

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2017

Bc. Kamila Arnoldová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Katedra analytické chemie

Analýza kyseliny hyaluronové s využitím separačních technik v kapalinné fázi

Bc. Kamila Arnoldová

Diplomová práce

2017

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kamila Arnoldová**
Osobní číslo: **C15551**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Analýza kyseliny hyaluronové s využitím separačních technik v kapaliné fázi**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na využití kyseliny hyaluronové a její stanovení pomocí moderních analytických technik. Zaměřte se na úpravu vzorku před analýzou pomocí různých typů extrakcí, dále se zaměřte na enzymy vhodné pro naštěpení kyseliny hyaluronové a na vhodná derivatizační činidla pro fluorimetrickou či hmotnostně spektrometrickou detekci.
2. Na základě literární rešerše zvolte vhodné podmínky pro naštěpení kyseliny hyaluronové, derivatizaci získaných fragmentů a jejich následnou chromatografickou separaci.
3. Kvalitu naštěpení různými enzymy ověřte pomocí gelové elektroforézy a pomocí spektrofotometrického stanovení. Získané fragmenty derivatizujte vhodným činidlem a separujte s využitím kapalinové chromatografie.
4. Výsledky porovnejte a kriticky zhodnoťte.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce:

Mgr. Jitka Kašparová

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce:

20. února 2017

Termín odevzdání diplomové práce:

12. května 2017



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2017

Prohlašuji:

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

Byla jsem seznámena 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.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 26. 6. 2017

Kamila Arnoldová

Ráda bych poděkovala doc. Ing. Lence Česlové za odborné vedení, cenné rady a za vytvoření příjemné atmosféry při diskuzích a práce v laboratoři. Děkuji také katedře analytické chemie za skvělé pracovní prostředí a katedře biologických a biochemických věd za umožnění plnění části praxe v jejich laboratořích s odbornou pomocí Mgr. Jitky Kašparové. V neposlední řadě děkuji své rodině za velkou podporu během celých pěti let studia.

ANOTACE

V této diplomové práci je optimalizováno kvantitativní stanovení kyseliny hyaluronové ve farmaceutických výrobcích pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií či fluorescenční detekcí. Jsou podrobně popsány hyaluronidázy, jejich typy a mechanismus štěpení. Fragmentace byla provedena enzymem bakteriální hyaluronanlyáza a účinnost ověřena spektrofotometricky. Práce se zaměřuje na derivatizaci hyaluronanových fragmentů pomocí 2-aminoakridonu a jejich následnou chromatografickou separaci v systémech s obrácenými fázemi. V práci jsou uvedeny další chromatografické, elektroforetické a spektrální metody ke stanovení hyaluronanu. Zahrnuto je i aktuální využití, výroba a unikátní vlastnosti této látky.

KLÍČOVÁ SLOVA

kyselina hyaluronová, hyaluronan, analytická separace, chromatografie, hmotnostní spektrometrie, enzymatické štěpení, derivatizace

TITLE

Analysis of hyaluronic acid by liquid separation techniques.

ANNOTATION

In this thesis, the quantification of hyaluronic acid in pharmaceutical formulations using liquid chromatography with mass spectrometry or fluorescent detection is optimized. Different types and cleavage mechanism of the hyaluronidases is described. The fragmentation was performed by the bacterial hyaluronan lyase and cleavage was confirmed with spectrophotometry. The thesis is focused on derivatization techniques of hyaluronan fragments with 2-aminoacridone followed by reversed phase chromatography. The spectral, chromatographic and electrophoretic methods developed for hyaluronan determination are introduced. Also current applications, production and unique characteristics of this substance are included.

KEYWORDS

hyaluronic acid, hyaluronan, analytical separation, chromatography, mass spectrometry, enzymatic treatment, derivatization

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	9
ÚVOD	10
1 TEORETICKÁ ČÁST	11
1.1 Hyaluronan.....	11
1.2 Biosyntéza hyaluronanu.....	15
1.3 Enzymatická degradace hyaluronidázami	15
1.3.1 Bakteriální hyaluronidázy.....	18
1.3.2 Hyaluronidázy obratlovců	21
1.3.3 Endo- β -glukuronidázy	21
1.3.4 Fungální hyaluronidázy.....	22
1.4 Neenzymatická degradace hyaluronanu	22
1.4.1 Degradace vlivem pH a teploty.....	22
1.4.2 Degradace ultrafialovým zářením	23
1.4.3 Degradace volnými radikály.....	24
1.4.4 Degradace ultrazvukem.....	24
1.5 Hyaluronanové fragmenty	25
1.6 Využití hyaluronanu	25
1.6.1 Hojení akutních a chronických ran.....	26
1.6.2 Kosmetika a estetická chirurgie	28
1.6.3 Výrobky s kyselinou hyaluronovou	29
1.6.4 Nové formy hyaluronanu.....	30
1.7 Výroba kyseliny hyaluronové.....	33
1.7.1 Extrakce ze zvířecích tkání.....	33
1.7.2 Produkce hyaluronanu bakteriální fermentací	35
1.7.3 Enzymatická produkce hyaluronanu in vitro	36
1.8 Kapalinová chromatografie.....	37
1.8.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	37
1.8.2 Instrumentace ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii.....	38
1.9 Derivatizace v kapalinové kolonové chromatografii	40
1.9.1 Derivatizace hyaluronanu	41
1.9.2 2-aminoakridon	42
1.9.3 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfonová kyselina	43
1.9.4 Dansylhydrazin	45
1.10 Stanovení hyaluronanu spektrálními metodami	45

1.10.1	UV/VIS spektroskopie.....	45
1.10.2	FT-IČ spektroskopie	46
1.10.3	NMR.....	46
1.11	Stanovení hyaluronanu chromatografickými metodami	47
1.12	Stanovení hyaluronanu elektroforetickými metodami.....	48
1.12.1	Planární elektromigrační techniky	48
1.12.2	Kapilární elektroforéza.....	50
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	52
2.1	Přístroje a vybavení	52
2.2	Vzorky	53
2.3	Použité chemikálie.....	54
2.3.1	Standardy kyseliny hyaluronové	54
2.3.2	Enzymy	54
2.3.3	Činidla a chemikálie	54
2.4	Pracovní postupy.....	55
2.4.1	Spektrofotometrie.....	55
2.4.2	Příprava standardů a kalibračních řad pro HPLC/FLD a HPLC/MS.....	56
2.4.3	Příprava vzorků.....	56
2.5	Podmínky měření	57
2.5.1	HPLC/FLD.....	57
2.5.2	HPLC/MS.....	57
3	VÝSLEDKY A DISKUZE	58
3.1	Spektrofotometrické měření	58
3.1.1	Rychlost štěpení enzymu v závislosti na velikosti hyaluronanu	58
3.1.2	Kontrola enzymatické fragmentace standardů a vzorků.....	60
3.1.3	Stanovení hyaluronanu spektrofotometricky	63
3.2	Optimalizace postupu derivatizace a chromatografické separace	65
3.3	Optimalizace hmotnostního spektrometru	66
3.4	Kvantifikace hyaluronanu.....	72
3.4.1	Stanovení hyaluronanu pomocí HPLC/FLD	73
3.4.2	Stanovení hyaluronanu pomocí HPLC/MS.....	74
4	ZÁVĚR	77
5	LITERATURA.....	79

SEZNAM ZKRATEK

AMAC	2-aminoakridon
ANTS	8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfonová kyselina
ATR	zeslabený totální odraz (Attenuated Total Reflectance)
CCD	zařízení s vázanými náboji
CD44	Cluster of Differentiation 44
CE	kapilární elektroforéza
CS	chondroitin sulfát
CZE	kapilární zónová elektroforéza
CXP	výstupní potenciál kolizní cely (Collision Cell Exit Potential)
DNS-H	dansylhydrazin
DMSO	dimethylsulfoxid
DP	deklasterační potenciál (Declustering Potential)
DS	dermatan sulfát
DVS	divinyl sulfon
EC	mezinárodní klasifikace enzymů
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EP	vstupní potenciál (Entrance Potential)
ESI	ionizace elektrosprejem
FACE	fluorofory podporovaná elektroforéza sacharidů
FLD	fluorescenční detekce
FT-IČ	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GAGs	glykosaminoglykany
GlcA	glukuronová kyselina
GlcNAc	N-acetyl-D-glukosamin
HA	kyselina hyaluronová
HAS	hyaluronansyntáza
HILIC	chromatografie hydrofilních interakcí
HMW	vysokomolekulární (High Molecular Weight)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HS	heparan sulfát
Hyal	hyaluronidáza

IS	napětí iontového spreje (Ion Spray Voltage)
KS	keratan sulfát
LMW	nízkomolekulární (Low Molecular Weight)
LOD	limit detekce (Limit of Detection)
LOQ	limit kvantifikace (Limit of Quantification)
MALDI	ionizace/desorpce laserem za účasti matrice
MF	mobilní fáze
MRM	skenování více fragmentových hmot (Multiple Reaction Monitoring)
MS	hmotnostní spektrometrie
M_w	molekulová hmotnost
m/z	poměr hmotnost/náboj
NMR	nukleární magnetická rezonance
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
Q	kvadrupól
QqQ	trojitý kvadrupól
ROS	reaktivní formy kyslíku (Reactive Oxygen Species)
SEC	chromatografie stérické vyluky
SF	stacionární fáze
TBE	tris-borát-EDTA
TOF	analyzátor doby letu
UDP	uridindifosfát
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV-VIS	ultrafialové-viditelné záření
Δ Di	nenasycený disacharid

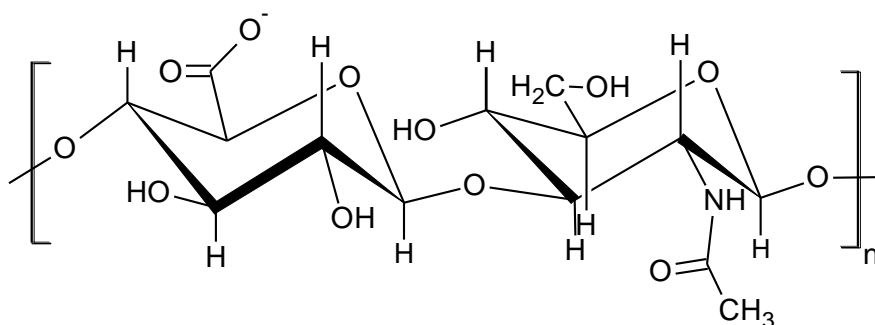
ÚVOD

Kyselina hyaluronová je přírodní lineární heteropolysacharid, který má rozsáhlé využití v mnoha oborech medicíny, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Pro své unikátní vlastnosti se přidává do volně prodejných léčiv či doplňků stravy, kde zvyšuje nejen kvalitu výrobku, ale i cenu. Cílem proto bylo stanovit obsah hyaluronanu ve vybraných farmaceutických produktech (oční kapky, nosní spreje a tablety) a porovnat jej s množstvím uváděným výrobcem. Jedná se o biopolymer, který je potřeba nejprve rozštěpit na kratší úseky. K tomu se využívá speciálních enzymů, hyaluronidáz, které v závislosti na jejich typu poskytují nasycené či nenasycené fragmenty o různých počtech jednotek. Nejvhodnější je rozštěpení na základní jednotky – disacharidy. Ke kontrole účinnosti štěpení a potvrzení vzniklých fragmentů s nenasycenou vazbou se používají spektrální metody. Hyaluronanové fragmenty se pro zvýšení citlivosti detekce obvykle derivatizují pomocí vhodného fluorescenčního činidla. Separace disacharidových jednotek může být zprostředkována mnoha způsoby chromatografických či elektroforetických technik nejčastěji se spektrofotometrickou, fluorescenční či hmotnostně spektrometrickou detekcí. Tato diplomová práce je zaměřena na optimalizaci vhodné metody ke stanovení hyaluronanu od úpravy vzorku až po jeho kvantifikaci.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Hyaluronan

Hyaluronan je přírodní lineární heteropolysacharid patřící do skupiny glykosaminoglykanů (GAGs). Řetězec tvoří opakující se disacharidové jednotky spojené β -1,4-glykosidickou vazbou a může dosáhnout molekulové hmotnosti až 10^7 Da. Disacharid se skládá z kyseliny D-glukuronové a N-acetyl-D-glukosaminu, které vzájemně propojuje β -1,3-glykosidická vazba [1, 2].

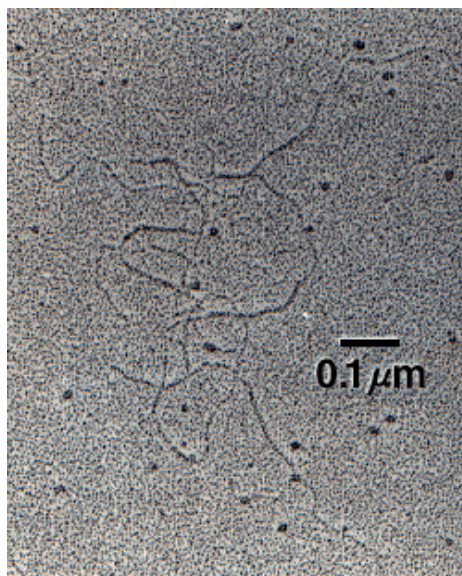


Obr. 1: Základní disacharidová jednotka HA, kyselina D-glukuronová a N-acetyl-D-glukosamin [1].

Na obr. 1 je znázorněna základní disacharidová jednotka polymeru. Oba cukry jsou prostorově příbuzné glukóze. V β -konfiguraci se všechny objemné skupiny (-OH, -COOH a anomerní uhlík na přilehlém cukru) nacházejí ve stericky ekvatoriálních polohách, kdežto malé vodíkové atomy zaujímají stericky méně příznivější axiální polohy. Z toho vyplývá, že struktura disacharidu je energeticky velmi stabilní [3].

Disociační konstanta karboxylových skupin v kyselině glukuronové odpovídá hodnotě 3–4. Při neutrálním pH (přesně 7,4) jsou tyto skupiny převážně ionizovány a molekula hyaluronanu se nachází v polyaniontové podobě [3]. Vliv pH na chování kyseliny hyaluronové (HA) je blíže popsán v kapitole 1.4.1.

Každý disacharid má hmotnost přibližně 400 Da. Průměrná délka disacharidu odpovídá cca 1 nm, takže molekula hyaluronanu o 10 000 jednotkách by teoreticky měla velikost 10 μ m (od jednoho konce k druhému), což se přibližně rovná velikosti lidského erytrocytu. Na obr. 2 je ukázáno několik vzájemně propojených molekul hyaluronanu. Mikrofotografie byla pořízena elektronovým mikroskopem a molekuly byly pro kontrast zvýrazněny pokrytím těžkým kovem metodou rotačního stínování [3].



Obr. 2: Mikrofotografie HA polymeru [3].

V roztoku je hyaluronan uspořádan tak, že jeho vodíkové atomy v axiální poloze vytvářejí nepolární (hydrofobní) část molekuly a ekvatoriální postranní řetězce tvoří polárnější (hydrofilní) část. Tím vzniká v prostoru uspořádání připomínající stuhu náhodně stočenou do klubka. Molekula hyaluronanu tvoří ve fyziologickém roztoku rozměrné doménové struktury, které mají zajímavé vlastnosti. Malé molekuly (voda, elektrolyty či živiny) mohou doménou volně difundovat, na rozdíl od velkých molekul (např. proteinů), které jsou z domény částečně vylučovány [3]. Tento jev je známý jako sterická vyluka a může ovlivňovat transport vody a osmotickou aktivitu v mimobuněčné matici [4].

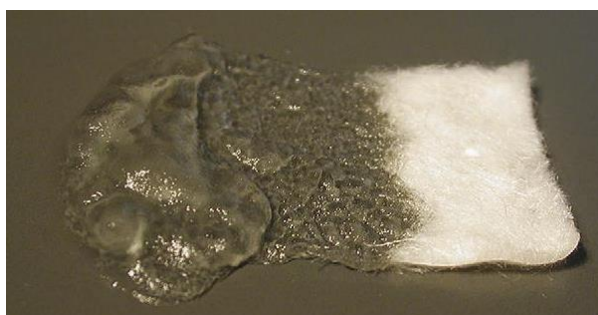
Díky svému negativnímu náboji navíc HA projevuje schopnost elektrostatického vylučování, což ovlivňuje tok kladně nabitých iontů [5]. Vyloučený objem je závislý jak na velikosti makromolekuly, tak na náboji. Vylukové efekty mohou být ovládnány záporně nabitými proteoglykany a mimo to souvisí s hydratací tkáně [6]. Hyaluronová síť v doméně poskytuje tím menší prostor pro ostatní molekuly, čím větší jsou. Z toho důvodu je difúze makromolekul přes síť pomalejší a zároveň je jejich koncentrace nižší uvnitř sítě než v okolním prostoru bez HA. Hyaluronanové řetězce se v roztoku neustále pohybují, tudíž se i velikost pórů v síti mění. Teoreticky tedy mohou sítí projít všechny molekuly s různým stupněm zadržení [3].

Hyaluronanový polymer může mít obrovský počet tvarů, velikostí a konfigurací. Objevuje se v řadě fyziologických stavů, volně cirkulující nebo vázaný s tkáněmi. Hyaluronan může být díky elektrostatické interakci vázán na proteiny zvané hyaladheriny a interagovat s proteoglykany. Hyaluronan se vyskytuje i v kovalentní vazbě s některými proteiny,

např. inter-alfa-trypsin inhibitorem, což je plazmatický protein fungující jako stabilizátor struktur bohatých na HA [2]. Schopnost hyaluronanové molekuly spojovat se sama se sebou, s buněčným povrchem receptorů, s proteiny, nebo s jinými GAGs, hovoří o všestrannosti této pozoruhodné molekuly [7].

HA je nejjednodušší zástupce GAGs, od kterých se značně liší několika charakteristikami. GAGs (chondroitinsulfát (CS), dermatansulfát (DS), keratansulfát (KS), heparansulfát (HS) a heparin) obsahují sulfátové skupiny a jejich polysacharidové řetězce jsou relativně krátké (15–20 kDa, maximálně 50 kDa). Oproti tomu, HA je vysokomolekulární záporně nabitá molekula skládající se z nesulfatovaných řetězců dosahujících molekulové velikosti obvykle 200–2000 kDa (v synoviální tekutině má průměrnou velikost až 7 MDa). Jako jediná z GAGs není syntetizována v Golgiho aparátu a neváže se kovalentně na bílkovinné jádro proteoglykanů [2, 6]. Proteoglykany tvoří významnou část mimobuněčné matrice, vyplňují prostory mezi kolagenními vlákny a chondrocyty. Jejich makromolekuly jsou vysoce hydrofilní a dodávají chrupavce schopnost pružné deformace. Devadesát procent proteoglykanů tvoří tzv. velké proteoglykany (aggrecan), jsou složeny z bílkovinného jádra (tzv. core protein), na němž jsou po stranách navázány řetězce chondroitinsulfátu a keratansulfátu. Malými proteoglykany jsou decorin a biglykan, které obsahují sulfatovaný glykosaminoglykan a jsou označovány jako dermatansulfát [8].

Klíčovými schopnostmi HA jsou její vysoká schopnost vázat vodu a schopnost tvorby gelu v koncentracích $> 0,2$ mg/ml. Viskozita gelu závisí na délce řetězce, zesílení polymeru, pH a chemické modifikaci. Na obr. 3 je materiál vyrobený z hyaluronanu na levém konci navlhčený vodou, který se používá v tkáňovém inženýrství [9].

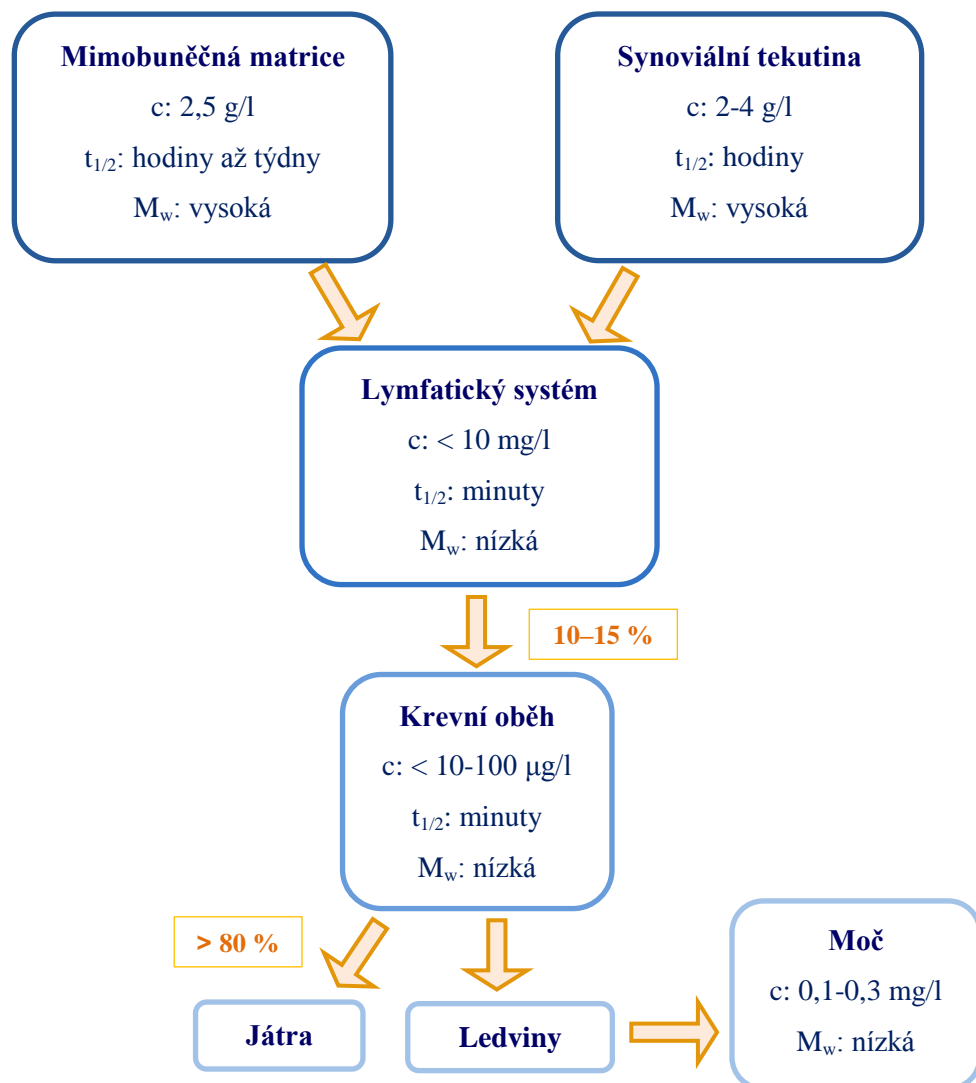


Obr. 3: Hyaluronan a jeho schopnost tvorby gelu [9].

Kyselina hyaluronová se nachází v celém těle, avšak v největších koncentracích se vyskytuje v měkkých pojivových tkáních. Zastoupení HA se značně liší dle lokality, např.

v séru od 0,01–0,1 $\mu\text{g/ml}$ a 0,2–50 $\mu\text{g/ml}$ v lymfě, 100 $\mu\text{g/g}$ v epidermis a 200–500 $\mu\text{g/g}$ v dermis. Nejvyšších koncentrací dosahuje v očním sklivci, v synoviální tekutině (3600 $\mu\text{g/ml}$) a pupeční šňůře novorozenců. Více než 50 % HA se nachází v kůži [10].

Hyaluronan vykazuje vysokou metabolickou aktivitu. Poločas rozpadu v tkáni se pohybuje od 12 do 72 hodin [11]. Při vstupu do krevního řečiště je eliminováno 85–90 % HA v játrech a pouze 1–2 % se vylučuje ledvinami. HA, která vstoupí do krevního řečiště, je převzata jaterními endoteliálními buňkami a degradována na produkty s nízkou molekulovou hmotností [12]. Lymfatické uzliny mají také schopnost extrahovat a degradovat HA [13]. Poločas rozpadu hyaluronanu je kolem 3–5 min v krevním oběhu, méně než 1 den v kůži a v inertním prostředí chrupavkové tkáně 1–3 týdny. Postupné odbourávání HA v těle je zjednodušeně vysvětleno na obr. 4 [14].



Obr. 4: Poločas rozpadu hyaluronanu v těle. Šipky naznačují tok HA, (c) koncentrace, ($t_{1/2}$) poločas rozpadu, (M_w: nízká) M_w < 450 kDa, (M_w: vysoká) M_w > 1000 kDa [14].

1.2 Biosyntéza hyaluronanu

Syntéza hyaluronanu je uskutečněna v plazmatické membráně vysoce specializovanými membránovými proteiny, tzv. hyaluronansyntázami (HASs). V savcích buňkách existují tři různé izoenzymy HASs (HAS1, HAS2 a HAS3), z nichž každý má dvě různé vazebné domény pro uridindifosfátové (UDP) cukry [15]. Zajímavé je, že geny hyaluronansyntáz nejsou záležitostí vyšších organismů, ale byly nalezeny také v bakteriích (např. *Streptococcus* a *Pasteurella multocida*) a virech. Díky této skutečnosti lze získat čistou HA z bakterií pomocí fermentačních metod, což je výhodou oproti extrakcím ze zvířecích tkání, ze kterých je potřeba odstranit kontaminaci proteiny. O výrobě HA bakteriální produkcí je více v kapitole 1.7.2.

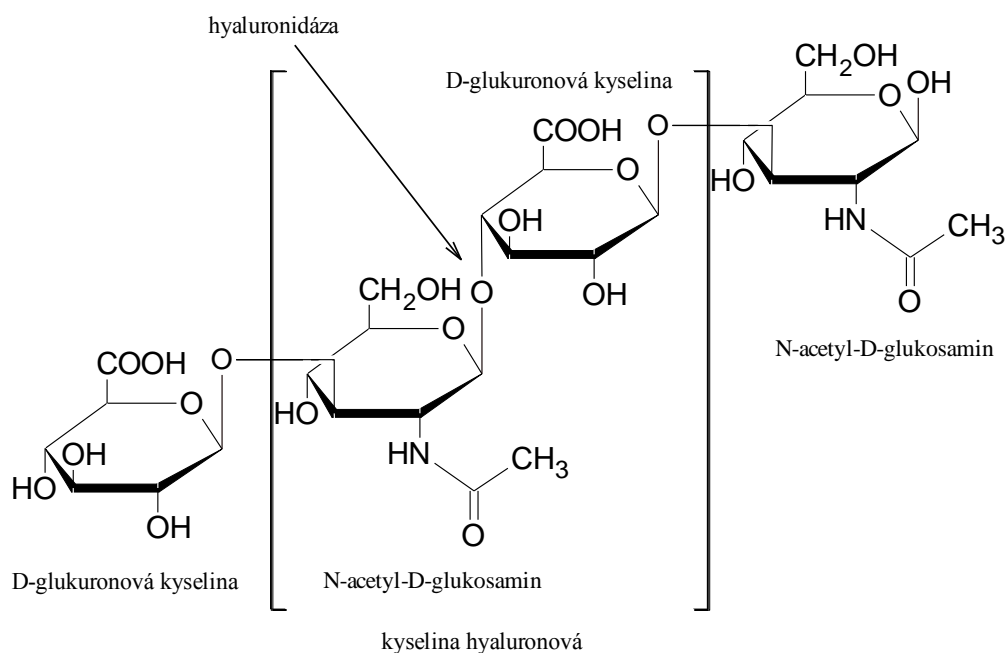
Polymerizace hyaluronanu probíhá na vnitřní straně plazmatické membrány, kde hyaluronansyntáza střídavě přidává monomery uridindifosfát-glukuronovou kyselinu (UDP-GlcA) a uridindifosfát-N-acetylglukosamin (UDP-GlcNAc) na redukující konec rostoucího polymeru. S postupující polymerací se neredukující konec sacharidového řetězce přemisťuje do mimobuněčného prostoru přes póry v plazmatické membráně. Ačkoliv jsou všechny tři HASs z 55–70 % strukturně identické, liší se ve schopnosti syntetizovat HA. HAS1 a HAS2 jsou schopny produkovat HA o větší velikosti (více než 2 MDa), zatímco HAS3 produkuje hyaluronan vždy s nižší molekulovou hmotností (100–1000 kDa). Tato skutečnost je důležitá, protože HA o různých velikostech vykazuje značně odlišné i protichůdné biologické účinky [15].

1.3 Enzymatická degradace hyaluronidázami

GAGs mají v proteoglykanech své redukující konce kovalentně připojeny k jejich jaderným proteinům a proto nemají žádné volné redukční skupiny. Přestože hyaluronan není s proteoglykany kovalentně vázán, není zcela jisté, zda je či není substituován na svém redukujícím konci. Nicméně velká délka jeho řetězce by neumožnila detekovat volnou redukující skupinu. Z toho důvodu je před analýzou vždy nutné rozštěpit polymer hyaluronanu na kratší jednotky, které budou následně detekovány v ultrafialovo-viditelné (UV/VIS) oblasti, fluorescenčně po označení vhodným činidlem, s využitím hmotnostní spektrometrie či jinými způsoby [16].

Ke štěpení se v praxi obecně využívají dvě třídy enzymů - hydrolázy, které vnášejí vodu do místa štěpení vazby nebo lyázy (eliminázy), jejichž působením dojde k odstranění vody mezi 4. a 5. uhlíkem hexuronové kyseliny. Vznikne tak $\Delta^{4,5}$ nenasyčená vazba v kyselině

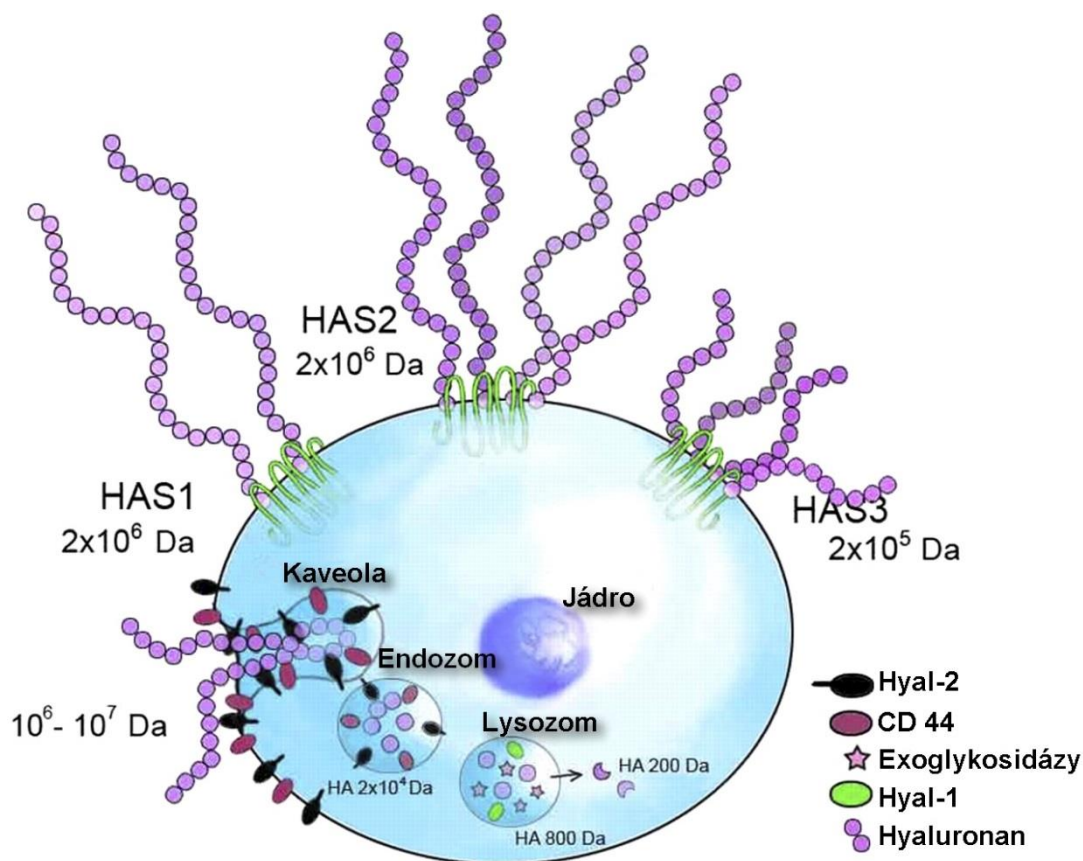
D-glukuronové. Výsledkem každého štěpení různými typy enzymů je vznik volné redukční skupiny, jež může být značena fluoroforem pro následnou identifikaci [16]. V závislosti na použitém enzymu pak vznikají různé jak nasycené, tak nenasycené hyaluronanové oligo- až disacharidy [17]. Na obr. 5 je znázorněno obecné schéma enzymatického štěpení hyaluronanového řetězce.



Obr. 5: Enzymatické štěpení kyseliny hyaluronové [17].

Hyaluronidázy jsou enzymy, které štěpí kyselinu hyaluronovou a mají také omezenou schopnost degradovat chondroitin a chondroitin sulfát. V tkáních obratlovců jsou přítomny v extrémně nízkých koncentracích (cca 60 ng/ml v lidském séru), ale vyznačují se mimořádně vysokou specifickou aktivitou. První izolovaná somatická hyaluronidáza byla purifikována z lidské plazmy a byla označena jako Hyal-1 [18]. Protein Hyal-1 existuje stejně jako mRNA ve více formách a tyto různé izomery si mohou navzájem konkurovat [19].

Hyaluronan má v těle obratlovců mimořádně vysoký obrát. U člověka o průměrné hmotnosti 70 kg se vyskytuje celkem 15 g HA, z čehož 5 g HA je denně přeměňováno (degradováno a syntetizováno), většinou důsledkem hyaluronidáz a to třemi katabolickými cestami. Dominuje především aktivita Hyal-1 a Hyal-2, které odbourávají HA na postupně menší fragmenty. Biosyntéza a degradace hyaluronanu je znázorněna na obr. 6. Přeměna hyaluronanu je ještě rychlejší v maligních tkáních. Bylo dokázáno, že podíl fragmentů s nízkou molekulovou hmotností (LMW HA) je vyšší u pacientů s nádorovým onemocněním [20].



Obr. 6: Biosyntéza a rozklad kyseliny hyaluronové. Hyaluronansyntázy (HAS 1–3) produkují HA o různých velikostech v plazmatické membráně. Hyaluronidázy (Hyal) hydrolyzují HA. Štěpení začíná již na plazmatické membráně pomocí Hyal-2, následuje navázání na HA receptor CD44. Po degradaci v endosomech pomocí Hyal-2, je HA následně degradována pomocí Hyal-1 v lysozomech [6].

Je dobře prostudováno, že degradace HA začíná jejím navázáním na receptor CD44 (Cluster of Differentiation 44), což je multifunkční transmembránový glykoprotein. Mimobuněčný polymer s vysokou molekulovou hmotností je navázán na povrch buňky kombinovanou činností receptoru CD44 a enzymu Hyal-2 zakotveného na GPI (glycosylphosphatidylinositolové) kotvě [2].

Polymer HA je degradován v řadě kroků. Fragmenty o různé velikosti mají široké a občas opačné spektrum biologických aktivit. Na buněčném povrchu vytváří Hyal-2 počáteční zlom vysokomolekulární (HMW) HA a generují fragmenty s 50–100 sacharidy. Tyto středně velké fragmenty vstupují do endozomů a nakonec lysozomů, kde se dále rozkládají převážně na tetrasacharidy pomocí lysozomální Hyal-1 [19].

V lidském genomu najdeme sekvence pro 6 různých hyaluronidáz: Hyal-1, Hyal-2, Hyal-3, Hyal-4, SPAM1 a HYAL-P1. Sekvence Hyal-4 a HYAL-P1 však nejsou schopné translace, tudíž vznikají jen Hyal-1,-2,-3, a PH-20 (produkt genu SPAM) [21].

Hyal-1 je schopna využívat HA jako substrát o jakékoliv velikosti a generovat převážně tetrasacharidy. Nachází se v srdci, ledvinách, játrech, plicích, placentě a kosterních svalech. Je převládající formou hyaluronidáz a jako jediná se vyskytuje v lidské plazmě [18, 22].

Hyal-2 se nachází ve všech tkáních včetně mozku. Je lokalizována v lysozomech a na cytoplasmatické membráně, kde je vázána GPI kotvou. Hyal-2 štěpí HMW HA na fragmenty o přibližně 20 kDa, což je kolem 50 disacharidových jednotek. Má však důležité i neenzymatické funkce. Hyal-1 a Hyal-2 mají velmi podobnou strukturu, přesto různé reakční produkty. Obě jsou aktivní při kyselém pH (pod 4) [2].

Nejméně informací je známo o hyaluronidáze Hyal-3, která je exprimována ve varlatech savců, kostní dřeni a v ledvinách novorozenců. Hyal-4 je primárně v placentě a kosterním svalstvu a pravděpodobně se ani nepodílí na degradaci HA [22].

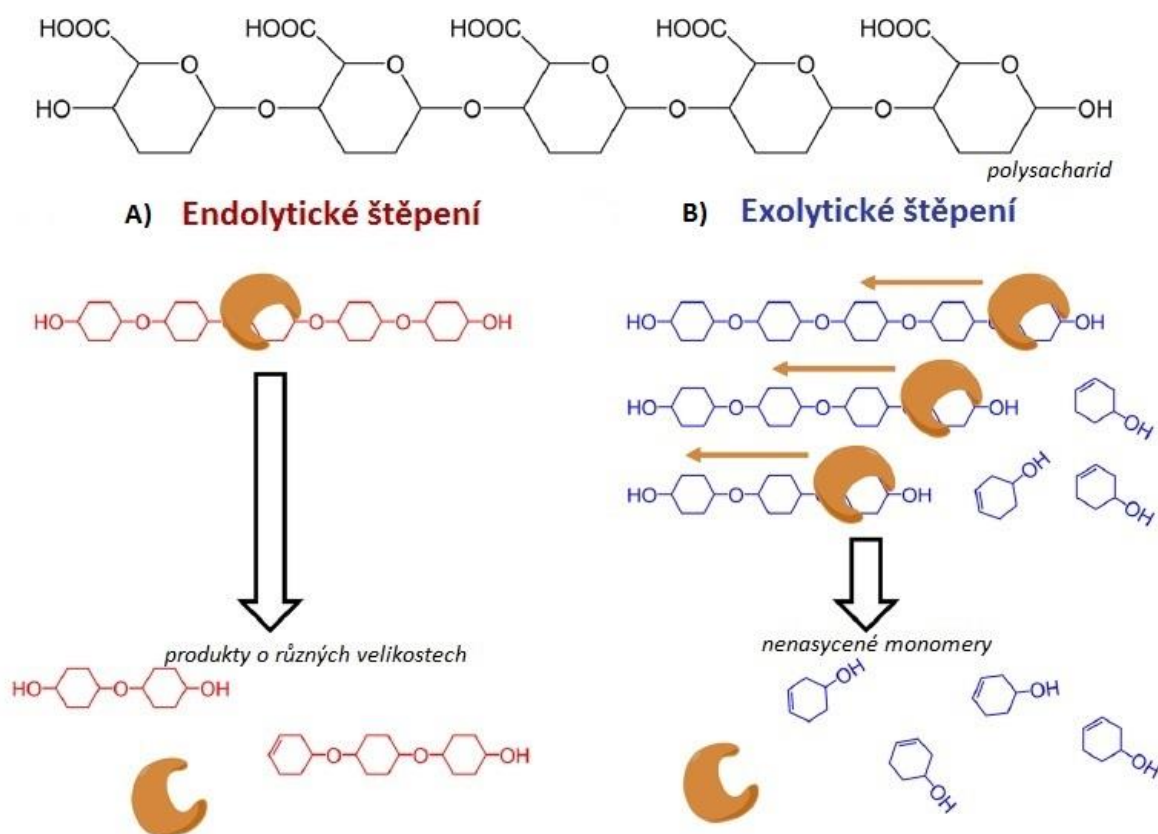
Dále je zde PH-20/SPAM1, známý jako testikulární hyaluronidáza, která se nachází ve spermiích a je nezbytná pro fertilizaci, neboť narušuje obal vajíčka. Šestá hyaluronidáza, tzv. HYAL-P1 je lidský pseudogen vzniklý předčasným ukončením kodonů [6, 23].

Hyaluronidázy jsou dle Meyera již od roku 1971 rozděleny do tří tříd na základě biochemické analýzy jejich reakčních produktů. Dodnes je toto rozdělení platné. Dvě z těchto tříd jsou endo- β -N-acetyl-hexosaminidázy, jedny pocházející od bakterií a druhé od obratlovců [24].

1.3.1 Bakteriální hyaluronidázy

Bakteriální hyaluronidázy (EC 4.2.99.1) jsou endo- β -N-acetyl-hexosaminidázy prokaryot, které fungují jako eliminázy, jejichž výslednými fragmenty jsou disacharidy. Mechanismus štěpení spočívá v β -eliminaci glykosidické vazby za vzniku nové nenasycené vazby, proto jsou zároveň nazývány hyaluronanlyázami či eliminázami. Mnoho bakteriálních hyaluronidáz štěpí substrát nejprve endolyticky a následně exolyticky za produkce nenasycených disacharidů [25].

Obecný princip endolytického a exolytického štěpení polysacharidů je vysvětlen na obr. 7 [26].



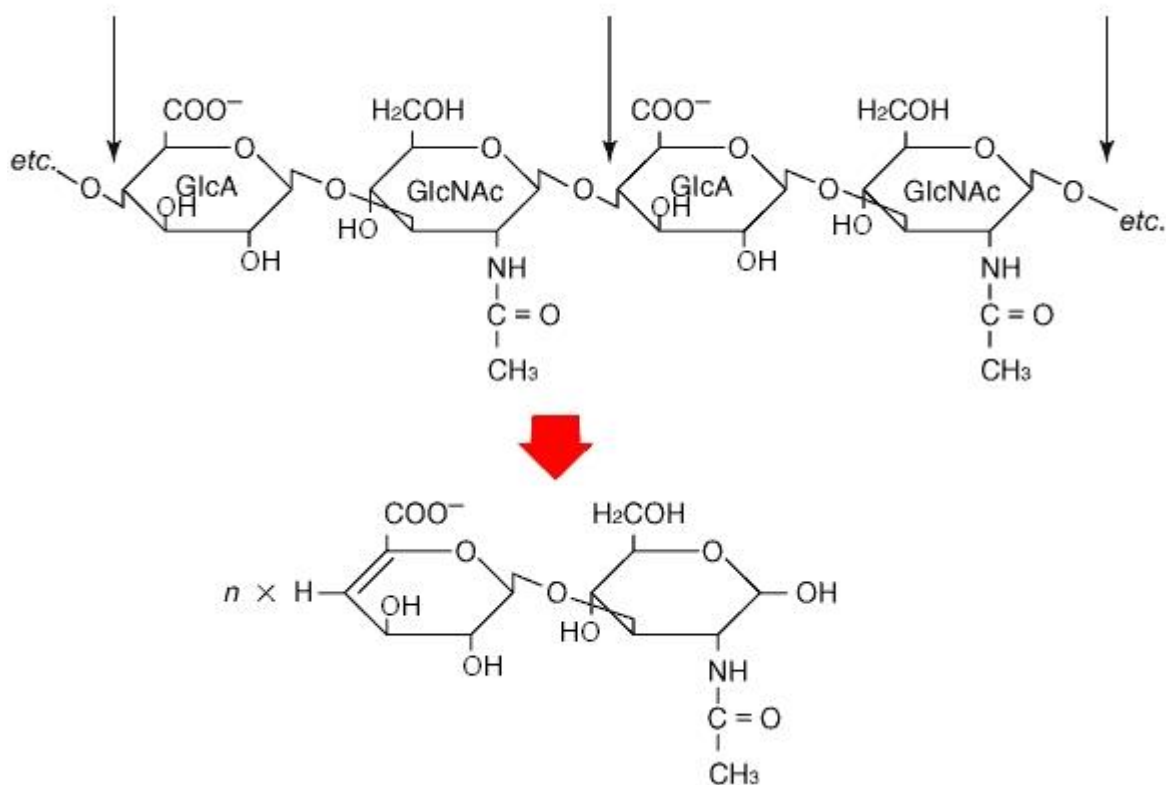
Obr. 7: Endolytický a exolytický způsob štěpení polysacharidu. A) Endolytický enzym štěpí O-glykosidickou vazbu uvnitř polysacharidu mechanismem β -eliminace. B) Exolytický enzym se váže na konec polysacharidu, spouští β -eliminaci a postupně z řetězce odštěpuje nenasyčené monomery, dokud není celý polymer rozštěpen na produkty o stejné velikosti [26].

Konkrétně dochází k eliminaci β -1,4-glykosidické vazby mezi N-acetyl- β -D-glukosaminem a kyselinou D-glukuronovou. Vzniklá nenasyčená vazba v hexuronové kyselině slouží jako UV chromofor na neredukujícím konci řetězce, který může být jednoduše spektrofotometricky detekován. Produkt může být také označen na redukujícím konci některým z fluorescenčních činidel, díky čemuž může být separován (chromatograficky, elektroforeticky) a kvantifikován na úrovni nano- až pikogramů. Produktem štěpení tedy mohou být nasycené mono- a disacharidy (získané z neredukujícího konce) nebo nenasyčené disacharidy [27].

Existuje zde jedna skupina prokaryotních hyaluronidáz specifická pouze pro HA. Jsou to enzymy bakterie *Streptomyces hyalurolyticus*, které mají substrátovou specifitu jen pro HA, tudíž na rozdíl od ostatních hyaluronidáz nereagují s CS [25]. Tato hyaluronanlyáza vede ke vzniku 3-(4-deoxy- β -D-gluc-4-enuronosyl)-N-acetyl-D-glukosamin tetra- a hexasacharidů [28].

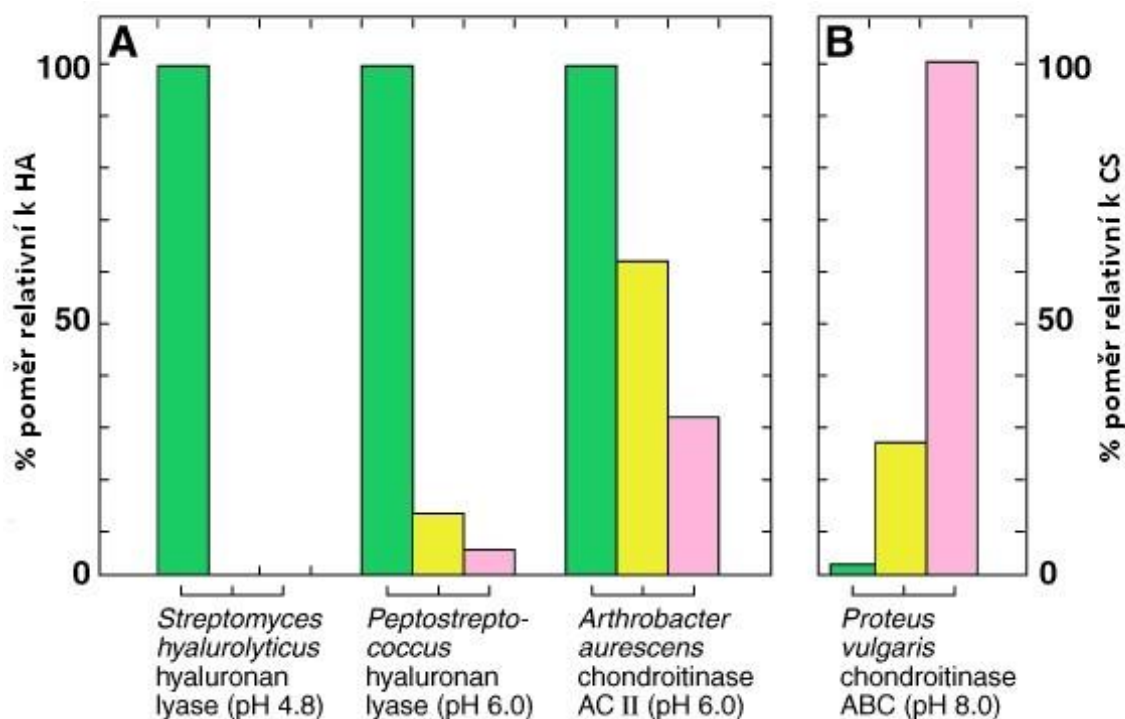
S přítomností bakteriálních hyaluronidáz se lze setkat například u bakterií rodu *Streptococcus* (*St. pyogenes*, *St. dyslatea*, *St. pneumoniae*), *Streptomyces*, *Clostridium*, *Micrococcus*, *Peptococcus*, *Propionibacterium* a *Bacteroides* [27].

Eliminační štěpení polymeru HA ukazuje obr. 8.



Obr. 8: Štěpení biopolymeru HA složeného z GlcA a GlcNAc jednotek pomocí lyázy za vzniku nenasycených disacharidů. Šipky ukazují místo štěpení [27].

Pro štěpení hyaluronanu lze použít také bakteriální enzymy, jež štěpí chondroitin a chondroitin sulfát, a těmi jsou chondroitináza AC I (izolovaná z *Flavobacterium heparinum*), chondroitináza AC II (*Arthrobacter aurescens*) a chondroitináza ABC (*Proteus vulgaris*) [29]. Na obr. 9 je zřetelná substrátová specifita jednotlivých enzymů [27].



Obr. 9: Znárodnění substrátové specifity bakteriálních enzymů v procentech vztažené k A) hyaluronanu a B) k chondroitinsulfátu. HA (zeleně), chondroitin (žlutě), chondroitin-4-sulfát a chondroitin-6-sulfát (růžově) [27].

1.3.2 Hyaluronidázy obratlovců

Hyaluronidázy v těle obratlovců (EC 3.2.1.35) jsou endo- β -N-acetyl-hexosaminidázy eukaryot, které hydrolyticky štěpí HMW HA primárně na tetrasacharidy jako výsledný produkt. Postrádají substrátovou specifitu a mají tedy schopnost štěpit i chondroitin sulfát. Tato skupina zahrnuje savčí testikulární a lysozomální hyaluronidázy.

Testikulární hyaluronidáza (endohexosaminidáza) je hydroláza, jež štěpí HA i CS. Reakce je slabě reverzibilní a produkuje převážně hexa- a tetrasacharidy s neredukujícím koncem v kyselině glukuronové a redukujícím koncem v N-acetylhexosaminech [16, 25].

1.3.3 Endo- β -glukuronidázy

Endo- β -glukuronidázy (EC 3.2.1.36) nalezeny v pijavicích, korýších a některých parazitech poskytují štěpením β -1,3-glykosidické vazby převážně tetra- a hexasacharidy. O této skupině není mnoho známo, avšak svým mechanismem štěpení se podobají spíše eukaryotickým hyaluronidázám [2, 25].

1.3.4 Fungální hyaluronidázy

Zajímavostí je výskyt hyaluronidáz u říše *Fungi*. U několika druhů rodu *Candida* (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii* a *Candida krusei*) [30] byla objevena hyaluronidázové aktivita, ovšem nebyla plně prozkoumána a proto nebude dále rozvíjena. Avšak vezmeme-li v úvahu, že oportunní infekce způsobené druhy *Candida* a dalšími fungálními organismy se zvyšují s použitím širokospektrálních antibiotik, protinádorových léků, imunosupresivních látek a s epidemií AIDS, mohou být tyto domnělé hyaluronidázy důležité [25].

1.4 Neenzymatická degradace hyaluronanu

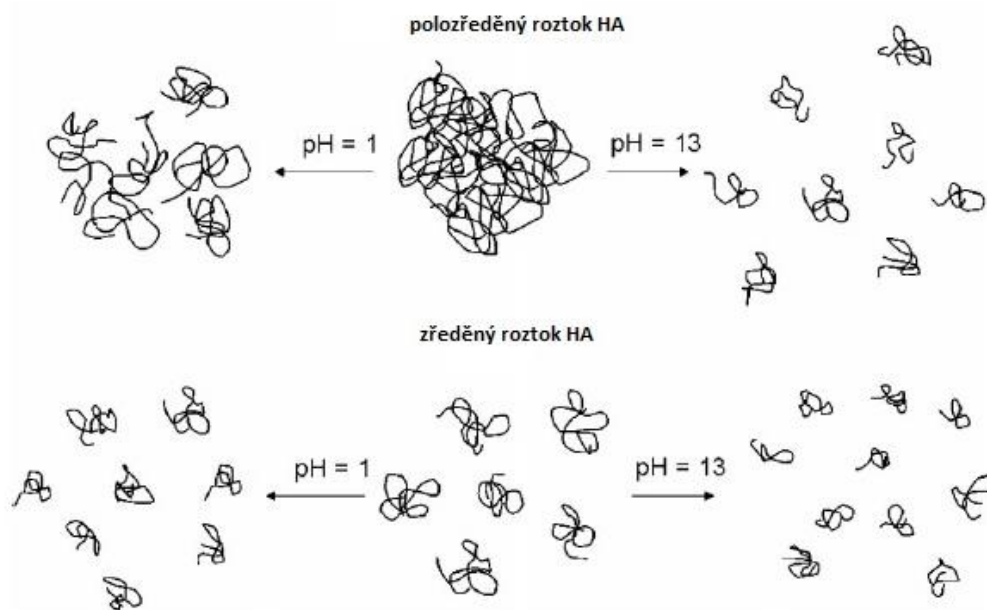
Hyaluronan je kromě enzymatického působení rozkládán i jinými neenzymatickými způsoby. Mezi prozkoumané patří rozklad volnými radiály, ultrafialovým zářením, ultrazvukem, teplotou a vlivem pH.

1.4.1 Degradace vlivem pH a teploty

V kyselém i alkalickém prostředí dochází k náhodnému štěpení hyaluronanového řetězce. Při alkalickém pH jsou zničeny vodíkové můstky, což má za následek ztrátu pevnosti strukturního uspořádání řetězců a tvorbu kompaktnějšího flexibilního klubka. Na základě reologických měření bylo zjištěno, že řetězce hyaluronanu retrogradují i v destilované vodě a to vlivem teploty. Se zvyšující se teplotou klesá viskozita s lineární závislostí na čase a exponenciální závislostí na teplotě [31].

Podrobněji byl prozkoumán vliv pH na vodný pufovaný roztok kyseliny hyaluronové. Výsledkem je, že k degradaci HA dochází při $\text{pH} < 4$ a $\text{pH} > 11$. V rozpětí pH 4–11 by měl zůstat řetězec HA beze změny. Studium kinetiky degradačního procesu bylo zjištěno, že štěpení probíhá rychleji při $\text{pH} = 13$, než při $\text{pH} = 1$ a současně i stupeň degradace glykosidických vazeb je při alkalickém pH vyšší [32].

Na obr. 10 je znázorněna degradace hyaluronanu vlivem kyselého a alkalického prostředí.



Obr. 10: Degradace HA vlivem pH na zředěný a polozředěný vodný roztok. Ve zředěném roztoku hraje roli intramolekulární štěpení HA. V polozředěném roztoku je fragmentována polymerová síť. Degradační efekt je znatelnější při pH = 13 [32].

1.4.2 Degradace ultrafialovým zářením

Ultrafialové (UV) záření rozrušuje interglykosidické vazby v hyaluronanu a spolu s fotochemickými oxidativními reakcemi narušuje řetězec polymeru a snižuje jeho molekulovou hmotnost. Absorpce UV záření při 267 nm odpovídá karbonylovému chromoforu. Začátek procesu fotodegradace po expozici UV záření je přisuzován právě tomuto chromoforu. Tím je narušena fibrilární struktura hyaluronanu a kolagenu v kůži, což se může projevit poškozením pleti [33].

UV záření významně postihuje dermální mimobuněčnou matrici, jejíž hlavní složky jsou právě kolagen, elastin a GAGs. Jejich hlavním úkolem je zajištění elasticity a hydratace pleti [34].

Záření UVB proniká do epidermis, poškozuje DNA a způsobuje změny v kožních buňkách, zatímco UVA záření proniká ještě hlouběji do kůže na úroveň dermis. UVA kromě toho, že poškozuje kolagen a elastin tvořící strukturu dermis, může navíc poškodit i krevní cévy [35].

GAGs neabsorbují přímo UVA ani UVB záření. Poškození těchto struktur vlivem UV záření probíhá nepřímými způsoby, jako je oxidační poškození disacharidových jednotek působením reaktivních forem kyslíku (ROS) [34].

UVB záření způsobuje výrazné ztráty hyaluronanu z papilární dermis a snižuje regulaci HAS1, HAS2 a HAS3. Kromě toho snižuje celkový počet buněk. Avšak hyaluronidázy a receptor CD 44 se vlivem UVB nemění. Závěrem lze říci, že chronické UVB ozařování indukuje ztrátu HA z dermis, to způsobuje pokles hydratace pleti a časem hluboké vrásky [36].

1.4.3 Degradace volnými radikály

Hyaluronan je degradován radikálovým mechanismem, a to za podpory vyšší teploty, thiolů, přechodných kovů (železnaté nebo měďné ionty), kyseliny askorbové a peroxidu vodíku [37]. Tento mechanismus depolymerace vyžaduje účast molekulárního kyslíku. Volné radikály náhodně štěpí postranní skupiny řetězce a tím narušují terciální strukturu. Po delší expozici dochází také ke štěpení hlavního řetězce. Existují tzv. lapače volných radikálů, např. 2,6-diisopropylfenol, který efektivně stabilizuje HA proti hydroxylovým radikálům [31].

Mezi reaktivní formy kyslíku patří: OH^{\bullet} , $\text{O}_2^{\bullet-}$, NO^{\bullet} , ONOO^- , H_2O_2 , OCl^- a $^1\text{O}_2$ [38]. Oxidační odbourávání nejen snižuje molekulovou velikost hyaluronanu, ale také modifikuje jeho sacharidové složení, což generuje fragmenty, které mohou mít vlastnosti podstatně odlišné od vlastností původní makromolekuly [37].

1.4.4 Degradace ultrazvukem

Roztoky kyseliny hyaluronové mohou být degradovány také ultrazvukem. Řetězce hyaluronanu o vysoké molekulové hmotnosti jsou degradovány pomaleji než řetězce s nízkou M_w . Degradace HA ultrazvukem v kyselém a alkalickém prostředí je výrazně podpořena pouze za přítomnosti oxidantů (H_2O_2 a NaOCl). Navzdory použití různých vzorků hyaluronanu a různých ultrazvukových energií, se několik výzkumných skupin shodlo, že ultrazvuk neumožňuje úplnou degradaci HA polymerů na monomery. Degradace ultrazvukem vede k získání řetězců s molekulovou hmotností vyšší než 10 kDa [31, 39].

K analýze degradovaného hyaluronanu lze použít hmotnostní spektrometrii s ionizací laserem za účasti matrice a analyzátořem doby letu (MALDI-TOF/MS) [39] nebo se jednoduše měří změny reologických vlastností hyaluronanu, jako pokles viskozity [31].

1.5 Hyaluronanové fragmenty

Mimobuněčné hyaluronanové polymery jsou molekuly vyplňující prostor, které hydratují tkáň a jsou antiangiogenní [40]. Velké molekuly HA se nacházejí hlavně v chrupavce, sklivci oka, v kloubech a plodové vodě. Tyto polymery jsou také protizánětlivé a imunosupresivní [41]. To je částečně odvozeno ze schopnosti polymerů vyplňujících prostor, zabránit přístupu ligandu k receptorům na povrchu buněk.

Oproti tomu, fragmenty HA se podílejí na různých normálních i patologických procesech. Povětšinou jsou vysoce angiogenní [42], zánětlivé [43] a imunostimulační. Aktivují signalizační cesty, které jsou rozhodující pro progresi rakoviny. Fragmenty mohou být zkrácené produkty syntetické reakce, nebo výsledky aktivity hyaluronidáz [2, 19].

Fragmenty o velikosti 20 kDa indukují transkripci matrixových metaloproteináz [44] a stimulují rozpoznání poranění endotelovými buňkami [45]. Oligomery hyaluronanu ve velikosti 6–20 kDa indukují expresi zánětlivých cytokinů v dendritických buňkách [46]. Oligosacharidy HA mohou jak podporovat, tak inhibovat progresi nádoru [47]. Velmi malé oligosacharidy mají též specifickou aktivitu. Tetrasacharidy indukují expresi proteinů tepelného šoku a jsou antiapoptotické, tzn. potlačující buněčnou smrt [48].

Na základě těchto pozorování, lze konstatovat, že v průběhu katabolické dráhy hyaluronanu dochází ke vzniku produktů o specifických velikostech s velmi odlišnými biologickými vlastnostmi. Předpokladem je, že katabolismus HA je vysoce uspořádaný, kontrolovaný proces, jehož mechanismus se opírá o regulaci jednotlivých enzymových aktivit. Jako příklad řádné regulace slouží proces hojení ran [2].

1.6 Využití hyaluronanu

Kyselina hyaluronová je všestranně využitelná látka, jež nachází uplatnění především v medicíně, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Biologické účinky HA závisí na její molekulové hmotnosti. Využívá se pro biomedicínské účely, zvláště pak ortopedické, kardiovaskulární, farmakologické a onkologické aplikace [49].

HA o velikosti 250–2200 kDa nachází uplatnění v oční chirurgii, při léčbě poranění chrupavky a šlach, redukuje zjizvení tkáň a podporuje regeneraci jaterní tkáň. Používá se pro výrobu umělých kožních a kostních štěpů, náhradu chrupavek a jako materiál pro náhrady tukové tkáň. Je součástí intraartikulárních injekcí a biologicky aktivních bandáží [50, 51].

Ve velikosti 7–250 kDa se HA uplatňuje při protirakovinné léčbě, zvýšení imunitní odezvy na bakteriální infekce, léčbě zranění a popálenin. Podporuje regeneraci míchy po zranění a používá se jako podpůrný materiál pro léčbu pomocí kmenových buněk.

Oligosacharidy HA (4–18 mery) jsou využívány k detekci nádorů, k protirakovinné léčbě založené na nanočásticích a stimulaci tvorby nových cév [50].

Hyaluronany s relativně nízkou molekulovou hmotností (> 10 kDa) mají dobrou viskoelasticitu, adhezi ke sliznici a dobře zadržují vlhkost. Mají tedy vlastnosti, které jsou žádoucí v oftalmologii, ortopedii, při hojení ran a v kosmetice. Nicméně, pro účely regenerace chrupavky jsou nezbytné mnohem vyšší hodnoty molekulové hmotnosti (nad 700 kDa) [51].

Chemickou modifikací (např. zesíťováním polymeru) lze získat biomateriály, které mohou být kontrolovaně degradované a mohou usnadnit angiogenezi nebo osteointegraci (tj. přímé strukturální a funkční spojení mezi živou kostí a povrchem implantátu) [52].

1.6.1 Hojení akutních a chronických ran

Kyselina hyaluronová se zapojuje do počátečních fází opravy tkáně a hojení ran. Společně s fibrinem představuje složku mimobuněčné matrice, která podporuje organizaci a migraci fibroblastů a endotelových buněk do místa poranění. Hydrofilní vlastnosti HA činí fibrinovou sraženinu měkčí, což usnadňuje kolonizaci buněk a strukturní konstrukci nově vytvářené tkáně. Tyto buněčné procesy jsou proto nezbytnými kroky k regeneraci tkáně [53].

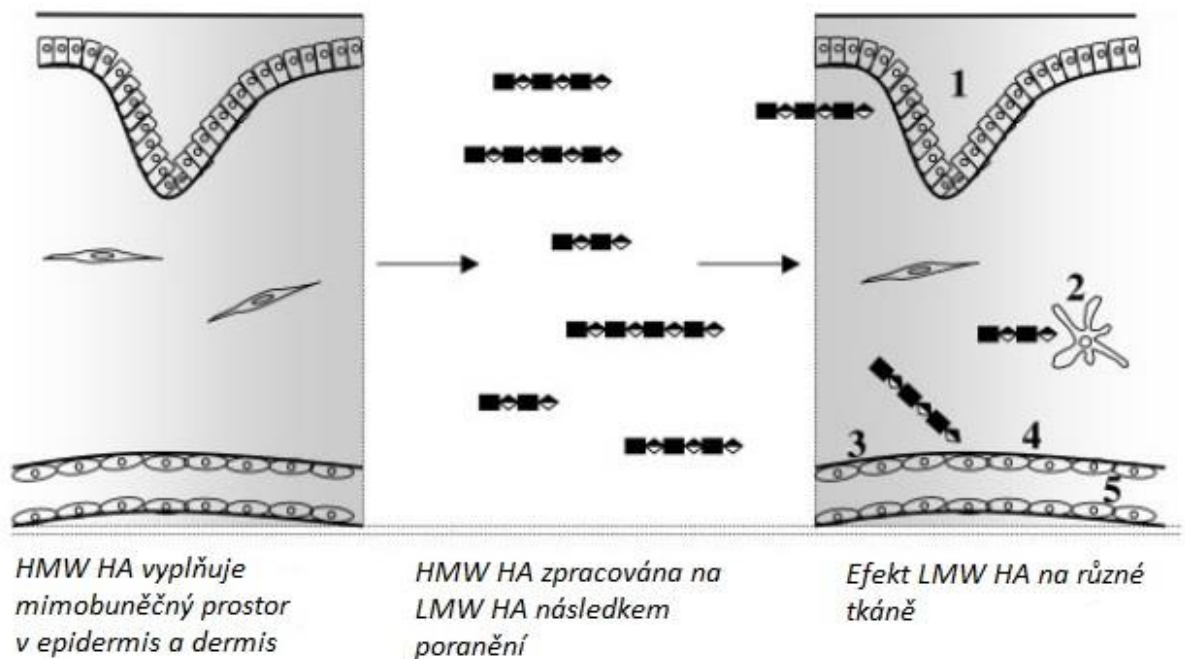
Deriváty HA se používají k hojení popálenin, chronických ran (např. diabetické vředy, bércevé vředy a proleženiny), po chirurgických zákrocích, ale i při akutních zraněních, kde okamžitě uzavírají ránu a podporují regeneraci dermis. Používají se ve formě různých vícevrstvých obvazů. Aktivní vrstvou je speciální derivát hyaluronanu, absorpční vrstvou bývá celulóza (proti mokrání rány) a krycí vrstvou např. silikon, který chrání ránu před vnější kontaminací a před ztrátou tekutiny [50, 53].

Konkrétně pro hojení popálenin byla vyvinuta technologie HYAFF®11, používaná v medicínských přípravcích (Hyalomatrix, Hyalospace a další). Je založena na chemické modifikaci HA esterifikací karboxylových skupin v kyselině glukuronové benzylalkoholem za cílem zlepšení stability polymeru. Modifikace má za následek pokles hydrofility karboxylových skupin a tedy zvýšení hydrofobity polysacharidu. Hyalomatrix (na obr. 11) je dvouvrstvá sterilní náhrada kůže pro okamžité krytí popálenin a hluboké chronické rány. Aktivní vrstva HYAFF®11 je vyfocena zepředu, silikonová vrstva vzadu [53].



Obr. 11: Biomateriál z derivátu HA k náhradě dermis [53].

Po zranění nebo během zánětu se vysokomolekulární hyaluronan rozpadá na nízkomolekulární hyaluronanové úseky. K degradaci může dojít enzymaticky nebo neenzymaticky prostřednictvím volných radikálů či mechanickým poškozením. Rozpad HA je vysoce regulovaný proces a neschopnost degradace HA vede k nesprávnému hojení tkáně. Proces rozpadu HA v tkáni po zranění a následná funkce LMW HA je znázorněna na obr. 12 [54].



Obr. 12: Vysokomolekulární HA se při poranění rozpadá na aktivní nízkomolekulární HA (1). Keratinocyty proliferují a migrují prostřednictvím HA interakce s receptorem CD44 (2). Dendritické buňky dozrávají a uvolňují zánětlivé cytokiny pomocí TLR4 (3). HA indukuje angiogenezi interakcí s CD44 (4). Endoteliální buňky uvolňují prozánětlivé cytokiny pomocí TLR4 (5). Endotelové buňky regulují HA a iniciují vazbu na CD44 na leukocytech [54].

1.6.2 Kosmetika a estetická chirurgie

Pravděpodobně nejvíce medializovaný účinek kyseliny hyaluronové je její schopnost redukce vrásek a zlepšení hydratace pleti. Lidská kůže za kombinace několika vnějších (životní prostředí, znečištěné ovzduší, cigaretový kouř, expozice UV záření, gravitace) a vnitřních (genetika) vlivů podléhá stárnutí, které lze terapií HA zpomalit. Nejškodlivějším faktorem, který se podílí na stárnutí pleti, je sluneční UV záření, které se dle vlnových délek dělí na UVA (320–400 nm), UVB (290–320 nm) a UVC (200–290 nm). Na zemi dopadá jen UV záření kolem 290–400 nm a stárnutí kůže vlivem tohoto záření se nazývá photoaging. Photoaging závisí především na stupni expozice slunci a kožním pigmentu [34, 55].

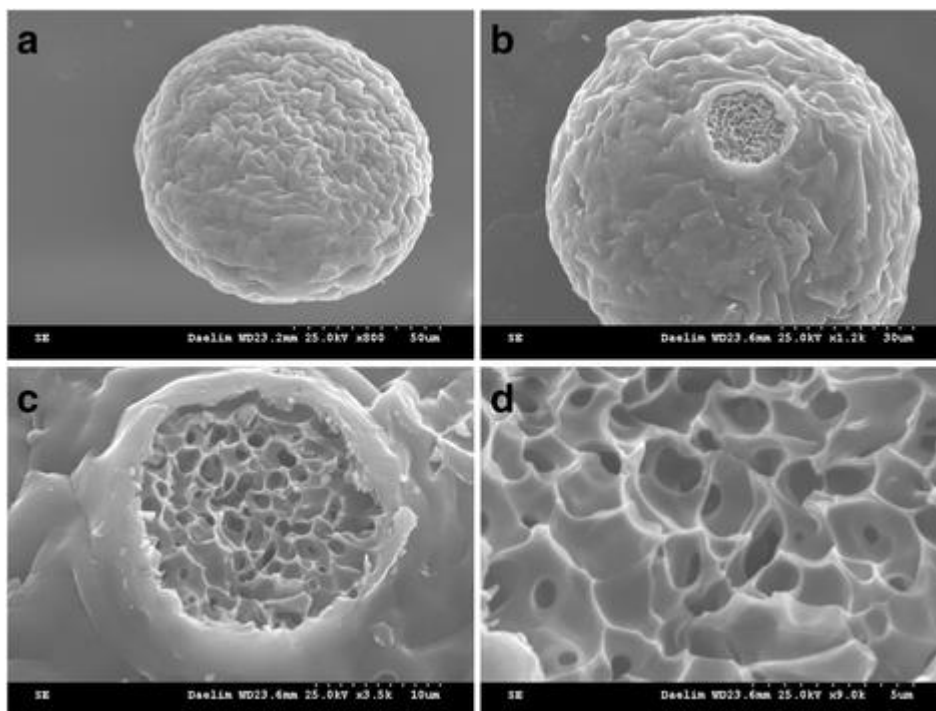
Kosmetické firmy přidávají hyaluronanovou sůl do přípravků s anti-aging efektem a do hydratačních krémů. Účinek je spekulativní, poněvadž závisí na prostupu hyaluronanu přes svrchní vrstvu kůže a na koncentraci, která bývá často velmi nízká.

Nejúčinněji fungují injekční aplikace hyaluronanu do vrásek na obličej, krku, dekoltu a rukou v mezoterapii (tzv. biorejuvenace). Jeden gram HA může vázat až 6 litrů vody. To znamená, že čím vyšší je procento HA ve složení, tím vyšší je její kapacita zadržovat vodu. Upřednostňuje se použití HA získané bakteriální fermentací, jelikož riziko hypersenzitivní reakce je tak nízké, že nejsou nutné ani kožní testy. HA používaná v mezoterapii není zesíťovaná, tudíž je méně stabilní a má krátký poločas rozpadu. Pokud je aplikována v kombinaci s jinými účinnými látkami (vitamíny A, C, E, D, K a B komplex) může být stimulována vlastní syntéza z fibroblastů, čímž je udržována dostatečná hladina HA pro získání pružnosti a hydratace kůže [56].

V estetické chirurgii se vyskytují tři typy dermálních plniv: dočasná (HA a kolagen), semipermanentní (poly-L-mléčná kyselina, hydroxylapatit vápenatý, polymetylmetakrylát) a permanentní (polyakrylamidový gel a dimetylsiloxan) [57]. Pro docílení delšího zdržení hyaluronanu v kůži musí být použita chemická modifikace biopolymeru. Dermální plniva dočasně obnovují objem měkké tkáně kůže a tím vyplňují vrásky. Samotná HA by v kůži nevydržela ani týden, zatímco po modifikaci vydrží v pleti 6–12 měsíců. Na trhu je nabízena řada dermálních plniv o koncentraci mezi 5–30 mg/ml modifikované HA (např. Prelane, Juvéderm, Eleveess a Hylaform) [57].

Kyselina hyaluronová je dodávána v podobě prášku, který po smíchání s vodou tvoří viskózní roztok. Zesíťováním volné HA prostřednictvím zesíťovačel BDDE (1,4-butandiol diglycidyl ether) nebo DVS (divinyl sulfon) reagujících na hydroxylových skupinách, vzniká polymerní síť, která má podobu řidšího gelu [57].

Byla vynalezena také dvoufázová dermální plniva (např. Restylane), založená na kombinaci zesítených HA mikrosfér suspendovaných v nemodifikované HA. Náhled na dvoufázové dermální plnivo pod elektronovým mikroskopem je na obr. 13. Tato plniva obsahují gelové částičky stabilizované HA. Uvádí se, že dvoufázová plniva mají rychlou počáteční degradaci nezesítené HA a pomalejší degradaci zesítených gelových částic, zatímco jednofázové gely jsou rozloženy rovnoměrněji [58].



Obr. 13: Dvoufázové dermální plnivo pod elektronovým mikroskopem. (a) zesítená částice HA, (b-d) zobrazují porézní síť uvnitř mikrosféry [58].

1.6.3 Výrobky s kyselinou hyaluronovou

Na českém trhu se lze setkat s mnoha výrobky obsahujícími kyselinu hyaluronovou v podobě soli, které jsou volně prodejně či na předpis. Mezi volně prodejně patří kapky do nosu (např. Hysan a Olynth) a kapky do očí (např. Hyal-Drop, Oxyal, řada HYLO® od Ursapharm, Bepanthen), kde je HA přidána především pro zvláčňující účinky, chrání proti podráždění, vysychání sliznice a urychluje hojení. Dále se prodává v tabletách, ve kterých by měla mít pozitivní účinky na zralou pleť (hydratace a redukce vrásek) a na podporu kloubů. Často se pro synergistický účinek míchá s kolagenem, chondroitinsulfátem a vitamínem C [50, 56].

Za zmínku stojí česká biotechnologická společnost Contipro, která se více než 20 let zabývá vývojem a výrobou aktivních látek pro kosmetický i farmaceutický průmysl a patří mezi přední světové výrobce kyseliny hyaluronové. Mimo to se intenzivně věnuje výzkumu a v roce 2013 přivedla na trh nový přístroj pro výrobu nanovláken (4SPIN). Holding Contipro v současnosti ovládá 60 % evropského a 30 % světového trhu s hyaluronanem. Vyrábí produkty veterinární (např. Bonharen, Anigran, Geloren a Dentaren), které slouží pro prevenci a léčbu problémů pohybového aparátu, pro hojení ran v ústech zvířat, pro oční aplikace apod. Humánní produkty (např. Hyiodine a Sorelex) jsou určeny pro léčení široké škály chronických i akutních ran. Sorelex jsou bioaktivní bandáže používané ve zdravotnictví pro krytí infikovaných ran s antimikrobiálními i biologickými účinky při procesu hojení. Dříve se k tomuto účelu používalo stříbro, které je oproti HA tělu cizí [50].

V Evropě a USA je komerčně dostupné velké množství různých přípravků hyaluronanu, sloužící pro kosmetické a zdravotní účely. Jsou vyráběny různými postupy, liší se molekulovou hmotností a tím i dobou zdržení v kloubu a reologickými vlastnostmi. Známými nízkomolekulárními produkty jsou Sinovial (800–1200 kDa) a Hyalgan (500–730 kDa), což jsou intraartikulární injekce, které se aplikují do kloubní štěrbiny, zmírňují bolesti, otoky a zlepšují funkci kloubu [50].

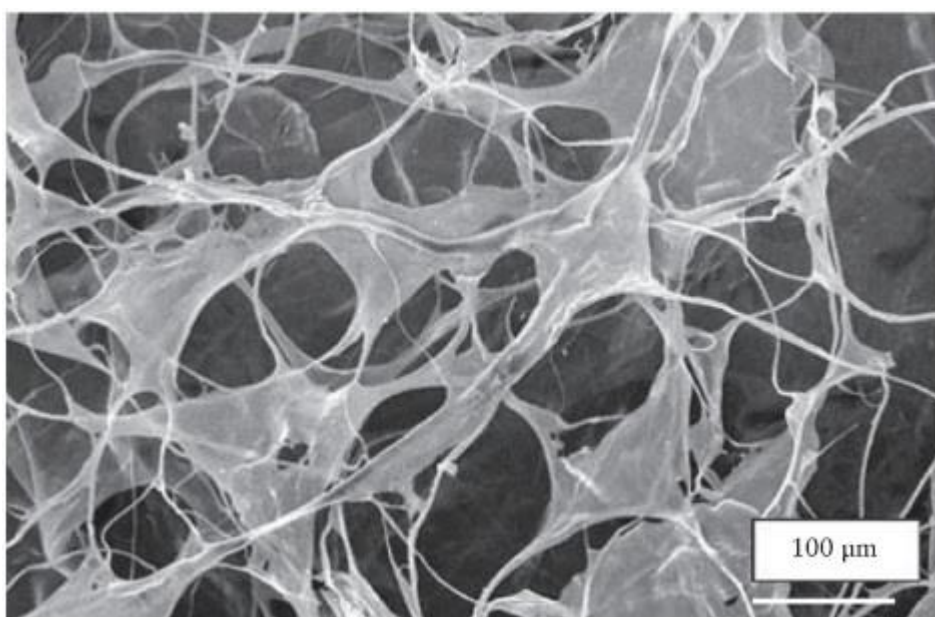
S vysokomolekulárním hyaluronanem se můžeme setkat např. u produktu Synvisc (6000 kDa). V USA první intraartikulární injekce hyaluronanu, SynviscOne®, byla schválena na začátku roku 2009. S rostoucím počtem pacientů trpících osteoartritidou roste poptávka po viskosuplementaci, stejně tak je stále větší zájem o dermální výplně. Na trhu je přes padesát různých kožních plniv pro estetické a plastické chirurgie založených na bázi hyaluronanu [51].

1.6.4 Nové formy hyaluronanu

Mezi nově vyráběné formy hyaluronanu patří hydrogely, nanovlákná, mikrovlákná a polymerní micely.

Hydrogely jsou polymerní sítě s vysokým obsahem vody a elasticitou. Poskytují objemné třírozměrné prostředí podobné skutečným tkáním [59]. Vyrábí se zesítněním derivátů kyseliny hyaluronové, obsahují od 0,5–10 % HA a mají molekulovou hmotnost kolem 60–1000 kDa. Dle výběru derivátu má hydrogel požadované mechanické vlastnosti. Do jejich struktury lze zahrnout buňky, vlákna, mikročástice, nanočástice nebo aktivní chemické či biologické látky. Hyaluronové hydrogely a jejich rezidua jsou biokompatibilní

a biologicky odbouratelné. Hydrogel může sloužit jako podpůrný nosič (tzv. scaffold) pro tkáňové inženýrství, materiál pro augmentaci měkkých tkání nebo k viskosuplementaci [50]. Hybridní hydrogely HA kombinované s dalším biopolymerem (např. chitosanem) se používají v regenerativní medicíně, především v intraartikulárních injekcích, kde prodlužují viskosuplementační efekt HA [60]. Jako zesít'ovadla se obvykle používají malé molekuly ve velkém počtu, např. 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC), hydrazin kyseliny adipové (ADH) a DVS. Zesít'ovadla přeměňují lineární polysacharid na stabilní porézní strukturu podobnou houbě, která zadržuje velký objem vody. Hydrogel na obr. 14 je zesítěná HA s polylysinem (v poměru 10:1) pomocí EDC a ADH [59].



Obr. 14: Hydrogel HA-polylysin pod elektronovým mikroskopem [59].

Biologicky aktivní „scaffoldy“ jsou založeny na analogii mimobuněčné matrice vyvolávající syntézu tkání a orgánů, čili slouží k obnovení funkce tkáně nebo její regeneraci. „Scaffoldy“ působí jako dočasná matrice pro buněčné proliferace a uložení matrice do té doby, dokud tkáň nejsou zcela obnoveny nebo regenerovány. Biokompatibilní hydrogely byly použity pro regeneraci chrupavek, kostí a jako prostředek pro řízené doručování léků. Hydrogely příznivě podporují migraci buněk, angiogenezi a zprostředkovávají rychlou difúzi živin. Hydrogelové „scaffoldy“ jsou intenzivně studovány v tkáňovém inženýrství, co se týče náhrad pojivových tkání, díky jejich biochemické podobnosti s GAGs. Další přírodní polymery, které se používají k formaci hydrogelů, jsou kolagen, želatina, fibrin, chitosan a alginát [61].

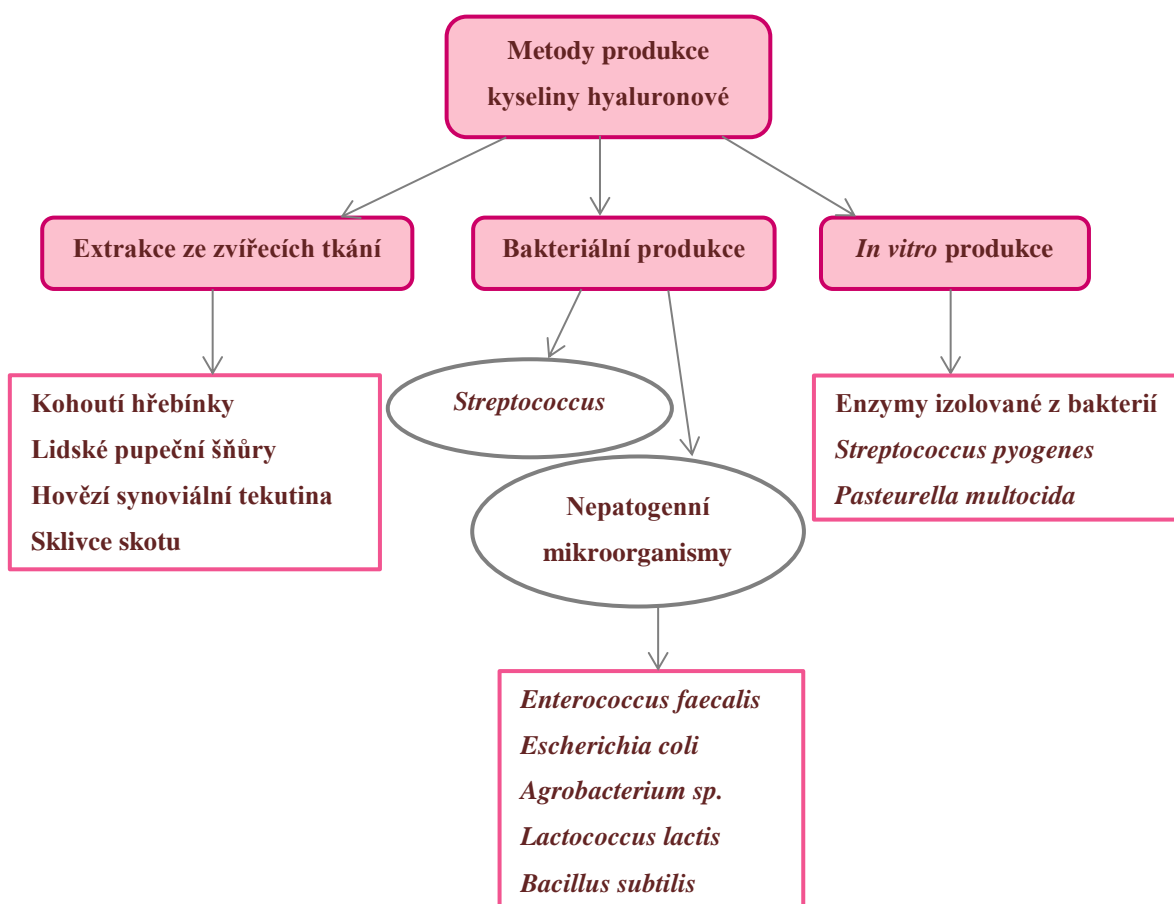
Nanovlákná ($M_w = 15\text{--}150$ kDa) vyráběná z HA jsou na výzkumném poli stále velice aktuální. Lze vytvářet různé struktury, objemné i ploché vrstvy. Vlákná mohou být náhodně překřížena nebo směrově uspořádána. Z hyaluronanových nanovláken se vyrábějí obvazy na rány, nosiče pro postupné uvolňování léčiv, „scaffoldy“, materiály vhodné pro regenerativní medicínu, kosmetická séra a nanomasky. Kromě toho mohou být kombinována s dalšími formami materiálů (např. s mikrovlákny) [50, 114].

Mikrovlákná ($M_w = 100\text{--}700$ kDa) se opět připravují z různých biodegradovatelných derivátů hyaluronanu. Deriváty se liší např. v rychlosti rozpustnosti ve vodě či době resorpce v těle. Vyrábí se z nich pletené tkaniny v různých vzorech, gramážích a velikostech. Vlákná a textilie se mohou dále modifikovat aktivními činidly [50].

Polymerní micely ($M_w = 10\text{--}20$ kDa) jsou sférické částice o velikosti 20–100 nm. Ve svém plášti obsahují hyaluronan, který zde slouží k cílení molekuly do buněk nebo tkání, které jsou citlivé na vázání hyaluronanu. Reagují tak např. s patologickými tkáněmi bohatými na receptory CD44. Polymerní micely mají velké uplatnění v dermatologii pro zvýšení penetrace aktivních látek. Jsou schopné překonat vrstvu kůže *stratum corneum*, přes kterou mohou dodat hydrofobní lék i do hlubších vrstev kůže. Využívají se tedy hojně ve farmacii a pro cílení léčiv [50, 115].

1.7 Výroba kyseliny hyaluronové

K výrobě hyaluronanu bylo vyvinuto několik technologických postupů. Obecné schéma je rozkresleno na obr. 15. Průmyslová výroba hyaluronanu spočívá ve dvou hlavních postupech, kterými jsou starší metoda extrakce z živočišných tkání a dnes velmi rozsáhlá mikrobiální fermentace. Obě technologie poskytují polydisperzní hyaluronan (tj. soubor HA řetězců různých délek) o vysoké molekulové hmotnosti ($M_w \geq 1 \times 10^6$ Da) vhodné pro medicínské a kosmetické využití [62].



Obr. 15: Metody výroby hyaluronanu [62].

1.7.1 Extrakce ze zvířecích tkání

Vůbec první pokus o extrakci polysacharidů ze sklivce skotu provedli Karl Meyer a John W. Palmer v roce 1934 [63]. Jejich postup inspiroval mnoho dalších vědců a v roce 1949 popsal Norman F. Boas izolaci kyseliny hyaluronové z kohoutích hřebínků [64]. Přes četné způsoby izolace a čištění produktu, až v roce 1979 popsal Balazs výrobu hyaluronanu z kohoutích hřebínků a lidské pupeční šňůry vhodného k farmaceutickému použití. Extrakce ze zvířecích tkání stále patří k základním způsobům průmyslové produkce hyaluronanu [62].

Hyaluronan lze extrahovat téměř ze všech tkání obratlovců, nejčastěji z kohoutích hřebínků [65], sklívce oka (ryb, skotu, atd.), prasečí kůže, pupeční šňůry, synoviální tekutiny či žraločí chrupavky. Extrakce hyaluronanu z živočišných tkání byly původně používány pro laboratorní výzkum za účelem objasnění jeho biologického potenciálu [62]. Nejvíce přístupné zdroje pro sériovou výrobu HA o vysoké M_w jsou kohoutí hřebínky (1,2 MDa), lidské pupeční šňůry (3,4 MDa), sklívce skotu (77 kDa až 1,7 MDa) a hovězí synoviální tekutina (14 MDa) [62]. Přehled koncentrací HA v živočišných zdrojích je pro srovnání v tabulce 1 [66].

Tabulka 1: Koncentrace hyaluronanu v živočišných zdrojích [66].

<i>Zdroj</i>	<i>HA (v g/l resp. g/kg)</i>
kohoutí hřebínky	8–45
hovězí synoviální tekutina	15–40
hovězí sklívec	0,3
žraločí sklívec	0,3
bakteriální kultury	2–6

Hyaluronan je sice rozpustný ve vodě, ale extrakce vysoce čistého hyaluronanu o vysoké M_w z živočišných tkání je obtížná, poněvadž v biologických materiálech je obvykle přítomen v komplexu s dalšími biopolymery, jako proteoglykany. K uvolnění hyaluronanu z těchto komplexů slouží proteolytické enzymy (např. papain, pepsin a trypsin), iont-párové vysrážení s cetylpyridinium-chloridem, vysrážení organickými rozpouštědly nebo detergenty. K odstranění nečistot se používá ultrafiltrace a chromatografie. Sterilní filtrací se odstraňují všechny mikrobiální buňky před precipitací alkoholem, sušením a úpravou konečného produktu [62].

Nevýhodou extrakce ze zvířecích tkání je nevyhnutelná degradace hyaluronanu, způsobená aktivitou hyaluronidáz v živočišných tkáních. Výsledkem toho je získání vždy polydisperzního hyaluronanu. Další nevýhodou představují drsné extrakční podmínky a oproti bakteriální produkci i nižší výtěžky extrakce. Nebezpečné je zde riziko kontaminace proteiny, nukleovými kyselinami, bakteriálními endotoxiny a viry. Množství nečistot se liší dle zdroje, největší hladina proteinů a nukleových kyselin se nachází v pupeční šňůře a hovězím sklívci [67]. Největší riziko představuje prionové onemocnění skotu BSE (bovinní spongiformní encefalopatie) [62].

Alternativními zdroji k získání kyseliny hyaluronové jsou například játra rejnoků *Aetobatus narinari* (Siba skvrnitá) [68], mořští mlži *Amussium pleuronectus*, mořská ryba

Cyclopterus lumpus (Hranáč šedý). Zajímavou a levnou alternativou mohou být skořápky od vajec, které údajně obsahují nejméně 0,5 % (w) HA [69].

Kyselina hyaluronová získaná ze zvířecí tkáně může být prokázána pomocí reakce s karbazolem. Jedná se o rychlý test přítomnosti HA na základě reakce s karbazolem v etanolu za přítomnosti tetraboritanu sodného v testovací tubě, po zahřátí při 100 °C na 15 min. Po ochlazení na pokojovou teplotu se změří absorbance zbarveného roztoku při 530 nm. Druhou možností je využití elektroforézy na acetátu celulózy. Vzorek a standard je aplikován na acetátcelulóзовый proužek namočený v pufru ze směsi pyridin/kyselina octová/destilovaná voda (pH 3,5). Po skončení eluce (150 V, 45 min) je proužek obarven alciánovou modří. Další způsoby používané k ověření přítomnosti extrahované HA jsou spektrální metody, které jsou popsány v kapitole 1.10 [70].

1.7.2 Produkce hyaluronanu bakteriální fermentací

Poptávka po hyaluronanu získaného bakteriální produkcí za posledních pár let velmi vzrostla. Jsou kladené vysoké nároky na kvalitu a čistotu hyaluronanu pro následnou výrobu biomateriálů, medicínské použití a tkáňové inženýrství [71].

Principem je průmyslová fermentace bakterií rodu *Streptococcus*, nepohyblivých, nesporulujících, grampozitivních koků, které se seskupují do párů a řetězků o různé délce [72]. Tyto bakterie přirozeně produkují HA, která je uložena v jejich buněčné stěně. Bakterie jsou fermentovány v bioreaktoru při 37 °C po dobu 25 hodin aerobně. Komplexní médium obsahuje kvasničný extrakt, fosforečnan draselný, glukózu, síran hořečnatý, chlorid sodný a L-glutamát. Následuje důkladný proces čištění. Nerozpustné nečistoty a bakteriální kmeny jsou odstraněny filtrací, metabolické produkty a nečistoty o nízké molekulové hmotnosti pak membránovou ultrafiltrací. Endotoxiny, vysokomolekulární proteiny a nukleové kyseliny jsou vyvázány na adsorbenty (aluminu a aktivní uhlí). Adsorbenty jsou nakonec odstraněny přefiltrováním přes 0,45 µm filtr. Tímto způsobem se získává vysokomolekulární HA s výbornou biokompatibilitou [71]. K průmyslové fermentaci jsou využívány především bakterie *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *Streptococcus equi* subsp. *equi*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus equisimilis* a *Streptococcus dysgalactiae* [73].

Dále lze kyselinu hyaluronovou získat i z gramnegativní bakterie *Pasteurella multocida*. Tvorba HA je však obvykle pozorována u grampozitivních bakterií, jelikož většině gramnegativních bakterií chybí klíčový enzym pro její syntézu [73, 74].

Při fermentačním postupu se musí čelit riziku doprovodných bakteriálních endotoxinů, alergenů a jiných nežádoucích produktů. Tento problém byl vyřešen zavedením genu pro syntézu HA do jiných mikroorganismů (tzv. genetická modifikace), výsledkem čehož je produkce HA rekombinantními nepatogenními mikroorganismy. Bakterie používané k tomuto účelu jsou *Bacillus*, *Lactococcus*, *Agrobacterium* a *Escherichia coli* [51, 74].

1.7.3 Enzymatická produkce hyaluronanu *in vitro*

Nejnovější metodou produkce HA je technologie, která využívá izolované hyaluronansyntázy ke katalýze polymerizace monomerů UDP-cukrů. Tímto způsobem lze vyrábět hyaluronan jak o vysoké molekulové hmotnosti, tak oligosacharidy o definované délce a nízké polydisperzitě. K produkci monodisperzních oligosacharidů HA byly použity například rekombinantní hyaluronansyntázy bakterií *P. multocida* [62].

Srovnání všech tří základních metod výroby HA, jejich výhody a nevýhody jsou shrnuty v tabulce 2.

Tabulka 2: Srovnání metod pro výrobu hyaluronanu [62].

<i>Metoda</i>	<i>Výhody</i>	<i>Nevýhody</i>
<i>Extrakce z živočišných zdrojů</i>	<ul style="list-style-type: none"> › dobře zavedená technologie › dostupný materiál za nízkou cenu › produkt s vysokou M_w (> 20 MDa) › přírodní produkt 	<ul style="list-style-type: none"> » rozdíly ve kvalitě produktů » riziko degradace polymeru » riziko kontaminace proteiny, NK a viry » nutnost purifikace (čištění) » nízké výtěžky » dražší (náklady na čištění)
<i>Bakteriální produkce</i>	<ul style="list-style-type: none"> › vyspělá technologie › vysoké výtěžky › produkt s vysokou M_w (1-4 MDa) 	<ul style="list-style-type: none"> » riziko kontaminace bakteriálními endotoxiny, proteiny, NK a těžkými kovy » použití geneticky modifikovaných organismů
<i>Enzymatická syntéza</i>	<ul style="list-style-type: none"> › všestranná technologie › možnost řízení M_w produktu od 0,55-2,5 MDa › neměnná kvalita produktu › žádné riziko kontaminace 	<ul style="list-style-type: none"> » technologie ve fázi vývoje

1.8 Kapalinová chromatografie

Chromatografie je separační analytická metoda založená na rozdílné distribuci dělených látek mezi dvě nemísitelné fáze, stacionární (SF) a mobilní (MF). Slouží k separaci, identifikaci a stanovení většiny organických i anorganických látek [75]. Pro všechny chromatografické metody je společné postupné a mnohonásobně opakované vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi dvěma (popř. i více fázemi) až do ustavení dynamické rovnováhy [76].

Stacionární fáze může být tuhá látka v podobě částic nebo film kapaliny zakotvené či chemicky navázané na tuhý inertní nosič. Vlastnosti nosiče jako porozita, velikost a tvar pórů, jsou podstatné pro účinnost dělení. Na základě typu interakcí dělených látek se stacionární fázi lze klasifikovat chromatografické metody na adsorpční, rozdělovací, iontově výměnnou, gelovou nebo afinitní chromatografii. Na separaci se mohou podílet dva i více uvedených mechanismů [76, 77].

Mobilní fázi může být plyn nebo kapalina, která unáší separované látky ložem stacionární fáze [76]. Separace a eluce analytů závisí na povaze SF i MF. Zůstává-li v průběhu separace složení mobilní fáze konstantní, jedná se o izokratickou eluci. Stejná eluční síla mobilní fáze je vhodná v případě, že mají látky podobné fyzikálně-chemické vlastnosti (hodnoty distribučních konstant). Naopak, pro separaci látek s velmi odlišnými vlastnostmi, se využívá gradientová eluce, při níž se eluční síla mobilní fáze s časem zvyšuje. Složení mobilní fáze je při ní programově měněno ve prospěch silnější eluční složky. Výsledkem je zúžení chromatografických píků, zvýšení citlivosti detekce a podstatné zkrácení doby analýzy [76, 77].

1.8.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Nejčastějším uspořádáním je vysokoúčinná kapalinové chromatografie (HPLC, High-Performance Liquid Chromatography). Vysoká účinnost této metody je dosažena použitím kolon naplněných velmi jemnými částicemi o velikosti 2 až 5 μm a průtoku MF kolonou pod vysokým tlakem. To vyžaduje použití vysokotlakých čerpadel pracujících za tlaků 30 až 60 MPa. V případě ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC, Ultra High-Performance Liquid Chromatography), kde se používá částic $< 2 \mu\text{m}$ může být dosaženo tlaku až 130 MPa [77, 78].

1.8.2 Instrumentace ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii

Sestava jednoduchého kapalinového chromatografu se skládá ze základních částí, zajišťujících transport mobilní fáze (vysokotlaká čerpadla), dávkování vzorku (vysokotlaké dávkovací ventily, automatické dávkovače), separaci látek (analytické kolony), detekci, záznam a zpracování dat. Všechny moderní kapalinové chromatografy by měly splňovat řadu požadavků, které zabezpečují účinnost chromatografické separace, reprodukovatelnost retenčních dat a přesné kvantitativní výsledky [78].

Mobilní fáze je ze zásobníků dávkována pomocí vysokotlakých čerpadel, která musí být konstruována z nerezových materiálů, odolných vůči poměrně agresivním mobilním fázím a vůči vysokému tlaku. Vhodné jsou nerezová ocel, titan či keramické materiály. Základním požadavkem je zajištění stabilního průtoku MF. Změna průtoku mobilní fáze by se měla dát nastavit v širokém rozmezí od 0,1 do 10 ml. Vnitřní objem čerpadel by měl být co nejmenší, aby umožnil rychlou výměnu mobilní fáze. Bublínky rozpuštěných plynů, které by se mohly uvolnit při změně tlaku na výstupu z kolony nebo v koloně, je nutno odstranit, protože působí rušivě na funkci čerpadel i na signál některých detektorů. Nejčastěji se používá probublávání heliem nebo vakuový degasser. Vysokotlaká čerpadla se principiálně dělí do dvou skupin, na čerpadla pracující při konstantním tlaku nebo konstantním objemovém průtoku. Existují čerpadla pneumatická, injekčního typu, pístová, membránová a dvoupístová zapojená do série [77, 78].

Pro dávkování vzorku se používají manuální smyčkové dávkovače na principu přepínacích ventilů nebo automatické dávkovače (tzv. autosamplery). Dávkovací vysokotlaké ventily mohou využívat dávkovací smyčku o různých objemech (od 0,2 μ l do 2 ml) nebo konstantní objem vnitřního prostoru ventilu [77, 78].

Takzvaným srdcem chromatografu je chromatografická kolona, na jejíž volbě závisí celá chromatografická separace. Důležitými aspekty při výběru kolony jsou druh sorbentu a velikost částic. Kolony jsou rovné trubice s dokonale hladkým vnitřním povrchem, zhotovené z materiálu odolného proti vysokým tlakům a chemickému působení mobilní fáze a separovaných látek. Používanými materiály jsou antikorozi ocel s leštěným vnitřním povrchem, tlustostěnné trubice z borosilikátového tvrzeného skla (použitelné pouze do tlaků 20 MPa) a polyetheretherketon (PEEK) [77, 78]. Rozměry kolon závisejí na účelu použití a na velikosti částic náplně. S rostoucí délkou kolony se úměrně zvyšuje účinnost separace, současně i doba analýzy a pracovní tlak [43]. Kolony v HPLC lze klasifikovat podle průměru (d), délky (l) a průtoku mobilní fáze (F_m) na kolony preparativní ($d > 10$ mm, l v desítkách

cm, F_m ve stovkách ml/min), analytické ($d = 2,1-5$ mm, $l = 10-30$ cm, $F_m = 0,5-3$ ml/min), mikrokolony ($d = 0,5-1$ mm, $l = 5-30$ cm, $F_m = 0,05-0,2$ ml/min) a kapilární kolony ($d = 100-500$ μm , $l = 10-30$ cm, $F_m = 1-20$ $\mu\text{l/min}$) [79].

Dle povahy lože stacionární fáze se rozlišují kolony plněné diskretními částicemi sorbentu a monolitické kolony se stacionární fází připravenou „*in situ*“ ve formě jednoho kusu [46]. Jsou známé tři typy monolitických kolon - anorganické, polymerní a stlačitelné monolity (komprimované gely). Výhodou monolitů je snadná příprava, široká možnost modifikace, vyšší permeabilita a dobrá účinnost separace [77, 79]. Klasické pórovité náplně vykazují velký odpor vůči převodu hmoty ve stagnující mobilní fázi, který se dá potlačit zmenšením průměru částic. Čím menší je velikost částic v koloně, tím vyšší je účinnost separace, ovšem rostou problémy s plněním kolon a vysokými pracovními tlaky. Dále lze použít tzv. povrchově porézní částice, kde je tenká aktivní vrstva sorbentu (cca 0,5 μm) nanášena na neporézním kulovitém jádru [77]. Rozdělení stacionárních fází do skupin není snadné. Často se lze setkat s členěním dle chromatografického separačního módu na chromatografii s normálními fázemi (NP-HPLC) nebo obrácenými fázemi (RP-HPLC), chromatografii hydrofilních interakcí (HILIC), iontově výměnnou (IEC), iont-párovou (IPC), gelovou permeační/ chromatografii stérické výluky (GPC/ SEC), afinitní nebo chirální chromatografii. Členění není dostatečné, protože jedna fáze může pracovat ve více módech. Převážně se používají náplně s chemicky vázanými stacionárními fázemi, přičemž podle navázané funkční skupiny rozlišujeme polární ($-\text{NH}_2$, dioly), středně polární ($-\text{CN}$), nepolární ($-\text{C}_8$, $-\text{C}_{18}$, -fenyl) a amfoterní (zwitterionty) stacionární fáze [77, 79].

Detekční systémy v chromatografii zaznamenávají rozdíl mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující eluovanou složku. Během detekce může a nemusí dojít k chemickým změnám a nevratnému poškození analytu. Z tohoto hlediska se detektory dělí na destruktivní a nedestruktivní. Další klasifikace rozlišuje detektory koncentrační a hmotnostní. Koncentrační detektory reagují na změnu hmotnostní koncentrace složky v efluentu nezávisle na rychlosti přívodu složky do detektoru. V ideálním případě je odezva detektoru přímo úměrná koncentraci eluující složky. Hmotnostní detektory reagují na změnu hmotnostního toku detekované složky vstupující do detektoru. Selektivní detektory poskytují signál úměrný pouze koncentraci analyzované složky v eluátu a univerzální detektory poskytují signál úměrný dané vlastnosti eluátu jako celku. Do speciálních požadavků na detektory patří vysoká citlivost, univerzálnost, specifita, linearita, nízký šum nulové linie, nedestruktivnost a další. Šum detektoru se projevuje rozkmitaným zápisem nulové linie. Je důsledkem kolísání

experimentálních parametrů, jako jsou průtok mobilní fáze, teplota, napětí v síti apod. Nejčastěji používané detektory v kapalinové chromatografii jsou spektrofotometrický (UV/VIS detektor), fluorescenční (FLD), hmotnostní, elektrochemický, detektor rozptylu světla (ELSD), refraktometrický, vodivostní a chemiluminiscenční [77, 78].

1.9 Derivatizace v kapalinové kolonové chromatografii

Derivatizace sloučenin je cílená přeměna chemické struktury analytu chemickou reakcí funkční skupiny s vhodným derivatizačním činidlem. Produktem je derivát o definovaném složení, který má požadované fyzikálně-chemické vlastnosti. Derivatizace se používá pro získání kvalitativně nových vlastností separovaných látek, které se projeví zvýšením citlivosti detekce, zlepšením separace a usnadněním identifikace nebo stanovení. Dle toho, kdy je reakce provedena, se rozlišuje technika předkolonové a post-kolonové derivatizace, které mohou být v režimu on-line či off-line [78, 80].

Off-line předkolonová derivatizace je jednoduchá metoda, která nevyžaduje speciální instrumentaci, poněvadž reakce probíhá mimo chromatograf. V případě on-line předkolonové derivatizace k reakci dochází v mikroreaktoru, kam je vzorek a derivatizační činidlo dávkováno automaticky pomocí smyček o různých objemech a směšovacího T kusu. Využívají se často derivatizační činidla, která poskytují produkty vyznačující se intenzivní fluorescencí. Reakce se zastaví ve chvíli, kdy reakční směs vstoupí do chromatografické kolony a komponenty se začnou separovat [78].

Přístupuje-li se k derivatizaci až po průchodu látek kolonou, jedná se o post-kolonovou derivatizaci. Off-line technika spočívá ve sběru frakcí eluátu z kolony, které jsou následně derivatizovány a již se s ní v praxi nesetkáváme. On-line mód se provádí v mikroreaktorech zařazených mezi kolonu a detektor. Pokud je funkce reaktoru a detektoru spojena, mluvíme o reakčních detektorech. Tato technika je nákladnější, neboť vyžaduje speciální zařízení. Derivatizační reakce musí probíhat rychle a používaná činidla by měla poskytovat kvantitativní reakci. Post-kolonová derivatizace přináší řadu výhod, například eliminaci veškerých manuálních operací, vedlejší produkty reakce nejsou na závadu a reakce může být neselektivní. Derivatizační reakce nemusí probíhat zcela kvantitativně, protože rozhodující je dobrá reprodukovatelnost chemické reakce. Mezi nevýhody pak patří přítomnost nezreagovaného přebytečného činidla, které samo poskytuje signál. Další problém představuje rozmývání chromatografické zóny při průchodu mobilní fáze mikroreaktorem, což má za následek snížení účinnosti separace [78].

1.9.1 Derivatizace hyaluronanu

K detekci nenasyčených disacharidů hyaluronanu (Δ Di-HA) je nejjednodušší využití absorpce UV záření při vlnové délce kolem 230 nm, jež je umožněna dvojnou vazbou v kyselině uronové vzniklou po degradaci hyaluronidázami. Detekovatelné množství se nachází v rozsahu nanogramů. Δ -Disacharidy silně absorbují při 232 nm a jejich molární absorpční koeficient nabývá hodnot $5500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [81]. Nicméně detekce v UV/VIS oblasti spektra není dostatečně citlivá a někdy vyžaduje časově náročné a zdoluhavé přípravy. Pro zlepšení detekčních limitů a selektivity se proto provádí derivatizace hyaluronanu s následnou separací (chromatografickou nebo elektroforetickou) a vhodnou detekcí (UV, fluorescenční či hmotnostní). Fluorimetrická detekce dovoluje rozšířit stanovitelné množství na úroveň pikogramů.

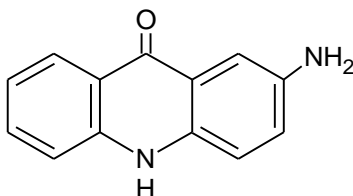
Mezi známá derivatizační činidla vhodná pro předkolonovou derivatizaci nenasyčených disacharidů patří dansylhydrazin, 2-aminopyridin a 1-fenyl-3-methyl-5-pyrazolon. Klasické post-kolonové reakční činidlo pro redukující cukry je 2-kyanoacetamid, které vykazuje až čtyřicetkrát silnější intenzitu fluorescence než neutrální monosacharidy. Umožňuje stanovit GAGs v různých biologických vzorcích jako je plasma, sérum, krevní buňky, moč a tkáň [29]. Nevýhody fluorimetrické detekce s těmito činidly jsou pro 2-kyanoacetamid nutnost použití teflonové reakční cívky a pro 2-aminopyridin délka derivatizace z důvodu nutné následné redukce meziprojektu dimethylaminboranem [82].

Postupy derivatizační reakce hyaluronanu s fluorofory vycházejí z prvotního postupu, který popsal Jackson v roce 1991 a od té doby jsou různě modifikovány [83]. Vzorky s obsahem GAGs jsou předem podrobené enzymatickému štěpení a vysušeny do sucha inertním plynem či lyofilizovány. Následně se přidává vhodné derivatizační činidlo. Fluorofor obsahuje primární aminoskupinu. Navázání aminoskupiny fluoroforu probíhá na redukující konec (aldehydový uhlík) sacharidu. Reakcí vzniká imin, tzv. Schiffova báze, která je stabilizována reduktivní aminací kyanoborohydridem sodným. Takto vznikají stabilní fluorescenční deriváty sacharidů, které pak mohou být separovány a detekovány [84, 85].

Kyanoborohydrid sodný se používá pro reduktivní aminaci aldehydů a ketonů a také pro reduktivní alkylaci aminů [28]. Nevýhodou je jeho toxicita, především při styku s kyselinami dochází k vývinu jedovatého plynu. Proto se v poslední době jako náhrada používá netoxický 2-pikolinboran, který je navíc stabilní v kyselém prostředí, není zdrojem sodíku a je více selektivní. Deriváty se díky tomu hodí pro následnou analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie po ionizaci elektrosprejem (ESI/MS) [85, 86].

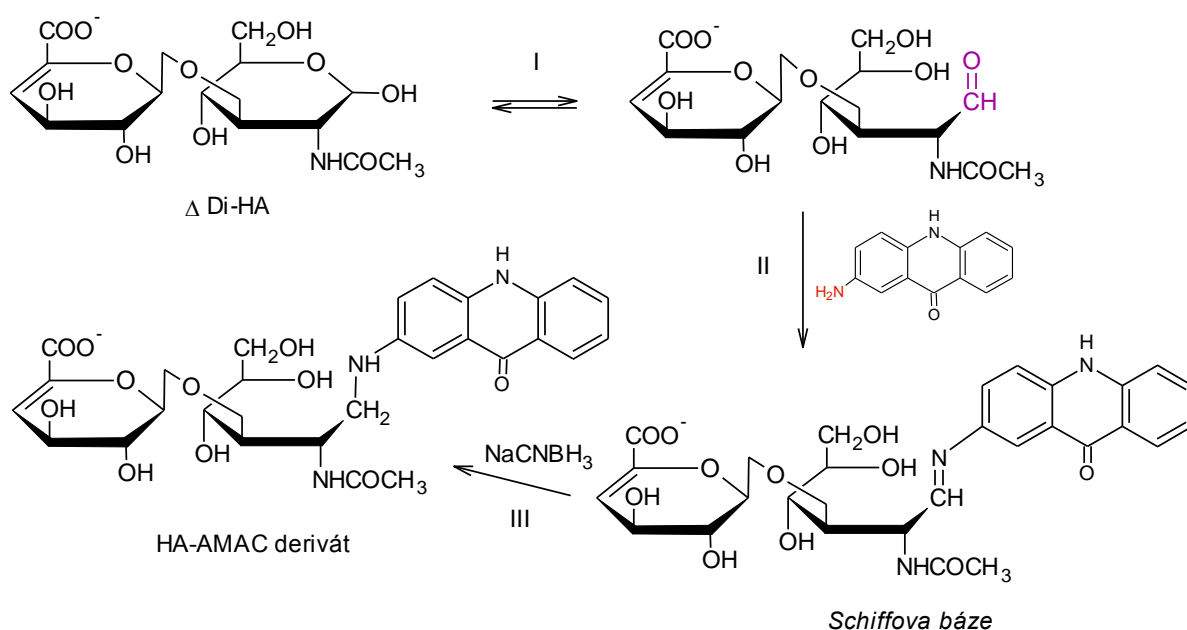
1.9.2 2-aminoakridon

Bioreagent 2-aminoakridon (na obr. 16) s $M_w = 210,23 \text{ g/mol}$, známý pod zkratkou AMAC, je velmi oblíbené derivatizační činidlo spojené se značením všech GAGs. Umožňuje následné použití jak fluorescenční, tak hmotnostní detekce pro kvantitativní stanovení [85].



Obr. 16: 2-aminoakridon [28].

Je to vysoce fluorescenční aromát obsahující primární aminovou skupinu, která reaguje s aldehydovou skupinou redukujícího cukru. Derivatizace hyaluronanu s 2-aminoakridonem je zakreslena na obr. 17 [16]. Molekulovou hmotnost výsledného derivátu lze vypočítat následovně: $\Delta\text{Di-HA} + \text{AMAC} - \text{H}_2\text{O} + 2 \text{ H} = 379 + 210,23 - 18 + 2 = 573,23 \text{ g/mol}$.



Obr. 17: Derivatizační reakce nenasyceného HA disacharidu s 2-aminoakridonem. I) V roztoku jsou redukující cukry v rovnováze (uzavřená vs. otevřená konformace), II) Volný redukující konec sacharidu (aldehydová skupina) reaguje s primární aminoskupinou v činidle a tvoří Schiffovu bázi, III) Reduktivní aminace kyanoborohydridem sodným za vzniku derivátu [16].

Vlnová délka excitace a emise tohoto fluoroforu jsou 425 nm a 532 nm. AMAC je hydrofobní molekula stabilní v širokém rozsahu pH [28]. V neutrálním a alkalickém prostředí

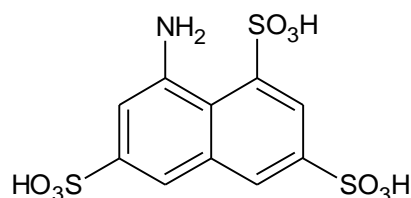
je nenabíjí a proto se hodí pro analýzu malých kyselých sacharidů. Vlnová délka emise způsobuje žluté zbarvení derivátů v UV světle [84].

Protože volné činidlo je více nepolární, než jeho deriváty, je v RP-HPLC eluováno až po derivátech [87]. Deriváty 2-aminoakridonu jsou výjimečně stabilní i po jednom měsíci uchování při pokojové teplotě. Nejčastěji jsou separovány pomocí RP-HPLC-ESI-MS [28].

Mimo to se o nich lze často dočíst ve spojení s fluorofory podporovanou gelovou elektroforézou (FACE). Je to užitečná metoda pro určení disacharidového složení všech GAGs [88]. AMAC deriváty mají stejnou hodnotou molární fluorescence nezávisle na jejich chemickém složení. Výsledný označený sacharid tedy poskytuje fluorescenční signál závislý výhradně na fluoroforu. Po separaci se relativní fluorescence každého pruhu kvantifikuje CCD („charge-coupled device“) kamerou. Identifikovány jsou různé štěpné produkty a těmi jsou v případě hyaluronanu buď Δ Di-HA, nebo nasycené neredukující Di-HA [89].

1.9.3 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfonová kyselina

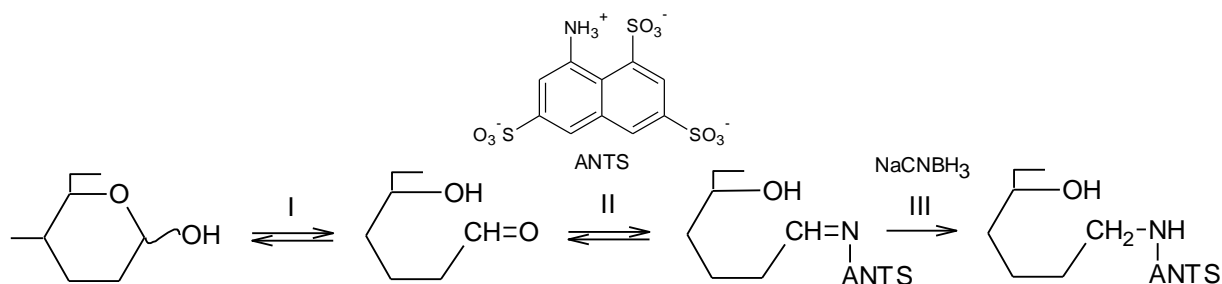
Kyselina 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfonová ($C_{10}H_9NO_9S_3$) s $M_w = 383$ g/mol, neboli ANTS (obr. 18), je fluorescenční činidlo s excitačním maximem při vlnové délce 365 nm a emisním maximem při 515 nm. Činidlo obsahuje tři sulfonové kyseliny záporně nabitě v širokém rozmezí pH [85]. Ty udělují původně neutrální molekule tři negativní náboje, díky nimž může značená molekula migrovat v elektrickém poli.



Obr. 18: ANTS [28].

Pomocí ANTS mohou být značeny kyselé i neutrální sacharidy. Jejich separace je založena jak na náboji, tak na velikosti. Pohyblivost neutrálních derivátů závisí převážně na jejich velikosti, protože všechny mají díky ANTS stejný náboj [84].

S tímto činidlem se častěji setkáváme v polyakrylamidové gelové elektroforéze (PAGE) a kapilární elektroforéze (CE), než v HPLC. Propůjčuje sacharidům elektrický náboj a fluorescenci. Princip derivatizační reakce je opět založen na vzniku Schiffovy báze [90]. Reakce redukujícího cukru s činidlem ANTS je znázorněna na obr. 19 [91].



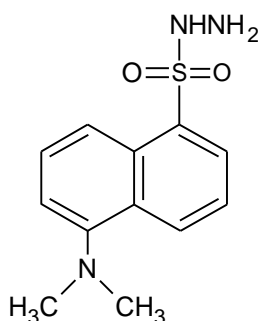
Obr. 19: Polysacharid v otevřené konformaci s redukujícím koncem (I), značení redukujícího sacharidu fluoroforem ANTS (II), vznik Schiffovy báze a redukce pomocí kyanoborohydridu sodného (III) [91].

Pomocí ANTS mohou být značeny i neštěpené polysacharidy. Konjugát je pak jednoduše odseparován od volného činidla pomocí 75% etanolu, v němž je ANTS na rozdíl od polysacharidů vysoce rozpustný. Ke konjugaci s polysacharidy se používá 0,02 M ANTS v kyselině octové/vodě (3/17, v/v) v poměru 1:400 (polysacharid:ANTS), což je optimální poměr pro vysoce efektivní konjugaci mezi polysacharidem a činidlem. Směs se míchá na vortexu a inkubuje ve vodní lázni. Poté se přidává 1 M NaCNBH₃ a v konečné fázi se zbavuje volného činidla promytím 75% etanolem. Touto metodou se dají separovat polysacharidy ze zvířecích tkání a krevního séra [92].

V posledních pár letech je zájem především o studium glykoproteinů, kterým se zabývá obor glykomika. Glykosylace je nejčastější posttranslační modifikace proteinů a hraje důležitou roli v živých organismech. Dělí se podle typu vazby sacharidů s proteiny na N-glykosylaci a O-glykosylaci. Obě nabízejí rozdílné analytické přístupy, většinou založené na enzymatickém uvolnění glykanů z glykoproteinů. Uvolněné glykany jsou analyzovány často pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (HPLC/MS) a kapilární elektroforézy spojené s hmotnostní spektrometrií (CE/MS). Pro on-line detekci je pak nutná derivatizace chromofory nebo fluorofory. Jedním z nejcitlivějších značek pro laserem indukovanou fluorescenci je právě ANTS nebo APTS (8-aminopyrentrisulfonová kyselina). Protože spousta glykanů obsahuje záporně nabitě sialové kyseliny, negativní náboj na činidlo nemůže neutralizovat náboj analytu a tudíž celý značený glykan má negativní náboj. Každá nabitá značka podporuje ionizaci v MS, kde se však očekává extra vysoká citlivost u pozitivně nabitých molekul. Proto byla vyvinuta metoda tzv. kationtového značení sacharidů pomocí AETMA ((2-aminoethyl)-trimethylammonium chlorid hydrochlorid). Před značením jsou polysacharidy hydrolyzovány (např. dextran kyselinou trifluorooctovou při 100°C) [93].

1.9.4 Dansylhydrazin

Dansylhydrazin (DNS-H) neboli 5-(dimethylamino)naftalen-1-sulfonohydrazid s $M_w = 265,33$ g/mol na obr. 20, je fluorescenční barvivo, které patří do skupiny substituovaných hydrazinů a řadí se k činidlům selektivních pro karbonylovou skupinu. Má vlnovou délku excitace při 340 nm a emise 525 nm (v ethanolu). Používá se také k detekci separovaných glykoproteinů pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS-PAGE). Může způsobit podráždění očí a kůže [28]. Generace fluorescenčních disacharidových derivátů HA působením dansylhydrazinu je rychlá a levná [82].



Obr. 20: Dansylhydrazin [28].

1.10 Stanovení hyaluronanu spektrálními metodami

Pro kontrolu přítomnosti enzymaticky ošetřeného nebo čerstvě vyprodukovaného hyaluronanu (jak ze zvířecích tkání, tak bakteriálně) se často používají spektrální metody. Slouží k jeho charakterizaci a ke kontrole čistoty srovnáním se standardy.

Tyto metody se také uplatňují při charakterizaci dvojně vazby v hyaluronanových fragmentech. K tomuto účelu lze využít metody nukleární magnetické rezonance (NMR), Ramanovu spektroskopii, infračervenou (IČ) a UV/VIS spektroskopii. Dvojná vazba v HA je významná z toho důvodu, že tvoří komplex s radikály (ROO, HO) za působení UV záření a snižuje toxicitu radikálů dříve, než jsou absorbovány v lidské pokožce. Částečně tedy chrání pleť před škodlivými účinky UV záření [94].

1.10.1 UV/VIS spektroskopie

Nenasycená vazba v HA fragmentech se jednoduše detekuje pomocí absorpční spektroskopie v UV/VIS oblasti. Absorpce UV záření kolem 230 nm náleží dvojně vazbě mezi čtvrtým a pátým uhlíkem v kyselině glukuronové. Toho se využívá pro detekci nenasycených disacharidů i k pouhé kontrole účinnosti štěpení enzymu. Absorbovat však

může spousta jiných složek roztoku, čímž může dojít k překryvu absorpčních pásů či posunu absorpčního maxima. Metoda se tudíž příliš nehodí pro vzorky se složitou maticí [17].

1.10.2 FT-IČ spektroskopie

Častým způsobem k detekci fragmentů je infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FT-IČ) v ATR módu (tj. zeslabený úplný odraz) za použití fluoridu barnatého. Vzorek HA (cca 0,5 ml) je nakapán ve třech vrstvách na BaF₂ a vysušen, poté překryt další vrstvou BaF₂ a proměřen. Spektra byla zaznamenána ve střední IČ oblasti 4000–800 cm⁻¹. Potvrzení spočívá v porovnání spekter vzorku se standardem. Charakteristické absorpční pásy funkčních skupin HA jsou přibližně 3300–3500 cm⁻¹ (OH a NH), 1645–1650 cm⁻¹ a 1565–1587 cm⁻¹ (CO, CN, NH ve skupině NHCOCH₃), 2891–2900 cm⁻¹ (CH), 1423–1435 (CH₂) a 1070–1081 cm⁻¹ (COC, CO, COH). Dvojná vazba CH=C vzniklá po štěpení se nachází při 1550 a 1750 cm⁻¹ [70, 94].

Rovněž lze použít Ramanovu spektroskopii, pomocí které byly proměřeny tři vzorky HA o různých molekulových hmotnostech (31 kDa, 235 a 1200 kDa). Pro 31 kDa HA byl naměřen ostrý pás při vlnětu 1661 cm⁻¹. Intenzita pásu stoupá s klesající molekulovou hmotností, což značí tvorbu dvojně vazby v molekule fragmentu [94].

1.10.3 NMR

¹H NMR i ¹³C NMR spektroskopie lze použít pro charakterizaci HA fragmentů. Jako rozpouštědlo pro vzorky se používá D₂O a vnitřní standard TSP (trimethylsilyl propionát).

Spektra ¹H NMR ukazují charakteristické píky při chemickém posunu 1,9 ppm, které náleží protonu z -CH₃ skupiny. Signály v oblasti 3,3–5,6 ppm odpovídají protonům z D-glukuronové a N-acetylglukosaminové jednotky. HA ve formě kyseliny bude mít místo Na⁺ (v COO⁻Na⁺) vodíkový proton H⁺, což se projeví signálem při 7,8 ppm (proton z COOH skupiny) [95].

Dvojná vazba CH=C fragmentů je dokázána signály při 5,77 ppm (¹H) a 107,5 ppm (¹³C) [94].

1.11 Stanovení hyaluronanu chromatografickými metodami

Obečně je HPLC nejpohodlnější a nejefektivnější metodou nejen pro strukturální a kvantitativní analýzu GAGs, ale i pro purifikaci vzorku a určení molekulové velikosti fragmentů [17].

Polymerní řetězec hyaluronanu musí být před vlastní analýzou nejprve rozštěpen na kratší jednotky, nejlépe nenasycené disacharidy. K tomuto účelu se používají specifické enzymy. Jejich charakteristika, typy a mechanismus štěpení byly popsány v kapitole 1.3. Získané fragmenty lze derivatizovat vhodným činidlem, nejčastěji 2-aminoakridonem či dansylhydrazinem [88]. Derivatizaci hyaluronanu objasňuje kapitola 1.9.1.

Nachází-li se ve vzorku i další GAGs, je lepší použít substrátově specifické hyaluronidázy produkované kmenem *Streptomyces hyalurolyticus*. Chondroitinázy sice účinně produkují Δ Di-HA, ale i Δ Di-OS, což jsou epimery lišící se pouze na čtvrtém uhlíku v hexosaminové části, důsledkem čehož se stává vzájemná separace těchto dvou disacharidů obtížná [17].

Nenasycené disacharidy byly separovány pomocí různých typů vysokoúčinné kapalinové chromatografie [81]. K analýze hyaluronanu může být zvolena NP-HPLC, RP-HPLC (pro derivatizovaný hyaluronan), IPC, aniontově výměnná chromatografie, GPC, UHPLC i HILIC. Po HPLC separaci lze volit mezi klasickou UV detekcí, citlivější fluorescenční detekcí nebo hmotnostní spektrometrií. Je možná i vodivostní detekce, avšak její citlivost a selektivita je oproti UV detekci na horší úrovni [17].

Separaci nenasycených disacharidů derivatizovaných dansylhydrazinem na chemicky vázané aminopropylové fázi popsal Volpi [82]. Mobilní fázi tvořil acetonitril a 100 mM acetátový pufr (pH 5,6) v poměru 90:20. Fluorescence byla monitorována při vlnové délce excitace 350 nm a emise 530 nm. Touto metodou byly nenasycené disacharidy GAGs extrahované ze zvířecí tkáně separovány při použití izokratického režimu s citlivostí vyšší než 50 pmol (cca 20–30 ng) [88].

Chceme-li využít pouze spektrofotometrickou UV detekci ($\lambda = 232$ nm), lze stanovení provést nejlépe metodou NP-HPLC, IPC či GPC/SEC [17]. Nedávno byla optimalizována první chromatografická metoda k přímému stanovení nederivatizovaného hyaluronátu sodného ve farmaceutických roztocích. K tomuto účelu byla použita SEC s UV detekcí při 205 nm. Jako stacionární fáze byla použita kolona BioSep SEC S2000 (300 mm \times 7,8 mm). Izokratickou mobilní fázi tvořil pufr 0,05 M dihydrogenfosforečnan draselný o pH 7,0. Díky

vynechání derivatizačního kroku šetří tato metoda čas i náklady. Řeší navíc potíže s nestabilitou mnohých reakčních produktů vzniklých při derivatizaci [96].

V posledních několika letech je pro analýzu GAGs (resp. jejich disacharidy a oligosacharidy) často využívána RP-HPLC [97] či UHPLC [98] ve spojení s hmotnostní spektrometrií či tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS) [97].

Metodou RP-HPLC-ESI-MS byly analyzovány a strukturně charakterizovány HA, CS a DS disacharidy získané enzymatickým štěpením chondroitinázou ABC a derivatizované s činidlem AMAC. Separace proběhla na oktadecylsilikagelové koloně (C18), mobilní fázi tvořil octan amonný (60 mM, pH 5,6) a acetonitril. Vlnová délka excitace byla nastavena na 428 nm a emise 525 nm. Zároveň byla použita ionizace elektrosprejem při snímání záporných iontů [99].

Speciálním novějším typem je metoda ZIC-HILIC (zwitteriontová chromatografie hydrofilních interakcí), použitelná pro simultánní separace celé skupiny GAGs z biologických vzorků. V případě ZIC jde o chemicky vázané funkční skupiny nesoucí pozitivní a negativní náboj, které se vyznačují vysokou polaritou a afinitou k vodě [100]. Mobilní fázi tvořila voda:ACN:octan amonný. Disacharidy značené 2-aminobenzamidem byly detekovány fluorescenčně při vlnové délce excitace 330 nm a emise 420 nm [101].

1.12 Stanovení hyaluronanu elektroforetickými metodami

Protože hyaluronan je polyanion, lze ho separovat v elektrickém poli pomocí různých elektroforetických technik, planárních i kapilárních. Velkou výhodou je, že u spousty metod nemusí být provedeno enzymatické štěpení a HA může být analyzována v nezměněné podobě (např. elektroforéza na agarózovém gelu, na acetátcelulózové membráně či polyakrylamidová gelová elektroforéza).

1.12.1 Planární elektromigrační techniky

Již v roce 1984 vědci Hampson a Hallagher [102] aplikovali rozlišovací schopnost polyakrylamidové gelové elektroforézy, používané tehdy pro výzkum nukleových kyselin, na analýzu glykosaminoglykanových oligosacharidů. Na tomto základě byla vyvinuta polyakrylamidová elektroforéza se zvýšenou citlivostí (SE-PAGE, sensitivity-enhanced) [103], která umožňovala separovat nízkomolekulární GAGs od počtu disacharidových jednotek $n = 8$ až do více než $n = 100$. Používal se k tomu 10% polyakrylamidový gel.

Detekce byla uskutečněna pomocí alciánové modři v kombinaci s barvením stříbrem, která přináší asi stonásobně vyšší citlivost ve srovnání s fluorimetrickou analýzou [102, 103].

Poté byla metoda SE-PAGE urychlena použitím mini-deskových gelů ($8 \times 9 \times 0,1$ cm) a dalšími menšími úpravami v původním postupu. Citlivost stačila pro analýzu oligosacharidů o jednotkách $n = 5-50$. Nejprve bylo provedeno částečné štěpení pomocí hovězí testikulární hyaluronidázy, která dává homologické řady oligosacharidů, z nichž nejmenší je tetrasacharid, $n2$ -mer. Optimální koncentrace akrylamidu v polyakrylamidovém gelu byla nastavena tak, aby došlo k rozdělení co největšího množství oligosacharidů do diskretních pruhů. Ukázalo se, že při koncentraci 15 %, bylo dosaženo lepšího oddělení pásů menších oligosacharidů. Polyakrylamidový gel dále obsahoval 0,5% N,N'-metylen-bis-akrylamid v 0,1 M tris-borát-EDTA (TBE) pufru o pH 8,3. Pro elektroforetický pohyb byl vzorek smíchán s 2 M sukروزou v TBE pufru a 2 μ l směsi byly aplikovány přímo na gel. Jako sledovací barvivo byla použita bromfenolová modř a zásobním pufrem byl TBE. Ihned po elektroforéze byly oligosacharidy fixovány v gelu pomocí 0,05% vodného roztoku alciánové modři. Poté byl gel podroben barvení stříbrem [104]. Dodnes se tato metoda používá pro dělení hyaluronanových fragmentů při použitím napětí 125 V/10 min a následně 200 V/20 min. Použití mini gelů přineslo kromě výrazného urychlení navíc vyšší citlivost. Nejnižší detekční limit byl naměřen méně než 1 ng/pruh, což je 50 \times citlivější než u původní SE-PAGE [104]. PAGE navíc patří k metodám, pomocí nichž je možné analyzovat neporušené glykosaminoglykanové řetězce [105].

Elektroforéza na 0,5% agarózovém gelu slouží k určení distribuce molekulových hmotností kyseliny hyaluronové již od roku 1994 (Lee a Cowman) [106]. V roce 2011 byla původní metoda pozměněna za cílem zlepšit rozlišení, citlivost a rychlost separace. Velikost gelu byla zredukována na $10 \times 6,2 \times 0,65$ cm, koncentrace agarózového gelu a pufr tris-acetát-EDTA byly zachovány. Byla analyzována nízká koncentrace vzorku (0,3–0,5 mg/ml), protože u HMW HA hrozí zaplétání řetězců. Napětí se udržuje na nízké hodnotě (40 V), aby nedocházelo k zahřátí gelu a odchylkám v mobilitě vzorku kvůli orientaci molekul. K barvení se používá Stains-All. Tato metoda je vhodná pro HA s $M_w > 200$ kDa. Vzorky o nižší molekulové hmotnosti mohou být analyzovány na agarózovém gelu s vyšším stupněm zesílení nebo na polyakrylamidových gelech [106].

Mezi další planární elektroforetické techniky používané ke stanovení GAGs, patří elektroforéza na membráně z acetátu celulózy [88], kterou může být analyzován hyaluronan rovněž v původní podobě [107] a elektroforéza na nitrocelulóze membráně [108]. Jedná se

o rychlé, levné a jednoduché metody, kterými lze provést kvalitativní a semikvantitativní analýzu několika vzorků naráz [88].

Nejpoužívanější planární technikou je fluofory podporovaná elektroforéza sacharidů, poprvé popsána v roce 1990 [84]. FACE kombinuje vysoké rozlišení a jednoduchost elektroforézy v polyakrylamidovém gelu s citlivostí a viditelností fluorescence. Tato metoda rychle, jednoduše a spolehlivě určuje strukturu řetězců hyaluronanu a disacharidové složení všech GAGs. Vzorek lze kvantifikovat na úrovni pikomolů. Výhodou oproti metodám CE nebo HPLC je rychlá příprava a možnost analýzy více vzorků v daném čase [89]. Fluorescenční značení redukujících sacharidů pomocí činidel zde používaných, AMAC a ANTS, bylo popsáno v kapitole 1.9.1.

Avšak 2-aminoakridon má v metodě FACE jisté nevýhody. Jelikož je v neutrálním a alkalickém prostředí nenabitý, nezlepšuje migraci cukrů v elektrickém poli. Navíc může v průběhu separace docházet k inverzi v pohyblivosti jím značených malých oligosacharidů. Fragmenty jako tetra- a hexa-sacharidy (HA4 a HA6) již nemigrují na základě velikosti molekuly. Změna v pohyblivosti je pravděpodobně důsledkem interakce menších oligosacharidů s borátem v elektroforetickém pufru. Interakce s borátem umožňuje separaci AMAC-derivatizovaných oligosacharidů s podobnými molekulovými hmotnostmi, ale rozdílným chemickým složením [89].

Fluorofor ANTS sice obsahuje tři záporné náboje, které podporují migraci kyselých i neutrálních sacharidů v elektrickém poli, ale má také své nevýhody. Sulfátové části molekuly mohou narušovat biologickou aktivitu oligosacharidů, protože několik proteinů, které se váží na HA, se váží i na sulfatované GAGs [109].

Řešení těchto problémů přináší fluorofor kyselina 2-aminobenzoová (2AA, jiným názvem kyselina anthranilová). Zvyšuje signál v MALDI/TOF MS a zlepšuje FACE analýzu. Je to malá molekula (oproti předchozím dvěma činidlům), má podobnou velikost a náboj jako je na glukuronové kyselině, není sulfatovaná a je vysoce fluoreskující [109].

1.12.2 Kapilární elektroforéza

Existuje několik metod kapilární elektroforézy aplikovatelných na analýzu neporušených GAGs a jejich oligosacharidů. Tyto metody dovolují jak kvalitativní, tak kvantitativní analýzu s vysokou citlivostí a rozlišovací schopností.

Analýza pomocí CE nebo vysokoúčinné kapilární elektroforézy [110] poskytuje užitečné informace o množství, molekulové velikosti, polydisperzitě a hustotě náboje na

řetězci. Používá se také ke kontrole čistoty izolovaných GAGs [111]. Hodí se i pro stanovení molekulové hmotnosti chemicky modifikované HA (např. sulfonované, acetylované apod.) [88]. Chemická modifikace HA však bývá spojena s degradací polymeru.

Ke kapilární elektroforéze je potřeba velmi malé množství vzorku (oproti planárním technikám). Nejčastěji se používá kapilární zónová elektroforéza (CZE), která separuje analyty na základě jejich poměru náboje k molekulové hmotnosti. Většina separací neporušených GAGs byla dosažena za nízkého pH fosfátového nebo Tris-fosfátového pufru [112]. K detekci se často využívá UV/VIS detektor a v případě derivatizovaných GAGs fluorescenční detektor. Laserem indukovaná fluorescence nenasyčených 2-aminoakridonem značených disacharidů 100× citlivější než tradiční CE/UV detekce [113].

O rychlé simultánní separaci HA, CS, DS a heparinu byla před rokem publikována metoda CE s detektorem diodového pole. Separace proběhla v nepokryté křemenné kapiláře při 37 °C během 23 minut. V migračním pořadí byl hyaluronan první a heparin poslední, poněvadž migrace souvisí se stupněm sulfatace. Separace proběhla v prostředí 80 mM diethyltriamin-fosfátového pufru (pH 5,0) při vlnové délce detekce 200 nm [112].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přístroje a vybavení

Pro spektrofotometrické sledování enzymatického štěpení a kontrolu fragmentace kyseliny hyaluronové byl použit spektrofotometr Libra S22, UV-VIS (Biochrom Ltd., UK).

Analýza kyseliny hyaluronové byla provedena na kapalinovém chromatografu s fluorescenčním detektorem a na kapalinovém chromatografu ve spojení s hmotnostním spektrometrem.

Zařízení pro HPLC/FLD

kapalinový chromatograf složený ze dvou vysokotlakých čerpadel LC-30 AD, degaseru DGU-20A5, fluorescenčního detektoru RF-20A XS (vše Shimadzu, Tokyo, Japonsko), termostatu kolon LCO 102 (Ecom, Praha) a dávkovacího zařízení s vnější dávkovací smyčkou 2 µl (Valco-Vici, Schenk, Švýcarsko)

Zařízení pro HPLC/MS

kapalinový chromatograf složený ze dvou vysokotlakých čerpadel LC-20 AD XR, degaseru DGU-20A 3R, spektrofotometrického detektoru SPD-20A, autosampleru SIL-20A HT (vše Shimadzu, Tokyo, Japonsko) a termostatu kolon LCO 102 (Ecom, Praha)
hmotnostní spektrometr QTRAP 4500 (AB SCIEX, USA)

Seznam testovaných kolon (Supelco, Sigma-Aldrich, USA)

Ascentis Express C18 (15 cm × 3 mm; 2,7 µm)

Zorbax Aqua C18 (15 cm × 3 mm, 3 µm)

Supelcosil NH2 (15 cm × 3 mm, 3 µm)

Ascentis RP- Amide (15 cm × 4,6 mm, 3 µm)

Kinetex HILIC 100A (15 cm × 3 mm; 2,6 µm)

Pro separaci hyaluronanových fragmentů fluorescenčně značených 2-aminoakridonem byla vybrána kolona Ascentis® Express C18 (15 cm × 3 mm; 2,7 µm) s odpovídající předkolonkou.

Při filtraci mobilní fáze byl využit regulátor vakua CVC 3000 (vacuubrand, Germany) s vakuovou jednotkou Labobase SBC 860 (KNF Neuberger GmbH, Německo) a filtry 0,2 μm \times 47 mm (Supelco, USA).

Pro přesné odměření objemu vzorků a standardů byly použity mikrostříkačky Hamilton (Hamilton, Nevada) a mikropipety Sartorius Proline plus (Biohit, Finsko) a Finnpiquette (Thermo LabSystems, USA).

Vzorky byly vysušeny inertním plynem na koncentrátoru Visible sample LabEva (Labicom, CZ). K derivatizaci vzorků byla používána sušárna Memmert UFE 400 (Mettler GmbH, Německo). Dále byly používány analytické váhy (Sartorius, Německo), pH metr (Metrohm 827, Švýcarsko), digitální ultrazvuková lázeň (Kraintek 12, Slovensko) a centrifuga 5424 (Eppendorf AG, Německo).

2.2 Vzorky

- tablety: nízkomolekulární kyselina hyaluronová, 70 mg (Hepatica, Polsko)
- nosní kapky: Hysan® Hyal kapky; 0,25 mg hyaluronátu sodného na 1 ml (URSAPHARM Arzneimittel GmbH, Německo)
- nosní sprej: Olynth® HA 0,1% (URSAPHARM, Německo)
- oční kapky: Hyal-Drop® multi; 2,4 mg kyseliny hyaluronové v 1 ml roztoku (BAUSCH & LOMB, USA)

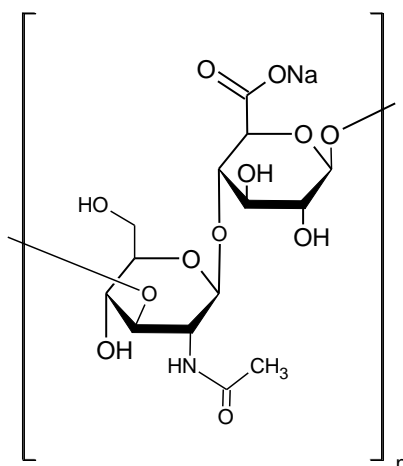


Obr. 21: Analyzované vzorky s obsahem hyaluronanu sodného: nosní spreje Olynth a Hysan, tablety Hepatica, oční kapky Hyal-Drop.

2.3 Použité chemikálie

2.3.1 Standardy kyseliny hyaluronové

- 10 kDa HA (5 mg/ml), 11 kDa HA (1,5 mg/ml), 30 kDa HA (5 mg/ml), 98 kDa HA (2,5 mg/ml) (Contipro a.s., Dolní Dobrouč, Česká Republika)
- vysokomolekulární HA (1,5 mg/ml) - sodná sůl izolovaná z bakterie *Streptococcus equi* (Sigma-Aldrich, USA)



Obr. 22: Sodná sůl kyseliny hyaluronové izolované z bakterie *Streptococcus equi*.

2.3.2 Enzymy

- hyaluronanlyáza zakotvená na magnetické perlové celulóze modifikované kyselinou iminodioxetovou (MPC-IDA)
- bakteriální hyaluronanlyáza SpHL (2,1 mg/ml, 1000 U/mg v pufru)
- testikulární hyaluronidáza (typ IV-S, lyofilizovaný prášek, 750-3000 U/mg)

2.3.3 Činidla a chemikálie

- 2-aminoakridon, $\geq 98,0\%$, HPLC (Sigma-Aldrich, USA)
- 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfonová kyselina (Sigma-Aldrich, USA)
- kyanoborohydrid sodný, 95% (Sigma-Aldrich, USA)
- dimethylsulfoxid, $\geq 99,9\%$ (Sigma-Aldrich, USA)
- kyselina octová, p.a., $\geq 99,8\%$ (Sigma-Aldrich, USA)
- octan amonný pro LC-MS (LiChropur, Merck, CZ)
- fosfátový pufr (0,1 M; pH 7,0)
- koncentrovaná kys. octová/dimethylsulfoxid (3:17)
- redestilovaná voda upravena zařízením Mili-Q (Merck, Německo)

2.4 Pracovní postupy

2.4.1 Spektrofotometrie

2.4.1.1 Sledování průběhu štěpení standardů kyseliny hyaluronové

Byla sledována rychlost a průběh štěpení standardů HA o různé molekulové hmotnosti. Pokus byl zkoušen na standardních roztocích kyseliny hyaluronové 11 kDa (5 mg/ml), 30 kDa (5 mg/ml), 98 kDa (2,5 mg/ml) a HMW HA (1,5 mg/ml). K reakci byl vždy odpipetován objem odpovídající 225 μ g HA a 23 μ l enzymu hyaluronanlyáza zakotvené na sedimentovaném nosiči MPC-IDA. Reakční prostředí tvořil 0,1 M fosfátový pufr (PB) o pH 7, kterým byla doplněna kvjeta na objem 1 ml. Po přidání HA bylo odstartováno měření absorbance při vlnové délce 225 nm po 5 minutových intervalech. Pro každý standard bylo měření opakováno 3 \times . Data ze tří měření byla poté zprůměrována a vynesena do grafu závislosti absorbance fragmentů HA na čase působení enzymu. Jako slepý pokus (SP) byl použit pouze daný standard HA (225 μ g) doplněný fosfátovým pufrém na objem 1 ml.

Na stejném principu bylo provedeno další měření pro standardy o velikosti 10, 30 a 98 kDa s rozdílem použitého enzymu. Místo enzymu zakotveného na nosiči byl použit solubilní (5 U) enzym hyaluronanlyáza, jež byl pro snazší pipetování 10 \times naředěn PB pufrém a k reakci ho bylo pipetováno 23,8 μ l. Množství hyaluronanu odebraného k reakci zůstalo stejné (225 μ g). Absorbance byla automaticky zaznamenávána v módu „simple kinetics“ vždy po 10 sekundách po celkovou dobu 4 minut. Měření bylo pro každý standard opakováno 2 \times .

2.4.1.2 Kalibrační řada na spektrofotometru

Pro kalibrační řadu změřenou spektrofotometricky byla použita HMW HA o $c = 2,5$ mg/ml naředěná PB pufrém na $c = 1$ mg/ml. Standard byl naštípán přidáním 104,7 μ l enzymu SpHL. Byly připraveny kalibrační body o obsahu 45, 90, 135, 180 a 225 μ g HA doplněny fosfátovým pufrém na objem 1 ml. Absorbance byla měřena při vlnové délce 225 nm. Kalibrační řada i vzorky byly proměřeny proti slepému pokusu, kterým byl 0,1 M fosfátový pufr o pH 7,0.

2.4.2 Příprava standardů a kalibračních řad pro HPLC/FLD a HPLC/MS

2.4.2.1 Enzymatické štěpení a spektrofotometrické proměření standardu

Pro vytvoření kalibrační řady měřené na HPLC/FLD a HPLC/MS byl vybrán standard 30 kDa HA o $c = 5$ mg/ml. Odebrané množství 1 mg HA reagovalo se 104,7 μ l 10 \times zředěného (5 U) enzymu SpHL. Po 4 minutách působení enzymu byla účinnost štěpení spektrofotometricky zkontrolována proměřením absorpčního spektra v rozsahu vlnových délek 190–300 nm. Do kyvety bylo odebráno 225 μ l naštípaného standardu (což po naředění enzymem odpovídá 203,68 μ g HA). Kyveta byla doplněna 0,1 M PB na objem 1 ml. Spektrum bylo opakovaně proměřeno po 10 minutách enzymatického štěpení a porovnáno pro kontrolu úplné fragmentace. Kalibrační řady a standardy byly proměřeny proti 0,1 M fosfátovému pufru (pH 7,0).

2.4.2.2 Derivatizační reakce s 2-aminoakridonem

Do mikrozkušavek bylo odpipetováno 0,5; 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 a 14 μ l enzymaticky naštípaného standardu 30 kDa HA. Všechny standardy kalibrační řady byly odpařeny dusíkem do sucha při teplotě 30 °C za dobu 40–45 minut. Do všech mikrozkušavek bylo následně přidáno 10 μ l 0,1 M činidla 2-aminoakridonu rozpuštěného ve směsi koncentrované kyseliny octové a dimethylsulfoxidu (v poměru 3:17). Směs činidla se vzorkem byla promíchána na vortexu a inkubována 15 minut při pokojové teplotě. Poté bylo přidáno 10 μ l 1 M kyanoborohydridu sodného (NaCNBH₃) ve vodě. Celý obsah byl promíchán na vortexu a následně centrifugován (2 minuty, 14 000 ot./min). Zkušavky byly umístěny do sušárny a ponechány k derivatizaci při teplotě 45 °C po dobu 4,5 hodiny. Po skončení reakce byly deriváty uchovány v lednici, nebo ihned analyzovány. Před vlastní analýzou byly všechny deriváty zředěny na objem 500 μ l 50% dimethylsulfoxidem ve vodě.

2.4.3 Příprava vzorků

2.4.3.1 Enzymatické štěpení a spektrofotometrické proměření vzorků

Vzorky s rozdílným obsahem kyseliny hyaluronové byly upraveny tak, aby se při reakci nezměnil poměr množství HA a přidávaného enzymu. Se 104,7 μ l 10 \times zředěného (5 U) enzymu bakteriální hyaluronanlyáza vždy reagovalo množství 1 mg hyaluronanu v prostředí 0,1 M fosfátového pufru (pH 7,0). Vzorky byly proměřeny po 4 min a 10 min působení enzymu. Jako slepé pokusy při měření vzorků byly vždy použity původní neštěpené vzorky, aby byl odstraněn vliv matrice, která proti PB pufru příliš absorbovala.

Vyjma vzorku Olynth, kterého nebyl dostatek, byly vzorky proměřeny i v původní podobě (nefragmentované) proti PB pufru. Do kyvety bylo vždy odebráno 225 µg HA, doplněno 775 µl PB pufru na objem 1 ml. Pro fragmentované vzorky je množství HA vstupující do kyvety o něco nižší, jelikož musí být zohledněno předchozí naředění vzorku objemem přidaného enzymu.

2.4.3.2 Derivatizace vzorků

Derivatizační reakce vzorků byla provedena stejným způsobem a za stejných podmínek jako u standardů - objem přidaného činidla a NaCNBH₃ byl vždy 10 µl, teplota 45 °C, čas 4,5 hodiny. K derivatizaci byly pipetovány různé objemy vzorků (10, 20 a 50 µl) následně odpařených dusíkem. Vzorky byly připravovány opakovaně, v sadách po různých objemech, z více štěpení a proměřeny v různých časech.

2.5 Podmínky měření

2.5.1 HPLC/FLD

K separaci byla použita kolona Ascentis Express C18 o délce 15 cm, průměru 3,0 mm a velikosti částic 2,7 µm s předkolumnou. Mobilní fázi tvořil acetonitril a 60 mM octan amonný o pH 5,60. Separace probíhala za izokratické eluce při koncentraci acetonitrilu 20 %. Teplota termostatu byla nastavena na 30 °C. Vlnová délka excitace byla $\lambda_{\text{ex}} = 428 \text{ nm}$ a emise $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$. Konstantní průtok mobilní fáze byl udržován na 0,5 ml/min. Smyčkou byl dávkován přesný objem 2 µl.

Ke zpracování naměřených dat a vyhodnocování chromatogramů sloužil Clarity software (DataApex).

2.5.2 HPLC/MS

Chromatografická separace byla provedena za totožných podmínek jako u měření na chromatografu s FI detekcí, přičemž zde na UV detektoru byla nastavena vlnová délka 428 nm.

Během měření a vyhodnocování bylo pracováno s programem Analyst 1.6.3. software (AB SCIEX).

3 Výsledky a diskuze

3.1 Spektrofotometrické měření

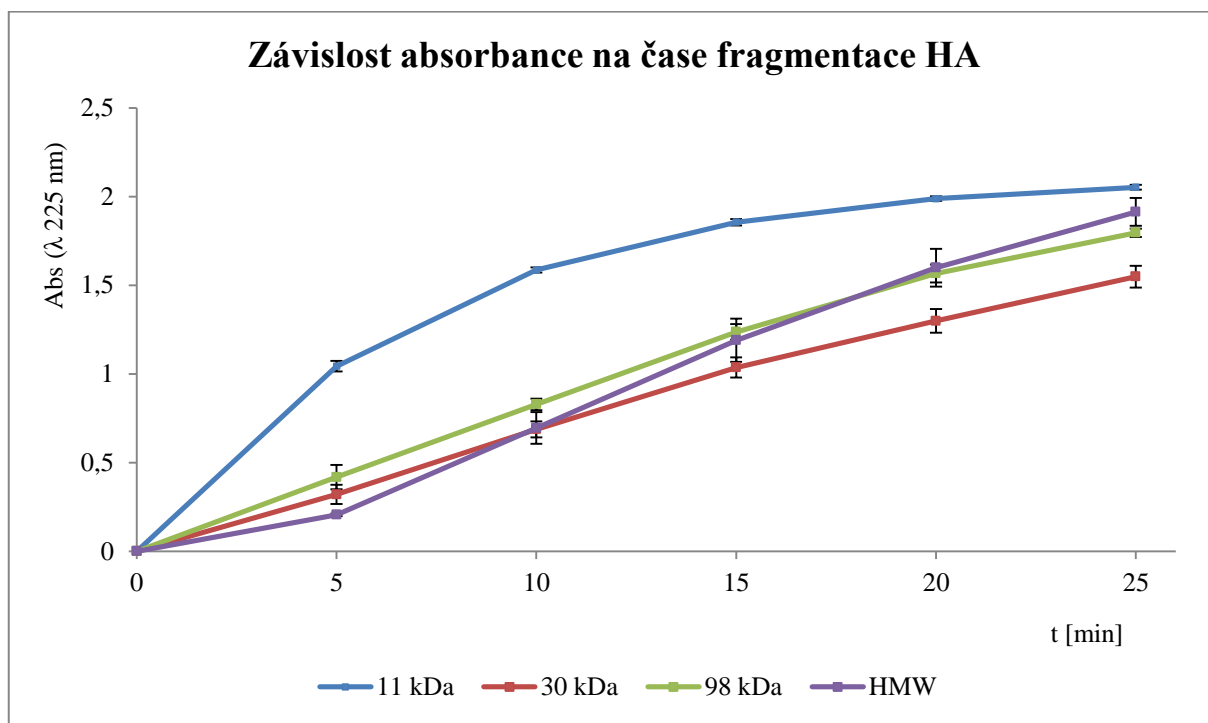
3.1.1 Rychlost štěpení enzymu v závislosti na velikosti hyaluronanu

Měření absorbance bylo prováděno při vlnové délce 225 nm, při které absorbuje dvojná vazba mezi 4. a 5. uhlíkem kyseliny glukuronové. Tato nenasyčená vazba vzniká po fragmentaci hyaluronanového řetězce účinkem enzymu hyaluronanlyázy. Fragmentace byla provedena dvěma způsoby: enzymem zakotveným na nosiči MPC-IDA a enzymem v solubilní podobě. Byla sledována rychlost enzymatického štěpení v závislosti na molekulové hmotnosti hyaluronanu.

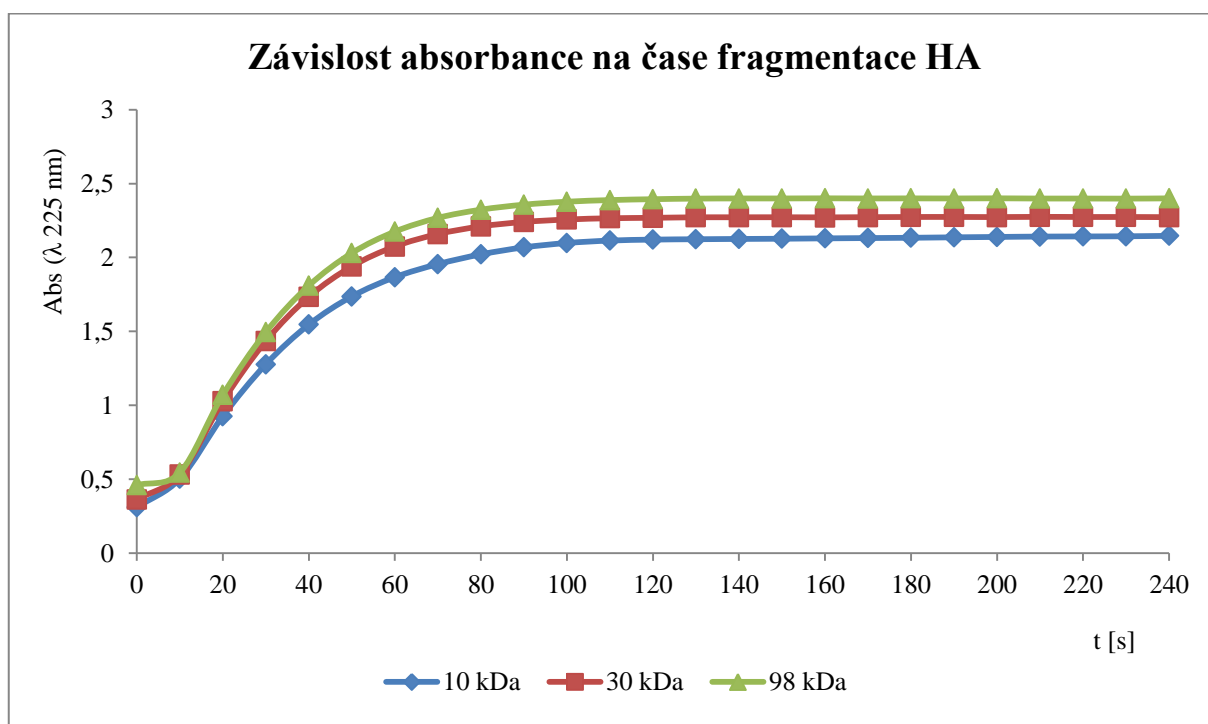
Závislost absorbance HA na čase působení enzymu hyaluronanlyázy zakotvené na MPC-IDA byla vynesena do grafu (obr. 23). Z grafu lze vyčíst, že HA o nejnižší molekulové hmotnosti (11 kDa) se štěpí rychleji, než zbylé standardy (30 kDa, 98 kDa, HMW HA). Hranice, od které rychlost štěpení již nezávisí na molekulové hmotnosti je tedy mezi 11 a 30 kDa. Je to pravděpodobně způsobeno tím, že u molekul s velmi nízkou M_w nenastává problém s krytím aktivního místa enzymu a ten tudíž může štěpit rychleji. Při vyšších M_w než 30 kDa jsou řetězce již příliš propletené a dochází tedy ke stérické zábraně. Standardy o M_w 30 kDa a více se štěpí již stejnou rychlostí. Závisí tedy jen na koncentraci daného standardu, která se může drobně lišit vlivem odchylek při pipetování. Výhody použití imobilizovaného enzymu představují vznik čistého produktu (nekontaminovaného enzymem) a snadná kontrolovatelnost reakce, která se zastaví po aplikaci magnetického pole prostřednictvím magnetického separátoru.

V druhém způsobu byl použit solubilní enzym (5 U) bakteriální hyaluronanlyáza. Absorbance byla měřena po 10 s intervalech po dobu 240 sekund. Graf závislosti absorbance HA na čase štěpení je znázorněn na obr. 24. Z grafu vyplývá, že štěpení HA o různých molekulových hmotnostech probíhá stejným způsobem a stejnou rychlostí. V momentě, kdy se hodnota absorbance ustálí na konstantní hodnotě, je fragmentace ukončena. Při použití fragmentačního času 4 minuty došlo k úplné fragmentaci řetězce na disacharidové jednotky. Takto fragmentovaný vzorek mohl být ihned derivatizován fluorescenčním činidlem nebo uchován při $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro pozdější zpracování. Výhodou použití solubilního enzymu je především rychlost reakce, naopak nevýhodou může být kontaminace produktu enzymem. Ta však není na závadu, jelikož je odstraněna při derivatizaci se selektivním činidlem a použitím separačních metod. Pro následující fragmentace všech komerčních vzorků byl tedy zvolen

solubilní enzym s intervalem štěpení 4 minuty, což je čas, za kterých je hyaluronan o různých délkách řetězce spolehlivě naštípán.



Obr. 23: Sledování rychlosti fragmentace HA o různých M_w po 5 min intervalech. Použitý enzym: hyaluronanlyáza zakotvená na MCP-IDA. Do reakce vždy vstupuje 225 μg HA a 23 μl enzymu.



Obr. 24: Sledování rychlosti fragmentace HA o různých M_w po 10 sekundových intervalech. Použitý enzym: 5 U hyaluronanlyáza (solubilní). Do reakce vždy vstupuje 225 μg HA a 23,8 μl 10 \times zředěného enzymu v PB.

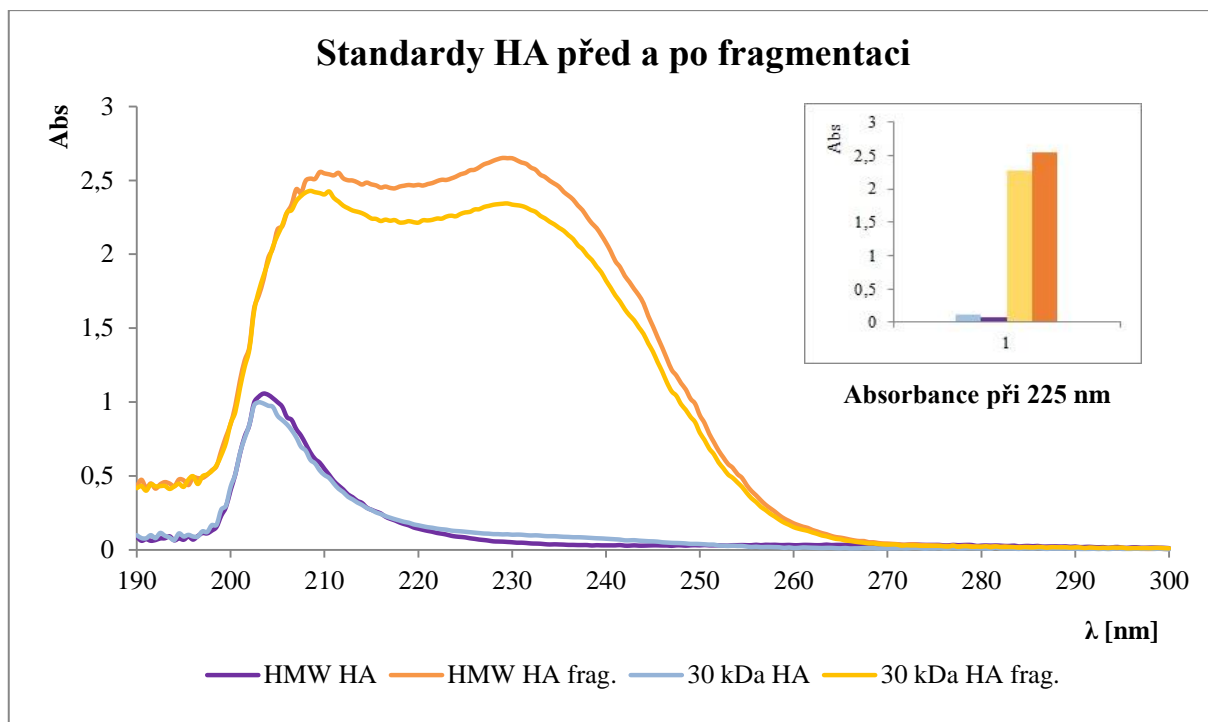
3.1.2 Kontrola enzymatické fragmentace standardů a vzorků

Pro kontrolu, že štěpení polymeru proběhlo na požadované disacharidové jednotky, byly standardy i vzorky proměřeny na spektrofotometru. Byla zaznamenána jejich absorpční spektra v rozsahu vlnových délek 190–300 nm nejdříve v původním stavu a poté po 4 minutách fragmentace enzymem SpHL.

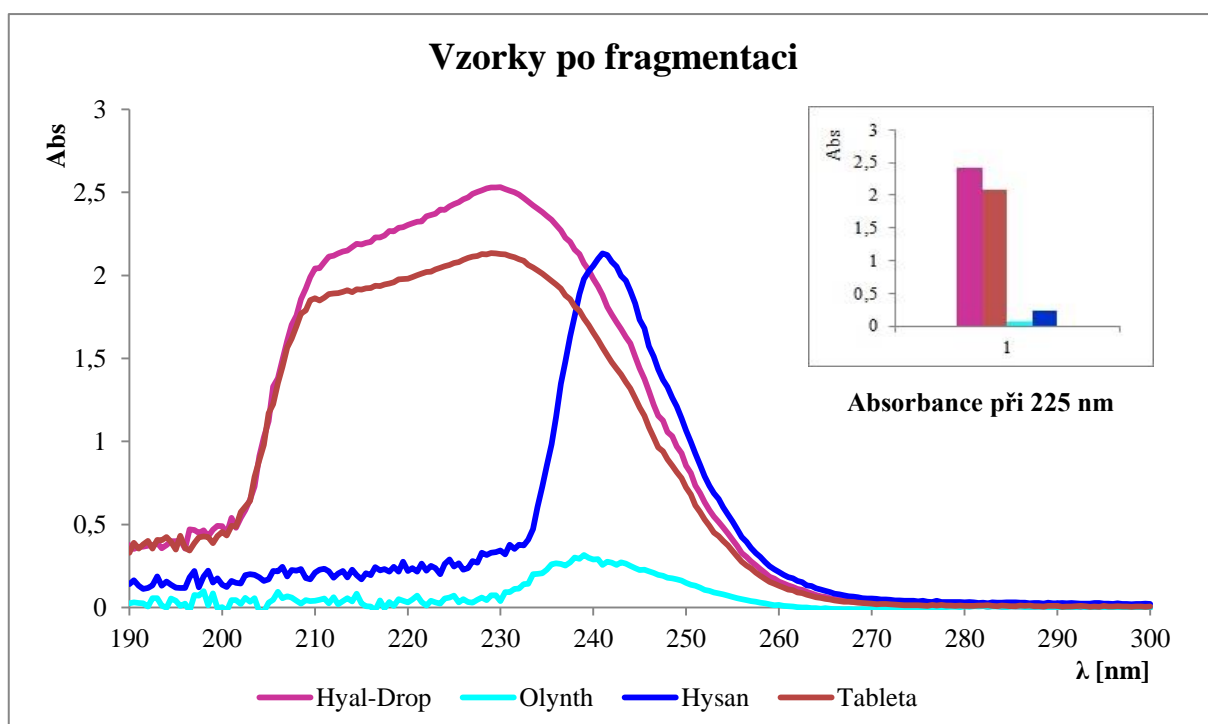
Nejprve byla proměřena absorpční spektra standardů 30 kDa HA a HMW HA proti fosfátovému pufru. Spektra standardů před a po fragmentaci jsou znázorněna na obr. 25. Důkazem proběhlé fragmentace pro množství 225 µg HA je velikost absorbance nad 2,5 při vlnové délce 225–230 nm. Při této vlnové délce absorbují právě nenasyčené disacharidové jednotky hyaluronanu.

Poté byla proměřena absorpční spektra vzorků. V případě fragmentovaných vzorků bylo měření provedeno vždy proti původnímu neštěpenému vzorku. Tím byl potlačen rušivý vliv absorpce matrice, který byl při měření proti PB výrazný. Vzorky o různých množstvích HA byly zpracovány tak, aby do reakce s enzymem (104,7 µl) vstupovalo vždy stejné množství HA (1 mg). Do kyvety bylo odebíráno vždy 225 µl HA. Pokud bylo množství ve vzorku nižší, než bylo deklarováno, projevilo se to nízkou absorbancí, jako u vzorku Olynth. Spektra všech vzorků po štěpení jsou zaznamenána na obr. 26.

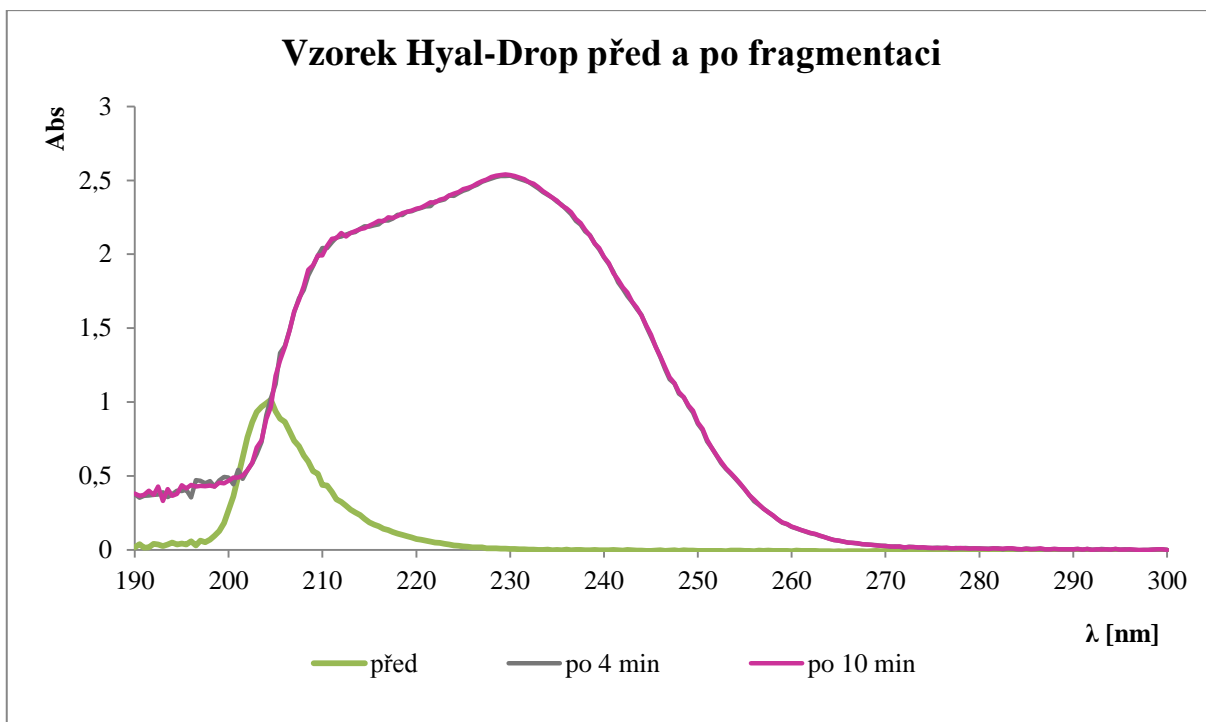
Naměřená spektra vzorků a standardů byla nakonec porovnána. Absorpční spektra vzorků kapek Hyal-Drop na obr. 27 a tablet Hepatica na obr. 28 se shodovala se spektry standardů. Avšak u vzorků Hysan a Olynth došlo k posunu vlnové délky, při které vzorek absorbuje nejvíce, ke 240 nm. Na obr. 29 je zřetelné, že v původním vzorku Hysan absorbuje více složek kolem 225 nm a po štěpení tedy absorbuje vzniklá dvojná vazba při posunuté vlnové délce 240 nm. Pro kapky Olynth bohužel nevystačil vzorek, protože koncentrace HA byla tak nízká, že k reakci bylo potřeba odebrat velký objem.



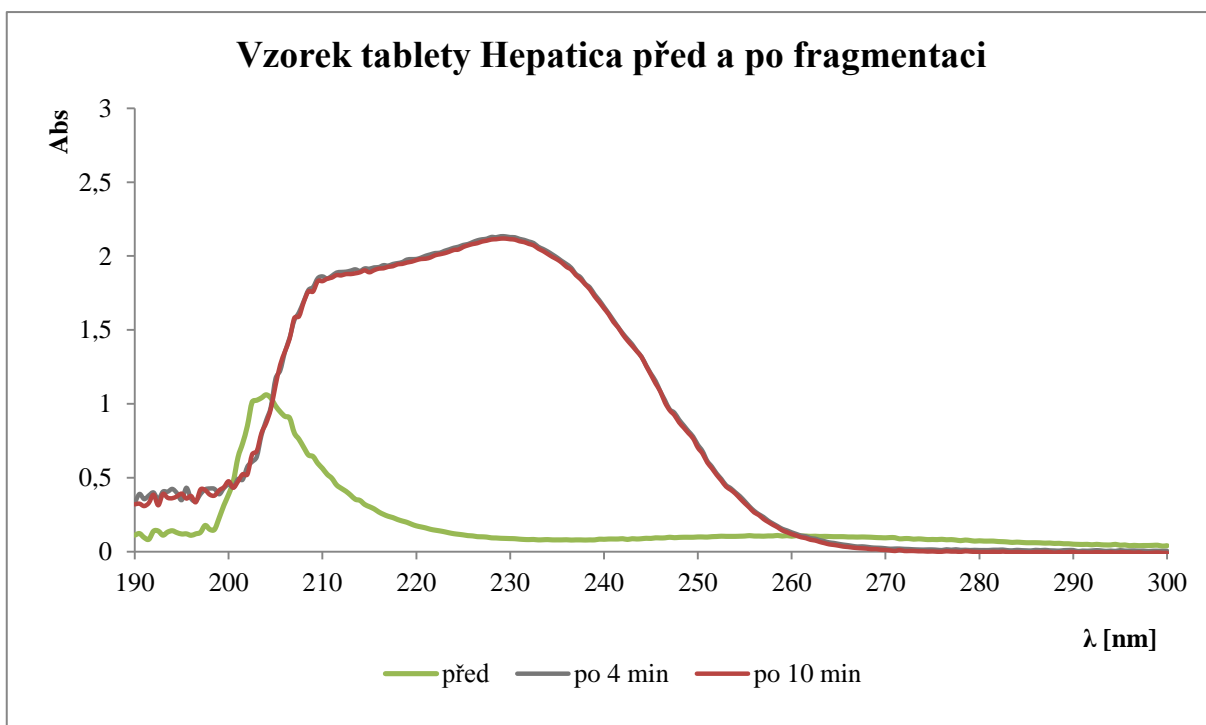
Obr. 25: Absorpční spektra standardů 30 kDa HA a HMW HA před a po štěpení enzymem SpHL. SP: 0,1 M fosfátový pufr o pH 7,0. V květetě se nacházelo 225 μg neštěpené HA a 203,68 μg fragmentované HA.



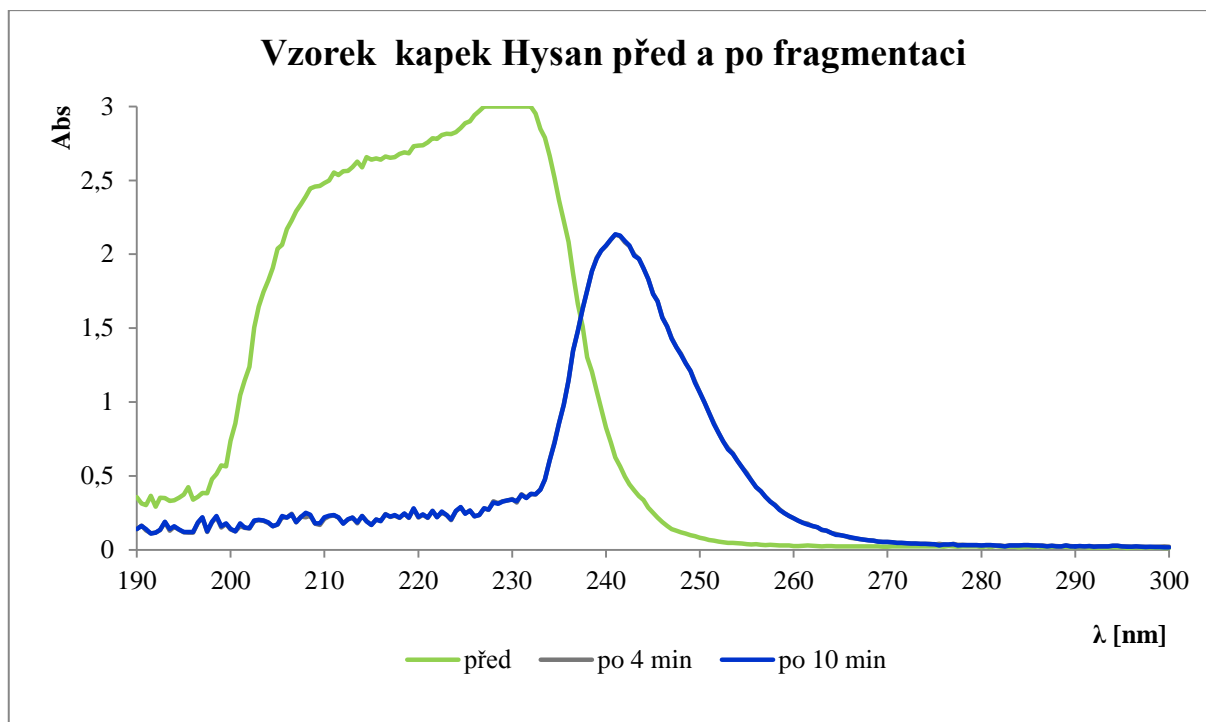
Obr. 26: Absorpční spektra vzorků Hyal-Drop, Olynth, Hysan a Hepatica po štěpení enzymem SpHL. SP: původní neštěpené vzorky.



Obr. 27: Srovnání absorpčních spektrů vzorku Hyal-Drop před fragmentací (SP: fošátový pufr) a po fragmentaci (SP: původní vzorek).



Obr. 28: Srovnání absorpčních spektrů vzorku Hepatica před fragmentací (SP: fošátový pufr) a po fragmentaci (SP: původní vzorek).

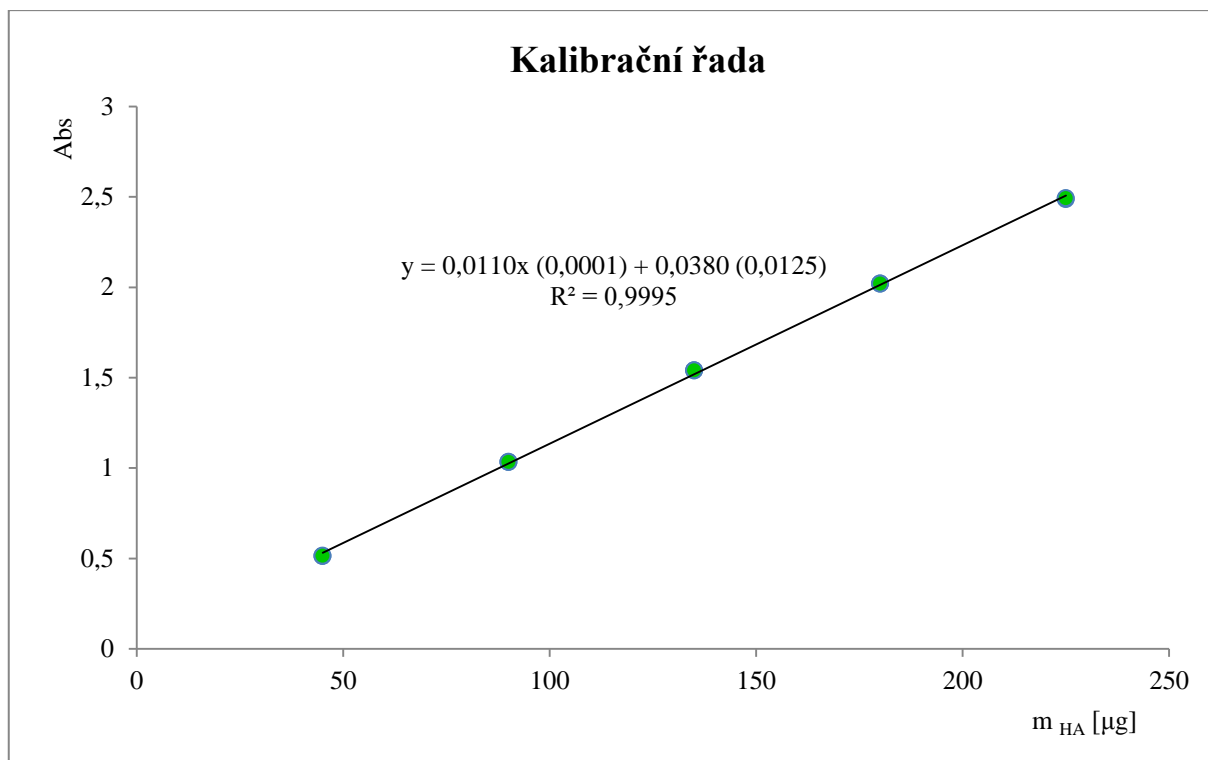


Obr. 29: Srovnání absorpčních spektrů vzorku Hysan před fragmentací (SP: fosfátový pufr) a po fragmentaci (SP: původní vzorek).

3.1.3 Stanovení hyaluronanu spektrofotometricky

U sledovaných čtyř vzorků byl pro porovnání s chromatografickými metodami stanoven obsah HA pomocí spektrofotometrie. Kalibrační řada s body 45, 90, 135, 180 a 225 μg standardu HA je zobrazena na obr. 30. Měření absorbance našťipaných kalibračních standardů a vzorků probíhalo při $\lambda = 225 \text{ nm}$.

Dle rovnice lineární regrese bylo následně vypočítáno přesné množství HA nacházející se v měřeném objemu vzorku. Na základě předešlých měření bylo zjištěno, že u kapek Hysan a Olynth je vlnová délka maximální absorbance dvojné vazby posunuta vlivem matrice vzorků. Proto byla pro výpočet množství HA u těchto dvou vzorků použita hodnota absorbance odpovídající vlnové délce zvolené s ohledem na posun maxima (kolem 240 nm). V tabulce 3 jsou porovnány výsledky experimentálně získaného množství HA s teoreticky vypočítaným množstvím HA, které by se mělo v kyvetě nacházet. Tyto výsledky byly přepočítány na obsah HA v celém objemu vzorku a zjištěné hodnoty byly porovnány v tabulce 8 s deklarovanými hodnotami a s výsledky z HPLC/FLD a HPLC/MS.



Obr. 30: Kalibrační řada připravená z HMW HA proměřená spektrofotometricky. Závislost absorbance měřené při 225 nm na množství hyaluronanu v µg.

Jak je z tabulky 3 patrné, výsledky jsou v poměrně dobré shodě, pouze u vzorku Olynth je naměřené množství osmkrát nižší.

Tabulka 3: Stanovení obsahu HA v kyvetě při spektrofotometrickém měření.

název vzorku	teoretické množství HA [µg]	naměřené množství HA [µg]	λ absorbance fragmentů
Hepatica, tablety	203,68	185,18	225 nm
Hyal-Drop, oční kapky	203,68	217,36	225 nm
Hysan, nosní kapky	219,26	190,45	241 nm *
Olynth, nosní sprej	203,68	25,27	239 nm *

* orientační vlnová délka (zvolená s ohledem na posun absorpčního spektra vzorků)

3.2 Optimalizace postupu derivatizace a chromatografické separace

Při optimalizaci postupu derivatizace a separace HPLC se vycházelo z postupu prezentovaným Volpim [99]. Byly zkoušeny a měněny různé aspekty derivatizační reakce s 2-aminoakridonem. Deriváty byly připraveny ze standardů o rozdílné molekulové hmotnosti (11, 30, 98 kDa HA, HMW HA), dále byla měněna délka inkubace činidla se vzorkem a celková doba derivatizace. V neposlední řadě byl testován vliv lyofilizace vzorku ve srovnání s odfoukáním vzorku do sucha pomocí dusíku.

Bylo zjištěno, že intenzita píků není závislá na molekulové hmotnosti použitého standardu, ale přímo závisí pouze na jeho koncentraci. Proto byla jako výchozí standardní látka zvolena 30 kDa HA o nejvyšší koncentraci 5 mg/ml, ze které byla připravena celá kalibrační řada.

Vliv délky inkubace činidla AMAC se vzorkem byl zkoušen na standardech připravených z 11 kDa HA. Zkoušené časy byly 0, 5, 10, 20 a 30 minut. Naměřené deriváty měly všechny přibližně stejnou intenzitu, vyjma 0 a 5 minutové inkubace, jejichž odezva byla nejnižší. Proto bylo zvoleno 15 minut jako optimální doba reakce činidla se vzorkem.

U další sady derivátů připravených z 11 kDa HA byl testován vliv délky derivatizace (3,5; 4 a 4,5 hodiny) při 45 °C. Nebyly zaznamenány žádné výrazné změny v intenzitě píků derivátů, ale pro jistotu byla zvolena doba 4,5 hodiny z důvodu počátečního kolísání a ustalování teploty v sušárně.

Co se týče lyofilizace vzorku před derivatizací, mohla být vyzkoušena pouze jednou, jelikož lyofilizátor nebyl k dispozici. Změřením lyofilizovaných standardů 10 a 30 kDa HA bylo zkontrolováno, že odpaření vzorků dusíkem je dostačující, poněvadž intenzita odezvy byla shodná.

Separace byla provedena izokraticky na koloně plněné chemicky vázanou oktadecylsilikagelovou stacionární fází při koncentraci 20 % acetonitrilu v 60 mM pufru octanu amonném o pH 5,60. Zvolenou izokratickou elucí se derivát i činidlo vyloučily během 5 minut a tudíž byl tento způsob jednoznačně nejjednodušší a nejrychlejší. Na rozdíl od původně uvedené 50 minutové gradientové eluce (s 2-30 % acetonitrilu) jak popsal Volpi, kde však byly s HA separovány i nenasycené disacharidy chondroitinsulfátu a dermatansulfátu.

Kromě 2-aminoakridonu (AMAC deriváty) bylo testováno další derivatizační činidlo 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfonová kyselina (ANTS deriváty). Činidlo ANTS obsahující tři sulfonové kyseliny vyžaduje HILIC separaci, která byla neúspěšná. Byla při ní použita kolona Kinetex HILIC 100A. Mobilní fázi tvořil acetonitril/octan amonný (60 mM, pH 5,6) nebo

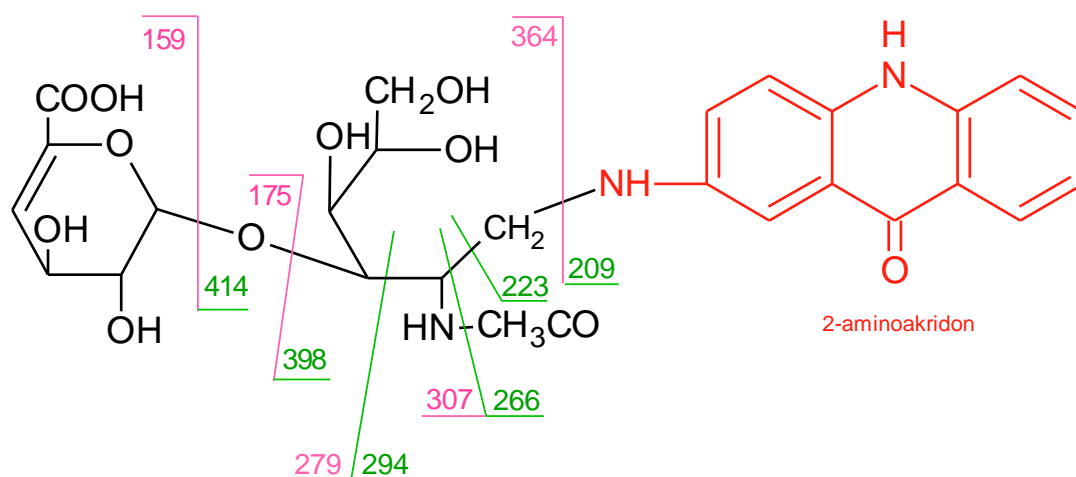
acetonitril/demineralizovaná voda s gradientem 95-50 % ACN. Za stejných podmínek byla také zkoušena kolona Supelcosil LC-NH₂. Na HPLC/MS nebyl identifikován pík derivátu a při HPLC/FLD se elovalo pouze hydrolyzované činidlo. Derivatizace se po několika pokusech nepodařila optimalizovat a reakce s činidlem ANTS dále nebyla prováděna.

Proto byl zvolen 2-aminoakridon jako vhodné derivatizační činidlo pro fragmenty hyaluronanu, pro něž se nejlépe prokázala chromatografická separace v systémech s obrácenými fázemi na koloně Ascentis Express C18.

3.3 Optimalizace hmotnostního spektrometru

Před kvantitativním stanovením hyaluronanu v zakoupených vzorcích bylo nejprve potřeba nastavit parametry hmotnostního spektrometru. Byla vybrána ionizace elektrosprejem (ESI) při snímání záporných iontů. Optimalizace probíhala při HPLC analýze, kdy byly dávkovány 2 μ l derivatizovaného standardu Δ Di-HA a průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min.

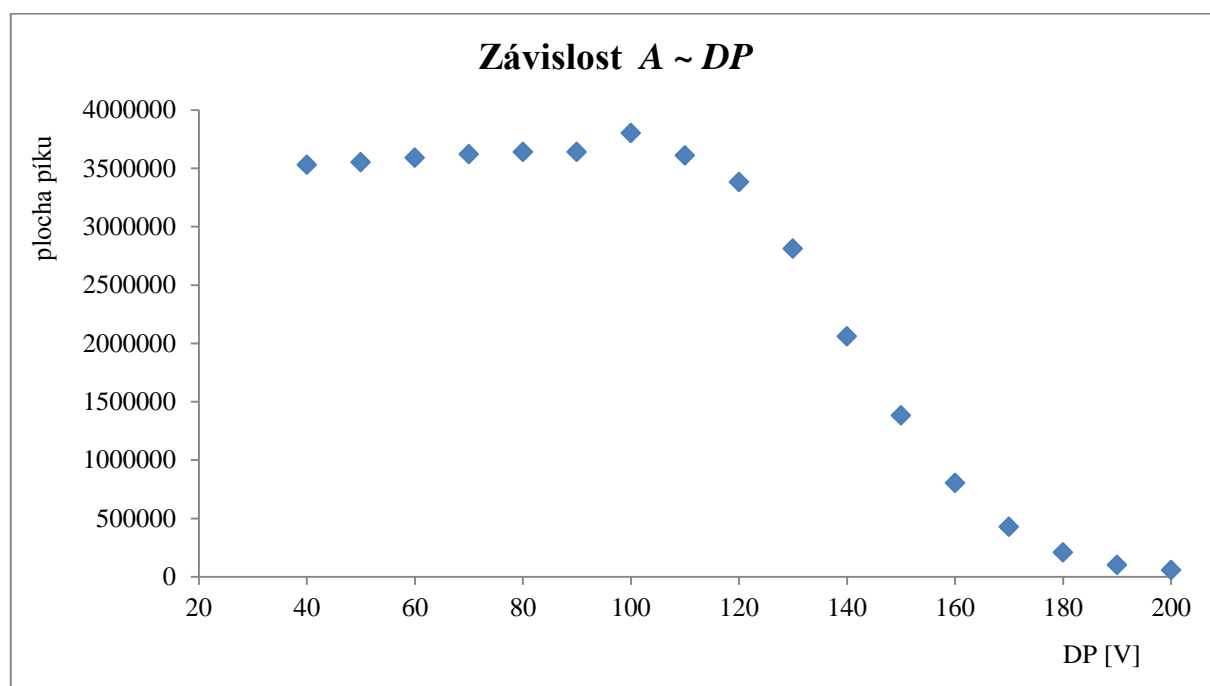
Cílem optimalizace bylo zjistit parametry hmotnostně spektrometrické detekce, kdy ionizační účinnost sledovaného derivátu bude nejvyšší. V případě trojitého kvadrupólu na kterém analýza probíhala, se jedná o režim skenování v MRM módu (Multiple Reaction Monitoring) a sledované parametry jsou deklasterační potenciál (DP), kolizní energie (CE) a výstupní potenciál kolizní cely (CXP) pro zvolený fragmentový přechod. Na obr. 31 jsou znázorněna možná štěpení derivátu hyaluronanu s činidlem (HA+AMAC) za vzniku fragmentových iontů o různých efektivních hmotnostech m/z .



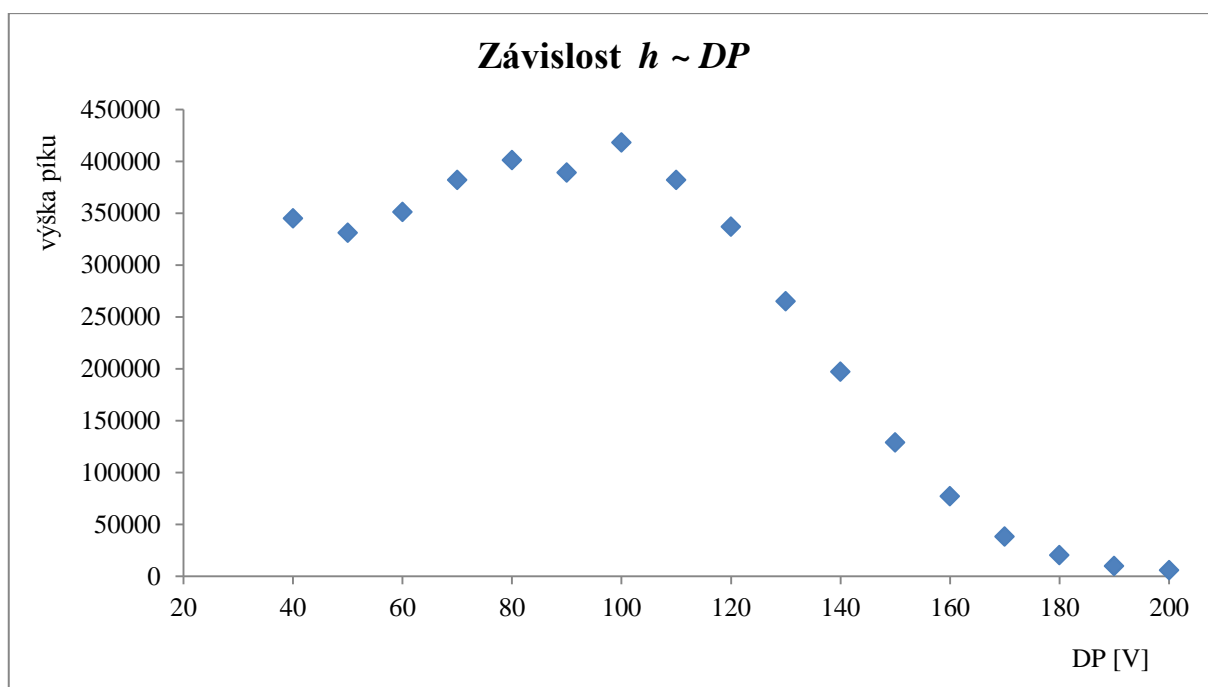
Obr. 31: Schéma fragmentace neutrálního nenasyceného disacharidu HA značeného činidlem AMAC.

Derivát nenasyčeného disacharidu HA značeného 2-aminoakridonem má teoreticky vypočítanou molekulovou hmotnost $M_w = 573,23$ g/mol. Při snímání záporných iontů dochází k odštěpení vodíkového protonu z karboxylové skupiny kyseliny glukuronové, takže anion derivátu $[M-H]^-$ by měl mít efektivní hmotnost m/z 572,23. Tento ion byl hledán jako prekurzorový ion při Q1 skenování a jeho přítomnost byla potvrzena nalezením aniontu o m/z 571,9.

První krok optimalizace byl zaměřen na výběr optimálního napětí kladeného na první kvadrupól (Q1), při kterém bude prekurzorový iont analytu izolován s největší účinností. V módu SIM (Single Ion Monitoring) → Q1 byl sledován prekurzorový ion m/z 572 v rozsahu $R = 200-600$. Při vstupním potenciálu EP -10 V byly měněny hodnoty deklasteračního potenciálu v rozpětí od -40 do -200 V. Poté byly sestrojeny grafy závislosti plochy A a výšky h píku na hodnotách deklasteračního potenciálu (obr. 32 a obr. 33). Z obou grafů je patrné, že optimální hodnota DP se pohybuje kolem hodnoty 100, kdy má pík deprotonované molekuly nejvyšší intenzitu. Tato hodnota proto byla pro další optimalizaci výchozí.



Obr. 32: Závislost plochy píku prekurzorového iontu 571,9 m/z na hodnotách deklasteračního potenciálu.

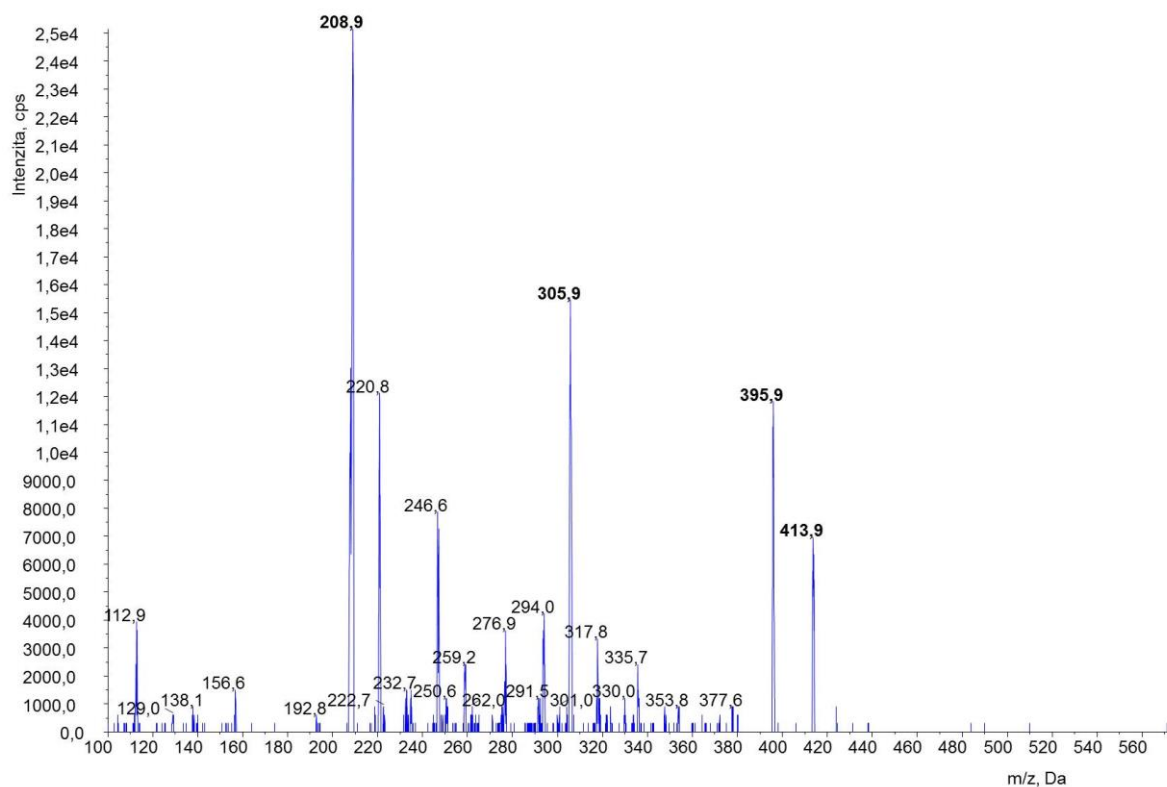


Obr. 33: Závislost výšky píku prekurzorového iontu 571,9 m/z na hodnotách deklasteračního potenciálu.

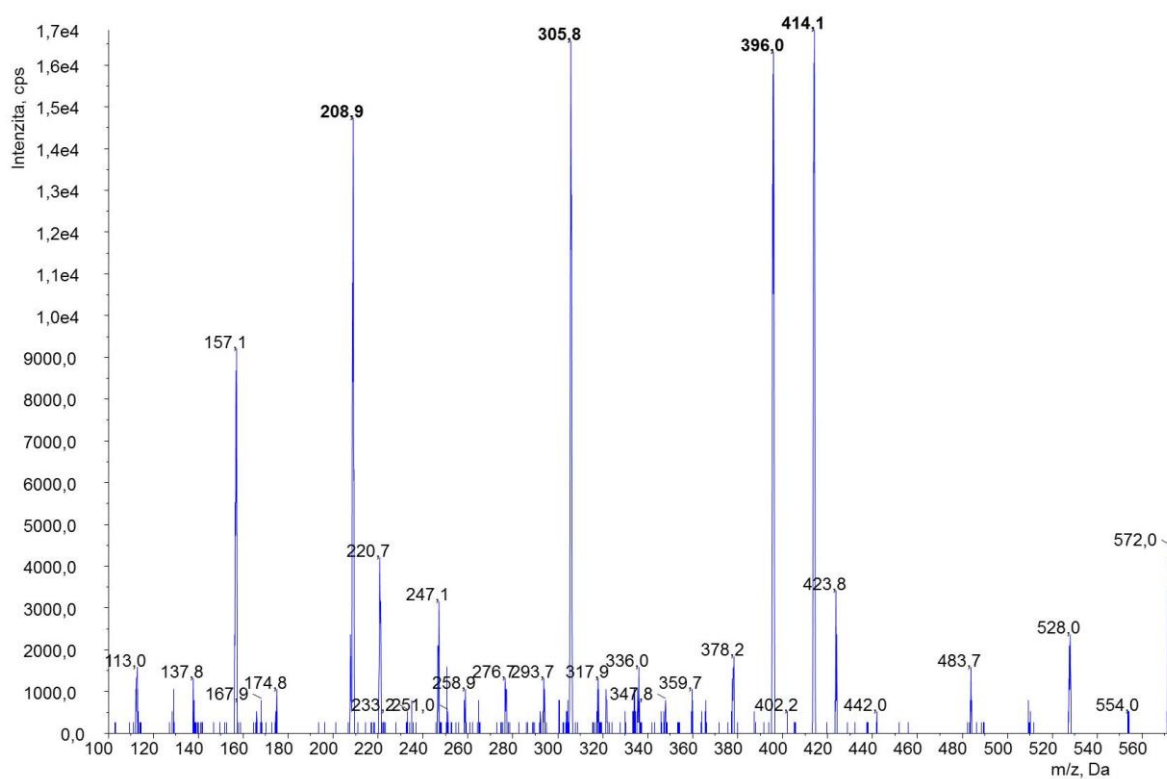
Druhá fáze MRM optimalizace byla zaměřena na studium fragmentace prekurzorového iontu probíhající v kolizní cele (Q2). Produktové ionty byly monitorovány v TIC módu (Total Ion Current). Při stálých hodnotách ostatních parametrů (DP –100, EP –10, CXP –9) byly měněny hodnoty kolizní energie od –5 do –55 V. Čím vyšší je hodnota kolizní energie, tím vyšší je fragmentace prekurzorového iontu ve prospěch produktových iontů. Hodnota kolizní energie má tedy vliv na citlivost MRM metody, jelikož špatně zvolená CE může způsobit buď nedostatečnou fragmentaci, nebo naopak příliš rozsáhlou fragmentaci. Byly vybrány čtyři nejintenzivnější produktové ionty při daných hodnotách kolizní energie uvedené v tabulce 4. Pro kvantitativní účel byla zvolena hodnota CE –45 V, při které byl nejintenzivnější produktový ion 208,9 m/z (spektrum na obr. 34). Pro konformační účel sloužilo CE –35 V, při kterém byl výrazný pík fragmentu 395,9 m/z (spektrum na obr. 35).

Tabulka 4: Nejintenzivnější fragmentové ionty při daných hodnotách CE.

prekurzorový ion [m/z], Q1	produktový ion [m/z], Q3	CE [V]
571,9	208,9	–50, –45, –40
	395,9	–35, –30
	305,9	–40
	413,9	–35



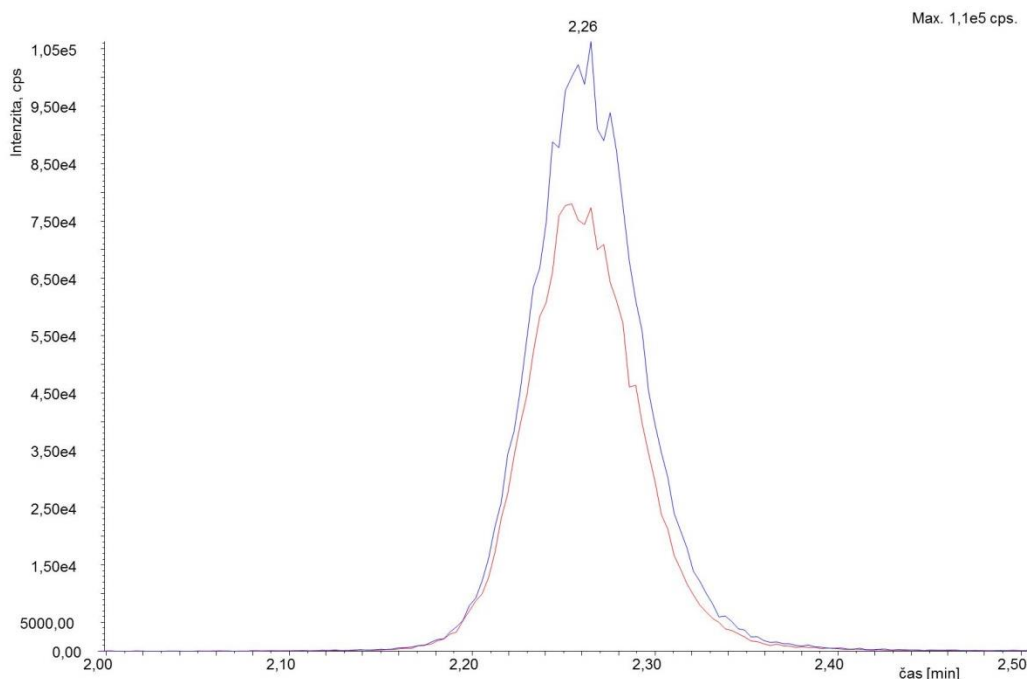
Obr. 34: Hmotnostní spektrum (ESI-) po fragmentaci prekurzorového iontu (IS –4500 V, CE – 45 V).



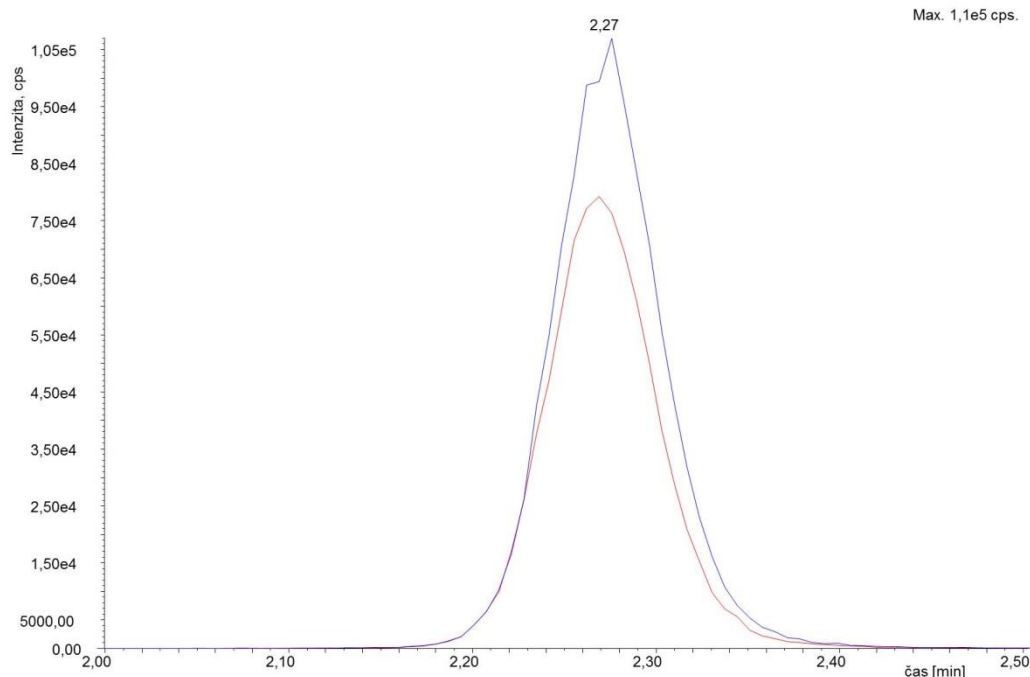
Obr. 35: Hmotnostní spektrum (ESI-) po fragmentaci prekurzorového iontu 572 m/z (IS –4500 V, CE – 35 V).

Posledním optimalizovaným parametrem byl výstupní potenciál kolizní cely. CXP fokusuje a urychluje fragmentové ionty z druhého kvadrupólu (Q2) do třetího (Q3). Pro vybrané přechody prekurzorového iontu na fragmentové ionty (Q1→Q3 Masses) byly zkoušeny hodnoty CXP od -7 do -12 V. Z celkem sedmi přechodů byl vybrán nejintenzivnější přechod z $571,9 \rightarrow 208,9$ m/z (odpovídající odštěpení činidla z molekuly) jako kvantitativní a přechod $571,9 \rightarrow 395,9$ m/z jako konformační. Nejintenzivnější přechody byly naměřeny při CXP -8 V, které bylo zvoleno jako optimální.

Pro kvantitativní a konformační přechod byla nakonec optimalizována doba skenu na 100 ms (tzv. *dwell time* , tj. doba, po kterou kvadrupól skenuje daný iont). Obecně platí, že čím delší je doba skenu, tím vyšší je citlivost, jelikož je nižší šum a tudíž lepší poměr S/N (signál/šum). Avšak příliš dlouhá doba skenu způsobí, že pík je vykreslen málo body a tudíž mohou detektoru uniknout méně koncentrované píky. Kratší *dwell time* sice snižuje citlivost, ale zase poskytuje více bodů na daný pík. Při volbě doby skenu je tudíž vždy nutné provést kompromis. Srovnání délek skenu iontu derivátu standardní HA je na obr. 36 a obr. 37.



Obr. 36: Optimalizace doby skenu, *dwell time* **100 ms**, CXP -8 V. Přechod kvantitativní (modře) $571,900/208,910$ m/z; konformační (červeně) $571,900/395,91$ m/z.



Obr. 37: Optimalizace doby skenu, dwell time **200 ms**, CXP -8 V. Přechod kvantitativní (modře) 571,900/208,910 m/z; konformační (červeně) 571,900/395,91 m/z.

Retenční čas AMAC značeného derivátu hyaluronanu byl za daných podmínek přibližně 2,4 minut. Nastavené podmínky pro měření na kapalinovém chromatografu s hmotnostní detekcí jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Podmínky měření na HPLC/MS.

<i>Optimalizované parametry</i>			
MRM přechody	CE	DP	CXP
571, 9 → 208,9 m/z	-45 V	-100 V	-8 V
571, 9 → 395,9 m/z	-35 V		
<i>Parametry hmotnostního spektrometru</i>			
EP	-10 V	ionizace	ESI-
teplota	400 °C	ion spray voltage	-4500 V
curtain gas	20	collision gas	medium
ion source gas 1	40	ion source gas 2	50

3.4 Kvantifikace hyaluronanu

Kvantitativní stanovení hyaluronanu bylo provedeno metodou kalibrační křivky. Byla sestrojena kalibrační řada o objemech 0,5; 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 a 14 μl standardu pipetovaných k derivatizaci, což odpovídá rozsahu 1,64–45,95 μg absolutního množství HA. Jednotlivé kalibrační roztoky byly proměřeny v HPLC/FLD 2 \times a v HPLC/MS 3 \times . Statistické vyhodnocení naměřených dat bylo provedeno pomocí programu QC Expert 2.9 (TriloByte, ČR). Byla provedena regresní diagnostika využitím pěti grafů – *Williamsova*, *Pregibonova*, *McCullohova-Meeterova*, *L-R* a *grafu predikovaných reziduí*. Tímto způsobem byly identifikovány a odstraněny vlivné body. Dále byla provedena kritika modelu na hladině významnosti 95 %. Významnost regresních parametrů byla ověřena Studentovým t-testem. Regresní parametry i se směrodatnými odchylkami a koeficient determinace jsou uvedeny v grafech kalibračních závislostí.

Obsah HA ve vzorcích byl u obou metod vypočítán z příslušné rovnice lineární regrese po dosazení naměřených ploch píků analytu. Medián a směrodatná odchylka byla u dané metody počítána pro tablety z 36 měření, Hyal-Drop z 22, Hysan z 15 a Olynth z 9. Vzorky byly připraveny a proměřeny opakovaně (včetně fragmentace a derivatizace).

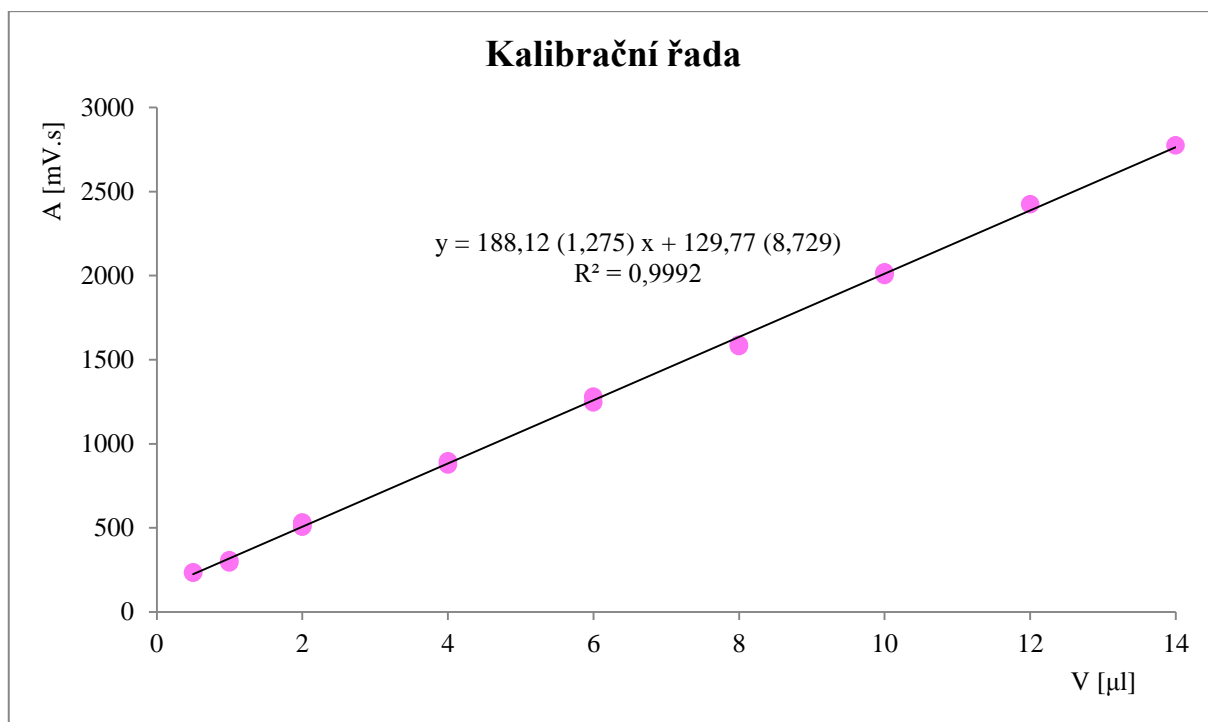
Nakonec byl pro obě metody vypočítán limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ). LOD je definován jako nejnižší detekovatelné množství analytu ve vzorku. Tato koncentrace poskytuje signál, který odpovídá trojnásobku šumu. LOQ je definován jako nejnižší koncentrace analytu ve vzorku, která může být kvantifikována s přijatelnou přesností a správností za daných podmínek metody. Tato koncentrace poskytuje signál, jenž je roven desetinásobku šumu.

Při měření na HPLC/FLD byla velikost šumu základní linie odečtena 5 \times z chromatogramů nejnižšího bodu kalibrace, z čehož průměrná hodnota odpovídala $h_{\text{sum}} = 0,00987 \text{ mV}$. Ze směrnice závislosti výšky píku na množství HA byl vypočítán $\text{LOD} = 2,716 \text{ ng}$ a $\text{LOQ} = 9,053 \text{ ng}$.

Metodou HPLC/MS byla z výšky šumu ($h_{\text{sum}} = 20 \text{ cps}$) a závislosti výšky píku na množství HA stanovena mez detekce $\text{LOD} = 22,44 \text{ ng}$ a mez stanovitelnosti $\text{LOQ} = 74,81 \text{ ng}$.

3.4.1 Stanovení hyaluronanu pomocí HPLC/FLD

Na obr. 38 je sestrojena kalibrační křivka s odpovídající rovnicí lineární regrese.



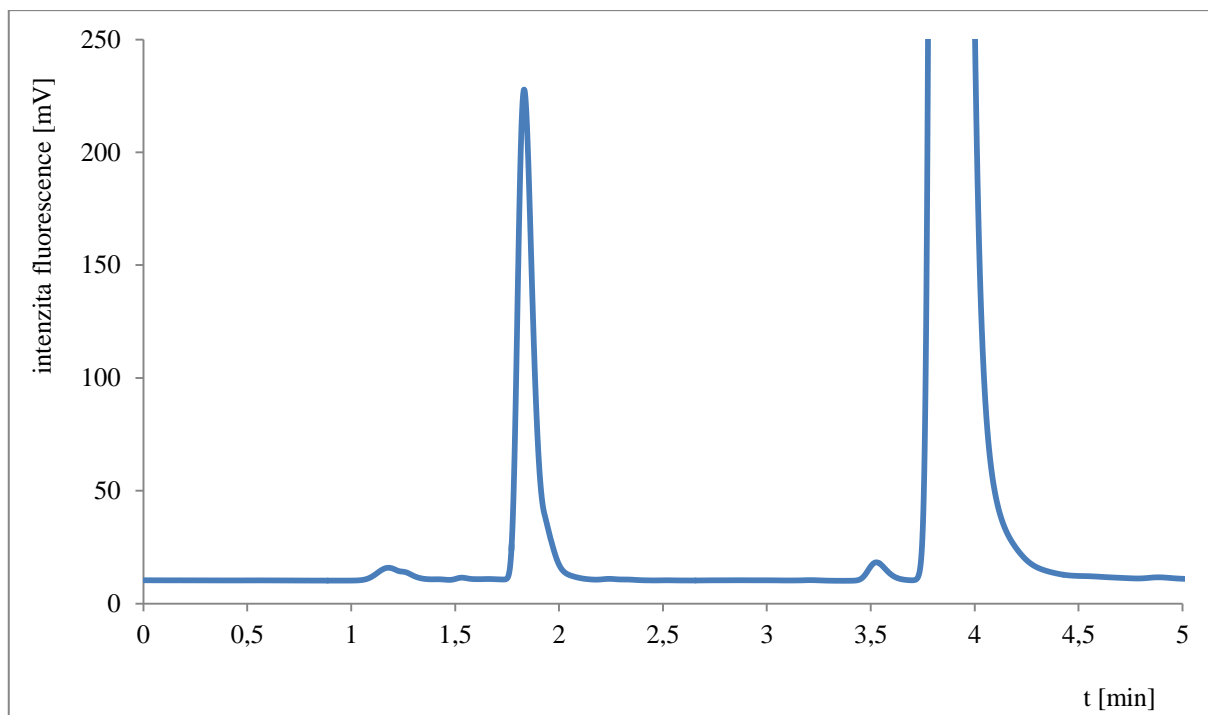
Obr. 38: Kalibrační závislost plochy píku na objemu standardu HA pipetovaného k derivatizaci.

Z rovnice lineární regrese kalibrační přímky a naměřených ploch píků byly vypočítány obsahy hyaluronanu ve vzorcích. Získané výsledky a jejich směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6: Výsledky měření z HPLC/FLD.

název vzorku	výsledek (SD) – medián
<i>Hepatica</i> , tablety	69,17 (\pm 2,82) mg
<i>Hyal-Drop</i> , oční kapky	1,116 (\pm 0,043) mg/ml
<i>Hysan</i> , nosní sprej	0,273 (\pm 0,015) mg/ml
<i>Olynth</i> , nosní sprej	0,023 (\pm 0,001) %

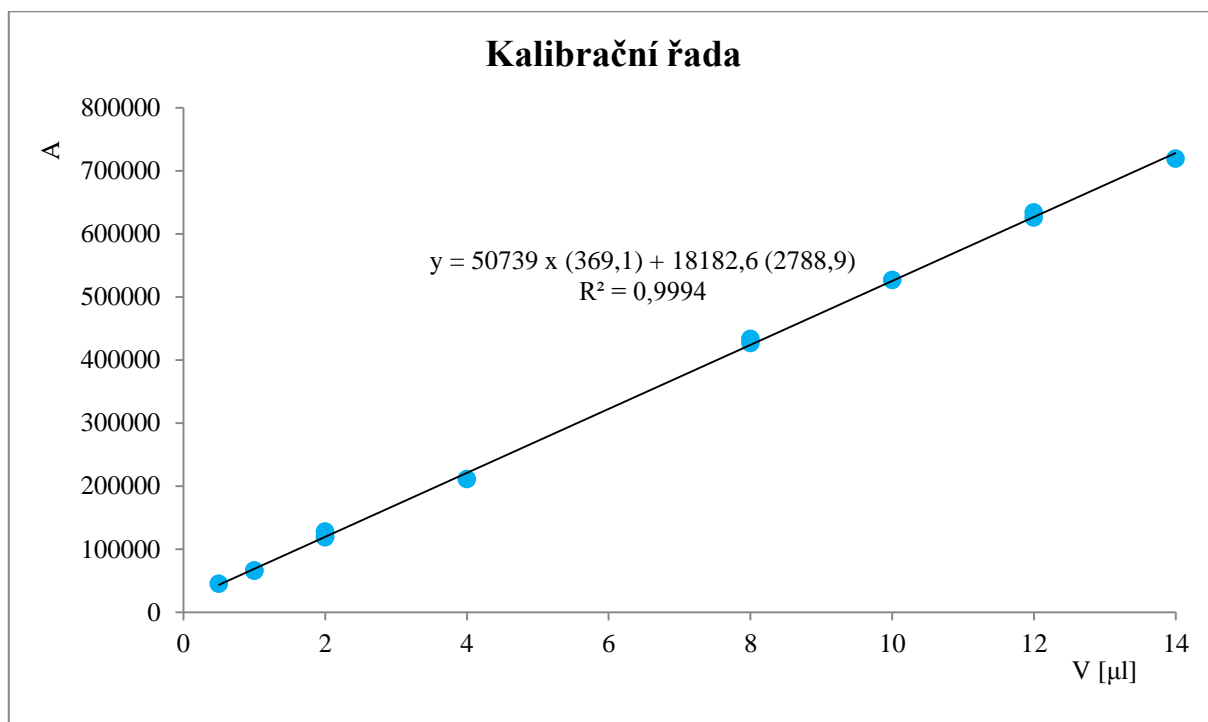
Průběh chromatografické separace s fluorescenční detekcí za stanovených podmínek je znázorněn na obr. 39. K eluci hyaluronanového derivátu značeného 2-aminoakridonem dochází kolem druhé minuty. Volné činidlo je eluováno ve čtvrté minutě.



Obr. 39: Chromatogram RP-HPLC separace s FLD při 428 a 525 nm. SF: C18, MF: acetonitril/ 60 mM octan amonný (pH 5,6). Izokratická eluce s 20 % ACN.

3.4.2 Stanovení hyaluronanu pomocí HPLC/MS

Graf závislosti plochy píku na objemu standardu pipetovaného k derivatizaci je znázorněna na obr. 40.



Obr. 40: Kalibrační křivka závislosti plochy píku na objemu standardu HA pipetovaného k derivatizaci.

V tabulce 7 jsou uvedeny výsledky měření vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s hmotnostním spektrometrem jako detekčním prvkem.

Tabulka 7: Výsledky měření z HPLC/MS.

název vzorku	výsledek (SD) – medián
<i>Hepatica</i> , tablety	73,67 (\pm 2,43) mg
<i>Hyal-Drop</i> , oční kapky	1,259 (\pm 0,057) mg/ml
<i>Hysan</i> , nosní sprej	0,306 (\pm 0,028) mg/ml
<i>Olynth</i> , nosní sprej	0,023 (\pm 0,002) %

Pro přehledné shrnutí jsou všechny výsledky z použitých metod porovnány v tabulce 8. Spektrofotometrická metoda zde slouží pouze pro srovnání a zjištění přesnosti měření této metody. Porovnáním hodnot lze vidět, že všechny spektrofotometricky naměřené hodnoty jsou nižší, což potvrzuje nižší citlivost UV/VIS spektroskopie, která se v tomto případě nehodí pro kvantifikaci, ale spíše pro kvalitativní stanovení. U většiny vzorků se výsledky pohybují kolem dolní meze výsledků získaných z chromatografického stanovení, vyjma vzorku Olynth, u kterého je hodnota poloviční.

Kvantitativním stanovením pomocí metod HPLC/FLD a HPLC/MS bylo dosaženo podobných výsledků. Směrodatné odchylky jsou poměrně nízké, vyjma tablet se naměřené hodnoty lišily jen v úzkém intervalu. Větší odchylky ve výsledcích tablet mohla způsobit manipulace se vzorkem, respektive vážení. Ostatní vzorky mohly být k enzymatickému štěpení pipetovány mikropipetami a množství tedy bylo vždy téměř stejné. Vzorky byly připravovány a měřeny opakovaně, v různé časy a s různými objemy odebranými k derivatizaci.

Největší shoda je vidět u výsledků tablet Hepatica, které se pohybují vždy kolem deklarované hodnoty. U nosního spreje Hysan byl zjištěn dokonce vyšší obsah hyaluronanu, který u obou metod přesahoval deklarovanou hodnotu. Naopak v kapkách do očí Hyal-Drop bylo změřené množství HA přibližně poloviční. Nejhorší výsledek byl zjištěn u nosního spreje Olynth, ve kterém byl obsah HA více než 4× nižší.

Tabulka 8: Výsledky obsahů hyaluronanu ve vzorcích získané ze všech použitých metod.

Vzorek	Spektrofotometrie	Výsledek (\pmSD) HPLC/FLD	Výsledek (\pmSD) HPLC/MS	Deklarované množství HA
Hepatica	64,27 mg	69,17 (\pm 2,82) mg	73,67 (\pm 2,43) mg	<i>70 mg v tableť</i>
Hyal-Drop	1,067 mg/ml	1,116 (\pm 0,043) mg/ml	1,259 (\pm 0,057) mg/ml	<i>2,4 mg/ml</i>
Hysan	0,217 mg/ml	0,273 (\pm 0,015) mg/ml	0,306 (\pm 0,028) mg/ml	<i>0,25 mg/ml</i>
Olynth	0,012 %	0,023 (\pm 0,001) %	0,023 (\pm 0,002) %	<i>0,1 % HA</i>

4 Závěr

Cílem praktické části této práce bylo nalézt a optimalizovat postup pro stanovení kyseliny hyaluronové, látky s neustále vzrůstající popularitou a využitím v mnoha oblastech medicíny, v kosmetice i potravinářství. Byly zvoleny různé typy vzorků volně prodejných v lékárnách s obsahem hyaluronanu sodného v různých koncentracích. Jednalo se o tablety Hepatica s obsahem nízkomolekulární HA sloužící jako doplněk stravy pro doplnění hyaluronanu v organismu, jenž s věkem přirozeně ubývá, čímž se podílí na stárnutí kůže a problémech s klouby. Dále byly zkoumány oční kapky Hyal-Drop, nosní spreje Olynth a Hysan, kde má hyaluronan především zvláčňující a ochranné účinky.

Jelikož se jedná o přírodní molekulu o vysoké molekulové hmotnosti, bylo nutné nejprve nastavit podmínky enzymatického štěpení na nenasycené disacharidové jednotky. Byl zvolen enzym bakteriální hyaluronanlyáza, u něhož byla spektrofotometricky sledována rychlost štěpení v závislosti na molekulové hmotnosti substrátu. K úplné fragmentaci polymeru stačily 4 minuty. Fragmenty hyaluronanu byly ověřeny proměřením absorbance, která byla nejvyšší při vlnové délce 225 nm (230 nm) díky vzniklé dvojné vazbě v kyselině glukuronové.

Následně mohly být fragmenty hyaluronanu derivatizovány pomocí vhodného fluorescenčního činidla. Derivatizační reakce byla původně zkoušena se dvěma činidly, AMAC a ANTS. Podařilo se optimalizovat postup derivatizace pro činidlo 2-aminoakridon. Deriváty s kyselinou 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfonovou se nepodařilo separovat ani pomocí chromatografie hydrofilních interakcí. Proto byl k fluorescenčnímu značení zvolen AMAC, pro jehož deriváty byla nejvhodnější chromatografie v systémech s obrácenými fázemi, RP-HPLC s oktadecylsilikagelovou stacionární fází. Mobilní fázi tvořil acetonitril a 60 mM octan amonný. Za zvolených podmínek bylo navíc dovoleno použití izokratické eluce (20 % ACN), při které byly vzorky i s činidlem eluovány do 5 minut.

Ke kvantitativnímu stanovení byly použity dvě metody: vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí a ve spojení s hmotnostním spektrometrem. Nižší limit detekce byl zjištěn u fluorescenční detekce (LOD = 2,716 ng). To je pravděpodobně způsobeno tím, že ionizační účinnost derivátu není tak vysoká a proto je měření s využitím hmotnostního spektrometru méně citlivé. Oproti tomu je však použití MS selektivnější, poněvadž sledujeme pouze daný ion derivátu HA a žádné další látky, které by v HPLC/FLD fluoreskovaly. Není tedy rušeno stanovení konkrétní látky a proto i obsahy HA naměřené pomocí HPLC/MS byly vyšší.

Současně byla ověřena i robustnost metody. Separace byly provedeny v různých časech, stejně tak štěpení vzorků a derivatizace byla provedena opakovaně, v různé dny a s různými objemy vzorku. Celkově však rozdíl ve výsledcích nebyl velký, obě metody se ukázaly být citlivé, robustní a rychle proveditelné. Výhodou HPLC/MS byla především automaticnost procesu a přesnější kvantifikace. Výsledky ze všech měření jsou porovnány v tabulce 8. Obecně nejlepší výsledky byly naměřeny pro produkt Hysan, kde množství HA přesahovalo u obou metod deklarovanou hodnotu. V doplňku stravy Hepatica bylo nalezeno přesné nebo vyšší deklarované množství. Nicméně pro zbylé dva vzorky, Hyal-Drop byla zjištěná koncentrace hyaluronanu dvakrát nižší a pro Olynth dokonce čtyřikrát nižší, než koncentrace uváděná výrobcem.

5 Literatura

- [1] Covington, T.: *Tanning Chemistry – The Science of Leather*, Royal Society of Chemistry, 2009, s. 42.
- [2] Stern, R.: Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway, *European Journal of Cell Biology*, 2004, 83, s. 317–325.
- [3] Hascall, V. C.; Laurent, T. C.: Hyaluronan, structure and physical properties. *Glycoforum* online, ke dni 21. 2. 2017. <http://www.glycoforum.gr.jp>.
- [4] Comper, W. D.; Laurent, T. C.: Physiological function of connective tissue polysaccharides. *Physiological Reviews*, 1978, 58, s. 255–315.
- [5] Wiig, H.; Gyenge, C.; Iversen, P.O.; Gullberg, D.; Tenstad, O.: The role of the extracellular matrix in tissue distribution of macromolecules in normal and pathological tissues: potential therapeutic consequences. *Microcirculation*, 2008, 15, s. 283–296.
- [6] Stridh, S.; Palm, F.; Hansell, P.: Renal interstitial hyaluronan: functional aspects during normal and pathological conditions, *American Journal of Physiology*, 2012, 302, s. 1235–1249.
- [7] Turley, E. A.; Roth, S.: Interactions between the carbohydrate chains of hyaluronate and chondroitin sulphate. *Nature*, 1980, 283, s. 268–271.
- [8] Dungal, P. a kol.: *Ortopedie: 2.*, přepracované a doplněné vydání, GRADA Publishing, 2014, s. 128.
- [9] Price, R.D.; Berry, M.G.; Navsaria, H.A.: Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *Journal of Plastic Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 2007, 60, s. 1110–1119.

- [10] Tsepilov, R. N.; Beloded, A. V.: Hyaluronic Acid—an “Old” Molecule with “New” Functions: Biosynthesis and Depolymerization of Hyaluronic Acid in Bacteria and Vertebrate Tissues Including during Carcinogenesis. *Biochemistry* (Moscow), 2015, 80 (9), s. 1093–1108.
- [11] Fraser, J. R.; Laurent, T. C.; Laurent, U. B.: Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine*, 1997, 242, s. 27–33.
- [12] Eriksson, S.; Fraser, J. R.; Laurent, T. C.; Pertoft, H.; Smedsrod, B.: Endothelial cells are a site of uptake and degradation of hyaluronic acid in the liver. *Experimental Cell Research*, 1983, 144, s. 223–228.
- [13] Fraser, J. R.; Kimpton, W. G.; Laurent, T. C.; Cahill, R. N.; Vakakis, N.: Uptake and degradation of hyaluronan in lymphatic tissue. *Biochemical Journal*, 1988, 256, s. 153–158.
- [14] Garg, H. G.; Hales, C. A.: *Chemistry and biology of hyaluronan*, Oxford: Elsevier Science, 2004.
- [15] Dicker, K.T.; Gurski, L. A.: Hyaluronan, A simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta Biomaterialia*, 2014, 10 (4), s. 1558–1570.
- [16] Calabro, A.; Midura, R.; Wang, A.; West, L.; Plaas, A.; Hascall, V. C.: Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis of glycosaminoglycans. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2001, 9 (1), s. 16–22.
- [17] Imanari, T.; Toida, T.; Koshiishi, I.; Toyoda, H.: High-performance liquid chromatographic analysis of glycosaminoglycan-derived oligosaccharides. *Journal of Chromatography A*, 1996, 720, s. 275–293.
- [18] Frost, G. I.; Csoka, A. B.; Wong, T.; Stern, R.: Purification, cloning, and expression of human plasma hyaluronidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 236, s. 10–5.

- [19] Stern, R.: Hyaluronidases in cancer biology. *Seminars in Cancer Biology*, 2008, 18, s. 275–280.
- [20] Kumar, S.; West, D. C.; Ponting, J. M.; Gattamaneni, H. R.: Sera of children with renal tumours contain low-molecular-mass hyaluronic acid. *International Journal of Cancer*, 1989, 44, s. 445–8.
- [21] Jiang, D.; Liang, J.; Noble, P. W.: Hyaluronan in Tissue Injury and Repair. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2007, 23, s. 435–461.
- [22] Csoka, A. B.; Frost, G. I.; Stern, R.: The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biology*, 2001, 20, s. 499–508.
- [23] Csoka, A. B.; Scherer, S. W.; Stern, R.: Expression analysis of six paralogous human hyaluronidase genes clustered on chromosomes 3p21 and 7q31. *Genomics*, 1999, 60, s. 356–361.
- [24] Meyer, K.: Hyaluronidases. *The enzymes*, 3rd ed., Academic Press, New York, 1971, 5, s. 307–320.
- [25] Stern, R.; Jedrzejaz, M. J.: Hyaluronidases: Their genomics, structures, and mechanism of action. *Chemical Reviews*, 2006, 106, s. 818–839.
- [26] MacDonald, L. C.; Weiler, E. B.; Berger, B. W.: Engineering broad-spectrum digestion of polyuronides from an exolytic polysaccharide lyase. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9 (43), s. 1–13.
- [27] Suzuki, S.: Microbial Hyaluronan Lyases, on-line ke dni 28. 4. 2017. Dostupné na webových stránkách <http://glycoforum.gr.jp>.
- [28] Webové stránky *Sigma-Aldrich*, ke dni 4. 5. 2017. <http://www.sigmaaldrich.com>.

- [29] Imanari, T.; Toida, T.; Koshiishi, I.; Toyoda, H.: High-performance liquid chromatographic analysis of glycosaminoglycan-derived oligosaccharides. *Journal of Chromatography A*, 1996, 720, s. 275–293.
- [30] Shimizu, M. T.; Jorge, A. O.; Unterkircher, C. S.; Fantinato, V.; Paul, C. R.: Hyaluronidase and chondroitin sulphatase production by different species of *Candida*. *Journal of medical and veterinary mycology*, 1995, 33 (1), s. 27–31.
- [31] Lapčík, L.; Smedt, S.; Demeester, J.; Chabreček, P.: Hyaluronan, Preparation, Structure, Properties and Applications. *Chemical reviews*, 1998, 98 (8), s. 2663–2681.
- [32] Maleki, A.; Kjøniksen, A.-L.; Nyström, B.: Effect of pH on the Behavior of Hyaluronic Acid in Dilute and Semidilute Aqueous Solutions. *Macromolecular Symposia*, 2008, 274, s. 131–140.
- [33] Lapčík, L.; Omelka, L.; Kuběna, K.; Galatík, A.; Kellö, V.: Photodegradation of Hyaluronic Acid and of the Vitreous Body. *General Physiology and Biophysics*, 1990, 9, s. 419–429.
- [34] Kammeyer, A.; Luiten, R. M.: Oxidation events and skin aging, *Ageing Research Reviews*, 2015, 21, s. 16–29.
- [35] Webové stránky *Canadian Dermatology Association*, on-line ke dni 15. 3. 2017. <http://www.dermatology.ca>
- [36] Dai, G.; Freudenberger, T.; Zipper, P.: Chronic ultraviolet B irradiation causes loss of hyaluronic acid from mouse dermis because of down-regulation of hyaluronic acid synthases. *The American Journal of Pathology*, 171 (5), 2007, s. 1451–1461.
- [37] Šoltés, L.; Kogan, G.; Stankovská, M.: Degradation of High-Molar-Mass Hyaluronan and Characterization of Fragments. *Biomacromolecules*, 2007, 8, s. 2697–2705.

- [38] Šoltés, L.; Mendichi, R.; Kogan, G., Schiller, J. a kol.: Degradative Action of Reactive Oxygen Species on Hyaluronan. *Biomacromolecules*, 2006, 7, s. 659–668.
- [39] Šoltés, L.; Stankovská, M.; Brezova, V. a kol.: Hyaluronan degradation by copper(II) chloride and ascorbate: rotational viscometric, EPR spin-trapping, and MALDI–TOF mass spectrometric investigations. *Carbohydrate Research*, 2006, 341, s. 2826–2834.
- [40] Feinberg, R. N.; Beebe, D. C.: Hyaluronate in vasculogenesis. *Science*, 1983, 220, s. 1177–1179.
- [41] Delmage, J. M.; Powars, D. R.; Jaynes, P. K.; Allerton, S. E.: The selective suppression of immunogenicity by hyaluronic acid. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 1986, 16, s. 303–310.
- [42] West, D. C.; Hampson, I. N.; Arnold, F.; Kumar, S.: Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science*, 1985, 228, s. 1324–1326.
- [43] Noble, P. W.: Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biology*, 2002, 21, s. 25–29.
- [44] Fieber, C.; Baumann, P.; Vallon, R.; Termeer, C.; Simon, J. C.; Hofmann, M.; Angel, P.; Herrlich, P.; Sleeman, J. P.: Hyaluronan oligosaccharide-induced transcription of metalloproteases. *Journal of Cell Science*, 2004, 117, s. 359–367.
- [45] Taylor, K. R.; Trowbridge, J. M.; Rudisill, J. A.; Termeer, C. C.; Simon, J. C.; Gallo, R. L.: Hyaluronan fragments stimulate dermal endothelial recognition of injury through TLR4. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279, s. 17079–17084.
- [46] Termeer, C. C.; Hennies, J.; Voith, U.; Ahrens, T.; Weiss, J. M.; Prehm, P.; Simon, J. C.: Oligosaccharides of hyaluronan are potent activators of dendritic cells. *Journal of Immunology*, 2000, 165, s. 1863–1870.

- [47] Stern, R.; Asari, A. A.; Sugahara K. N.: Hyaluronan fragments. An information-rich system. *European Journal of Cell Biology*, 2006, 85, s. 699–715.
- [48] Xu, H.; Ito, T.; Tawada, A.; Maeda, H.; Yamanokuchi, H.; Isahara, K.; Yoshida, K.; Uchiyama Y.; Asari, A.: Effect of hyaluronan oligosaccharides on the expression of heat shock protein 72. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277, s. 17308–17314.
- [49] Allison, D. D.; Grande-Allen, K. J.: Hyaluronan: a powerful tissue engineering tool. *Tissue Engineering*, 2006, 12, s. 2131–2140.
- [50] Webové stránky holdingu *Contipro*, on-line ke dni 6. 4. 2017. <http://www.contipro.cz>
- [51] Muzzarelli, R. A. A.: Chitosan, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 89 (3), s. 723–739.
- [52] Almond, A.: Visions & Reflections (Minireview) Hyaluronan. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2007, 64, s. 1591–1596.
- [53] Longinotti, C.: The use of hyaluronic acid based dressings to treat burns. *Burn & Trauma*, 2014, 2 (4), s. 162–168.
- [54] Taylor, K. R.; Gallo, R. L.: Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *The FASEB Journal*, 2006, 20, s. 9–22.
- [55] Fisher, G. J.; Kang, S.; Varani, J.; Bata-Csorgo, Z.; Wan, Y.; Datta, S.; Voorhees, J. J.: Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Archives of Dermatology*, 2002, 138 (11), s. 1462–70.
- [56] Iorizzo, M.; Padova, M. P.; Tosti, A.: Biorejuvenation theory and practice. *Clinics in Dermatology*, 2008, 26, s. 177–181.

- [57] Fakhari, A.; Berklund, C.: Applications and emerging trends of hyaluronic acid in tissue engineering, as a dermal filler and in osteoarthritis treatment. *Acta Biomaterialia*, 2013, 9, s. 7081–7092.
- [58] Chun, C.; Lee, D.Y.; Kim, J.-T.; Kwon, M.-K.; Kim, Y.-Z., Kim, S.-S.: Effect of molecular weight of hyaluronic acid (HA) on viscoelasticity and particle texturing feel of HA dermal biphasic fillers. *Biomaterials Research*, 2016, 20:24, s. 1–7.
- [59] Collins, M. N.: *Hyaluronic Acid for Biomedical and Pharmaceutical Applications*, Smithers Rapra Technology, 2014, ebook, ISBN: 978-190903-078-7.
- [60] Kaderli, S.; Boulocher, C.; Pillet, E.; Watrelot-Virieux, D.: A novel biocompatible hyaluronic acid–chitosan hybrid hydrogel for osteoarthritis therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015, 483, s. 158–168.
- [61] Dhandayuthapani, B.; Yoshida, Y.; Maekawa, T.; Kumar, D. S.: Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application. *International Journal of Polymer Science*, 2011, s. 1–19.
- [62] Boeriu, C. G.; Springer, J.; Kooy, F. K.; Broek, L. A. M.; Eggink, G.: Production Methods for Hyaluronan. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2013, 2013, s. 1–14.
- [63] Meyer, K.; Palmer, J. W.: The polysaccharide of vitreous humor. *The journal of biological chemistry*, 1934, s. 629–634.
- [64] Boas, N. F.: Isolation of hyaluronic acid from the cock's comb. *The journal of biological chemistry*, 1949, s. 573–575.
- [65] Kang, D. Y.; Kim, W. S.; Heo, I. S.; Park, Y. H.; Seungho, L.: Extraction of hyaluronic acid from rooster comb and characterization using flow field-flow fractionation coupled with multiangle light scattering. *Journal of Separation Science*, 2010, 33 (22), s. 3530–3536.

- [66] Murado, M. A.; Montemayor, M. I.; Cabo, M. L.; Vázquez, J. A.; González, M. P.: Optimalization of extraction and purification process of hyaluronic acid from fish eyeball. *Food and bioproducts processing*, 2012, 90, s. 491–498.
- [67] Shiedlin, A.; Bigelow, R.; Christopher, W. a kol.: Evaluation of hyaluronan from different sources: streptococcus zooepidemicus, rooster comb, bovine vitreous, and human umbilical cord. *Biomacromolecules*, 2004, 5 (6), s. 2122–2127.
- [68] Sadhasivam, G.; Muthuvel, A.; Pachaiyappan, A.; Thangavel, B.: Isolation and characterization of hyaluronic acid from the liver of marine stingray *Aetobatus narinari*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 54, s. 84–89.
- [69] Khanmohammadi, M.; Khoshfetrat, A. B.; Eskandarnezhad, S.; Sani, N. F.; Ebrahimi, S.: Sequential optimization strategy for hyaluronic acid extraction from eggshell and its partial characterization. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2014, 20 (6), s. 4371–4376.
- [70] Srisantisaeng, P.; Garnjanagoonchorn, W.; Thanachasai, S.; Choothesa, A.: Proteolytic activity from chicken intestine and pancreas: extraction, partial characterization and application for hyaluronic acid separation from chicken comb. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2013, 93, s. 3390–3394.
- [71] Choi, S.; Choi, W.; Kim, S. a kol.: Purification and biocompatibility of fermented hyaluronic acid for its applications to biomaterials. *Biomaterials Research*, 2014, 18 (6), s. 1–10.
- [72] Webové stránky *MicrobeWiki*, ke dni 3. 3. 2017. <https://microbewiki.kenyon.edu>
- [73] Kleeman, A.; Engel, J.; Kutscher, B.; Reichert, D. *Pharmaceutical Substances - Syntheses, Patents and Applications of the Most Relevant AIPs (5th Edition, Completely Revised)*, Thieme Medical Publishers Inc., 2009, s. 665.

- [74] Sze, J. H.; Brownlie, J. C.; Love, C. A.: Biotechnological production of hyaluronic acid. *3 Biotech*, 2016, 6:67, s. 2–9.
- [75] Churáček, J.; Jandera, P. *Separace látek, Kapalinová vysokoučinná kolonová chromatografie*, SNTL, Praha, 1986.
- [76] Holzbecher, Z.; Churáček, J. *Analytická chemie*, SNTL, Praha, 1987, s. 413–478.
- [77] Nováková, L.; Douša, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.*, Praha, 2013, ISBN 978-80-260-4243-3.
- [78] Churáček, J. a kolektiv. *Analytická separace látek*, SNTL, Praha, 1990.
- [79] Česla, P. *Přednášky z instrumentálních metod analytických*, Univerzita Pardubice, 2015.
- [80] Česla, P. *Derivatizace pro chromatografii, přednášky UPCE*, 2015.
- [81] Ambrosius, M.; Kleesiek, K.; Götting, C.: Quantitative determination of the glycosaminoglycan Δ -disaccharide composition of serum, platelets and granulocytes by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1201 (1), s. 54–60.
- [82] Volpi, N.: Hyaluronic acid and chondroitin sulfate unsaturated disaccharides analysis by high-performance liquid chromatography and fluorimetric detection with dansylhydrazine. *Analytical Biochemistry*, 2000, 277, s. 19–24.
- [83] Jackson, P.: Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Reducing Saccharides Labeled with the Fluorophore 2-aminoacridone: Subpicomolar Detection Using an Imaging System Based on a Cooled Charge-Coupled Device. *Analytical biochemistry*, 1991, 196, s. 238–244.

- [84] Hu, G-F.: Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis, Technology and applications. *Journal of Chromatography A*, 1995, 705 (1), s. 89–103.
- [85] Kitagawa, H.; Kinoshita, A.; Sugahara, K.: Microanalysis of Glycosaminoglycan-Derived Disaccharides Labeled with the Fluorophore 2-aminoacridone by Capillary Electrophoresis and High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Biochemistry*, 1995, 232, s. 114–121.
- [86] Unterieser, I.; Mischnick, P.: Labeling of oligosaccharides for quantitative mass spectrometry. *Carbohydrate Research*, 2011, 346, s. 68–75.
- [87] Okafo, G.; Langridge, J.; North, S. a kol.: High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Complex N-Linked Glycans Derivatized with 2-aminoacridone. *Analytical Chemistry*, 1997, 69, s. 4985–4993.
- [88] Kakehi, K.; Kinoshita, M.; Yasueda, S.: Hyaluronic acid - separation and biological implications, *Journal of Chromatography B*, 2003, 797, s. 347–355.
- [89] Calabro, A.; Benavides, M.; Tammi, M.; Hascall, V. C.; Midura, R. J.: Microanalysis of enzyme digests of hyaluronan and chondroitin/dermatan sulfate by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE). *Glycobiology*, 2000, 10 (3), s. 273–281.
- [90] Chiesa, C.; Horváth, C.: Capillary zone electrophoresis of malto-oligosaccharides derivatized with aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid. *Journal of Chromatography*, 1993, 645, s. 337–352.
- [91] Starr, C. M; Masada, R. I.; Hague, C.; Skop, E.; Klock, J. C.: Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis in the separation, analysis, and sequencing of carbohydrates. *Journal of Chromatography A*, 1996, 720, s. 295–321.
- [92] Christopher, K.; Makani, V.; Judy, W.; Lee, E.; Chiaia, N.; Kim, D. S.; Park, J.: Use of fluorescent ANTS to examine the BBB-permeability of polysaccharide. *MethodsX* 2, 2015, s. 174–181.

- [93] Partyka, J.; Foret, F.: Cationic labeling of oligosaccharides for electrophoretic preconcentration and separation with contactless conductivity Detection. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1267, s. 116–120.
- [94] Alkrad, J. A.; Mrestani, Y.; Stroehl, D.; Wartewig, S.; Neubert, R.: Characterization of enzymatically digested hyaluronic acid using NMR, Raman, IR, and UV–Vis spectroscopies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2003, 31 (3), s. 545–550.
- [95] Vasi, A.-M.; Popa, M. I.; Butnaru, M. a kol.: Chemical functionalization of hyaluronic acid for drug delivery applications. *Materials Science and Engineering C*, 2014, 38, s. 177–185.
- [96] Ruckmani, K.; Shaikh, S. Z.; Khalil, P. a kol.: Determination of sodium hyaluronate in pharmaceutical formulations by HPLC–UV. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2013, 3 (5), s. 324–329.
- [97] Osago, H.; Shibata, T.; Hara, N. a kol.: Quantitative analysis of glycosaminoglycans, chondroitin/dermatan sulfate, hyaluronic acid, heparan sulfate, and keratan sulfate by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spektrometry. *Analytical Biochemistry*, 2014, 467, s. 62–74.
- [98] Yanga, B. Changa, Y.; Weyersa, A. M. a kol.: Disaccharide analysis of glycosaminoglycan mixtures by ultra-high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1225, s. 91–98.
- [99] Volpi, N.: High-performance liquid chromatography and on-line mass spectrometry detection for the analysis of chondroitin sulfates/hyaluronan disaccharides derivatized with 2-aminoacridone, *Analytical Biochemistry*, 2010, 397, s. 12–23.
- [100] Vacek, J.; Onofrejová, L.; Klejdus, B.; Kubáň, V.: Využití kapalinové chromatografie založené na hydrofilních interakcích pro separace polárních látek. *Chemické listy*, 2009, 103, s. 381–385.

- [101] Takegawa, Y.; Araki, K.; Fujitani, N. a kol.: Simultaneous Analysis of Heparan Sulfate, Chondroitin/Dermatan Sulfates, and Hyaluronan Disaccharides by Glycoblotting-Assisted Sample Preparation Followed by Single-Step Zwitter-Ionic-Hydrophilic Interaction Chromatography. *Analytical Chemistry*, 2011, 83, s. 9443–9449.
- [102] Hampson, I. N.; Gallagher, J. T.: Separation of radiolabelled glycosaminoglycan oligosaccharides by polyacrylamide-gel electrophoresis. *Biochemical Journal*, 1984, 221 (3), s. 697–705.
- [103] Min, H.; Cowman, M. K.: Combined Alcian blue and silver staining of glycosaminoglycans in polyacrylamide gels: application to electrophoretic analysis of molecular weight distribution. *Analytical Biochemistry*, 1986, 155 (2), s. 275–285.
- [104] Ikegami-Kawai, M.; Takahashi, T.: Microanalysis of hyaluronan oligosaccharides by polyacrylamide gel electrophoresis and its application to assay of hyaluronidase activity. *Analytical Biochemistry*, 2002, 311 (2), s. 157–165.
- [105] Laremore, T. N.; Ly, M.; Solakyildirim, K. a kol.: High-resolution preparative separation of glycosaminoglycan oligosaccharides by polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 2010, 401(2), s. 236–241.
- [106] Lee, H. G.; Cowman, M. K.: An agarose gel electrophoretic method for analysis hyaluronan molecular weight distribution. *Analytical biochemistry*, 1994, 219, s. 278–287.
- [107] Fateen, E. M.; Ibrahim, M. M.; Gouda, A. S.; Youssef, Z. A.: Biochemical diagnosis of mucopolysaccharidoses over 11 years. *Middle East Journal of Medical Genetics*, 2014, 3 (1), s. 16–23.
- [108] Volpi, N.: Electrophoresis Separation of Glycosaminoglycans on Nitrocellulose Membranes. *Analytical Biochemistry*, 1996, 240 (1), s. 114–118.

- [109] Seyfried, N. T.; Blundell, C. D.; Day, A. J.; Almond, A.: Preparation and application of biologically active fluorescent hyaluronan oligosaccharides. *Glycobiology*, 2005, 15 (3), s. 303–312.
- [110] Hayase, S.; Oda, Y.; Honda, S.; Kakehi, K.: High-performance capillary electrophoresis of hyaluronic acid - determination of its amount and molecular mass. *Journal of Chromatography A*, 1997, 768, s. 295–305.
- [111] Mao, W.; Thanawiroon, Ch.; Linhardt, R. J. *Biomedical chromatography*, 2002, 16, s. 77–94.
- [112] Zhao, T.; Songa, X.; Tana, X.; Xu, L. a kol.: Development of a rapid method for simultaneous separation of hyaluronic acid, chondroitin sulfate, dermatan sulfate and heparin by capillary electrophoresis. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 141, s. 197–203.
- [113] Chang, Y.; Yang, B.; Zhao, X. a kol.: Analysis of glycosaminoglycan-derived disaccharides by capillary electrophoresis using laser-induced fluorescence detection *Analytical Biochemistry*, 2012, 427, s. 91–98.
- [114] Shah, K.; Crowder, D.; Overmeyer, J.; Maltese, W.; Yun, Y.: Hyaluronan Drug Delivery Systems are Promising for Cancer Therapy Because of Their Selective Attachment, Enhanced Uptake, and Superior Efficacy. *Biomedical Engineering Letters*, 2015, 5, s. 109–123.
- [115] Šmejkalová, D.; Muthný, T.; Nešporová, K. a kol.: Hyaluronan polymeric micelles for topical drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 156, s. 86–96.