

# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ  
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY  
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

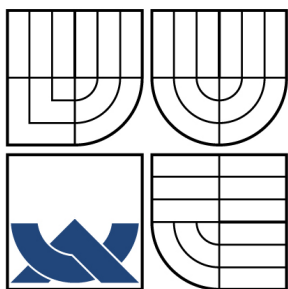
KYSELINA HYALURONOVÁ A MOŽNOSTI JEJÍHO VYUŽITÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE  
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

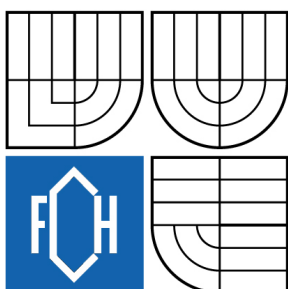
IVA MAIVALDOVÁ

BRNO 2008



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# KYSELINA HYALURONOVÁ A MOŽNOSTI JEJÍHO VYUŽITÍ

HYALURONIC ACID AND POSSIBILITIES OF ITS UTILIZATION

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

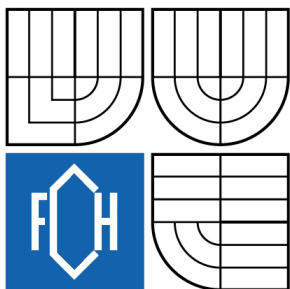
IVA MAIVALDOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. JANA ZEMANOVÁ, Ph.D.

BRNO 2008



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce	<b>FCH-BAK0189/2007</b>	Akademický rok: <b>2007/2008</b>
Ústav	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka)	<b>Maivaldová Iva</b>	
Studijní program	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor	Potravinářská chemie (2901R021)	
Vedoucí bakalářské práce	<b>Ing. Jana Zemanová, Ph.D.</b>	
Konzultanti bakalářské práce	Ing. Filip Mravec	

### Název bakalářské práce:

Kyselina hyaluronová a možnosti jejího využití

### Zadání bakalářské práce:

1. Vypracování literární rešerše na téma:
  - a) Kyselina hyaluronová, její účinné formy.
  - b) Přehled jejich fyzikálně-chemických a biologických vlastností.
  - c) Možnosti jejich získávání a aplikace.
2. Přehledné zpracování získaných informací a jejich souhrnné hodnocení.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 30.5.2008

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

---

Iva Maivaldová  
student(ka)

---

Ing. Jana Zemanová, Ph.D.  
Vedoucí práce

---

Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2007

---

doc. Ing. Jaromír Havlica, CSc.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

Tato bakalářská práce prezentuje současné znalosti z výzkumu kyseliny hyaluronové, popisuje její fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti stejně jako hlavní možnosti jejího využití jak v lékařství tak v kosmetice.

Kyselina hyaluronová je lineární polysacharid, skládá se z opakujících se jednotek disacharidu tvořeného *N*-acetyl-D-glukosaminem a D-glukuronovou kyselinou. Hyaluronová kyselina tvoří jednu ze základních složek extracelulární matrix a je přítomna téměř ve všech biologických tekutinách a tkáních (především pojivových). Díky své vysoké molekulové hmotnosti a unikátním viskoelastickým vlastnostem se hyaluronová kyselina využívá v kosmetologii, oftalmologii, revmatologii, otolaryngologii, dermatologii, plastické chirurgii, při hojení ran a k přenosu léků.

## **ABSTRACT**

This bachelor thesis presents contemporary knowledge gained in the research of hyaluronic acid, describing its physical-chemical and biological properties as well as principal possibilities of its utilization both in medicine and cosmetics.

Hyaluronic acid is a linear polysaccharide formed from disaccharide units containing *N*-acetyl-D-glucosamine and glucuronic acid. Hyaluronic acid represents one of the main components of the extracellular matrix and is present in almost all biological fluids and tissues (mainly in connective tissue). Its high molecular mass and unique viscoelastic properties offer a wide range of use of this molecule in cosmetology, ophthalmology, rheumatology, otolaryngology, dermatology, plastic surgery, wound healing and drug delivery.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Hyaluronová kyselina, vlastnosti, aplikace

## **KEYWORDS**

Hyaluronic acid, properties, applications

MAIVALDOVÁ, I. *Kyselina hyaluronová a možnosti jejího využití*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 37 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Jana Zemanová, Ph.D.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studentky

## **PODĚKOVÁNÍ**

*Na tomto místě bych ráda poděkovala za vstřícnost, cenné rady a připomínky Ing. Janě Zemanové, Ph.D. a Ing. Filipovi Mravcovi.*

# OBSAH

1. Úvod.....	6
2. Současný stav řešené problematiky.....	7
2.1 Hyaluronová kyselina a její vlastnosti .....	7
2.1.1 Historický přehled .....	7
2.1.2 Struktura HA .....	8
2.1.2.1 Chemická struktura .....	8
2.1.2.2 Struktura polymeru.....	9
2.1.2.3 Struktura v roztoku.....	9
2.1.3 Výskyt hyaluronanu .....	11
2.1.4 Mechanismus syntézy hyaluronanu .....	13
2.1.4.1 Prodlužování řetězce .....	14
2.1.4.2 Velikost řetězce .....	15
2.1.5 Hyaluronansynthasa .....	15
2.1.6 HA-vazebné proteiny a receptory .....	15
2.1.6.1 CD44 .....	15
2.1.6.2 RHAMM .....	16
2.1.6.3 Ostatní HA-vazebné proteiny.....	16
2.1.7 Regulace syntézy hyaluronanu.....	16
2.1.7.1 Exprese synthasy .....	16
2.1.7.2 Stimulace a inhibice synthasy .....	17
2.1.7.3 Vliv délky řetězce na další prodlužování .....	17
2.1.8 Biotransformace .....	17
2.1.8.1 Obrat.....	17
2.1.8.2 Katabolismus .....	18
2.1.9 Funkce hyaluronanu .....	18
2.1.9.1 Buněčné funkce .....	18
2.1.9.2 Fyziologické funkce .....	19
2.1.9.3 Patologické funkce .....	20
2.1.10 Degradace hyaluronanu.....	21
2.1.10.1 Degradace volnými radikály .....	21
2.1.10.2 Enzymatická degradace.....	21
2.2 Aplikace hyaluronanu .....	22
2.2.1 Oftalmologie.....	22
2.2.2 Ortopedická chirurgie a revmatologie.....	23
2.2.3 Otolaryngologie.....	25
2.2.4 Dermatologie a plastická chirurgie .....	26
2.2.4.1 Kosmetika.....	26
2.2.4.2 Plastická chirurgie .....	26
2.2.5 Hojení ran a léčba popálenin.....	27
2.2.5.1 Hojení ran.....	27
2.2.5.2 Léčba popálenin .....	28
2.2.6 Přenos léků .....	30
3. Závěr.....	31
4. Seznam použitých zdrojů .....	33
5. Seznam použitých zkratk .....	36
6. Příloha .....	37

## 1. ÚVOD

Hyaluronová kyselina (HA) je přirozeně se vyskytující biopolymer. Představuje jednu z hlavních složek extracelulární matrix (ECM) obratlovců a kromě toho je vytvářena bakteriemi, viry a houbami. Hyaluronová kyselina je lineární polyanionický polysacharid tvořený disacharidovými jednotkami složenými z *N*-acetyl-D-glukosaminu a D-glukuronové kyseliny. Hyaluronát sodný, převládající forma ve fyziologickém pH, a hyaluronová kyselina jsou společně nazývány jako **hyaluronan**, běžně se používají oba názvy polymeru. Vyskytuje se jako vysokomolekulární polymer v rozsahu od několika stovek až do  $10^7$  Da (s průměrnou velikostí  $1-2 \cdot 10^6$  Da) téměř ve všech biologických tekutinách a tkáních. Zaujímá velký prostorový objem a je schopna pojmout velké množství vody.

Jeho fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti nabízejí široké spektrum možností využití tohoto biopolymeru jak v průmyslu, tak v lékařských vědách. Díky svým viskoelastickým a hydratačním vlastnostem je hyaluronan využíván v kosmetologii, oftalmologii, revmatologii, diabetologii, otolaryngologii, dermatologii, plastické chirurgii, při hojení ran a k přenosu léků.

## 2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Hyaluronová kyselina a její vlastnosti

Kyselina hyaluronová je mnohdy považována pouze za molekulu extracelulární matrix. Minulý a současný výzkum však objevuje stále nové a nové funkce této molekuly jak na buněčné, tak na orgánové úrovni. Všechny získané znalosti o této molekule poukazují na to, že HA je molekula velkého významu. Její všudypřítomnost a účast na celé řadě biologických procesů, jako jsou angiogeneze, migrace a proliferace různých buněčných typů, účast na zánětlivých procesech, procesech hojení ran a dalších, ukazuje na celou řadu možností využití této molekuly. [1, 2, 3, 4]

#### 2.1.1 Historický přehled

V roce 1934 popsal Karl Meyer a jeho asistent, John Palmer, postup izolace nového glykosaminoglykanu z hovězího sklivce. Objevili, že tato látka obsahuje uronovou kyselinu a aminocukr, ale ne sufloester, který je pro glykosaminoglykany specifický. Látku nazvali hyaluronová kyselina (angl. *hyaluronic acid*) jako spojení slov *hyaloid* (sklovitý) a *uronic acid* (uronová kyselina). Ve fyziologickém pH dochází k disociaci karboxylových skupin, a proto by měla být nazývána hyaluronát. Dnes je tato makromolekula stále častěji označována jako **hyaluronan** za účelem zdůraznění její polysacharidové podstaty. [1, 4]

Během 30. a 40. let 20. století byl hyaluronan izolován z mnoha zdrojů, například ze sklivce, synoviální tekutiny, pupeční šňůry, kůže, kohoutích hřebínků (Meyer, 1947) a také ze streptokoků. [1]

Fyzikálně-chemické charakterizace hyaluronanu byly prováděny v průběhu 50. a 60. let 20. století. Molekulová hmotnost je v řádech  $10^7$  Da. Vlastnosti umožňují hyaluronanu regulovat vodní bilanci, osmotický tlak a odpor proti proudění, interagovat s proteiny a také působit jako síto a jako mazivo, dále stabilizovat strukturu na základě elektrostatických interakcí. [1]

V roce 1972 Hardingham a Muir objevili, že hyaluronan interaguje s chrupavkovými proteoglykany. Toto byl první příklad specifické interakce mezi hyaluronanem a proteinem, mnoho dalších takovýchto interakcí bylo objeveno během 90. let 20. století. [1, 4]

Na rozdíl od většiny glykosaminoglykanů, které jsou tvořeny v Golgiho aparátu, bylo v 80. letech 20. století prokázáno, že hyaluronan se syntetizuje v plazmatické membráně. Následně bylo možné měřit hyaluronan specificky v tělních tekutinách s vysokou citlivostí. V této době začal Balazs propagovat aplikaci hyaluronanu pro medicínské účely a vyrábět vysoce viskózní a protizánětlivé přípravky jako podporu pro oční lékařství a jako viskózní doplněk synoviální tekutiny u pacientů s osteoartritidou. [1]



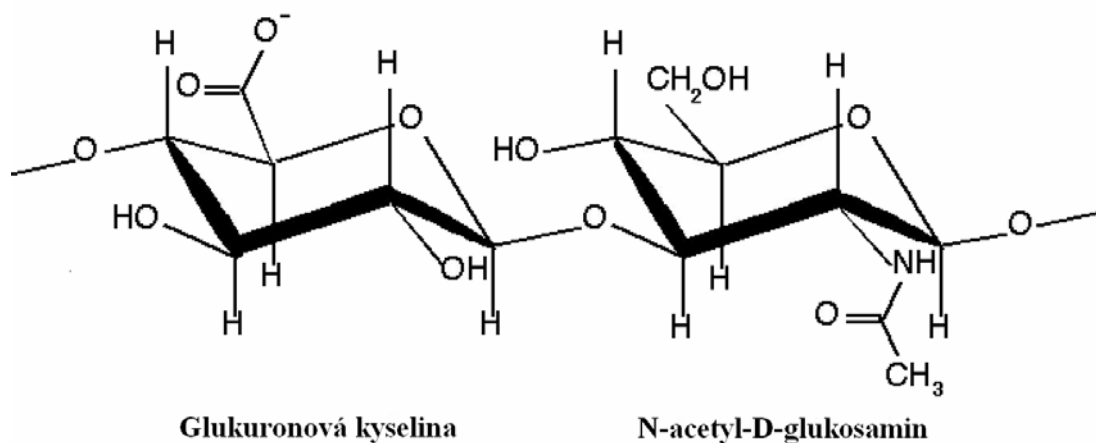
V 90. letech 20. století byly intenzivně studovány interakce hyaluronan-protein, dále byla klonována hyaluronansynthasa z různých zdrojů, každá schopná produkovat hyaluronan s rozdílnou délkou řetězce a v rozdílném množství. [1]

Poslední dobou se ukazuje, že hyaluronan působí jako zesilovač pro aktivní proteinasy. Bylo již dlouho známo, že hyaluronan je velmi citlivý na oxygenní radikály způsobující jeho rozklad. Vznikající produkty odbourání zprostředkovávají důležité biologické funkce. Produkty vznikající při degradaci hyaluronanu, označovány jako HA oligosacharidy, indukují angiogenezi a také aktivují lymfocyty. Radikálová degradace vytváří reaktivní aldehydy, které modifikují proteiny do hlavní/základní antigenní struktury revmatické artritidy. Tento objev posléze ukončil dlouhé a tíživé období neznalosti lékařsky významného problému a může případně vést k úspěšné léčbě těchto nemocí, které jsou léčeny pouze symptomaticky. [1]

## 2.1.2 Struktura HA

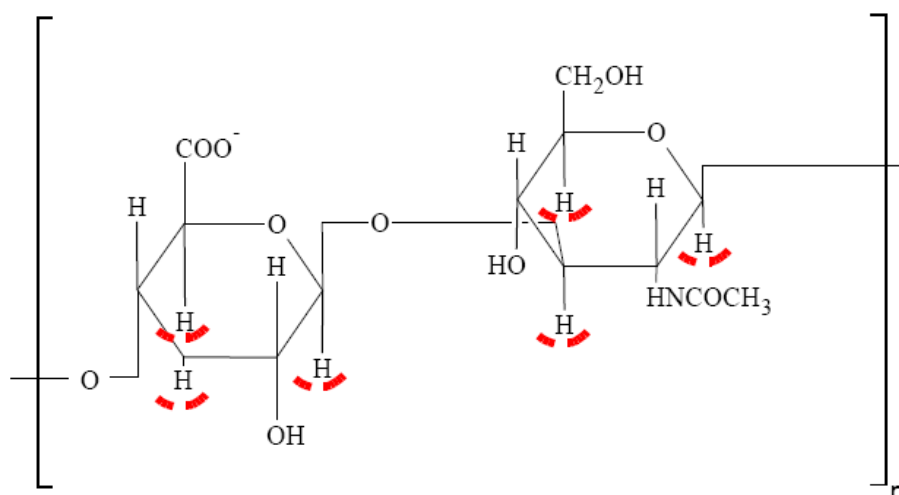
### 2.1.2.1 Chemická struktura

Hyaluronan se skládá ze základních disacharidových jednotek tvořených D-glukuronovou kyselinou a *N*-acetyl-D-glukosaminem vzájemně spojených střídající se  $\beta$ -1,3 a  $\beta$ -1,4 glykosidickou vazbou (**Obr. 1**). [1, 2, 5, 6, 7]



**Obr. 1:** Struktura HA. Základ tvoří opakující se disacharidové jednotky glukuronové kyseliny a *N*-acetylglukosaminu. [1]

Oba sacharidy prostorově vycházejí z glukosy, která v beta konfiguraci dovoluje všem objemným skupinám (hydroxylové, karboxylové, acetamidové) být ve stericky příznivé ekvatoriální pozici, zatímco všechny malé atomy vodíku zaujímají méně stericky příznivé axiální polohy (**Obr. 2**). A tak je struktura disacharidu energeticky velmi stabilní. [1, 2, 5, 6, 7]



**Obr. 2:** Podtržené axiální vodíky ve struktuře HA tvoří hydrofobní část [6]

### 2.1.2.2 Struktura polymeru

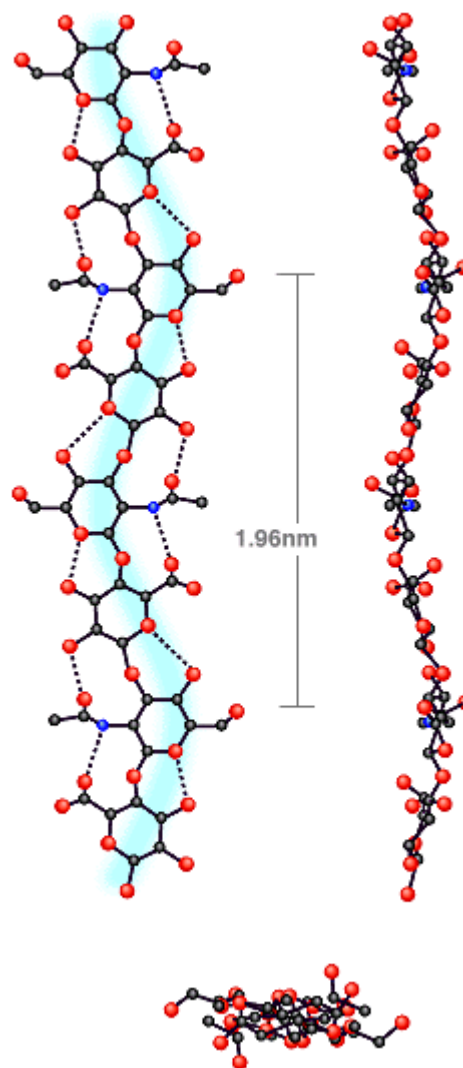
Enzymy hyaluronansynthasy syntetizují velké lineární polymery, tvořené z opakující se disacharidové struktury hyaluronanu. Tato struktura vzniká střídavým připojováním glukuronové kyseliny a *N*-acetylglukosaminu k rostoucímu řetězci, které využívají svoje aktivované nukleotidové cukry (UDP-glukuronová kyselina a UDP-*N*-acetylglukosamin) jako substráty. Počet opakujících se disacharidů může v kompletní molekule dosáhnout 10 000 a více, s molekulovou hmotností ~ 4 miliony Da (každý disacharid ~ 400 Da). Průměrná délka disacharidu je ~ 1 nm. A tak má molekula hyaluronanu s 10 000 disacharidy po natažení od konce ke konci 10  $\mu$ m, tato délka je přibližně shodná s průměrem lidského erytrocytu. [2, 6, 7]

### 2.1.2.3 Struktura v roztoku

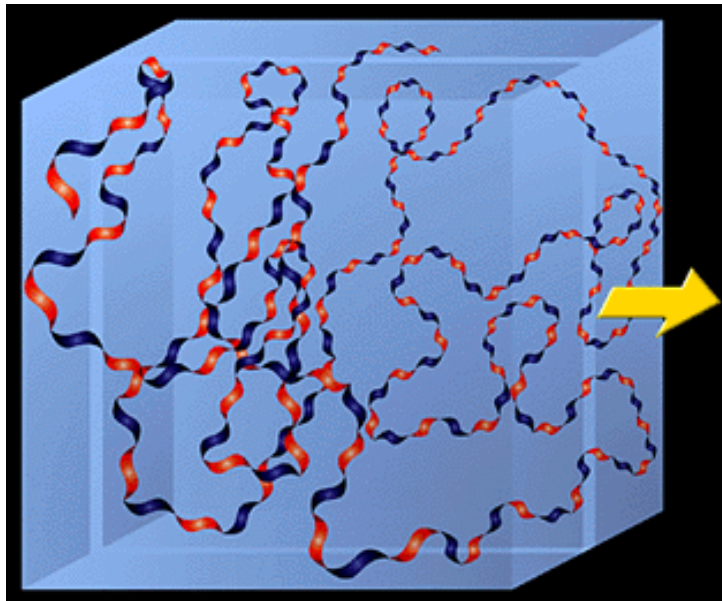
Ve vodě hyaluronan agreguje, částečně pomocí vazeb mezi hydrofobními místy, a zaujímá preferovaný tvar. Sekundární struktura má výjimečné vlastnosti, obě strany jsou identické, ale antiparalelní, a co je možné na jedné straně struktury, je také možné na druhé (**Obr. 3**). Agregáty mohou růst z obou stran. Molekuly hyaluronanu jsou obojetné, umožňují jejich hromadění ve vodě pomocí specifických interakcí a vytvářejí síťovinu - terciální struktura. [1, 6]

Ve fyziologickém roztoku je hlavní řetězec molekuly hyaluronanu „vyztužen“ kombinací chemické struktury disacharidu, vnitřních vodíkových můstků a interakcemi s rozpouštědlem. Axiální atomy vodíku tvoří nepolární, relativně hydrofobní ráz, zatímco ekvatoriální postranní řetězce tvoří více polární, hydrofilní ráz, čímž vytvářejí stočenou pásovou strukturu. Molekula hyaluronanu převezme ve fyziologickém roztoku rozšířenou strukturu nahodilého klubka, které zaujímá velmi rozsáhlou oblast (**Obr. 4**).

Doménová struktura hyaluronanu má zajímavý a důležitý význam. Malé molekuly jako voda, elektrolyty a živiny mohou volně difundovat rozpouštědlem do domény. Nicméně velké molekuly jako proteiny budou částečně vyloučeny z domény kvůli jejich hydrodynamické velikosti v roztoku. Obojí vede k pomalejší difúzi makromolekul přes síť hyaluronanu a k jejich nižší koncentraci v síti ve srovnání s okolními volnými částmi hyaluronanu. Zajímavé je, že řetězce hyaluronanu se neustále v roztoku pohybují a efektivní póry v síti průběžně mění velikost. V podstatě tedy mohou všechny molekuly procházet hyaluronovou sítí, ale s rozdílným stupněm retardace. Při pH 7 jsou karboxylové skupiny převážně ionizovány a molekula hyaluronanu se stává polyaniontem s přiřazeným vyměnitelným kationem k udržení nábojové neutrality. [6, 7]



**Obr. 3:** Různé pohledy na strukturu hyaluronanu (počítačová projekce) [7]

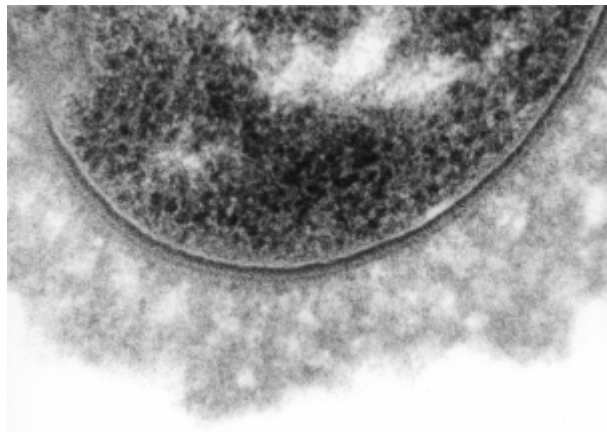


červené...hydrofobní část  
modré.....hydrofilní část

**Obr. 4:** Model vodného roztoku HA: tzv. stuha [6]

### 2.1.3 Výskyt hyaluronanu

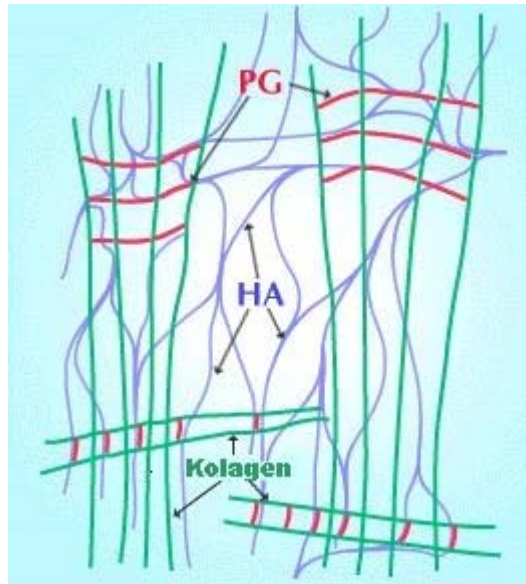
Hyaluronan je přítomen u všech obratlovců a také v pouzdrech některých patogenních bakterií jako je *Streptococcus equi*, *Streptococcus zooepidemicus* a *Pasteurella* (**Obr. 5**).



**Obr. 5:** *Streptococcus zooepidemicus* – pouzdro obsahující HA [8]

HA je součástí extracelulárních maticí mnoha tkání a v některých tkáních představuje jejich hlavní složku. Koncentrace hyaluronanu je vysoká zejména v kohoutím hřebínku ( $7,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), v synoviální tekutině ( $3\text{-}4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), v pupeční šňůře ( $3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), v očním sklivci ( $0,1\text{-}0,4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

Na **Obr. 6** je znázorněna základní struktura očního sklivce tvořená třemi složkami (hyaluronanem, kolagenem a proteoglykany – zkratka PG).



*Obr. 6: Základní struktura očního sklivce [7]*

V ostatních tkáních obsahujících méně hyaluronanu slouží hyaluronan jako esenciální strukturální složka matrix. Výskyt hyaluronanu v lidském těle je zobrazen na **Obr. 7.** [1, 2, 4]



*Obr. 7: Výskyt hyaluronanu v lidském těle [9]*

V chrupavce vytváří HA agregační centra pro aggrecan, velký chondroitinsulfátový proteoglykan, a udržuje molekuly aggrecanu v matrix specifickými protein-hyaluronan interakcemi. Hyaluronan je méně koncentrovaný v matrix dalších pojivových tkáních jako například těch, které obklopují hladké svalové buňky v aortě a fibroblasty v dermis. [1, 6]

Největší množství hyaluronanu (7-8 g v průměru u dospělého člověka, ~ 50 % celkového množství v těle) spočívá v kožní tkáni, je přítomno jak v dermis (0,2-0,5 mg·ml<sup>-1</sup>), tak v epidermis (0,1 mg·ml<sup>-1</sup>). Přehled koncentrací hyaluronanu u různých živočišných druhů v jejich tkáních a orgánech je uveden v **Tab. 1**. [1, 6]

**Tab. 1:** Koncentrace hyaluronanu ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) v orgánech a tekutinách u různých živočišných druhů [10]

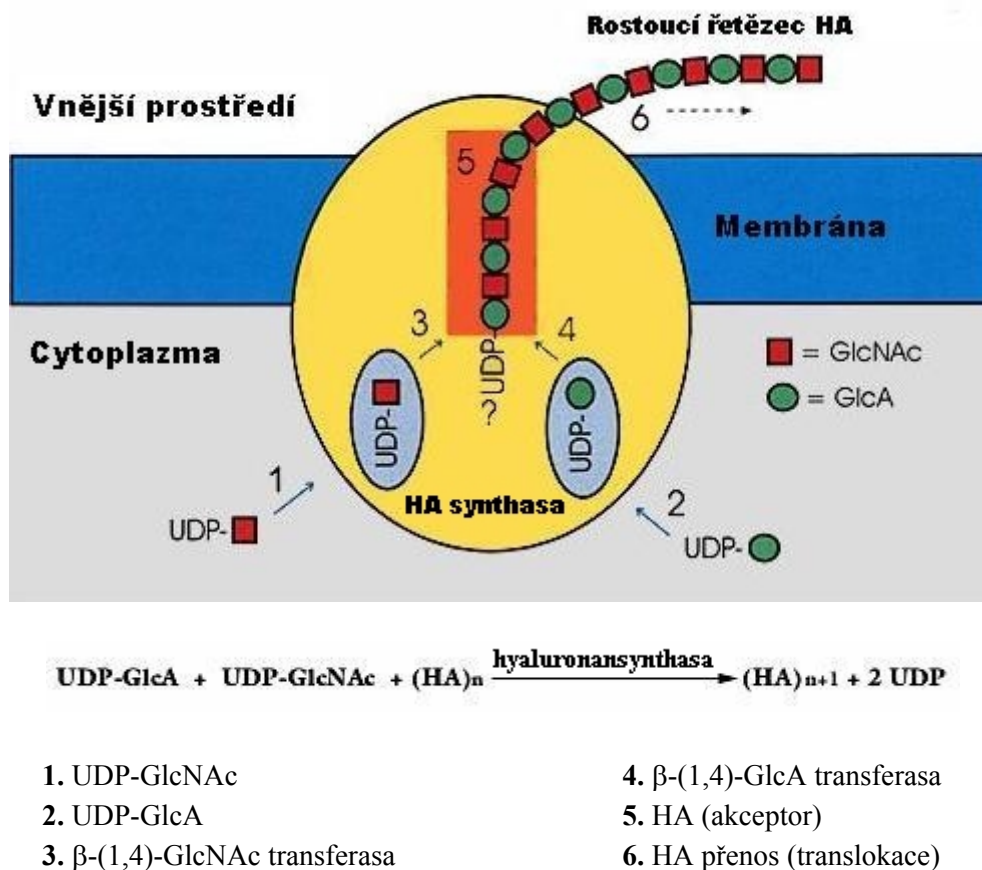
Orgán či tekutina	Člověk	Ovce	Králík	Krysa
Pupeční šňůra	4100			
Synoviální tekutina	1400-3600	540	3890	1000
Dermis	200			
Sklivec	140-338	260	29	
Plíce		98-243		34
Ledviny			93-113	30
Renální papily			250	
Renální kortex			4	
Mozek	35-115		54-76	74
Svaly			27	
Střevo				44
Torakální mícha	8,5-18	1-34		5,4
Játra			1,5	4
Komorová voda	0,3-2,2	1,6-5,4	0,6-2,5	0,2
Moč	0,1-0,3			
Cerebrospinální tekutina	0,02-0,32			
Plazma	0,01-0,1	0,12-0,31	0,019-0,086	0,048-0,26

#### 2.1.4 Mechanismus syntézy hyaluronanu

Neobvyklý mechanismus syntézy hyaluronanu bránil po dlouhou dobu k jeho úplnému objasnění. Byly však na sobě nezávisle objeveny dva mechanismy – pro savčí buňky a streptokoky na jedné straně a pro *Pasteurellu* na straně druhé. [1]

### 2.1.4.1 Prodlužování řetězce

Syntéza hyaluronanu v savčích buňkách se liší od syntézy ostatních polysacharidů v mnoha ohledech. Molekula je prodlužována na redukujícím konci střídavým přenosem UDP-hyaluronanu k substrátům UDP-GlcNac a UDP-GlcA, za současného uvolnění UDP. Ostatní glykosaminoglykany rostou na neredukujícím konci. (**Obr. 8**) [1]



**Obr. 8:** Model syntézy HA [11]

Většina glykosaminoglykanů je vytvářena v Golgiho aparátu. Naproti tomu hyaluronan je syntetizován v plazmatické membráně, vznikající řetězce jsou vytlačovány přímo do extracelulární matrix.

Tento mechanismus syntézy funguje pro syntézu hyaluronanu u obratlovců a u grampozitivních streptokoků. Nicméně se zdá, že existuje rozdílný mechanismus syntézy hyaluronanu u gramnegativní *Pasteurelly*, u které jsou řetězce prodlužovány na neredukujícím konci. [1, 4, 10]

#### **2.1.4.2 Velikost řetězce**

Experimenty s izolovanými membránami fibroblastů nebo streptokoků odhalily, že odstraněním/přesunutím vznikajícího hyaluronanu z enzymu hyaluronansynthasy se stimulovala jeho produkce. Tak se ukázalo, že vysokomolekulární hyaluronan inhibuje vlastní prodlužování řetězce, když je držen synthasou. [1]

#### **2.1.5 Hyaluronansynthasa**

Hyaluronan je syntetizován membránou ohraničující protoplast streptokoků skupiny A a C. Enzymatická aktivita bývá snižována velmi mírnými detergenty - digitoninem. Tradiční purifikační procedury (jako iontově-výměnná chromatografie) membránových proteinů rozpuštěných detergentem poskytly nehomogenní proteinové směsi, které nemohly být rozděleny na jednotlivé složky bez ztráty enzymatické aktivity. Proto byla vyvinuta nová metoda, založená na fázové separaci roztoku detergentu umožňující purifikaci synthasy v její aktivní formě. Konečná purifikace hyaluronansynthasy byla dosažena pomocí iontově-výměnné chromatografie a poskytla elektroforeticky homogenní protein o 42 kDa. Studie prokázala, že jediný protein je dostačující pro přímou syntézu hyaluronanu. Byla klonována streptokoková hyaluronansynthasa a savčí synthasa. Jsou známy tři savčí synthasy označované jako HAS1, HAS2 a HAS3. [1, 4]

Identifikace a charakterizace eukaryotní hyaluronansynthasy způsobilo převrat v oblasti biologie hyaluronanu. Nyní je možné přeměnit v podstatě každou savčí buňku a možná každou eukaryotickou buňku na továrnu syntetizující hyaluronan jednoduše pomocí exprese jediného genu. Biosyntéza hyaluronanu je řízena u obratlovců třemi odlišnými enzymy. Kombinací diferenciální transkripce HAS genů, podstatných rozdílů v enzymových rychlostech a rozdílů ve výsledné délce řetězce hyaluronanu zajišťuje organismus dokonalou úroveň kontroly nad biosyntézou a funkcí hyaluronanu. [12]

#### **2.1.6 HA-vazebné proteiny a receptory**

HA-vazebné proteiny jsou složky extracelulární matrix a stabilizují její integritu. HA-receptory se podílejí na přenosu buněčných signálů. [1]

##### **2.1.6.1 CD44**

Hlavní receptor pro HA je molekula CD44. CD44 je transmembránový receptor všudypřítomný v lidském těle. Je spojen s G-proteinem a celou řadou kinas, které zprostředkovávají jeho odpověď. CD44 je povrchový buněčný glykoprotein zapojený do fyziologických mezibuněčných interakcí, buněčné adheze, diferenciaci, migrace, růstu a patologické nádorové metastáze. Vazba HA na tento receptor vede k celé řadě buněčných odpovědí, jako jsou přilnavost, organizace a obrat extracelulární matrix na povrchu buněčné



membrány a zprostředkování migrace lymfocytů v průběhu zánětu. Tento receptor může existovat v celé řadě izoform. [3, 4, 13]

#### **2.1.6.2 RHAMM**

Jedním z receptorů, který se svojí funkcí a expresí podobá CD44, je RHAMM (angl. *receptor for hyaluronan-mediated motility*). Oba receptory, jak CD44, tak RHAMM, se podílejí na regulaci přenosu buněčných signálů. RHAMM byl původně identifikován jako povrchový buněčný protein, ale nyní se zdá, že RHAMM je buď tvořen v malém množství na povrchu buněk za specifických růstových podmínek, nebo není tvořen vůbec a je převážně lokalizován intracelulárně. [1, 3]

#### **2.1.6.3 Ostatní HA-vazebné proteiny**

Mezi další intracelulární HA-vazebné proteiny patří LYVE-1, který je podobný receptoru CD44. Tento receptor je zapojen do přenosu buněk v lymfatických cévách a mizních uzlinách a může být transportérem hyaluronanu. Jedním z dalších proteinů je ICAM-1, který byl izolován z jater a také byl objeven v ostatních tkáních, které vážou hyaluronan. Existuje však několik pochybností o tom, zda je opravdový jaterní receptor pro endocytosu hyaluronanu. [1, 4, 13]

### **2.1.7 Regulace syntézy hyaluronanu**

Téměř každá porucha buněčné homeostáze stimuluje produkci hyaluronanu. Rozlišují se tři úrovně regulace. [1]

1. Exprese synthasy.
2. Stimulace a inhibice synthasy růstovými a diferencními faktory působící na cílové buňky.
3. Poruchy v integritě extracelulární matrix, zejména degradace hyaluronanu vázaného na buněčný povrch.

#### **2.1.7.1 Exprese synthasy**

Synthasa má značnou rychlost obratu a poločas rozpadu 82 minut. Tři savčí synthasy jsou vytvářeny v různých tkáních, a tak produkují hyaluronan o rozdílném množství a velikosti. [1]

### **2.1.7.2 Stimulace a inhibice syntasy**

Je známo mnoho růstových a diferenčních faktorů stimulujících syntézu hyaluronanu – zvýšená produkce hyaluronanu při nádorových onemocnění, virový sarkom stimuluje produkci hyaluronanu v chondrocytech, v kuřecích fibroblastech a myoblastech. [1]

Je překvapivé, že byly objeveny pouze dva inhibitory hyaluronansyntasy. Jodistanem oxidované UDP-GlcA nebo UDP-GlcNac jsou používány jako „sebevražedné“ inhibitory syntasy. Tyto inhibitory nepřekonají buněčné membrány a musí být importovány do cytoplasmu pinocytózou. Inhibitory potlačí aktivitu syntasy v myofibroblastech. Z toho důvodu stojí za to rozvíjet či izolovat inhibitory syntézy hyaluronanu, které by mohly být použité jako hojivé léky při patologických poruchách souvisejících s produkcí hyaluronanu (například otoky). [1]

### **2.1.7.3 Vliv délky řetězce na další prodlužování**

Dalším faktorem regulujícím syntézu hyaluronanu je jeho množství na buněčném povrchu, které ovlivňuje vlastní produkci. Během výzkumů regulace syntézy hyaluronanu u streptokoků bylo objeveno, že velký řetězec hyaluronanu inhibuje svoje vlastní prodlužování, nachází-li se v blízkosti syntasy. U eukaryotických buněk je regulátorem syntézy hyaluronanu receptor CD44. [1]

## **2.1.8 Biotransformace**

Samotná biotransformace hyaluronanu probíhá různými způsoby na různých místech. Nejčastějším místem biodegradace HA jsou játra, a to zejména při parenterálních způsobech podání. Topické podání naopak vykazuje degradaci již v pokožce. [3]

### **2.1.8.1 Obrat**

Obrat (angl. *turnover*) HA v savčích tkáních je značný, u dospělého člověka činí kolem 5 g hyaluronanu za den. Hlavní zdroje hyaluronanu jsou klouby, kůže, oči a střevo. V kůži a kloubech je poločas rozpadu okolo 12 hodin, zatímco v přední komoře oční 1-1,5 hod, v krevním řečišti 2-5 minut a ve sklivci 70 dní. [1, 14]

V epidermis (topické podání) je obrat HA rychlý. Keratinocyty v monokultuře si ponechávají část HA jako součást buněčné vrstvy, část na povrchu plazmatické membrány a část v intracelulárním kompartmentu. [3]

V synoviální tekutině je obrat HA závislý na velikosti molekuly. Zatímco velké molekuly setrvávají v synoviální štěrbině, malé molekuly jsou odsouvány a degradovány. [3]

### **2.1.8.2 Katabolismus**

Katabolismus hyaluronanu zahrnuje degradaci jeho polysacharidového řetězce na monomery, které jsou využívány jinými tkáněmi. Hyaluronan je odváděn tkáňovým mokem a dostává se do krevního oběhu, odkud je vychytáván převážně parenchymatickou frakcí jaterních buněk. Endoteliální buňky degradují HA až na nízkomolekulární produkty. Vychytávání a degradace hyaluronanu jsou způsobeny schopností buněk vázat HA pomocí receptorů několika typů. Jsou to transmembránové receptory (CD44, RHAMM) a některé další (LYVE, ICAM, VCAM...). [1, 3, 4, 10]

Schopnost jaterních endoteliálních buněk endocytovat HA není čistě specifická pro HA vzhledem k tomu, že o stejný mechanismus soutěží také chondroitin a heparin. [1, 10]

Degradace hyaluronanu následně probíhá v lysosomech a je zprostředkována enzymaticky. Na tomto ději se podílejí jak enzymy specifické pro HA – hyaluronidasy, kterých je několik podtypů, tak enzymy podílející se i na jiných dějích – glukuronidasy, glykosidasy a některé další. [1, 3, 4, 10]

Degradační produkty tvořené po úplné degradaci se při analýze chovají jako laktáty a acetáty. Metabolismus HA je tedy v souladu s metabolismem acetylových skupin přes acetyl-CoA. [3]

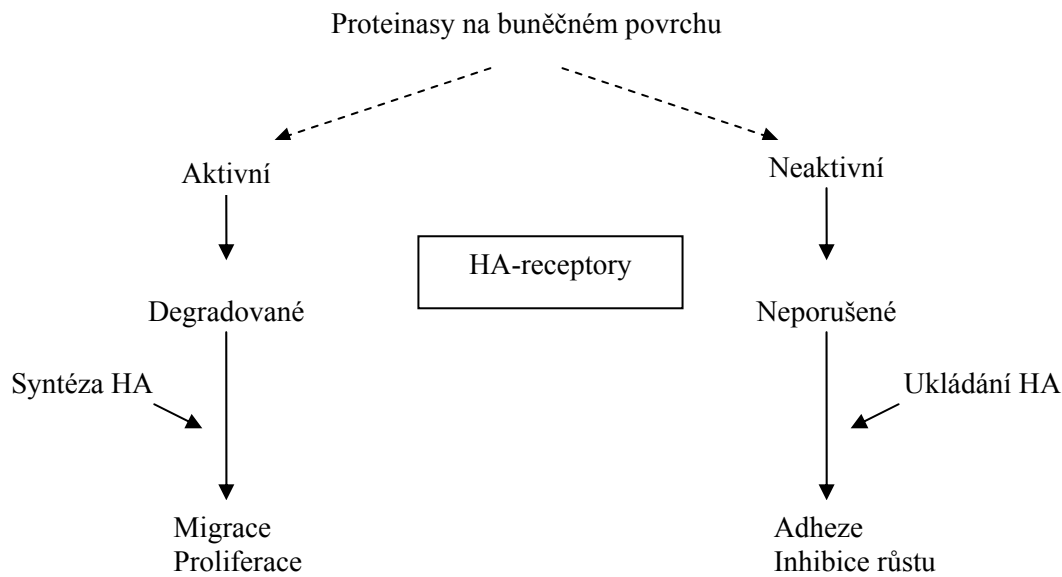
Exkrece hyaluronanu je převážně extrarenální a je limitována molekulovou hmotností molekuly. [3]

### **2.1.9 Funkce hyaluronanu**

Hyaluronanu je připisováno mnoho různých funkcí, které mohou být rozděleny na tři základní, a to buněčné, fyziologické a patologické. Většina funkcí je určena buď fyzikálními vlastnostmi nebo interakcemi s HA vazebnými proteiny. [1]

#### **2.1.9.1 Buněčné funkce**

Funkce hyaluronanu v buněčném chování se jeví protichůdně. Syntéza hyaluronanu zvyšuje buněčnou migraci a mitózu, naproti tomu hyaluronan podporuje adhezi, buněčné shlukování, ale inhibuje buněčnou proliferaci. Hyaluronan slouží jako adhezivní prvek, je-li držen receptorem CD44 na buněčném povrchu, a v případě uvolnění slouží hyaluronan jako odpudivý faktor. Buněčnou funkcí hyaluronanu by mohlo být zesílení funkce proteinasy na buněčném povrchu: když jsou proteinasy neaktivní, hyaluronan ukládáním a připojením k receptorům zesílí činnost faktorů buněčné adheze a inhibuje růst. Avšak jsou-li proteinasy aktivní, hyaluronan aktivací syntézy zesílí odpuzování buněk z prostředí, a tím zvýší migraci a proliferaci (**Obr. 9**). [1]



**Obr. 9:** Dvojitá biologická funkce hyaluronanu [1]

### 2.1.9.2 Fyziologické funkce

HA má v organismu mnoho fyziologických funkcí a ty se liší v závislosti na typu tkáně, ve které se uplatňují. HA slouží ve tkáni jako molekula vytvářející odpor vodě a tekutinám proudícím extracelulárním prostorem. Podílí se na udržení osmotického tlaku. Na základě své konformace stéricky vytlačuje některé molekuly z prostoru, který sama zaujímá, a v neposlední řadě se podílí na regulaci molekulárního transportu, kde působí jako jakési síto pro postupné propouštění molekul o různé molekulové hmotnosti. [2, 3]

Hyaluronan udržuje vodu, zachovává extracelulární prostor a zprostředkovává transport iontů a nutričních látek. Dále se podílí na zvlhčování *stratum corneum* (rohová vrstva) a udržování její flexibility. Je významnou součástí synoviální tekutiny. Koncentrace hyaluronanu v synoviální tekutině se pohybuje od 1,4 do 3,6 mg·ml<sup>-1</sup>. Molekulová hmotnost je proměnlivá, v normální synoviální tekutině se odhaduje na 7,0·10<sup>6</sup> Da, avšak v revmatické synoviální tekutině klesá na 3·10<sup>6</sup> – 5·10<sup>6</sup> Da. V kloubu udržuje správnou lubrikaci chrupavky, a tím jeho správnou funkci. HA také reguluje funkce granulocytů, ovlivňuje oxidativní poškození tkání, je endogenním stimulatorem produkce řady cytokinů, reguluje rychlost produkce endoteliálních buněk a fibroblastů. [2, 3]

HA se také podílí na hojení ran, kdy degradační produkty hyaluronanu (oligosacharidy) stimulují angiogenezi a vytváření nových cév. V neposlední řadě podporuje HA také tumorigenicitu, buněčnou proliferaci a migraci. [1, 3]

### **2.1.9.3 Patologické funkce**

Mimo zmíněné fyziologické funkce je HA přítomna také v řadě patologických dějů, jejichž průběh lze odhalit na základě změn její koncentrace v krvi nebo na základě přítomnosti jejích fragmentů a degradačních produktů. Mezi tyto patologické děje patří především revmatoidní artritida, fibróza nebo jiná onemocnění jater a některé další zánětlivé procesy v lidském organismu. Při patologických stavech nastává změna ve složení a velikosti molekuly HA. [3]

- **Synoviální tekutina**

HA obsažená v synoviální tekutině je schopna inhibovat migraci, chemotaxi, fagocytózu a adhezi leukocytů. Může také ovlivnit produkci řady mediátorů zánětlivých procesů obsažených v synoviální tekutině. [3, 4]

Strukturní změny HA, týkající se například délky jejího řetězce, mohou mít výrazný význam na funkce synoviální tekutiny, jako jsou absorpce nárazu, rozptýlení energie při traumatu a konzervace a lubrikace chrupavky. [3, 10]

Při revmatoidní artritidě jsou v krvi pacienta nacházeny komplexy vznikající vazbou malých molekul HA na protilátky typu IgG. Tyto malé molekuly vznikají díky degradaci velkých molekul volnými radikály produkovanými neutrofilními granulocyty a monocyty, které revmatický kloub infiltrují. Vysokomolekulární HA nutná pro lubrikaci kloubní chrupavky je produkována jen zdravými buňkami, zatímco kloubní tkáň infiltrovaná monocyty a neutrofilny produkuje pouze molekuly o malé molekulové hmotnosti. Degradace hyaluronanu pak vede k masivnímu uvolnění volných radikálů. Vychytávače radikálů (*scavengery*) chrání hyaluronan před degradací v synoviální tekutině, a zlepšují tak stav revmatického kloubu. [1, 2, 3]

- **Onemocnění jater**

HA je kromě osteoartrity také markerem poškození jater (cirhóza, fibróza včetně dalších poškození způsobených virovým onemocněním nebo působením xenogenních látek) a biliární atrezie (vrozené zúžení či nevyvinutí žlučových cest). Indikace je možná díky tomu, že za normálních podmínek je 90 % HA degradováno jaterními endoteliálními buňkami. Při jejich poškození se toto procento snižuje a dojde ke zvýšení plazmatické koncentrace hyaluronanu. Na základě statistik je potvrzeno, že plazmatické koncentrace HA korelují s plazmatickými koncentracemi bilirubinu. Plazmatická koncentrace HA v těchto případech vypovídá pouze o stavu jaterní fibrózy a nikoli o stavu jaterních funkcí. [3, 15]

- **Metastáze**

Kromě své role při patologii revmatoidní artritidy a poškození jater má HA velký vliv také při kancerogenním procesu. Většina zhoubných nádorů obsahuje zvýšenou hladinu hyaluronanu. Toto obohacení nádorů o hyaluronan může být způsobeno zvýšenou produkcí samotnými

nádory nebo indukci v okolních buňkách stromatu. Interakcí se specifickým receptorem CD44 indukuje HA buněčnou motilitu, facilitovanou invazi rakovinných buněk a angiogenezi. [3, 4]

### **2.1.10 Degradace hyaluronanu**

Hyaluronan, jakožto velká molekula, má sklon k mechanické degradaci ultrazvukem nebo k tepelné degradaci. Fyziologicky může být hyaluronan degradován volnými kyslíkovými radikály nebo enzymaticky prostřednictvím hyaluronidáz. [1, 16]

#### **2.1.10.1 Degradace volnými radikály**

Degradace volnými kyslíkovými radikály je většinou vedlejší reakcí aktivovaných neutrofilních granulocytů či monocytů při zánětu. Radikálová degradace hyaluronanu má za následek dramatický pokles viskozity a funkce synoviální tekutiny v kloubech. Zdravé tkáně a některé artritické tkáně neobsahují významné množství granulocytů a produkují vysokomolekulární hyaluronan. Naproti tomu artritické tkáně infiltrované granulocyty uvolňují hyaluronan o nízké molekulové hmotnosti. Degradace hyaluronanu je doprovázena masivní produkcí kyslíkových radikálů. [1, 3]

Vychytávače radikálů chrání hyaluronan před degradací v synoviální tkáni, zvláště chelátory železa blokují vytváření hydroxylových radikálů. Hydroxylové radikály degradují hyaluronan se 100% účinností. Při degradaci dochází ke štěpení HA a vznikají různé volné aldehydy a oligosacharidy. [1, 16]

#### **2.1.10.2 Enzymatická degradace**

Enzymy degradující převážně HA se obecně nazývají hyaluronidázy. Tento termín je poněkud nesprávný od doby, kdy byla zjištěna jejich schopnost štěpit také chondroitinsulfát a dermatansulfát. [1, 14, 16]

Hyaluronidázy se rozdělují na základě mechanismu jejich účinku do tří odlišných tříd, a to na hyaluronidázy obratlovců, bakteriální a endo- $\beta$ -glukuronidázy. [1, 14]

- *Bakteriální hyaluronidázy* – degradují hyaluronan a do jisté míry chondroitinsulfát a dermatansulfát. Jsou to endo- $\beta$ -N-acetylhexosaminidázy, které  $\beta$ -eliminací štěpí HA na disacharidy.
- *Endo- $\beta$ -glukuronidázy* – tyto enzymy nalezené v pijavicích, korýších a některých parazitech hydrolyticky štěpí  $\beta$ -1,3-glykosidickou vazbu a produkují tetrasacharidy a hexasacharidy.

- *Hyaluronidázy obratlovců* – jsou endo- $\beta$ -N-acetylhexosaminidázy, které hydrolyticky štěpí  $\beta$ -1,4-glykosidickou vazbu. Převládajícími produkty hydrolýzy jsou tetrasacharidy a hexasacharidy. Tyto enzymy mohou degradovat hyaluronan, chondroitinsulfát a v malé míře i dermatansulfát.

## 2.2 Aplikace hyaluronanu

Balazs klasifikoval základní oblasti klinických aplikací kyseliny hyaluronové a jejích derivátů následovně [2]:

- ochrana jemných tkání a zajištění potřebného prostoru při chirurgických operacích (angl. *viscosurgery*)
- vyplnění a zvětšení tkáňových prostorů v kůži, hlasivkových a hltanových tkáních (angl. *viscoaugmentation*)
- separace povrchů pojivových tkání traumatizovaných chirurgickými operacemi nebo zraněními z důvodu zabránění adheze a nadměrného tvoření jizev (angl. *viscoseparation*)
- nahrazení či doplnění tkáňové tekutiny, jako například výměna synoviální tekutiny u bolestivé artritidy, a zmírnění bolesti (angl. *viscosupplementation*)
- ochrana zdravých, zraněných či poškozených tkáňových povrchů před suchostí či před škodlivými činiteli z prostředí, a podpora hojení těchto povrchů (angl. *viscoprotection*)

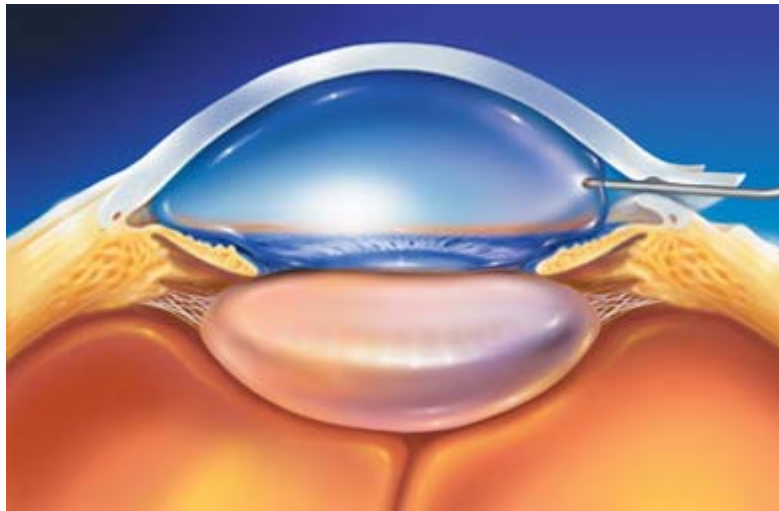
Díky svým unikátním vlastnostem našla HA již řadu uplatnění v nejrůznějších medicínských odvětvích: v revmatologii, oftalmologii, diabetologii, farmaceutické technologii a dalších oblastech, například při hojení ran. [1, 2, 3]

Její potenciál coby léčivé látky je veliký a možnosti dalšího využití při terapii chorob jsou stále předmětem zkoumání. [3]

### 2.2.1 Oftalmologie

V oftalmologii je HA považována za klíčovou makromolekulu, jelikož je hlavní složkou sklivce. Vzhledem k jejím viskoelastickým vlastnostem se využívá v řadě významných oftalmologických operacích. Přípravky z HA chrání jemné oční tkáně (adheruje k očním tkáním a poskytuje jim dostatečnou ochranu v průběhu operace) a zajišťují prostor během chirurgických zákroků. Produkty HA v gelové formě zabraňují vysychání rohovky během různých oftalmologických operací. HA se lokálně používá k léčbě syndromu suchého oka. Aplikace gelu HA se úspěšně využívá k přenosu léků v oftalmologii. Gel brání slzám před vymýváním léku a zajišťuje tak jeho uvolňování po dlouhou dobu. [1, 2, 3, 5, 16, 17]

Jejím hlavním využitím je nahrazení tekutiny sklivce, k jejíž ztrátě dochází při operacích zákalu a implantaci čočky. První produkt, který se objevil na trhu v roce 1979, se jmenoval *Healon* (Pfizer, New York) a připravoval se z kohoutích hřebínků. Brzy ho následovaly další produkty. V současné době je k dispozici několik přípravků obsahujících HA o různé molekulové hmotnosti v kombinaci s dalšími látkami (chondroitinsulfát), které lépe splňují požadavky pro použití v oftalmologii. Jejich úkolem je chránit oční tkáň, především rohovkový endotel, před nežádoucím poškozením operačními nástroji, a snižovat tak riziko možných pooperačních komplikací (**Obr. 10**). [1, 2, 17]



**Obr. 10:** Aplikace přípravku na bázi hyaluronanu zajišťující zvětšení přední komory oční a ochranu oční tkáň před poškozením operačními nástroji [18]

### 2.2.2 Ortopedická chirurgie a revmatologie

Druhou hlavní oblastí aplikace HA je ortopedická chirurgie a revmatologie. Normální zdravý kloub umožňuje téměř ideální a bezbolestný pohyb. Avšak klouby poškozené a zasažené artritidou se stávají ztuhými a bolestivými. Z více než stovky artritických poruch jsou osteoartritida a revmatoidní artritida nejběžnějšími chronickými stavy postihující nejvíce starší populaci. Zatímco osteoartritida je degenerativní choroba chrupavky a kostí, způsobující bolest a tuhost v zasaženém kloubu, revmatoidní artritida jako systémové zánětlivé onemocnění, u kterého je bolest kloubů často doprovázena degenerativními změnami v dalších orgánech (jako jsou plíce, srdce, krevní cévy). Odhaduje se, že více než 10 % všech lidí ve věku nad 55 let je postiženo osteoartritidou. [2, 17]

Ačkoliv jsou původ a příčiny revmatoidní artritidy doposud neznámé, může být při této nemoci pozorována postupná degradace polymerních sacharidů (především HA) v synoviální tekutině. V akutní fázi se hromadí v synoviální tekutině vysoké množství neutrofilních granulocytů. Tyto buňky mění oxidační homeostázi a jejich produkty, zejména reaktivní oxygenní sloučeniny, mohou přispívat k destrukci kloubní struktury. V důsledku chronického

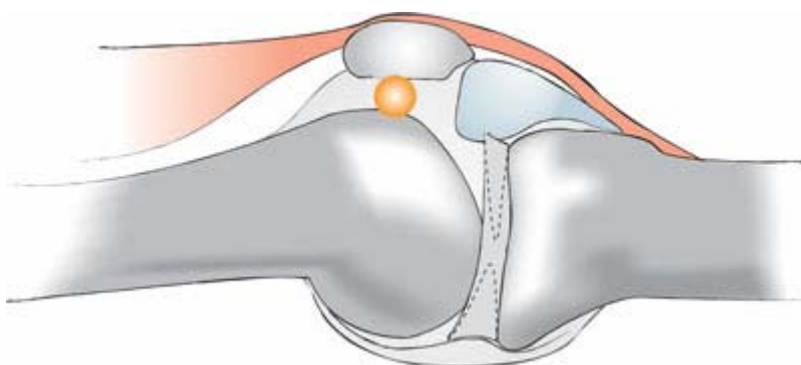


zánětu kloubu mění reaktivní oxygenní sloučeniny strukturu kloubu do takové míry, že není dále funkční. Pozměněné tkáně jsou rozpoznány jako cizí, autoimunitní reakce následně podporují chorobu a vytvářejí z revmatoidní artritidy systémové onemocnění ovlivňující celé tělo. [2]

Od konce 80. let 20. století je intraartikulární aplikace HA (angl. *viscosupplementation*) úspěšně používána u milionů osteoartritických pacientů (**Obr. 11**, **Obr. 12**). Molekulová hmotnost HA v synoviální tekutině u zdravého dospělého jedince se pohybuje v rozmezí 2 - 7 MDa. Hlavní komerční produkty *Healon* a *Synvisc* (Genzyme, Cambridge, Massachusetts) spadají do tohoto rozmezí, zatímco ostatní produkty jako *Artz* (Seikagaku, Tokyo, Japonsko) a *Hyalgan* (Fidia, Abano Terme, Itálie) obsahují HA o nízké molekulové hmotnosti (okolo 1 MDa). [1, 2, 3, 17]



**Obr. 11:** Intraartikulární aplikace HA do kolenního kloubu [19]



**Obr. 12:** Lokalizace intraartikulární injekce (kolenní kloub) [19]

Rozdíl v účinku HA o nízké a vysoké molekulové hmotnosti je zřejmý. Zdá se, že druhá jmenovaná HA je efektivnější při redukování projevů zánětu kloubu a při obnově viskozity synoviální tekutiny. Ne všechny studie však naznačují totéž a je těžké mezi nimi porovnávat. Mnoho lékařů hodnotí lépe HA o vysoké molekulové hmotnosti jako lépe snižující bolestivost osteoartritického kloubu. Přesný mechanismus účinku HA obou molekulových hmotností v kloubní štěrbině není bohužel dosud objasněn. HA je využitelná nejen jako viskoelastický činitel, ale také jako biologicky aktivní látka pro terapii osteoartrity. [2, 3, 17]

Greenberg a kolektiv navrhli čtyři mechanismy, kterými HA uplatňuje svůj terapeutický účinek [2]:

1. obnovení elastických a viskózních vlastností synoviální tekutiny
2. biosyntetický stimulační vliv exogenní HA na buňky – HA vpravená injekcí může indukovat endogenní syntézu hyaluronanu synoviálními buňkami, stimulovat proliferaci chondrocytů a inhibovat degradaci chrupavky
3. protizánětlivý účinek HA kdy terapie je spojena se sníženým počtem zánětlivých buněk v synoviální tekutině a s redukcí reaktivních oxygených sloučenin
4. pozorované analgetické účinky při podání HA

Zdá se, že odpověď postiženého kloubu na terapii HA je obdobná jako odpověď na terapii kortikosteroidy. Nevýhodou HA stále zůstává způsob aplikace pro účinnou léčbu. Intraartikulární injekce není přijatelným řešením pro všechny pacienty. Je však zřejmé, že celkové nežádoucí účinky vyvolané HA jsou a budou podstatně nižší než ty vyvolané podáváním kortikosteroidů. [2, 3, 17]

### 2.2.3 Otolaryngologie

Ačkoliv je HA v lidském těle prakticky všudypřítomná, nejvíce se vyskytuje ve specializovaných tkáních, jako jsou hlasivky, synoviální tekutina, pupeční šňůra a chrupavka. V těchto tkáních ovlivňuje několik různých funkcí zahrnujících viskozitu tkání, tkáňový tok, tkáňovou osmózu, tlumení nárazů, hojení ran a vyplňování prostoru. Tyto funkce jsou obzvláště důležité v hlasivkách v důsledku konstantního traumatu způsobeného vibračním účinkem fonace. [2]

Osmotické, viskoelastické a vyplňovací vlastnosti hyaluronanu jsou důležité pro hlas, protože přímo ovlivňují tloušťku a viskozitu hlasivek. Vyplnění a zvětšení tkáňových prostorů v hlasivkách (*viscoaugmentation*), zlepšení poraněných či zjizvených hlasivek a léčba paralýzy hlasivek jsou další možná využití HA derivátů. Nicméně hlavní stinnou stránkou pro užití HA jako bioimplantátu slizničního vaziva pro léčbu hlasivkových poruch je její krátká doba zadržení v hlasivkách – její poločas rozpadu v králičích hlasivkách je pouze 3-5 dní. Za účelem zvýšení doby zadržení se molekulová struktura HA modifikuje. Zesíťovaná HA vpichovaná do hlasivek produkuje nezánnětlivé reakce a materiál je přítomen ještě po roce. [2]

Při poruchách sluchu jsou používány k terapii filmy připravené z esterů HA. Tyto přípravky podporují hojení poraněného ušního bubínku a usnadňují reepitalizaci. [2, 16]

## **2.2.4 Dermatologie a plastická chirurgie**

Výhodné je použití HA v kosmetice a kosmetické chirurgii. Jako fyziologická komponenta tkání nemá velké nežádoucí účinky a shoda v chemickém složení HA produkované streptokoky s lidskou umožňuje její aplikaci bez předchozího testování bezpečnosti na zvířatech. [3, 20]

### **2.2.4.1 Kosmetika**

Používáním hyaluronanu a jeho derivátů je přínosem pro povrch pokožky v důsledku jeho hydratačních, antioxidačních a protizánětlivých účinků. Dále zpomaluje stárnutí pokožky, obnovuje epidermis a podporuje epidermální integritu. Všechny účinky závisí na molekulové hmotnosti a koncentraci hyaluronanu v konečném preparátu ošetřujícím pokožku. Čím vyšší molekulová hmotnost a vyšší koncentrace hyaluronanu, tím je přípravek efektivnější. Doporučuje se kombinace hyaluronanu o velmi nízké a velmi vysoké molekulové hmotnosti. Nízkomolekulární hyaluronan je schopen penetrovat rohovitou vrstvou kůže a vytvářet spojení mezi endogenním hyaluronanem v hlubších vrstvách epitelu a exogenním hyaluronanem pokrývajícím kůži. Toto spojení usnadňuje průchod vody a malých molekul z povrchu pokožky do podkožní intracelulární matrix a zpět. [21, 22]

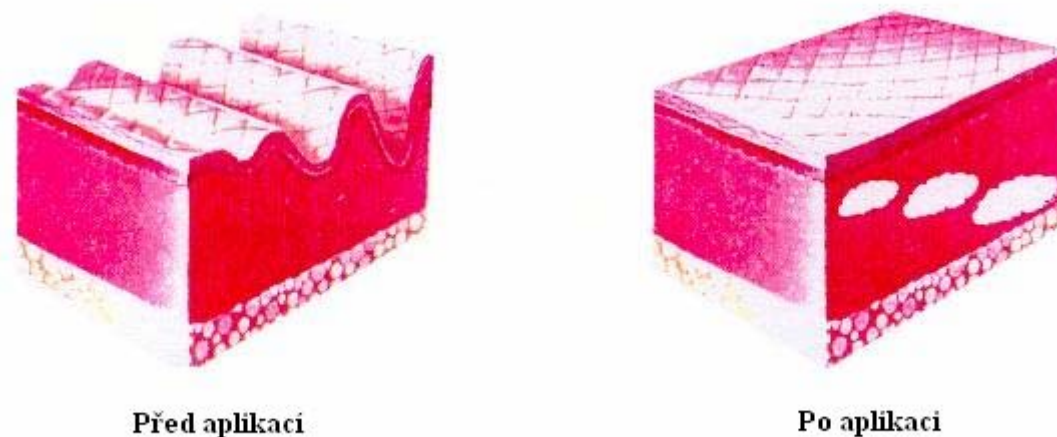
Oblasti použití přípravků s hyaluronanem [21, 23]:

- denní kosmetika
- noční a regenerační přípravky
- přípravky po opalování
- dekorativní kosmetika
- přípravky pro holení
- čisticí přípravky

### **2.2.4.2 Plastická chirurgie**

Přípravky s mírně zesíťovanou HA jsou v současné době obvykle používány ke zvětšení rtů a k vyplnění obličejových vrásek, jizev po akné a hlubších jizev (*Příloha I*). HA se aplikuje jako dermální injekce jen s použitím anestetického gelu aplikovaného před zákrokem. HA gely jsou oproti produktům na bázi kolagenu účinnější v udržování kosmetických úprav. Narozdíl od aplikace kolagenových produktů je HA extrémně elastická. U kolagenových prostředků se dále vyskytují malé (ale skutečné) problémy a alergie je jednou z nejvýznamnějších komplikací. [2, 3, 20]

HA svým objemem a tím, že na sebe váže vodu v kůži, vyrovnává stávající nerovnosti a vyhlazuje vrásky (**Obr. 13**). Postupem času se v kůži pomalu odbourává a její aplikaci je proto nutno opakovat. Doba, po kterou účinek trvá, je individuální a pohybuje se od 6 do 14 měsíců. Oproti ostatním produktům mají přípravky obsahující HA delší dobu účinku. [2, 20]



**Obr. 13:** Využití přípravků obsahujících HA k vyhlazení vrásek [24]

Při porovnání použitelnosti dvou komerčních produktů používaných pro vyplnění jemných tkání – *Restylane* (Medicis Corp., Scottsdale, Arizona) produkovaný činností bakterií a *Hylaform* (Genzyme, Cambridge, Massachusetts) z kohoutích hřebínků – vyšlo najevo, že *Hylaform* má lepší reologické vlastnosti a chová se jako silný hydrogel, kdežto *Restylane* působí jako slabý hydrogel. Komerční benzylester derivát HA a laboratorně zesíťovaný hyaluronan představují excelentní biomateriály, podporující adhezi vaskulárních endoteliálních buněk a využití pro vaskulární tkáňové inženýrství. [2]

## 2.2.5 Hojení ran a léčba popálenin

Přípravky obsahující vysokomolekulární HA aplikované lokálně podporují hojení čerstvých ran. Také podporují hojení bércových vředů a jsou účinné při léčbě chronických zranění. HA má při hojení ran různého původu řadu účinků, a to při všech fázích hojení rány: zánětu, formaci granulační tkáně a reepitalizaci. [2, 25]

### 2.2.5.1 Hojení ran

Role hyaluronanu v hojení ran je v současné době již dobře známa a byla prokázána klinickou studií provedenou v České republice prof. Sobotkou, který působí na Klinice gerontologické a metabolické ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové, s přípravkem *Hyiodine* (Contipro, Dolní Dobrouč, Česká republika). [3]

Přípravek *Hyiodine* je komplex hyaluronanu s jódem a jodidem draselným. Vysokomolekulární hyaluronan zajišťuje dobrou hydrataci podkoží. Dlouhé řetězce kyseliny hyaluronové jsou rovněž potřebné ke správnému očišťování tkání od infekce a odumřelých buněk pomocí bílých krvinek. Hyaluronan má navíc značnou schopnost vázat vodu a schopnost stimulovat novotvorbu cév a tkáně potřebné pro hojení (tzv. granulační tkáň). [25, 26]

Hyaluronan, který se vyskytuje v preparátu *Hyiodine*, je vyroben biotechnologií za použití speciálních kmenů bakterií a je naprosto čistý. Geneticky je shodný s hyaluronanem, který se vyskytuje v lidských tkáních a orgánech. Ani přes vysoké dávky *Hyiodinu* a dlouhou dobu používání nebyly pozorovány nežádoucí účinky, známky přecitlivělosti ani funkční změny štítné žlázy. [25, 26]

Komplex jódu, jodidu draselného a kyseliny hyaluronové zajišťuje ochranu kyseliny hyaluronové před bakteriálním poškozením (kyselina hyaluronová je velmi snadno štěpena a využívána bakteriemi). Současně má však i dezinfekční účinky v místě aplikace, a tím udržuje molekulu kyseliny hyaluronové v místě poškození. Značná hydrofilnost (schopnost vázat vodu) hyaluronanu vede k tomu, že tekutina z defektu převázaného preparátem *Hyiodine* je aktivně odsávána do obvazu. [25, 26, 27]

Vysoká afinita hyaluronanu k vodě zabezpečí, že povrch rány bude trvale vlhký a voda, která bude k povrchu rány přitahována z tkání pod ránou nebo z jejího okolí, bude směrem k místu hojení dopravovat i různé regulační faktory a další produkty buněk ležících v okolí, které zajistí její přirozené hojení. Vysokomolekulární hyaluronan je díky mikrořetězkám a dalším imunitním buňkám v místě rány štěpen na různé nízkomolekulární polysacharidy a oligosacharidy, které podporují novotvorbu krevních kapilár. Z těchto důvodů se přípravek *Hyiodine* velmi dobře uplatňuje při léčbě velkých a hlubokých ran, diabetických defektů i ulcerací při žilní nedostatečnosti (bércových vředů). [25, 26, 27]

### **2.2.5.2 Léčba popálenin**

Kůže je orgán nejvíce vystavený škodlivým vlivům prostředí a první orgán, který bývá rozsáhle poškozen zářením, horkem nebo chladem. Následkem větší ztráty kůže (např. rozsáhlejší popáleniny) je vždy ztráta tekutin a plazmy, metabolická dysbalance, bolest, infekce a potenciálně i pacients. Nezbytnou součástí moderní strategie léčby popálenin je co nejrychlejší uzavření defektu co nejlepším kožním náhradou. [28]

Stále se jako nejlepší kožní kryt jeví vlastní pacientův dermo-epidermální transplantát (tzv. autologní štěp, autotransplantát). Je to kryt trvalý, kosmeticky přijatelný, tělu vlastní a v neposlední řadě snadno dostupný. V případech, kdy je postižena většina kožního povrchu pacienta (i více než 90%), musí být ranné plochy kryty jinými např. biologickými, či biosyntetickými a syntetickými kryty. Ty mohou být dočasné nebo i trvalé. [28]

## Biologické kryty [28]

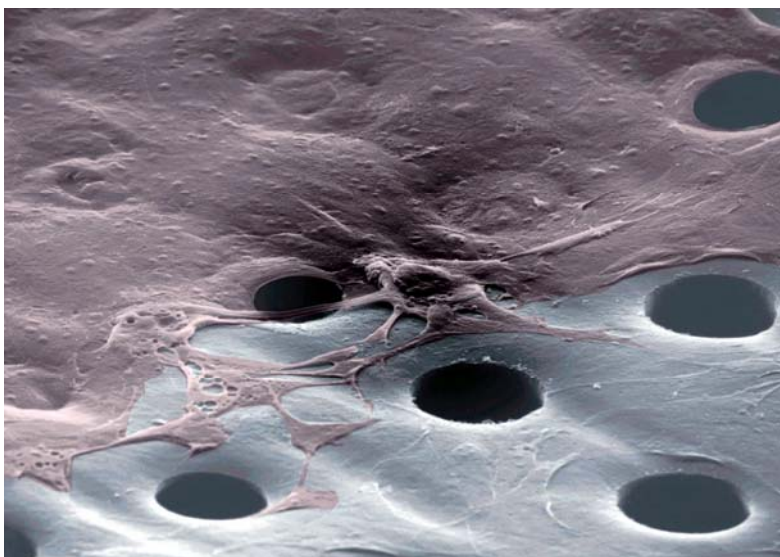
- *Alogenní štěpy* (alotransplantáty) - jsou kožní štěpy odebrané z živých dárců nebo mrtvých těl. Užívají se již přes 40 let a patří mezi nejběžnější dočasné kožní náhrady.
- *Xenogenní štěpy* (xenotransplantáty) - jsou kožní štěpy odebrané ze zvířat. Nejčastěji se používají kůže prasečí díky vysoké histologické podobnosti s kůží lidskou.
- *Amniové blány* - jsou získávány z placenty po porodu a ke krytí popálených ploch se užívají již několik desetiletí.

## Kryty biosyntetické a syntetické

Rychlý rozvoj biochemie, biologie, medicíny a bioinženýrství sebou v posledních desetiletích přináší nové možnosti krytí kožních defektů. Kůže je složitý komplexní orgán a dosud se ji jako plnohodnotný celek nepodařilo *in vitro* "vypěstovat" či "vyrobit", zatím se úspěšně daří kultivovat její nejdůležitější buněčné součásti - keratinocyty a fibroblasty a rovněž se klinicky zkoušejí různé kožní kompozitní náhrady na bázi kolagenu nebo syntetických polymerů v přítomnosti nebo v nepřítomnosti fibroblastů. [28]

V poslední době se v oblasti biosyntetických krytů pracuje také s kyselinou hyaluronovou. Z kyseliny hyaluronové se nejprve vytvoří trojrozměrná houbovitá síť, která slouží k přípravě dermálních struktur. V laboratoři je síť osázena fibroblasty pacienta, které začnou po uchycení produkovat kolagen i jiné složky extracelulární matrix. Využití je zejména u hlubokých defektů, do nichž jsou tyto náhradní struktury vkládány. Tělo postupně odbourává síť kyseliny hyaluronové a fibroblasty vytváří novou síť kolagenu. [29]

Dále je možné z trojrozměrné sítě vytvořit i tenkou fólii s mikrootvory vypálenými laserem (LASERSKIN). Po určité době se v laboratoři na LASERSKIN nakultivuje porost keratinocytů daného pacienta, štěp se přiloží na defekt, který je postupně uzavřen keratinocyty prorůstajícími z mikrootvorů. (Obr. 14) [29]



**Obr. 14:** Keratinocyty nakultivované na LASERSKIN  
- snímek z elektronového mikroskopu [30]

### 2.2.6 Přenos léků

Modifikovaná HA má uplatnění v přenosu léčiv. Dnes jsou využívány dvě hlavní metody modifikace HA: derivatizace a zesíťování. Oba postupy chemicky pozměňují jednu nebo více reaktivních skupin ze tří možných (hydroxylová, acetamidová a karboxylová skupina) se zachováním biologické aktivity a biokompatibility HA. Deriváty HA umožňují vytvoření vazby s daným léčivem. [5]

Deriváty hyaluronanu (hyanly) byly vyvinuty jako prostředky pro kontrolovaný a lokalizovaný přenos biologicky aktivních molekul. Hyanly zahrnují hyanlové tekutiny, gely, mikročástice a membrány. Hyanlová tekutina je ve vodě rozpustný, hydrofilní, polyanionický derivát hyaluronanu, který uchovává excelentní biokompatibilitu nativního glykosaminoglykanu. Hyanlové deriváty byly zkoumány pro schopnost optimalizovat přenos různých farmakologických aktivních molekul zahrnujících širokospektré antibiotikum gentamicin, lék proti zelenému zákalu pilocarpine a mnoho dalších. [5, 20, 31]

Jednou z nejvýznamnějších snah o využití HA je vytvoření derivátu pro tvorbu mikrokapslí ke zvýšení biologické dostupnosti některých léčiv. Vlastnosti těchto derivátů HA vylepšují její biokompatibilitu. Lipofilní vlastnosti usnadňují průnik biologickými membránami a zvyšují schopnost její biodegradace. [2, 3]

### 3. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo shrnutí dostupných informací týkajících se vlastností hyaluronanu a možností jeho využití především v kosmetice a v lékařství.

Jako takzvaný „inertní“ biomateriál hraje hyaluronová kyselina významnou roli ve vodní homeostázi tkání, regulaci permeability jiných látek, lubrikaci kloubů. Jako „aktivní“ glykosaminoglykan se hyaluronová kyselina specificky váže na proteiny v ECM a na povrchu buněk. Interakce protein-ligand jsou důležité pro stabilizaci chrupavkové matrix, v buněčné pohyblivosti, v buněčné proliferaci, v morfogenezi a embryonálním vývoji, při rakovině a při zánětech.

Ačkoliv má hyaluronan velmi jednoduchou strukturu, téměř vše ostatní týkající se této molekuly je neobvyklé. Někdy je její role mechanická a strukturní (v synoviální tekutině, ve sklivci nebo v pupeční šňůře), zatímco někdy ovlivňuje v malých koncentracích spouštění důležitých reakcí v buňce. Hyaluronan má zvláštní mechanismus biosyntézy a výjimečné fyzikální vlastnosti, z toho důvodu byly výzkumy obtížné. Pokrok byl zdržován nezdary – často protože nebylo možné použít již zavedené postupy z jiných oblastí, ale bylo potřeba vyvinout nové technologie.

Díky rozsáhlému množství fyziologických funkcí a vlastností našla HA řadu uplatnění v medicíně a kosmetice. V klinické medicíně se hyaluronová kyselina používá jako diagnostický ukazatel/marker mnoha nemocí včetně rakoviny, revmatické artritidy a patologie jater, jakož i doplnění poškozené synoviální tekutiny prostřednictvím intraartikulární injekce u artritických pacientů (léčba osteoartritidy). Je také využívána během oftalmologických a otologických operacích, k regeneraci a rekonstrukci měkkých tkání, hojení ran, jako nosič léků, v kosmetice jako hydratační látka.

Využití hyaluronové kyseliny se jeví velmi nadějně v rozvoji tkáňového inženýrství a biomateriálů pro různé biomedicínské potřeby zahrnující ortopedické, kardiovaskulární, farmakologické a onkologické aplikace.

U chorob, jako je zmíněná revmatoidní artritida, může její širší nasazení vést ke snížení celkových nežádoucích účinků a zlepšení kvality života pacienta. Stejně tak může hrát velkou roli při terapii nevyléčitelných onemocnění, jako jsou určité formy rakoviny, kde je již vliv její funkce zkoumán.

Dále jsou studovány možnosti jejího využití jakožto farmaceutického poloproduktu pro tvorbu nových derivátů s vlastnostmi nosičů terapeutických látek.

HA je jistě velmi zajímavou molekulou, která si zaslouží velkou pozornost odborné společnosti. Může být přínosem pro terapii řady chorob, v jejichž indikacích se doposud nevyužívá.



Shromážděné a zde uvedené informace jsou výsledkem několikaleté vědecké činnosti různých pracovišť zabývajících se výzkumem této látky. I přesto je celá řada otázek o HA dosud nezodpovězena. Zajímavé budou zejména odpovědi na funkci a úlohu HA a jejích degradačních produktů při tumorogenezi a metastatické aktivitě nádorových buněk. Zcela objasněn není také vliv molekulové hmotnosti HA při různých fyziologických i patologických procesech.

#### 4. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Steinbüchel, A., Vandamme, E. J., Baets, S. De: *Biopolymers: Polysaccharides I, Polysaccharides from Prokaryotes*. Vol. 5, Wiley-VCH, 2002. 532 p. ISBN 3-527-30226-3
- [2] Kogan, G., Šoltés, S., Stern, R., Gemeiner, P.: Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*, 2007, vol. 29, no. 1, pp. 17-25. ISSN 0141-5492
- [3] Svanovský, E.: Fyziologie a farmakologie kyseliny hyaluronové. *Česká a Slovenská farmacie*, 2007, roč. 56, č. 6., s. 264-268. ISSN 1210-7816
- [4] Almond, A.: Hyaluronan. *Cellular and Molecular Life Science*, 2007, vol. 64, no. 13, pp. 1591-1596. ISSN 1420-682X
- [5] Vercruyse, K. P., Prestwich, G. D.: Hyaluronate Derivatives in Drug Delivery. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1998, pp. 513-555. ISSN 0743-4863
- [6] Hascall, V. C., Laurent T. C.: *Hyaluronan: Structure and Physical Properties*. [HTML dokument]. Dec. 15, 1997, Glycoforum. [citováno 10.2.2008]. Dostupný z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [7] Scott, J. E.: *Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solution. Some Biological Consequences*. [HTML dokument]. Mar. 15, 1998, Glycoforum. [citováno 10.2.2008]. Dostupný z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>
- [8] *Streptococcus zooepidemicus – pouzdro obsahující HA* [online]. Obrázek, [citováno 28.3.2008]. Dostupné z: [http://www.cheque.uq.edu.au/research/bioengineering/research/Metabolic\\_Engineering/HA.html](http://www.cheque.uq.edu.au/research/bioengineering/research/Metabolic_Engineering/HA.html)
- [9] *Výskyt hyaluronanu v lidském těle* [online]. Obrázek, [citováno 28.3.2008]. Dostupné z: <http://www.biotechnologia.pl/kosmetologia/37/824>
- [10] Fraser, J. R. E., Laurent, T. C., Laurent, U. B. G.: Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine*, 1997, vol. 242, no. 1, pp. 27-33. ISSN 0954-6820
- [11] Weigel, P. H.: *Bacterial Hyaluronan Synthases*. [HTML dokument]. Sep. 15, 1998, Glycoforum, [citováno 10.2.2008]. Dostupný z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA06/HA06E.html>
- [12] Spicer, A. P., McDonald, J. A.: *Eukaryotic Hyaluronan Synthases*. [HTML dokument]. Sep. 15, 1998, Glycoforum, [citováno 10.2.2008]. Dostupný z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA07/HA07E.html>
- [13] Laurent, T., Laurent, U. BG., Fraser, J. R.: The structure and function of hyaluronan: An overview. *Imunology and Cell Biology*, 1996, vol. 74, no. 2, pp. A1-7. ISSN 0818-9641
- [14] Stern, R., Csóka, A. B.: *Mammalian Hyaluronidases*. [HTML dokument]. June 30, 2000, Glycoforum, [citováno 15.3.2008]. Dostupný z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA15/HA15E.html>
- [15] Vokurka, M., Hugo, J. a kol.: *Velký lékařský slovník*. 5. vyd. Praha: Maxdorf, 2005. 1001 s. ISBN 80-7345-058-5

- [16] Lapčík, L. Jr., Lapčík, L., De Smedt, S., Demeester, J. Chabraček, P.: Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications. *Chemical Reviews*, 1998, vol. 98, no. 8, pp. 2663-2681. ISSN 0009-2665
- [17] Asari, A., Miyauchi, S.: *Medical Applications of Hyaluronan*. [HTML dokument]. Mar. 7, 2000, Glycoforum, [citováno 10.2.2008]. Dostupný z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA13/HA13E.html>
- [18] *Aplikace přípravku na bázi hyaluronanu zajišťující zvětšení přední komory oční a ochranu oční tkáně před poškozením operačními nástroji* [online]. Obrázek, [citováno 28.3.2008]. Dostupné z: [http://www.healon.com/healon\\_gv/healon\\_gv.html](http://www.healon.com/healon_gv/healon_gv.html)
- [19] *Intraartikulární aplikace HA do kolenního kloubu* [online]. [citováno 30.3.2008]. Dostupné z: [http://www.durolane.org.uk/healthcare\\_professional\\_information/treatment/clinical\\_procedure](http://www.durolane.org.uk/healthcare_professional_information/treatment/clinical_procedure)
- [20] Price, R. D., Berry, MG, Navsaria, H. A.: Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 2007, Vol. 60, Iss. 10, pp. 1110-1119. ISSN 1748-6815
- [21] Kennedy, J. F., Philips, G. O., Williams, P. A.: *Hyaluronan. Biomedical, Medical and Clinical Aspects*. Vol. 2. Woodhead Publishing, 2002. 552 pp. ISBN 1-85573-570-9
- [22] Barel, A. O., Paye, M., Maibach, H. I.: *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. Marcel Dekker, Inc. 2001. 358 pp. ISBN 0-8247-0292-1
- [23] Internetové stránky firmy CPN s. r. o. [citováno 28.3.2008] Dostupné z: <http://www.hyaluronan.cz/cz/produkty/suroviny-pro-kosmetiku/>
- [24] *Využití přípravků obsahujících HA k vyhlazení vrásek* [online]. Obrázek, [citováno 30.3.2008]. Dostupné z: <http://www.foldyna.com/hyl.htm>
- [25] Sobotka, L., Velebný, V.: *Hyiodine, nový přípravek pro ošetřování kožních defektů*. [HTML dokument]. 17.12.2004. [citováno 27.3.2008]. Dostupné z: [http://www.hyiodine.cz/pdf/cone69\\_hy1.pdf](http://www.hyiodine.cz/pdf/cone69_hy1.pdf)
- [26] Sobotka, L.: *Využití preparátu Hyidoine při léčbě diabetických defektů – 2. část*. [HTML dokument]. 17.12.2004. [citováno 27.3.2008]. Dostupné z: [http://www.hyiodine.cz/pdf/cone61\\_hy1.pdf](http://www.hyiodine.cz/pdf/cone61_hy1.pdf)
- [27] Sobotka, L., Velebný, V., Mahelová, A., Kusalová, M.: *Komplex hyaluronanu a jodu – Hyiodine – nová metoda při terapii diabetických defektů*. [HTML dokument]. 29.05.2006. [citováno 27.3.2008]. Dostupné z: [http://www.hyiodine.cz/pdf/cone67\\_hy1.pdf](http://www.hyiodine.cz/pdf/cone67_hy1.pdf)
- [28] Brychta, P., Franců, M. a kolektiv autorů: *Vybrané kapitoly z plastické chirurgie a popáleninové medicíny*. [HTML dokument]. [citováno 29.3.2008]. Dostupné z: <http://www.med.muni.cz/Traumatologie/Popaleniny/Popaleniny.htm>
- [29] Dvořánková, B.: *Kožní banka – pracoviště „šité na kůži“...* [HTML dokument]. [citováno 29.3.2008]. Dostupné z: <http://www.anamneza.cz/moduly/clanek.php3?id=62&sekce=3>
- [30] *Keratinocyty nakultivované na LASERSKIN* [online]. Obrázek, [citováno 30.3.2008]. Dostupné z: <http://ec.europa.eu/research/press/2000/pr2703en-an.html>
- [31] Larsen, N. E., Balazs, E. A.: Drug delivery systems using hyaluronan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1991, vol. 7, no. 2, pp. 279-293. ISSN 0169-409X

- [32] *Využití přípravků s HA ke zvětšení rtů a k výplni obličejových vrásek – hlavní místa injekční aplikace* [online]. Obrázek, [citováno 30.3.2008]. Dostupné z: <http://www.plastika-ul.cz/img/provadime/matridex2.jpg>

## 5. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

HA	.....	hyaluronová kyselina, hyaluronan
Da	.....	Dalton (jednotka molekulové hmotnosti, 1/12 atomové hmotnosti uhlíku <sup>12</sup> C, 1 Da = 1,66.10 <sup>-27</sup> kg)
ECM	.....	extracelulární matrix
CD44	.....	<i>clusters of differentiation 44</i> (specifický receptor)
RHAMM	.....	<i>receptor for hyaluronan-mediated motility</i> (specifický receptor)
LYVE-1	.....	<i>lymphatic vessel endothelial receptor 1</i> (specifický receptor)
ICAM-1	.....	<i>intercellular adhesion molecule 1</i> (specifický receptor)
VCAM-1	.....	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i> (specifický receptor)

## 6. PŘÍLOHA

*Příloha 1: Využití přípravků s HA ke zvětšení rtů a k výplni obličejových vrásek – hlavní místa injekční aplikace [32]*

