoutter-Edouart, T. Lefebvre, The Many Ways by Which O-GlcNAcylation May Orchestrate the Diversity of Complex Glycosylations, *Molecules*. 23 (2018) 2858. <https://doi.org/10.3390/molecules23112858>.

- [206] M.C. Ryczko, J. Pawling, R. Chen, A.M. Abdel Rahman, K. Yau, J.K. Copeland, C. Zhang, A. Surendra, D.S. Guttman, D. Figeys, J.W. Dennis, Metabolic Reprogramming by Hexosamine Biosynthetic and Golgi N-Glycan Branching Pathways, *Scientific Reports*. 6 (2016) 23043. <https://doi.org/10.1038/srep23043>.
- [207] D. Parada Venegas, M.K. De la Fuente, G. Landskron, M.J. González, R. Quera, G. Dijkstra, H.J.M. Harmsen, K.N. Faber, M.A. Hermoso, Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases, *Front. Immunol.* 10 (2019). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00277>.

8. SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

2-AA	kyselina anthranilová
2-AB	2-aminobenzamid
¹³ C-HA	¹³ C isotopově obohacený hyaluronan
ACN	acetonitril
AMAC	aminoakridon
BDDE	butan-1,4-diol diglycidyl ether
BDPE	1,4-dibutandiol di-(propan-2,3-dioly) ether
BTH	hovězí testikulární hyaluronidasa
cADP ribose	cyklická adenosin difosfát ribosa
CS	chondroitin sulfát
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
DAU	daunorubicin
DESI	desorpční elektrosprej
DOX	doxorubicin
DoXol	doxorubicinol
<i>DP</i>	stupeň polymerizace
DS	dermatan sulfát
<i>DS</i>	stupeň substituce
FL	fluorescence
GAG	glykosaminoglykan
Gal	galaktosa
GalNAc	<i>N</i> -acetylgalaktosamin
GIT	gastrointestinální trakt
GlcA	kyselina glukuronová
GlcNAc	<i>N</i> -acetyl-d-glukosamin
HA	kyselina hyaluronová/ hyaluronan
AN2	nasyčený disacharid hyaluronanu
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HLEC	lidské jaterní endotheliální buňky
HMW HA	vysokomolekulární hyaluronan
HP	heparin

HS	heparan sulfát
IdoA	kyselina iduronová
IM	iontová mobilita
KS	keratan sulfát
LHase	hyaluronidasa z pijavic
LMW HA	nízkomolekulární hyaluronan
MALDI	laserová desorpce/ionizace za účasti matrice
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie
M_w	molekulová hmotnost
oCS	oligosacharidy chondroitin sulfátu
oHA	oligosacharidy hyaluronanu
oHS	oligosacharidy heparan sulfátu
PGC	porézní grafitický uhlík
PMP	1-fenyl-3-methyl-5-pyrazolon
RPLC	kapalinová chromatografie na reverzních fázích
SEC	gelová permeační chromatografie
SIMS	hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů
SpHyl	hyaluronidasa ze <i>Streptococcus pneumoniae</i>
UDP-GalNAcS	uridin difosfát <i>N</i> -acetylgalactosamin sulfát
UDP-Glc	uridin difosfát glukosa
UDP-GlcNAc	uridin difosfát <i>N</i> -acetylglukosamin
Δ AN2	nenasycený disacharid hyaluronanu
Δ AN2-C16	nenasycený palmitoyl modifikovaný disacharid hyaluronanu
Δ AN2-C18:1	nenasycený oleyl modifikovaný disacharid hyaluronanu

9. ŽIVOTOPIS

Matěj Šimek

narozen: 28, 4, 1991 v Pelhřimově

trvalé bydliště Salmovská 16, Praha 2

Vzdělání

2018 – doposud postgraduální studium na Přírodovědecké fakultě Univerzity Palackého v Olomouci

obor: *Analytická chemie*

2014 – 2017 bakalářské studium na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze

obor: *Učitelství odborných předmětů*

2013 – 2015 navazující magisterské studium na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze

obor: *Analytická chemie a jakostní inženýrství*

2010 – 2013 bakalářské studium na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze

obor: *Analytická a fyzikální chemie*

Praxe

2015 – doposud výzkumný pracovník, Contipro a.s., Dolní Dobrouč

Výzkum a vývoj analytických metod – farmaceutický průmysl

1/2020 – 2/2020, 6/2021 studijní stáž, Technická univerzita ve Vídni

MS zobrazování pomocí MALDI, skupina prof. Martiny Marchetti-Deschmann

Publikační činnost

- M. Šimek, K. Nešporová, A. Kocurková, T. Foglová, G. Ambrožová, V. Velebný, L. Kubala, M. Hermannová, How the molecular weight affects the *in vivo* fate of exogenous hyaluronan delivered intravenously: A stable-isotope labelling strategy, *Carbohydrate Polymers*. 263 (2021) 117927.
- M. Šimek, K. Lemr, M. Hermannová, V. Havlíček, Analysis of hyaluronan and its derivatives using chromatographic and mass spectrometric techniques, *Carbohydrate Polymers*. 250 (2020) 117014.
- M. Šimek, M. Hermannová, D. Šmejkalová, T. Foglová, K. Souček, L. Binó, V. Velebný, LC–MS/MS study of *in vivo* fate of hyaluronan polymeric micelles carrying doxorubicin, *Carbohydrate Polymers*. (2019) 181–189.
- P. Šedová, R. Buffa, P. Šilhár, L. Kovářová, H. Vágnerová, J. Bednařík, I. Basarabová, L. Hejlová, I. Ščigalková, M. Šimek, V. Velebný, The effect of hydrazide linkers on hyaluronan hydrazone hydrogels. *Carbohydrate polymers*, (2019) 63-71.
- L. Borovcová, M. Hermannová, V. Pauk, M. Šimek, V. Havlíček, K. Lemr, Simple area determination of strongly overlapping ion mobility peaks, *Analytica Chimica Acta*. 981 (2017) 71–79.

Postery

- M. Šimek, T. Foglová, P. Šulc, M. Hermannová, V. Velebný, Determination of Latanoprost and Latanoprost free acid in plasma by LC-MS/MS using elektropray and unispray, 67 th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, (2.-6. června 2019) Atlanta, USA
- M. Šimek, T. Foglová, G. Ambrožová, A. Kocurková, K. Nešporová, L. Kubala, V. Velebný, M. Hermannová, Comparison of pharmacokinetic profiles of low(15 kDa and 138 kDa), middle (370 kDa), and high (1,5 MDa) molecular weight hyaluronan after intravenous application, HYALURONAN 2019 (9.-13. června, 2019) Cardiff, UK.
- M. Šimek, M. Hermannová, T. Foglová, K. Souček, V. Velebný, Analysis of drug and vehicle in DBS and plasma for determination of nanocarrier stability and drug release in pharmacokinetic study, 47 th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, (29. července - 2. srpna, 2018) Washington, DC, USA.

- M. Šimek, P. Žádníková, Imaging of hyaluronan in mouse breast tumor tissue using desorption electrospray ionization mass spectrometry, 66th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, (3.-7. června 2018) San Diego, CA, USA.

10. PŘÍLOHA: PUBLIKAČNÍ VÝSTUPY

Přílohou tištěné verze disertační práce jsou následující publikace:

M. Šimek, K. Lemr, M. Hermannová, V. Havlíček, Analysis of hyaluronan and its derivatives using chromatographic and mass spectrometric techniques, *Carbohydrate Polymers*. 250 (2020) 117014. (cit. [98])

M. Šimek, M. Hermannová, D. Šmejkalová, T. Foglová, K. Souček, L. Binó, V. Velebný, LC–MS/MS study of in vivo fate of hyaluronan polymeric micelles carrying doxorubicin, *Carbohydrate Polymers*. (2019) 181–189. (cit. [1])

M. Šimek, K. Nešporová, A. Kocurková, T. Foglová, G. Ambrožová, V. Velebný, L. Kubala, M. Hermannová, How the molecular weight affects the in vivo fate of exogenous hyaluronan delivered intravenously: A stable-isotope labelling strategy, *Carbohydrate Polymers*. 263 (2021) 117927. (cit. [147])