

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Hyaluronová kyselina a její deriváty

Klára Kajtmanová

Bakalářská práce

2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Klára Kajtmanová
Osobní číslo: C14075
Studijní program: B2830 Farmakochemie a medicínální materiály
Studijní obor: Farmakochemie a medicínální materiály
Název tématu: Hyaluronová kyselina a její deriváty
Zadávající katedra: Ústav organické chemie a technologie

Zásady pro vypracování:

1. Seznamte se se základními informacemi o kyselině hyaluronové - chemická podstata, výskyt, význam, výroba a použití - se zvláštním zaměřením na deriváty této kyseliny.
2. Proveďte rešerši na téma chemická analýza kyseliny hyaluronové a jejích derivátů.
3. Výsledky zpracujte formou závěrečné zprávy.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Všechna dostupná chemická literatura.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Martin Bartoš, CSc.

Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce:

28. února 2017

Termín odevzdání bakalářské práce:

3. července 2017



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 3. 7. 2017

Klára Kajtmanová

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat panu Ing. Martinovi Bartošovi, CSc. za vedení mé bakalářské práce, za cenné rady a informace, které mi poskytl. Chtěla bych také poděkovat své rodině za podporu během celého studia.

ANOTACE

Tato bakalářská práce je věnována analýze kyseliny hyaluronové se zvláštním zaměřením na její deriváty. Jsou zde uvedeny základní informace o její struktuře, použití a historii objevu. Dále jsou zde také zmíněny základní informace o vzniku její polymerní struktury. Součástí práce jsou různé možnosti modifikace kyseliny hyaluronové a analytická stanovení tohoto polymeru a jeho derivátů.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kyselina hyaluronová, deriváty, analýza, modifikace

TITLE

Hyaluronic acid and its derivatives

ANNOTATION

This bachelor thesis is devoted to the analysis of hyaluronic acid with a special focus on its derivatives. Here are some basic information about its structure, usage, and history of discovery. Furthermore, basic information on the formation of its polymeric structure is also mentioned. Part of the thesis is various possibilities of modification of hyaluronic acid and analytical determination of this polymer and its derivatives.

KEYWORDS

Hyaluronic acid, derivatives, analysis, modification

OBSAH

OBSAH	7
SEZNAM ILUSTRACÍ	9
SEZNAM TABULEK	10
SEZNAM ZKRATEK	11
ÚVOD	12
OBECNÁ ČÁST	13
1. Kyselina hyaluronová	13
2. Historie.....	14
3. Chemická struktura	14
3.1. Struktura HA v roztoku	16
4. Syntéza HA – vznik polymerní struktury	17
5. Výskyt.....	18
6. Degradace	20
7. Farmakokinetika	21
8. Použití HA a jejích derivátů pro medicínské aplikace.....	21
9. Deriváty kyseliny hyaluronové.....	24
9.1. Modifikace karboxylové skupiny	25
9.2. Modifikace hydroxylové skupiny	27
ANALYTICKÁ ČÁST	28
1. Charakterizace struktury	28
1.1. Výpočet stupně modifikace kyseliny hyaluronové.....	28
1.2. Určení typu vazby vytvořené během modifikace kyseliny hyaluronové	29
1.3. Kvantifikace primárního aminu ninhydrinovým stanovením.....	31
2. Morfologie	32
2.1. Morfologie derivátů kyseliny hyaluronové	32
2.2. Výpočet velikosti a tvaru částic derivátů kyseliny hyaluronové	33
2.3. Morfologie derivátů kyseliny hyaluronové ve vodných roztocích.....	34
2.4. Hydrodynamické chování mikročástic derivátů kyseliny hyaluronové	37
3. Fyzikální vlastnosti	39
3.1. Stanovení molekulové hmotnosti derivátů kyseliny hyaluronové.....	39
3.2. Měření molekulové hmotnosti derivátů kyseliny hyaluronové	39
3.3. Tepelné chování derivátů kyseliny hyaluronové	40
3.4. Kondenzační schopnost derivátů kyseliny hyaluronové s DNA	41

ZÁVĚR	43
POUŽITÁ LITERATURA	45

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1 – Struktura hyaluronanu.	13
Obrázek 2 – Struktura opakující se základní jednotky HA.	14
Obrázek 3 – Struktura D-glukuronové kyseliny.	15
Obrázek 4 – Struktura N-acetylglukosaminu.	16
Obrázek 5 – Struktura kyseliny hyaluronové v roztoku	16
Obrázek 6 – Elektronová mikroskopie Streptococcus equisubsp. Zooepidemicus získané z pozdní exponenciální fáze provzdušněné kultury.	18
Obrázek 7 – Šipka znázorňuje místo působení hyaluronidázy.	20
Obrázek 8 – Schematický náčrt interakce mezi HA a proteoglykanem chrupavky. LP je spojovací protein.	22
Obrázek 9 – Opakující se disacharidové jednotky HA. Červené šipky označují primární místa vhodná pro chemickou modifikaci.	25
Obrázek 10 – Selektivní primární modifikace karboxylové skupiny na HA.	25
Obrázek 11 – Selektivní primární modifikace hydroxylové skupiny na HA.	27
Obrázek 12 – ¹ H NMR spektra kyseliny hyaluronové v D ₂ O (a), D ₂ O s NaOH (b) a ¹ H NMR spektra v D ₂ O u HA-alaninu (c)	29
Obrázek 13 – FT-IR-ATR spektra (A) suchého a (B) hydratovaného hyalového gelu.	30
Obrázek 14 – FTIR spektra (a) hyaluronanu a N-alkyl derivátů HA: b) N-butyl-HA, c) N-hexyl-HA, d) N-oktyl-HA, e) N-decyl-HA a (f) N-dodecyl-HA.	31
Obrázek 15 – ¹ H NMR spektrum N-acetylmočoviny.	32
Obrázek 16 – Skenovací elektronové mikrofotografie esterifikovaného derivátu HA; A pro 1,5%(w/w); B pro 3%(w/w).	33
Obrázek 17 – TEM obrazy a rozložení velikosti nanočástic hyaluronanu zesítěného pomocí 2,2'(ethylendioxy)bis(ethylaminu). A) HA při 50% b) HA při 100%.	34
Obrázek 18 – AFM vzorků, kde velikost zobrazených objektů souvisí s intenzitou světla a s kalibrační stupnicí napravo od snímků.	37
Obrázek 19 – Morfologie nanočástic HA obsahujících cisplatinu pozorovaná pomocí TEM	38
Obrázek 20 – Distribuce velikosti nanočástic HA obsahujících cisplatinu byla měřena pomocí DLS při pokojové teplotě.	38
Obrázek 21 – Distribuce molekulové hmotnosti pro koncentraci 0,5% HA a v přítomnosti 5% karbodiimidu v různých stupních během hydrolýzy (pH ≈ 7)	40
Obrázek 22 – DSC termogram ilustrující tepelné chování hydrogelu HA a jeho složek. Polyethylenglykol–propiondialdehyd (a); HA přírodní (b); HA-dihydrazid kyseliny adipové (c); HA hydrogelový film (d).	41
Obrázek 23 – Elektroforetický test komplexů HAP/DNA s různými poměry N/P	42

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 – Distribuce hyaluronanu v různých tkáních krysy	19
Tabulka 2 – Normální koncentrace ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) HA v různých orgánech u různých živočišných druhů	19
Tabulka 3 – Přehled chemicky modifikovaných hyaluronanů a jejich medicínských aplikací.....	24

SEZNAM ZKRATEK

HA	hyaluronová kyselina
ECM	extracelulární matrix
GAG	glykosaminoglykany
HAS	hyaluronan syntáza
GlcNAc	N-acetylglukosamin
GlcUA	kyselina glukuronová
UDP	uridindifosfát
BDDE	1,4-butandiol diglycidylether
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
GTA	glutaraldehyd
DVS	divinylsulfon
SEC-MALS	size exclusion chromatography multi angle (Laser) light scattering
NMR	nukleární magnetická rezonance
IČ	infračervený
FTIR	Fourier transform infrared (spectroscopy)
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
AFM	Mikroskopie atomárních sil
DLS	Dynamický rozptyl světla
DSC	Diferenční skenovací kalorimetrie
AFFFF	Asymetrická field flow frakcionace

ÚVOD

Kyselina hyaluronová (HA), zvaná také hyaluronan, je biopolysacharid s vysokou molekulovou hmotností, objevený v roce 1934 Karlem Meyerem a jeho asistentem Johnem Palmerem ve sklivci skotu.

V přírodě existuje HA ve formě soli, nikoliv ve formě kyseliny, proto je termín hayluronan používán v dnešní době častěji. Samotná kyselina hyaluronová existuje většinou pouze v chemických laboratořích, protože dochází k její rychlé degradaci a její roztok je velmi kyselý.

Od třicátých let byly o HA napsány desítky tisíc článků a zájem o ni stále vzrůstá. Jelikož je prakticky distribuována po celém těle, může být efektivně využívána pro navrhování různých aplikací pro podávání léčiv.

Přírodní hyaluronan je díky své rychlé vstřebatelnosti v lidském těle omezen pro vlastní medicínské aplikace a proto se dává přednost tzv. derivatizaci.

Deriváty HA si ponechávají podobné příznivé biologické funkce kyseliny hyaluronové a tím roste jejich uplatnění v medicíně.

Mezi světové lídry ve výrobě a výzkumu kyseliny hyaluronové je ryze česká farmaceutická a kosmetická společnost Contipro a.s. v Dolní Dobrouči.

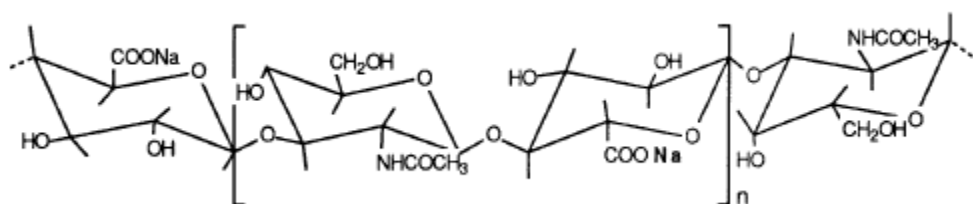
OBEČNÁ ČÁST

1. Kyselina hyaluronová

Je polysacharid, který patří do skupiny dříve známé jako kyselé mukopolysacharidy. Nyní je tato skupina označována jako glykosaminoglykany (GAG). [13]

Je to jediný nesulfátový GAG vyskytující se přirozeně ve všech živých organismech. Ve své přirozené formě existuje kyselina hyaluronová jako polymer o vysoké molekulové hmotnosti $10^6 - 10^7$ Da. Může obsahovat až několik tisíc sacharidů navázaných za sebou. Pokud se neváže na jiné molekuly, váže se na vodu, která jí dává vlastnosti kvalitou připomínající gel.[2,3,4]

Fyziologicky tato molekula neexistuje ve formě kyseliny, ale spíše jako sodná sůl. Proto celý název kyselina hyaluronová je poněkud redundantní a materiál by měl být správně nazvaný jako hyaluronát sodný nebo hyaluronan.[1]



Obrázek 1 – Struktura hyaluronanu.[11]

Označení hyaluronan tedy odráží skutečnost, že HA existuje in vivo nikoliv ve formě protonované kyseliny, ale ve formě polyanionu. Každá jeho glukuronátová jednotka nese při fyziologickém pH záporný náboj a negativní náboje na karboxylových skupinách jsou vyváženy mobilními kationty, jako je například Na^+ . [6]

Glukosaminoglykany

Jsou dlouhé nerozvětvené polysacharidy obsahující opakující se diasacharidovou jednotku sestávající se z N-acetylhexosaminu, jako je glukosamin a hexosová nebo hexauronová kyselina, přičemž jeden nebo oba mohou být sulfatovány. Mohou mít

vlastnosti podobné gelu, protože jejich struktura umožňuje významnou sorpci vody. Mezi nejznámější zástupce je považována kyselina hyaluronová, chondroitin sulfát, keratan sulfát a heparin. Obecně je tato skupina látek důležitou součástí pojivové tkáně.[22]

2. Historie

HA byla poprvé popsána v roce 1934 Karlem Mayerem a jeho kolegou Johnem Palmerem, kteří ji izolovali ze sklivce hovězího oka. Zjistili, že látka obsahuje dvě molekuly cukru, z nichž jedna byla hexauronové kyseliny.[1,2]

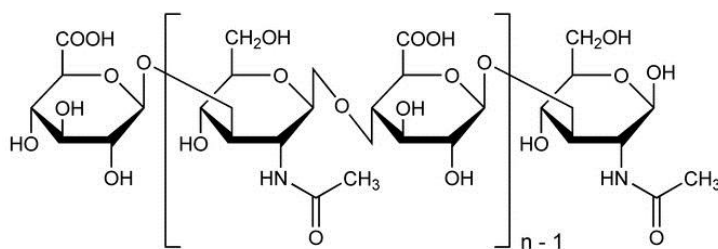
Pro větší pohodlí ji pojmenovali kyselinou hyaluronovou. Přesněji kombinací řeckého slova *hyalos* = 'sklo' s koncem 'uronová kyselina', dle typu kyseliny, kterou ve struktuře našli.

Trvalo 20 let než Weissmann a Meyer konečně stanovili přesnou strukturu opakujícího se disacharidu a konkrétně popsali jednotky kyseliny hyaluronové.[14]

Termín "hyaluronan" byl zaveden v roce 1986, aby odpovídal mezinárodnímu názvosloví pro polysacharidy, a je přičítán Endre Balazsovi (1986), který jej vytvořil tak, aby zahrnoval různé formy molekuly jako např. kyselá forma, kyselina hyaluronová nebo i soli, jako je např. sodná sůl kyseliny hyaluronové.[2]

3. Chemická struktura

Z chemického hlediska je strukturou nerozvětvený polysacharid, kde se střídají disacharidy glukuronové kyseliny a N-acetylglukosaminy. Dohromady jsou spojeny střídajícími se $\beta 1 \rightarrow 4$ a $\beta 1 \rightarrow 3$ glykosidickými vazbami, jak je znázorněno na obrázku 2.[1,2]

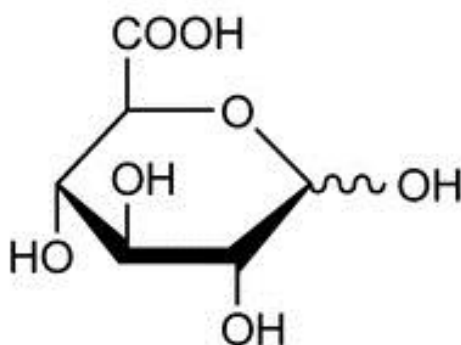


Obrázek 2 – Struktura opakující se základní jednotky HA.[5]

Oba cukry jsou v prostoru spojeny do glukózy, která v konfiguraci beta umožňuje všem svým objemným skupinám (hydroxylové skupiny, karboxylové skupiny a anomerní uhlík na sousedním cukru), aby se nacházely ve stericky výhodných ekvatoriálních pozicích, zatímco všechny malé atomy vodíku zabírají méně stericky příznivé axiální polohy. Tímto je dáno, že struktura disacharidu je energeticky velmi stabilní.[2]

Kyselina glukuronová

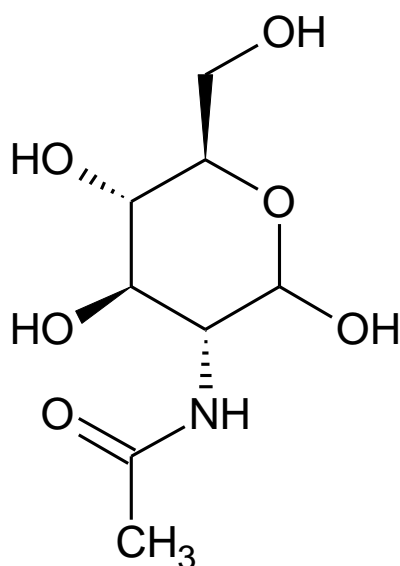
Je sloučenina, odvozená z oxidace glukózy. Je důležitou složkou dásní a slizu. Kyselina glukuronová (GlcUA) se může kombinovat s hydroxylovými (-OH), karboxylovými (-COOH) nebo amino skupinami (-NH₂) za vzniku glukuronidu. Přidáním skupiny glukuronidu k molekule, tzv. glukuronidaci se obecně zvyšuje rozpustnost sloučenin. Proto glukuronidace hraje důležitou roli při vylučování cizích látek.[19]



Obrázek 3 – Struktura D-glukuronové kyseliny.[8]

N-acetylglukosamin

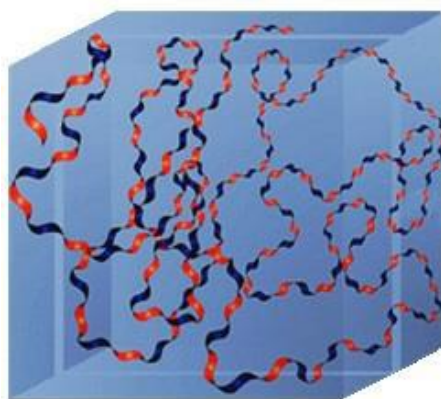
Je společná strukturní jednotka rostlinných glykoproteinů a mnoha živočišných a bakteriálních glykoproteinů. N-acetylglukosamin (GlcNAc) je často konečný cukr oligosacharidu. Je částí glykoproteinu, která je glykosidicky spojena s amidovým dusíkem bílkovinného asparaginového zbytku.[20]



Obrázek 4 – Struktura N-acetylglukosaminu.[22]

3.1. Struktura HA v roztoku

Páteří hyaluronanové molekuly ve fyziologickém roztoku je kombinace chemické struktury disacharidu spolu s vnitřními vodíkovými vazbami a s neméně důležitými interakcemi s rozpouštědlem. Nepolární hydrofobní část tvoří axiální vodíkové atomy, zatímco ekvatoriální postranní řetězce tvoří více polární hydrofilní část, čímž se vytváří struktura náhodného klubka.[12]



Obrázek 5 – Struktura kyseliny hyaluronové v roztoku.[12]

Roztoky hyaluronanu projevují velmi neobvyklé reologické vlastnosti - jsou mimořádně kluzké a velmi hydrofilní.[2]

4. Syntéza HA – vznik polymerní struktury

Enzymatická syntéza

Buněčná syntéza HA je jedinečný a vysoce kontrolovaný proces. Většina GAG se vyrábí v sítích Golgiho buněk. HA je přirozeně syntetizována třídou integrálních membránových proteinů nazývaných hyaluronan syntázy (HAS), z nichž obratlovci mají tři typy: HAS1, HAS2 a HAS3. Hyaluron syntáza je enzym, který dokáže syntetizovat velké lineární polymery podle opakující se disacharidové struktury hyaluronanu.

Tato struktura se syntetizuje v buněčné membráně střídavým přidáváním kyseliny glukuronové a N-acetylglukosaminu, jako prekurzory zde vystupují jejich aktivované nukleotidové cukry UDP - kyselina glukuronová (UDP-GlcUA) a UDP-N-acetylglukosamin (UDP-GlcNAc). Střídavým přidáváním disacharidů se vytvoří dlouhý řetězec, kde počet opakujících se jednotek vzniklého hyaluronanu může dosáhnout čísla 10 000 i více.[2,7]

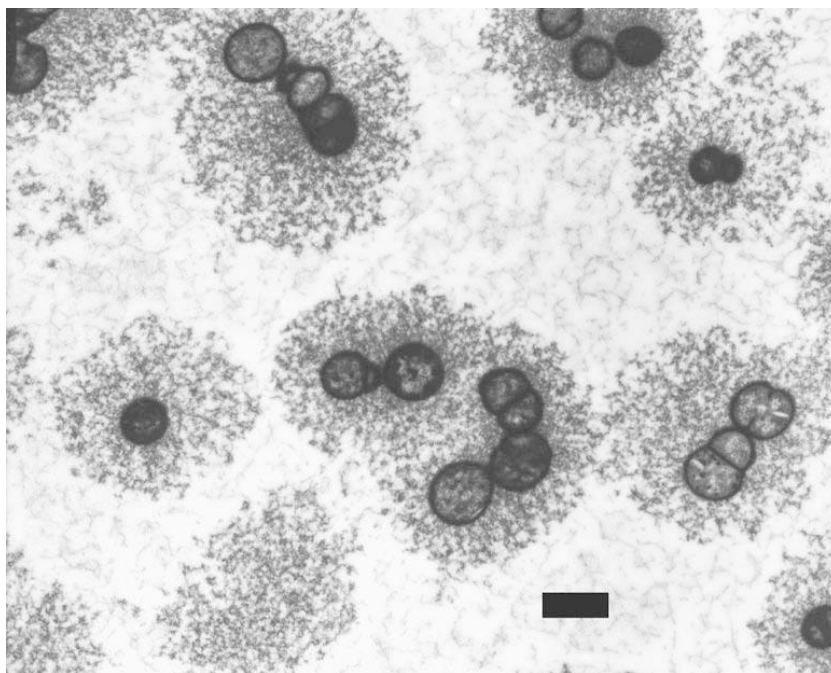
Biosyntéza probíhá následovně:



Mikrobiální syntéza

HA lze extrahovat z kohoutích hřebenů nebo ji lze vyrobit pomocí mikrobiální fermentace. V hřebenu je HA v komplexu s proteoglykany, které zajišťují při izolaci vysokou čistotu. Navíc, použití biochemických přípravků získaných ze zvířat se v terapii stává stále výhodnější, jelikož dochází ke snižování rizika virové kontaminace a tím vzniku náhodné infekce. Proto je mikrobiální výroba postupně více preferovanější metodou extrakce HA.[31]

HA je syntetizována jako extracelulární kapsle pomocí patogenních streptokoků skupiny A a C. Pod mikroskopem se tyto nesporulační a nepohyblivé bakterie objevují jako sférické nebo ovoidní buňky, které jsou typicky uspořádány ve dvojicích nebo řetězcích obklopených rozsáhlou extracelulární kapslí (obr. 6).[31]



Obrázek 6 – Elektronová mikroskopie *Streptococcus equisubsp. Zooepidemicus* získané z pozdní exponenciální fáze provzdušněné kultury.[31]

Kapsle chrání bakterie před reaktivními oxidy uvolňovanými bílými krvinkami. Tyto oxidy bojují proti bakteriím. V neposlední řadě kapsle HA podporuje migraci epiteliálními vrstvami (např. plicního epitelu) do tkání.[31]

5. Výskyt

Je prokázáno, že HA je přítomna v tělech všech obratlovců, jakožto důležitá složka extracelulární matrix (ECM).[6]

Důkladná analýza těla krysy, by měla být obecně použitelná na jiné savce. Asi polovina HA byla získána z kůže. Kostra a klouby spolu tvoří zhruba čtvrtinu. Zbytek byl téměř stejně rozdělen mezi svaly a vnitřnosti (tabulka 1).[13]

Tabulka 1 – Distribuce hyaluronanu v různých tkáních krysy.[13]

	Váha [g]	HA celkově [mg]	HA [%]
Celá krysa	201	60,5	100
Kůže	40,2	33,8	56
Svaly	35,7	4,69	8
Kostra a podpůrná tkáň	57,6	16,2	27
Střevo a žaludek	15,8	0,5	1
Zbývající vnitřní orgány	43,4	5,25	9

Srovnávací údaje pro různé druhy tkání a orgánů jsou patrné z tabulky 2, kde nalezneme, že nejvyšší koncentrace HA se nacházejí v typických pojivových tkáních, jako je pupečnicková šňůra, synoviální tekutina, pokožka či sklivec. Významná množství jsou také přítomna v plicích, ledvinách, mozku či svaly. V játrech se HA vyskytuje velmi málo, nejnižší koncentrace se vyskytuje v krevním séru.[13]

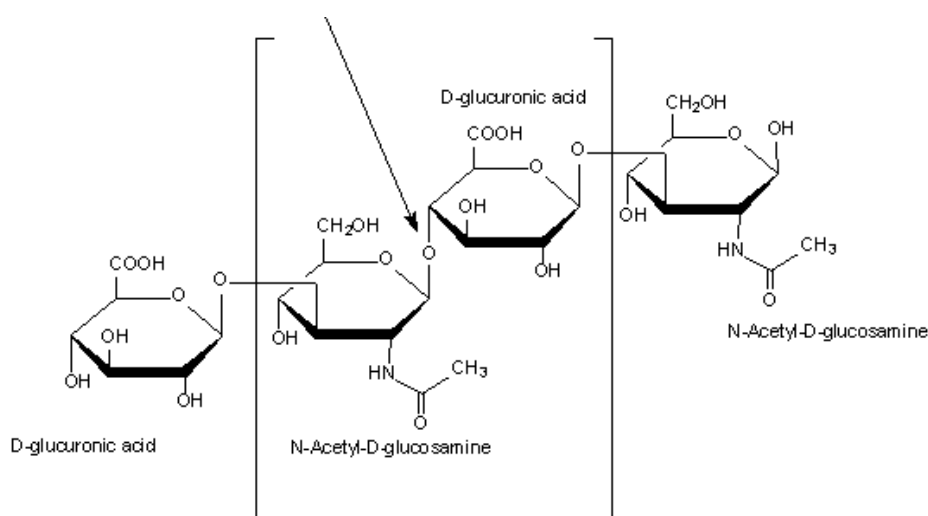
Tabulka 2 – Normální koncentrace ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) HA v různých orgánech u různých živočišných druhů.[13]

Orgány nebo tekutina	Člověk	Ovce	Králík	Krysa
Pupeční šňůra	4100			
Synoviální tekutina	1400-3600	540	3890	
Dermis - pokožka	200			
Sklivec	140-338	260	29	
Plice		98-243		34
Ledviny			93-113	30
Ledvinová papilla			250	
Ledvinová kůra			4	
Mozek	35-115		54-76	74
Sval			27	
Střevo				44
Hrudní lymfa	8,5-18	1,34		5,4
Játra			1,5	4
Moč	0,1-0,3			
Plazma (sérum)	0,01-0,1	0,12-0,31	0,019-0,086	0,048-0,26

6. Degradace

HA podléhá fragmentaci katabolickým procesem nebo metabolismem tkání, lymfatických uzlin, krve, jater a ledvin, které mají různé biochemické úlohy.[4]

U savců je enzymatická degradace HA výsledkem působení tří typů enzymů: hyaluronidázy (hyázy), β -d-glukuronidázy a β -N-acetylhexosaminidázy. V celém těle se tyto enzymy vyskytují v různých formách, intracelulárně a v séru. Obecně hyáza štěpí HA s vysokou molekulovou hmotností na menší oligosacharidy, zatímco β -d-glukuronidáza a β -N-acetylhexosaminidáza dále degradují oligosacharidové fragmenty odstraněním neredukujících koncových cukrů.[2]



Obrázek 7 – Šipka znázorňuje místo působení hyaluronidázy.[15]

Produkty degradace hyaluronanu, oligosacharidů a hyaluronanu s velmi nízkou molekulovou hmotností vykazují pro-angiogenní vlastnosti. Katalyzací hydrolyzy kyseliny hyaluronové, hlavní součásti intersticiální bariéry, hyaluronidáza snižuje viskozitu kyseliny hyaluronové, čímž se zvyšuje propustnost pro tkáň. Proto je používána v medicíně ve spojení s jinými léky, aby se urychlil jejich rozptyl. Nejběžnější aplikace je v oční chirurgii, ve které se používá v kombinaci s lokálními anestetiky. Některé bakterie, jako je *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenese pneumoniae* a *Clostridium perfringens*, produkují hyaluronidázu jako prostředek zvyšující pohyblivost skrze tkáň těla a jako antigenní převlek, který brání jejich rozpoznání fagocyty imunitního systému.[2]

7. Farmakokinetika

Normální systémová kinetika HA je u člověka dobře známa. Odstranění HA z oběhu je velmi účinné, s poločasem rozpadu 2 – 6 min a celkovým denním obratem 10 – 100 mg u dospělého člověka. Hlavní příjem z krve probíhá v endoteliálních buňkách jater.[2]

Absorpce v krvi

Je známo, že hlavní část eliminace HA z krevního oběhu probíhá v játrech a to prostřednictvím endocytózy zprostředkované receptory v jaterních endotelových buňkách.[2]

Exkrece (eliminace)

Přímým měřením HA v moči lze vypočítat, že přibližně 1% normálního denního obratu HA ze systémové cirkulace u člověka je filtrováno ledvinami.

Dále je HA z těla eliminována pomocí jater, plic a jen málo GIT traktem.[2]

Toxicita

Výsledky testů toxicity ukazují, že látky na bázi hyaluronanu nejsou cytotoxické a vykazují dobrou biologickou kompatibilitu. Hyaluronan je vysoce neantigenní a neimunogenní i vzhledem k jeho vysoké strukturní homologii napříč živočišnými druhy a špatné interakci s krevními složkami.[2]

8. Použití HA a jejích derivátů pro medicínské aplikace

Jak již bylo uvedeno výše, HA je všudypřítomný biokompatibilní polysacharid, který je hojně rozšířen v lidském těle. Může být tedy efektivně využíván pro navrhování různých aplikací pro podávání léčiv.

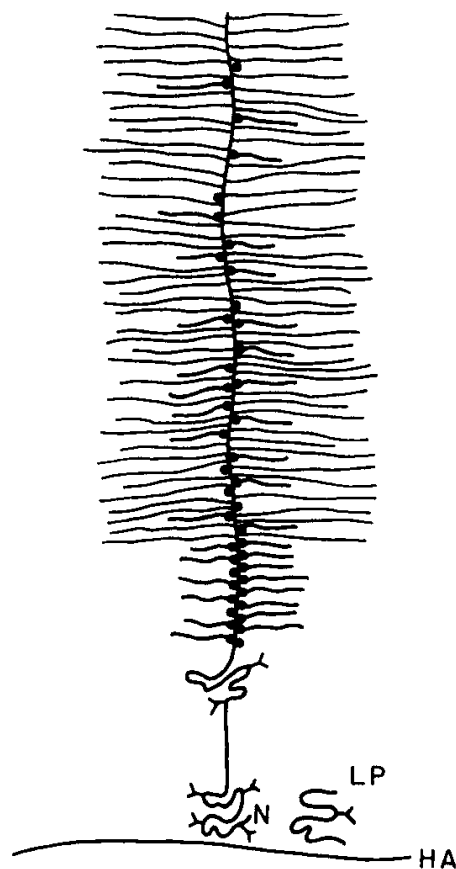
Jelikož je to netoxický a neimunogenní biopolymer, vzhledem k jeho strukturní podobnosti napříč živočišnými druhy a jeho omezené interakci s krevními složkami může být účinně nahrazen syntetickými polymery používanými ve farmaceutickém průmyslu.

Jakožto složka ECM je zde zodpovědná za různé funkce, jako je růst, diference a migrace buněk.[2]

Ortopedie

HA hraje zásadní roli při vývoji chrupavky, při udržování synoviální tekutiny a při regeneraci šlach. Vysoká koncentrace HA byla nalezena v ECM všech tkání dospělých kloubů, včetně synoviální tekutiny a chrupavky. Částečně kvůli své viskoelastické povaze a schopnosti vytvářet vysoce hydratované matrice působí HA v kloubu jako mazivo a tlumič nárazů.[2]

Viskosuplementace je nová, bezpečná a možná účinná forma lokální léčby osteoartrózy. Spolu s produkty HA pomáhá zlepšit fyziologické prostředí v osteoartritickém kloubu. Okamžitým přínosem viskosuplementace je úleva od bolesti, dlouhodobější přínosy zahrnují návrat pohyblivosti kloubů.[2]



Obrázek 8 – Schematický nákres interakce mezi HA a proteoglykanem chrupavky. LP je spojovací protein.[9]

Antiadhezní aplikace

Vzhledem k tomu, že je HA vysoce hydrofilní, je to polymer, který je vhodný pro aplikace vyžadující minimální adhezi buněk. Pooperační adheze, které se tvoří mezi sousedními tkáňovými vrstvami po chirurgickém zákroku, brání hojení ran a často vyžadují další chirurgické zákroky. Bariéry ze zesíťovaných HA byly účinně používány k zabránění vzniku takových adhezí. Navíc adheze bakterií k biomateriálům může vyvolat infekce a představuje pro pacienta velké riziko. S ohledem na tuto skutečnost byla esterifikovaná HA použita také k prevenci adheze bakterií na zubní implantáty, nitrooční čočky a katétrů.[2]

Oftalmologie

Jelikož je HA přirozenou složkou sklivce oka, nalezla řadu úspěšných aplikací v oftalmologické chirurgii. Intraokulární injekce HA během chirurgického zákroku se používají k udržení tvaru přední komory. Navíc roztoky HA slouží také jako složky zvyšující viskozitu očních kapek a jako adjuvans pro opravu očních tkání.[2]

Dermatologie

Jak již bylo zmíněno výše, HA je přirozeně přítomna ve vysokých koncentracích v kůži a měkkých pojivových tkáních. Proto je HA vhodnou volbou pro matrici, která podporuje regeneraci kůže. Například zesíťované HA hydrogelové filmy urychlují hojení plných tlustých ran, pravděpodobně tím, že poskytují vysoce hydratované a neimunogenní prostředí, které napomáhá opravě tkáně.

Jakožto hlavní složka extracelulární matrix se účastní každého kroku v procesu hojení ran a má potenciál zajistit rychlejší hojení. Proto je HA a její deriváty široce používány od roku 2001 při léčbě popálenin, těžko léčitelných a komplikovaných chirurgických ran.

Farmacie

HA se používá jako účinný nosič pro dodávku léků. Využívá se hlavně její biokompatibilita, biologická rozložitelnost, jedinečná cílová schopnost a vysoká kapacita pro doručování léků na místo potřeby.

Mnoho léků tvořených malými molekulami, zejména protirakovinových léčiv, má nízkou rozpustnost ve vodě, nízkou specifickou a krátký poločas in vivo. Využitím biofyzikálních

vlastností HA pro dodávání těchto malých molekul lze překonat několik těchto omezení. HA jako nosič dodávající léky může zvýšit rozpustnost hydrofobních léčiv, prodloužit poločas léku in vivo, pomáhá chránit lékové aktivity a podporuje cílené podání do specifických tkání.[4]

Deriváty HA

Jelikož je přírodní hyaluronan poněkud omezen, v důsledku některých svých fyzikálně-biologických vlastností, pro vlastní lékařské aplikace. Především se jedná o jeho krátký pobyt v těle, který je způsoben jeho rychlým vstřebáváním. Proto je velmi podporován vývoj jeho derivátů pro různé biomedicínské aplikace, jako je léčba artritidy, oční chirurgie a tkáňové inženýrství. Přehled různých derivátů HA a jejich aplikací je v tabulce 3.[4]

Tabulka 3 – Přehled chemicky modifikovaných hyaluronanů a jejich medicínských aplikací.[4]

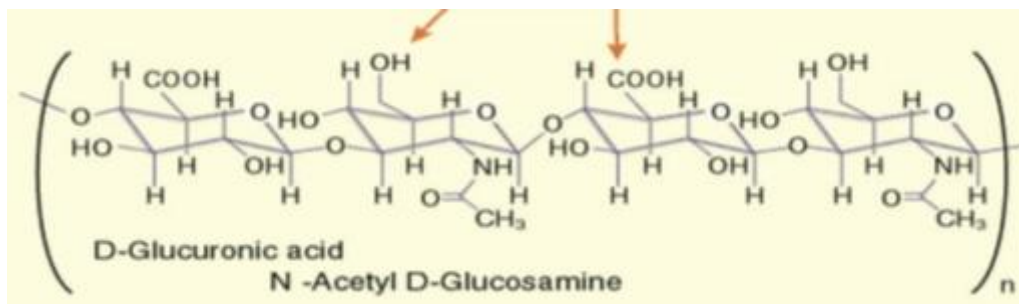
Typy HA	Biomedicínská aplikace
HA obsahující estery	tuková tkáň, srdce
HA obsahující hydrazid či aldehyd	kosti
Akryl-modifikovaná HA	genová terapie
Benzylester HA	játra, meziobratlová ploténka, kůže
Karbodiimidem zesíťovaná HA	oftalmologie
Metakrylátovaná HA	srdce, tkáň cév
Thiolátovaná HA	mícha
HA	svaly

9. Deriváty kyseliny hyaluronové

Ukázalo se, že chemicky modifikované hyaluronany se jeví jako ideální řešení nedostatků fyzikálně-biologických vlastností přírodního hyaluronanu. Výsledné deriváty mají vlastnosti, které se mohou výrazně lišit od přírodního polymeru, ale většina derivátů si zachovává biologickou kompatibilitu a biologickou rozložitelnost přírodní hyaluronanové molekuly.[1,6]

V chemické struktuře HA se nejčastěji používají 2 místa pro chemické (kovalentní) modifikace. Tato místa jsou karboxylové skupiny glukuronových kyselin a hydroxylové skupiny na uhlíku C-6, jak je znázorněno na obrázku 9.[4,6]

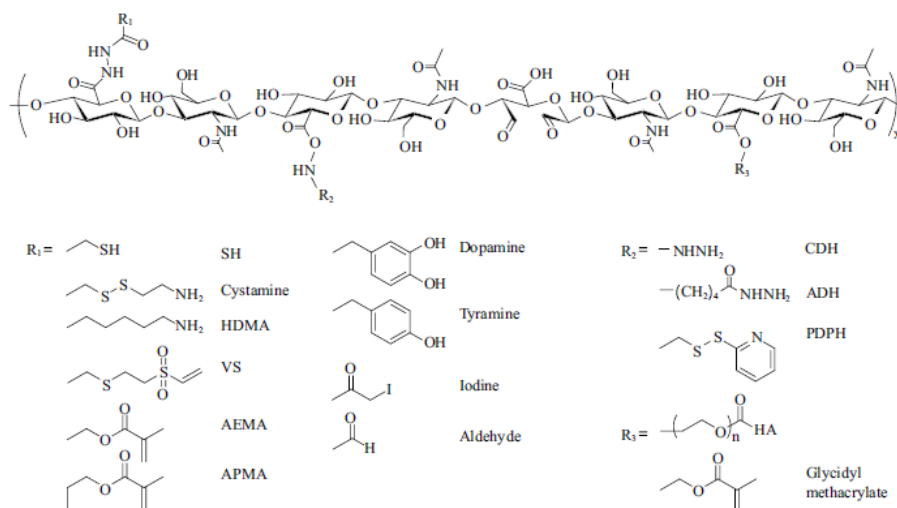
- Hydroxylová skupina na HA může být zesíťována prostřednictvím etherové vazby.
- Karboxylové skupiny na HA mohou být modifikovány prostřednictvím esterové vazby.



Obrázek 9 – Opakující se disacharidové jednotky HA. Červené šipky označují primární místa vhodná pro chemickou modifikaci.[6]

9.1. Modifikace karboxylové skupiny

Nejběžnější modifikace karboxylové skupiny pro tvorbu derivátů HA jsou uvedeny v tabulce 3. Karboxylové skupiny HA jsou běžně modifikovány reakcemi zprostředkovanými karbodiimidem, esterifikací a oxidací jodistanem.[4]



Obrázek 10 – Selektivní primární modifikace karboxylové skupiny na HA.[4]

Tvorba hydrazidů HA

Jednou z vysoce zkoumaných modifikací je hydrazidová modifikace HA. Té se obvykle dosahuje konjugací ADH pomocí karbodiimidové vazby a byla hodnocena pro různé aplikace biokonjugace, jako je konjugace léčiv nebo peptidů za použití hydrazonových vazeb.[4]

Tvorba thiolů HA

Tyto deriváty se obecně připravují konjugací s molekulami obsahujícími disulfid, jako je například cystamin nebo dihydrazid kyseliny 3,3'-dithiopropionové, který je kondenzován s HA za použití EDC chemie. Redukcí disulfidových vazeb dithiothreitem se získá požadovaný thiolový derivát. Thiolové deriváty HA se značně používají k vývoji hydrogelů. Ačkoli se thiolová chemie snadno provádí, hlavní nevýhodou je její pomalá kinetika zesítnění.[4]

Aldehydy HA

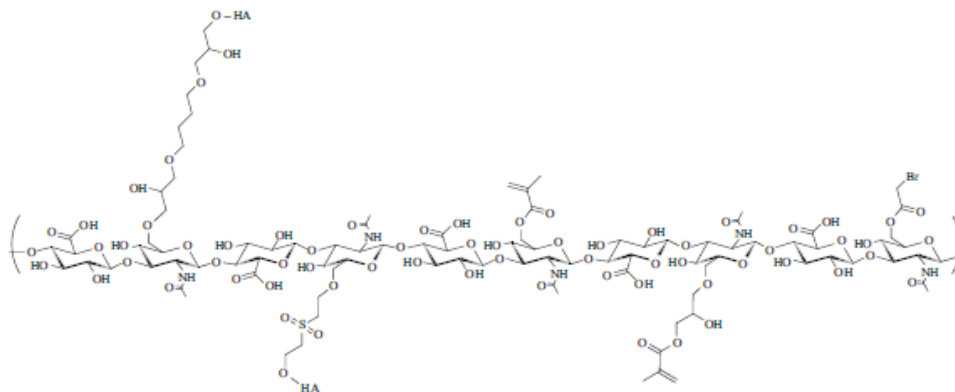
Tvorba takovýchto derivátů má široké uplatnění při selektivní konjugaci N-koncových peptidů a jiných nukleofilů. Nejčastější metodou používanou pro přípravu takové modifikace je částečná oxidace hlavního řetězce cukru HA s použitím jodistanu sodného. Taková oxidace páteře se snadno provádí za vodných a neutrálních podmínek avšak taková oxidace vede ke snížení molekulové hmotnosti a otevření cukrového kruhu, což je škodlivé pro jeho buněčné rozpoznávací vlastnosti a narušuje biologickou funkci molekuly.[4]

Esterifikace

Zahrnuje 3 typy reakcí a to akrylaci, alkylaci a Huisgenovu cykloadiční reakci (tzv. Click chemie). První z nich – akrylace, kdy se nejčastěji provádí tzv. metakrylace ve vodě s pH 6,5 za použití dvou molárních ekvivalentů EDC a N-(3-aminopropyl)methakrylamidu. Druhá z nich – alkylace, může být použita pro přípravu amfifilních derivátů HA. Alkylace karboxylových skupin HA se může provádět za použití HA-TBA soli a alkylhalogenidů, jako jsou alkyljodidy nebo bromidy, v organickém rozpouštědle. Poslední z nich - Huisgenová cykloadiční reakce azidů s alkyne za vzniku triazolů byla použita k výrobě hydrogelů HA a k zapouzdření kvasnicových buněk během zesíťování. Při této metodě byly funkční skupiny azidu a alkyne zabudovány na HA za použití EDC chemie.[4]

9.2. Modifikace hydroxylové skupiny

Hydroxylová skupina je běžně modifikována etherifikací, zesíťováním divinylsulfonem, esterifikací a bis-epoxidovým zesíťováním. Nejběžnější modifikace hydroxylové skupiny jsou uvedeny na obrázku 11.[4]



Obrázek 11 – Selektivní primární modifikace hydroxylové skupiny na HA.[4]

Tvorba etherů za použití epoxidů

Epoxid je běžným zesíťovadlem pro přípravu HA hydrogelů. Pro síťování se používá BDDE pro většinu zesíťovaných HA hydrogelů, které jsou v současné době na trhu. Reakce se skládá z otevření epoxidového kruhu za vzniku etherových vazeb s hydroxylovými skupinami HA.[4]

Tvorba etherů za použití divinylsulfonu

Divinylsulfon (DVS) je dalším běžným síťovadlem hydrogelu HA. Tato reakce se provádí při vysokých hodnotách pH ($\text{pH} > 13$) a vytváří sulfonyl-bis-ethylové vazby mezi hydroxylovými skupinami HA. Tento způsob zesíťování má tu výhodu, že probíhá při pokojové teplotě, což snižuje degradaci HA při alkalickém pH, ke kterému obvykle dochází při vyšších teplotách. I když je výchozí látka DVS vysoce reaktivní a toxická, hydrogely HA-DVS jsou biokompatibilní, což potvrzuje histologická analýza regenerované tkáně.[4]

Tvorba hemiacetalů pomocí glutaraldehydu

Zesíťování pomocí glutaraldehydu (GTA) musí být provedeno za kyselých podmínek, aby se získal acetalový zesíťovaný produkt. Vzhledem k tomu, že tato reakce je reverzibilní za kyselého pH, získaný acetalový hydrogel se získá neutralizací gelu. Další nevýhodou této strategie je toxicita spojená s GTA, která omezuje její použití v biomedicinském oboru.[4]

ANALYTICKÁ ČÁST

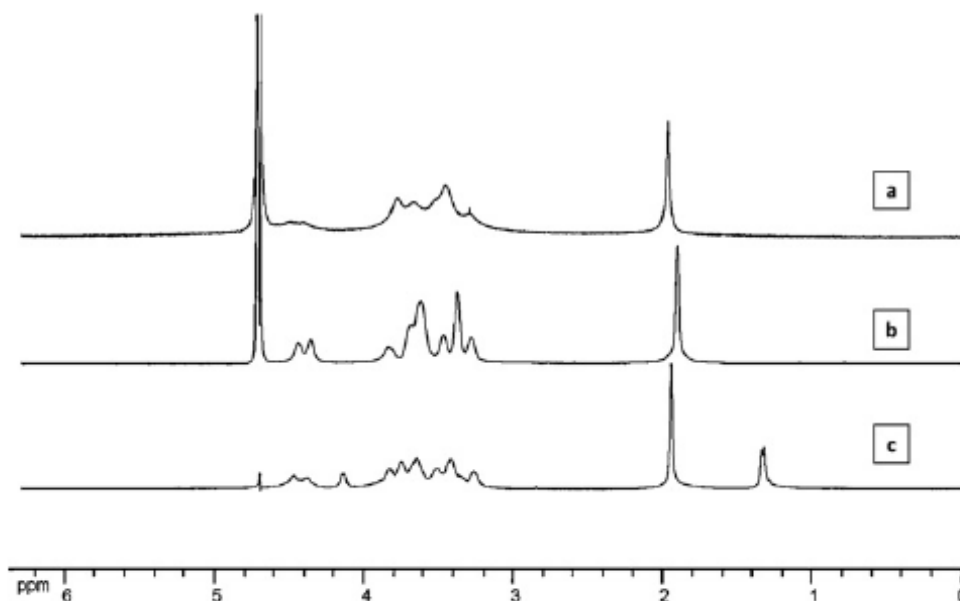
1. Charakterizace struktury

1.1. Výpočet stupně modifikace kyseliny hyaluronové

Jednorozměrná ^1H NMR je nejběžnějším nástrojem charakterizace derivátů HA. NMR spektra ukazují přítomnost konjugovaných sloučenin a umožňují vypočítat stupeň modifikace HA. Typické spektrum přírodní HA rozpuštěné v D_2O je na obr. 12a. Pokud je HA rozpuštěna v D_2O obsahující NaOH, pak má signál lépe vyvinuté píky v důsledku nižší viskozity alkalických roztoků HA (obr. 12b). Široký multiplet mezi přibližně 3,2 a 3,9 ppm odpovídá signálům protonů obsažených v cukerných kruzích. Jelikož jsou tyto protony rozmístěny prakticky všude, je ztíženo jednotlivé přiřazení každého z protonů. Široký dublet při 4,5 ppm odpovídá oběma anomerním protonům. Tyto protony jsou připojeny k uhlíkům sousedícím s dvěma kyslíkovými atomy. Protony methylových skupin od N-acetylové skupiny HA jsou dobře přiřaditelné k píkům při 1,95 ppm. Signál je mírně snížen v alkalickém pH na 1,90 ppm. Tento pík je obvykle používán jako odkaz pro výpočet stupňů modifikace, protože je zřídka modifikován při syntéze nových derivátů HA.

NMR spektrometrie je velmi užitečná metoda pro kvantifikaci a popis chemické modifikace. Například L-alanin byl naočkován na karboxylovou kyselinu HA a spektrum purifikovaného konjugátu je znázorněno na obr. 12c. Nové vrcholy za 1,33 ppm a 4,14 ppm odpovídají methylové skupině L-alaninu. Stupeň náhrady (SN) lze snadno stanovit pomocí výpočtu poměrů vrcholových integrálů z methylové skupiny L-alaninu ($\delta = 1,33$

ppm) s methylovými protony od N-acetylové skupiny ($\delta = 1,9$ ppm). Pík skupiny (CH) L-alaninu při 4,14 ppm může poskytnout aproximaci SN, ale vrchol je příliš široký, aby poskytl přesnou hodnotu. Pík methylové skupiny L-alaninu má výhodou, že není překrýván s vrcholy přírodní HA, což umožňuje snadný a přesný výpočet SN. Pokud se signály naočkovaných molekul překrývají se signály HA, je obtížnější hodnotit stupeň modifikace za použití jednorozměrné ^1H NMR.[17]

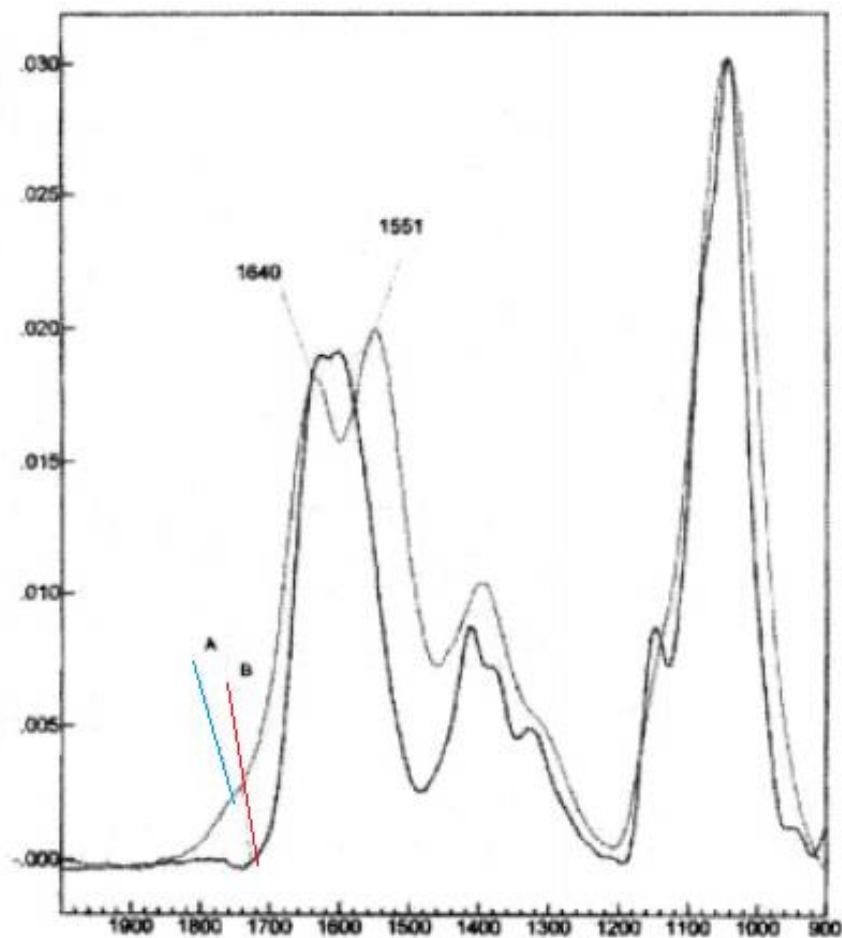


Obrázek 12 – ^1H NMR spektra kyseliny hyaluronové v D_2O (a), D_2O s NaOH (b) a ^1H NMR spektra v D_2O u HA-alaninu (c).[17]

1.2. Určení typu vazby vytvořené během modifikace kyseliny hyaluronové

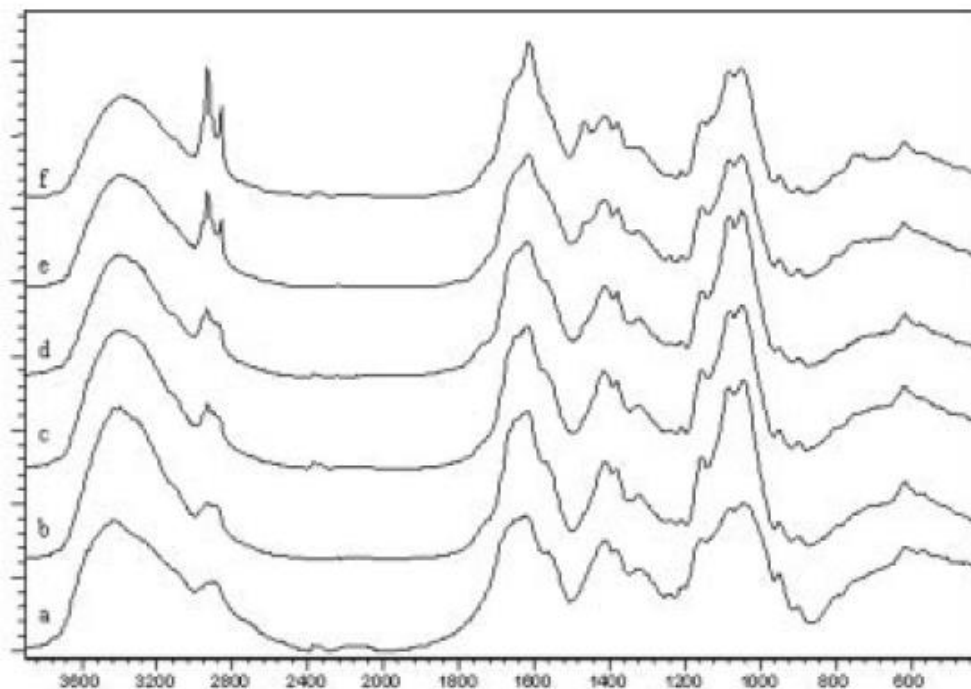
Další běžná a doplňková charakterizační technika používaná pro HA a její deriváty je infračervená spektroskopie (IČ), zejména infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR). Tato metoda umožňuje určit typ vazby, která byla vytvořena během modifikace HA.[17]

Například byly pomocí FTIR pozorovány amidové pásy při asi $1630\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$. Tyto pásy odpovídají novým amidovým vazbám vytvořených mezi diaminy a karboxylovými skupinami HA. V tu stejnou dobu, jak bylo přidáno množství zesíťovacího činidla, tak intenzita pásu karboxylové skupiny v rozmezí od asi 1720 do 1740 cm^{-1} poklesla (obr. 13).[25]



Obrázek 13 – FT-IR-ATR spektra (A) suchého a (B) hydratovaného hyalového gelu.[25]

Dále byla například potvrzena přítomnost alkylových řetězců na HA, další píky pozorované mezi 2850-2930 cm^{-1} odpovídají (CH) a (CH_2) vibracím. Tyto vibrace jsou znázorněny na obr. 14.[17]



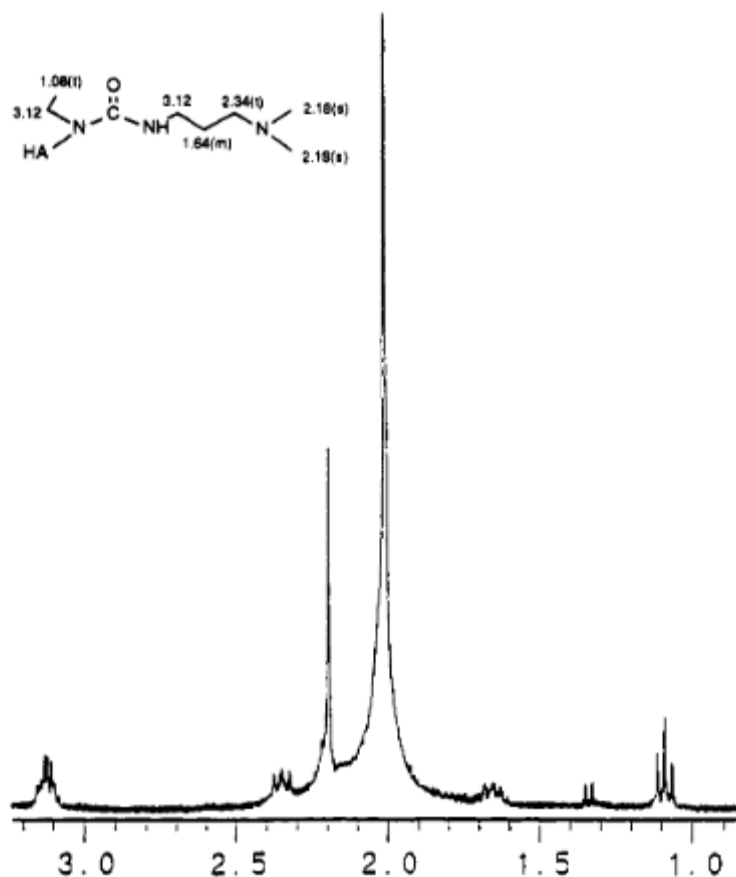
Obrázek 14 – FTIR spektra (a) hyaluronanu a *N*-alkyl derivátů HA: b) *N*-butyl-HA, c) *N*-hexyl-HA, d) *N*-oktyl-HA, e) *N*-decyl-HA a (f) *N*-dodecyl-HA.[26]

Tato metoda však neumožňuje přesné vyčíslení stupně modifikace. V některých případech nejsou k dispozici žádné informace, které by mohly být získány z FTIR spektra. Nebyl získán žádný rozdíl mezi spektrem před a po zesíťování, s výjimkou pásma o velikosti 1650 cm^{-1} , které může být přiřazeno iontové výměně sodné soli ke kyselé formě HA.[17]

1.3. Kvantifikace primárního aminu ninhydrinovým stanovením

Kolorimetrickou zkušební metodou s použitím ninhydrinu byla uvedena kvantifikace volných primárních aminoskupin na HA. Negativní výsledky potvrdily, že žádné primární aminy nebyly naočkovány na HA pomocí karbodiimidu. Proto tento rychlý test snadno určuje, zda jsou aminové molekuly, detekované pomocí NMR, kovalentně vázány na HA nebo jestli jsou pouze volně v roztoku.[17]

Na obrázku č. 15 můžeme pozorovat ^1H spektrum *N*-acylmočoviny, jakožto finálního produktu hyaluronanu sodného s karbodiimidem. Pík při 2 ppm byl určen jako *N*-acetylová skupina hyaluronanu sodného.[10]

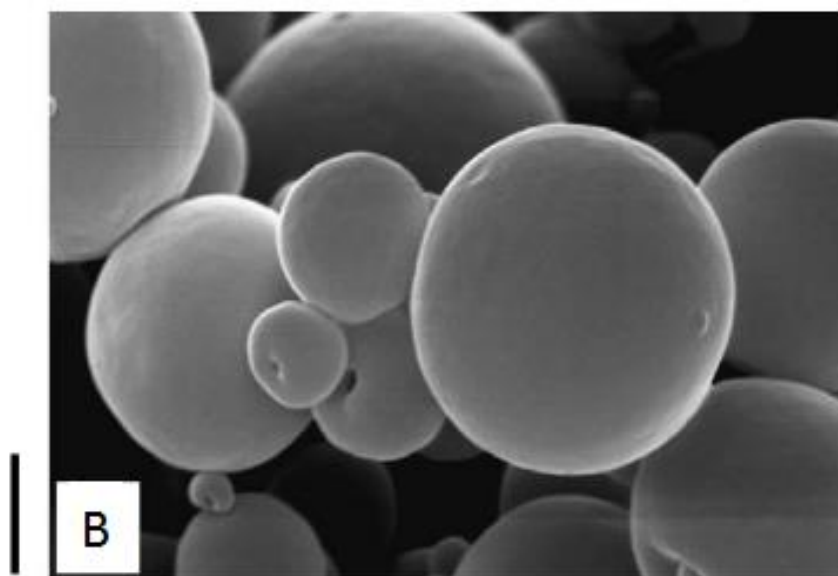
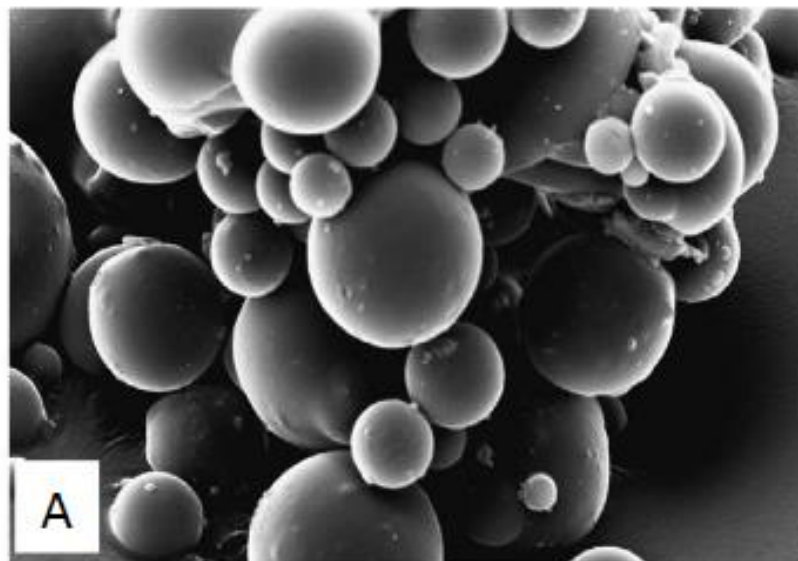


Obrázek 15 – ^1H NMR spektrum *N*-acetylmočoviny.[10]

2. Morfologie

2.1. Morfologie derivátů kyseliny hyaluronové

Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) se používá k určování morfologie suchých HA derivátů. U HA mikrosfér nebo potažených lipozomů se zejména SEM používá k charakterizaci tvaru, povrchových vlastností nebo distribuci velikosti. Na obr. 16 je možné pozorovat sférické mikročástice nebo nepravidelně zrcadlené mikročástice v závislosti na parametrech použitých pro jejich tvorbu. Konkrétně obr. 16 ukazuje dvě skenovací elektronové mikrofotografie esterifikovaného derivátu hyaluronanu, kde 50% karboxyskupin HA je esterifikováno benzylalkoholem.[16]



Obrázek 16 – Skenovací elektronové mikrofotografie esterifikovaného derivátu HA; A pro 1,5%(w/w); B pro 3%(w/w).[16]

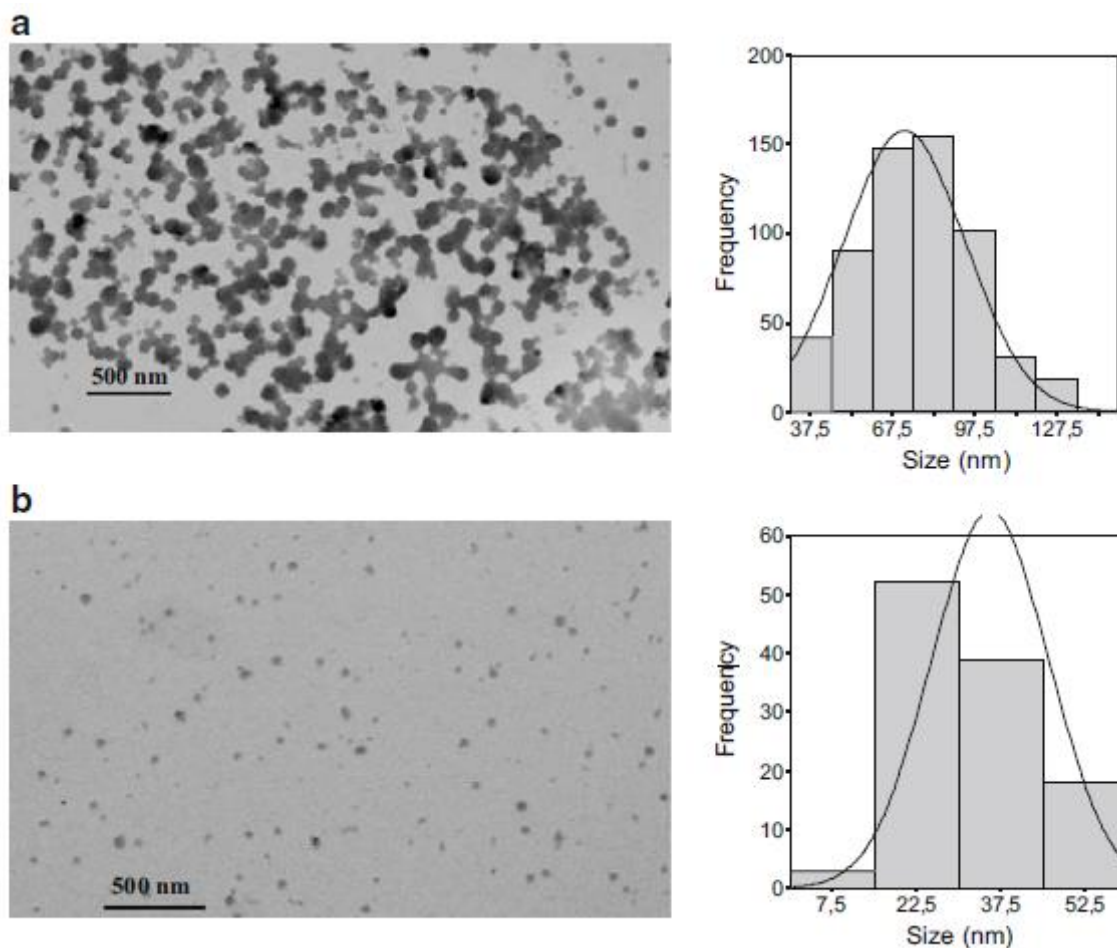
2.2. Výpočet velikosti a tvaru částic derivátů kyseliny hyaluronové

Pro stanovení povrchových charakteristik suchých nanočástic lze použít transmisní elektronovou mikroskopii (TEM). Získané obrázky však nejsou tak přesné, i když stále umožňují výpočet velikosti a tvaru částic.[17]

Mikrofotografie TEM (obr. 17) potvrzují nano-velikost suchých zesíťených částic hyaluronanu a ukazují distribuci těchto derivátů. Na základě výsledků histogramů bylo

zjištěno, že poměr zesílení ovlivňuje velikost nanočástic. Zvýšením poměru zesíťování došlo ke snížení velikosti suchých částic.[23]

Na obrázku 17, jsou TEM obrazy pro HA s $M = 660$ kDa. Obrázek 17a zobrazuje HA při 50% zesílení a obrázek 17b při 100% zesílení.



Obrázek 17 – TEM obrazy a rozložení velikosti nanočástic hyaluronanu zesíťového pomocí 2,2'(ethylendioxy)bis(ethylaminu). A) HA při 50% b) HA při 100%. [23]

2.3. Morfologie derivátů kyseliny hyaluronové ve vodných roztocích

Mikroskopie atomárních sil (AFM) je další metoda mikroskopie použitelná pro stanovení morfologie derivátů HA. Na rozdíl od předchozích dvou technik může poskytovat informace o morfologii HA ve vodných podmínkách.[17]

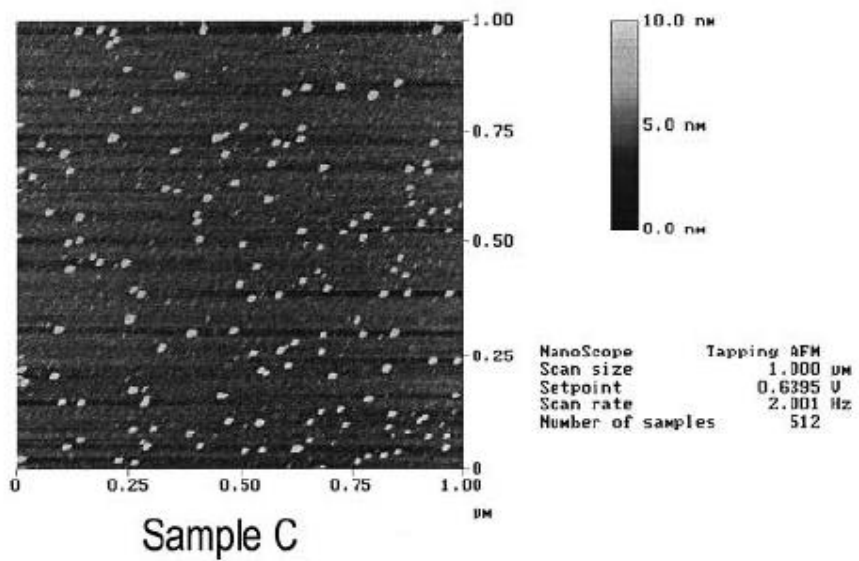
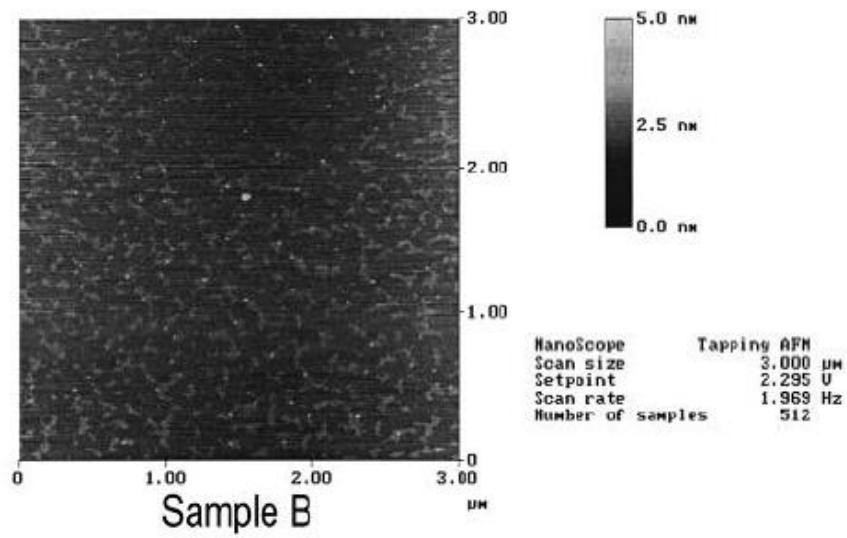
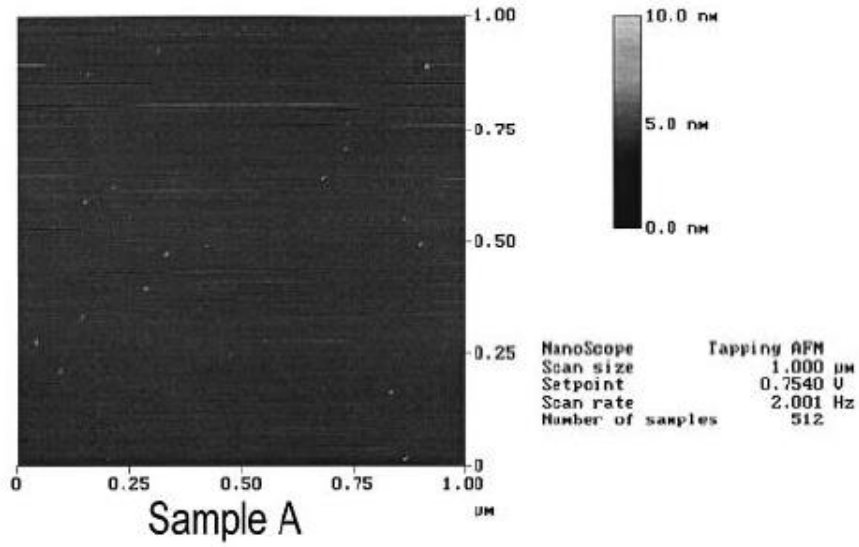
Následující vzorky hyaluronanu a inzulinu (směsi či komplexu hyaluronan-inzulínu) byly zkoumány na silika površích:

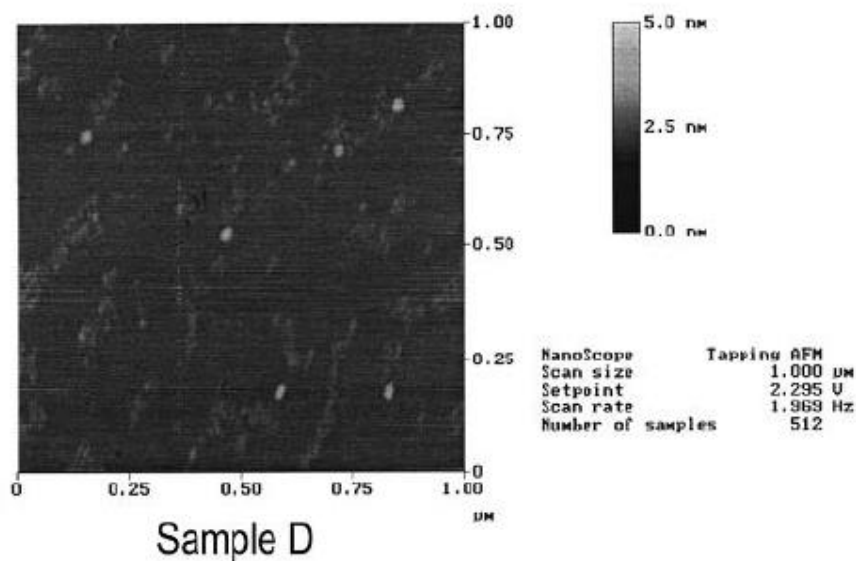
Sample A, přirozený inzulin 1 mg / ml a hyaluronan 1 mg / ml v molárním poměru 25: 1, rozpuštěný v izotonickém chloridu sodném obsahujícím Tris pufr 0,5 mM, pH 6,5, nevedl k žádné detekovatelné tvorbě komplexu (Obr. 18). Nedostatek hydrofobních míst na hyaluronanu a přírodních molekulách inzulinu zabránil připojení k hydrofobnímu povrchu skenovaného místa.

Sample B, komplex hyaluronan-inzulín, sraženina v čirém roztoku z dialýzy, která obsahovala 2,4 mg inzulinu / ml s molárním poměrem inzulinu: hyaluronan 19: 1, byla považována za směs vláken a pevných skvrn (<10 nm), pozorovatelné na obr. 18. Molekuly měly zjevně hydrofobní místa, která byla schopná vázat se na hydrofobní povrch skenovaného místa.

Sample C, čirý supernatant, roztok z dialýzy centrifugován při 11 000 otáčkách za minutu (20 000 x g) při 10 °C po dobu 15 minut, který byl testován tak, že obsahoval 1,6 mg / ml inzulinu: hyaluronan v molárním poměru 15: 1, obsahoval tuhé částice hydrofobního komplexu hyaluronan-inzulinu viditelné v AFM. Z obrázku 18 lze usuzovat, že skvrny mají průměr kolem 2 nm.

Sample D, sediment po smísení se 100 µl čirého roztoku z dialýzy, který obsahoval 5,2 mg inzulinu na ml s molárním poměrem inzulinu: hyaluronan 54: 1, byl pozorován jako odlišné skvrny a paralelní vlákna s některými širšími pásy, obrázek 18. Největší skvrny vypadaly, že měly průměr kolem 2 nm a pásy měly šířku 1 nm. To naznačuje, že inzulinový komplex byl hydrofobní (z čehož vyplývá, že byl adsorbován na hydrofobní povrch skenovaného místa) a že sraženina obsahovala vlákna inzulinu, která byla spojena se strukturou hvězdicového hyaluronanu ve směsi s pevnými malými částicemi. Obě struktury obsahovaly komplex hyaluronan-inzulin a hyaluronan.[24]





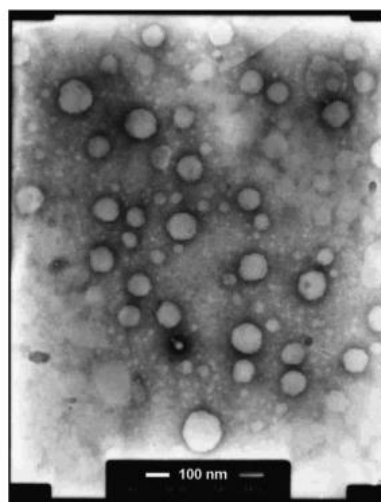
Obrázek 18 – AFM vzorků, kde velikost zobrazených objektů souvisí s intenzitou světla a s kalibrační stupnicí napravo od snímku.[24]

2.4. Hydrodynamické chování mikročástic derivátů kyseliny hyaluronové

Dynamický rozptyl světla (DLS) je metoda, která poskytuje informace o hydrodynamickém chování mikročástic nebo nanočástic HA v roztoku a umožňuje měření jejich rozměrů. Tato metoda většinou úzce souvisí s jinými metodami.[17]

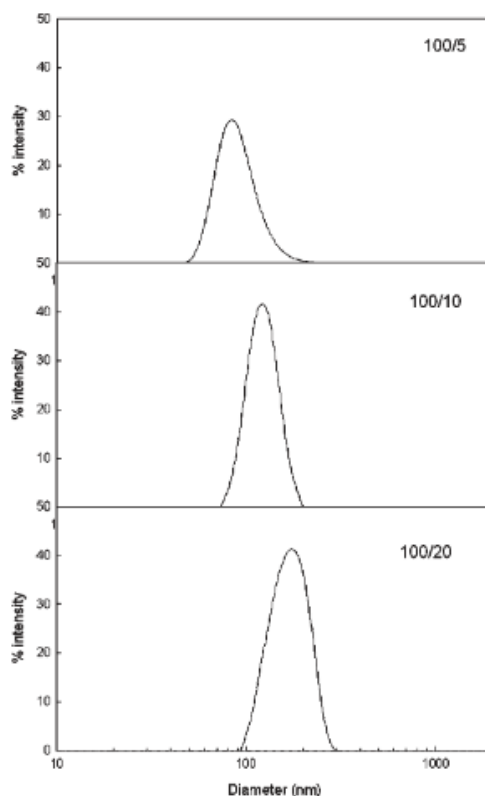
Například k pozorování nanočástic HA obsahujících cisplatinu byla použita TEM metoda. Kapka polymerní suspenze byla umístěna na uhlíkovou fólii pokrytou měděnou mřížkou a pozorována viz. obr. 19.

Dle pozorování TEM, nanočástice HA obsahující cisplatinu mají sférické tvary s velikostí částic přibližně 100 až 200 nm, jak je ukázáno na obrázku 19.[27]



Obrázek 19 – Morfologie nanočástic HA obsahujících cisplatinu pozorovaná pomocí TEM.[27]

Dle pozorování DLS, byly vytvořeny úzce distribuované nanočástice HA s cisplatinou a velikost jejich částic byla distribuována v rozmezí 100 - 200 nm v závislosti na hmotnostním poměru HA / cisplatinu (obr. 20).[27]



Obrázek 20 – Distribuce velikosti nanočástic HA obsahujících cisplatinu byla měřena pomocí DLS při pokojové teplotě.[27]

3. Fyzikální vlastnosti

3.1. Stanovení molekulové hmotnosti derivátů kyseliny hyaluronové

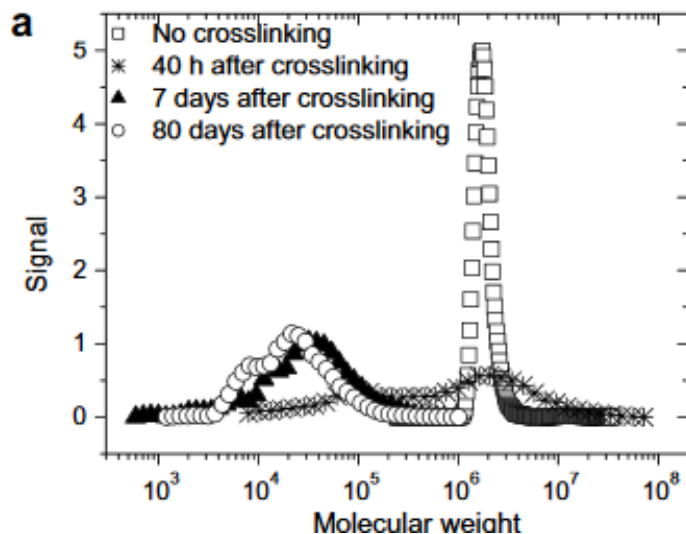
Vylučovací chromatografie spojená s víceúhlovým rozptylem světla (SEC-MALS), je moderní, vysokoúčinná a velice přesná chromatografická metoda pro stanovení důležitých parametrů biopolymerů, jako je především molekulová hmotnost.[21]

Zachování délky řetězce HA je kritickým bodem při syntéze jejích derivátů, protože její vlastnosti na bázi lubrikantů a výplně prostorů jsou úzce spojeny s vysokou viskozitou a molekulovou hmotností. Některé rozklady jsou během procesů chemické modifikace však nevyhnutelné. Analýza, využívající detektor rozptýleného světla, může pomoci zjistit některé parametry molekuly. Lze je vypočítat pomocí specifického indexu refrakčního přírůstku (dn/dC) polymeru. Hodnoty (dn/dC) přírodní HA jsou obvykle v rozmezí 1,430 až 1,670 ml/g v závislosti na rozpouštědle a měření použitých parametrů. Získané hodnoty nejsou závislé na případných změnách v hydrodynamické sféře a následných změnách funkce HA a tak nevedou k falešnému výkladu.[17]

3.2. Měření molekulové hmotnosti derivátů kyseliny hyaluronové

Další metodou pro měření molekulové hmotnosti HA je asymetrická field flow frakcionace (AFFFF), která byla použita pro měření molekulové hmotnosti a distribuce molekulových hmotností HA v různých časech zesíťovací reakce.[17]

Tato metoda konkrétně popisuje, na obr. 21, studium hydrolytické degradace HA během procesu zesíťování. Zesíťování proběhlo pomocí vodě rozpustným karbodiimidem. Po počátečním zvýšení vykazuje molekulová hmotnost pokles už po sedmi dnech za přítomnosti zesíťujících činidel.[28]

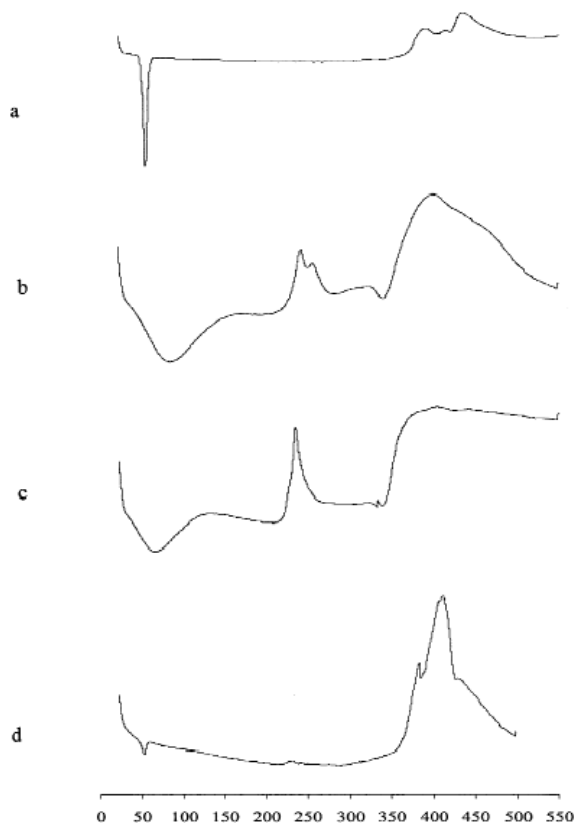


Obrázek 21 – Distribuce molekulové hmotnosti pro koncentraci 0,5% HA a v přítomnosti 5% karbodiimidu v různých stupních během hydrolyzy ($pH \approx 7$).[28]

3.3. Tepelné chování derivátů kyseliny hyaluronové

Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) je metoda, která se často používá k charakterizaci tepelného chování derivátů kyseliny hyaluronové. Tato technika poskytuje informace o jejich hydratačních vlastnostech.

Například tepelné chování složek hydrogelů HA hydrogelového filmu bylo zkoumáno pomocí této techniky. DSC termogram ukázal (obr. 22), že přírodní HA poskytuje široký endotermický pík při 89,5 °C. Tento pík je dále následován dvěma ostrými exotermními píky při 243,6 a 258,7 °C, což naznačuje krystalickou povahu HA. Píky nad 300 °C odpovídají rozkladu HA.[17]

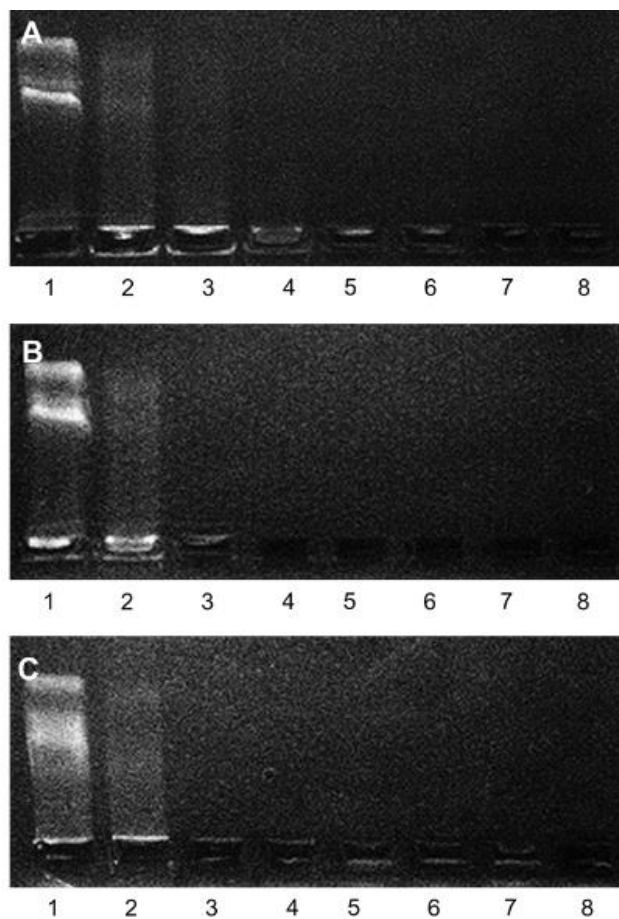


Obrázek 22 – DSC termogram ilustrující tepelné chování hydrogelu HA a jeho složek.[30]
 Polyethylenglykol–propiondialdehyd (a); HA přírodní (b); HA-dihydrazid kyseliny adipové (c);
 HA hydrogelový film (d).

Termogramy zesíťovaného HA-dihydrazidu kyseliny adipové již nevykazují exotermní vrchol, jelikož materiál již není krystalický, ale amorfní.[17]

3.4. Kondenzační schopnost derivátů kyseliny hyaluronové s DNA

Kondenzační schopnost HA-polyethyleniminu (HAP) s DNA byla vyhodnocena pomocí elektroforézy na agarózovém gelu. Obr. 23 znázorňuje plynulost poměrů náboje při kondenzaci DNA pomocí tří derivátů HAP s různou molekulovou hmotností HA (60 kDa, 500 kDa a 1500 kDa), tyto produkty byly označeny jako HAP6, HAP50 a HAP150. Migrace DNA byla zcela zpomalena, když poměr N/P (aminové skupiny HAP/fosfátové skupiny DNA) byl přibližně 2,5 (pro HAP6), 1,5 (pro HAP50) a 1 (pro HAP150). Komplexy 1-8 pro HAP6 (obr. 23a), HAP50 (obr. 23b) a HAP150 (obr. 23c) byly připraveny s poměry N/P 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 a 4.[29]



Obrázek 23 – Elektroforetický test komplexů HAP/DNA s různými poměry N/P.[29]

ZÁVĚR

Tato práce shrnuje základní informace o kyselině hyaluronové a jejích derivátech. První část práce je věnována popisu obecných informací o HA, jako je například historie objevu, chemická struktura či možnosti její modifikace. Druhá část je věnována samotné analýze kyseliny hyaluronové se speciálním zaměřením na její deriváty.

Kyselina hyaluronová, jakožto velmi významný biopolymer objevený v roce 1934, sestávající se ze základní stavební disacharidové jednotky, z kyseliny D-glukuronové a N-acetyl-D-glukosaminu, je velmi významná sloučenina přirozeně se vyskytující v lidském těle, kde se HA vyskytuje ve formě polyanionu. Bylo patentováno několik metod výroby, avšak bylo zjištěno, že použití mikrobiální a enzymatické syntézy je výhodnější, především z hlediska následné virové kontaminace.

Jelikož je HA důležitou součástí extracelulární matrix, plyne z toho předpoklad pro její hojně využití v lékařství, farmacii a kosmetice. V lékařství se uplatňuje jako mazivo pro kloubní plochy nebo jako tlumič nárazů. Ve farmacii jako účinný nosič pro dodávku léků a v kosmetice je vhodnou volbou pro matrici, která podporuje regeneraci kůže.

V této práci bylo vybráno a popsáno několik metod pro analýzu derivátů tohoto biopolymeru. Strukturní charakterizaci bylo možné stanovovat pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR), kde konkrétně bylo možné určit stupeň modifikace HA. Dále, pomocí infračervené spektroskopie, bylo možné určit typ nově vzniklé vazby při modifikaci HA. V neposlední řadě byla také kvantifikována přítomnost primárního aminu pomocí ninhydrinového stanovení. Toto stanovení bylo detekované pomocí NMR.

Morfologii derivátů HA bylo možné pozorovat pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM) a morfologii derivátů ve vodném prostředí pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM). Výpočet velikosti částic a tvaru částic vybraných derivátů bylo možné provést za pomoci transmisní elektronové mikroskopie (TEM) a hydrodynamické chování derivátů HA bylo možné pozorovat pomocí dynamického rozptylu světla (DLS).

Fyzikální vlastnosti bylo možné analyzovat pomocí SEC-MALS. Tato chromatografická technika umožňuje stanovit molekulové hmotnosti derivátů HA, stejně jako metoda asymetrické flow field frakcionace (AFFFF). Dále, použitím termické analýzy, konkrétněji diferenční skenovací kalorimetrií (DSC), bylo možné zkoumat tepelné chování HA a jejích vybraných derivátů. V neposlední řadě, byla pomocí

elektroforetického testu komplexů vybraných derivátů pozorována kondenzační schopnost derivátů HA s DNA.

Právě díky možnosti modifikace kyseliny hyaluronové je možné dále využívat jejího biologického potenciálu a objevovat stále nové vlastnosti a nová použití tohoto biopolymeru.

POUŽITÁ LITERATURA

- 1) SILCOCK, D. Collagen-based dressings as therapeutic agents for wound healing. In: LEWIS, Andrew, ed. *Drug-Device Combination Products - Delivery Technologies and Applications*. Woodhead Publishing, 2010, s. 283-284. ISBN 978-1-84569-470-8.
- 2) NECAS, J., BARTOSIKOVA, L., BRAUNER, P. a KOLAR, J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni medicina*, 2008, **53**(8), s. 397-411.
- 3) LALAN, Manisha S. and MISRA, Ambikanandan. Applications of Polymers in Vaginal Drug Delivery. In: MISRA, Ambikanandan a SHAHIWALA, Aliasgar, ed. *Applications of Polymers in Drug Delivery*. Shawbury: Smithers Rapra, 2014, s. 363. ISBN 978-1-84735-851-6.
- 4) OOMMEN, Oommen P., WANG, Shujiang, HILBORN Jöns and VARGHESE, Oommen P. Chemical Modifications of Hyaluronan for Therapeutic Applications. In: Collins, Maurice N. *Hyaluronic Acid for Biomedical and Pharmaceutical Applications*. Smithers Rapra Technology, 2014, s. 149-176. ISBN 978-190903-077-0.
- 5) Hyaluronic acid. *The Merck Index* online*[online]. Whitehouse Station (New Jersey): Royal Society of Chemistry, ©2017. Last Revised 2013. [cit. 12.06.2017]. Dostupné z: <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m6066/hyaluronic%20acid?q=authorize>
- 6) COLLINS, Maurice N. a BIRKINSHAW, Colin. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering – A review. *Carbohydrate Polymers*. 2013, **92**(2), s. 1262-1279. ISSN 0144-8617.
- 7) LAURENT, Torvard C. Biochemistry of Hyaluronan. *Acta Oto-Laryngologica*. 2009, **104**(sup442), s. 7-24. ISSN 0001-6489.
- 8) D-Glucuronic Acid. *The Merck Index* online*[online]. Whitehouse Station (New Jersey): Royal Society of Chemistry, ©2017. Last Revised 2013. [cit. 12.06.2017]. Dostupné z: <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m5771/glucuronic%20acid?q=authorize>

- 9) LAPCIK, L. Jr., LAPCIK, L., DE SMEDT, S., DEMEESTER, J., a CHABRECEK, P. Hyaluronan: preparation, structure, properties, and applications. *Chemical reviews*. 1998, **98**(8), s. 2663-2684. ISSN 0009-2665.
- 10) KUO, Jing Wen, SWANN, David A. a PRESTWICH, Glenn D. Chemical modification of hyaluronic acid by carbodiimides. *Bioconjugate Chemistry*. 2002, **2**(4), s. 232-241. ISSN 1043-1802.
- 11) CAMPOCCIA, D., DOHERTY, P., RADICE, M., BRUN, P., ABATANGELO, G. a WILLIAMS, D. F. Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification. *Biomaterials*. 1998, **19**(23), s. 2102. ISSN 0142-9612.
- 12) NOVÁKOVÁ, Gabriela. *Kyselina hyaluronová. Její vlastnosti a použití v kosmetice a lékařství*. Pardubice, 2013. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice. Fakulta chemicko-technologická. Ústav organické chemie a technologie.
- 13) RASER, J. R. E., LAURENT T. C. a LAURENT U. B. G. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine*. 1997, **242**(1), s. 27-33. ISSN 09546820.
- 14) WEIGEL, Paul H., HASCALL, Vincent C. a TAMMI, Markku. Hyaluronan synthases. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, **272**(22), s. 13997-14000. ISSN 0021-9258.
- 15) SVANOVSKÝ, Evžen. *Studium biologického chování derivátů kyseliny hyaluronové*. Hradec Králové, 2010. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Katedra farmakologie a toxikologie.
- 16) ESPOSITO, Elisabetta, MENEGATTI, Enea a CORTESI, Rita. Hyaluronan-based microspheres as tools for drug delivery: a comparative study. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005, **288**(1), s. 35-49. ISSN 0378-5173.

- 17) SCHANTÉ, C. E., ZUBER, G., HERLIN, C. a VANDAMME, T. F. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate polymers*. 2011, **85**(3), s. 469-489. ISSN 0144-8617.
- 18) KARIDURAGANAVAR Mahadevappa Y., KITTUR Arjumand A. a KAMBLE Ravindra R. Polymer Synthesis and Processing. In: KUMBAR, Sangamesh G., LAURENCIN Cato T. a DENG Meng, ed. *Natural and synthetic biomedical polymers*. Burlington, MA: Elsevier, 2014, s. 17-18. ISBN 978-0-12-396983-5.
- 19) DAINTITH, John. *A dictionary of chemistry*. 6th ed. New York: Oxford University Press, 2008, s. 247. ISBN 978-0-19-920463-2.
- 20) CAMMACK, Richard, ed. *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology*. Rev. ed. New York: Oxford University Press, 2011, s. 6. ISBN 978-0-19-852917-0.
- 21) SEREDA, Alena. *Studium interakcí hyaluronanu a albuminu metodou SEC-MALLS*. Brno, 2014. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Centrum materiálového výzkumu.
- 22) The United States Pharmacopeial Convention. *Dietary Supplements Compendium*. vol 1 and 2. The United States Pharmacopeial Convention, 2015, s. 853. ISBN 978-1-936424-41-2.
- 23) BODNÁR, Magdolna, DARÓCZI, Lajos, BATTA, Gyula, BAKÓ, József, HARTMANN, John F. a BORBÉLY, János. Preparation and characterization of cross-linked hyaluronan nanoparticles. *Colloid and Polymer Science*. 2009, **287**(8), s. 991-1000. ISSN 0303-402X.
- 24) EDERSTROM, Gustaf, ANDERSSON, Arne, GRÅSJÖ Johan a SJÖHOLM, Ingvar. Formulating Insulin for Oral Administration: Preparation of Hyaluronan-Insulin Complex. *Pharmaceutical Research*. 2004, **21**(11), s. 2040-2047. ISSN 0724-8741.

- 25) MAGNANI, A., RAPPUOLI, R., LAMPONI, S. a BARBUCCI, R. Novel polysaccharide hydrogels: characterization and properties. *Polymers for Advanced Technologies*. 2000, **11**, s. 488–495.
- 26) MLČOCHOVÁ, Petra, BYSTRICKÝ Slavomír, STEINER Bohumil, MACHOVÁ Eva, KOÓS Miroslav, VELEBNÝ Vladimír a KRČMÁŘ Martin. Synthesis and characterization of new biodegradable hyaluronan alkyl derivatives. *Biopolymers*. 2006, **82**(1), s. 74-79. ISSN 0006-3525.
- 27) JEONG, Young-Il, KIM, Seong-Taek, JIN, Shu-Guang , RYU, Hyang-Hwa, JIN, Yong-Hao, JUNG, Tae-Young, KIM, In-Young a JUNG, Shin. Cisplatin-incorporated hyaluronic acid nanoparticles based on ion-complex formation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008, **97**(3), s. 1268-1276. ISSN 0022-3549.
- 28) MALEKI, Atoosa, KJØNIKSEN, Anna-Lena a NYSTRÖM, Bo. Characterization of the chemical degradation of hyaluronic acid during chemical gelation in the presence of different cross-linker agents. *Carbohydrate Research*. 2007, **342**(18), s. 2776-2792. ISSN 0008-6215.
- 29) YAO, Jing, FAN, Ying, DU, Ronghui, ZHOU, Jianping, LU, Yun, WANG, Wei, REN, Jin a SUN, Xiaojing. Amphoteric hyaluronic acid derivative for targeting gene delivery. *Biomaterials*. 2010, **31**(35), s. 9357-9365. ISSN 0142-9612.
- 30) UO, Yi, KIRKER Kelly R. a PRESTWICH Glenn D. Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: new biomaterials for drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2000, **69**(1), s. 169-184. ISSN 0168-3659.
- 31) CHONG, Barrie Fong, BLANK Lars M., MCLAUGHLIN Richard a NIELSEN Lars K. Microbial hyaluronic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005, **66**(4), s. 341-351. ISSN 0175-7598.