

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chemie



Hyaluronová kyselina

Bakalářská práce

Autor práce: Veronika Andrllová

Vedoucí práce: Ing. Matyáš Orsák, Ph.D.

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Hyaluronová kyselina" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 15.4.2015

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Matyáši Orsákovi, Ph.D. za jeho ochotu, cenné rady, připomínky a čas, který mé práci věnoval.

Hyaluronová kyselina

Souhrn

Práce se zabývá hyaluronovou kyselinou, která je pro své specifické a výjimečné vlastnosti využívána v medicíně i v kosmetickém průmyslu už 80 let. Prezentuje její výskyt, chemickou strukturu a využití v praxi.

Hyaluronová kyselina je lineární polysacharid, skládá se z opakujících se jednotek disacharidu tvořeného N-acetyl-D-glukosaminem a D-glukuronovou kyselinou. Dospělé lidské tělo obsahuje až 15 g této kyseliny, která je každý den obnovována a po rozštěpení se hyaluronová kyselina transportuje lymfatickým systémem do krve, dále pak degradovaný hyaluronan je vyloučen játry do ledvin a následně a pryč z těla.

Díky své unikátním viskoelastickým vlastnostem a své vysoké molekulové hmotnosti se hyaluronová kyselina využívá v kosmetologii, oftalmologii, revmatologii, otolaryngologii, dermatologii, plastické chirurgii a při hojení ran.

Popsán je zde i chondroitin sulfát, který se řadí mezi glukosaminglykany, nachází se v chrupavkách a dále v pojivových tkáních. Používá se například při léčbě revmatoidních onemocnění. Průmyslově se získává extrakcí z hovězích a vepřových chrupavek.

Praktická část této práce se věnuje stanovení hyaluronové kyseliny vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC). Stanovovaly se standardy nasycených a nenasycených oligomerů hyaluronové kyseliny (dimer-dekamer) a dále také hyaluronan štěpený enzymaticky hydrolasou a lyasou na oligomery. Povedlo se připravit ze standardů, kalibrační roztoky, ty byly proměřeny HPLC metodou a byly vytvořeny chromatogramy jednotlivých oligomerů. Standardy poskytnuté firmou Contipro Pharma a.s. hyaluronanu štěpené hydrolasou a lyasou, byly úspěšné, ale enzymaticky štěpené reálné (nativní) vzorky prasečích oocytů, se nepodařilo stanovit, pro jejich vysoký podíl nežádoucích složek.

Klíčová slova: chondroitin-sulfát, kolagen, vazivo, polysacharid

Hyaluronan acid

Summary

Bachelor thesis deals with hyaluronic acid which is used in medicine and in the cosmetics for its specific and unique properties for over 80 years. The work presents its occurrence, chemical structure and its use in practice.

Hyaluronic acid is a linear polysaccharide and it consists of repeating units of disaccharide consisting of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucuronic acid. The adult human body contains up to 15 g of this acid which is renewed every day, and after digestion hyaluronic acid is transported by the lymphatic system to the blood and then degraded hyaluronan is eliminated in the kidneys and liver and consequently away from the body.

Due to its unique viscoelastic properties and its high molecular weight, hyaluronic acid is used in cosmetology, ophthalmology, rheumatology, otolaryngology, dermatology, plastic surgery and wound healing.

The work also describes chondroitin sulfate which belongs to the glycosaminoglycans and it is located in cartilages and connective tissues. In the medicine CS is used for example in the treatment of rheumatic diseases. It is industrially obtained by extraction from beef and pork cartilage.

The practical part of this thesis deals with the determination of hyaluronic acid by high performance liquid chromatography (HPLC). There are determined standards of saturated and unsaturated oligomers of hyaluronic acid (dimer-decamer) and also cleaved hyaluronate lyase enzyme and a hydrolase in oligomers. I managed to prepare calibration solutions from the standards. Solutions were measured by HPLC method and chromatograms of individual oligomers were created. Company Contipro Pharma a.s. has provided standards which were cleaved by hydrolase and lyase and they were successful. On the other side I did not determine native samples of porcine oocytes, which were enzymatically cleaved, because they contained a high proportion of undesirable components.

Keywords: chondroitin sulfate, collagen, ligament, polysaccharide

Obsah

1 Úvod	1
2 Cíl práce	2
3 Historie hyaaronové kyseliny	2
3.1.1 Současný stav hyaluronové kyseliny	3
3.1.2 Výskyt hyaluronanu	3
3.2 Vlastnosti hyaluronové kyseliny	5
3.2.1 Roztok hyaluronanu	5
3.2.2 Chemická struktura	6
3.2.3 Struktura polymeru	6
3.3 Syntéza hyaluronové kyseliny	7
3.4 Regulace syntézy hyaluronové kyseliny	8
3.4.1 Stimulace syntézy	8
3.4.2 Inhibitory HA	8
3.5 Vlastnosti receptorů	9
3.5.1 CD44	9
3.5.2 RHAMM	9
3.5.3 TLR-4	10
3.5.4 Layilin	10
3.5.5 HARE a LYVE-1	10
3.6 Degradace hyaluronanu	10
3.6.1 Štěpení volnými radikály	10
3.6.2 Biotransformace	11
3.7 Separace a čištění hyaluronanu od oligosacharidů	12
3.7.1 Kapalinová chromatografie (HPLC)	12
3.8 Hyaluronan	13
3.8.1 Buněčné funkce	14
3.8.2 Fyziologické funkce	14
3.8.3 Patologické funkce	14
3.9 Chondroitin sulfát	15
3.9.1 Chemické a fyzikální vlastnosti	15
3.9.2 Fyziologická úloha chondroitinu sulfátu	16
3.9.3 Mechanismus	16
3.10 Využití hyaluronové kyseliny v medicíně	17
3.10.1 Dermatologie	17
3.10.2 Kosmetika	17
3.10.3 Plastická a estetická chirurgie	18

3.10.4	Otolaryngologie	19
3.11	Revmatologie	19
3.11.1	Zánětlivé onemocnění	20
3.11.2	Degenerativní onemocnění	21
3.11.3	Oftalmologie	21
3.12	Léčba akutních zranění a chronických ran	22
3.12.1	Chronické rány.....	23
3.12.2	Hyodine.....	24
4	Metodika	25
4.1	Použitý materiál	25
4.2	Použitá metoda	25
4.3	Měření kalibrací.....	26
5	Výsledky	26
5.1	Kalibrace	26
5.2	Měření štěpení hyaluronanu	26
5.3	Měření reálných (nativních) vzorků.....	27
6	Diskuze	30
7	Závěr.....	32
8	Seznam použité literatury	33
9	Seznam použitých zkratk.....	38
10	Seznam obrázků	39
11	Seznam tabulek.....	40
12	Seznam příloh	41

1 Úvod

Hyaluronovou kyselinu (HA) poprvé izolovali Karl Meyer s kolegou Johnem Palmerem roku 1934 jako neznámou chemickou substancí ze sklivce kravského oka. Zjistili, že se tato sloučenina skládá ze dvou cukerných molekul, z nichž jedna byla uronová kyselina. Pro zjednodušení poté navrhli název hyaluronová kyselina, kde je první část názvu odvozena od řeckého slova „hyalos“, které znamená sklo.

V té to práci je popsána hyaluronová kyselina, veškeré její využití a především její vzácné vlastnosti. Hyaluronan je polysacharid a nachází se jako základní složka v extracelulárním matrixu (EMC) všech obratlovců. Produkují ho bakterie dále také viry a houby. Hyaluronová kyselina je přirozenou součástí lidského těla, přičemž je stále obnovována. Tento lineární přírodní polysacharid se skládá opakujících se jednotek disacharidů a proto má mnoho výjimečných funkcí, které využíváme hlavně v lékařství tak v dalších mnoha oborech.

Najdeme ho například v strukturách mezibuněčných hmot chrupavek, zde udržuje hydrataci, je velmi důležitá jako substrát sloužící pro navázání proteoglykanů, pro pohyb buněk a reguluje buněčné funkce. Nový vývoj se zaměřuje na využití té to kyseliny ve výzkumu nádorové progresy, k léčbě různých zánětů a hojení ran. Její fyzikální vlastnosti a biologická kompatibilita je také důležitá v rozvoji tkáňového inženýrství, biomateriálů a klinických aplikací.

Dále je zde zmíněn chondroitin sulfát, který je řazený mezi glykosaminoglykany. Jeho hlavní vlastností je, že má silný záporný náboj a tím pomáhá osmoticky zadržovat vodu, čímž dává chrupavkám pružnost. Kromě chrupavek tuto látku najdeme v ostatních pojivových tkáních. Využívá se při léčbě osteoartrózy. Průmyslově se získává extrakcí hovězí či vepřové chrupavky.

2 Cíl práce

- 1) Zjistit literární podklady o struktuře, výskytu a využití hyaluronové kyseliny
- 2) Seznámit se s HPLC analýzou hyaluronové kyseliny a provést analýzu vzorků
- 3) Zjistit možnosti stanovení štěpů hyaluronové kyseliny

3 Historie hyaluronové kyseliny

Hyaluronová kyselina je poměrně jednoduchý neesterifikovaný glykasaminoglykan, je skládán ze základních disacharidových jednotek tvořených D-glukuronovou kyselinou a N-acetyl-D-glukosaminem vzájemně spojených střídající se β -1,3 a β -1,4 glykosidickou vazbou (Koolman a Klaus-Heinrich, 2012).

Hyaluronová kyselina byla poprvé objevena roku 1934 a byla publikována v článku dvojicí Karl Meyer a John Palmer. Byla izolována z očního sklivce jako polysacharid obsahující D-glukuronovou kyselinu a D-N-acetylglukosoamin. Pro zjednodušení poté navrhli název hyaluronová kyselina (angl. Hyaluronic acid), jako spojení slov hyaloid (sklovitý) a uronic acid (uronová kyselina) (Garg a Hales, 2004).

Hyaluronan byl z počátku izolován z mnoha zdrojů tkání, včetně synoviální tekutiny, hřebene kohouta a pupeční šňůry. Chemická struktura této kyseliny byla vyřešena během padesátých let Karlem Meyerem a jeho kolektivem. Nejprve se izolovala jako kyselina, ale za fyziologických podmínek se chovala spíše jako sůl – hyaluronát sodný. 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 mazivo, dále stabilizovat strukturu na základě elektrostatických interakcí (Steinbüchel a Vandamme, 2002; Garg a Hales, 2004).

Hyaluronan byl poprvé komerčně využit roku 1942, když Endre Balazs zažádal o udělení patentu k užití této substance k náhradě vaječného bílku v pekařských produktech. U lidí se hyaluronan poprvé léčebně použil až ke konci padesátých let 20. století v oční chirurgii k náhradě sklivce (Garg a Hales, 2004).

Termín hyaluronan byl představen v roce 1986, aby souhlasil s mezinárodním názvoslovím polysacharidů (Steinbüchel a Vandamme, 2002).

3.1.1 Současný stav hyaluronové kyseliny

V současnosti je hyaluronová kyselina získávána především syntetickou bakteriální fermentací bakterií rodu *Streptococcus equi* a *Streptococcus zooepidemicus*, dále se stále získává z lidské pupeční šňůry nebo kohoutích hřebínků. Od objevení této důležité kyseliny uběhlo přes 80 let a její uplatnění, díky jejím významným vlastnostem v různých průmyslových odvětvích, včetně medicíny a kosmetiky, roste (Steinbüchel a Vandamme, 2002).

3.1.2 Výskyt hyaluronanu

Hyaluronová kyselina (HA) je přirozeně se vyskytující biopolymer, najdeme ji u všech obratlovců a pak dále je obsažena v pouzdrech patogenních bakterií, *Streptococcus equi*, *Streptococcus zooepidemicus* a *Pasteurella*. 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 (Steinbüchel a Vandamme, 2002).



Obr. č. 1. *Streptococcus equi*- HA obsažená v membráně (www.nmpdr.org)

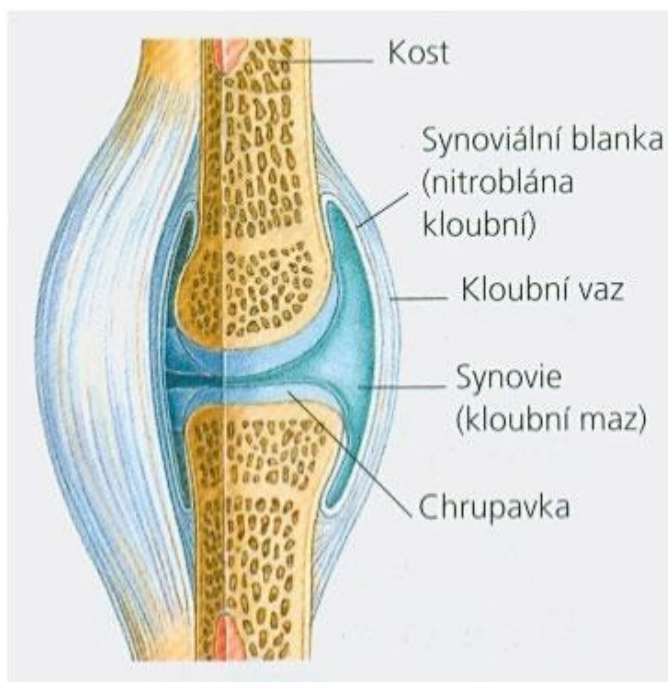
Je také součástí extracelulární matrixu mnoha tkání. V některých tkáních představuje tato kyselina jejich hlavní složku. Největší koncentrace hyaluronanu se nachází v kohoutím hřebínku ($7,5 \text{ mg.ml}^{-1}$), dále v synoviální tekutině ($3-4 \text{ mg.ml}^{-1}$), pak v pupeční šňůře a v očním sklivci (Garg a Hales, 2004).

Tab. č. 1. :Hyaluronát sodný obsažený v lidském těle (Slíva a Minařík, 2009)

Lokalizace	Množství HA	Biologický poločas	Molekulová hmotnost
Mezibuněčná hmota	>2,5 g/l	hodiny až týdny	vysoká
Pupečník	2-4 g/l	-	-
Synoviální tekutina	2-4 g/l	hodiny	vysoká
Lymfa	<10 mg/l	minuty	různá
Sérum	0,01-0,10 mg/l	minuty	nízká

Ve tkáních, kde se vyskytuje méně, slouží jako esenciální strukturní složka matrixu. Hyaluronová kyselina je přirozenou součástí lidského těla (viz tab. č. 1.). Lidské tělo o hmotnosti 70 kg obsahuje přibližně 15 g této látky, přičemž je neustále obnovována (Garg a Hales, 2004).

V chrupavkách v lidském těle (viz. Obr. č. 3.) hyaluronan vytváří tzv. agregační centra a velký chondroitin sulfátový proteoglykan, udržuje tím molekuly agrecanu v matrixu (Garg a Hales, 2004).



Obr. č. 2.: Synoviální tekutina (www.orling.cz)

Nachází se také v matrixu pojivových tkání, ale méně koncentrovaný. Méně koncentrovaná HA se nachází v tkáních, které obklopují hladké svalové buňky v aortě a dále fibroblasty ve škáře (Garg a Hales, 2004).

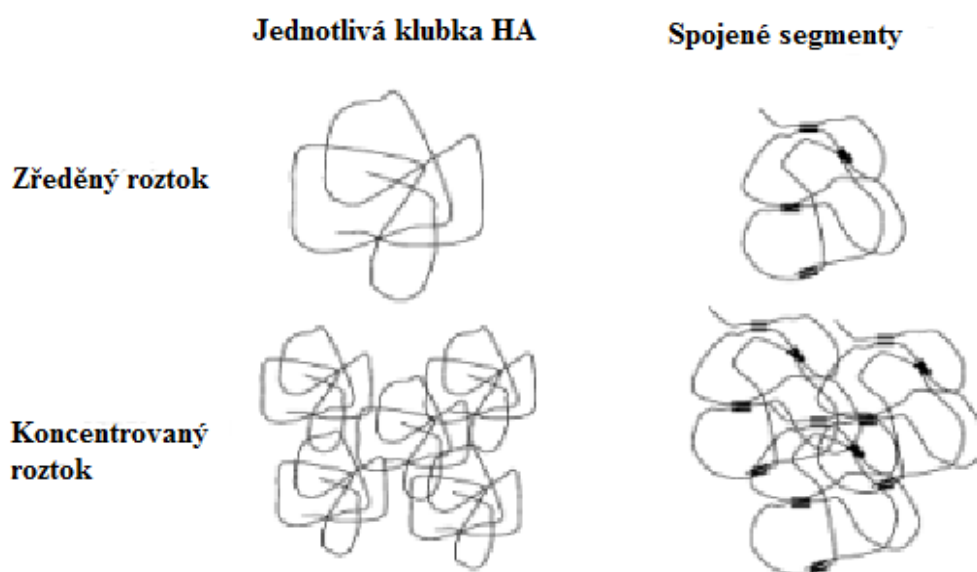
3.2 Vlastnosti hyaluronové kyseliny

Její hlavní vlastností je, že na sebe dokáže vázat velké množství vody a tak dochází k optimální hydrataci tkáně, proto je HA důležitou složkou mezibuněčné hmoty (Garg a Hales, 2004; Slíva a Minařík, 2009). Je tedy přítomna všude, kde je potřeba mezi tkáněmi udržovat vlhkost a zabránit nežádoucímu tření. Aktivně se tato kyselina účastní imunologických procesů jako signální molekula a ovlivňuje mobilitu a adhezi buněk v rámci jejich proliferace a diferenciaci (Slíva a Minařík, 2009). Významné jsou také její antioxidační vlastnosti a dále působí jako chytač volných radikálů (Garg a Hales, 2004).

Průměrná molekulová hmotnost hyaluronanu obsaženého v synoviální tekutině je 3-4 MDa. Hmotnost HA, který je přítomen v pupeční šňůře, je 3,14 MDa a velikost jejich řetězců se pohybuje v rozmezí od 5- ti tisíc do 20- ti milionů daltonů (Garg a Hales, 2004).

3.2.1 Roztok hyaluronanu

Polymerové řetězce zauímají rozbalenou nahodilou spirálu. Tyto řetězce se pak mezi sebou zaplétají, což může způsobit neobvyklé reologické vlastnosti a proto je tento roztok mimořádně vazký a velice hydrofilní (Garg a Hales, 2004).

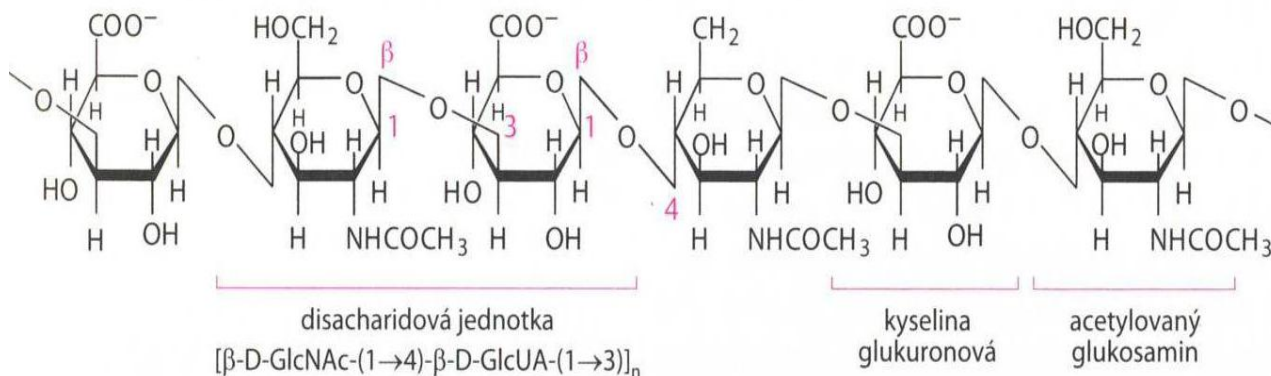


Obr. č. 3.: Modely chování hyaluronanu v roztoku (Garg a Hales, 2004)

Roztok HA o vyšší koncentraci je extrémně viskózní, už 1 % roztok je jako rosol, ale pokud je na něj vyvinut tlak, pohybuje se velice snadno a může být vpravován tenkou jehlou. Tyto extrémní lubrikační vlastnosti se využívají při postoperační péči u ortopedických a abdominálních zákroků (Garg a Hales, 2004).

3.2.2 Chemická struktura

Hyaluronová kyselina je poměrně jednoduchý neesterifikovaný glykasaminoglykan. Skládá se ze základních disacharidových jednotek tvořených D-glukuronovou kyselinou a N-acetyl-D-glukosaminem vzájemně spojených střídající se β -1,3 a β -1,4 glykosidickou vazbou (Koolman a Klaus-Heinrich, 2012).

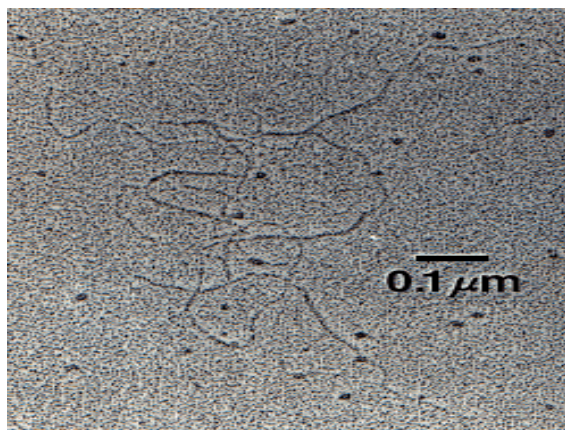


Obr. č. 4.: Strukturální vzorec hyaluronové kyseliny (Koolman a Klaus-Heinrich, 2012)

Obě cukerné složky vycházejí prostorově z glukózy (viz obr.č.5), která ve své beta konfiguraci umožňuje velkým skupinám, např. hydroxylové, karboxylové, acetamidové, být ve výhodnějším postavení ekvatoriální roviny, zatímco ostatní vodíkové atomy zabírají méně prostorově příznivé axiální pozice. Díky tomuto uspořádání je struktura tohoto disacharidu energeticky velice stabilní (Koolman a Klaus-Heinrich, 2012).

3.2.3 Struktura polymeru

Lineární polymer opakujících se disacharidových jednotek (viz obr. č. 5) syntetizuje enzym hyaluronan syntáza tak, že střídavě přidává glukuronovou kyselinu a N-acetylglukosamin k rostoucímu řetězci, který využívá svoje aktivované nukleoidové cukry (UDP- glukuronovu kyselinu a UDP- N . acetylglukosamin) jako substráty (Garg a Hales, 2004).



Obr. č. 5.: Ukazuje několik propojených molekul hyaluronanu, které byly položeny na rovném povrchu těžkého kovu pro kontrast a byly sledovány elektronovým mikroskopem (Garg a Hales, 2004)

Počet opakujících se disacharidů může v kompletní molekule dosáhnout 10 000 a více jednotek, s molekulovou hmotností ~ 4 miliony Da (každý disacharid ~ 400 Da). Průměrná délka disacharidu je 1 nm. Proto má molekula hyaluronanu s 10 000 disacharidy po natažení od konce ke konci 10 μm, tato délka je přibližně shodná s průměrem lidského erytrocytu (Garg a Hales, 2004).

3.3 Syntéza hyaluronové kyseliny

Enzymy které tvoří kyselinu hylauronovou bylo obtížné vyčistit a rozpustit a proto byla dlouhá prodleva 65 let mezi objevením v roce 1934 této kyseliny a první aktivní hyaluronové syntézy v roce 1999. Překvapivě se hyaluronan objevil až během pozdní evoluce, obvykle ho dnes nacházíme u strunatců. Zajímavé je, že některé patogenní bakterie získávají schopnost syntetizovat hyaluronan jako mimetické štíty na obranu proti imunitnímu systému hostitele. (Boeriu a kol, 2012)

Tab. č. 2.: Tabulka systému hyaluronové syntézy podle Weigl a DeAngelis (2007)

	I. Třída	II. Třída
	Redukující	Neredukující
Příslušníci	<i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>S. equisimilis</i> , <i>S. uberis</i> , lidé a myši	<i>Xenopus aevis</i> , <i>Pasteurella multocida</i>
Růst hyaluronového řetězce	Redukující konec	Neredukující konec

První třída grampozitivních bakterií a obratlovců syntetizuje hyaluronan v plazmatické membráně a vznikající řetězce (na redukujícím konci, viz tab.č. 2) jsou vytlačovány přímo do extracelulárních matrix. Druhou třídu prezentuje *Pasterella multocida*, gram negativní bakterie, kde jsou řetězce připevňovány na karboxylovém konci (neredukujícím) (Weigel a DeAngelis, 2007; Boeriu a kol., 2012).

3.4 Regulace syntézy hyaluronové kyseliny

Většina poruch buněčné homeostáze stimuluje produkci hyaluronanu. Jsou dvě základní úrovně regulace, patří sem:

- 1) Stimulace syntézy.
- 2) Inhibice syntézy růstovými a diferenčními faktory působící na cílové buňky (Steinbüchela kol., 2002).

3.4.1 Stimulace syntézy

Stimulace syntázy je známá jako mnoho růstových a diferenčních faktorů stimulující syntézu hyaluronanu, například zvýšená produkce hyaluronanu při nádorovém onemocnění, virový sarkom stimuluje produkci hyaluronanu v chondrocytech (v kuřecích fibroblastech a myoblastech) (Steinbüchel, a kol, 2002; Garg a Hales, 2004).

3.4.2 Inhibitory HA

Inhibitory potlačují aktivitu syntézy v myofibroblastech a proto je zde důvod rozvíjet či izolovat inhibitory syntézy hyaluronanu, které mohou být použité jako hojivé léky při patologických poruchách souvisejících s produkcí hyaluronanu (Steinbüchel a kol., 2002).

Zatím byly objeveny pouze dva inhibitory hyaluronan syntasy a to jodistanem oxidované UDP-GlcA nebo UDP-GlcNac. Jsou používány jako „sebevražedné“ inhibitory syntasy. Tyto inhibitory ale nepřekonají buněčné membrány a musí být proto importovány do cytoplasmu pinocytózou (Slíva a Minařík, 2009).

3.5 Vlastnosti receptorů

Receptory této kyseliny se podílejí na přenosu buněčných signálů. Pro molekulu hyaluronátu bylo na povrchu různých typů buněk identifikováno šest specifických struktur, které můžeme označit jako receptory:

- CD44
- RHAMM
- TLR-4
- Layilin
- LYVE-1
- HARE (Slíva a Minařík, 2009).

Mezi nejlépe popsané a charakterizované dnes patří první dva receptory a sice CD44 a RHAMM. Předpokládá se, že oba zasahují do procesu migrace zánětlivých a nádorových buněk, ovlivňují jejich invazivitu, adhezivitu a proliferaci (Garg a Hales, 2004; Slíva a Minařík, 2009).

3.5.1 CD44

CD44 je transmembránový glykoprotein, na který se kompetitivně vážou polymery HA. Nachází se na leukocytech, na endotelu, na parenchymových a epiteliálních buňkách. CD44 má nejméně 17 různých izoform a kromě funkce receptoru pro HA slouží také jako mediátor vyžrávání, adheze a přestupu aktivovaných T-lymfocytů z krevního řečiště do místa zánětu. Rovněž koordinuje signály pro buněčné přežívání a smrt. Vazba HA na tento receptor vede k celé řadě buněčných odpovědí, jako jsou přilnavost, organizace a obrat extracelulární matrix na povrchu buněčné (Slíva a Minařík, 2009; Steinbüchel a kol., 2002).

3.5.2 RHAMM

Jedním z receptorů, který se svojí funkcí a expresí podobá CD44, je RHAMM (angl. receptor for hyaluronan-mediated motility). RHAMM není na rozdíl od CD44 transmembránovým proteinem. Oba receptory, jak CD44, tak RHAMM, se podílejí na regulaci přenosu buněčných signálů. Na buněčnou membránu je napojen zvenčí a může tak tvořit M fázi buněčného cyklu a podporuje novotvorbu cév (Slíva a Minařík, 2009; Garg a Hales, 2004).

3.5.3 TLR-4

TLR-4 (Toll-like receptor-4) patří do skupiny receptorů pro interleukin-1. Celá skupina TLR je charakterizována EM částí receptoru bohatou na aminokyselinu leucin. TLR-4 váže kromě HA také bakteriální lipopolysacharid. Tento receptor je široce rozšířen, například v mozku, srdci, ledvinách a játrech. Účastní se aktivace monocytů, makrofágů a při vazbě tetrasacharidů HA se může podílet i na maturaci dendritických buněk (Delgado a Deretic, 2009).

3.5.4 Layilin

Layilin je transmembránový protein s podobným rozšířením jako TLR-4 receptor. Extracelulární doména vázající hyaluronan není totožná s žádným dalším proteinem. Jedná se o receptor uplatňující se při migraci buněk (Bono a kol., 2005).

3.5.5 HARE a LYVE-1

Tato skupina dvou receptorů HARE a LYVE-1 se nachází na endotelu lymfatických cest. Oba dva jsou membránové proteiny. LYVE-1 se vyskytuje na místech, kde dochází k pohlcování a degradaci vysokomolekulárního HA. Najdeme ho na lymfatickém endotelu a endotelu v játrech a také ve slezině. HARE se vyskytuje ve stejných místech jako LYVE-1 receptor. Internalizace HA dochází po jeho dopravení do kompartmentu prelysozomů, to je zprostředkováno proteinem HARE, ten se pak následně vrací na buněčný povrch (Garg a Hales, 2004).

3.6 Degradace hyaluronanu

Hyaluronan je odbouráván na menší fragmenty chemickými metodami za kyselých či zásaditých podmínek, fyzikálním působením, ultrazvukovými vibracemi, štěpením založeným na volných radikálech nebo různými enzymatickými metodami (Garg a Hales, 2004).

3.6.1 Štěpení volnými radikály

Štěpení založené na bázi volných radikálů štěpí hyaluronan přímo v pojivové tkáni a to je příčinou artritidy a stárnutí. Bylo prokázáno, že hlavním faktorem při zahájení degradace je hydroxylový radikál, který způsobí nespecifické štěpení glykosidické vazby. Čím vyšší je koncentrace těchto volných radikálů, tím se zmenšuje molekulová hmotnost hyaluronanu (Garg a Hales, 2004).

3.6.2 Biotransformace

Hyaluronan se v organismu odbourává především enzymaticky za pomoci hyaluronidas a to dvěma cestami (Slíva a Minařík, 2009).

1. Internalizace a degradace v lysozomech buněk

Hyaluronidasa Hyal-1 je odpovědná za katabolismus intracelulárního HA. Ta je přítomna především v lysozomech. Hyal-1 štěpí HA na tetrasacharidy, které jsou následně odbourány β -glukuronidasou a β -N-acetylglukozaminidasou. Konečnými degradačními produkty jsou GlcNAc a GlcA, jež se buď recyklují a nebo katabolizují v pentozovém cyklu (Garg a Hales, 2004; Slíva a Minařík, 2009).

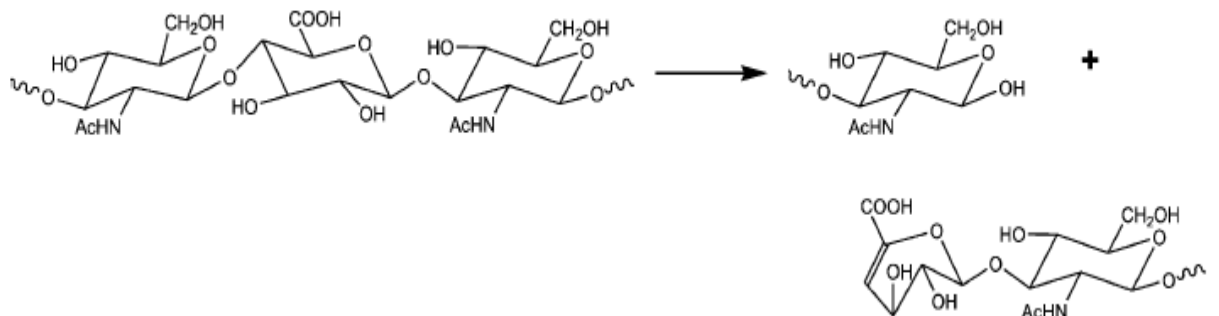
2. Uvolnění do extracelulární matrix a transport

Uvolnění do extracelulární matrix a transport lymfatickými cestami do jater a ledvin. Hyaluronidasa Hyal-2 je odpovědná za katabolismus extracelulárního HA. Po rozštěpení se HA transportuje lymfatickým systémem do krve, vyloučen je buď játry (80 %) a nebo ledvinami (10 %) (Garg a Hales, 2004; Slíva a Minařík, 2009).

Existují tři hlavní typy hyaluronidas a degradují hyaluronan různými mechanismy:

- a) Savčí
- b) Z pijavic a parazitů
- c) Bakteriální (Slíva a Minařík, 2009).

a) Savčích hyaluronidas (viz obr. č. 7) je pět typů: Hyal-1 až 4 a PH-20 (sperm adhesion molecule 1) (SPAM-1).



Obr. č. 6.: Savčí hyaluronidasa (Garg a Hales, 2004)

- Hyal-1 se nachází ve většině tkání a nalézáme ji také v plazmě a moči. Vyžaduje ke své aktivitě přítomnost CD44. U pacientů s karcinomem močového měchýře a prostaty dochází k její upregulaci.
- Hyal-2 se také nachází ve většině tkání kromě mozku. Ke své aktivaci rovněž vyžaduje přítomnost CD44. Patří ke klíčovým extracelulárním enzymům při remodelaci tkání a buněčné migraci.
- Hyal-3 nacházíme především v mozku. Její funkce zatím nebyla objasněna.
- Hyal-4 je specifická pro chondroitin sulfát.
- PH-20 se nachází ve spermatu. Narušuje ochranný obal zralého oocyty, jenž je bohatý na HA a tím umožňuje průnik nejrychlejší spermie k vajíčku a jeho oplodnění (Garg a Hales, 2004; Slíva a Minařík, 2009).

b) Druhou skupinu tvoří hyaluronidasy izolované ze slinné žlázy pijavice. Je to endo- β -D-glukuronidasa, působením tohoto enzymu vznikají především tetrasacharidové odštěpky. Enzymy tohoto typu mohou být nalezeny i u měchovců a dalších parazitů (Slíva a Minařík, 2009).

c) Třetí skupinu tvoří bakteriální hyaluronidasy působí na hyaluronan přes β -eliminanci reakce (Garg a Hales, 2004).

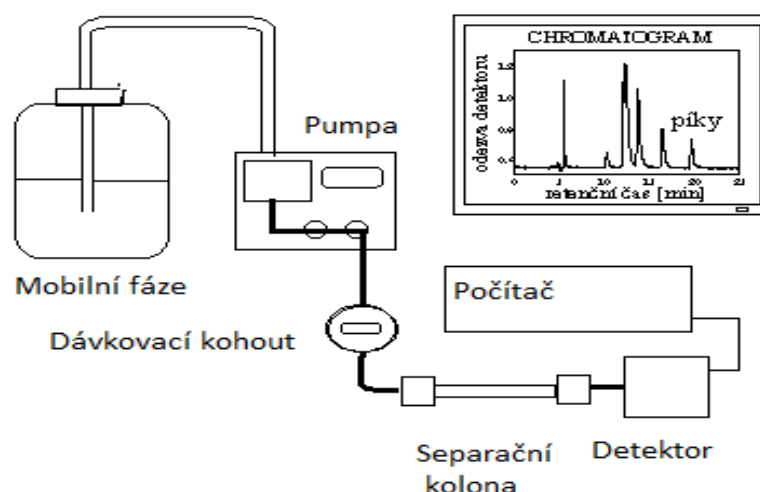
Tyto lyasy působí jako N-acetyl-D-hexosaminidasy, které odtrhnou β -eliminací disacharid obsahující glukuronosilové zbytky s dvojnou vazbou mezi uhlíky 4 a 5. Pro dva enzymy produkované streptokoky byla určena i genová sekvence. Tato sekvence je u těchto enzymů ze streptokoka. Jedna pochází z *Clostridium perfringens* a další byla izolována z bakteriofága *Streptococcus pyogenes* (Kreil, 1999).

3.7 Separace a čištění hyaluronanu od oligosacharidů

Byly popsány různé metody pro separaci hyaluronanu od oligosacharidů. Nejrozšířenější mezi ně patří gelová chromatografie, iontově-výměnná chromatografie a vysoce výkonná kapalinová chromatografie (HPLC) (Garg a Hales, 2004).

3.7.1 Kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysoko účinná kapalinová chromatografie (HPLC – High-Performance Liquid Chromatography) využívá jako mobilní fázi kapalinu. O separaci složek vzorků rozhodují nejen interakce mezi vzorkem a stacionární fází, ale velice významně se zde podílí i použitá mobilní fáze. Jsou využitelné různé mechanismy separace – normální fázové rozdělení, systém reverzních fází, iontová výměna či vymývání podle velikosti (Klouda, 2005).



Obr. č. 7.: Zjednodušené schéma chromatografu (Nováková a kol. 2013).

Při všech chromatografických metodách se mnohonásobně ustavuje rovnováha součástí analyzované směsi mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Jedna nepohyblivá (stacionární fáze) má schopnost různou měrou zadržovat jednotlivé součásti analyzované směsi, druhá pohyblivá (mobilní fáze) pak vymývá (eluje) jednotlivé součásti směsi z nepohyblivé fáze a odnáší je ve směru toku různou rychlostí, čímž dojde k jejich oddělení. Stacionární fáze může být tuhá (sorbent) nebo kapalná, mobilní fáze může být kapalná (=eluent, eluční činidlo) nebo plynná (nosný plyn). Hybnou silou v chromatografickém systému je tok mobilní fáze, který unáší ionty nebo molekuly. Vlastní dělení látek v systému však závisí na brzdící síle (retenci), která působí selektivně - některá látka je bržděna více, jiná méně. Při chromatografickém procesu se ustavuje dynamická rovnováha mezi vratnou sorpcí na stacionární fázi a desorpcí na mobilní fázi. Rychlost postupu látky závisí na sorpční rovnováze, tj. čím pevněji se látka sorbuje, tím pomaleji v systému postupuje (Nováková a kol. 2013).

3.8 Hyaluronan

Obecně je hyaluronan molekula, která má vysokou molekulovou hmotnost a zabírá svým náhodným uspořádáním shluků velký hydrodynamický objem v roztoku. Při vyšších koncentracích jsou molekuly hyaluronanu zamotané do sebe a tvoří kontinuální síť a proto je obdařený zajímavými reologickými vlastnostmi (Hascall a Laurent, 1997; Garg a Hales, 2004).

Tyto shluky jsou viskoelastické. Proto hyaluronan může působit jako lubrikant. Nachází se v kloubech a na povrchu svalů, které po sobě díky té to kyselině kloužou a mohou se pohybovat (Garg a Hales, 2004).

3.8.1 Buněčné funkce

Hyaluronan má dvě hlavní buněčné funkce. Syntéza hyaluronanu, která podporuje buněčné shlukování a adhezi, inhibuje buněčnou proliferaci. Pokud je hyaluronan držen receptorem CD44 na povrchu buňky, pak slouží jako adhezivní prvek. Proto tedy funkcí hyaluronanu je zesílení proteínasy na buněčném povrchu. Pokud jsou tedy proteínasy neaktivní, hyaluronan, pak ukládáním a připojením k receptorům zesílí činnost faktorů adheze a inhibuje růst buňky. Jsou-li proteínasy aktivní, potom hyaluronan aktivací syntesy zvětší odpuzování buněk z prostředí, tedy zvýší migraci a proliferaci (Steinbüchel a kol., 2002; Garg a Hales, 2004).

3.8.2 Fyziologické funkce

Hyaluronová kyselina má spousty fyziologických funkcí a ty se liší podle závislosti na typu tkáně ve které se nachází. Slouží ve tkáni jako molekula vytvářející odpor k vodě a tekutinám proudícím v extracelulárním prostoru. Udržuje osmotický tlak a podílí se na regulaci molekulárního transportu, kde působí jako jakési síto pro postupné propouštění molekul o různé molekulové hmotnosti (Kennedy a kol., 2002; Garg a Hales, 2004).

Kyselina se také podílí na hojení ran, kdy degradační produkty hyaluronanu stimulují abiogenezi a vytváření nových cév. V neposlední řadě podporuje hyaluronan také tumorigenicitu, buněčnou proliferaci a migraci (Garg a Hales, 2004).

3.8.3 Patologické funkce

HA nyní působí jako farmakologická signální molekula. HA funkce se uplatňuje v různých biologických procesech včetně embryonálního vývoje, při zánětech a to zejména s ohledem na funkci bílých krvinek, také podporuje hojení ran pomocí angiogeneze. HA je také rozhodující pro udržení normální pružnosti tkání, jejich hydrataci a funkci kloubu (Garg a Hales, 2004).

Mimo zmíněné fyziologické funkce je hyaluronová kyselina přítomna také v řadě patologických dějů. Průběh lze odhalit díky změnám její koncentrace v krvi nebo na základě přítomnosti jejích fragmentů a degradačních produktů.

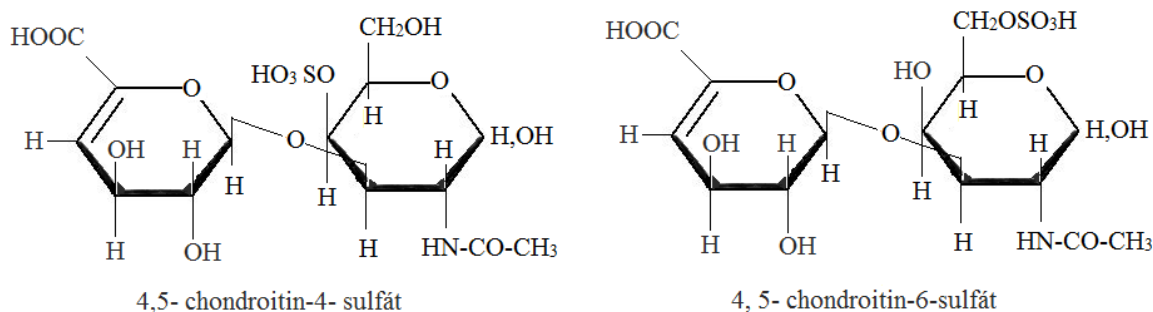
Patří sem především akutní poškození plic a imunologické dysfunkce, včetně astma a revmatoidní artritidy a další záněty v lidském organismu. Při patologických stavech nastává změna ve složení a velikosti molekuly HA (Garg a Hales, 2004).

3.9 Chondroitin sulfát

Chondroitin sulfát (CS) je reprezentativní sulfátovaný glykosaminoglykan (GAG), který je rozšířený na povrchu buněk a v pericelulárním matrixu ve formě proteoglykanů (CSPG), kde alespoň jeden CS je kovalentně připojen k proteinům. CSPG jsou zapojeny nejen v různých fyziologických dějích jako je cytokineze, morfogeneze a plasticita neuronů, ale také v patologických procesech, včetně kosterních poruch, tvorba gliové jizvy po poranění mozku, a infekce viry a bakteriemi (Mikami a Kitagawa, 2013).

3.9.1 Chemické a fyzikální vlastnosti

Chondroitin sulfát je sulfátovaný polysacharid ze skupiny glykosaminoglykanů (viz. obr. č. 9), skládajících se z opakujících se disacharidových jednotek z kyseliny uronové a N-acetyl-6-aminů (Mikami a Kitagawa, 2013).



Obr. č. 8.: Strukturovaný vzorec chondroitinu sulfátu (Flangea a kol., 2009)

V jeho molekule se opakuje disacharidová jednotka složená z kyseliny glukuronové a galaktosaminu, který je sulfátován obvykle na čtvrtém nebo šestém uhlíku (chondroitin-4-sulfát, chondroitin-6-sulfát, viz. obr. č. 9). V malém množství se v řetězci přirozeného chondroitin sulfátu mohou objevit i nesulfátované disacharidy, disacharidy sulfátované na jiném uhlíku nebo disulfátované či trisulfátované disacharidy. CS je součástí řady proteoglykanů obsažených v kloubní chrupavce, zejména agrekanu, dále též dekorinu a biglykanu (Mikami a Kitagawa, 2013).

3.9.2 Fyziologická úloha chondroitinu sulfátu

Chondroitin sulfát je jednou ze základních molekul mezibuněčné hmoty kloubní chrupavky. Tato hmota se skládá z pevné kolagenní sítě, v níž jsou zanořeny molekuly proteoglykanu agrekanu. Kolagenní síť představuje základní nosnou trojrozměrnou molekulární konstrukci mezibuněčné hmoty chrupavky a v ní jsou vázány velké molekulární komplexy agrekanu. Agrekan je proteoglykan složený z centrálního proteinu, na který jsou navázány dlouhé řetězce glykosaminoglykanů. Hlavním polysacharidem agrekanu z hlediska objemu je chondroitin sulfát, který vytváří dvě chondroitin sulfátové domény, dále se v agrekanu nachází keratan sulfát a oligosacharidy. Molekuly agrekanu jsou vázány na dlouhé vlákno hyaluronové kyseliny. Složení chondroitinu sulfátu a dalších glukosaminů v agrekanu obsahují velké množství negativně nabitých skupin, kvůli kterým jsou schopny vázat značné množství vody a právě tato vlastnost je podstatou funkcí agrekanu, který se právě kvůli změně obsahu vody účastní na absorpci mechanické síly, která na chrupavku působí. Ke spontánnímu zvětšování objemu glykosaminoglykanů vstřebáváním vody brání za fyziologických okolností právě pevná, neelastická kolagenní síť (Olejárová, 2010).

3.9.3 Mechanismus

U osteoartrózy dochází v chrupavce k řadě metabolických změn směřujících ke zhoršení její kvality. Degenerativní změny se týkají všech složek mezibuněčné hmoty chrupavky. Kolagenní síť se stává následkem patologické produkce jiných typů kolagenu (např. kolagenu typu I a III) méně pevnou a odolnou vůči působení proteolytických enzymů a přestává stačit odolávat značnému osmotickému tlaku agrekanu, který absorbuje více vody a zvětšuje tak svůj objem; edém chrupavky však snižuje její elasticitu. Z poškozené kolagenní sítě se též snáze extrahují fragmenty i celé molekuly agrekanu do synoviální tekutiny, což vede k jeho úbytku v chrupavce. Alterována je však i samotná syntéza agrekanu i chondroitin sulfátu, mění se délka řetězců chondroitin sulfátu, poměr chondroitin-4-sulfátu a chondroitin-6-sulfátu, zvyšuje se antigenicita chondroitin sulfátu. Výsledkem všech výše uvedených změn je pak zhoršení kvality i snížení množství agrekanu, což vede ke ztrátě pružnosti a alteraci funkce kloubní chrupavky (Olejárová, 2010).

Ve studiích *in vitro* byly u chondroitinu sulfátu prokázány všechny charakteristické účinky, tedy stimulace syntézy mezibuněčné hmoty chrupavky, inhibice její degradace a protizánětlivý efekt. CS např. zvyšuje syntetickou aktivitu kultivovaných humánních chondrocytů, zvyšuje produkci proteoglykanů a zároveň snižuje aktivitu kolagenózy.

In vitro byl dále prokázán příznivý vliv chondroitin sulfátu na apoptózu králíčích chondrocytů. Chondroitin sulfát má rovněž vlastní protizánětlivý účinek, na kterém se podílí několik mechanismů: *in vitro* ovlivňuje chemotaxi, fagocytózu i migraci zánětlivých buněčných elementů a snižuje uvolňování lyzozomálních enzymů (Olejárová, 2010).

3.10 Využití hyaluronové kyseliny v medicíně

V lidském těle je hyaluronát základní stavební jednotkou mezibuněčného matrixu. Je tvořen řadou buněk, přičemž nejvýznamněji se na jeho syntéze podílejí především fibroblasty, keratinocyty a chondrocyty (Slíva a Minařík, 2009).

Pro okolní buňky vytváří jakési lešení, bývá zmiňován rovněž v kontextu své schopnosti na sebe vázat vodu, a přispívat tak k optimální hydrataci tkáně. Pro své vynikající viskoelastické vlastnosti je hojně využíván například v oční chirurgii, při artroskopických operacích, při terapii močové inkontinence, intraartikulárně při osteoartróze, při endoskopických operacích k prevenci jizvení, dále jako výplň vrásek v plastické chirurgii, k intravezikální instilaci při cystitidách a v očních či nosních kapkách (Garg a Hales, 2004).

3.10.1 Dermatologie

Dermatologie, neboli kožní lékařství, je obor medicíny zabývající se kůží a jejími deriváty (vlasy, nehty, potní žlázy, atd.) a chorobami kůže (Garg a Hales, 2004).

Kůže působí jako ochranný štít proti vnějším vlivům z prostředí, hlavní funkcí kůže je ochrana proti patogenům, toxickým látkám, radiaci (UV záření) a proti mechanickému stresu. Dále má význam jako vylučovací orgán, při termoregulaci, jako smyslový orgán a v neposlední řadě třeba zmínit i její zásobní funkce a tvorbu vitamínu D. Využití Ha v dermatologii je velice výhodné, nemá velké nežádoucí účinky pro tělo, je přirozená a shoda v chemickém složení hyaluronanu produkovaného streptokoky s lidskou umožňuje aplikaci rovnou, bez předchozího testování na zvířatech (Proksch a kol., 2008).

3.10.2 Kosmetika

Kůže jako složitý orgán lidského těla vyžaduje každodenní péči a pozornost. Stav kůže hraje důležitou roli ve vztahu k fyzickému a duševnímu zdraví. K tomu, aby byla kůže v dobrém stavu, je nutné ji udržovat v dokonalé čistotě a optimálně hydratovanou (Proksch a kol., 2008).

V současné době jsou k dispozici kosmetické přípravky s hyaluronovou kyselinou, které mají především hydratační účinek a zpomalují projevy stárnutí. V dermatologii se do kosmetických přípravků přidává hyaluronan a různé jeho deriváty, ty jsou přínosné pro povrch pokožky, mají antioxidační, hydratační a protizánětlivé účinky. Hyaluronová kyselina zpomaluje stárnutí pokožky, podporuje epidermální integritu a pomáhá obnovovat epidermis. Účinky záleží na molekulové hmotnosti hyaluronanu v daném výrobku, to znamená, že čím vyšší je ta koncentrace a molekulová hmotnost hyaluronanu, tím je přípravek efektivnější a účinek delší. Používá se, ale kombinace směsi o nízké a vysoké molekulové hmotnosti, protože nízkomolekulární hyaluronan je schopen lépe penetrovat rohovitou vrstvu kůže a vytváří spojení mezi endogenním hyaluronanem v hlubších vrstvách epitelu a exogenním hyaluronanem pokrývajícím kůži. Spojení dvou molekulárních hmotností usnadňuje průchod vody a malých molekul z povrchu pokožky do podkožní intracelulární matrix a zpět (Abbiati, 2002).

Kosmetické přípravky s obsahem HA jsou dnes vyráběny převážně ve formě emulzí. Ty se využívají hlavně na hyperkeratózy a alopecie. Krémy, které kromě samotné HA mohou obsahovat i aktivní látky, jako jsou vitamin A, vitamin E, kyselina askorbová, výtažek z měsíčku lékařského, propolis, aloe vera, ginko-bilobu, bambucké máslo, včelí vosk, různé oleje a další látky. Tyto kosmetické produkty jsou účinné při redukci vrásek a k podpoře její elasticity. Dále se využívají při ochraně proti fotodermatóze, proti zarudnutí a společně s hydrochinonem při léčbě senilních skvrn (Abbiati, 2002).

U nás výzkumem, vývojem a biotechnologickou výrobou aktivních látek pro kosmetický a farmaceutický průmysl zabývá firma Contipro Pharma. Hyaluronovou kyselinu používá především v přípravcích denní péče o pleť, v nočních a regeneračních přípravcích, v kosmetice určené po slunění, v dekorativní kosmetice, v přípravcích před a po holení a v neposlední řadě i v čisticích prostředcích (www.contipro.cz).

3.10.3 Plastická a estetická chirurgie

Prsní implantáty jsou v současné době k dispozici vyrobené hlavně ze silikonového gelu. Studie však potvrdily, že další alternativou by mohla být výplň z hyaluronové kyseliny. Implantáty na bázi hyaluronanu jsou mnohem měkčí a umožňují lepší vizualizaci struktur v okolí implantátu (při pořízení rentgenového snímku) než implantáty se silikonovým gelem (Lapčík, 1998).

Výhodou použití hyaluronové kyseliny je, že má lepší snášenlivost ve srovnání s použitím kolagenu, protože hyaluronová kyselina je vysoce biokompatibilní a nedráždivou látkou s dobrou biologickou rozložitelností (www.contipro.cz).

Hyaluronan ve formě injekcí se aplikuje do podkoží, využívá se pro vyplnění obličejových linek a vrásek, také i na řešení jizev tam, kde je nedostatečné použití běžných kosmetických přípravků (Abbiati, 2002; www.contipro.cz).

3.10.4 Otolaryngologie

HA se ve vyšším množství v těle nachází i v hlasivkách. V této tkáni ovlivňuje několik funkcí, včetně její viskozity, tkáňového průtoku, osmózy, tlumení nárazů a hojení ran. Tyto funkce jsou pro hlasivky obzvláště důležité, protože mají přímý vliv na tloušťku a viskozitu hlasového orgánu (Kogan a kol., 2007).

Deriváty hyaluronové kyseliny jsou určeny ke zvýšení viskozity hlasivek, k regeneraci poškozených hlasivek a k léčbě jejich nedostatečné funkčnosti. Hlavní nevýhodou léčby hlasivek hyaluronovou kyselinou je však krátká doba jejího účinku, pouze jenom 3-5 dní. (Lapčík, 1998; Kogan a kol., 2007).

V léčbě poruchy sluchu se osvědčily estery HA, např. přípravek HYAFF, který je používán při operacích dutin ucha, podporuje hojení ran na bubínku, usnadňuje reepitelizaci, stejně jako zabraňuje srůstání vrstev mezi sliznicí (Kogan a kol., 2007).

3.11 Revmatologie

Revmatologie je obor vnitřního lékařství, zabývá se diagnostikou a léčbou onemocnění pohybového aparátu nechirurgického typu. Revmatické onemocnění, které postihuje pohybový aparát, jako jsou klouby, kosti páteře, svaly, vazy, šlachy a úpony, také postihuje ostatní orgány (srdce, píce, ledviny) (www.old.lf3.cuni.cz).

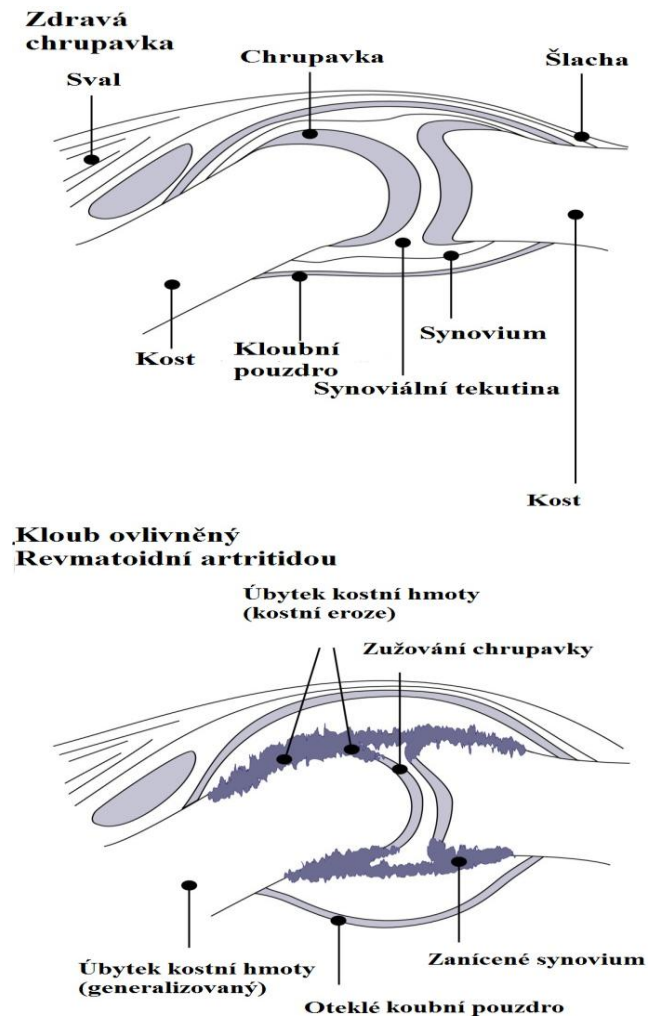
Revmatologie má tedy interdisciplinární charakter a erudovaný specialista musí proto znát kromě vlastní revmatologie i vnitřní lékařství, klinickou imunologii, rehabilitaci a fyzikální léčbu, ale i principy revmatochirurgie (Pavelka a kol., 2002).

Revmatické onemocnění rozdělujeme do těchto skupin:

- Zánětlivé
- Degenerativní (www.old.lf3.cuni.cz).

3.11.1 Zánětlivé onemocnění

Revmatoidní artritida je systémové zánětlivé onemocnění, ve kterém je bolest kloubů navíc doprovázena degenerativními změnami v jiných orgánech, jako jsou plíce, srdce, cévy (www.old.lf3.cuni.cz).



Obr. č. 9. : Schéma kloubu při Revmatoidní artritidě (Tamer, 2013)

U kloubu HA hraje důležitou roli v ochraně kloubní chrupavky a transportu živin do chrupavky. U pacientů s revmatoidní artritidou (viz. obr. č. 10) se uvádí, že HA působí jako anti-zánětlivá látka, tak že brání přilnutí imunitních komplexů na neutrofilů prostřednictvím receptoru nebo také, že chrání synoviální tkáň při uchycení zánětlivých mediátorů (Tamer, 2013).

3.11.2 Degenerativní onemocnění

Hyaluronová kyselina byla použita k experimentální léčbě osteoartrózy, která je řazena mezi degenerativní onemocnění. Při onemocnění osteoartrózy dochází ke snížení molekulární hmotnosti hyaluronové kyseliny je způsobena přítomností protizánětlivých cytokinů, volných radikálů a proteinas, které působí na metabolismus fibroblastů B, které syntetizují hyaluronovou kyselinu o nižší molekulární hmotnosti v synoviální tekutině, která ve spojení se zředěním plazmatickou tekutinou a přítomností proteinů (způsobenou zvýšenou propustností synoviální membrány při zánětu) způsobuje zhoršené reologické vlastnosti této synoviální tekutiny. Výzkum prováděný na zvířatech ukázaly, že nitrokloubní injekce HA snižují poškození kloubní chrupavky. V konečném důsledku obnovuje HA viskoelasticitu synoviální tekutiny, snižuje ztuhlost a zlepšuje pohyblivost kloubů obnovením transsynoviálního toku, což má vliv na metabolismus a homeostasu kloubu (Kogan a kol., 2007; www.old.lf3.cuni.cz).

Dále může být hyaluronová kyselina přímo depolymerizována volnými radikály, intracelulárními hyaluronidasami a jinými glukosidázami ze synoviocytů a leukocytů v synoviální membráně (Stair-Nawy a kol., 1999).

Kogan a kol. (2007) navrhli důležité mechanismy hyaluronové kyseliny, které uplatňují svůj terapeutický vliv:

- Obnovení viskózních a elastických vlastností synoviální tekutiny.
- Biosyntetický stimulační vliv exogenní hyaluronové kyseliny na buňky (hyaluronan vpravený vstříknutím, může indikovat endogenní syntézu hyaluronanu synoviálními buňkami, inhibovat degradaci chrupavky a stimulovat proliferaci chondrocytů).
- Hyaluronová kyselina má viditelné analgetické účinky.
- Protizánětlivý účinek HA, kdy se snažíme při terapii snížit počet zánětlivých buněk v synoviální tekutině.

3.11.3 Oftalmologie

První komerční oftalmologický produkt na bázi HA Healon byl připraven z kohoutích hřebínků a byl používán i pro ochranu endotelu rohovky při její transplantaci. V současné době je k dispozici řada výrobků s různou molekulou hmotností HA, včetně preparátu Viscoat, který kombinuje hyaluronovou kyselinu s chondroitinem sulfátem.

V současné době je HA široce používán v mnoha procedurách, včetně pronikající keratoplastiky, trabekulektomii, retinální znovu připojení a úrazové chirurgie, stejně jako léčba ke zmírnění příznaků nemoci suchého oka (Klingenberg, 2013).

V oku se HA vyskytuje převážně ve sklivci, který je průhledný, bezbarvý a je to želatinová hmota vyplňující prostor mezi oční čočkou a obložením na zadní straně oka. Funkce HA ve sklivci se v podstatě týká poskytování tvaru, objemu a struktury prostředí. Většinou je složený hlavně z vody (98% až 99%), jakož i malé množství rozpuštěných látek, jako jsou soli, cukry, vitrosiny, kolagen a další proteiny. Použití HA v očním ošetření je využíváno díky jeho hydratační vlastnosti a schopnosti rozšířit léky během krátkého času a podpoře hojení tkání. V důsledku toho je HA přirozenou volbou při vyhodnocení možných pomocných látek pro oftalmologii (Klingenberg, 2013).

Tradiční komerční zdroje HA jsou extrakcí kohoutích hřebínků a nebo různých oslabených kmenů *Streptococcus*. U těchto zdrojů však může být potenciální riziko kontaminace z živočišných bílkovin, virů, nebo endotoxinů. Kromě toho, jak extrahovaná HA tak mikrobiálně odvozená HA se čistí pomocí tvrdých organických rozpouštědel, které představují další potenciální zdravotní problémy pacientů (Klingenberg, 2013).

Fermentace *Bacillus* pro výrobu HA je vyvinuta tak, aby překonala jak výrobní tlak, tak i bezpečnostní problémy spojené s riziky kontaminace ze zvířat. *Bacillus subtilis* je nepatogenní bakterie, jejíž výrobky jsou obecně považovány za bezpečné. Proces fermentace využívá minimální médium, bez žádných zvířecích produktů a technika je na bázi vody, která odstraňuje použití organických rozpouštědel ve výrobním procesu. Výsledný HA se vyznačuje nízkým množstvím nukleových kyselin, proteinů, bakteriální endotoxiny, exotoxiny a mikrobiální kontaminace, což snižuje alergické reakce. Použití biotechnologii k výrobě HA nejen zvyšuje bezpečnost, ale umožňuje výrobu stupňů hyaluronové kyseliny, polymerů o různé délce řetězců a molekulové hmotnosti. To zase umožňuje výrobu očních roztoků o několika různých viskozitách (Klingenberg, 2013).

3.12 Léčba akutních zranění a chronických ran

Hojení rány je komplexní proces, během kterého dochází k sebeobnově kůže po poranění (Midwood a kol., 2004). Tyto procesy se objevují v přesných systematických kaskádách, které přesně odpovídají výskytu různých typů buněk v ráně během odlišných etap procesu hojení. Komplexy procesů, které jsou spouštěny po poranění tkáně, mohou být rozděleny na čtyři fáze: hemostáza, zánět, proliferace a remodelace (Enoch a Price, 2004).

U zdravých jedinců se rány většinou hojí v relativně krátkém čase a bez komplikací. Zpomalené hojení nebo tvorba chronické, nehojící se rány, může být způsobena faktory, jako jsou vyšší věk, infekce, žilní onemocnění nebo diabetes. Hyaluronová kyselina byla vyvinuta za účelem podpory přirozeného procesu hojení rány, významně zkracuje celkovou dobu hojení a zlepšují kvalitu života mnoha pacientům. Většina výrobků s hyaluronovou kyselinou je určena na vlhké hojení komplikovaných, zanícených nebo chronických ran (www.contipro.cz).

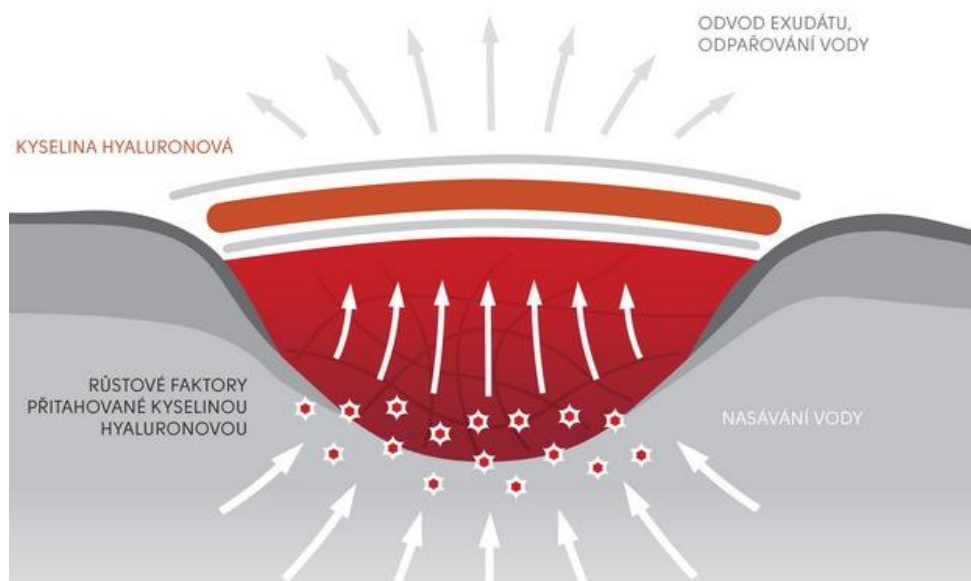
3.12.1 Chronické rány

Chronická rána je obecně definována jako porušení kontinuity kožního povrchu a integrity organismu, porušení anatomické struktury a s ní související funkce kůže, způsobené různými příčinami. Jde o defekty se ztrátou kožní tkáně často zasahující hluboko do tkání podkožních. Doba hojení takových ran je obvykle delší nežli 6 týdnů, neboť reparace tkáně v některé z fází hojení stagnuje (Enoch a Price, 2004; Stryja, 2009).

V současné době je odhadováno, že chronickou ranou trpí po celém světě více než 13 milionů pacientů. Kvůli stárnoucí populaci, zvyšujícímu se celosvětovému výskytu diabetu a obezity se počet pacientů s chronickou ranou každoročně zvyšuje (www.contipro.cz).

Podle zdrojů Contipro Pharma a.s. patří mezi tři nejčastější druhy chronických ran:

- Diabetické vředy
- Bércové vředy
- Proleženiny



Obr. č. 10. :Hojení ran pomocí hyaluronové kyseliny (www.contipro.cz)

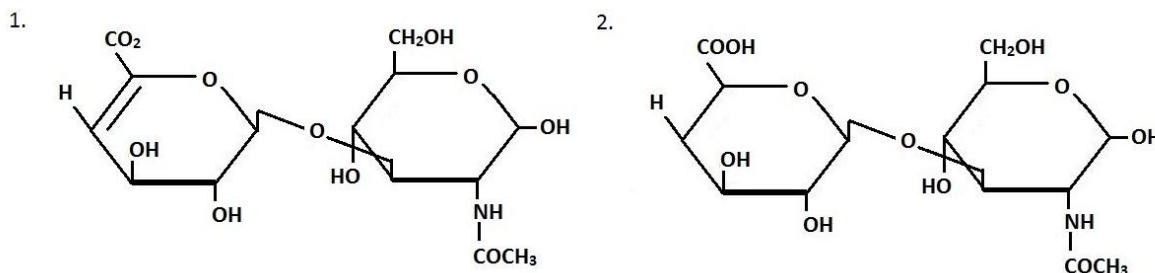
3.12.2 Hyodine

Tento produkt je přímo výrobek Contipro Pharma, je to zdravotnický prostředek určený k hojení všech druhů chronických, akutních ran a i rány infikované. Produkt má gelovitou strukturu, čímž je vhodný také pro aplikaci do velmi hlubokých ran, či dutin. Účinnost produktu Hyodine je založen na společném, působení mezi hyaluronové kyseliny a jódu. Hyaluronová kyseliny vytváří v ráně přirozeně vlhké prostředí podporující migraci a viabilitu buněk a současně odvádí z rány nadbytečný exudát. Zatím co komplex jódu chrání HA před degradací bakteriemi přítomnými v ráně, a zároveň zajišťuje antibakteriální ochranu rány. Hyodine účinným způsobem podporuje granulaci a epitelizaci rány a urychluje jejich hojení, také je velmi efektivní především při hojení diabetických vředů (www.contipro.cz).

4 Metodika

4.1 Použitý materiál

Byly použity nasycené a nenasycené oligomery hyaluronové kyseliny (dimer-dekamer). Pro štěpení hyaluronové kyseliny byly použity dva enzymy lyasa [EC 4.2.2.1] a hydrolysa [EC 3.2.1.35], (www.sigmaaldrich.com).



Obr. č. 11.: Strukturovaný vzorec 1. nenasycené HA, 2. nasycené HA (Volpi, 2000)

4.2 Použitá metoda

V HPLC metodách se ustavuje rovnováha v distribuci analyzovaných látek mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi (stacionární a mobilní). Stacionární fáze má schopnost různou měrou zadržovat jednotlivé součásti analyzované směsi, mobilní fáze pak eluuje jednotlivé součásti směsi z nepohyblivé části a odnáší je ve směru toku různou rychlostí, tím dojde k jejich oddělení.

Hyaluronová kyselina byla stanovena pomocí systému firmy Dionex (USA) – přístroj UltiMate 3000 – stavebnicový systém HPLC s PDA detekcí. Použité standardy hyaluronanu a oligomerů (nasycených i nenasycených) byly poskytnuty firmou Contipro Pharma a.s. Z nasyc. a nenasyc. oligomerů byly připraveny kalibrační roztoky o koncentracích 0,1000; 0,0100; 0,0250; 0,0120; 0,0063; 0,0031; 0,0015 a 0,0007 %. Metodou HPLC byly tyto roztoky proměřeny a nasycené oligomery HA byly detekovány při 210 nm a nenasycené oligomery při 232 nm.

Metodika stanovení byla získána od firmy Contipro Pharma a.s. (Hermannová, 2013, pers. comm.). Jako mobilní fáze byly použity roztoky NaCl v koncentraci 20 a 250 mM. Byla použita kolona firmy Showa Denko America, Inc. (bližší údaje viz příloha č. 1). Nástřik vzorku 50 mikrolitrů, teplota při separaci byla 35 °C.

4.3 Měření kalibrací

Délka separace trvala 44 minut. Gradientová eluce probíhala dle tabulky č. 3.

Tab. č. 3. Průběh gradientové eluce.

	Retenční čas [min]	Průtok [ml/min]	% 20 mM	% 250 mM
1	0,000	1,500	100,0	0,0
2	0,000	1,500	100,0	0,0
3	25,000	1,500	24,0	76,0
4	26,000	1,500	0,0	100,0
5	32,000	1,500	0,0	00,0
6	33,000	1,500	100,0	00,0
7	40,000	1,500	100,0	00,0

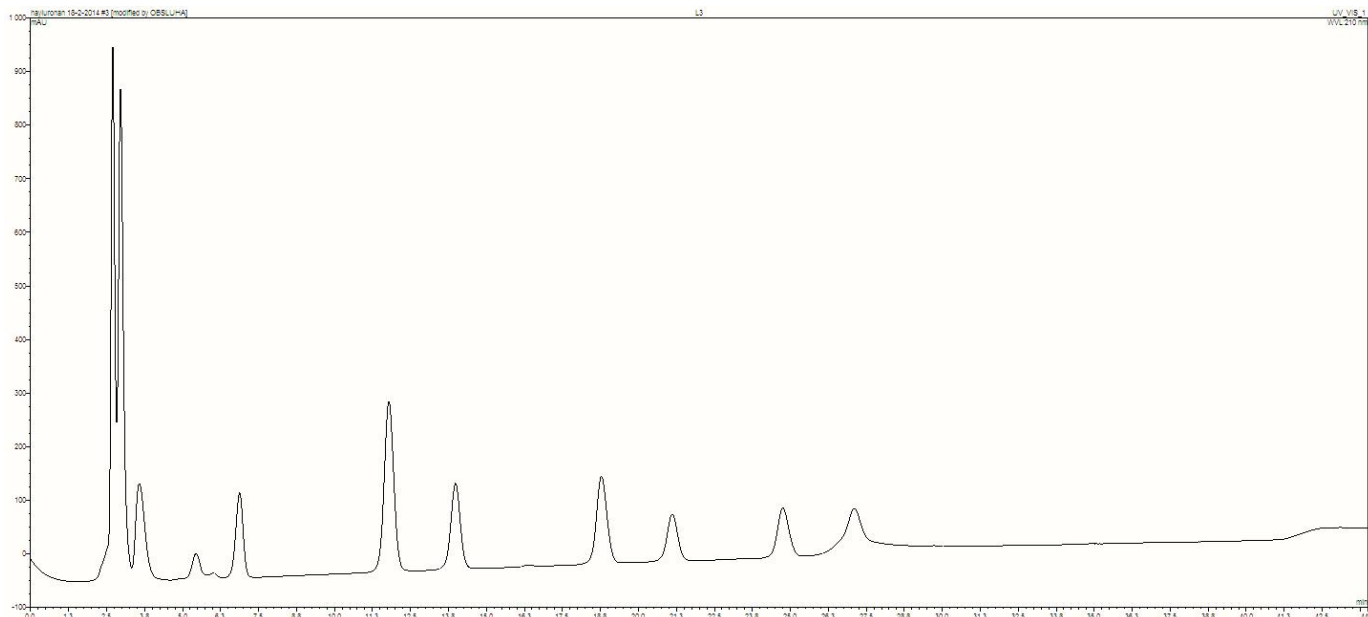
5 Výsledky

5.1 Kalibrace

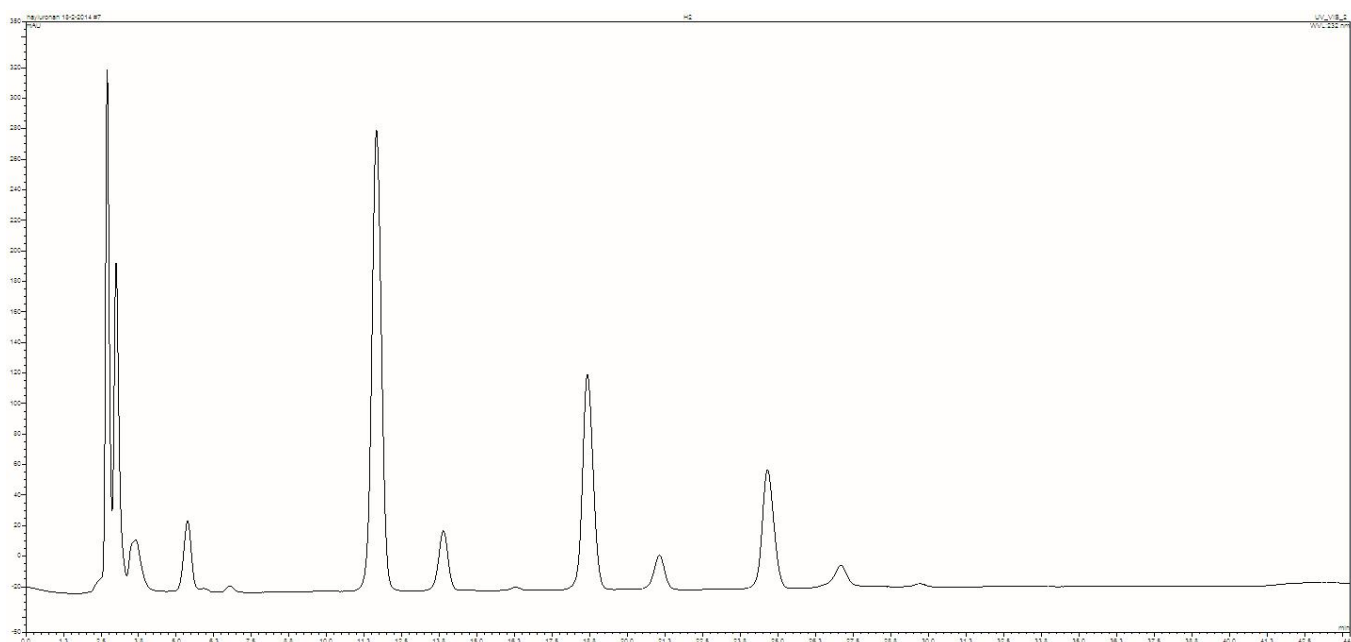
Povedlo se připravit ze standardů nasycených a nenasycených oligomerů (štěpů) hyaluronové kyseliny kalibrační roztoky o koncentracích 0,1000; 0,0100; 0,0250; 0,0120; 0,0063; 0,0031; 0,0015 a 0,0007 %, které byly proměřeny metodou HPLC. Byly získány chromatogramy jednotlivých oligomerů, které jsou v přílohách č. 2-10. Retenční časy jednotlivých oligomerů jsou uvedeny v tab. č. 3. Na základě získaných chromatogramů byly vytvořeny kalibrační křivky.

5.2 Měření štěpení hyaluronanu

Vedle standardů byla provedena analýza enzymaticky štěpeného hyaluronanu (Contipro Pharm, a.s.), který štěpili kolegové z Katedry veterinárních disciplín FAPPZ ČZU v Praze. Byly použity 2 enzymy, hydrolasa a lyasou. Oba enzymy štěpily hyaluronan na oligomery (viz obrázky č. 11 a 12). Hydrolasa štěpí na oligomery nasycené a lyasa vytváří štěpy s dvojnou vazbou (nenasycené).



Obr. č. 12.: Standard hyaluronové kyseliny štěpený lyasou, měřený při 210 nm

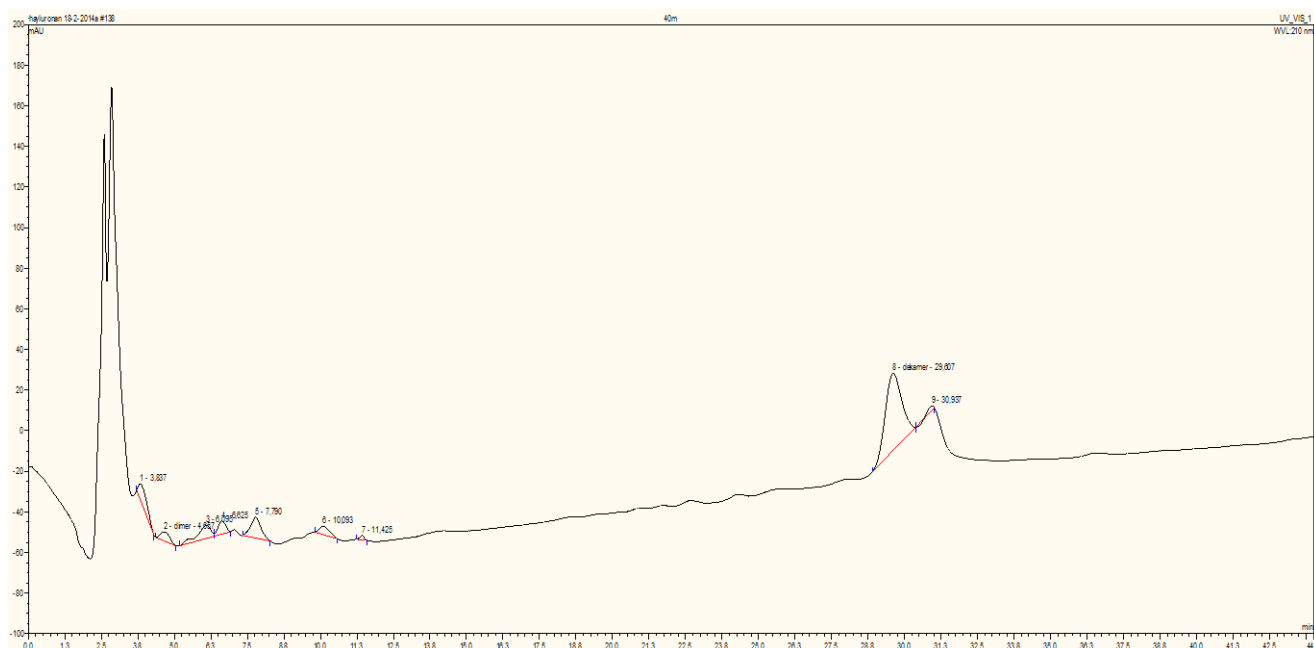


Obr. č. 13.: Standard hyaluronové kyseliny štěpený hydrolasou, měřený při 232 nm

5.3 Měření reálných (nativních) vzorků

V další fázi byly proměřovány vzorky se štěpy hyaluronové kyseliny, které dodali kolegové z KVD FAPPZ v Praze. Jednalo se o vzorky prasečích oocytů, které byly kultivovány a enzymaticky štěpeny. V těchto vzorcích se nepodařilo stanovit štěpy hyaluronové kyseliny, protože vzorky obsahovaly vysoký podíl rušivých složek viz obr.č. 13,

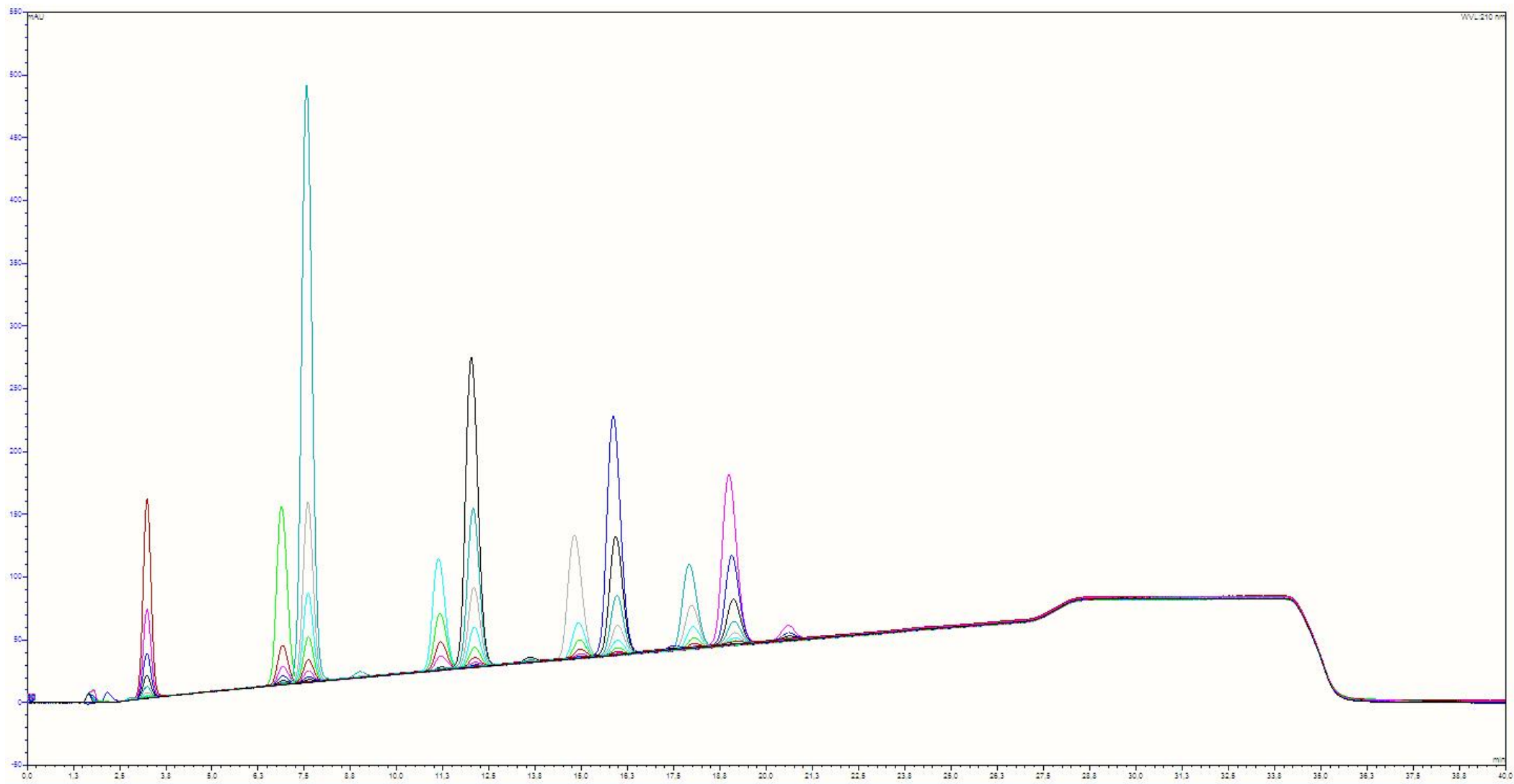
kteře zkrslily pky štěpů hyaluronanu. V další práci (diplomová práce) se budu více zabývat problematikou měření nativních vzorků, resp. přípravou vzorků před samotným měřením.



Obr. č. 14.: Chromatogram enzymaticky štěpené vzorky hyaluronové kyseliny

Tab. č. 4. : Všechny retenční časy zaznamenané v chromatogramu (viz. obr. č. 13)

	dimer		tetramer		hexamer		oktamer		dekamer	
	nas.	nenas.	nas.	nenas.	nas.	nenas.	nas.	nenas.	nas.	nenas.
Retenční čas [min]	3,24	-	7,59	6,89	11,16	12,06	14,89	15,91	17,98	19,08



Obr. č. 15. :Chromatograf nasycených a nenasycených oligomerů (dimer-dekamerů)(Retenční časy viz tabulka č. 3)

6 Diskuze

V mé práci jsem zvolila pro stanovení HA metodu HPLC s DAD detekcí. Jedná se o běžně používanou metodu, kterou využívá řada autorů, např. Ruckmani a kol. (2013), Alkrad a kol. (2002) a Volpi (2000). Vedle HPLC metod lze využít např. spektrofotometrická stanovení v UV oblasti (Homer a kol., 1993, Alkrad a kol., 2002) nebo elektroforetické metody (Alkrad a kol., 2002).

Metoda, kterou uvádí Volpi (2000), je použita v jeho práci na měření všech nenasyčených, nesulfovaných mono- a disacharidů odvozených od chondroitinu sulfátu a hyaluronové kyseliny po jejich derivatizaci s dansylhydrazínem a jejich následné separaci HPLC s fluorimetrickou detekcí. Tuto metodu jsme zkoušeli, ale pro její složitější přípravu (derivatizaci) jsme od ní upustili.

V této práci byly použity standardy nenasyčených a nasycených oligomerů (dimer-dekamery) hyaluronové kyseliny enzymaticky štěpené lyasou, nebo hydrolasou ta byla poté měřena při 232 nm (štěpy hydrolasou) a při 210 nm (štěpy lyasou). Použité vlnové délky pro detekci byly srovnatelné s použitými vlnovými délkami jiných autorů, kteří využívali vlnové délky od 195 nm (Alkrad a kol., 2002) až po 205 nm (Ruckmani a kol., 2013). V našem případě byla použita vlnová délka 201 nm, které se jevila pro naše standardy optimální.

Volpi (2000) použil materiál, chondroitinasa z *Proteus vulgaris* [EC 4.2.2.4]. Chondroitin sulfát vzorky byly extrahovány z hovězí a prasečí průdušnice a žraločí chrupavky. Dermatan sulfát byl získán z vepřové sliznice a hyaluronan z hovězí průdušnice.

Pro štěpení standardů hyaluronové kyseliny byly v naší práci použity dva enzymy bovinní lyasa [EC 4.2.2.1] a hydrolasa [EC 3.2.1.35]. Dále jsme analyzovaly vzorky štěpů hyaluronové kyseliny, které byly poskytnuty KVD FAPPZ v Praze. Vzorky byly získány z prasečích oocytů, které byly kultivovány a enzymaticky štěpeny. Použití námi zvolených enzymů přineslo uspokojivé výsledky a aktivita enzymů byla podobná jako u citovaných zdrojů.

Hyaluronová kyseliny v této práci byla stanovena pomocí systému firmy Dionex (USA) – přístroj UltiMate 3000 – stavebnicový systém HPLC s PDA detekcí. Z nasyc. a nenasyc. oligomerů byly připraveny kalibrační roztoky o koncentracích 0,1000 - 0,0007 %. Jako mobilní fáze byly použity roztoky NaCl v koncentraci 20 a 250 mM. Byla použita kolona firmy Showa Denko America, Inc. (bližší údaje viz příloha č. 1). Nástřik vzorku 50 mikrolitrů, teplota při separaci byla 35 °C. Průtok kolonou byl 1,5 ml/min.

Použitá kolona odpovídala použitým elučním roztoků, pro separaci štěpů i hyaluronové kyseliny lze využít v jiných elučních systémech např. kolony BioSepSEC S2000, 300mm-7.8 mm (Ruckmani a kol., 2013), (reverzní fáze) nebo kolony typu exchange Dowex 1×2.

Pro stanovení se používá obecně buď isokratický či gradientový režim eluce. Způsob eluce je závislý na použité koloně a typu rozpouštědel. V naší práci jsme použili gradientovou eluci. Isokratickou eluci použil např. Volpi (2000).

Retenční časy nasycených a nenasycených oligomerů se pohybovaly zhruba 3 - 19 minuty. Celková separace probíhala u našich analýz celkově 44 minut.

Retenční čas píku nenasyceného HA disacharidu v chromatogramu byl přibližně při 7 minutě (Volpi, 2000). V naší analýze jsme tento standard neměli, ale jeho retenční čas v porovnání s ostatními nenasycenými a nasycenými štěpy HA by byl někde okolo 2,5 minuty.

Reálné (nativní) vzorky se štěpy HA se nepodařilo stanovit z důvodů vysokého obsahu rušivých látek, které zkreslovaly píky štěpů a znemožnily jejich identifikaci a kvantifikaci. Reálné vzorky je třeba lépe připravit a předčistit před samotnou analýzou, čemuž se budu věnovat ve své diplomové práci.

7 Závěr

- V rešerši této práce byly shrnuty dostupné informace o struktuře, výskytu, významu hyaluronové kyseliny v organismech a využití jejích vlastností v medicíně a kosmetice.
- Hyaluronová kyselina je chemicky polymer aminoderivátů sacharidů o polymeračním stupni přibližně 5 000 až 20 000 000 monosacharidových jednotek (hmotnost až 4MDa)
- Hyaluronová kyselina je nezastupitelnou sloučeninou v organismu s celou řadou důležitých funkcí, kam patří například lubrikační hmota pro kloubní spojení, dale je přítomna ve sklivci očí, na povrchu tkání a sliznic, které hydratuje a udržuje ve fyziologicky funkčním stavu.
- V medicíně se využívá v očním lékařství, při léčbě a hojení ran. Aplikuje se buď ve formě potravních doplňků (kloubní výživa) nebo ve formě gelů a krémů nebo ve formě injekcí.
- V praktické části práce se podařilo připravit kalibrační roztoky standardů štěpů hyaluronanu (nenasycených a nasycených oligomerů hyaluronové kyseliny), které byly proměřeny HPLC a byly vytvořeny kalibrační grafy těchto látek.
- Byla provedena analýza enzymaticky štěpeného hyaluronanu za použití dvou enzymů bovinní lyasa [EC 4.2.2.1] a hydrolasa [EC 3.2.1.35]. Získané štěpy se podařilo separovat, identifikovat a kvantifikovat.
- Vlastní enzymaticky štěpené reálné vzorky se nepodařilo stanovit pro jejich vysoký obsah rušivých doprovodných látek.
- Další práce v oblasti přípravy reálných vzorků budou zahrnuty do diplomové práce.

8 Seznam použité literatury

Abbiati, G. Reaction products of hyaluronic acid and natural amino acids and their use in cosmetic and pharmaceutical compositions. United States. US 6495148 B1. 2002-12-17.

Alkrad, J. A., Merstani, Y. M., Neubert, R. H. H. New approaches for quantifying hyaluronic acid in pharmaceutical semisolid formulations using HPLC and CZE. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. [online]. listopad 2002. 30(4).

[cit. 2015-04-15]. Dostupné

z <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708502003291>>

Boeriu, C. G., Springer, J., Kooy F. K., Van den Broek L. A. M., Eggink, G. Production Methods for Hyaluronan European International Journal of Carbohydrate Chemistry. [online] listopad 2013. 2013(1). [cit. 12. 12. 2014].

Dostupné z <<http://www.hindawi.com/journals/ijcc/2013/624967/>>

Bono, P., Cordero, E., Johnson, K., Borowsky, M., Ramesh, V., Jacks, T., Hynes, R. O. 2005. Layilin, a cell surface hyaluronan receptor, interacts with merlin and radixin. *Europe PubMed Central*. [online]. Srpen 2005. 308(1) [cit. 2015-04-15]. Dostupné z <<http://europepmc.org/abstract/MED/15913605>>

Hojení ran. [online]. Contipro Pharma. 2011 [cit. 2015-04-02].

Dostupné z <<http://www.contipro.cz/index.php?lang=cs>>

Delgado, A., Deretic, V. 2009. Toll-like receptors in control of immunological autophagy. *Cell Death Differ*. 16(1). 976–983

Enoch, S., Price, P. Cellular, molecular and biochemical differences in the pathophysiology of healing between acute wounds, chronic wounds and wounds in the aged [online]. *World Wide Wounds*. Srpen 2004. [cit. 2015-04-06].

Dostupné z <<http://www.worldwidewounds.com/2004/august/Enoch/Pathophysiology-Of-Healing.html>>.

Flangea, C., Serb, A., F., Schiopu, C., Tudor, S., Sisu, E., Seidler, D. G., Zamfir, A. D. Discrimination of GalNAc (4S/6S) sulfation sites in chondroitin sulfate disaccharides by chip-based nanoelectrospray multistage mass spectrometry. Central European Journal of Chemistry. [online]. Prosinec 2009. 7(4). [cit.2015-04-07].

Dostupné z <<http://link.springer.com/article/10.2478%2Fs11532-009-0070-7>>

Garg, H., Hales Ch. 2004. Chemistry and Biology of Hyaluronan. Elsevier Science. Amsterdam. p. 624. ISBN: 9780080443829

Hascall, V. C., Laurent, T. C. Hyaluronan: Structure and Physical Properties [online]. GlycoForum. 15. Prosinec 1997 [cit. 2015-04-05].

Dostupné z <<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>>

Homer, K. A., Denbow, L., Beighton, D. Spectrophotometric method for the assay of glycosaminoglycans and glycosaminoglycan-depolymerizing enzymes. Analytical Biochemistry. [online]. Listopad 1993. 214(2) [cit. 2015-04-15].

Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7509127>>

Hyaluronate Lyase from Streptococcus pyogenes. [online]. Sigma-Aldrich. 2015 [cit. 2015-04-10]. Dostupné

z <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/56177?lang=en®ion=CZ>>

Kahemi, K., Kinoshita, M., Yasueda, S. Hyaluronic acid: separation and biological implications. Journal of Chromatography B. [online]. Listopad 2003. 797(2) [cit. 2015-04-15].

Dostupné z <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023203004793>>

Kennedy, J. F., Phillips, G. O., Williams, P. A., Hascall, V. C. 2002. Hyaluronan. Woodhead Publishing. North East Wales. s. 1152. ISBN: 9781845693121

Klingenber, H. O., EXCIPIENT UPDATE - A Real Eye-Opener: Advances in Hyaluronic Acid for Ophthalmology. [online]. Drug Development & Delivery. 31. březen 2013 [cit. 2015-04-06]. Dostupné z

http://search.proquest.com.ezproxy.techlib.cz/docview/1354932995/1647F19E86124C0B_PQ/ >

Klouda P. 2003. Moderní analytické metody. Nakladatelství Pavel Klouda. Ostrava. s. 132. ISBN-10: 8086369072

Kogan, G., Šoltés, L., Stern, R., Gemeiner, P. 2007. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. Biotechnology Letters. 29. (1). 17-25

Koolman, J., Klaus-Heinrich. R. 2012. Barevný atlas biochemie. Grada Publishing. Praha s. 512. ISBN 9788024729770

Kreil, G. Hyaluronidases-A group of neglected enzymes. Protein Science. [online]. Zář 1995. 4 (9). [cit. 2015-04-05].

Dostupné z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2143229/>

Lapčík, L., Jr., De Smedt S., Chabrecek P. 1998. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications. Chemical Reviews. 98 (8). 2663-2684.

Mikami, T., Kitagawa, H. Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. Biochimica et Biophysica Acta- General Subjects [online]. Říjen 2013. 1830(10). [cit. 2015-04-05].

Dostupné

z <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.techlib.cz/science/article/pii/S0304416513002663> >

Midwood K.S., Williams L.V., Schwarzbauer J.E. 2004. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 36(6). 1031-1037.

Nováková L., Douša M. a kol. 2013. Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. Europrint. Praha. s. 299. ISBN: 9788026042433

Olejárová, M. Chondroitin sulfát. Remedia online [online]. Březen 2010. 19 (3) [cit. 2015-03-30]. Dostupné z <<http://www.remédia.cz/Archiv-rocniku/Rocnik-2010/3-2010/Chondroitin-sulfat/e-Oa-SE-Tz.magarticle.aspx>>

O kloubech v lidském těle. [online]. Originální české doplňky stravy a doplňková krmiva.2010. [cit. 2015-04-09]. Dostupné z <<http://www.orling.cz/cz/o-kostech-a-kloubech/o-kloubech-v-lidskem-tele.html>>

Pavelka, K., Klener, O. 2002. Revmatologie Vnitřní lékařství, Svazek VII. Galén. Praha. s. 159 ISBN 80-7262-145-9

Proksch, E., Brandner J. M, Jensen J. M.. The skin: an indispensable barrier. Experimental Dermatology.[online]. 2008. 17 (1) [cit. 2015-03-30]. Dostupné z <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x/full>>

Revmatologie. [online]. Revmatologie - 3. lékařská fakulta University Karlovy. 2012 [cit. 2015-04-02]. Dostupné z <<http://old.lf3.cuni.cz/studium/materialy/revmatologie/>>

Rohrich, R., Ghavami, A., Crosby, M. 2007. The Role of Hyaluronic Acid Fillers (Restylane) in Facial Cosmetic Surgery: Review and Technical Considerations. Plastic and Reconstructive Surgery. 120 (6). 41-54.

Ruckmania, K., Shaikha, S. Z., Khalilb, P., Muneera, M. S., Thusleem, O. A. Determination of sodium hyaluronate in pharmaceutical formulations by HPLC–UV. Journal of Pharmaceutical Analysis [online]. Říjen 2013. 3(5) [cit. 2015-04-15]. Dostupné z<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095177913000129>>

Slíva J, Minárik J. 2009.Hyaluronát – nejen pasivní pozorovatel, nýbrž aktivní modulátor imunitních reakcí. Ústavy farmakologie 2. a 3. LF UK. 13(3). 143–147

Streptococcus. [online]. National microbial pathogen data resource. 2008. [cit. 2015-04-09]. Dostupné z <<http://www.nmpdr.org/FIG/wiki/view.cgi/Main/Streptococcus>>

Stair-Nawy S., Csóka A. B., Stern R. 1999. Hyaluronidase expression in human skin fibroblasts. *Biochemical and biophysical research communication*. 266 (1). 268–273.

Steinbüchel, A., Vandamme, E., Baets, S. 2002 *Biopolymers: Polysaccharides I, Polysaccharides from Prokaryotes*. Wiley-Blackwell. Weinheim. s. 534.
ISBN: 978-3-527-30226-0.

Stryja J. 2009. Akcelerace hojení rány – science fiction nebo realita?. *Hojení ran*. 3(3). 4-8

Tamer, T. M. Hyaluronan and synovial joint: function, distribution and healing. *Interdisciplinary toxicology*. [online]. Zář 2013. 6(3). [cit. 2015-04-06]. Dostupné z <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3967437/>>

Volpi, N. Hyaluronic Acid and Chondroitin Sulfate Unsaturated Disaccharides Analysis by High-Performance Liquid Chromatography and Fluorimetric Detection with Dansylhydrazine. *Analytical Biochemistry*. [online]. Ledna 2000. 277 (1).

[cit. 2015-04-06]. Dostupné z

<<http://www.sciencedirect.com.ezproxy.techlib.cz/science/article/pii/S000326979994366>
X>

Weigel, P. H., DeAngelis, P. L. 2007. Hyaluronan synthases: a decade-plus of novel glycosyltransferases. *The Journal of Biological Chemistry*. 282 (51). 36777–36781.

9 Seznam použitých zkratek

CD44.....	clusters of differentiation 44 (specifický receptor)
CS.....	chondroitin sulfát
Da	Dalton (jednotka molekulové hmotnosti, 1/12 atomové hmotnosti uhlíku 12C, 1 Da = 1,66.10 ⁻²⁷ kg)
ECM.....	extracelulární matrix
GAG	glykosaminoglykan
GlcNAc.....	N-acetylglukosamin
HA.....	hyaluronová kyselina, hyaluronan
HARE	hyaluronan receptor for endocytosis (hyaluronanový receptor)
HAS	hyaluronan-syntázy
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HYAL 1-4.....	savčí hyaluronidasa
LYVE-1.....	lymphatic vessel endothelial receptor 1 (hyaluronanový receptor na endotelu lymfatických cest)
PH-20- (SPAM-1)).....	sperm adhesion molecule 1 (testikulární hyaluronidasa)
RHAMM.....	receptor for hyaluronan-mediated motility (receptor pro HA zprostředkující buněčnou motilitu)
TLR-4	toll-like receptor 4 (receptor skupiny Toll) pro endocytózu)

10 Seznam obrázků

Obr. č. 1. <i>Streptococcus equi</i> - HA obsažená v membráně (www.nmpdr.org)	3
Obr. č. 2.: Synoviální tekutina (www.orling.cz).....	4
Obr. č. 3.: Modely chování hyaluronanu v roztoku (Garg a Hales, 2004)	5
Obr. č. 4.: Strukturní vzorec hyaluronové kyseliny (Koolman a Klaus-Heinrich, 2012).....	6
Obr. č. 5.: Ukazuje několik propojených molekul hyaluronanu, které byly položeny na rovném povrchu těžkého kovu pro kontrast a byly sledovány elektronovým mikroskopem (Garg a Hales, 2004)	7
Obr. č. 6.: Savčí hyaluronidasa (Garg a Hales, 2004)	11
Obr. č. 7.:Zjednodušené schéma chromatografu (Nováková, Douša a kol. 2013).	13
Obr. č. 8.: Strukturovaný vzorec chondroitinu sulfátu (Flangea a kol., 2009)	15
Obr. č. 9. : Schéma kloubu při Revmatoidní artritidě (Tamer, 2013).....	20
Obr. č. 10. :Hojení ran pomocí hyaluronové kyseliny (www.contipro.cz).....	24
Obr. č. 11.: Strukturovaný vzorec 1. nenasycené HA, 2. nasycené HA (Volpi, 2000)	25
Obr. č. 12.:Standard hyaluronové kyseliny štěpený lyasou, měřený při 210 nm	27
Obr. č. 13.: Standard hyaluronové kyseliny štěpený hydrolasou, měřený při 232 nm	27
Obr. č. 14.: Chromatogram enzymaticky štěpené vzorky hyaluronové kyseliny	28
Obr. č. 15. :Chromatograf nasycených a nenasycených oligomerů (dimer-dekamerů)	29

11 Seznam tabulek

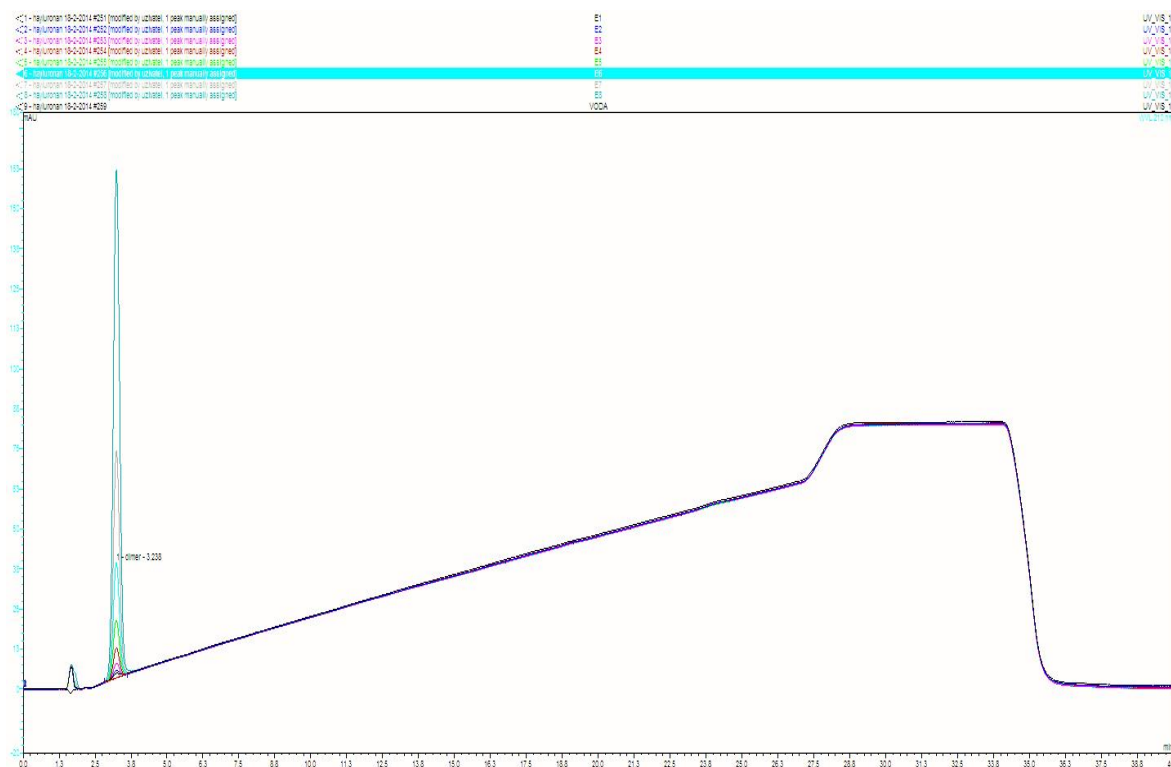
Tab. č. 1.: Hyaluronát sodný v lidském těle (Slíva a Minařík, 2009).....	4
Tab. č. 2.: Tabulka systému hyaluronové syntézy podle Weigl a DeAngelis (2007).....	7
Tab. č. 3.: Průběh gradientové eluce.....	26
Tab. č. 4.: Zaznamené retenční časy z chromatogramu (viz. obr. č. 13).....	28

12 Seznam příloh

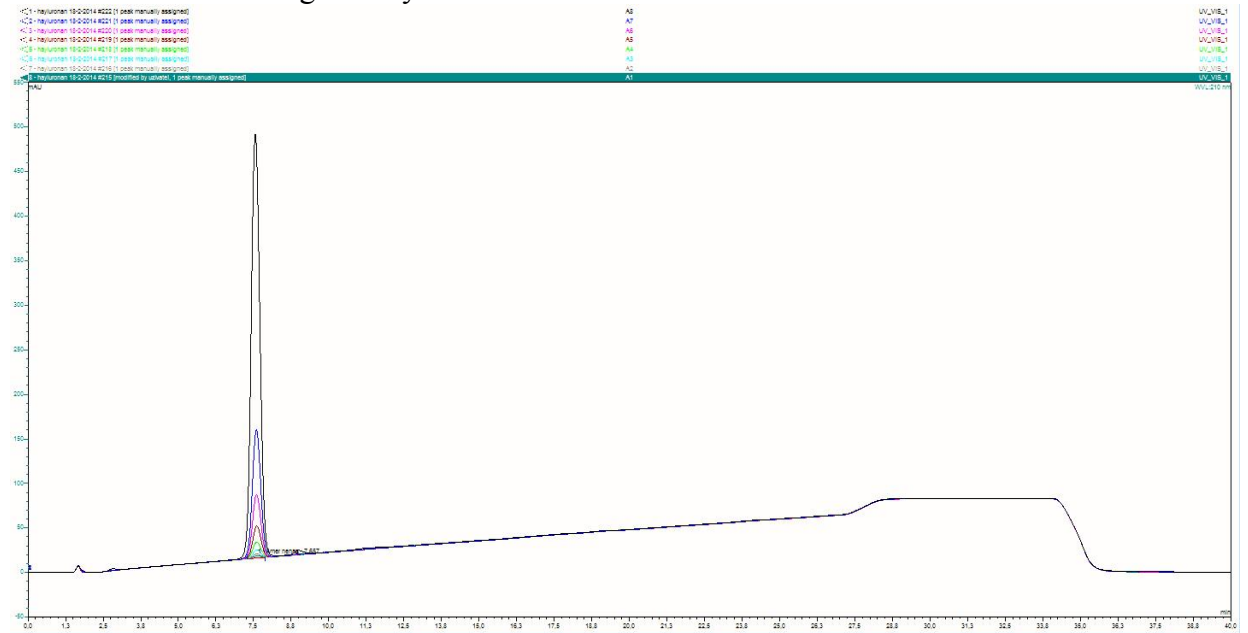
Příloha č. 1: Vlastnosti kolony IEC QA-825

Vlastnosti produktu	
Materiál kolony	Polyhydroxový methyl akrylát
Funkční skupina	QA
Délka kolony	8,0-75 (mm)
Velikost částic	12 µm
Maximální tlak v koloně	2,0 MPa
Maximální použitelný průtok	1,5 ml/min
Teplotní rozsah	10 až 50(°C)
Rozsah pH	2-12
Velikost pórů (A)-průměr	5000
Ion-výměnná kapacita	0,5 meg/g
Koncentrované org. rozpouštědlo	20%
Koncentrace soli	20 mm-1,0 M
Produkt	F611 00 11

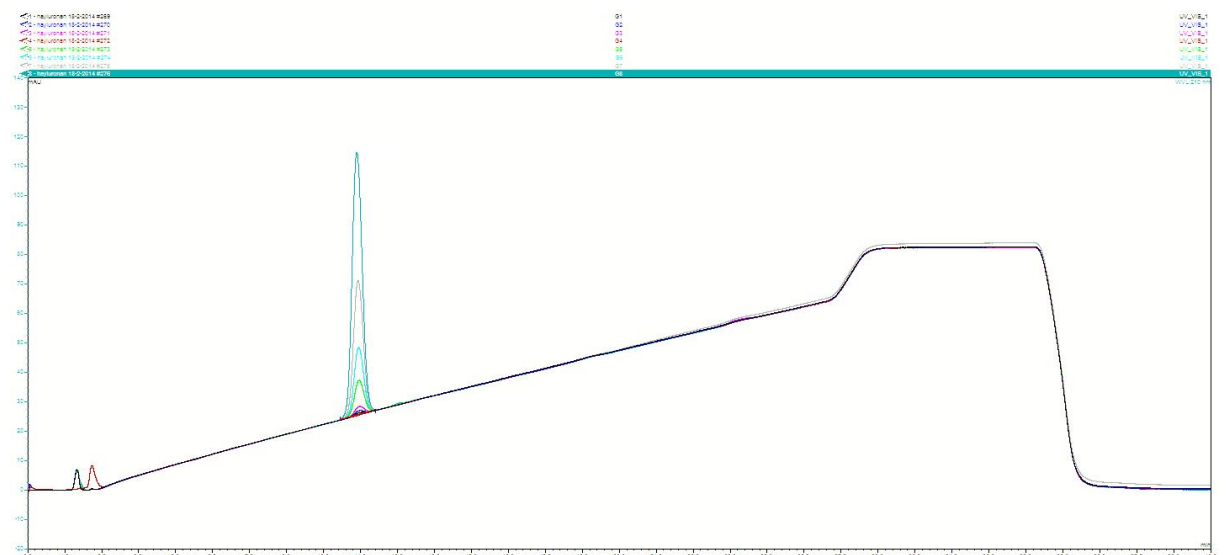
Příloha č. 2: Chromatograf nasyceného dimeru HA



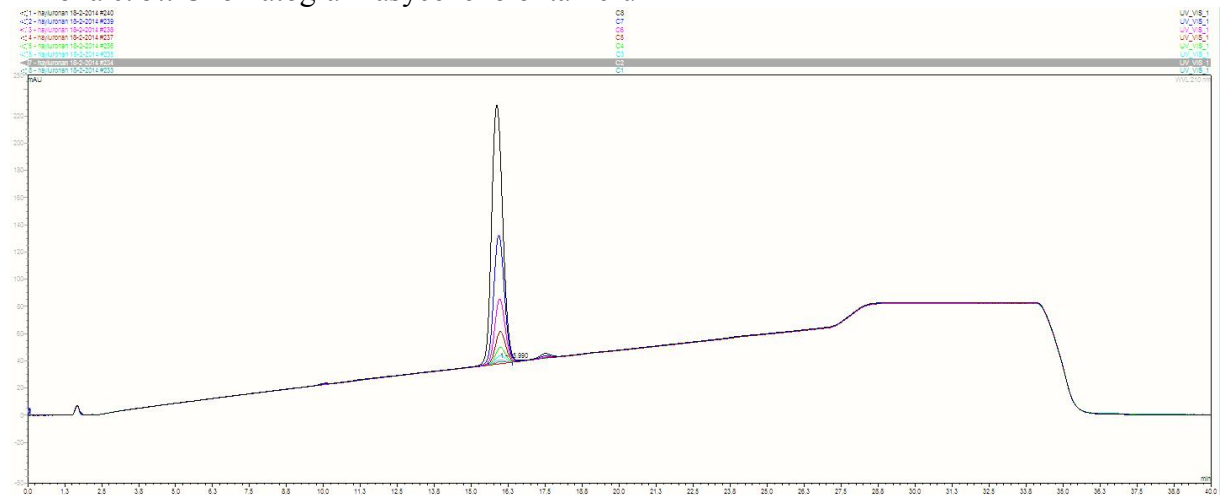
Příloha č. 3.: Chromatograf nasyceného tetrametru HA



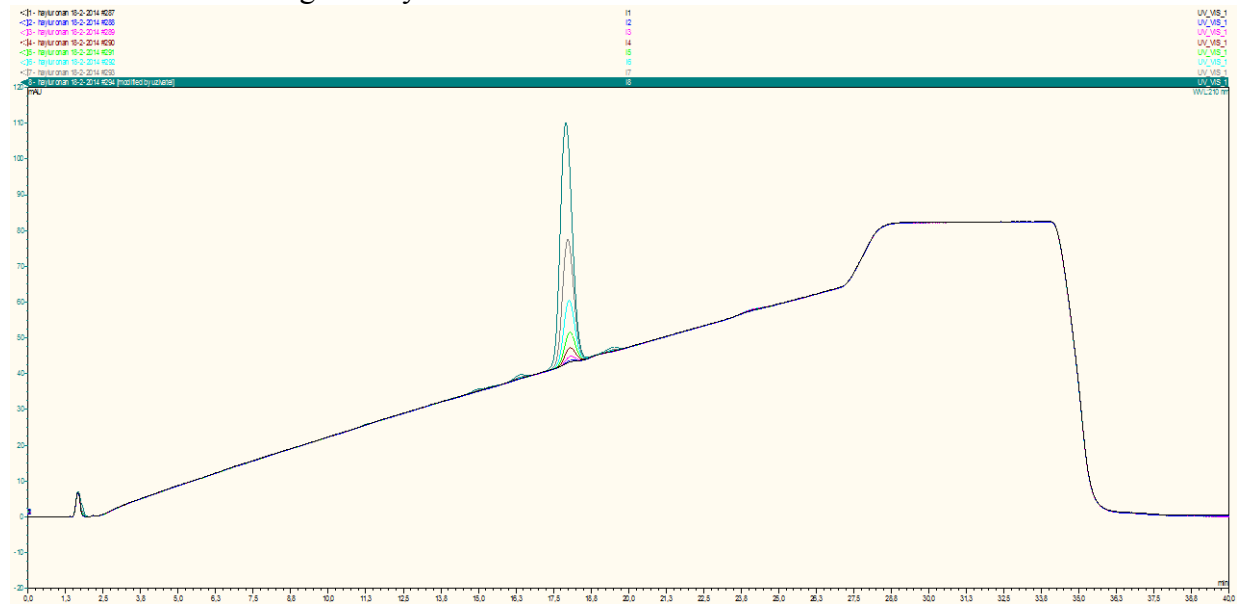
Příloha č. 4.: Chromatograf nasyceného hexameru HA



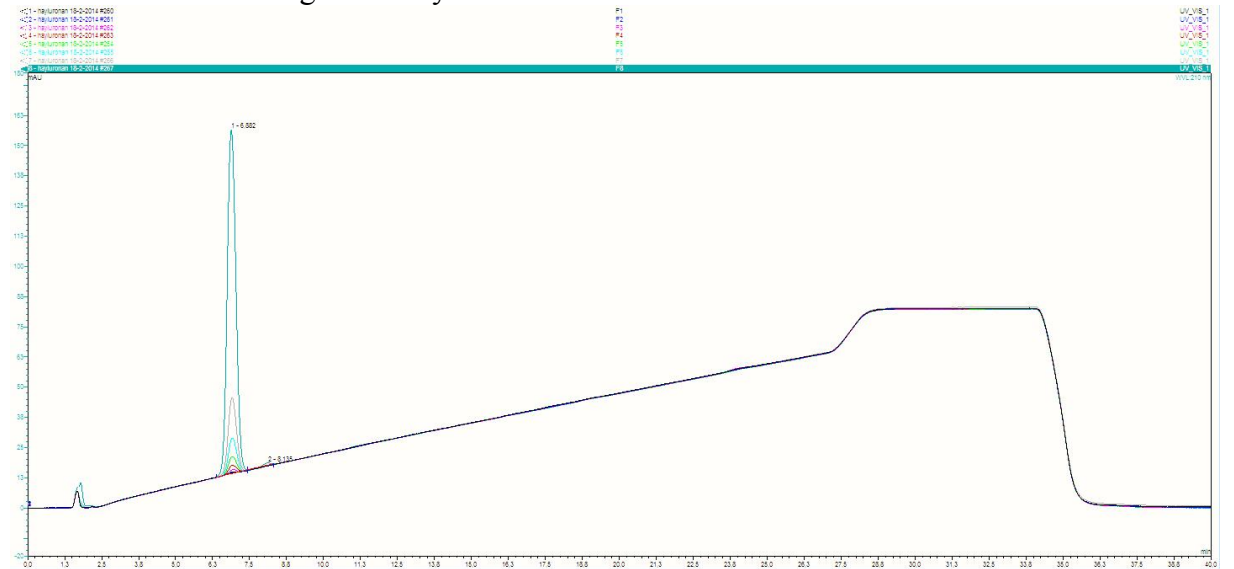
Příloha č. 5.: Chromatograf nasyceného oktameru HA



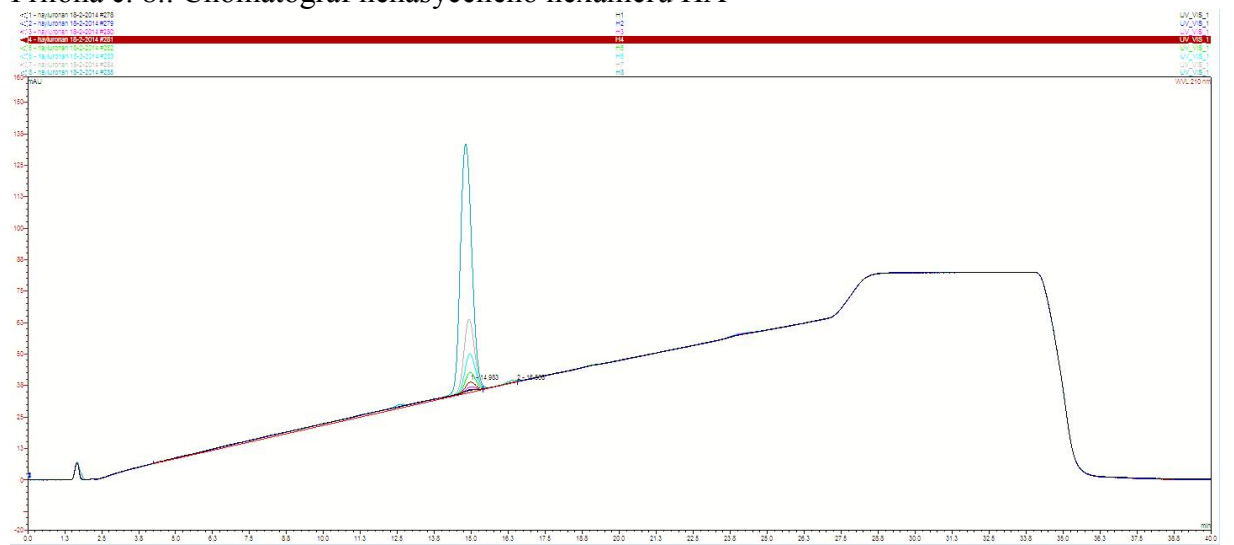
Příloha č. 6.: Chromatograf nasyceného dekameru HA



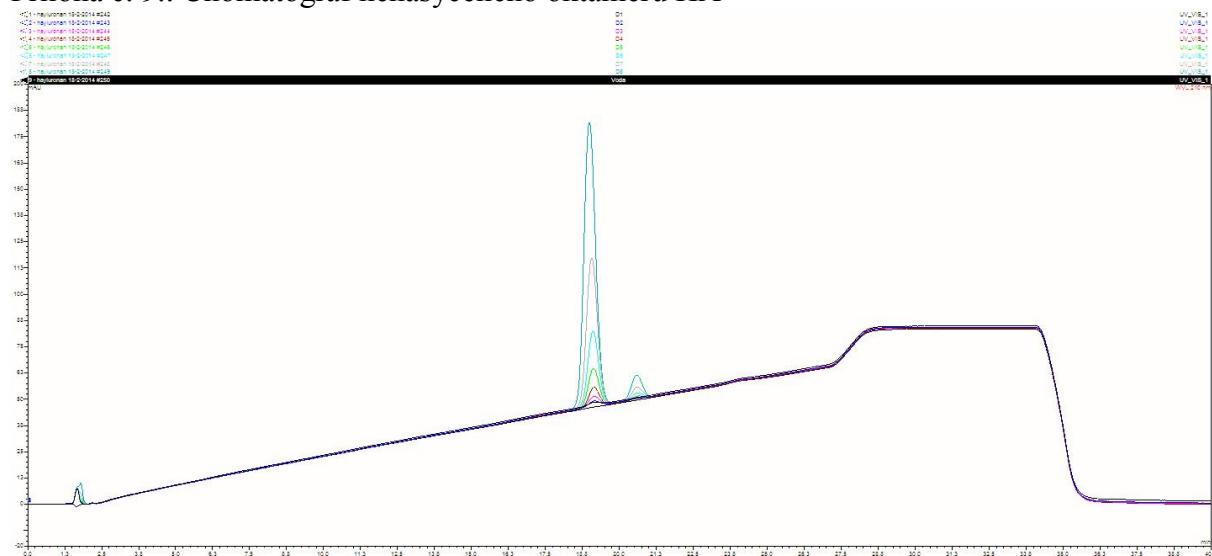
Příloha č. 7.: Chromatograf nenasyceného tetrametu HA



Příloha č. 8.: Chromatograf nenasyceného hexameru HA



Příloha č. 9.: Chromatograf nenasyceného oktameru HA



Příloha č. 10.: Chromatograf nenasyceného dekameru HA

