

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Analýza oligomerů kyseliny hyaluronové

Bc. Miroslav Kubát

Diplomová práce

2021

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Miroslav Kubát**
Osobní číslo: **C19537**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Studijní obor: **Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Analýza oligomerů kyseliny hyaluronové**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

význam kyseliny hyaluronové ve zdravotnictví a farmaceutickém průmyslu
možnosti stanovení kyseliny hyaluronové s ohledem na mez detekce a proveditelnost jednotlivých analýz ve větších sériích vzorků

Experimentální část:

vývoj metodiky pro stanovení nasycených a nenasycených oligosacharidů na báze hyaluronanu
optimalizace přípravy vzorků před vlastní analýzou
prověření základních validačních charakteristik vyvinuté metody

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **Ing. Matěj Šimek**
Contipro a.s.
Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2020**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2021

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

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

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 7. 5. 2021

Miroslav Kubát

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval Ing. Matěji Šimkovi za odbornou konzultaci, rady a předané zkušenosti v průběhu zpracování této diplomové práce. Poděkování patří také prof. Mgr. Romanu Kand'árovi, Ph.D. za trpělivost, vstřícnost a kontrolu formální úpravy.

ANOTACE

V této diplomové práci se zabývám kyselinou hyaluronovou, jejími výjimečnými vlastnostmi, funkcemi, metabolismem a širokým využitím ve zdravotnictví či farmacii. Podávám také aktuální přehled o možnostech analýzy kyseliny hyaluronové a porovnávám konkrétní metody. Byla vyvinuta citlivá a selektivní metoda UPLC-MS pro stanovení oligomerů kyseliny hyaluronové. Zavedená metoda byla využita pro stanovení oligomerů kyseliny hyaluronové ve vzorcích gastrointestinálního traktu myši pro účely studia farmakokinetiky kyseliny hyaluronové.

KLÍČOVÁ SLOVA

Oligomery kyseliny hyaluronové, glykosaminoglykany, kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

TITLE

Analysis of hyaluronic acid oligomers

ANNOTATION

In this thesis I deal with hyaluronic acid, its unique properties, functions, metabolism and wide use in healthcare or pharmacy. I also give a current overview of the possibilities of hyaluronic acid analysis and compare specific methods. A sensitive and selective UPLC-MS method for the determination of hyaluronic acid oligomers was developed. The established method was used for the determination of hyaluronic acid oligomers in samples of the gastrointestinal tract of mice for the purpose of pharmacokinetics study of hyaluronic acid.

KEYWORDS

Hyaluronic acid oligomers, glycosaminoglycans, liquid chromatography with mass spectrometry

OBSAH

0	Úvod.....	17
1	Teoretická část	18
1.1	Historie kyseliny hyaluronové	18
1.2	Struktura kyseliny hyaluronové	18
1.3	Fyzikálně-chemické vlastnosti kyseliny hyaluronové	21
1.4	Biologie kyseliny hyaluronové	21
1.4.1	Syntéza hyaluronanu v lidském těle	21
1.4.2	Odbourávání hyaluronanu v lidském těle	22
1.4.3	Mechanismy působení hyaluronanu	22
1.4.4	Vliv molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové na její vlastnosti.....	24
1.4.5	Farmakokinetika kyseliny hyaluronové.....	24
1.4.6	Absorpce kyseliny hyaluronové při orálním podání.....	25
1.5	Průmyslová výroba kyseliny hyaluronové	26
1.6	Modifikace kyseliny hyaluronové.....	26
1.6.1	Nenasycená kyselina hyaluronová.....	28
1.7	Aplikace kyseliny hyaluronové.....	28
1.7.1	Aplikace kyseliny hyaluronové ve farmacii	28
1.7.2	Aplikace kyseliny hyaluronové při léčbě rakoviny	29
1.7.3	Aplikace kyseliny hyaluronové při hojení ran	30
1.7.4	Aplikace kyseliny hyaluronové v oftalmologii.....	30
1.7.5	Aplikace kyseliny hyaluronové v artrologii.....	31
1.7.6	Aplikace kyseliny hyaluronové v rhinologii a pneumologii.....	31
1.7.7	Aplikace kyseliny hyaluronové v urologii.....	32
1.7.8	Aplikace kyseliny hyaluronové v estetické medicíně.....	32
1.7.9	Aplikace kyseliny hyaluronové v kosmetice	32
1.7.10	Orální aplikace kyseliny hyaluronové	32

1.7.11	Aplikace kyseliny hyaluronové při výrobě 3D struktur.....	33
1.7.12	Využití kyseliny hyaluronové v diagnostice.....	33
1.8	Možnosti analýzy kyseliny hyaluronové.....	34
1.8.1	Izolace a purifikace kyseliny hyaluronové z biologických vzorků.....	34
1.8.2	Depolymerizace hyaluronanu pro analytické účely.....	35
1.8.3	Derivatizace oligomerů hyaluronanu pro analytické účely.....	36
1.8.4	Kolorimetrické metody v analýze hyaluronanu.....	36
1.8.5	Imunoanalytické metody v analýze hyaluronanu.....	37
1.8.6	Elektroforetické metody v analýze hyaluronanu.....	38
1.8.7	Metody kapalinové chromatografie v analýze hyaluronanu.....	39
1.8.8	Hmotnostní spektrometrie v analýze hyaluronanu.....	41
2	Experimentální část.....	43
2.1	Chemikálie a pomůcky.....	43
2.1.1	Chemikálie.....	43
2.1.2	Přístroje.....	43
2.1.3	Sestava UPLC-MS.....	44
2.2	Příprava roztoků.....	44
2.2.1	Příprava 10× zředěné plazmy.....	44
2.2.2	Příprava 10mmol/l octanu amonného, pH 5 (mobilní fáze).....	44
2.2.3	Příprava směsi kyseliny fosforečné a acetonitrilu.....	44
2.2.4	Příprava standardů nasycených oligomerů kyseliny hyaluronové (2-20).....	44
2.2.5	Příprava standardů nenasycených oligomerů kyseliny hyaluronové (2-20).....	44
2.2.6	Příprava dimeru kyseliny hyaluronové značeného uhlíkem ¹³ C.....	45
2.3	Výběr vhodné extrakční metody.....	46
2.4	Provedení extrakce methanolem.....	47
2.5	Ověření UPLC-MS metody stanovení oligomerů kyseliny hyaluronové po extrakci methanolem.....	48

2.5.1	Vliv matrice na výtěžnost extrakce methanolem	48
2.5.2	Vliv koncentrace matrice na výtěžnost extrakce methanolem.....	48
2.5.3	Vliv pH na výtěžnost extrakce methanolem	49
2.5.4	Vliv pH na separaci oligomerů kyseliny hyaluronové.....	49
2.5.5	Vliv koncentrace octanu amonného v mobilní fázi na separaci oligomerů kyseliny hyaluronové	50
2.5.6	Příprava standardních roztoků nenasycených okta- a hexadekamerů kyseliny hyaluronové pro konstrukci kalibračních křivek	50
2.5.7	Stanovení hladin nenasycených okta- a hexadekamerů kyseliny hyaluronové v modelových vzorcích.....	52
2.6	Příprava standardních roztoků nenasycených oligomerů kyseliny hyaluronové pro konstrukci kalibračních křivek použitých ke stanovení hladin uhlíkem ¹³ C značených nenasycených oligomerů.....	53
2.7	Stanovení hladin uhlíkem ¹³ C značených nenasycených oligomerů hyaluronanu ve vzorcích obsahu gastrointestinálního traktu myši pro účely studia farmakokinetiky kyseliny hyaluronové.....	54
2.8	Podmínky UPLC separace	56
2.9	Podmínky MS detekce	56
3	Výsledky	58
3.1	Výběr vhodné extrakční metody	58
3.2	Ověření účinnosti extrakce methanolem a metody UPLC-MS.....	60
3.2.1	Vliv matrice na výtěžnost extrakce methanolem	60
3.2.2	Vliv množství matrice na výtěžnost extrakce methanolem	61
3.2.3	Vliv pH na výtěžnost extrakce methanolem	62
3.2.4	Vliv pH na separaci oligomerů kyseliny hyaluronové.....	63
3.2.5	Vliv koncentrace octanu amonného v mobilní fázi na separaci oligomerů kyseliny hyaluronové	65
3.3	Analytické parametry UPLC-MS metody pro stanovení vybraných oligomerů kyseliny hyaluronové.....	67

3.3.1	Linearita	67
3.3.2	Správnost	68
3.3.3	Přesnost	70
3.3.4	Celkové zhodnocení analytických parametrů metody stanovení vybraných oligomerů kyseliny hyaluronové	72
3.3.5	Stabilita oligomerů kyseliny hyaluronové	72
3.3.6	Průkaz oligomerů kyseliny hyaluronové v moči	72
3.4	Analýza uhlíkem ¹³ C značených nenasycených oligomerů hyaluronanu ve vzorcích gastrointestinálního traktu myši po podání uhlíkem ¹³ C značené kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 15 a 1562 kDa pro účely studia farmakokinetiky kyseliny hyaluronové	73
3.4.1	Stanovení hladin uhlíkem ¹³ C značených oligomerů hyaluronanu v obsahu žaludku myši	74
3.4.2	Stanovení hladin uhlíkem ¹³ C značených oligomerů hyaluronanu v obsahu tenkého střeva myši	77
3.4.3	Stanovení hladin uhlíkem ¹³ C značených oligomerů hyaluronanu v obsahu apendixu myši	80
3.4.4	Stanovení hladin uhlíkem ¹³ C značených oligomerů hyaluronanu v obsahu tlustého střeva myši	83
3.4.5	Shrnutí výsledků získaných při stanovení hladin jednotlivých uhlíkem ¹³ C značených oligomerů hyaluronanu v obsahu trávicího traktu myši po podání uhlíkem ¹³ C značené kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 15 a 1562 kDa	86
3.5	Diskuse	87
4	Závěr	92
5	Přílohy	94
6	Seznam literatury	96

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1 Hydratace vrstvičky kyseliny hyaluronové (převzato a upraveno z [2]).....	17
Obrázek 2 Primární struktura kyseliny hyaluronové (převzato a upraveno z [4]).....	19
Obrázek 3 Interakce podílející se na vzniku sekundární struktury (převzato a upraveno z [4])	19
Obrázek 4 Základní stavební složky glykosaminoglykanů (převzato a upraveno z [17]).....	20
Obrázek 5 Chemická konjugace a zesíťování kyseliny hyaluronové (převzato a upraveno z [4])	27
Obrázek 6 Nativní, konjugovaná a zesíťovaná kyselina hyaluronová (převzato a upraveno z [4])	27
Obrázek 7 AlphaScreen [®] metoda pro analýzu kyseliny hyaluronové (převzato a upraveno z [188]).....	38
Obrázek 8 Hmotnostní spektrum disacharidu připraveného z uhlíkem ¹³ C značené kyseliny hyaluronové (převzato z [60]).....	45
Obrázek 9 Tvary píků vybraných oligomerů kyseliny hyaluronové po extrakci různými extrakčními metodami	59
Obrázek 10 Vliv pH mobilní fáze na separaci hexadekameru kyseliny hyaluronové	64
Obrázek 11 Vliv koncentrace octanu amonného v mobilní fázi na separaci dekameru kyseliny hyaluronové	66
Obrázek 12 Vliv počtu nástřiků na separaci hexadekameru kyseliny hyaluronové	87
Obrázek 13 Vliv promytí na separaci eikosameru kyseliny hyaluronové	89
Obrázek 14 Vliv promytí na separaci hexadekameru kyseliny hyaluronové	89
Obrázek 15 Vliv promytí na separaci dodekameru kyseliny hyaluronové	90
Obrázek 16 Vliv promytí na separaci dekameru kyseliny hyaluronové	90
Obrázek 17 Vliv promytí na separaci oktameru kyseliny hyaluronové.....	91

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Extrakce na pevné fázi	46
Tabulka 2 Extrakce kapalina-kapalina I	46
Tabulka 3 Extrakce kapalina-kapalina II	47
Tabulka 4 Extrakce kapalina-kapalina III	47
Tabulka 5 Příprava standardů pro sestrojení kalibrační řady I	51
Tabulka 6 Příprava standardů pro sestrojení kalibrační řady II	51
Tabulka 7 Pravděpodobnosti monoisotopické hmotnosti	55
Tabulka 8 Poměry monoisotopických hmotností a náboje	55
Tabulka 9 Gradientová eluce	56
Tabulka 10 Optimalizace detekce vybraných oligomerů hyaluronanu hmotnostním spektrometrem	57
Tabulka 11 Hodnoty korelačních koeficientů kalibračních křivek vybraných nenasycených oligomerů kyseliny hyaluronové	67
Tabulka 12 Správnost metody stanovení nenasyceného oktameru kyseliny hyaluronové	68
Tabulka 13 Správnost metody stanovení nenasyceného hexadekameru kyseliny hyaluronové	69
Tabulka 14 Přesnost metody pro stanovení nenasyceného oktameru kyseliny hyaluronové ...	70
Tabulka 15 Přesnost metody pro stanovení nenasyceného hexadekameru kyseliny hyaluronové	71
Tabulka 16 Výpočetní parametry z kalibračních křivek nativních oligomerů	73
Tabulka 17 Hladiny vybraných uhlíkem ¹³ C značených oligomerů hyaluronanu v obsahu jednotlivých částí trávicího traktu myši po podání uhlíkem ¹³ C značené kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 15 a 1562 kDa	94
Tabulka 18 Procentuální množství vybraných uhlíkem ¹³ C značených oligomerů hyaluronanu v obsahu jednotlivých částí trávicího traktu myši po podání uhlíkem ¹³ C značené kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 15 a 1562 kDa	95

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Porovnání intenzity vybraných analytů extrahovaných různými extrakčními metodami	58
Graf 2 Vliv matrice na výtěžnost extrakce methanolem.....	60
Graf 3 Vliv množství matrice na výtěžnost extrakce methanolem.....	61
Graf 4 Vliv pH na výtěžnost extrakce methanolem.....	62
Graf 5 Vliv pH na retenční čas oligomerů kyseliny hyaluronové	63
Graf 6 Vliv pH na selektivitu oligomerů kyseliny hyaluronové.....	64
Graf 7 Vliv koncentrace octanu amonného v mobilní fázi na retenční čas oligomerů kyseliny hyaluronové	65
Graf 8 Vliv koncentrace octanu amonného v mobilní fázi na selektivitu oligomerů kyseliny hyaluronové	66
Graf 9 Kalibrační křivky stanovení vybraných nenasycených oligomerů kyseliny hyaluronové (1. měření).....	67
Graf 10 Změna hladiny vybraných oligomerů hyaluronanu v obsahu žaludku myši po podání kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 15 kDa	74
Graf 11 Vybrané oligomery hyaluronanu v obsahu žaludku myši po podání kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 15 kDa (procentuální množství dávky).....	75
Graf 12 Změna hladiny vybraných oligomerů hyaluronanu v obsahu žaludku myši po podání kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 1562 kDa	76
Graf 13 Vybrané oligomery hyaluronanu v obsahu žaludku myši po podání kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 1562 kDa (procentuální množství dávky).....	76
Graf 14 Změna hladiny vybraných oligomerů hyaluronanu v obsahu tenkého střeva myši po podání kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 15 kDa	77
Graf 15 Vybrané oligomery hyaluronanu v obsahu tenkého střeva myši po podání kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 15 kDa (procentuální množství dávky).....	78
Graf 16 Změna hladiny vybraných oligomerů hyaluronanu v obsahu tenkého střeva myši po podání kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 1562 kDa	79
Graf 17 Vybrané oligomery hyaluronanu v obsahu tenkého střeva myši po podání kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 1562 kDa (procentuální množství dávky).....	79
Graf 18 Změna hladiny vybraných oligomerů hyaluronanu v obsahu apendixu myši po podání kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 15 kDa	80

Graf 19 Vybrané oligomery hyaluronanu v obsahu apendixu myši po podání kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 15 kDa (procentuální množství dávky).....	81
Graf 20 Změna hladiny vybraných oligomerů hyaluronanu v obsahu apendixu myši po podání kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 1562 kDa	82
Graf 21 Vybrané oligomery hyaluronanu v obsahu apendixu myši po podání kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 1562 kDa (procentuální množství dávky).....	82
Graf 22 Změna hladiny vybraných oligomerů hyaluronanu v obsahu tlustého střeva myši po podání kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 15 kDa	83
Graf 23 Vybrané oligomery hyaluronanu v obsahu tlustého střeva myši po podání kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 15 kDa (procentuální množství dávky).....	84
Graf 24 Změna hladiny vybraných oligomerů hyaluronanu v obsahu tlustého střeva myši po podání kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 1562 kDa	85
Graf 25 Vybrané oligomery hyaluronanu v obsahu tlustého střeva myši po podání kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 1562 kDa (procentuální množství dávky).....	85

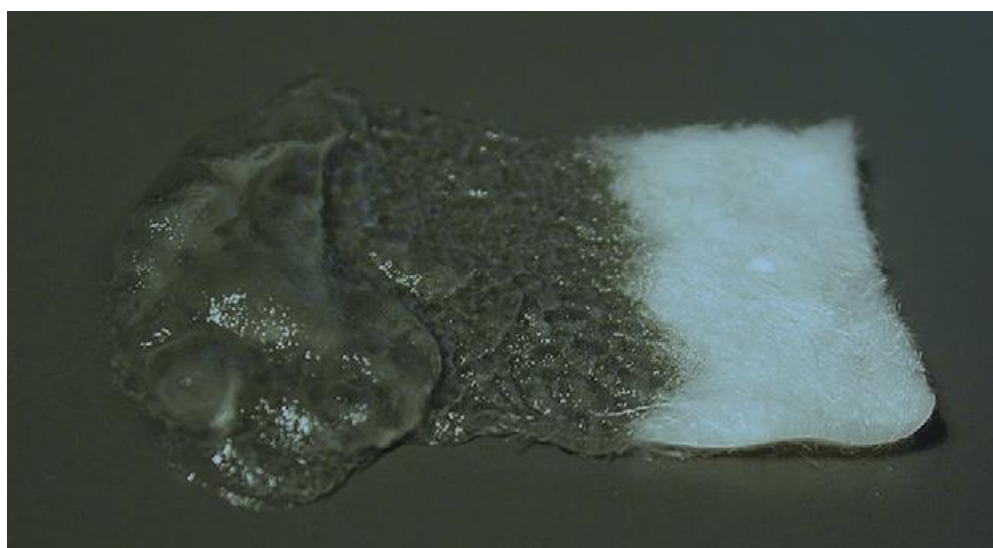
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

Δ HA	nenasycená kyselina hyaluronová/hyaluronan
^{13}C - Δ HA2	uhlíkem ^{13}C značený nenasycený dimer kyseliny hyaluronové
^{13}C -HA	uhlíkem ^{13}C značená kyselina hyaluronová
2-AB	2-aminobenzamid
2-AK	2-aminobenzoová kyselina
9-AA	9-aminoakridin
AMAC	2-aminoakridon
BTH	hyaluronidasa z varlat skotu
CD44	diferenciační skupina (z angl. cluster of differentiation)
CE	kapilární elektroforéza
CTAB	cetrimoniumbromid
CV	variační koeficient
DESI	desorpční ionizace elektrosprejem
DHB	2,5-dihydroxybenzoová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ELISA	imunoanalytická metoda využívající značení protilátky enzymem
ESI	ionizace elektrosprejem
GAG	glykosaminoglykan(y)
GIT	gastrointestinální trakt
GPC	gelová permeační chromatografie
HA	kyselina hyaluronová/hyaluronan
HABP	protein vázající kyselinu hyaluronovou
HAS	hyaluronansynthasa

HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HRP	křenová peroxidasa
HYA	hyaluronidasa
KE	kolizní energie
LC	kapalinová chromatografie
LLE	extrakce kapalina-kapalina
LLOQ	spodní limit kvantifikace
MALDI	desorpční ionizace laserem za účasti matrice
MHCII	hlavní histokompatibilní komplex třídy II
MRM	multiplexní analýza
MS	hmotnostní spektrometrie
oHA	oligomer(y) kyseliny hyaluronové
PBS	fosfátový pufr
PGC	chromatografie na porézním grafitickém uhlíku
PMP	1-fenyl-3-methyl-5pyrazolon
RHAMM	receptor pro hyaluronanem zprostředkovanou motilitu
RONS	reaktivní sloučeniny kyslíku a dusíku
RPLC	kapalinová chromatografie na reverzní fázi
SPE	extrakce na pevné fázi
TLR	toll-like receptor
UPLC	ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV	ultrafialové

0 ÚVOD

Kyselina hyaluronová (HA) je nevětvený nesulfatovaný heteropolysacharid ze skupiny glykosaminoglykanů (GAG). HA je označována také jako mukopolysacharid, jelikož na sebe váže vodu, která dodává tomuto polysacharidu tuhou strukturu podobnou želé [1] (viz obrázek 1 [2]). Přirozeně se vyskytuje zejména v extracelulární matrix tkání savců, např. v kostní dřeni, kloubech či kůži [3]. HA se účastní mnoha klíčových procesů, jako jsou buněčná signalizace, hojení ran, regenerace tkání, morfogeneze, organizace extracelulární matrix a patobiologie. HA má velmi výjimečné fyzikálně-chemické vlastnosti, jako jsou biokompatibilita, biodegradabilita, mukoadhezivita, hygroskopicita či viskoelasticita. Pro své výjimečné vlastnosti a biologické funkce nachází HA široké využití např. ve farmacii, oftalmologii, artrologii, pneumologii, rinologii, estetické medicíně a kosmetice nebo dokonce při léčbě rakoviny [4].



Obrázek 1 Hydratace vrstvičky kyseliny hyaluronové (převzato a upraveno z [2])

V rámci teoretické části následuje krátký náhled do historie pojednávající o HA, bude podrobněji probrána struktura, fyzikálně-chemické vlastnosti, biologické funkce a metabolismus HA. Budou zmíněny také možnosti průmyslové výroby a chemické modifikace. Podstatná část bude věnována širokému využití HA ve zdravotnictví či farmacii a také metodám stanovení HA včetně úpravy vzorku před analýzou. V rámci experimentální části budou popsány všechny prováděné experimenty spojené s vývojem metody stanovení oligomerů HA (oHA) a aplikací této metody v analýze reálných vzorků pro účely studia farmakokinetiky HA. Poté budou prezentovány a diskutovány získané výsledky.

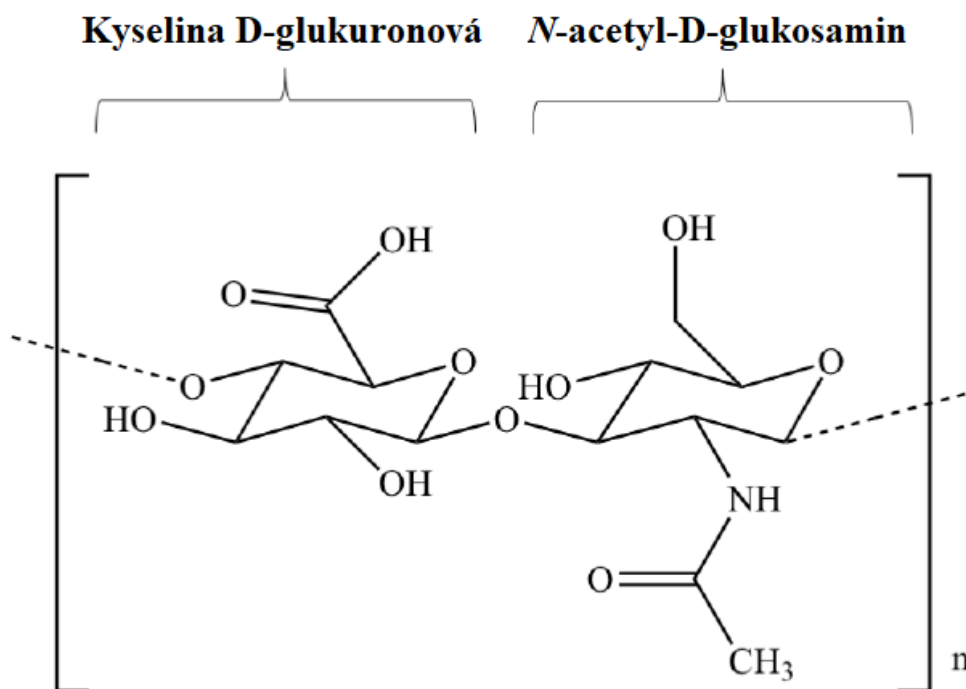
1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Historie kyseliny hyaluronové

První zmínka pochází z roku 1880, kdy francouzský vědec Portes zkoumal mucin z očního sklivce a nazval jej hyalomucinem [5]. Roku 1934 Meyer a Palmer izolovali z očního sklivce skotu nový polysacharid a pojmenovali jej kyselina hyaluronová [1]. Struktura byla popsána roku 1954 Meyerem a Weissmannem [4]. První farmaceuticky čistá HA byla vyrobena v roce 1979 Balazsem extrakcí a purifikací z hřebenů kohoutů a pupečních šňůr lidí [6]. Termín hyaluronan byl poprvé představen roku 1986 Balazsem, neboť HA za fyziologického pH tvoří soli. Se vzrůstajícím poznáním o výjimečných vlastnostech HA stoupal zájem o její výrobu a klinické aplikace [4]. V 70. letech již byly první zmínky o možnosti výroby bakteriální fermentací [5]. Poprvé byla HA aplikována v lidské medicíně v 50. letech v oční chirurgii [1]. První aplikace HA do kloubů byla úspěšně provedena u závodních koní s traumatickou artritidou, od té doby je HA hojně využívána ve veterinární medicíně [7]. Od 70. let je HA využívána k léčbě kloubů při artritidě také u lidí [3]. Od 80. let je HA zkoumána jako materiál a léčivo v očním lékařství [6], při léčbě kloubů [8], kožních onemocnění [9], hojení ran [10] nebo při zvětšení či výplni tkání [11]. HA je také od konce 80. let využívána ve farmakologii jako nosič či doručovatel léků [12]. Velkým pokrokem za několik posledních desetiletí byl zejména vývoj fermentačních technologií či charakterizace enzymů metabolismu HA [5].

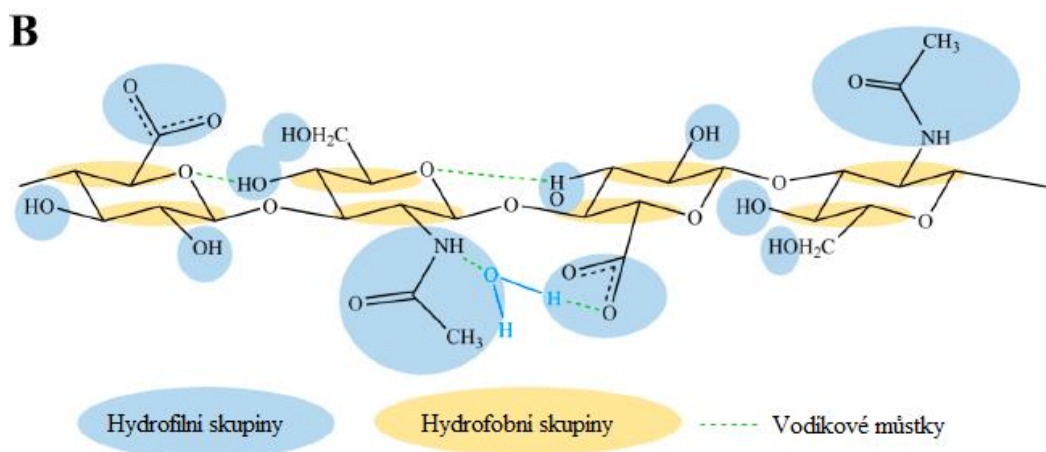
1.2 Struktura kyseliny hyaluronové

Primární strukturu HA tvoří řetězec obsahující opakující se disacharidové jednotky spojené β -1,4-glykosidickými vazbami. Každá disacharidová jednotka HA je tvořena dvěma monomery, *N*-acetyl-D-glukosaminem a D-glukuronovou kyselinou, které jsou spojeny β -1,3-glykosidickými vazbami [1, 4] (viz obrázek 2 [4]). Každý disacharid HA má molekulovou hmotnost 379 Da a měří asi 1 nm [13], polysacharid může obsahovat až 25 000 jednotek disacharidů a dosahovat molekulové hmotnosti 5 kDa až 20 MDa [3].



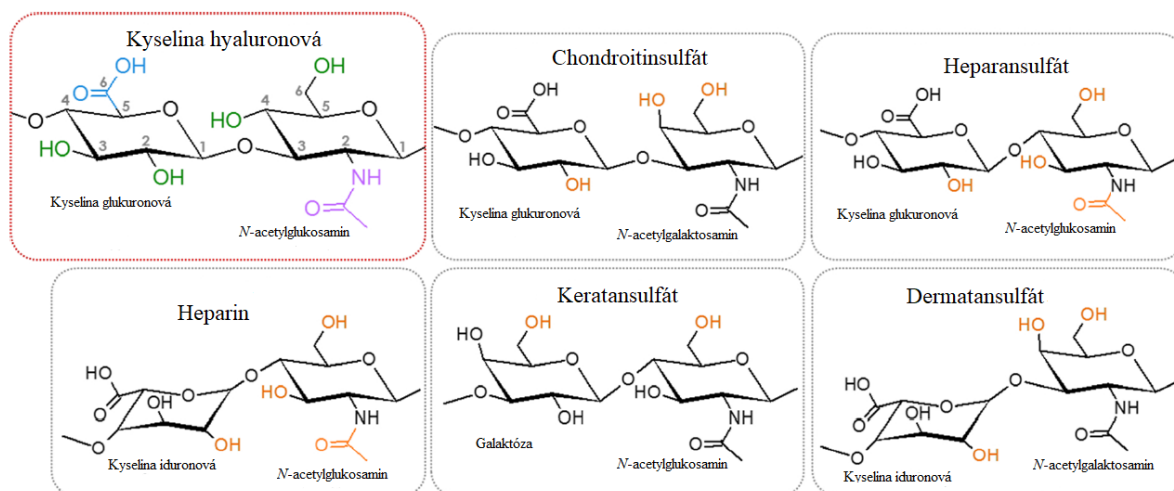
Obrázek 2 Primární struktura kyseliny hyaluronové (převzato a upraveno z [4])

Pokud jsou oba monosacharidy v β -konformaci, je tvořena energeticky velmi stabilní struktura, neboť všechny velké funkční skupiny jsou v ekvatoriální pozici, naopak malé atomy vodíků zaujímají axiální pozici. Volná rotace okolo glykosidické vazby je tedy omezena, což má za následek poměrně tuhou strukturu, která je navíc stabilizována intra- a intermolekulárními vodíkovými můstky [14] (viz obrázek 3 [4]).



Obrázek 3 Interakce podílející se na vzniku sekundární struktury (převzato a upraveno z [4])

Do skupiny GAG patří mimo HA také chondroitinsulfát, dermatansulfát, keratansulfát, heparansulfát a heparin. Všechny tyto GAG mají podobnou strukturu (viz obrázek 4 [15]), avšak HA se od ostatních liší tím, že není sulfatována. Oproti ostatním GAG, jež dosahují maximálně 5×10^4 Da, může molekulová hmotnost HA dosáhnout až 10^8 Da. Syntéza HA probíhá na vnitřní straně cytoplazmatické membrány bez účasti kovalentní vazby proteinů, zatímco ostatní zmíněné GAG jsou syntetizovány enzymy Golgiho komplexu s účastí proteinů [16, 17].



Obrázek 4 Základní stavební složky glykosaminoglykanů (převzato a upraveno z [15])

Barevně zvýrazněné funkční skupiny HA mohou být modifikovány (viz kapitola 1.6), oranžově zvýrazněné funkční skupiny ostatních GAG mohou být sulfatovány.

Při fyziologickém pH má každá karboxylová skupina záporný náboj, který může být balancován kationty, jako jsou Na^+ , K^+ nebo Ca^{2+} a Mg^{2+} za tvorby solí [4]. HA dokáže pojmout až tisícinásobek své hmotnosti ve formě vody [13]. Molekuly vody spojují vodíkovými můstky karboxylovou a acetamidovou skupinu, čímž je stabilizována sekundární struktura HA (levotočivý helix se dvěma disacharidovými jednotkami na otočku) [18]. Ve vodných roztocích tyto helixy (díky hydrofobním interakcím a intermolekulárním vodíkovým můstkům) tvoří duplexy, tedy terciární strukturu, β -skládaný list [14, 19]. Tvorba této struktury závisí na molekulové hmotnosti a koncentraci HA. S rostoucí molekulovou hmotností je terciární struktura silnější, což se projevuje zvýšenou viskozitou a viskoelasticitou [20]. Již 0,1% roztok HA je velmi viskózní [21]. Díky těmto vlastnostem je HA schopna absorbovat nárazy, stabilizovat strukturu kloubů, udržovat rovnováhu vody či ovlivňovat proud tekutin [3].

1.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti kyseliny hyaluronové

Jelikož je HA elektrolyt, jeho vlastnosti jsou ovlivňovány také iontovou silou, pH či teplotou [16, 20]. Vlivem těchto faktorů dochází k oslabení strukturálních interakcí řetězce a ke snížení viskozity [22]. HA je velmi citlivá ke změnám pH, například při pH nižším než 4 nebo vyšším než 11 dochází k degradaci a hydrolýze HA. V alkalickém prostředí je tento efekt ještě výraznější díky narušení vodíkových můstků [23, 24]. Struktura HA a její viskoelastické vlastnosti jsou ovlivňovány také smykovou rychlostí. Při zvýšené smykové rychlosti dochází k deformaci struktury řetězce HA v důsledku narušení vodíkových můstků a hydrofobních interakcí, což se projeví sníženou viskozitou, (proto je také HA označována za pseudoplastickou). Nicméně narušení terciární struktury řetězce HA je reverzibilní a po obnovení původních podmínek dochází také k obnovení původní struktury HA včetně jejích původních vlastností [22, 23, 25]. Jednoprocentní roztok HA ve formě želé se tak dá protlačit malou jehlou, neboť pod tlakem je HA méně viskózní, po protlačení získá HA zpět své původní vlastnosti [13]. Tyto unikátní reologické vlastnosti HA určují mnoho fyziologických procesů a zároveň se jich využívá ve farmaceutických, medicínských, kosmetických či jiných aplikacích [4].

1.4 Biologie kyseliny hyaluronové

HA je v přírodě široce rozšířena, vyskytuje se u lidí, savců a dalších zvířat, u měkkýšů, ale také u bakterií a kvasinek [26–28]. Nevyskytuje se u rostlin, hub, ani hmyzu [29]. V lidském těle se u dospělého člověka vážícího 70 kg vyskytuje asi 15 g HA [30], a to zejména v kloubech, kůži či očích [27]. Asi 50 % HA se vyskytuje v kůži [9]. Velké množství se vyskytuje také v synoviální tekutině, očním sklivci či pupeční šňůře [27]. Koncentrace HA v synoviální tekutině je asi 2-3 mg/ml, zatímco v séru se fyziologické hladiny HA pohybují okolo 30 ng/ml [31]. Obnova HA je poměrně rychlá (5 g/den) a je enzymaticky regulována [30]. HA je důležitá složka extracelulárního či pericelulárního prostoru, některé funkce má však i uvnitř buněk. Účastní se buněčné proliferace, migrace či morfogeneze [3, 4]. Na téma biologických funkcí a využití HA již bylo vypracováno mnoho rešeršních článků [1, 4, 23, 30, 32–37, 37–44], ze kterých je v této části čerpáno, zejména pak z přehledné práce Fallacara a kol. [4].

1.4.1 Syntéza hyaluronanu v lidském těle

V lidském těle se HA syntetizuje za účasti 3 isoenzymů hyaluronansynthasy (HAS) ze třídy glykotransferas. Tyto enzymy katalyzují prodlužování vznikajícího polymeru opakovaným střídavým začleňováním monomerů kyseliny glukuronové a *N*-acetylglukosaminu [3].

Nacházejí se na vnitřní straně plazmatické membrány a vznikající řetězce HA jsou vylučovány skrz membránu na povrch buňky a do mezibuněčného prostoru [45, 46]. HA je syntetizována zejména v synoviocytech typu B [3]. Zmíněné 3 isoenzymy sdílejí 50-71 % sekvence aminokyselin a jejich exprese je řízena růstovými faktory, cytokiny či dalšími proteiny, jako jsou kinasy [30, 45, 47]. Isoenzymy se v mnoha ohledech liší, např. isoenzym HAS1 katalyzuje syntézu HA o řádově menší molekulové hmotnosti ($<2 \times 10^6$ Da), oproti HAS2 ($>2 \times 10^6$ Da), který je více aktivní a je hlavním enzymem syntézy HA [48], poruchy HAS2 na úrovni genu mohou být velmi závažné až letální [43]. HAS3 je nejvíce aktivní a katalyzuje syntézu HA o nejmenší molekulové hmotnosti ($<3 \times 10^5$ Da) [49]. Poruchy regulace exprese HAS mohou vyústit v abnormální produkci HA, což může vést k mnoha patologickým procesům včetně maligní transformace [33].

1.4.2 Odbourávání hyaluronanu v lidském těle

Specifické odbourávání HA v lidském těle zajišťují hyaluronidasy (HYA) ze třídy endoglykosidas. Odbourávání HA však může probíhat i nespecificky, a to prostřednictvím reaktivních sloučenin kyslíku a dusíku (RONS). HYA přednostně katalyzují hydrolýzu HA, nicméně mohou katalyzovat také hydrolýzu chondroitinsulfátu a chondroitinu [50]. HYA náhodně katalyzuje hydrolýzu β -1,4 glykosidické vazby. Rozeznáváme 4 isoenzymy sdílející asi 40 % aminokyselinové sekvence. Exprese HYA je tkáňově specifická. HYA 1 a 2 se hojně nachází v lidských somatických buňkách a pro jejich aktivitu je optimální kyselé pH (≤ 4) [51, 52]. HYA2 se nachází na povrchu buněk, kde katalyzuje hydrolýzu vysokomolekulární HA ($\geq 10^6$ Da), navázanou na receptor CD44, na nízkomolekulární HA (asi 2×10^4 Da), tyto fragmenty jsou transportovány endocytózou do buňky a v lysozomech jsou odbourány za katalýzy HYA1 na tetramery [34]. Poruchy HYA mohou být velmi závažné [43]. Jelikož jsou při různých typech rakoviny zvýšeny hladiny všech HYA, slouží v diagnostice nádorových onemocnění jako tumormarkery [53]. Jak již bylo zmíněno, HA může být degradována prostřednictvím RONS, které jsou produkovány zejména během zánětu, poranění tkáně či karcinogenezi [49, 54]. Oxidační procesy degradující HA mohou zvýšit riziko poranění dýchacích cest, snížit viskozitu kloubní tekutiny s následnou degenerací chrupavky, což vede k ztuhlosti a bolesti kloubů [55, 56].

1.4.3 Mechanismy působení hyaluronanu

HA působí jako strukturální a signální molekula, oba tyto mechanismy se odvíjí od molekulové hmotnosti HA [34]. Vysokomolekulární HA díky svým výjimečným vlastnostem, jako jsou viskoelasticita, hygroskopicitata či schopnost hydratace tkání, slouží jako strukturální molekula

v mezibuněčném prostoru, kde udržuje stabilní prostředí pro buňky, kolagen či elastinová vlákna [17, 30, 35]. Interakcí s proteiny může HA sloužit i jako signální molekula v závislosti na molekulové hmotnosti, lokaci či expresi receptorů. HA může ovlivňovat zánětlivé působení, migraci a dělení či diferenciaci buněk. Molekulová hmotnost HA může ovlivnit její příjem buňkou a zároveň také afinitu receptorů [34]. HA váže proteiny hyaloadheriny (proteoglykany), nacházející se extracelulárně nebo na povrchu buněk jako receptory. Vysokomolekulární HA může interagovat simultánně s více proteoglykany, a to v rámci jedné nebo i více sousedních buněk [34, 49]. Tyto struktury mohou agregovat další extracelulární proteiny za vzniku komplexů, které mohou být napojeny na povrchové receptory buněk. HA tedy funguje jako jakési lešení, které stabilizuje mezibuněčný prostor [49, 57]. Zajišťuje strukturu, funkcionalitu a ochranu zejména pojivových tkání [35].

HA může interagovat s mnoha receptory nacházejícími se na povrchu buněk. Hlavním receptorem pro HA je transmembránový glykoprotein CD44, se kterým interagují mimo HA také růstové faktory, cytokiny, kolageny či jiné proteiny [3, 48, 49]. Interakce HA s CD44 je podstatou mnoha biologických procesů, jako je internalizace či degradace HA, angiogeneze, proliferace, agregace či adheze. CD44 má klíčovou úlohu při zánětu a hojení ran [16, 34, 48, 49], avšak abnormální aktivace HA-CD44 může vést až k patologickému zvýšení exprese CD44 a vývoji rakoviny [34]. Významným receptorem je také RHAMM, který zajišťuje HA zprostředkovanou buněčnou motilitu. Tento receptor se nachází na povrchu buňky, ale i v cytoplazmě a jádře. Interakce HA s RHAMM umožňuje migraci buněk a účastní se buněčného cyklu a na tvorbě a stabilitě mitotického vřeténka, má úlohu při zánětu, obnově tkání, kontroluje makrofágy a fibroblasty [16, 48, 49]. Dalším příkladem je vazba HA na Toll like receptor (TLR), který rozeznává bakteriální struktury a zprostředkovává imunitní odpověď [48]. Nízkomolekulární HA je agonistou TLR, čímž podněcuje zánětlivou reakci [34]. Vysokomolekulární HA tvoří jakousi viskózní vrstvu překrývající povrchové receptory buněk, včetně TLR, a zamezuje tím interakci s ligandy, je tedy možné, že právě odbourávání HA při zánětlivém procesu (v důsledku snížené hodnoty pH a tvorby RONS, případně v přítomnosti patogenů produkujících HYA) odhaluje TLR receptory, které mohou být aktivovány, zprostředkovat imunitní reakci a podpořit zánět [16, 54, 58]. HA se váže i na receptor pro endocytózu, který se účastní vychytávání GAG z cirkulace [48], nebo také na receptor lymfatických váček 1, který kontroluje obrat HA jejím uvolňováním z tkání do lymfy [48, 49].

1.4.4 Vliv molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové na její vlastnosti

Vlastnosti HA jsou značně ovlivňovány její molekulovou hmotností, tedy i tím, zda převažuje její syntéza či odbourávání. Vysokomolekulární HA může vykazovat dokonce opačné účinky oproti nízkomolekulární. Pokud se vyskytují ve stejné tkáni obě varianty HA, bude převažovat účinek více zastoupené varianty [34, 49]. Vysokomolekulární HA působí protizánětlivě, inhibuje chemotaxi, fagocytózu či respirační vzplanutí a řídí hladinu cytokinů, dále ovlivňuje migraci kmenových buněk, váže fibrinogen a podílí se na regeneraci tkání [36, 47, 49], je anti-angiogenní, inhibuje růst endotelových buněk [34, 49]. Díky svým viskoelastickým vlastnostem slouží jako lubrikant v kloubní tekutině, čímž chrání chrupavku [59]. Nízkomolekulární HA vzniká fragmentací vysokomolekulární HA, a to zejména během patologických podmínek, jako je astma, plicní fibróza, hypertenze či revmatoidní artritida. Nízkomolekulární HA působí prozánětlivě, stimuluje produkci prozánětlivých cytokinů, chemokinů či růstových faktorů a podporuje přestavbu buněčné hmoty a také může indukovat nádorové bujení [34, 57, 60, 61]. oHA mohou vykazovat protizánětlivé i prozánětlivé účinky v závislosti na typu buňky a onemocnění. Mohou mírnit zánět prostřednictvím TLR receptorů [62], inhibovat aktivaci kinas prostřednictvím CD44 [63], zpomalovat růst nádorů a podporovat hojení ran [64]. Mohou však působit zánětlivě v synoviálních fibroblastech [4] a stimulovat adhezi buněk [65].

1.4.5 Farmakokinetika kyseliny hyaluronové

Asi 70 % HA v těle je transportováno lymfou do endotelových buněk v lymfatických váčcích lymfatických uzlin, kde je poté HA odbourána. Menší část HA je odbourávána v játrech [60]. Odhadovaný poločas rozpadu HA v kůži je asi 24 hodin, v oku 24-36 h, v chrupavce 1-3 týdny a v tekutině očního sklivce asi 70 dní [27]. Poločas rozpadu HA v krevním oběhu je asi 25 minut a celková denní obměna činí 5 g [30], asi 90 % HA v krvi je eliminováno játry během 24 hodin. HA je také vylučována ledvinami, limitem je molekulová hmotnost do 25 kDa [66]. Při sledování distribuce intravenózně podané a radioaktivně značené HA (10, 100 a 450 kDa) se po 5 minutách 50-54 % HA o molekulové hmotnosti 10 kDa a 100 kDa nacházelo v játrech, zatímco HA o molekulové hmotnosti 450 kDa až 80 %. Podstatná část nízkomolekulární frakce byla vylučována ledvinami. Je zřejmé, že molekulová hmotnost HA má značný vliv na způsob vylučování z organismu [67]. V další studii byly myším intravenózně podávány vysoké dávky HA (25-50 mg/kg) o různých molekulových hmotnostech (13,6, 46, 138, 370 a 1562 kDa). Devadesát devět % podané HA bylo vyloučeno během 48 hodin. Nízkomolekulární HA byla v porovnání s vysokomolekulární vyloučena rychleji ve formě

malých fragmentů močí. Všechny molekuly HA o různé velikosti byly játry metabolizovány podobně [68].

1.4.6 Absorpce kyseliny hyaluronové při orálním podání

Orálně podaná HA je v trávicím traktu (v závislosti na své koncentraci, molekulové hmotnosti a pH prostředí) hydrolyzována nebo dezintegrována [24, 69]. HA interaguje s receptory CD44 a TLR4 receptory, které kromě signálních funkcí, plní také funkci absorpce HA epitelem trávicího traktu (TLR4) nebo jinými tkáněmi (CD44) [70]. Vysokomolekulární HA je absorbována enterocyty, M buňkami, dendritickými buňkami či makrofágy endocytózou, po předchozí vazbě na TLR4 receptor [42, 69]. M buňky přenáší intaktní vysokomolekulární HA do lymfatických tkání střev [71], zatímco při absorpci enterocyty je HA hydrolyzována v lysosomech a následně prezentována na povrchu paměťových T lymfocytů glykoproteiny MHCII [72]. Na hydrolýze HA se podílí také střevní mikroflóra produkující HYA. Částečně depolymerizovaná HA je absorbována zejména ve slepém střevě, kterým se dostává do krevního oběhu, zatímco málo depolymerizovaná a vysokomolekulární HA jsou vstřebávány zejména střevními lymfatickými tkáněmi a následně uvolňovány do krevního oběhu [44, 73]. Bylo prokázáno, že intaktní vysokomolekulární HA se dostává do pojivových tkání a kůže již po 4 hodinách od podání [74]. Byl prokázán pozitivní účinek orálně podávané vysokomolekulární HA k prevenci suché kůže či stárnutí pokožky v důsledku ultrafialového (UV) záření [75], k úlevě bolesti kolene, zmírnění synoviálního zánětu a zvýšení síly v oblasti kolene [42]. HA se podílí také na rovnováze střevní mikroflóry. Orálně podávaná HA má potenciál podporovat růst bakterií mléčného kvašení, a tím pozitivně ovlivňovat poměr mezi gram-pozitivní a gram-negativní mikroflórou [76, 77]. Rozkladem β -glykanů je navíc střevní mikroflóra schopna tvořit vitamín B12, vitamín K či mastné kyseliny s krátkým řetězcem [78]. Bylo zjištěno, že nanočástice zesíťované HA do kulatého tvaru se vstřebávají intaktní, zejména procesem endocytózy [79], naopak volná HA je více náchylná k hydrolýze a biotransformaci střevní mikroflórou [69]. Jelikož orálně podávaná HA slouží kromě regenerace a obnovy pojivových tkání také jako výživa pro střevní mikroflóru, je vhodné formy orálně podávané HA kombinovat [69]. Vstřebávání nanočástic HA ovlivňuje jejich velikost a tvar, zeta potenciál [80], ale také molekulová hmotnost, čistota, chemická stabilita nebo také pH prostředí [81]. Bylo zjištěno, že buňky přednostně přijímají nanočástice HA kulatého tvaru, menší než 400 nm v průměru, a s mírně negativním zeta potenciálem (-10 až -20 mV) [82].

1.5 Průmyslová výroba kyseliny hyaluronové

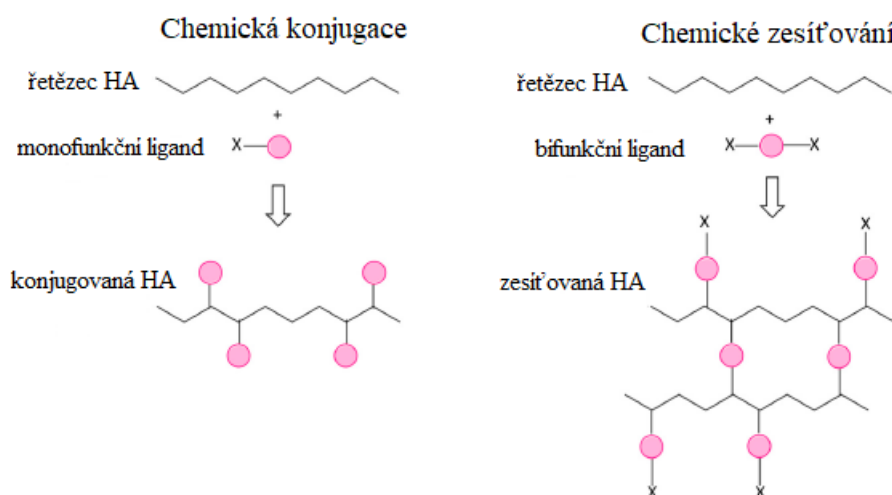
Díky výjimečným vlastnostem HA, jako jsou biokompatibilita, biodegradabilita, hygroscopicita či viskoelasticita, roste poptávka po HA a také její využití ve farmaceutickém, medicínském, potravinářském i kosmetickém odvětví. Proto je také stále větší zájem optimalizovat výrobu. Cílem je výroba kvalitní vysokomolekulární HA s vysokými výtěžky a nízkými výrobními náklady [83, 84]. Jak již bylo zmíněno, dříve byla HA produkována extrakcí ze živočichů, například z kohoutích hřebenů, tato produkce však poskytovala velmi malé výtěžky a produkováná HA mohla být částečně degradována nebo kontaminována proteiny, nukleovými kyselinami či viry, což vyžadovalo velmi nákladnou purifikaci [16, 26, 83].

Dnes je již HA vyráběna výhradně mikrobiální fermentací. Takto vyrobená HA je biokompatibilní [5, 26]. Prvními využívanými bakteriemi byly streptokoky A a C, dnes je využívána zejména bakterie *Streptococcus equi*. Optimální podmínky pro výrobu vysokomolekulární HA s výtěžkem 6-7 g/l [5] jsou teplota 37 °C, pH 7, přítomnost laktosy a sacharosy [84, 85]. Většina mikroorganismů produkujících HA jsou patogeny, byly však vyvinuty rekombinantní nepatogenní mikroorganismy, které produkují čistou HA bez přítomnosti toxinů [16, 26], např. druhy *Lactococcus lactis* [86], *Bacillus subtilis* [87] či *Escherichia coli* [88]. Nicméně žádný z těchto rekombinantních mikroorganismů nevykazoval tak vysoké výtěžky jako přírodní patogenní producenti HA. Monodisperzní HA (o definované molekulové hmotnosti) je možno připravit také chemoenzymatickou syntézou [89] nebo kontrolovanou kyselou, alkalickou, ultrasonickou či tepelnou degradací vysokomolekulární HA [90].

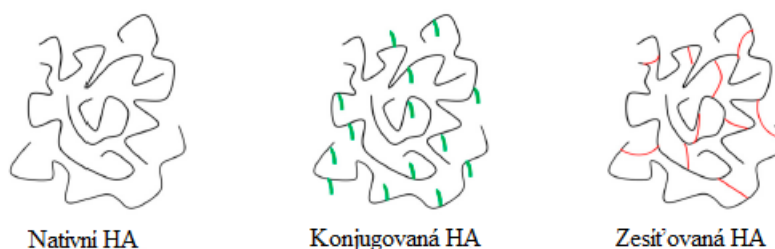
1.6 Modifikace kyseliny hyaluronové

Jak již bylo zmíněno, HA má pro své unikátní vlastnosti široké využití. Chemické modifikace HA umožňují ještě širší využití nebo vylepšení jejích vlastností (např. delší poločas rozpadu). Modifikace by však měly být takové, aby modifikovaná HA neztratila své unikátní vlastnosti [16]. HA může být modifikována na karboxylové skupině kyseliny D-glukuronové, hydroxylové skupině (pravděpodobně primární alkohol *N*-acetyl-D-glukosaminu) či na aminoskupině po deacetylaci *N*-acetyl-D-glukosaminu. Tyto funkční skupiny mohou být modifikovány konjugací (modifikace molekulou s jednou funkční skupinou za vzniku jedné kovalentní vazby) nebo zesíťováním (modifikace molekulou s více funkčními skupinami za vzniku více kovalentních vazeb) [39] (viz obrázek 5 a 6 [4]). Zesíťovaná HA může být připravena také přímým zesíťováním nativní HA. Zesíťováním HA se zlepši její mechanické a reologické vlastnosti, prodlouží poločas rozpadu a tím i účinek. Konjugací léků s HA je možno

významně zlepšit jejich distribuci. Dnešním trendem jsou modifikace HA za účelem přípravy derivátů s lepšími vlastnostmi a jejich aplikace v lékařství, estetice či bioinženýrství [16, 39, 91–94]. Modifikace jsou prováděny zejména ve vodné fázi [95], v případě použití organických rozpouštědel je nutná purifikace [39], možné je také využít reakcí na pevné fázi bez použití rozpouštědel [96].



Obrázek 5 Chemická konjugace a zesíťování kyseliny hyaluronové (převzato a upraveno z [4])



Obrázek 6 Nativní, konjugovaná a zesíťovaná kyselina hyaluronová (převzato a upraveno z [4])

Hydroxylové skupiny HA mohou být modifikovány např. butandioldiglycidyletherem ve vodném alkalickém prostředí za vzniku derivátu, který je odbourán na netoxické fragmenty. Modifikací hydroxylových skupin HA mohou být připraveny také hemiacetaly, estery či karbamáty [4, 39].

Karboxylové skupiny HA mohou být esterifikovány či amidovány. Esterifikací karboxylových skupin (např. alkylhalogenidy) se stává HA méně hydrofilní, tedy méně rozpustná ve vodě, čímž je také snížena náchylnost k hydrolýze HYA a ve výsledku prodloužen poločas rozpadu modifikované HA [4, 16, 39]. Příkladem amidace může být modifikace a následné zesíťování

HA močovinou za vzniku velmi hydrofilního derivátu HA, který je již využíván v oční či estetické medicíně [91, 92].

Modifikace *N*-acetylových skupin HA je využívána zřídka, neboť modifikaci (amidace) předchází deacetylace, která indukuje fragmentaci HA [4]. Tato poměrně silná strukturální modifikace by mohla značně změnit unikátní vlastnosti HA, byla např. prokázána snížená interakce s CD44 [97].

1.6.1 Nenasycená kyselina hyaluronová

Přítomnost dvojné vazby mezi uhlíky v molekule kyseliny hyaluronové (Δ HA) jí dodává zvláštní vlastnosti bez ztráty jejích původních vlastností [98]. Zatím je známo jen několik postupů pro zavedení dvojné vazby do molekuly HA. Jednou z nich je využití lyas, které katalyzují vznik dvojné vazby na neredukujícím konci řetězce. Hyaluronanlyasy katalyzují hydrolýzu HA za vzniku nenasyceného dimeru HA (Δ HA₂), přirozeně tento enzym produkuje např. *Streptococcus pneumoniae* a další mikroorganismy. V tomto případě stupeň modifikace silně závisí na molekulové hmotnosti, modifikace vysokomolekulární HA tímto způsobem je zanedbatelná [99]. Další způsobem přípravy Δ HA je zavedení dvojné vazby do pozice 4 a 5 *N*-acetyl-D-glukosaminu náhodně po celé délce řetězce HA, čímž je možno efektivně modifikovat i vysokomolekulární HA. Oxidací HA lze připravit α či β nenasycené aldehydy (vhodné pro konjugaci s aminy) a jejich redukcí vzniká Δ HA [100].

Δ HA vykazuje zvýšenou antioxidační kapacitu v porovnání s HA, což je v biologických systémech poměrně významné, neboť volné radikály a jimi způsobený oxidační stres se podílejí na procesu stárnutí a přispívají k rozvoji onemocnění jako je rakovina, artritida, ateroskleróza, Alzheimerova choroba nebo diabetes [101, 102]. Δ HA navíc vykazuje selektivní cytotoxicitu vůči nádorovým buňkám, na čemž se zřejmě významně podílí zmíněné antioxidační vlastnosti, nicméně přesný mechanismus zatím není znám [98].

1.7 Aplikace kyseliny hyaluronové

Jak již bylo zmíněno, pro své unikátní vlastnosti má HA široké uplatnění například v medicíně, farmaceutickém, potravinářském či kosmetickém průmyslu. Níže jsou popsány konkrétní příklady využití HA nebo jejích derivátů.

1.7.1 Aplikace kyseliny hyaluronové ve farmacii

HA může být využita při vývoji proléčiv, povrchově modifikovaných lipozomů, nanočástic, mikročástic, hydrogelů či jiných nosičů pro dopravu léků. Konjugací léků s HA je možno

vyvinout pro léčivo s lepšími fyzikálně-chemickými vlastnostmi, lepší stabilitou či účinností léků. Nebo naopak účinku léku může být dosaženo až po přerušení vazeb konjugátu a jeho uvolnění. Například HA může být konjugována s antidiabetickými peptidy, jako je exendin-4, tento derivát vykazuje delší poločas rozpadu a výraznější odpověď inzulínu oproti volné formě léku (u myši s diabetem 2. typu) [103]. Pro vyšší účinnost jsou v některých případech konjugáty HA podávány lokálně, například injekční aplikací derivátu subkutánně, intraperitoneálně, do kloubů či tumorů [104]. Mnoho protizánětlivých léků, jako jsou hydrokortison, prednison, prednisolon či dexamethason, bylo konjugováno s HA a zkoumáno při lokální terapii artritidy [4]. Dále byla prokázána lepší rozpustnost a stabilita konjugátu kurkuminu s HA oproti samotnému kurkuminu [105], konjugát navíc vykazuje lepší hojivé účinky [106]. HA může být konjugována s fosfolipidy za vzniku povrchově modifikovaných lipozomů [107–109], které se jeví jako vhodné nosiče léků, díky jejich stabilitě v krevním oběhu, prodlouženému poločasu rozpadu, snížené systémové toxicitě [109], lepší tkáňové permeabilitě a výsledně lepší účinnosti [110, 111]. Povrchově modifikované lipozomy HA by mohly například zlepšit léčbu nádorových onemocnění doxorubicinem [112], gemcitabinem [109] či docetaxelem [107] prostřednictvím specifity HA k CD44 receptorům.

Významné je také využití nanočástic HA, například peptidový konjugát HA může představovat nosič pro dexamethazon při léčbě astma. Dalším příkladem mohou být chitosanové nanočástice obalené v HA, obsahující betamethazonvalerát a vykazující velký potenciál při léčbě atopické dermatitidy [113–115]. Podobným příkladem mohou být sprejem vysušené mikročástice HA obsahující ofloxacin, které jsou mnohem vhodnější a účinnější formou dopravy ofloxacinu do plic jednoduchou inhalací oproti samotnému ofloxacinu [116]. Mikročástice HA naplněné kofeinem, rozptýlené v lecitinovém organogelu představují při dlouhodobém kožním podání potenciální léčivo celulitidy [117]. Významné jsou také hydrogely připravené z lineární HA, které jsou vhodnou formou pro povrchovou aplikaci buněk [118], protizánětlivých léčiv [119], antibiotik [120] či protilátek [121], mají velký potenciál zejména při očních, kloubních či kožních aplikacích [121–123].

1.7.2 Aplikace kyseliny hyaluronové při léčbě rakoviny

Jelikož byla u nádorových buněk rakoviny slinivky, prsu, plic, vaječníků či prostaty prokázána zvýšená exprese receptoru CD44, je HA pro svou vysokou afinitu k tomuto receptoru potenciálně využitelná v léčbě nádorových onemocnění [3]. CD44 se také přímo účastní signálních cest včetně iniciace metastáz. Bylo zjištěno, že lkrátké oHA (s 6-18 monomery) mohou inhibovat CD44 a také podporovat adhezi buněk [65, 124]. oHA mohou svou

kompetitivní vazbou k CD44 také regulovat mnoho tyrosinových kinas či jiných komponent důležitých při progresi rakoviny [125]. HA může sloužit také jako nosič, který donese lék proti rakovině přímo do místa určení, konjugace léku s HA tedy dodává specifitu a selektivitu k nádorovým buňkám [16, 34, 104]. Po internalizaci HA do buňky za účasti receptoru CD44 je léčivo uvolněno přímo uvnitř nádorové buňky. Využití HA značně zlepšuje farmakokinetický profil léčiv, řeší problémy jako je nízká rozpustnost, nízký poločas rozpadu či distribuce léku do zdravých tkání. Výzkumy a klinické studie využívající HA při léčbě nádorových onemocnění přinášejí slibné výsledky [34, 104]. Například nanočástice polykapronolaktonu modifikované HA obalující léčivo naringerin zvyšují jeho příjem nádorovými buňkami *in vitro* a také inhibují růst nádoru *in vivo* u myši s rakovinou plic indukovanou urethanem [126]. Dalším příkladem mohou být chitosanové nanočástice modifikované HA, které dopravují 5-fluoruracil do nádorových buněk se zvýšenou expresí CD44 [127]. V léčbě nádorových onemocnění může být využita také již zmíněná ΔHA [98].

1.7.3 Aplikace kyseliny hyaluronové při hojení ran

HA se podílí na hojení ran a obnově epitelu kůže či mukózy například ovlivněním zánětlivých procesů, granulací, stimulací proliferace fibroblastů, jejich migrací a adhezí v místě poranění, také je stimulována produkce kolagenu [3, 4]. Poraněné místo je nejprve infiltrováno hmotou bohatou na HA, dále je stimulována migrace mesenchymálních a sousedních buněk, které vylučují HYA, HA je odbourávána a nahrazována kolagenem [37, 128]. HA může být povrchově aplikována při léčbě různých podráždění kůže, vředů, popálenin či hojení chirurgických řezů [27, 37]. Také bylo zjištěno, že HA urychluje srážení krve, konkrétně urychluje trombinem indukovanou tvorbu fibrinu. Také je známo, že zvýšené množství HA v cirkulaci může narušit hemostázu zvýšením rizika trombózy [3]. V souvislosti s urychlením a zlepšením hojení byly zkoumány různé deriváty, obvazy, filmy či hydrogely založené na pozitivních účincích HA [129–133].

1.7.4 Aplikace kyseliny hyaluronové v oftalmologii

HA se přirozeně vyskytuje v lidském oku, byla nalezena v očním sklivci, rohovce, slzných žlázách, dokonce i slzách. Roztoky HA jsou nejvíce využívány ke zvlhčování tkání oka, náhradě tekutiny očního sklivce či při chirurgických zákrocích předního oka, jako jsou odstranění šedého zákalu, plastická chirurgie rohovky a mnoho dalších. Díky svým viskoelastickým vlastnostem totiž drží tkáň na svém místě [91, 134, 135]. HA je navíc biokompatibilní a nevyvolává imunitní reakci, je využívána ke zvlhčování očí při syndromu suchého oka, čímž snižuje dráždivost a tření při mrkání a vytváří slzný film zabraňující vazbě

škodlivých látek [16, 39, 135]. Zlepšuje hojení poranění či oděrek rohovky [136]. Také zlepšuje komfort kontaktních čoček [91, 137, 138]. Nové deriváty HA vykazují také lepší biomechanické vlastnosti a delší poločas rozpadu, například močovinou zesíťovaná HA [91].

1.7.5 Aplikace kyseliny hyaluronové v artrologii

HA je hlavním lubrikantem v kloubní tekutině, díky své viskoelasticitě absorbuje mechanické nárazy a značně snižuje tření v kloubním spoji [27, 59]. Poruchy kloubní tekutiny, například v důsledku zánětu, vedou ke snížení obsahu HA a následně k výskytu revmatické artritidy či osteoartritidy. Řešením těchto potíží, doprovodných bolestí kloubů či snížení progresu onemocnění, může být tzv. viskosuplementace, neboli lokální injekční podání vysokomolekulární HA přímo do kloubu [139, 140]. Takto podaná HA však během 14-18 hodin difunduje do okolních tkání krví a posléze je eliminována [3], nicméně tato doba neudává dobu trvání klinického efektu, která je mnohem delší (3-12 měsíců) [141]. Viskosuplementace spočívá v obnovení reologických vlastností synoviální tekutiny, přináší dlouhodobé benefity, neboť terapeutický efekt HA spočívá převážně v indukci syntézy nové vysokomolekulární HA v synoviálních buňkách a stimulaci proliferace chondrocytů, což vede ke snížení degradace kloubní chrupavky, zlepšení mobility a funkce kloubu, a snížení bolesti [3]. Na vzniku osteoartritidy se podílí také oxidační stres, HA má antioxidační vlastnosti a inhibuje produkci radikálu oxidu dusnatého v kloubech [142], zmíněná Δ HA vykazuje ještě vyšší antioxidační vlastnosti [98]. Intraartikulární podání HA je efektivnější než orální či intravenózní podání díky zvýšení lubrikačního potenciálu synoviální tekutiny, také je vyloučen systémový vliv organismu či potenciální vedlejší účinky [3]. Pro zlepšení mechanických vlastností HA a prodloužení poločasu rozpadu je možno využít také zesíťované deriváty HA [139, 140, 143].

1.7.6 Aplikace kyseliny hyaluronové v rinologii a pneumologii

Vysokomolekulární HA se přirozeně nachází v sekretech horních i dolních cest dýchacích, kde působí protizánětlivě a protiangiogeně, podporuje přežívání buněk a mukociliární clearance, podporuje hojení a hydrataci tkání. Vysokomolekulární HA tedy představuje nadějně léčivo onemocnění nosu či plic, jako jsou rýma (alergická i nealergická), astma, cystická fibróza či chronické obstrukční onemocnění plic [40, 144, 145]. Příkladem prodáváných léků s obsahem HA mohou být hydratační nosní spreje, hypertonické roztoky redukující viskozitu sekretu při cystické fibróze [146], či rozprašovač viskózního roztoku HA k léčbě bronchiální hyperreaktivitu [144].

1.7.7 Aplikace kyseliny hyaluronové v urologii

Aplikace HA je zkoumána také v oblasti urologie, předběžné výsledky ukázaly, že HA může snižovat výskyt infekcí močových cest nebo zlehčovat jejich průběh a také chránit sliznici močového měchýře [4, 147]. Pětidenní intrauretrální léčba HA však nevykazovala významné benefity, nicméně výsledky je nutno potvrdit klinickými studiemi, ve kterých bude léčba HA prodloužena nebo budou navýšeny dávky [148].

1.7.8 Aplikace kyseliny hyaluronové v estetické medicíně

Obsah HA v kůži se snižuje se vzrůstajícím věkem, kůže se stává méně hydratovaná, ztrácí elasticitu, což má za následek tvorbu vrásek [35]. Pro své unikátní vlastnosti, jako jsou vysoká hydratační schopnost, viskoelasticita, biokompatibilita či biodegradabilita, nachází HA uplatnění také ve výplni zejména kožních tkání, konkrétně např. vrásek či jizev. Možné komplikace způsobené výplní mohou být zvráceny injekcí HYA. Tkáňové výplně na bázi HA mohou mít účinek 3 až 24 měsíců v závislosti na koncentraci a zesíťování HA. Čím větší koncentrace a zesíťování, tím větší a delší účinek výplně. Výplně kombinující HA a botulotoxin A úspěšně vyplňují i velmi hluboké vrásky [92, 149].

1.7.9 Aplikace kyseliny hyaluronové v kosmetice

HA se v kosmetice využívá nejčastěji ve formě gelů či emulzí k hydrataci pokožky, zvýšení elasticity a celkově k obnově a zachování typického vzhledu mladé pokožky. Hydratační efekt však záleží na molekulové hmotnosti a stabilitě k HYA. Vysokomolekulární HA vytváří film zabraňující vypařování vody z kůže, což vede ke zvlhčení pokožky. Nízkomolekulární HA však může vykazovat opačný efekt a ve vysokých koncentracích dokonce může pokožka dehydratovat [27, 150, 151]. HA je přidávána do opalovacích krémů jako zvlhčovač, ale také jako možná ochrana proti volným radikálům vznikajícím v důsledku UV záření [152, 153].

1.7.10 Orální aplikace kyseliny hyaluronové

Pro své blahodárné účinky na klouby či vzhled pokožky je HA součástí mnoha potravinových doplňků či suplementů nebo je do potravin přidávána přímo [154]. Vysokomolekulární HA byla již v mnoha státech schválena jako bezpečný doplněk stravy s pozitivními účinky na klouby nebo zvlhčení a celkové zlepšení pleti [155]. Účinky orálně podávané nízkomolekulární HA zůstávají nejasné, neboť některé studie popisují prozánětlivé účinky [156], zatímco jiné snížení bolesti kloubů bez zánětu [157].

Mnoha studiemi byl prokázán účinek HA při léčbě kloubů, bolesti kolen, synoviálních zánětů či výpotků, také bylo zaznamenáno zlepšení síly v oblasti kolene [42]. U kulhajících koní byl

dokonce při orálním podání HA prokázán větší účinek oproti intravenóznímu podání [3]. Často jsou zkoumány přípravky obsahující vedle HA směs dalších látek, těmito studiemi však není možné objasnit účinek samotné HA, nýbrž synergický účinek všech látek [158, 159]. Nicméně je prokázán účinek orálně podávané samotné HA na hydrataci kůže u lidí trpících suchostí kůže při podávání 37,5-240 mg denně po dobu 4 a 6 týdnů. Účinky se mohou lišit v závislosti na molekulové hmotnosti a množství podávané HA [44]. V další studii bylo podáváno 200 mg/kg HA (300 kDa a <10 kDa) myším bez srsti po dobu 6 týdnů. U obou skupin byla snížena tloušťka kůže a zlepšena hydratace kůže při vystavení UV záření. Lepší účinek vykazovala HA s molekulovou hmotností <10 kDa, která navíc stimulovala expresi HAS2. Nízkomolekulární HA tedy působí proti stárnutí pokožky v důsledku UV záření více mechanismy [75]. Kombinace orálně podávané HA společně s povrchově či injekčně podávanou HA může být velmi úspěšným nástrojem při kontrole stárnutí pokožky [155].

1.7.11 Aplikace kyseliny hyaluronové při výrobě 3D struktur

HA a její deriváty mohou být použity k tvorbě 3D struktur, tzv. skafoldů. Skafoldy si můžeme představit jako jakési lešení simulující strukturu mezibuněčné matrix *in vivo*. Takto lze kultivovat 3D buněčné kultury *in vitro*. 3D skafoldy HA mohou mít využití také pro regeneraci tkání *in vivo*, například hydrogely HA [160]. Dalším využitím je kultivace buněk, které špatně adherují, kdy 3D kultivace je mnohem efektivnější oproti 2D kultivaci [161]. 3D struktury HA je možno využít také k potažení implantátů a zabránit tak negativní reakci organismu vůči implantátu, příkladem mohou být elektrody v centrálním nervovém systému [162]. Důležitým faktorem je vhodnost materiálu k tisknutí. Pro použití v biomedicině se jeví jako vhodný materiál sekundárně zesíťovaná HA [163].

1.7.12 Využití kyseliny hyaluronové v diagnostice

Hladiny HA v séru jsou zvýšené u několika onemocnění, zejména onemocnění, které provází zánět. Jelikož játra jsou odpovědná za absorpci HA z krevního oběhu, zvýšené hladiny HA v krvi mohou být způsobeny poruchou funkce jater, například při jaterní fibróze či cirhóze [164]. Zvýšené hladiny HA v krvi mohou být také výsledkem produkce vysokého množství HA nádorovými buňkami a jejího uvolnění do krevního oběhu [165]. Hladiny nízkomolekulární HA v séru mohou být využity k odlišení metastatické formy rakoviny prsu [61]. Zvýšené hladiny HA v moči jsou typické pro rakovinu močového měchýře [166]. Analýza degradované HA a zastoupení různě velkých fragmentů by mohlo být užitečné v predikci progresu tumoru [41].

1.8 Možnosti analýzy kyseliny hyaluronové

Jelikož HA se účastní mnoha fyziologických i patologických procesů v závislosti na molekulové hmotnosti, možnost správně a přesně analyzovat obsah a velikost HA výrazně přispívá k pochopení a objasnění těchto procesů. Analýza HA je nepostradatelná při vývoji nových léčiv, studiu farmakokinetiky, navíc umožňuje diagnostikovat některá onemocnění.

HA může být analyzována různými technikami. Vzorky s vysokou koncentrací HA bez přítomnosti kontaminantů (zejména jiných GAG) je možno analyzovat kolorimetrickými metodami, nicméně studium metabolismu a biologické aktivity vyžaduje vysokou citlivost a selektivitu, případně také strukturální informace, proto jsou využívány metody elektroforetické, kapalinové chromatografie (LC) ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS) nebo také metody imunoanalytické. Na téma analýzy HA a dalších GAG bylo vypracováno několik rešeršních článků [31, 167–172], včetně nedávné přehledné práce Šimka a kol. [15], ze které je v této části ve velké míře čerpáno.

1.8.1 Izolace a purifikace kyseliny hyaluronové z biologických vzorků

Jelikož biologické vzorky jsou velmi komplexní a obsahují značné množství proteinů či jiných biopolymerů, je vyžadována poměrně pracná příprava vzorku před vlastní analýzou [173]. Extrakce a purifikace HA je podobná metodám pro izolaci nukleových kyselin, protože HA či jiné GAG jsou polyanionty, stejně jako nukleové kyseliny. Principem je denaturace, odstranění proteinů a separace vodné fáze od organické (chloroform) centrifugací, následuje precipitace ethanolem. Takto byla izolována první farmaceuticky čistá HA z hřebene kohoutů v roce 1979 [31]. Dnešní izolační protokoly zahrnují navíc digesci a odstranění proteinů, enzymů nebo nukleových kyselin, některé zahrnují také odstranění lipidů. Nízkomolekulární látky mohou být odstraněny dialýzou [31]. Příprava vzorku však může zahrnovat i odbourávání nebo derivatizaci HA, případně odstranění nadbytku derivatizačního činidla [173].

Proteiny je možné odstranit enzymatickou hydrolýzou, např. proteinasou K [31], papainem [15] či aktinasou E [174]. Pro odstranění peptidů vzniklých enzymatickou hydrolýzou proteinů je možno využít ultrafiltraci s limitem 10 kDa. Pro odstranění větších partikulí je možno využít membránovou filtraci (filtry s porozitou asi 0,22 μm). Pro separaci HA z izolované frakce GAG je možno využít extrakci na tuhé fázi (SPE) se silným anexem, kdy sulfatované GAG jsou eluovány při vyšší koncentraci soli [174]. Stejnou metodou je možné separovat oHA do molekulové hmotnosti až 100 kDa, kdy HA s delším řetězcem je taktéž eluována při vyšší koncentraci soli [31]. Pro purifikaci oHA lze také využít mikrokrytalickou celulosu [175].

GAG mohou být precipitovány alifatickými amoniiovými solemi s dlouhým hydrofobním řetězcem, např. cetrimoniumbromidem (CTAB) [176]. HA má menší negativní náboj než sulfatované GAG, což umožňuje selektivní precipitaci CTAB komplexů sulfatovaných GAG při nízké iontové síle [177]. CTAB se však nehodí pro analýzu spojenou s MS, neboť by mohl potlačovat tvorbu iontů [15]. Pro purifikaci oHA může být využito také tzv. glykoblodování, při kterém dochází k selektivnímu zachycení oHA na hydrazidové kuličky o vysoké hustotě, v tom samém kroku může být provedeno i fluorescenční značení [178]. Jelikož je HA náchylná k odbourávání hydroxylovými radikály, které se tvoří v přítomnosti stopových množství Fe^{2+} či Cu^+ , je během izolace vhodná přítomnost chelatačního činidla jako je deferoxamin, ne však EDTA [31].

1.8.2 Depolymerizace hyaluronanu pro analytické účely

Jelikož kvantifikace elektroforetickými a chromatografickými metodami je značně limitována molekulovou hmotností, bývá u těchto metod zařazována depolymerizace za využití enzymů nebo kyselin [15, 31]. Pro kvantifikaci HA je vhodná kompletní depolymerizace až na dimery, zatímco částečná depolymerizace může být užitečná pro strukturální analýzy [15].

HA může být hydrolyzována za katalýzy bakteriálních nebo i živočišných HYA. Nejvyužívanější jsou bakteriální lyasy, např. lyasa ze *Streptococcus pneumoniae* katalyzuje hydrolýzu za vzniku nenasycených dimerů HA s kyselinou glukuronovou na neredukujícím konci [179], výhodou je vysoká aktivita tohoto enzymu. HYA ze *Streptomyces hyalurolyticus* jako jediná rozezná HA od ostatních GAG, katalyzuje hydrolýzu β -1,4- i β -1,3-glykosidických vazeb za vzniku nenasycených oHA (o lichém i sudém počtu monomerů) [180], avšak aktivita této HYA je nízká, hydrolýza HA trvá asi 20 hodin [177]. Mezi živočišné HYA patří například HYA z varlat skotu (BTH), která katalyzuje hydrolýzu β -1,4-glykosidické vazby za vzniku nasycených oHA (o sudém počtu monomerů) s kyselinou glukuronovou na neredukujícím konci [181]. HYA z pijavic katalyzují hydrolýzu β -1,3-glykosidické vazby za vzniku nasycených oHA (o sudém počtu monomerů) s *N*-acetylglukasaminem na neredukujícím konci [182]. Kombinací HYA z pijavic s BTH je možno připravit i oHA o lichém počtu monomerů [183]. HA může být hydrolyzována také za katalýzy chondroitinasou AC nebo ABC [174]. HYA však mohou být inhibovány jinými proteiny, polysacharidy, mastnými kyselinami a mnoha dalšími látkami [184], což neplatí pro alkalickou či kyselou hydrolýzu. Z těchto dvou je preferována kyselá hydrolýza, neboť při vyšších koncentracích kyseliny jsou produktem převážně oHA o sudém počtu monomerů [15, 185]. HA může být odbourávána také fyzikálními vlivy, např. teplem, sonikací, UV zářením či rentgenovým zářením [31].

1.8.3 Derivatizace oligomerů hyaluronanu pro analytické účely

Za účelem zlepšení chromatografických vlastností, umožnění UV či fluorescenční detekce nebo také zlepšení MS detekce je možno purifikované oHA derivatizovat [167]. Při některých derivatizačních reakcích oHA, např. s hydroxylovými či karboxylovými skupinami může vznikat směs produktů, produktem by však měl být homogenní derivát. Vhodná je derivatizace na redukujícím konci oHA, například reduktivní aminace 2-aminobenzoovou kyselinou (2-AK), 2-aminobenzamidem (2-AB), 2-aminoakridonem (AMAC) [174] nebo prokainamidem, dalším příkladem je Michaelisova adice 1-fenyl-3-methyl-5-pyrazolonu (PMP) [186]. PMP deriváty silně absorbují UV záření o vlnové délce 245 nm. AMAC deriváty se separují na reverzních fázích, neboť jsou hydrofobní. Pro separaci derivátů 2-AK a 2-AB se využívá jak kapalinová chromatografie na reverzních fázích (RPLC), tak také hydrofilní interakční chromatografie (HILIC), deriváty prokainamidu jsou separovány pouze v módu HILIC [187]. Reduktivní aminace zvyšuje citlivost MS detekce v pozitivním iontovém módu a umožňuje citlivější fluorescenční detekci oHA [15, 188, 189], avšak derivatizace je časově náročná a je spojena s pracnou úpravou vzorků, včetně odstranění přebytku derivatizačního činidla [15, 187].

1.8.4 Kolorimetrické metody v analýze hyaluronanu

První kolorimetrické metody pro kvantifikaci HA byly založeny na specifické detekci *N*-acetylglukosaminu a glukuronové kyseliny, například karbazolová metoda, Elson-Morganova metoda [177], reakce s alciánovou modří [172] nebo metoda oxidace kyselinou jodistou [190]. Tyto metody vyžadují depolymerizaci HA, například hydrolýzou v 80% kyselině sírové při teplotě 60 °C nebo hydrolýzou katalyzovanou HYA. Tyto metody jsou však poměrně málo citlivé i málo specifické a časově náročné. Jiné metody využívají k precipitaci HA CTAB a turbidimetrickou detekci [191], při které však mohou interferovat ostatní GAG a dokonce i škrob [177].

Zmíněné nedostatky předchozích metod slibně řeší kolorimetrická metoda vyvinutá Pepeliaevem a kol. [177]. Metoda je rozdělena do tří kroků. Prvním je separace HA od kontaminujících GAG, mono- a oligomerů frakcionací CTAB. Dalším krokem je hydrolýza HA lyasou izolovanou z bakterie *Streptococcus pneumoniae* na 4,5-nenasycené dimery HA (Δ HA2). Třetím krokem je reakce Δ HA2 s 3-methyl-2-benzothiazolinonhydrazonem, vzniká modře zbarvený produkt. Metoda dosahuje citlivosti 0,3 mg/l a opakovatelné kvantifikace v rozmezí 3-2000 mg/l. Analýza trvá 25-60 minut v závislosti na komplexnosti vzorku. Jedná se tedy o rychlou, spolehlivou a cenově dostupnou metodu pro detekci HA v komplexních

vzorcích, která může být snadno upravena na formát mikrotitračních destiček pro analýzu větších sérií vzorků [177].

1.8.5 Imunoanalytické metody v analýze hyaluronanu

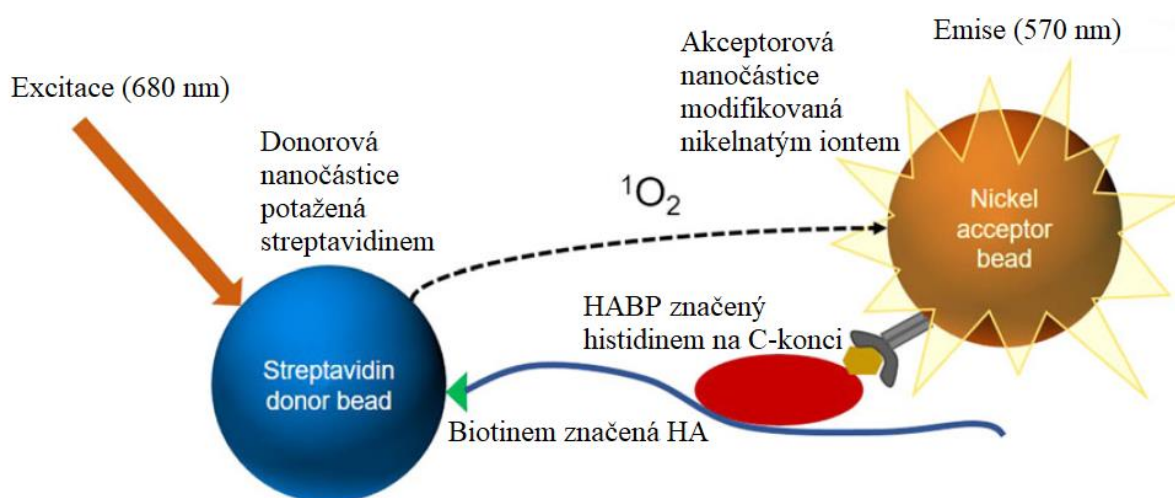
Studium metabolismu HA vyžaduje vysokou citlivost v řádech nanogramů na mililitr. Takovou citlivost může nabídnout modifikovaná imunoanalytická metoda ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Klasická ELISA metoda využívá pro specifickou vazbu k analytu protilátek, avšak HA je biokompatibilní, nevyvolává tedy v organismech tvorbu protilátek proti HA, nelze tedy ani takové protilátky získat [31, 177, 192]. Nicméně místo protilátek mohou být použity jiné proteiny vázající HA s vysokou specifitou, např. agrekan, spojovací protein nebo také hyaluronektin. Jelikož při analýze HA metodou ELISA nejsou využívány protilátky, nazývá se ELISA-like metoda (ELISA podobná metoda) [31, 192]. Před vlastní analýzou lze pro separaci HA podle molekulové hmotnosti využít iontově výměnné kolony [193].

ELISA-like metoda pro analýzu HA má většinou sendvičové uspořádání. Na mikrotitrační destičce je imobilizován protein vázající HA (HABP), konjugovaný s křenovou peroxidasou (HRP), na tento konjugát se váže HA (vzniká tak sendvič). Pro konjugaci je využívána vysoce afinitní a specifická vazba streptavidinu a biotinu [31]. Po promytí se přidá substrát, který je za katalýzy HRP přeměněn na produkt silně absorbující ve viditelné oblasti. Citlivější metody jsou založeny na fluorescenční detekci, HABP je v tomto případě konjugován s fluoroforem [192]. Citlivost ELISA-like metody je vysoká, mez detekce je kolem 0,05 ng HA, metoda není vhodná pro analýzu HA o molekulové hmotnosti menší než 150 kDa [15], což je pravděpodobně způsobeno vazbou krátkých řetězců HA bez formování smyček, které jsou nutné pro dostatečně silnou vazbu [31].

Kompetitivní ELISA-like metody jsou pro detekci HA preferovány více, neboť komplex HABP-HA vzniká mnohem lépe volně v roztoku než na povrchu mikrotitrační destičky. Kompetitivní ELISA-like metodou je možno analyzovat jak vysokomolekulární, tak také nízkomolekulární HA, až po dekamer HA, což je limitní velikost pro vazbu k HABP, nicméně citlivost kompetitivních ELISA-like metod je obvykle nižší než u metod sendvičových, mez detekce kompetitivních metod je asi 1 ng [31].

Zajímavým řešením je kompetitivní metoda AlphaScreen[®] (amplified luminescent proximity homogeneous assay) [194], která využívá dvou typů latexových nanočástic. Prvním typem je částice potažená streptavidinem (donor), tato částice váže biotinem značenou HA. Druhým typem je částice modifikovaná nikelnatým iontem (akceptor), tato částice váže specifický

rekombinantní HA vázající protein (např. HABP nebo agrekan) značený histidinem na jeho C-konci. Po vystavení donorové částice elektromagnetickému záření (680 nm) se tvoří singletový kyslík, který reaguje s akceptorovou nanočásticí modifikovanou nikelnatým iontem a emituje se záření o vlnové délce 570 nm, které je detegováno (viz obrázek 7) [194]. Tato metoda je citlivá, specifická a nezávislá na molekulové hmotnosti HA (dolním limitem je dekamer HA). HA může být kvantifikována v rozmezí 30-1600 ng/ml při spotřebě 2,5 µl vzorku, mez detekce se pohybuje v rozmezí 0,08-4 ng HA. Po odstranění kontaminujících proteinů či lipidů je možno touto metodou analyzovat i komplexní biologické vzorky [194].



Obrázek 7 AlphaScreen® metoda pro analýzu kyseliny hyaluronové (převzato a upraveno z [194])

V současnosti je metoda ELISA-like nejvíce citlivá a specifická metoda pro stanovení hladiny HA, avšak je finančně a časově náročná, samotná analýza trvá několik hodin a vyžaduje zkušené analyticky. Využívá se zejména v medicínských aplikacích pro analýzu HA v biologických vzorcích [177, 192].

1.8.6 Elektroforetické metody v analýze hyaluronanu

Kyselinu hyaluronovou je možné separovat (dle molekulové hmotnosti) klasickou gelovou elektroforézou, při které je však nutno využít standardů HA o definované molekulové hmotnosti (nejlépe monodisperzních). Volba typu a koncentrace gelu se odvíjí od požadavků na separaci. Agarosový gel (0,5%) v EDTA-tris-acetátovém pufru je možno využít pro separaci HA o molekulové hmotnosti 200 až 6000 kDa, zatímco pro separaci HA o velikosti 5 až 500 kDa je využíváno gelů s menšími póry, například koncentrovanější agarosový gel nebo polyakrylamidový gel v EDTA-tris-borátovém pufru. Polyakrylamidové gely jsou komerčně dostupné i v koncentračním gradientu 4 až 20 %. Dle typu gelu je aplikováno

0,5 až 2,5 μg vzorku [31]. Pro detekci separované HA bez přítomnosti kontaminantů je možno využít barviv nebo denzitometrie. Další možností je detekce HA na pozitivně nabitě nylonové membráně a obarvení alciánovou modří. Pro specifickou detekci na nylonové membráně může být využit HABP značený biotinem a následná vizualizace částicemi zlata značenými streptavidinem [195].

Kapilární elektroforéza (CE) je citlivá metoda s vysokým rozlišením a separační účinností a zároveň s krátkým časem analýzy. CE je kompatibilní s UV, fluorescenční i MS detekcí [186]. Analýza může probíhat při normální i obrácené polaritě. Při obrácené polaritě je využito nízkého pH ke snížení elektroosmotického toku, analyt aplikovaný na katodě pak putuje k detektoru na anodě. Jelikož UV detekce neposkytuje dostatečnou citlivost pro analýzu GAG v biologických vzorcích, využívá se detekce fluorescenční nebo MS [186, 188]. Metoda CE s fluorescenční detekcí byla využita pro separaci 17 dimerů různých GAG včetně HA během jednoho běhu trvajícího 60 minut. Purifikované analyty byly depolymerizovány a derivatizovány AMAC, separace probíhala ve fosfátovém pufru. Tato metoda je asi stokrát citlivější než CE s UV detekcí, mez detekce pro HA je asi 0,5 $\text{ng}/\mu\text{l}$ [188]. Podobné separace bylo dosaženo také metodou UPLC-MS [196], CE má však oproti této metodě několik výhod, např. rychlé promytí kapiláry před dalším nástřikem, vysoké rozlišení bez použití iontově párových činidel a velmi nízkou spotřebu vzorku a chemikálií (10-100 nl) [188]. V kapiláře plněné polyakrylamidovým gelem je možné separovat oHA dle molekulové hmotnosti či stupně depolymerizace. Podobně lze v kapiláře plněné 10% ethylenglykolem za použití borátového pufru o pH 8,5 separovat oHA s řetězcem dlouhým až 190 monomerů [186].

1.8.7 Metody kapalinové chromatografie v analýze hyaluronanu

Pro separaci oHA metodou LC mohou být použity různé separační módy, jako jsou RPLC, HILIC, chromatografie na porézním grafitickém uhlíku (PGC) nebo gelová permeační chromatografie (GPC). Detekce může být UV, fluorescenční nebo MS podle požadavků na citlivost či potřebě informace o struktuře [15]. oHA jsou separovány v závislosti na jejich molekulové hmotnosti, případně chemické modifikaci. Také je možnost využití metod vyvinutých pro stanovení ostatních GAG [171].

Separace hydrofilních oHA metodou RPLC je neefektivní, avšak modifikací nepolárních fází nabitými ligandy se značně zlepší retence polárních analytů, takové kolony se pak nazývají vícemodální (mixed-mode). Informace o ligandu, jeho pK_a a stupni iontových interakcí jsou u těchto kolon klíčové. Například pro eluci látek vázaných silnými iontovými interakcemi je

potřeba vysoké koncentrace pufru, která nemusí být kompatibilní s MS. Publikace Kadlecové a kol. porovnává několik vícemodálních kolon a shrnuje pro analytiku důležité informace, které často nejsou výrobcem udávány [197]. Vícemodální kolony XSelect CSH C18 bylo využito pro separaci oHA o sudém i lichém počtu (2-10) monomerů v úspěšném spojení s MS detekcí [183]. Pro efektivní separaci na reverzních fázích je možno využít derivatizace, například AMAC. Konkrétně na koloně C18 byly separovány AMAC deriváty dimerů sedmnácti různých GAG a detekovány metodou MS s limitem detekce HA 0,1 ng [196], stejné meze detekce bylo dosaženo také podobnou metodou Weyerse a kol. [198]. Také je možno do mobilní fáze přidat iontově párové činidlo, například tributylamin, takto byly na C18 koloně separovány i delší oHA (až 40-mer) [199]. Iontově párové činidlo však může způsobovat komplikace, jako jsou iontová suprese nebo tvorba aduktů v komplexních vzorcích [15].

Dále je možno využít PGC, principem je retence analytu na základě hydrofobních interakcí, ale i polárních a iontových interakcí [15]. Metodami PGC je možno separovat dimery až oktamery HA, separace jsou však silně závislé na pH a koncentraci solí. Vyšší oHA jsou na stacionární fázi PGC silně zadržovány [200, 201], nicméně je možná separace dimerů ostatních sulfatovaných i nesulfatovaných GAG a jejich detekce fluorescenčním [202] nebo MS detektorem [203]. Při spojení s ionizací elektrosprejem (ESI) musí být kolona uzemněna, neboť polarizace stacionární fáze vede k úplné retenci oHA [201].

Jelikož jsou oHA hydrofilní, je vhodná pro jejich separaci metoda HILIC. Stacionárními fázemi jsou např. amidem modifikovaný silikát [182], diolem modifikovaný silikát [204] nebo také zwitteriontová stacionární fáze [178]. HILIC metodou byly separovány oHA až po hexadekamer s limitem detekce (metodou ESI-MS) 3,8 µg/ml [204]. Podobně jako metody RPLC, tak také HILIC metody mohou být vícemodální [197]. Metodou kombinující mechanismy HILIC a slabé aniontové interakce byly separovány dimery GAG včetně HA a detekovány metodou ESI-MS, pro eluci analytů je však potřeba vyšší koncentrace pufru (mravenčan amonný) v mobilní fázi oproti klasické HILIC [205, 206].

Pro separaci oHA dle molekulové hmotnosti je možno využít GPC, známé také jako vylučovací chromatografie. Principem této metody je porézní gelové síto, které rozděluje látky podle jejich velikosti, resp. molekulové hmotnosti [207]. Velké molekuly nepronikají hluboko do pórů, jsou tedy eluovány dříve než menší molekuly, které pronikají hlouběji do pórů. GPC ve spojení s detekcí MALLS (multiangle laser light scattering) je široce využívána pro analýzu HA o molekulové hmotnosti 2000-5000 kDa [31]. GPC kolony však musí být kalibrovány nejlépe

monodisperzní HA o známé molekulové hmotnosti. GPC může být spojena také s detekcí ELISA-like metodami a vysokoúčinné GPC kolony jsou kompatibilní i s detekcí MS [168]. Na ultravysokoúčinných GPC kolonách byly separovány oHA až po dodekamer [180].

1.8.8 Hmotnostní spektrometrie v analýze hyaluronanu

Hmotnostní spektrometrie je výkonným nástrojem pro citlivou detekci HA, přímé určení molekulové hmotnosti, určení struktury HA a jejich derivátů a případné odlišení od jiných GAG [15]. Zásadní výhodou MS je schopnost odlišení isotopů uhlíku ^{12}C a ^{13}C či možnost využití uhlíkem ^{13}C značených standardů. MS je tak excelentním nástrojem pro studium farmakokinetiky tělu vlastních látek, jako je HA, neboť spolehlivě odliší exogenní (^{13}C) a endogenní (^{12}C) HA [68]. Vzhledem k polymerní struktuře HA jsou vhodné měkké ionizační techniky jako je ESI nebo ionizace laserem za účasti matrice (MALDI) [15].

Elektrosprejem je HA ionizována především v negativním iontovém módu odštěpením vodíku z karboxylové skupiny, stupeň ionizace je tedy závislý na počtu karboxylových skupin v molekule oHA. Např. dimery a tetramery HA vykazují náboj -1, hexamery až dekamery -2, dodekamery až oktadekamery -3 [199]. Metodou ESI-MS byly jednoznačně identifikovány oHA až po 24-mer. Jelikož mnohonásobně nabitě oHA je v důsledku jejich zvýšené fragmentace těžké rozpoznat [208], využívá se při ESI kromě negativně nabitě sondy (ionizuje oHA) také pozitivně nabitě sondy, například [1,8-bis(dimethylamino)naftalen], který snižuje stupeň ionizace. Spojením popsané ESI s hybridním analyzátozem (kvadrupól-analyzátor doby letu) byly analyzovány oHA až po 41-mer [15, 209]. Další možností snížení náboje mnohonásobně nabitých aniontů oHA je konverze náboje srážkami s mnohonásobně kladně nabitými proteiny [210]. ESI-MS je vhodná pro online spojení jak s UPLC, tak CE, kombinace pozitivní polarity CE a negativní ionizace ESI-MS může poskytovat kompletní informace [186].

V porovnání s technikou ESI-MS, MALDI-MS je více vhodná pro analýzu oHA s delším řetězcem [211], avšak v případě analýzy oHA s delším řetězcem, ve směsi oHA s různou délkou řetězce, může být tvorba iontů oHA s delším řetězcem utlumena přítomností oHA s kratšími řetězci. Pro optimální analýzu je vhodné odstranění nízkomolekulární frakce a získání co největšího podílu oHA s delším řetězcem, za těchto podmínek mohou být identifikovány oHA až do velikosti 41 kDa [15, 212]. Metodou MALDI-MS vznikají monovalentní anionty i u oHA s dlouhým řetězcem (až 34-mer) [208]. Pro ionizaci technikou MALDI je třeba využít matrice, která po ozáření vzorku laserem ionizuje analyt. Pro analýzu

HA je možno využít matric, jako jsou 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (DHB) [213], 6-aza-2-thiothymin [211], 9-aminoakridin (9-AA) [214] nebo také 2,4,6-trihydroxyacetofenon s citronanem amonným [208]. HA je možno ionizovat v pozitivním i negativním módu, v pozitivním módu vznikají zejména adukty oHA s Na^+ či K^+ , zatímco v negativním módu je odštěpen vodík [208]. Zatímco DHB vykazuje stejnou citlivost v obou módech (500 pg), 9-AA vykazuje mnohem lepší citlivost v negativním módu (130 pg) než v pozitivním (5 ng). I přes nižší citlivost nachází DHB v pozitivním módu využití pro analýzu sulfatovaných GAG, a to díky nižší úrovni fragmentace [214].

Využití v analýze oHA nachází také desorpční ionizace elektrosprejem (DESI), která umožňuje šetrnou ionizaci (za atmosférického tlaku), analýzu vzorků *in situ* s minimálními nároky na jejich přípravu a vysokou toleranci k solím [215]. Vhodným desorpčním povrchem pro analýzu HA je hydrofobní materiál, jako je teflon. Tandemovou MS (iontová past-orbitrap) s DESI byla určena sekvence dekameru HA s výbornou citlivostí (10 pg) [216].

Při analýze komplexních vzorků metodou MS je vhodné pro efektivní určení struktury jednotlivé analyty nejprve separovat, např. metodami LC nebo CE. Některé isomery (např. desulfatované oligomery chondroitinu, heparanu a oHA) mají podobné chromatografické vlastnosti, a dokonce i hmotnostní spektra, liší se jen nepatrně, např. unikátním fragmentovým iontem nebo iontovou mobilitou [15]. Příkladem využití iontové mobility pro separaci isomerů HA může být aplikace vysokotlaké vlny nosného plynu na isomerické ionty v analyzátoru doby letu, takto byla separována isomerická směs tetramerů a hexamerů HA [217]. Podobně lze iontové mobility využít i při analýze jinými metodami, např. tandemovou MS s iontovou cyklotronovou rezonancí s Fourierovou transformací. Aplikace vysokonapěťové asymetrické vlny na isomerické ionty umožní jejich separaci [218].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Chemikálie a pomůcky

2.1.1 Chemikálie

- methanol LC-MS čistoty (Fischer Scientific Inc., Hampton, USA)
- acetonitril LC-MS čistoty (Fischer Scientific Inc., Hampton, USA)
- octan amonný LC-MS čistoty (Fischer Scientific Inc., Hampton, USA)
- hydroxid amonný LC-MS čistoty (Fischer Scientific Inc., Hampton, USA)
- kyselina octová LC-MS čistoty (Fischer Scientific Inc., Hampton, USA)
- kyselina mravenčí LC-MS čistoty (Fischer Scientific Inc., Hampton, USA)
- kyselina fosforečná (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)
- sterilní prasečí plazma (Contipro a.s., Dolní Dobrouč, Česká republika)
- demineralizovaná voda
- nasycené oligomery kyseliny hyaluronové: dimer (HA2), tetramer (HA4), hexamer (HA6), oktamer (HA8), dekamer (HA10), dodekamer (HA12), tetradekamer (HA14), hexadekamer (HA16), oktadekamer (HA18) a eikosamer (HA20) (Contipro a.s., Dolní Dobrouč, Česká republika)
- nenasycené oligomery kyseliny hyaluronové: dimer (Δ HA2), tetramer (Δ HA4), hexamer (Δ HA6), oktamer (Δ HA8), dekamer (Δ HA10), dodekamer (Δ HA12), tetradekamer (Δ HA14), hexadekamer (Δ HA16), oktadekamer (Δ HA18) a eikosamer (Δ HA20) (Contipro a.s., Dolní Dobrouč, Česká republika)
- nenasycený dimer kyseliny hyaluronové značený uhlíkem ^{13}C (^{13}C - Δ HA2) (Contipro a.s., Dolní Dobrouč, Česká republika)

2.1.2 Přístroje

- analytické váhy (Mettler Toledo, s.r.o., Praha, Česká republika)
- magnetické míchadlo (2mag AG, Mnichov, Německo)
- pH-metr (XS Instruments, Carpi, Itálie)
- třepačka (Benchmark Scientific, Sayreville, USA)
- třepačka s regulací teploty (N-Biotek, Bucheon, Korea)
- hlubokomrazicí box (-80 °C) (Eppendorf, Hamburk, Německo)
- chlazená odstředivka (Eppendorf, Hamburk, Německo)
- sušička s přívodem dusíku (Fischer Scientific Inc., Hampton, USA)

2.1.3 Sestava UPLC-MS

UPLC systém Waters Acquity, hmotnostní spektrometr Waters Xevo TQ-XS (Waters, Milford, USA)

2.2 Příprava roztoků

2.2.1 Příprava 10× zředěné plazmy

Jeden ml sterilní prasečí plazmy byl naředěn 9 ml demineralizované vody, takto připravená plazma byla důkladně promíchána.

2.2.2 Příprava 10mmol/l octanu amonného, pH 5 (mobilní fáze)

Navážka asi 0,77 g octanu amonného byla rozpuštěna v asi 950 ml demineralizované vody, pH roztoku upraveno koncentrovanou kyselinou octovou na hodnotu 5 a objem roztoku doplněn demineralizovanou vodou do objemu 1 l.

2.2.3 Příprava směsi kyseliny fosforečné a acetonitrilu

K 47,5 ml demineralizované vody bylo přidáno 2,5 ml H₃PO₄ a po důkladném promíchání 450 ml acetonitrilu.

2.2.4 Příprava standardů nasycených oligomerů kyseliny hyaluronové (2-20)

Navážka 1 mg jednotlivého nasyceného oHA (2-20) byla rozpuštěna v 1 ml demineralizované vody.

Smícháním 100 µl jednotlivého zásobního roztoku oHA byl připraven směsný standard nasycených oHA o koncentraci 100 µg/ml.

2.2.5 Příprava standardů nenasyčených oligomerů kyseliny hyaluronové (2-20)

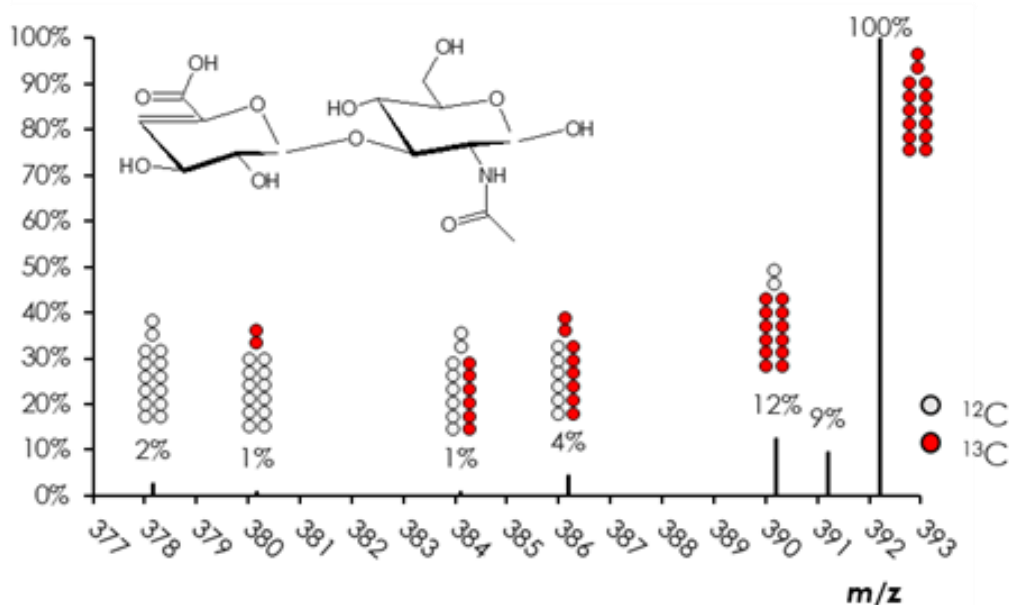
Navážka 1 mg jednotlivého nenasyčeného oHA (2-20) byla rozpuštěna v 1 ml demineralizované vody.

Smícháním 100 µl jednotlivého zásobního roztoku oHA byl připraven směsný standard nenasyčených oHA o koncentraci 100 µg/ml.

2.2.6 Příprava dimeru kyseliny hyaluronové značeného uhlíkem ^{13}C

Vysokomolekulární HA (1562 kDa) značená uhlíkem ^{13}C (^{13}C -HA) byla získána při kultivaci *Streptococcus zooepidemicus* na kultivační půdě s přidanou, uhlíkem ^{13}C značenou, D-glukosou (Cambridge Isotope Laboratories, Tewksbury, USA) v laboratořích Contipro a.s. Isotopická čistota ^{13}C -HA je známa, hmotnostní spektrum (obrázek 8) je převzato z publikace Šimka a kol. [68]. Disacharidové jednotky HA obsahující pouze uhlíky ^{13}C byly dominantní formou monomeru v řetězci isotopicky značené HA (91 % z celkového počtu všech monomerů).

^{13}C - $\Delta\text{HA}2$ byly připraveny enzymatickou hydrolyzou vysokomolekulární ^{13}C -HA, za katalýzy HYA ze *Streptomyces pneumoniae*. K vodnému roztoku vysokomolekulární ^{13}C -HA (1 mg/ml) byl přidán enzym HYA (7500 U/mg), směs byla inkubována přes noc při 37 °C.



Obrázek 8 Hmotnostní spektrum disacharidu připraveného z uhlíkem ^{13}C značené kyseliny hyaluronové (převzato z [68])

2.3 Výběr vhodné extrakční metody

Bylo zvoleno několik potenciálně vhodných metod pro extrakci oHA. U těchto metod byla porovnávána výsledná intenzita a selektivita analytů.

Pro extrakci na pevné fázi (SPE) byly použity následující typy kolon (tabulka 1):

- Oasis HLB (Waters, Milford, USA), objem kolonky 1 ml, 30 mg sorbentu, velikost částic 30 μm
- SepPak (Waters, Milford, USA), objem kolonky 1 ml, 50 mg sorbentu, velikost částic 55-105 μm

Pro extrakci kapalina-kapalina (LLE) byly použity následující rozpouštědla a postupy (uvedené v tabulkách 2, 3, 4):

- methanol
- chloroform
- hydrolýza proteinů za katalýzy aktinasou E následovaná extrakcí směsí chloroformu a methanolu (4:1, v/v)

Tabulka 1 Extrakce na pevné fázi

Oasis SPE	SepPak SPE
1. 1 ml methanolu	1. 1 ml methanolu
2. 1 ml 0,2% kyseliny mravenčí	2. 1 ml 0,2% kyseliny mravenčí
3. 0,1 ml vzorku + 2 μl kyseliny mravenčí	3. 0,1 ml vzorku + 2 μl kyseliny mravenčí
4. 1 ml 0,2% kyseliny mravenčí	4. 1 ml 0,2% kyseliny mravenčí
5. 0,7 ml methanolu	5. 0,7 ml methanolu
6. sušení dusíkem	6. sušení dusíkem
7. rozpuštění odparku v 0,1 ml 10mmol/l octanu amonném pH 5	7. rozpuštění odparku v 0,1 ml 10mmol/l octanu amonném pH 5

Tabulka 2 Extrakce kapalina-kapalina I

Methanol
1. 0,1 ml vzorku
2. 0,4 ml vychlazeného methanolu (při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$)
3. míchání na vortexu 30 min při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$
4. inkubace 2 h při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$
5. odstředění směsi ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $15000 \times g$, 10 min)
6. odebrání supernatantu
7. sušení dusíkem
8. rozpuštění odparku v 0,1 ml 10mmol/l octanu amonného o pH 5

Tabulka 3 Extrakce kapalina-kapalina II

Chloroform
1. 0,1 ml vzorku
2. 0,4 ml chloroformu
3. odstředění směsi (4 °C, 15000 × g, 10 min)
4. odstranění spodní organické vrstvy
5. přidání 0,4 ml methanolu k peletě a vodné vrstvě
6. odstředění směsi (4 °C, 15000 × g, 10 min)
7. odebrání supernatantu
8. sušení dusíkem
9. rozpuštění odparku v 0,1 ml 10mmol/l octanu amonného o pH 5

Tabulka 4 Extrakce kapalina-kapalina III

Aktinasa E/chloroform/methanol
1. 1 ml vzorku
2. 40 µl 1% aktinasy E
3. inkubace 3 h při 45 °C
4. 0,9 ml směsi chloroformu a methanolu (4:1, v/v)
5. odstředění směsi (4 °C, 15000 × g, 10 min)
6. odebrání supernatantu
7. sušení dusíkem
8. rozpuštění odparku v 0,1 ml 10mmol/l octanu amonného o pH 5

Modelový vzorek byl připraven smícháním 2970 µl 10× naředěné prasečí plazmy s 30 µl směsného standardního roztoku nasycených oHA. Výsledná koncentrace nasycených oHA tedy byla 1 µg/ml. Vzorky byly pro každou metodu připraveny v tripletu a analyzovány metodou UPLC-MS.

2.4 Provedení extrakce methanolem

Do zkumavky bylo pipetováno 100 µl vzorku, 10 µl vnitřního standardu (nasycené oHA pro analýzu nenasyčených oHA) a 400 µl vychlazeného methanolu při -80 °C. Zkumavky byly umístěny do vytemperovaného (4 °C) vortexu, obsah třepán po dobu 30 min, následně inkubován po dobu 2 hodin při -80 °C a směs odstředěna (4 °C, 15000 × g, 10 min). Supernatant byl odebrán do čisté zkumavky a rozpouštědlo odpařeno v atmosféře dusíku. Odparek byl rozpuštěn v 100 µl 10mmol/l octanu amonném o pH 5,0. Takto připravený vzorek byl přenesen do vialky a dále analyzován.

2.5 Ověření UPLC-MS metody stanovení oligomerů kyseliny hyaluronové po extrakci methanolem

2.5.1 Vliv matrice na výtěžnost extrakce methanolem

Zkoumanými matricemi byl obsah části gastrointestinálního traktu (GIT) myši:

- žaludek (ST)
- tenké střevo (SI)
- apendix (A)
- tlusté střevo (LI)

Modelový vzorek byl připraven z matric, u kterých již v minulosti nebyla prokázána přítomnost oHA. Ke každé matrici byl přidán směsný standardní roztok nenasyčených oHA. U první poloviny vzorků byl směsný standard (10 µl) přidán před extrakcí a u druhé poloviny vzorků byl přidán po extrakci. Vzorky byly připraveny v tripletu (celkem 24 vzorků) a analyzovány metodou UPLC-MS.

Průměrné hladiny nenasyčených oHA s přidáním standardem před extrakcí byly vztaženy k průměrným hladinám s přidáním standardem po extrakci, čímž byla získána výtěžnost extrakce.

2.5.2 Vliv koncentrace matrice na výtěžnost extrakce methanolem

Jako modelová matrice byla použita sterilní prasečí plazma o různých koncentracích:

- neředěná plazma
- 2× zředěná plazma
- 10× zředěná plazma
- 100× zředěná plazma

K plazmě byl přidán směsný standardní roztok nenasyčených oHA. U první poloviny vzorků byl směsný standard (10 µl) přidán před extrakcí a u druhé poloviny vzorků po extrakci. Vzorky byly připraveny v tripletu (celkem 24 vzorků) a analyzovány metodou UPLC-MS.

Průměrné hladiny nenasyčených oHA s přidáním standardem před extrakcí byly vztaženy k průměrným hladinám s přidáním standardem po extrakci, čímž byla získána výtěžnost extrakce.

2.5.3 Vliv pH na výtěžnost extrakce methanolem

Jako modelová matrice byla použita 10× naředěná sterilní prasečí plazma s upraveným pH:

- 10× zředěná plazma, pH 2,0
- 10× zředěná plazma, pH 5,0
- 10× zředěná plazma, pH 7,0
- 10× zředěná plazma, pH 9,0

Pro úpravu pH na požadovanou hodnotu byl použit roztok kyseliny mravenčí nebo amoniaku. Ke každé matrici o daném pH byl přidán směsný standardní roztok nenasycených oHA. U první poloviny vzorků byl směsný standard (10 µl) přidán před extrakcí a u druhé poloviny vzorků po extrakci. Vzorky byly připraveny v tripletu (celkem 24 vzorků) a analyzovány metodou UPLC-MS.

Průměrné hladiny nenasycených oHA s přidáním standardem před extrakcí byly vztaženy k průměrným hladinám s přidáním standardem po extrakci, čímž byla získána výtěžnost extrakce.

2.5.4 Vliv pH na separaci oligomerů kyseliny hyaluronové

Byly připraveny mobilní fáze s různou hodnotou pH:

- 10mmol/l octan amonný, pH 4,5
- 10mmol/l octan amonný, pH 5,0
- 10mmol/l octan amonný, pH 5,5
- 10mmol/l octan amonný, pH 6,0

Navážka asi 0,77 g octanu amonného byla rozpuštěna v 1 l demineralizované vody a pH upraveno na požadovanou hodnotu kyselinou octovou.

Byl připraven směsný standard nasycených oHA o koncentraci 1 µg/ml. Standard byl analyzován v duplikátu metodou UPLC-MS pro každou mobilní fázi o různém pH. Byl sledován vliv pH na retenci a selektivitu (poměr výšky a plochy píku).

2.5.5 Vliv koncentrace octanu amonného v mobilní fázi na separaci oligomerů kyseliny hyaluronové

Byly připraveny roztoky octanu amonného o třech různých koncentracích a pH 5,0:

- 5mmol/l octan amonný, pH 5,0; navážka asi 0,39 g
- 10mmol/l octan amonný, pH 5,0; navážka asi 0,77 g
- 25mmol/l octan amonný, pH 5,0; navážka asi 1,93 g

Odpovídající navážka octanu amonného byla rozpuštěna v 1 l demineralizované vody a pH upraveno na hodnotu 5,0 kyselinou octovou.

Byl připraven směsný standard nasycených oHA o koncentraci 1 µg/ml. Standard byl v duplikátu analyzován metodou UPLC-MS při použití mobilních fází lišících se v koncentraci octanu amonného. Byl sledován vliv koncentrace octanu amonného v mobilní fázi na retenci a selektivitu (poměr výšky a plochy píku).

2.5.6 Příprava standardních roztoků nenasyčených okta- a hexadekamerů kyseliny hyaluronové pro konstrukci kalibračních křivek

Ze zásobních roztoků Δ HA8 a Δ HA16 o koncentraci 1 mg/ml byly připraveny dva pracovní roztoky. Koncentrace obou oHA v pracovním roztoku (p1) byla 10 µg/ml (490 µl 10× naředěné plazmy, 5 µl zásobního roztoku Δ HA8 a 5 µl zásobního roztoku Δ HA16), v pracovním roztoku (p2) 1 µg/ml (450 µl 10× naředěné plazmy a 50 µl již připraveného roztoku p1).

Ze zásobních roztoků HA8 a HA16 o koncentraci 1 mg/ml byl připraven vnitřní standard o koncentraci obou oHA 10 µg/ml (980 µl vody, 10 µl zásobního roztoku HA8 a 10 µl zásobního roztoku HA16).

Smícháním pracovních roztoků (p1 a p2) s 10× naředěnou plazmou (modelová matrice) byla připravena kalibrační řada (tabulka 5 a 6).

Tabulka 5 Příprava standardů pro sestavení kalibrační řady I

	koncentrace (ng/ml)	10× naředěná plazma (μl)	pracovní roztok p1 (μl)	pracovní roztok p2 (μl)
blank	0	100		0
1	10	99		1
2	25	97,5		2,5
3	50	95		5
4	75	92,5		7,5
5	100	90		10
6	250	75		25
7	500	50		50
8	750	25		75
9	1000	90	10	
10	2500	75	25	
11	5000	50	50	
12	7500	25	75	
13	10000	0	100	

Tabulka 6 Příprava standardů pro sestavení kalibrační řady II

	koncentrace (ng/ml)	10× naředěná plazma (μl)	pracovní roztok p2 (μl)
blank	0	100	0
1	10	99	1
2	25	97,5	2,5
3	50	95	5
4	75	92,5	7,5
5	100	90	10
6	250	75	25
7	500	50	50
8	750	25	75
9	1000	90	100

Ke všem standardům bylo před extrakcí přidáno 10 μl vnitřního standardu (HA8 a HA16) o koncentraci 10 μg/ml. Byla provedena extrakce methanolem následovaná analýzou metodou UPLC-MS. Intenzita píku odpovídající ΔHA8 (ΔHA16) byla vztažena k intenzitě odpovídajícího píku vnitřního standardu HA8 (HA16).

2.5.7 Stanovení hladin nenasycených okta- a hexadekamerů kyseliny hyaluronové v modelových vzorcích

Byly připraveny modelové vzorky obsahující Δ HA8 a Δ HA16 o třech různých koncentracích:

- A (975 μ l 10 \times naředěné plazmy, 25 μ l p2) koncentrace 25 ng/ml
- B (950 μ l 10 \times naředěné plazmy, 50 μ l p2) koncentrace 50 ng/ml
- C (900 μ l 10 \times naředěné plazmy, 100 μ l p2) koncentrace 100 ng/ml

Pro každou koncentraci Δ HA8 (Δ HA16) bylo připraveno pět modelových vzorků. Ke všem modelovým vzorkům bylo před extrakcí přidáno 10 μ l vnitřního standardu HA8 (HA16) o koncentraci 10 μ g/ml. Byla provedena extrakce methanolem a následovaná analýzou metodou UPLC-MS.

Pro každý modelový vzorek byla posuzována míra shody mezi naměřenými hodnotami, tedy přesnost, vyjádřená variačním koeficientem *CV*.

$$CV = \frac{STD}{AVG}$$

kde *STD* je směrodatná odchylka a *AVG* aritmetický průměr.

Koncentrace Δ HA8 (Δ HA16) v modelových vzorcích byly porovnávány s reálnými koncentracemi, čímž byla posuzována správnost. Míra odchylky od reálné koncentrace byla vyjádřena relativní chybou δ .

$$\delta = \frac{(x - \mu)}{\mu}$$

kde *x* je naměřená hodnota a μ je skutečná hodnota.

2.6 Příprava standardních roztoků nenasycených oligomerů kyseliny hyaluronové pro konstrukci kalibračních křivek použitých ke stanovení hladin uhlíkem ¹³C značených nenasycených oligomerů

Ze zásobních roztoků ¹³C-ΔHA2, ΔHA8, ΔHA10, ΔHA12, ΔHA14 a ΔHA16 (uhlíkem ¹³C značené vyšší oHA nebyly k dispozici) o koncentraci 1 mg/ml byly připraveny dva pracovní roztoky. Koncentrace všech zmíněných oHA v pracovním roztoku (p1) byla 10 μg/ml, pracovním roztoku (p2) pak 1 μg/ml.

Ze zásobních roztoků HA2, HA8, HA10, HA12, HA14 a HA16 o koncentraci 1 mg/ml byly připraveny vnitřní standardy o koncentraci 100 μg/ml.

Smícháním pracovních roztoků s 10× naředěnou plazmou (modelová matrice) byly připraveny standardy pro sestavení kalibrační řady (tabulka 5).

Ke všem vzorkům standardů bylo před extrakcí přidáno 10 μl vnitřního standardu o koncentraci 100 μg/ml. Byla provedena extrakce methanolem následovaná analýzou metodou UPLC-MS.

2.7 Stanovení hladin uhlíkem ¹³C značených nenasycených oligomerů hyaluronanu ve vzorcích obsahu gastrointestinálního traktu myši pro účely studia farmakokinetiky kyseliny hyaluronové

Zavedená analytická metoda byla použita k analýze oHA v obsahu střev myši BALB/C, kterým byla perorálně aplikována ¹³C-HA v dávce 50 mg na 1 kg váhy zvířete. Celkem byly analyzovány vzorky třiceti zvířat. Jednalo se o dvě skupiny myši po patnácti zvířatech, přičemž první skupině patnácti myši byla podána HA o molekulové hmotnosti 15 kDa a druhé skupině patnácti myši o molekulové hmotnosti 1562 kDa. Vzorky obsahu střev byly odebírány po 1, 2, 4, 6 a 24 hodinách po aplikaci (v každý čas odběr obsahu střev tří myši).

K naváženým vzorkům obsahu GIT (ze žaludku, tenkého střeva, apendixu a tlustého střeva) byl přidán pufr (100mmol/l PBS + 10mmol/l EDTA, pH 7,4) v takovém množství, aby výsledná koncentrace byla 250 mg obsahu GIT na 1 ml.

Takto připravené vzorky byly homogenizovány na třepačce (4 °C, 2000 × g, 3 min) a poté byl obsah zkumavky odstředěn (4 °C, 15000 × g, 10 min). Zpracování vzorků bylo prováděno při teplotě 4 °C, aby se zamezilo případné degradaci oHA. Takto zpracované vzorky byly připraveny k analýze.

Ke všem vzorkům byl před extrakcí přidán vnitřní standard (HA2, HA8, HA10, HA12, HA14 a HA16) o koncentraci 100 µg/ml. Byla provedena extrakce methanolem následovaná analýzou metodou UPLC-MS.

Poměr intenzity píku HA ve vzorku a vnitřního standardu byl dále zkorigován na isotopickou distribuci nativního oHA. Jelikož nebyla možnost použít uhlíkem ¹³C značené standardy vyšších oHA pro sestavení kalibrační řady, byly použity nativní nenasycené oHA. Vzorec pro výpočet výsledné koncentrace, včetně korekce na isotopickou distribuci nativních oHA, je

$$C_{^{13}C\ oHA} = \frac{\left(\frac{\% \text{ atomů v nativním oHA}}{\% \text{ atomů v } ^{13}C\ oHA} \cdot \text{intenzita píku } ^{13}C\ oHA \right)}{\text{intenzita píku nativního oHA}} \cdot C_{\text{nativního oHA}}$$

kde ¹³C oHA je uhlíkem ¹³C značený nenasycený oHA (analyt), *nativní oHA* je nasycený oHA (vnitřní standard), % atomů v nativním oHA je pravděpodobnost výskytu nativního oHA při 100% zastoupení isotopu ¹²C, % atomů v ¹³C oHA je pravděpodobnost výskytu uhlíkem ¹³C značených oHA při 100% zastoupení isotopu ¹³C, hodnoty % atomů jednotlivých oHA jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7 Pravděpodobnosti monoisotopické hmotnosti

% atomů	ΔHA8	ΔHA10	ΔHA12	ΔHA14	ΔHA16
nativní oHA	48,1 %	39,9 %	33,3 %	27,8 %	23,3 %
¹³ C oHA	51,7 %	44,9 %	39,0 %	33,9 %	29,4 %

Pravděpodobnost výskytu nativních oHA při 100% zastoupení isotopu ¹²C byla zjištěna experimentálně. Pravděpodobnost *P* výskytu uhlíkem ¹³C značených oHA při 100% zastoupení isotopu ¹³C byla získána binomickým rozdělením podle vzorce

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

kde *x* je počet atomů uhlíku ¹²C v molekule (pro tento výpočet 0 ¹²C), *n* je celkový počet atomů uhlíku v molekule, *p* je pravděpodobnost výskytu atomu uhlíku ¹²C (tedy 1 % při isotopické čistotě ¹³C 99 %).

V tabulce 8 je uveden poměr hmotnosti a náboje *m/z* nativních oHA (při 100% zastoupení isotopu uhlíku ¹²C) a také uhlíkem ¹³C značených oHA (při 100% zastoupení isotopu ¹³C).

Tabulka 8 Poměry monoisotopických hmotností a náboje

<i>m/z</i>	ΔHA8	ΔHA10	ΔHA12	ΔHA14	ΔHA16
nativní oHA	757,22	955,78	763,22	889,59	1009,96
¹³ C oHA	785,31	990,89	791,31	922,37	1047,42

¹³C-ΔHA2 byly kvantifikovány bez přepočtu na výše zmíněnou isotopickou distribuci nativního dimeru, neboť ¹³C-ΔHA2 byl přítomen v kalibrační řadě standardů.

Koncentrace jsou uváděny jako μg analytu na g vzorku, vzorec pro přepočet je

$$c \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right) = c \left(\frac{\text{ng}}{\text{ml}} \right) \cdot \frac{c_{\text{VZ}} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)}{1000}$$

Konečným výsledkem je procentuální podíl podávané dávky, vzorec pro přepočet je

$$\% \text{ dávky} = c \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right) \cdot \frac{m_{\text{VZ}}(\text{mg})}{1000 \cdot \text{dávka HA} (\mu\text{g})}$$

2.8 Podmínky UPLC separace

Průtok mobilní fáze kolonou Atlantis Premier BEH C18 AX (Waters, Milford, USA) byl udržován na hodnotě 0,4 ml/min při teplotě 60 °C. Spodní tlakový limit byl 100 psi a horní tlakový limit 18000 psi. Analyty byly separovány při gradientové eluci (tabulka 9). Na kolonu bylo dávkováno 5 µl vzorku.

Tabulka 9 Gradientová eluce

čas (min)	mobilní fáze A (octan amonný, %)	mobilní fáze B (acetonitril, %)
0	95,0	5,0
0,5	95,0	5,0
5,0	40,0	60,0
5,5	40,0	60,0
6,0	40,0	60,0
6,3	95,0	5,0
7,5	95,0	5,0

2.9 Podmínky MS detekce

Oligosacharidy byly monitorovány v MRM módu (multiple reaction monitoring) a podmínky detekce optimalizovány. Napětí na kapiláře bylo 2,5 kV, průtok desolvatačního plynu (N₂) byl 1000 l/h při teplotě 600 °C. Jednotlivé přechody, spolu s optimalizovanými hodnotami napětí na kónusu (*KV*) a kolizní energie (*KE*), jsou uvedeny v tabulce 10.

Tabulka 10 Optimalizace detekce vybraných oligomerů hyaluronanu hmotnostním spektrometrem

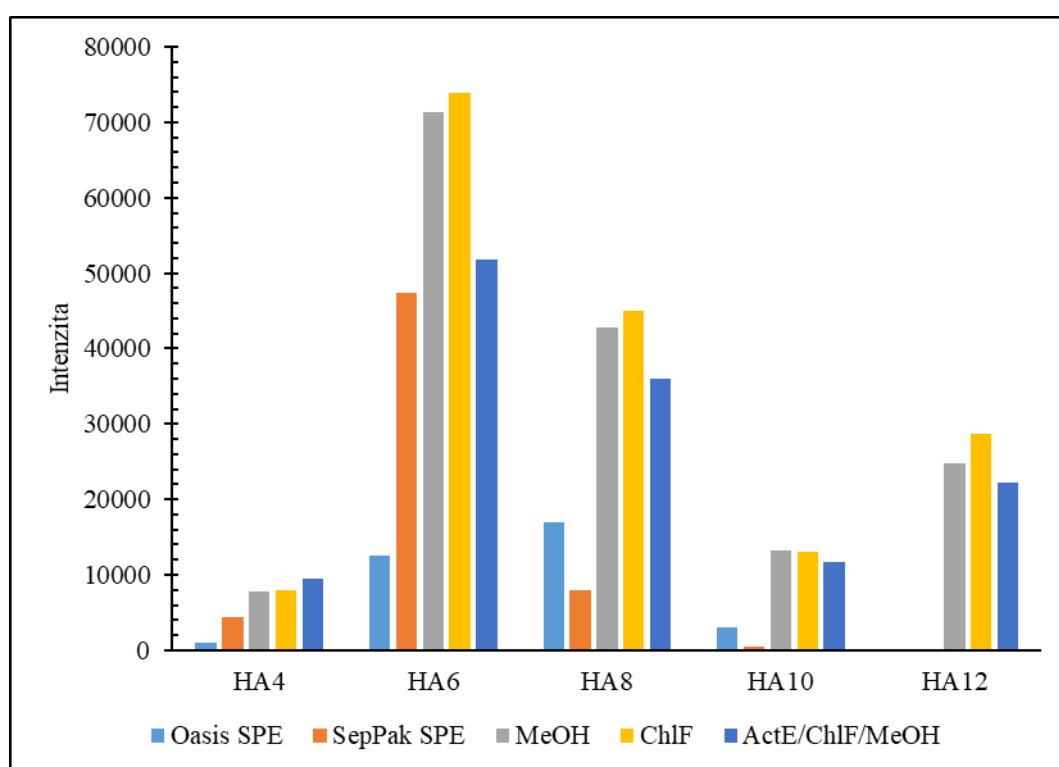
oligomer	isotop	z	m/z	fragment 1 (F1)	fragment 2 (F2)	KE F1, eV	KE F2, eV	KV, V
ΔHA2	¹² C	1-	378,1	175	87	24	10	22
	¹³ C		392,1	181	90	24	10	22
HA2	¹² C	1-	396,2	113	193	26	16	40
	¹³ C		410,2	118	199	26	16	40
ΔHA4	¹² C	1-	757,6	175	554,5	38	28	72
	¹³ C		785,3	181	574	38	28	72
HA4	¹² C	1-	775,2	193	572,1	38	28	72
	¹³ C		803,3	199	594,2	38	28	72
ΔHA6	¹² C	2-	568	175	465,9	30	16	42
	¹³ C		588,7	181	482,6	30	16	42
HA6	¹² C	2-	576,8	193	475,2	30	16	42
	¹³ C		597,7	199	492,7	30	16	42
ΔHA8	¹² C	2-	757,5	175	655,8	40	18	54
	¹³ C		785,3	181	679	40	18	54
HA8	¹² C	2-	766,4	193	664,7	40	18	54
	¹³ C		794,3	199	689,3	40	18	54
ΔHA10	¹² C	2-	946,8	175	844,7	44	26	18
	¹³ C		981,9	181	875,6	44	28	18
HA10	¹² C	2-	956	193	854,4	44	26	18
	¹³ C		990,9	199	885,8	44	26	18
ΔHA12	¹² C	3-	757,5	695,2	175	20	44	38
	¹³ C		785,1	90	181	20	44	38
HA12	¹² C	3-	763,5	695,7	113	20	44	38
	¹³ C		791,3	721,3	118	20	44	38
ΔHA14	¹² C	3-	884,1	175	816,2	38	22	12
	¹³ C		916,2	181	875	38	22	12
HA14	¹² C	3-	889,6	193	821,6	38	22	12
	¹³ C		922,4	199	852,3	38	22	12
ΔHA16	¹² C	3-	1010,6	113	942,7	64	28	38
	¹³ C		1047,2	181	976,5	40	24	26
HA16	¹² C	3-	1016,3	113	948,5	64	28	38
	¹³ C		1053,4	118	983,4	64	28	38
ΔHA18	¹² C	3-	1136,3	175	1068,3	50	28	92
	¹³ C		1178,2	181	1107,5	50	28	92
HA18	¹² C	3-	1142,7	113	1074,9	64	30	66
	¹³ C		1184,5	118	1114,4	64	30	66
ΔHA20	¹² C	3-	1262,7	113	1194,7	68	26	76
	¹³ C		1309,2	118	1238,5	68	26	76
HA20	¹² C	3-	1269,2	113	1201,5	74	32	88
	¹³ C		1315,5	118	1245,5	74	32	88

3 VÝSLEDKY

3.1 Výběr vhodné extrakční metody

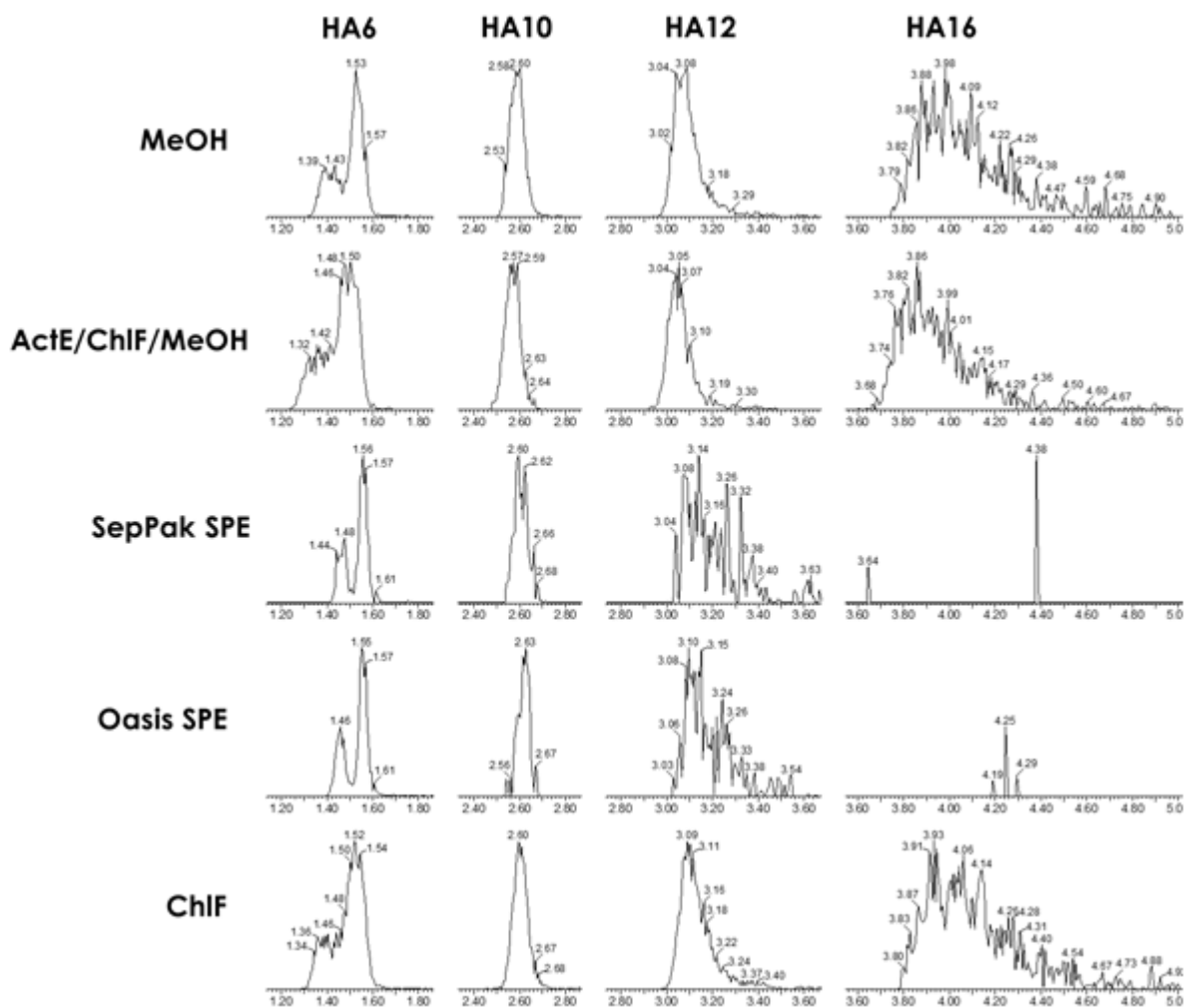
U obou SPE kolonek byla zaznamenána výborná selektivita, ale velmi nízká výtěžnost sledovaných oHA, prakticky žádná pro vyšší oHA. LLE vykazovala naopak výbornou výtěžnost i pro vyšší oHA, ale nízkou selektivitu v porovnání s technikou SPE. Nejlepší selektivitu a výbornou výtěžnost vykazovala extrakce methanolem, proto byla pro úpravu vzorku před vlastní UPLC-MS analýzou zvolena. V grafu 1 jsou zobrazeny naměřené intenzity vybraných analytů extrahovaných různými metodami.

Graf 1 Porovnání intenzity vybraných analytů extrahovaných různými extrakčními metodami



MeOH je extrakce methanolem, ChlF extrakce chloroformem, ActE/ChlF/MeOH je hydrolyza proteinů za katalýzy aktinasou E následovaná extrakcí směsí chloroformu a methanolu (4:1, v/v).

Na obrázku 9 jsou porovnány tvary píků vybraných oHA po extrakci různými extrakčními metodami. Použitá kolona a podmínky separace jsou uvedeny v kapitole 2.8.



Obrázek 9 Tvary piků vybraných oligomerů kyseliny hyaluronové po extrakci různými extrakčními metodami

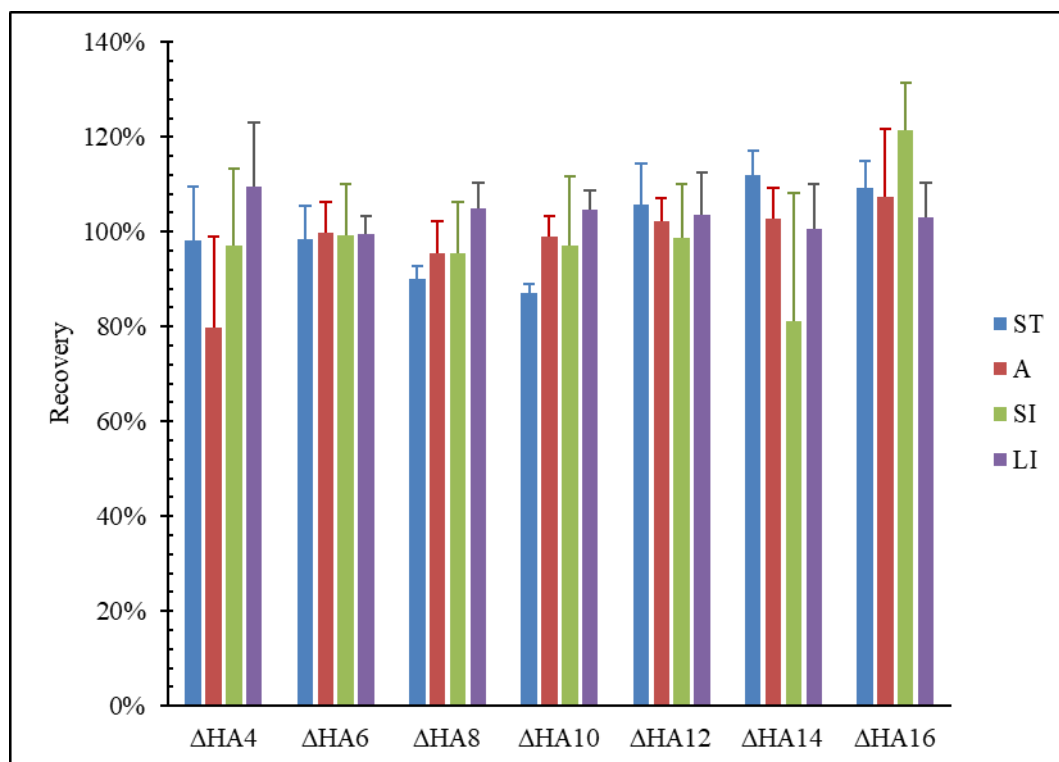
MeOH je extrakce methanolem, ChIF extrakce chloroformem, ActE/ChIF/MeOH je hydrolyza proteinů za katalýzy aktinasou E následovaná extrakcí směsí chloroformu a methanolu (4:1, v/v).

3.2 Ověření účinnosti extrakce methanolem a metody UPLC-MS

3.2.1 Vliv matrice na výtěžnost extrakce methanolem

Z grafu 2 je patrná výborná výtěžnost extrakce oHA methanolem u všech testovaných matric (obsah žaludku, appendixu, tenkého střeva a tlustého střeva myši). Výtěžnost se pohybovala v rozmezí od 95 % do 105 % s minimem 80 % a maximem 122 %.

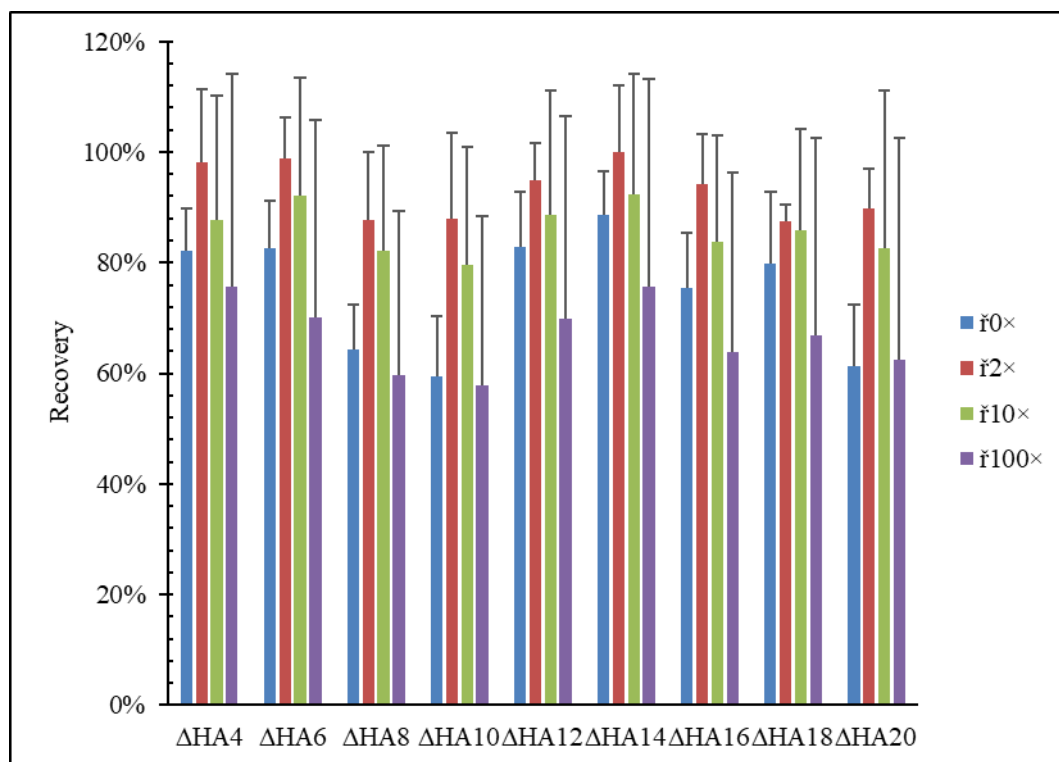
Graf 2 Vliv matrice na výtěžnost extrakce methanolem



3.2.2 Vliv množství matrice na výtěžnost extrakce methanolem

Z grafu 3 je patrná dobrá výtěžnost extrakce oHA methanolem i z neředěné prasečí plazmy. Výtěžnost se pohybovala v rozmezí od 58 % do 100 %. U 100× naředěné plazmy byl zaznamenán velký rozptyl hodnot.

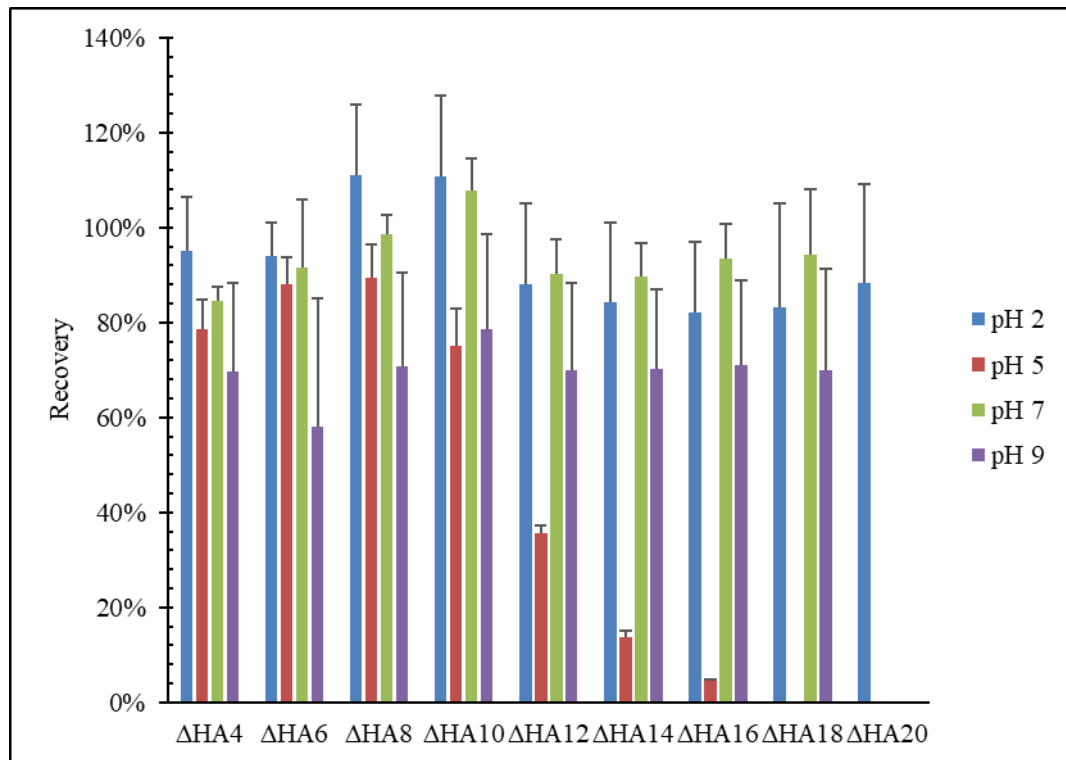
Graf 3 Vliv množství matrice na výtěžnost extrakce methanolem



3.2.3 Vliv pH na výtěžnost extrakce methanolem

Z grafu 4 je patrné, že extrakce oHA methanolem je nejúčinnější při pH 7 a pH 2, při pH 9 je extrakce méně účinná a při pH 5 je výtěžnost extrakce vyšších oHA daleko nejhorší. Možným vysvětlením může být precipitace vyšších oHA při pH 5 a jejich odstranění ze vzorku centrifugací. Výtěžnost se pohybovala v rozmezí od 58 % do 111 %, výjimkou byla extrakce vyšších oHA při pH 5.

Graf 4 Vliv pH na výtěžnost extrakce methanolem

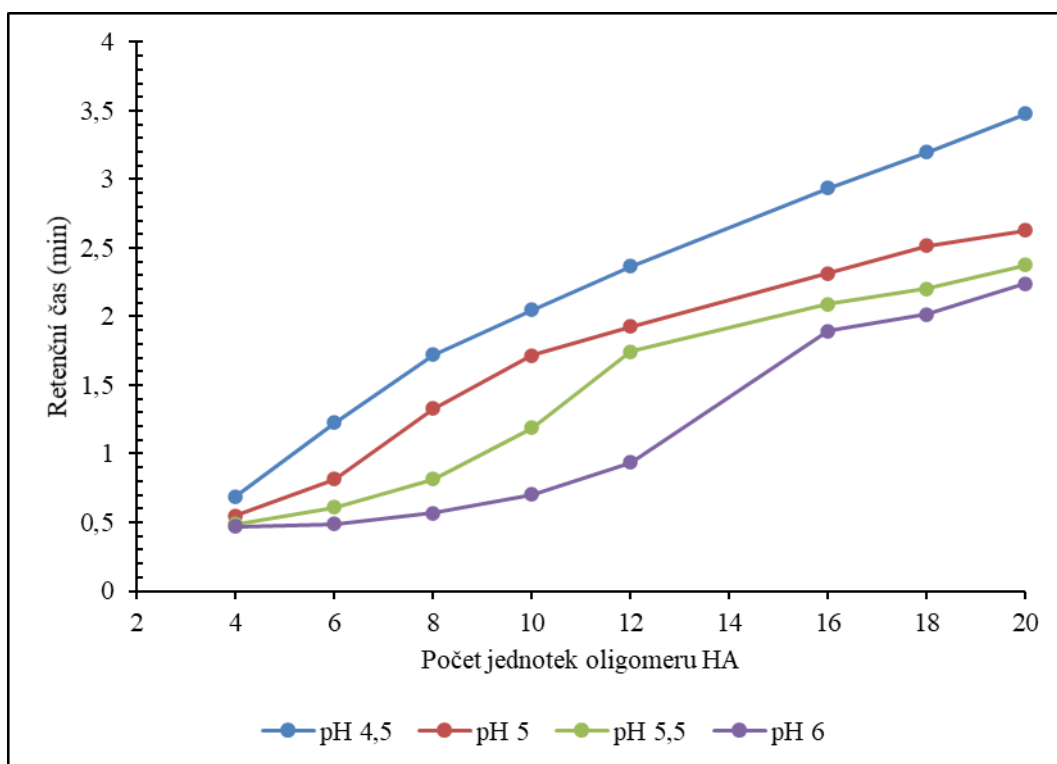


3.2.4 Vliv pH na separaci oligomerů kyseliny hyaluronové

Pro separaci oHA byla použita vícemodální (mixed-mode) kolona Atlantis Premier BEH C18 AX (Waters, Milford, USA). Tato kolona kombinuje reverzní fázi (C18) spolu s aniontově-výměnným módem. Modifikátorem je alkylamin, který je při pH nižším než jeho pKa (10,6) kladně nabitý. Kolona při pH nižším než 7 zadržuje anionty, retence se vzrůstajícím pH pozvolně klesá až do hodnoty pH mezi 7-8, v tomto rozmezí nastává prudký pokles retence aniontů a zároveň vzrůstá retence kationtů [197].

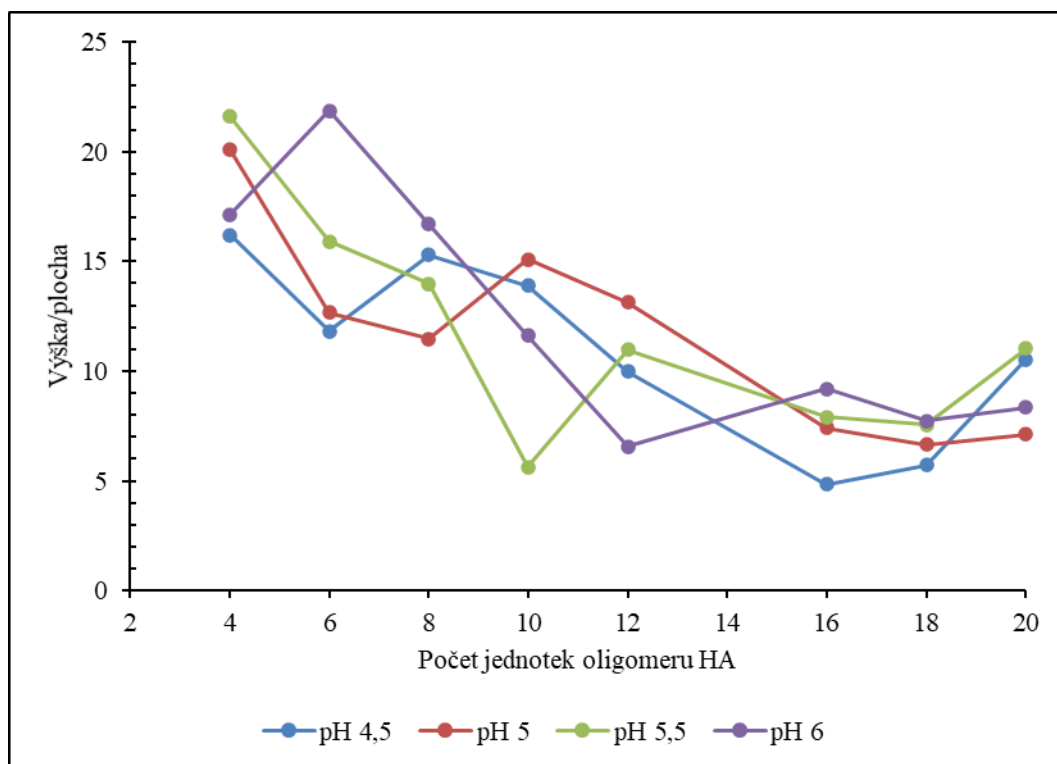
Právě hodnota pH určuje, zda budou molekuly HA ionizovány. Pokud bude pH mobilní fáze vyšší než pKa HA (3-4), budou karboxylové skupiny v molekule HA záporně nabitě, což umožní jejich větší retenci na koloně, a tím i lepší separaci na výše zmíněné vícemodální koloně.

Graf 5 Vliv pH na retenční čas oligomerů kyseliny hyaluronové



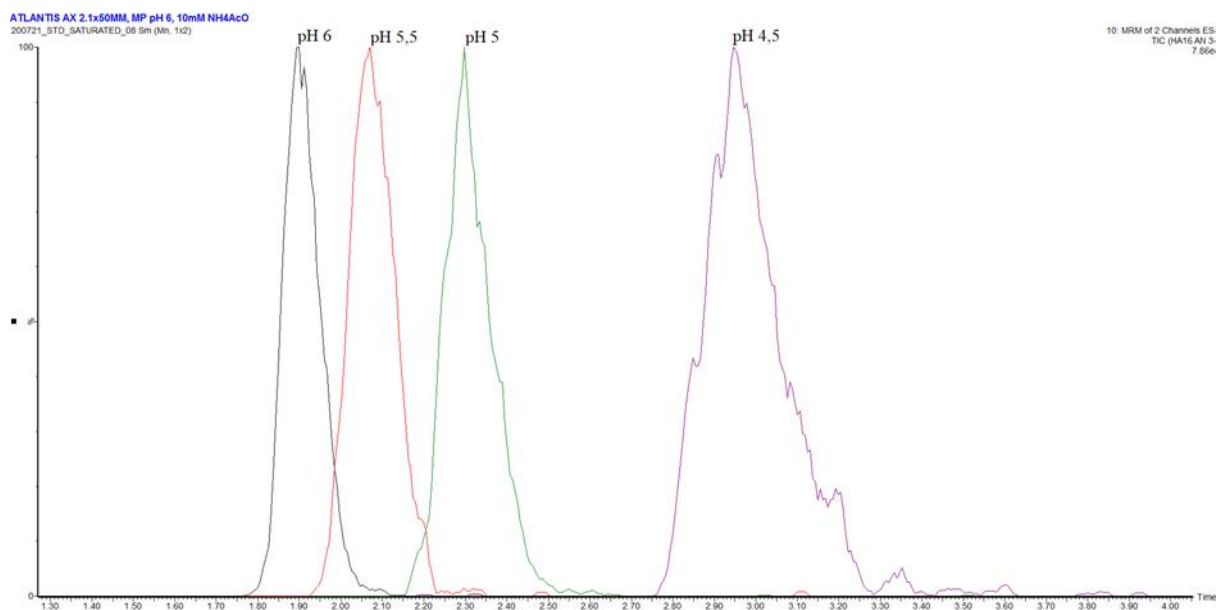
Z grafu 5 je patrné, že s rostoucím pH mobilní fáze významně klesá retence oHA, což je v souladu s daty uvedenými v publikaci Kadlecové a kol. [197]. Nejvýznamnější je změna z pH 4,5 na pH 5, a to zejména pro vyšší oHA. U pH 4,5 a pH 5 převažuje konkávní trend, až k HA12, naopak u pH 5,5 a pH 6 převažuje konvexní trend až k HA12. Nižší oHA se na koloně zadržují méně než vyšší oHA, pravděpodobně v důsledku menšího počtu ionizovatelných karboxylových skupin v molekule.

Graf 6 Vliv pH na selektivitu oligomerů kyseliny hyaluronové



Čím vyšší poměr výšky a plochy píku, tím lepší selektivita, a tím i účinnost separace. Z grafu 6 vyplývá, že vliv hodnoty pH mobilní fáze na účinnost separace je nevýznamný, nicméně nižší oHA jsou separovány lépe než vyšší oHA.

Na obrázku 10 je chromatografický záznam znázorňující vliv pH na retenci i selektivitu HA16. Použitá kolona a podmínky separace jsou uvedeny v kapitole 2.8.

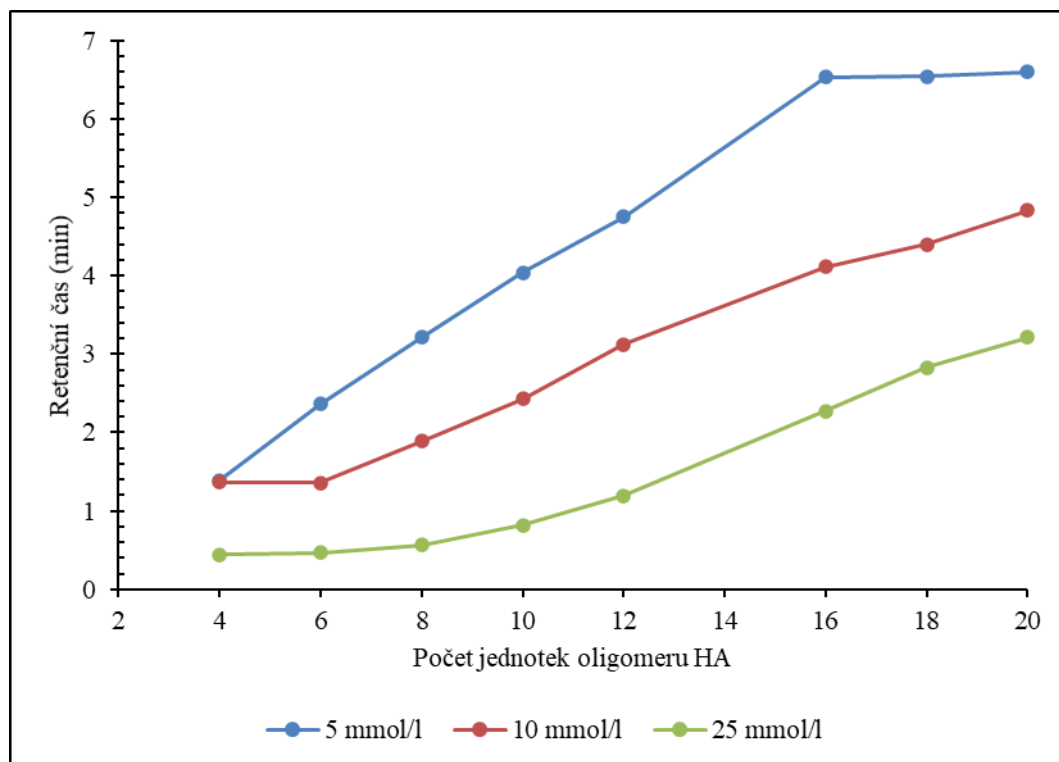


Obrázek 10 Vliv pH mobilní fáze na separaci hexadekameru kyseliny hyaluronové

3.2.5 Vliv koncentrace octanu amonného v mobilní fázi na separaci oligomerů kyseliny hyaluronové

Při pH 5 jsou ionizovány nejen molekuly HA, ale i molekula octanu amonného. Koncentrace octanu amonného v mobilní fázi tedy může významně ovlivňovat nejen separaci oHA, ale také MS detekci.

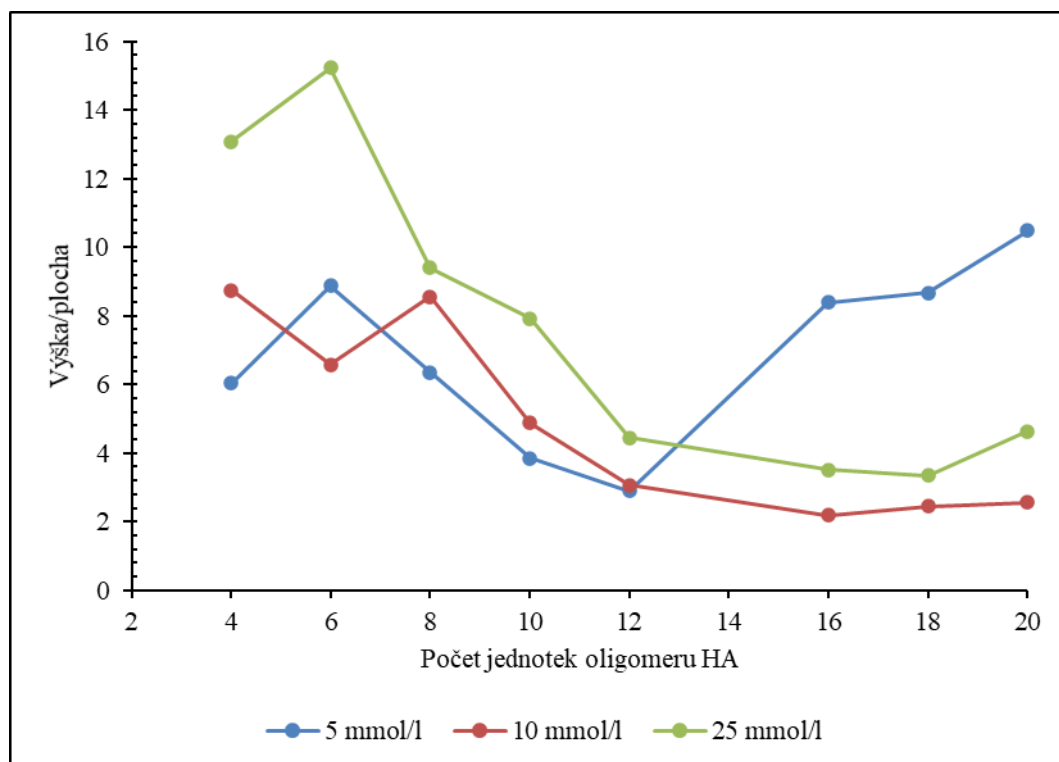
Graf 7 Vliv koncentrace octanu amonného v mobilní fázi na retenční čas oligomerů kyseliny hyaluronové



Z grafu 7 je patrné, že s rostoucí koncentrací octanu amonného v mobilní fázi rapidně klesá retence oHA, což je pravděpodobně způsobeno tím, že anionty octanu vytlačují anionty HA z iontových vazeb kationtů alkylaminu, podobně jako v případě jiných aniontů [219]. Při koncentraci octanu amonného 25 mmol/l je patrný konvexní trend. Nižší oHA se v koloně zadržují obecně méně než vyšší oHA, neboť obsahují méně ionizovatelných karboxylových skupin.

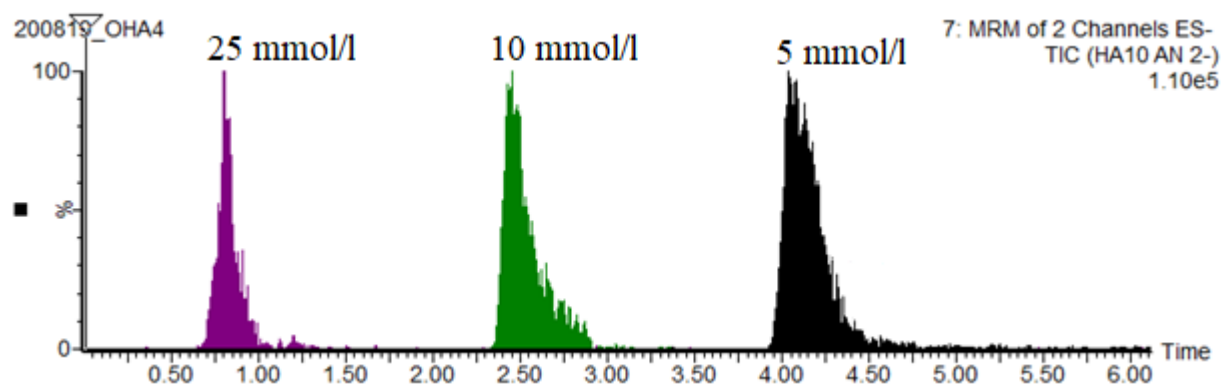
Oligomery HA16, HA18 a HA20 byly eluovány mobilní fází s koncentrací octanu amonného 5 mmol/l již po šesté minutě, tedy při složení mobilní fáze octan amonný a acetonitril (95:5, v/v), čímž lze vysvětlit rychlejší eluci a zároveň náhlý nárůst selektivity (graf 8).

Graf 8 Vliv koncentrace octanu amonného v mobilní fázi na selektivitu oligomerů kyseliny hyaluronové



Čím vyšší je poměr mezi výškou a plochou píku, tím je lepší selektivita a účinnost separace. Z grafu 8 je patrné, že vliv koncentrace octanu amonného v mobilní fázi na účinnost separace je poměrně významný. Při vyšší koncentraci octanu amonného v mobilní fázi jsou analyty lépe separované, což zřejmě souvisí s nižší retencí oHA. Nižší oHA jsou separovány obecně lépe než vyšší oHA.

Na obrázku 11 je uveden chromatografický záznam HA10, kde je patrný vliv koncentrace octanu amonného v mobilní fázi na retenci i selektivitu HA10. Použitá kolona a podmínky separace jsou uvedeny v kapitole 2.8.



Obrázek 11 Vliv koncentrace octanu amonného v mobilní fázi na separaci dekamery kyseliny hyaluronové

3.3 Analytické parametry UPLC-MS metody pro stanovení vybraných oligomerů kyseliny hyaluronové

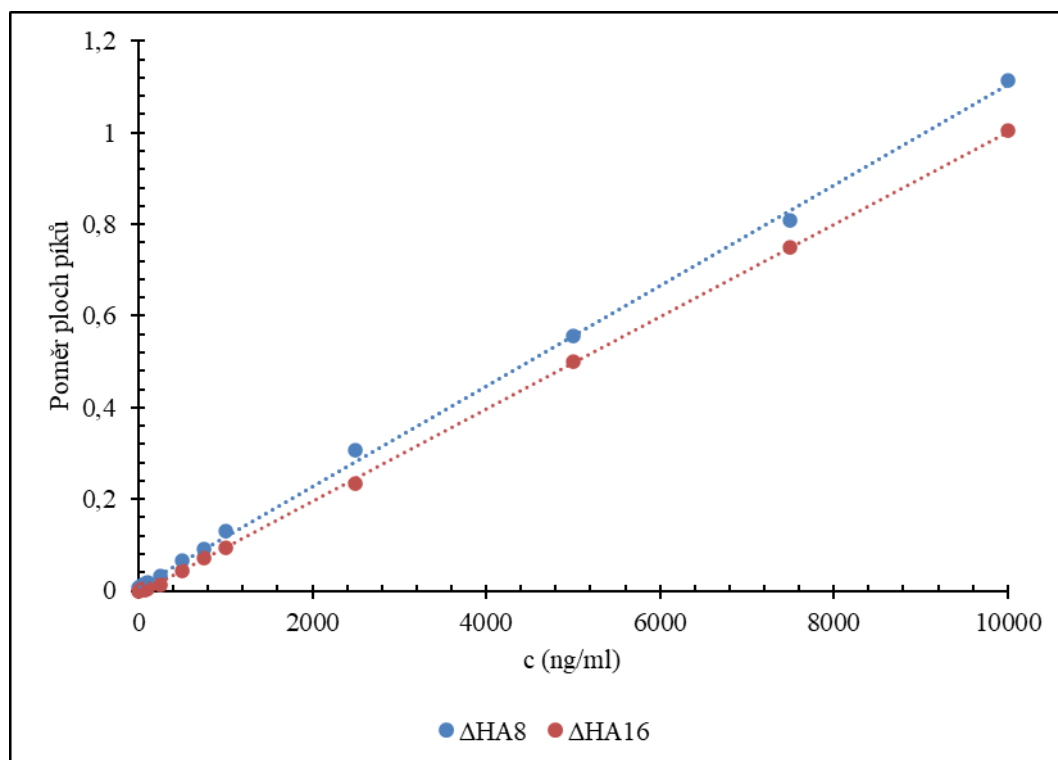
3.3.1 Linearita

Linearita se posuzuje korelačním koeficientem (R), čím víc se blíží jedné, tím více je kalibrační přímka spolehlivá. Linearita byla určena pro oligomery Δ HA8 a Δ HA16 při 14 hladinách, včetně slepého vzorku, měření bylo provedeno v triplicátu (včetně extrakce) a při všech třech měřeních bylo dosaženo velmi uspokojivých hodnot korelačních koeficientů uvedených v tabulce 11. Kalibrační řada byla lineární v celém rozmezí testovaných koncentrací u obou oHA, což je znázorněno v grafu 9.

Tabulka 11 Hodnoty korelačních koeficientů kalibračních křivek vybraných nenasycených oligomerů kyseliny hyaluronové

	Δ HA8	Δ HA16
1. měření	0,9992	0,9998
2. měření	0,9987	0,9980
3. měření	0,9991	0,9991

Graf 9 Kalibrační křivky stanovení vybraných nenasycených oligomerů kyseliny hyaluronové (1. měření)



3.3.2 Správnost

Správnost neboli odchylka naměřené hodnoty od té skutečné odhaluje náhodnou a soustavnou chybu měření, zde je vyjádřena relativní chybou v procentech. Odchylka by neměla překročit 15 % a pro dolní limit kvantifikace (LLOQ) 20 %. Správnost byla určena pro oligomery Δ HA8 a Δ HA16 z pěti extrakcí při třech různých koncentracích. Stanovení bylo provedeno v triplikátu. Získané výsledky jsou uvedeny v tabulkách 12 a 13.

Tabulka 12 Správnost metody stanovení nenasyceného oktameru kyseliny hyaluronové

očekávaná koncentrace (ng/ml)	poměr ploch píků Δ HA8/HA8	naměřená koncentrace (ng/ml)	odchylka (%)
25	0,1836	23,7	-5
	0,185	24,5	-2
	0,1783	20,6	-18
	0,1918	28,5	14
	0,1562	7,5	-70
50	0,2234	47,2	-6
	0,2155	42,6	-15
	0,1943	30,0	-40
	0,2168	43,3	-13
	0,2169	43,4	-13
100	0,3511	122,6	23
	0,3194	103,9	4
	0,3502	122,1	22
	0,2996	92,2	-8
	0,3183	103,3	3

V tabulce 12 jsou zvýrazněny odchylky, které nesplňují podmínku 20 %. Po vyloučení těchto odlehlých hodnot by teoreticky mohl být odhadnut LLOQ pro Δ HA8 na 25 ng/ml.

Tabulka 13 Správnost metody stanovení nenasyčeného hexadekameru kyseliny hyaluronové

očekávaná koncentrace (ng/ml)	poměr ploch píků Δ HA16/HA16	naměřená koncentrace (ng/ml)	odchylka (%)
25	0,0311	38,0	52
	0,0798	60,9	144
	0,0108	28,4	13
	0,0349	39,7	59
	0,0082	27,2	9
50	0,0709	56,7	13
	0,049	46,3	-7
	0,0613	52,2	4
	0,0566	50,0	0
	0,0589	51,0	2
100	0,1502	94,0	-6
	0,1454	91,7	-8
	0,1501	94,0	-6
	0,1126	76,3	-24
	0,1057	73,1	-27

Při stanovení vyšších oHA byla získána nižší intenzita a zároveň nižší účinnost separace při stejných koncentracích v porovnání s nižšími oHA. Výsledkem jsou horší analytické parametry metody.

V tabulce 13 jsou zvýrazněny odchylky, které nesplňují podmínku 20 %. Pro koncentraci 25 ng/ml Δ HA16 byly 3 z 5 naměřených hodnot odlehlé směrem k vyšším hodnotám. Po vyloučení 2 z 5 odlehlých hodnot u koncentrace 100 ng/ml by teoreticky mohl být odhadnut LLOQ pro Δ HA16 na 50 ng/ml.

3.3.3 Přesnost

Přesnost neboli míra shody výsledků z většího počtu měření závisí pouze na rozdělení náhodných chyb, je vyjádřena variačním koeficientem (CV) v procentech. Hodnota CV by neměla přesáhnout 15 %. Přesnost byla určena pro stanovení Δ HA8 a Δ HA16 z pěti extrakcí při třech různých koncentracích. Celý experiment byl proveden v triplicátu. Získané výsledky jsou uvedeny v tabulkách 14 a 15.

Tabulka 14 Přesnost metody pro stanovení nenasyčeného oktameru kyseliny hyaluronové

očekávaná koncentrace (ng/ml)	naměřená koncentrace (ng/ml)	průměrná hodnota	směrodatná odchylka	variační koeficient (%)
25	23,7	21,0	8,0	38
	24,5			
	20,6			
	28,5			
	7,5			
50	47,2	41,3	6,6	16
	42,6			
	30,0			
	43,3			
	43,4			
100	122,6	108,8	13,2	12
	103,9			
	122,1			
	92,2			
	103,3			

V tabulce 14 jsou zvýrazněné hodnoty variačních koeficientů, které nesplňují podmínku 15 %, tato podmínka je splněna pouze pro koncentraci 100 ng/ml. Horší přesnost však byla způsobena zejména dvěma odlehlými hodnotami, po vyloučení těchto odlehlých hodnot (zvýrazněné u koncentrace 25 a 50 ng/ml) se přesnost výrazně zlepší, čímž bude splněna podmínka 15 % pro všechny koncentrace.

Tabulka 15 Přesnost metody pro stanovení nenasyčeného hexadekameru kyseliny hyaluronové

očekávaná koncentrace (ng/ml)	naměřená koncentrace (ng/ml)	průměrná hodnota	směrodatná odchylka	variační koeficient (%)
25	38,0	38,8	13,5	35
	60,9			
	28,4			
	39,7			
	27,2			
50	56,7	51,2	3,7	7
	46,3			
	52,2			
	50,0			
	51,0			
100	94,0	85,8	10,3	12
	91,7			
	94,0			
	76,3			
	73,1			

Jak již bylo zmíněno, při stanovení vyšších oHA byla získána nižší intenzita píků a zároveň nižší účinnost separace v porovnání se stanovením nižších oHA, výsledkem je pak horší přesnost, zejména při nižších koncentracích.

V tabulce 15 je zvýrazněna hodnota variačního koeficientu, která nesplňuje podmínku 15 % pouze pro koncentraci 25 ng/ml. Pro ostatní testované koncentrace je tato podmínka splněna.

3.3.4 Celkové zhodnocení analytických parametrů metody stanovení vybraných oligomerů kyseliny hyaluronové

Určování parametrů metody bylo nejprve prováděno ještě pro nižší koncentrace oHA (10, 25 a 50 ng/ml), ovšem s neuspokojivými výsledky, proto byly analytické parametry metody určovány při vyšších koncentracích (25, 50 a 100 ng/ml).

V delším časovém horizontu analýz klesala citlivost, selektivita a docházelo ke značnému nárůstu šumu základní linie, což znesnadňovalo integraci ploch píků. Podrobněji budou tyto problémy, včetně aplikovaných řešení diskutovány v kapitole 3.6.

3.3.5 Stabilita oligomerů kyseliny hyaluronové

Byla ověřována stabilita oHA ve vzorcích obsahu GIT myši uchovávaných při teplotě -80 °C po dobu 1 měsíce. Bylo zjištěno, že nedošlo k významné degradaci oHA.

3.3.6 Průkaz oligomerů kyseliny hyaluronové v moči

Pro zjištění výskytu oHA v moči byla analyzována moč myši, kterým byla před odebráním vzorku podána vysokomolekulární HA. V moči myši nebyly oHA danou metodou detegovány.

3.4 Analýza uhlíkem ^{13}C značených nenasycených oligomerů hyaluronanu ve vzorcích gastrointestinálního traktu myši po podání uhlíkem ^{13}C značené kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 15 a 1562 kDa pro účely studia farmakokinetiky kyseliny hyaluronové

Jak již bylo uvedeno výše, nebyla možnost použít uhlíkem ^{13}C značené standardy pro všechny analyzované oHA, proto byly pro kvantifikaci použity nativní oHA, na jejichž isotopickou distribuci byl upraven naměřený signál podle již zmíněného vzorce. Pro analýzu ^{13}C - $\Delta\text{HA}2$ byl použit uhlíkem ^{13}C značený standard, proto mohl být ^{13}C - $\Delta\text{HA}2$ kvantifikován přímo, bez korekce na isotopickou distribuci. Výpočetní parametry pro kvantifikaci vybraných oHA, včetně korelačních koeficientů, jsou uvedeny v tabulce 16.

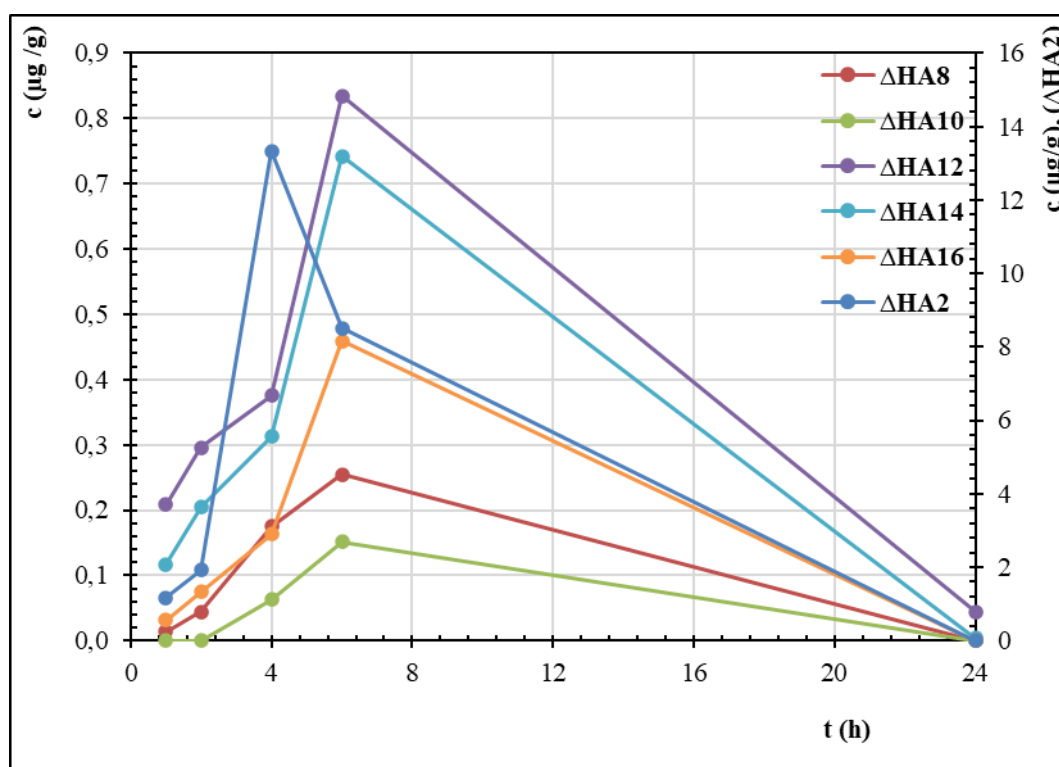
Tabulka 16 Výpočetní parametry z kalibračních křivek nativních oligomerů

žaludek	$\Delta\text{HA}2$	$\Delta\text{HA}8$	$\Delta\text{HA}10$	$\Delta\text{HA}12$	$\Delta\text{HA}14$	$\Delta\text{HA}16$
směrnice	6,031E+02	3,214E-04	1,006E-04	4,811E-05	5,483E-05	2,244E-04
úsek	1,278E+04	-6,819E-05	3,106E-03	3,182E-04	3,608E-05	5,105E-03
R^2	9,952E-01	9,975E-01	9,927E-01	9,945E-01	9,941E-01	9,959E-01
tenké střevo	$\Delta\text{HA}2$	$\Delta\text{HA}8$	$\Delta\text{HA}10$	$\Delta\text{HA}12$	$\Delta\text{HA}14$	$\Delta\text{HA}16$
směrnice	6,926E+02	2,427E-05	1,136E-05	2,315E-06	3,256E-06	1,239E-05
úsek	9,741E+03	4,497E-03	2,574E-03	9,064E-04	6,307E-04	1,699E-03
R^2	9,921E-01	9,936E-01	9,703E-01	9,658E-01	9,707E-01	9,819E-01
apendix	$\Delta\text{HA}2$	$\Delta\text{HA}8$	$\Delta\text{HA}10$	$\Delta\text{HA}12$	$\Delta\text{HA}14$	$\Delta\text{HA}16$
směrnice	5,775E+02	1,693E-04	6,822E-05	2,097E-05	2,298E-05	1,097E-04
úsek	4,283E+03	-1,613E-03	8,133E-04	-1,035E-04	1,064E-03	1,428E-03
R^2	9,993E-01	9,921E-01	9,920E-01	9,713E-01	9,956E-01	9,940E-01
tlusté střevo	$\Delta\text{HA}2$	$\Delta\text{HA}8$	$\Delta\text{HA}10$	$\Delta\text{HA}12$	$\Delta\text{HA}14$	$\Delta\text{HA}16$
směrnice	5,775E+02	1,304E-04	6,038E-05	3,249E-05	4,739E-05	1,617E-04
úsek	4,283E+03	-2,379E-03	1,477E-03	5,707E-04	-1,822E-03	-9,430E-03
R^2	9,993E-01	9,987E-01	9,927E-01	9,954E-01	9,967E-01	9,928E-01

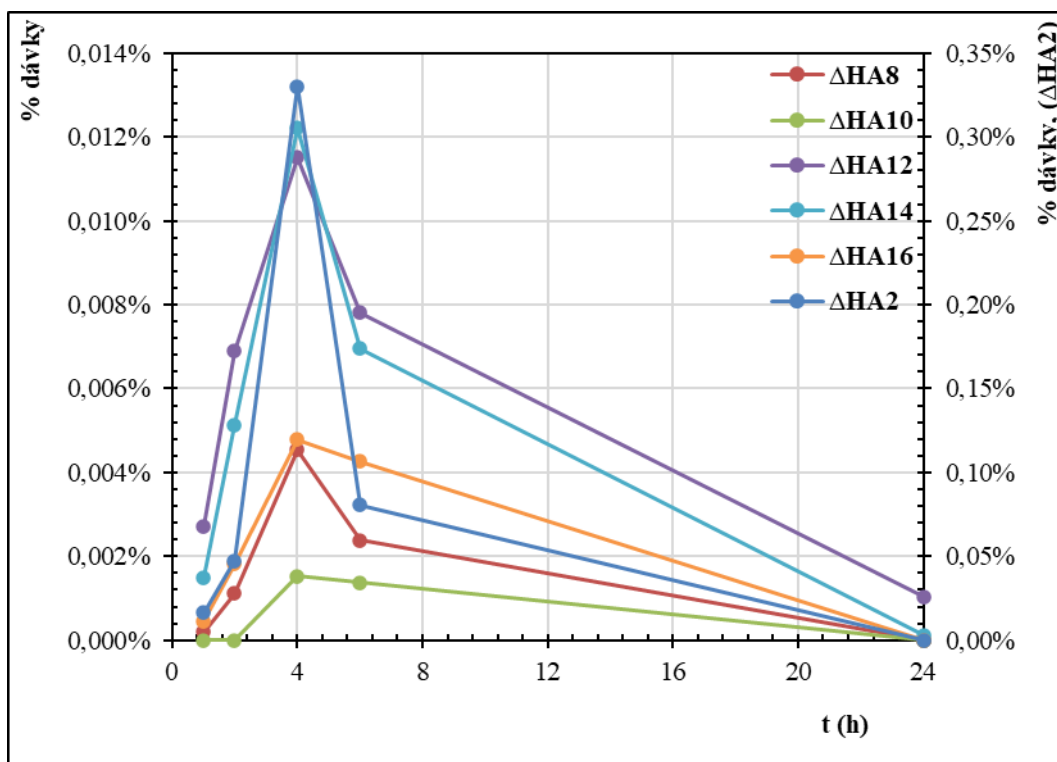
3.4.1 Stanovení hladin uhlíkem ^{13}C značených oligomerů hyaluronanu v obsahu žaludku myši

Jak je patrné z grafu 10 a 11, tak ve vzorcích obsahu žaludku myši BALB/C po podání HA o molekulové hmotnosti 15 kDa bylo nalezeno celé spektrum sledovaných nenasycených oHA. Nejvyšší koncentrace oHA byly naměřeny ve vzorcích, které byly odebrány po 6 hodinách od podání HA. V porovnání s vyššími oHA byly naměřeny řádově vyšší koncentrace dimeru HA (13 $\mu\text{g/g}$) s vrcholem 4 hodin po podání HA. Po přepočtu na procentuální množství podané dávky byly nejvyšší hodnoty zaznamenány u všech oHA po 4 hodinách od podání. To je dáno rozdílným množství odebraného obsahu žaludku.

Graf 10 Změna hladiny vybraných oligomerů hyaluronanu v obsahu žaludku myši po podání kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 15 kDa

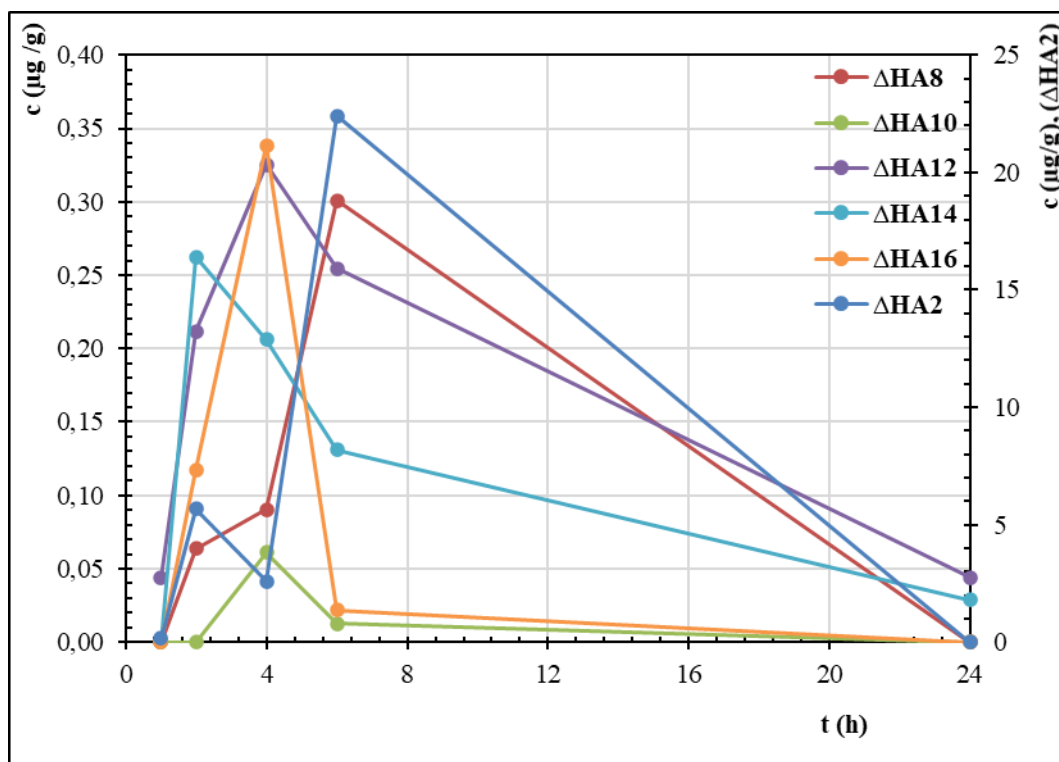


Graf 11 Vybrané oligomery hyaluronanu v obsahu žaludku myši po podání kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 15 kDa (procentuální množství dávky)

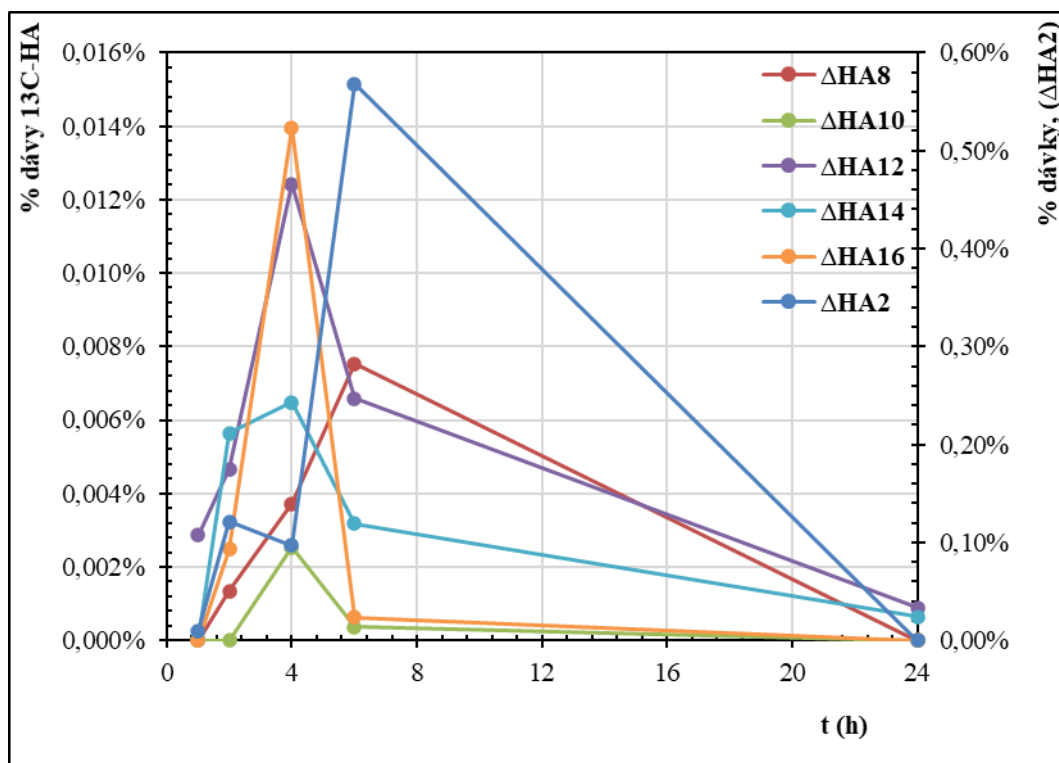


Jak je patrné z grafu 12 a 13, tak ve vzorcích obsahu žaludku myši BALB/C po podání HA o molekulové hmotnosti 1562 kDa bylo opět nalezeno celé spektrum sledovaných nenasycených oHA. Nejvyšší koncentrace oHA byly naměřeny ve vzorcích, které byly odebrány po 2, 4 a 6 hodinách od podání HA. V porovnání s vyššími oHA byly naměřeny řádově vyšší koncentrace dimeru HA (22 $\mu\text{g/g}$) s vrcholem 6 hodin od podání HA. Po přepočtu na procentuální množství podané dávky je charakter výsledků podobný, mírná odlišnost je způsobena rozdílným množstvím odebraných vzorků. U skupiny myši, kterým byla podávána HA o molekulové hmotnosti 1562 kDa byla zaznamenána téměř dvojnásobně vyšší koncentrace dimeru HA v obsahu žaludku oproti první skupině, které byla podávána HA o molekulové hmotnosti 15 kDa, naopak u této skupiny byly naměřeny téměř dvojnásobně vyšší koncentrace ostatních sledovaných oHA.

Graf 12 Změna hladiny vybraných oligomerů hyaluronanu v obsahu žaludku myši po podání kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 1562 kDa



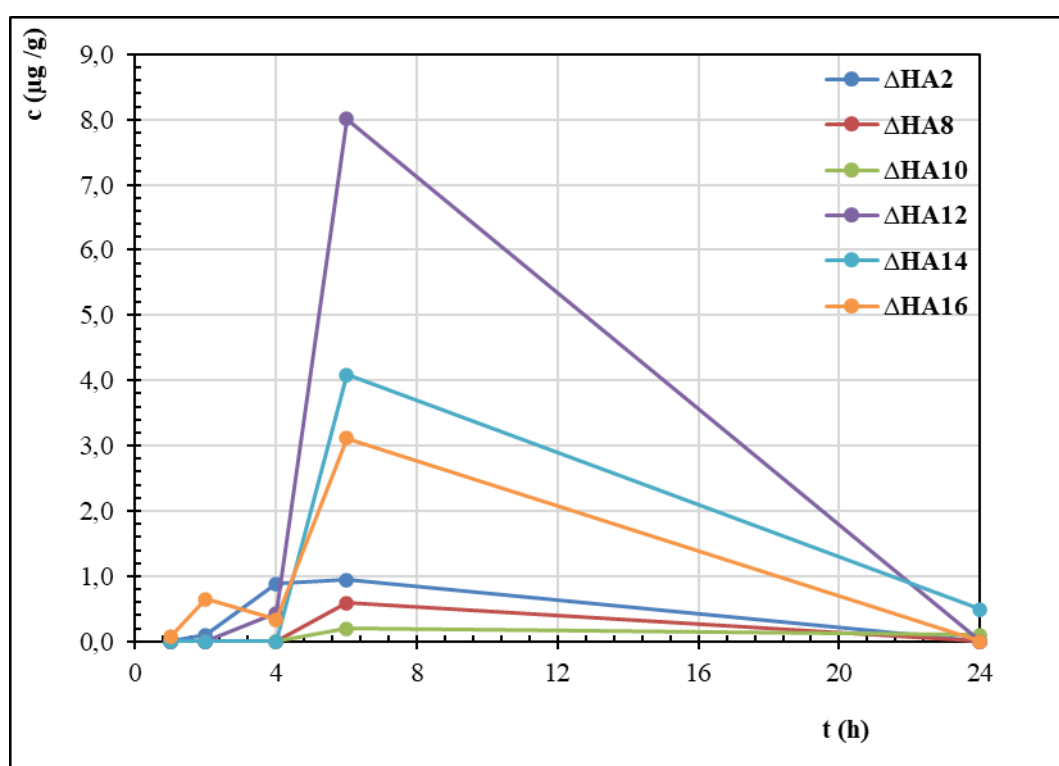
Graf 13 Vybrané oligomery hyaluronanu v obsahu žaludku myši po podání kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 1562 kDa (procentuální množství dávky)



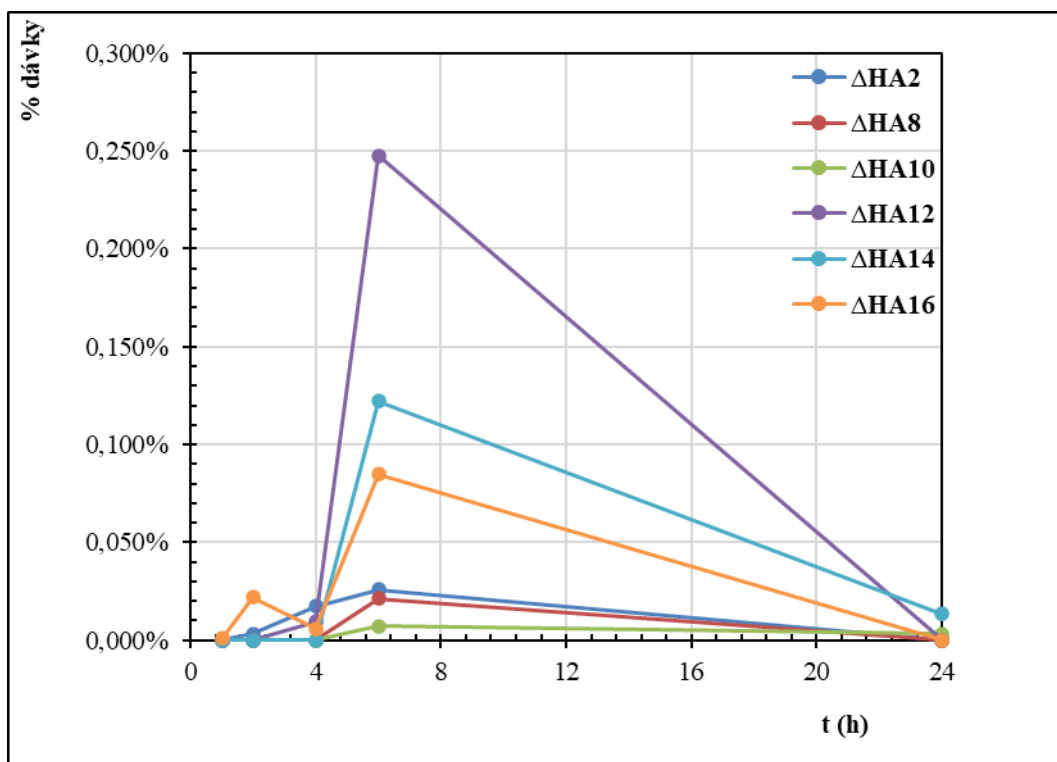
3.4.2 Stanovení hladin uhlíkem ^{13}C značených oligomerů hyaluronanu v obsahu tenkého střeva myši

Jak je patrné z grafu 14 a 15, tak ve vzorcích obsahu tenkého střeva myši BALB/C po podání HA o molekulové hmotnosti 15 kDa bylo nalezeno celé spektrum sledovaných nenasycených oHA. Nejvyšší koncentrace oHA byly naměřeny ve vzorcích, které byly odebrány po 6 hodinách od podání HA. Hladina dimeru HA zde řádově nepřevyšuje hladinu ostatních oHA. Po přepočtu na procentuální množství podané dávky je charakter výsledků téměř identický.

Graf 14 Změna hladiny vybraných oligomerů hyaluronanu v obsahu tenkého střeva myši po podání kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 15 kDa

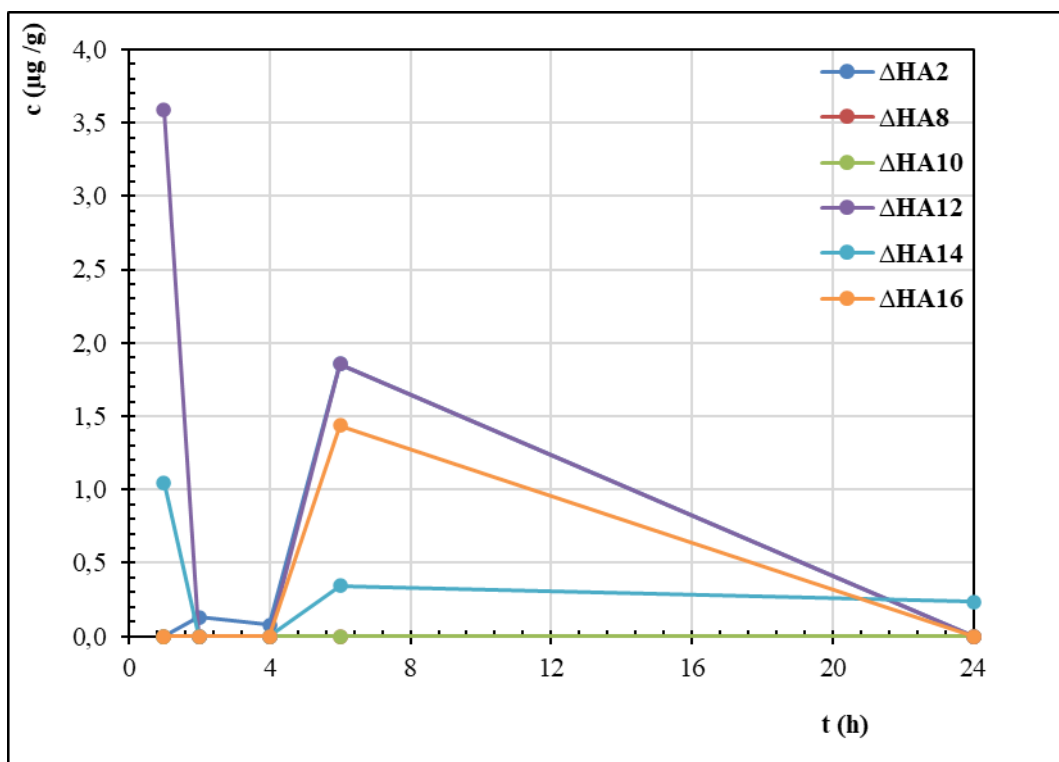


Graf 15 Vybrané oligomery hyaluronanu v obsahu tenkého střeva myší po podání kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 15 kDa (procentuální množství dávky)

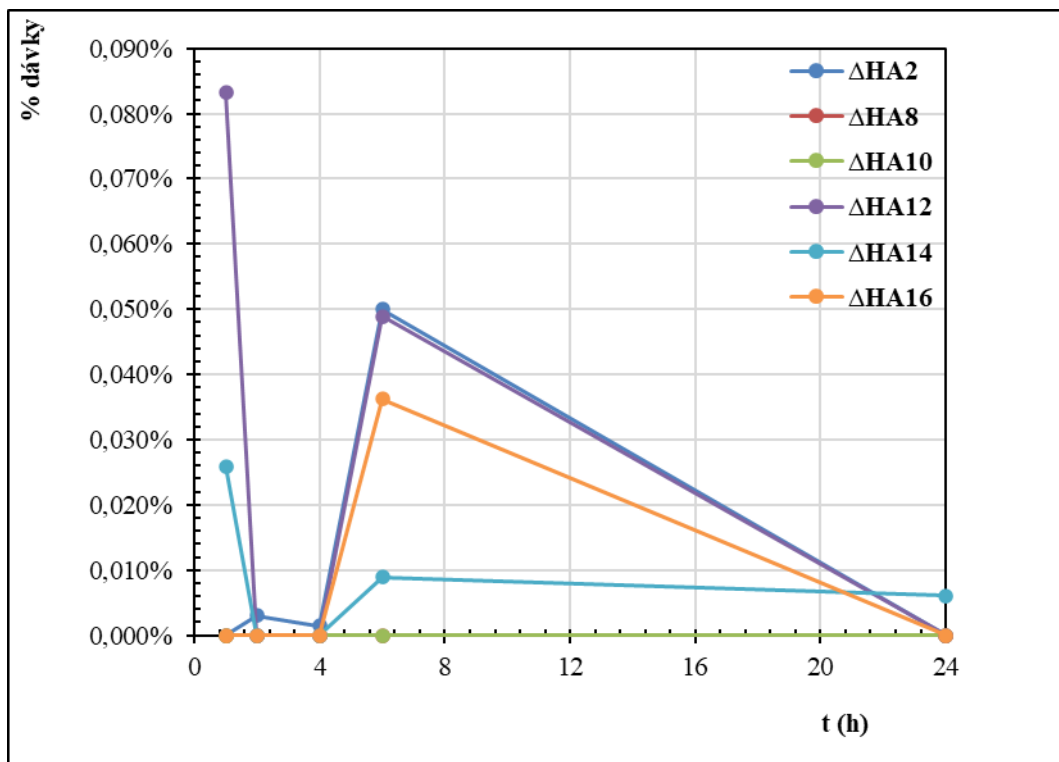


Jak je patrné z grafu 16 a 17, tak ve vzorcích obsahu tenkého střeva myší BALB/C po podání HA o molekulové hmotnosti 1562 kDa bylo nalezeno celé spektrum sledovaných nenasycených oHA, Δ HA8 a Δ HA10 však jen ve velmi nízkých koncentracích. Nejvyšší koncentrace byly naměřeny po 1. a 6. hodině od podání HA. Hladina dimeru HA zde řádově nepřevyšuje hladinu ostatních oHA. Nejvyšší koncentrace Δ HA12 a Δ HA14 byla nalezena již po 1. hodině od podání HA. To lze vysvětlit individualitou v rychlosti trávení, neboť vzorky odebrané v různých časech pocházejí od různých myší. Po přepočtu na procentuální množství podané dávky je charakter výsledků podobný. U skupiny myší, kterým byla podána HA o molekulové hmotnosti 1562 kDa, byla zaznamenána násobně nižší koncentrace oHA v porovnání se skupinou myší, kterým byla podána HA o molekulové hmotnosti 15 kDa. Dimer HA ani v jedné skupině myší nedominoval, na rozdíl od obsahu v ostatních částech trávicího traktu.

Graf 16 Změna hladiny vybraných oligomerů hyaluronanu v obsahu tenkého střeva myši po podání kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 1562 kDa



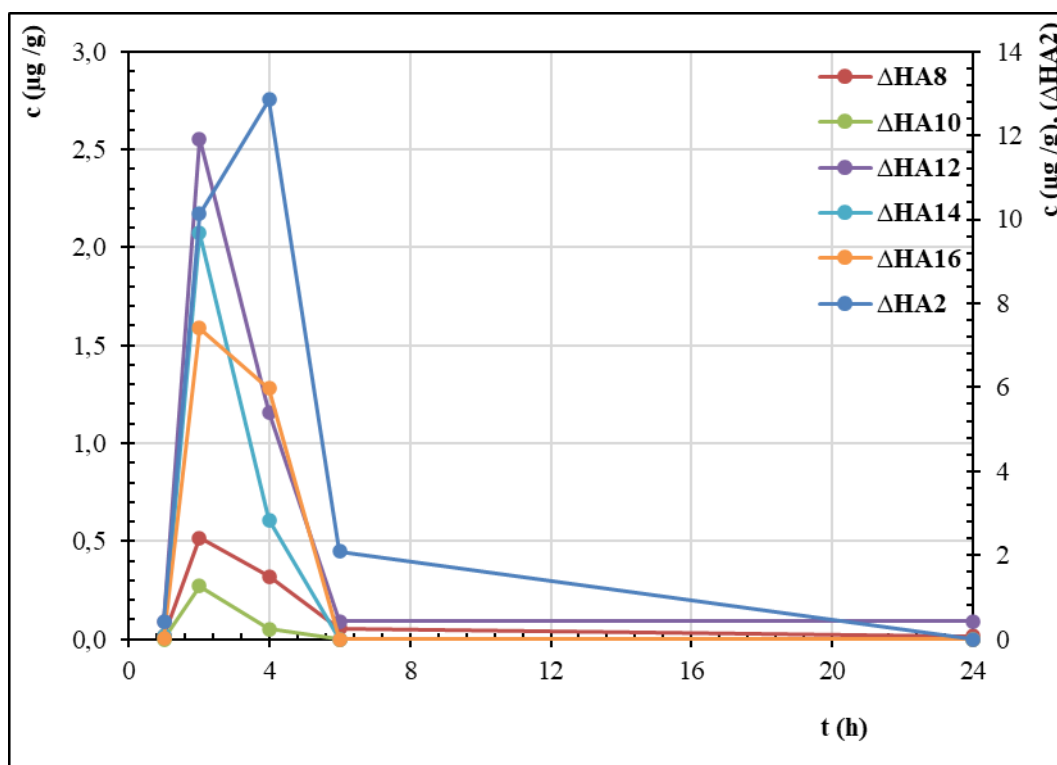
Graf 17 Vybrané oligomery hyaluronanu v obsahu tenkého střeva myši po podání kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 1562 kDa (procentuální množství dávky)



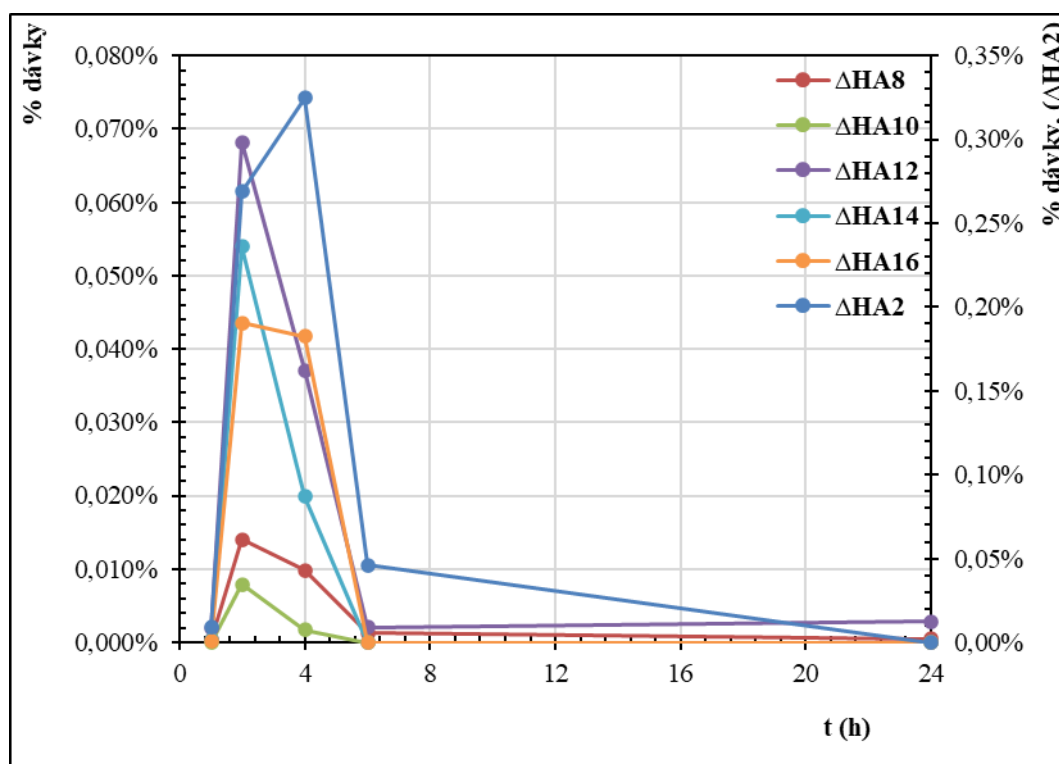
3.4.3 Stanovení hladin uhlíkem ^{13}C značených oligomerů hyaluronanu v obsahu apendixu myši

Jak je patrné z grafu 18 a 19, tak ve vzorcích obsahu apendixu myši BALB/C po podání HA o molekulové hmotnosti 15 kDa bylo nalezeno celé spektrum sledovaných nenasycených oHA. Nejvyšší koncentrace oHA byly naměřeny ve vzorcích, které byly odebrány po 2 hodinách od podání HA. V porovnání s vyššími oHA byly naměřeny řádově vyšší koncentrace dimeru HA ($13 \mu\text{g/g}$) s vrcholem 4 hodin od podání HA. Po přepočtu na procentuální množství podané dávky jsou výsledky podobné, mírná odlišnost je dána rozdílným množstvím odebraného vzorku.

Graf 18 Změna hladiny vybraných oligomerů hyaluronanu v obsahu apendixu myši po podání kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 15 kDa

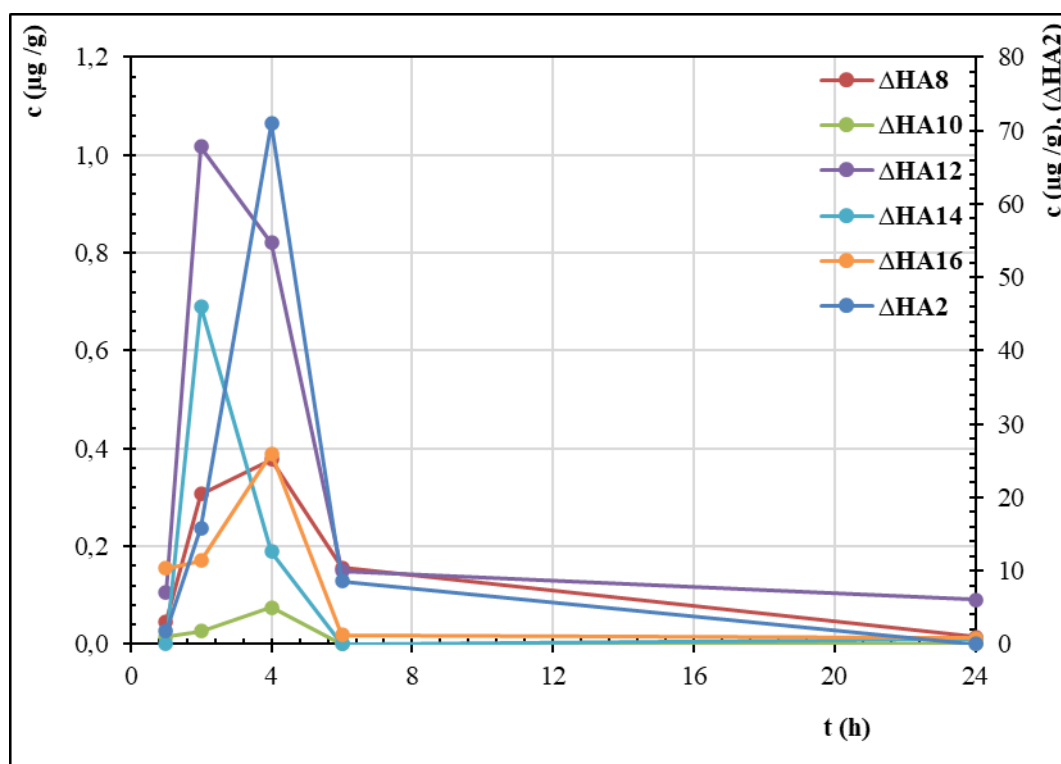


Graf 19 Vybrané oligomery hyaluronanu v obsahu apendixu myši po podání kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 15 kDa (procentuální množství dávky)

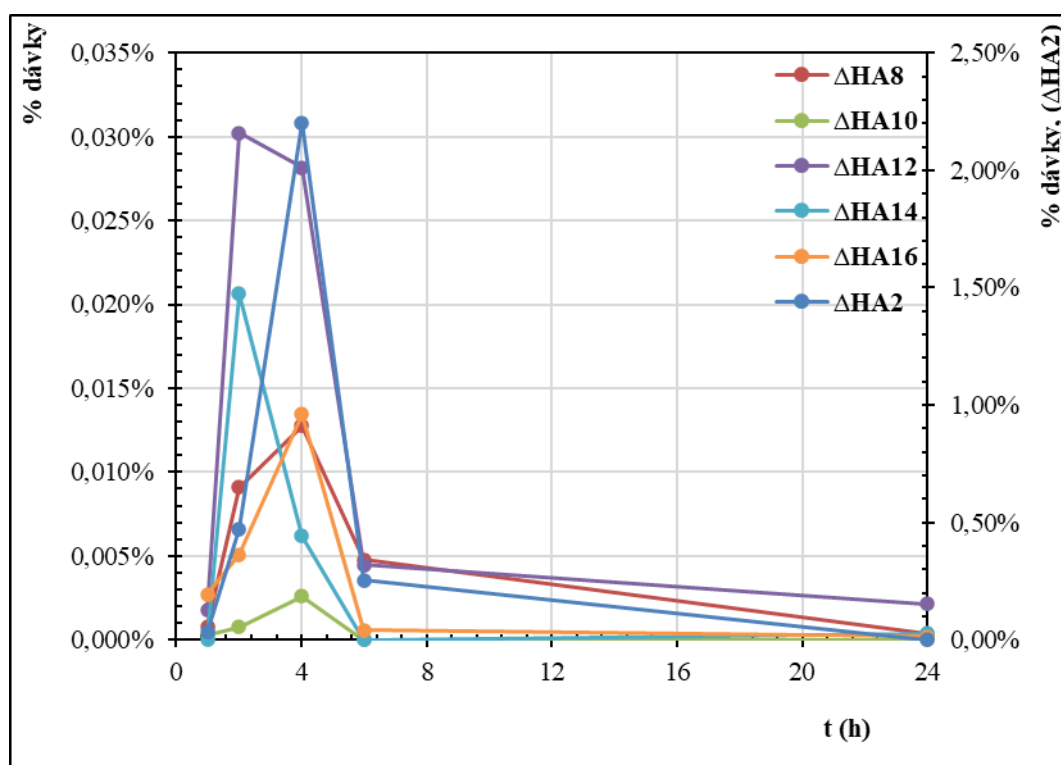


Jak je patrné z grafu 20 a 21, tak ve vzorcích obsahu apendixu myši BALB/C po podání HA o molekulové hmotnosti 1562 kDa bylo nalezeno celé spektrum sledovaných nenasycených oHA. Nejvyšší koncentrace oHA byly naměřeny ve vzorcích, které byly odebrány po 2 a 4 hodinách od podání HA. V porovnání s vyššími oHA byly naměřeny řádově vyšší koncentrace (70 $\mu\text{g/g}$) dimeru HA s vrcholem 4 hodin od podání HA. Po přepočtu na procentuální množství podané dávky je charakter výsledků podobný, mírná odlišnost je dána rozdílným množství odebraného vzorku. U skupiny myši, kterým byla podána HA o molekulové hmotnosti 1562 kDa, byla zaznamenána až pětinašobně vyšší koncentrace dimeru HA v obsahu apendixu v porovnání se skupinou, které byla podána HA o molekulové hmotnosti 15 kDa, naopak u této skupiny byly zaznamenány až trojnásobně vyšší koncentrace ostatních sledovaných oHA.

Graf 20 Změna hladiny vybraných oligomerů hyaluronanu v obsahu apendixu myši po podání kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 1562 kDa



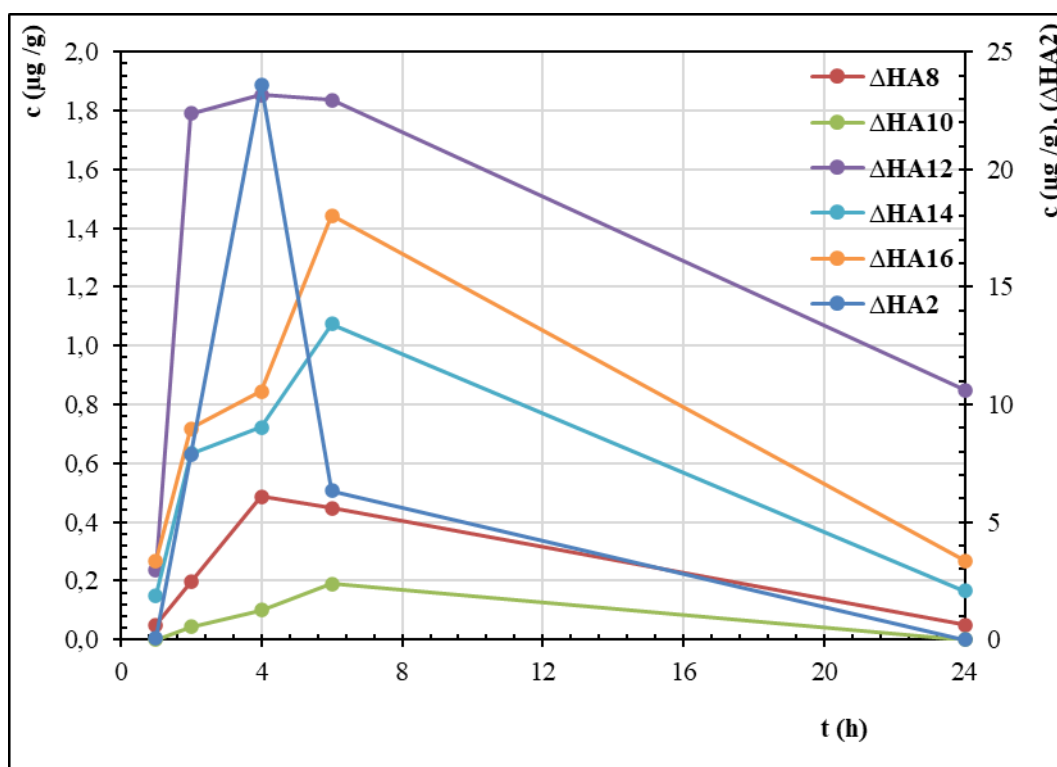
Graf 21 Vybrané oligomery hyaluronanu v obsahu apendixu myši po podání kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 1562 kDa (procentuální množství dávky)



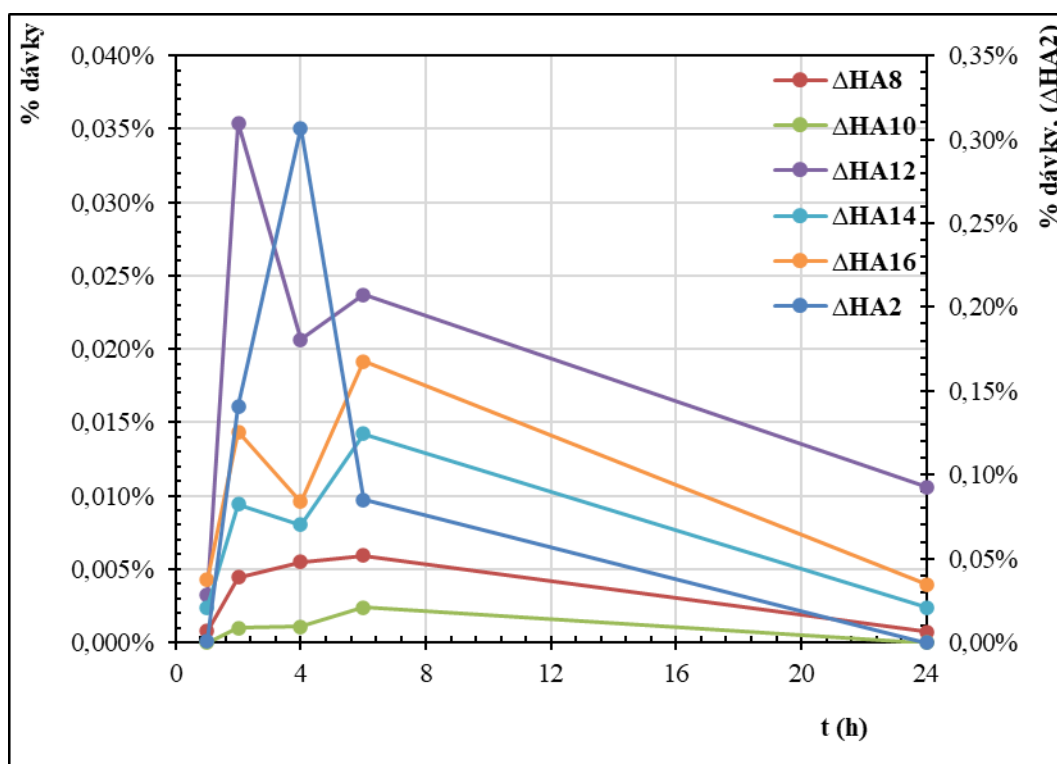
3.4.4 Stanovení hladin uhlíkem ^{13}C značených oligomerů hyaluronanu v obsahu tlustého střeva myši

Jak je patrné z grafu 22 a 23, tak ve vzorcích obsahu tlustého střeva myši BALB/ po podání HA o molekulové hmotnosti 15 kDa bylo nalezeno celé spektrum sledovaných nenasycených oHA. Nejvyšší koncentrace oHA byly naměřeny ve vzorcích, které byly odebrány po 4 a 6 hodinách od podání HA. V porovnání s vyššími oHA byly naměřeny řádově vyšší koncentrace ($24 \mu\text{g/g}$) dimeru HA s vrcholem 4 hodin od podání HA. Po přepočtu na procentuální množství podané dávky jsou výsledky podobné, liší se však v maximální koncentraci ΔHA_{12} , která byla dosažena po 2 hodinách od podání HA. Tato odlišnost je dána rozdílným množstvím odebraného vzorku.

Graf 22 Změna hladiny vybraných oligomerů hyaluronanu v obsahu tlustého střeva myši po podání kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 15 kDa

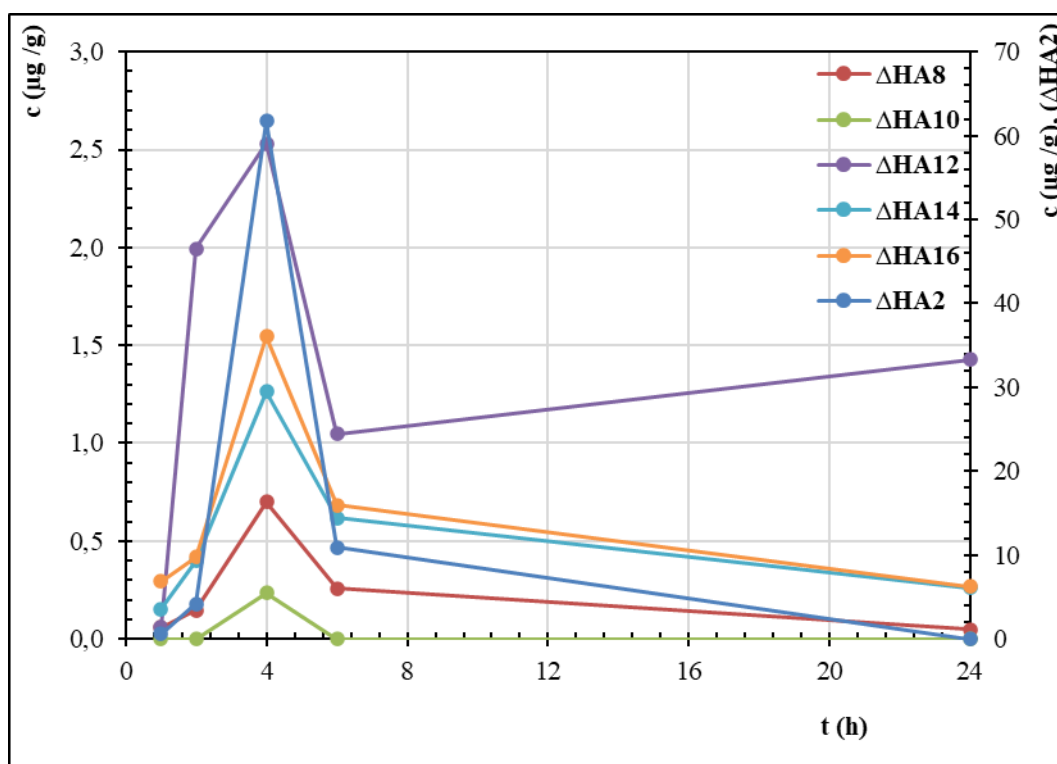


Graf 23 Vybrané oligomery hyaluronanu v obsahu tlustého střeva myší po podání kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 15 kDa (procentuální množství dávky)

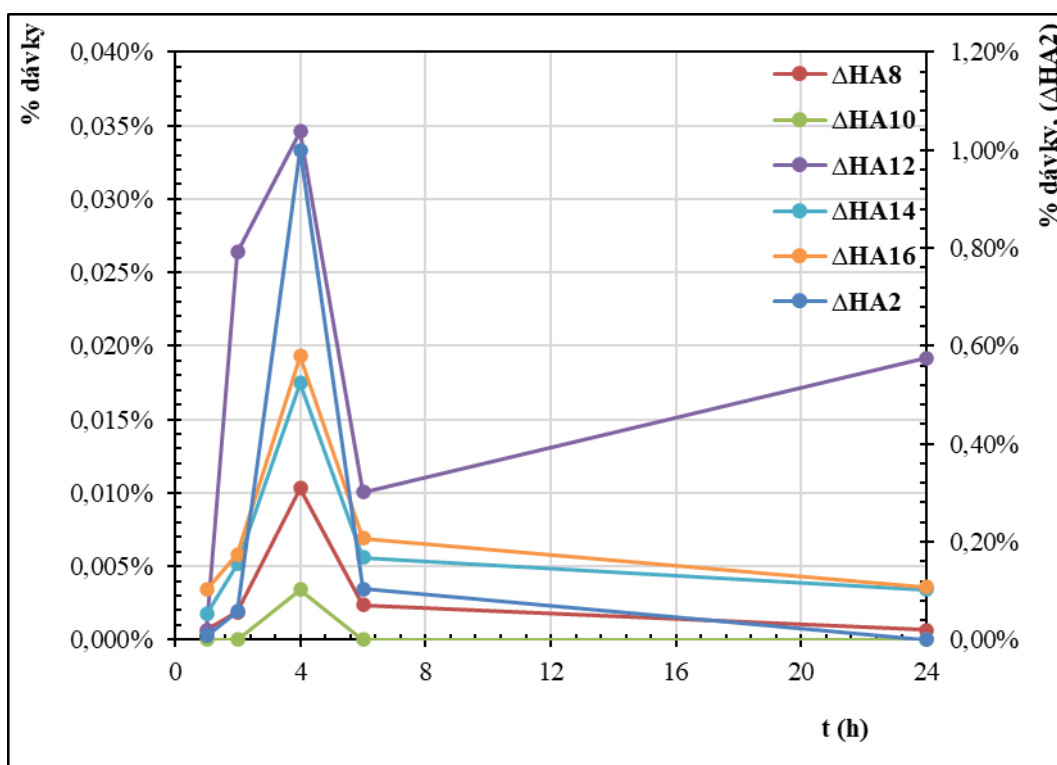


Jak je patrné z grafu 24 a 25, tak ve vzorcích obsahu tlustého střeva myší BALB/C po podání HA o molekulové hmotnosti 1562 kDa bylo nalezeno celé spektrum sledovaných nenasycených oHA. Nejvyšší koncentrace oHA byly naměřeny ve vzorcích, které byly odebrány 4. hodinu od podání HA. V porovnání s vyššími oHA byly naměřeny řádově vyšší koncentrace (60 $\mu\text{g/g}$) dimeru HA s vrcholem 4 hodin od podání HA. Z grafu 24 je patrné, že hladina $\Delta\text{HA}12$ je vyšší po 24 hodinách než po 6 hodinách od podání HA. Toto lze opět vysvětlit individualitou v trávení jednotlivých myší, neboť vzorky odebrané v různých časech od podání HA jsou od různých myší. Po přepočtu na procentuální množství podané dávky je charakter výsledků podobný. U skupiny myší, kterým byla podána HA o molekulové hmotnosti 1562 kDa, byla zaznamenána skoro trojnásobně vyšší koncentrace dimeru HA v obsahu tlustého střeva v porovnání se skupinou, které byla podávána HA o molekulové hmotnosti 15 kDa. Ostatní sledované oHA se v hladinách významně nelišily.

Graf 24 Změna hladiny vybraných oligomerů hyaluronanu v obsahu tlustého střeva myši po podání kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 1562 kDa



Graf 25 Vybrané oligomery hyaluronanu v obsahu tlustého střeva myši po podání kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 1562 kDa (procentuální množství dávky)

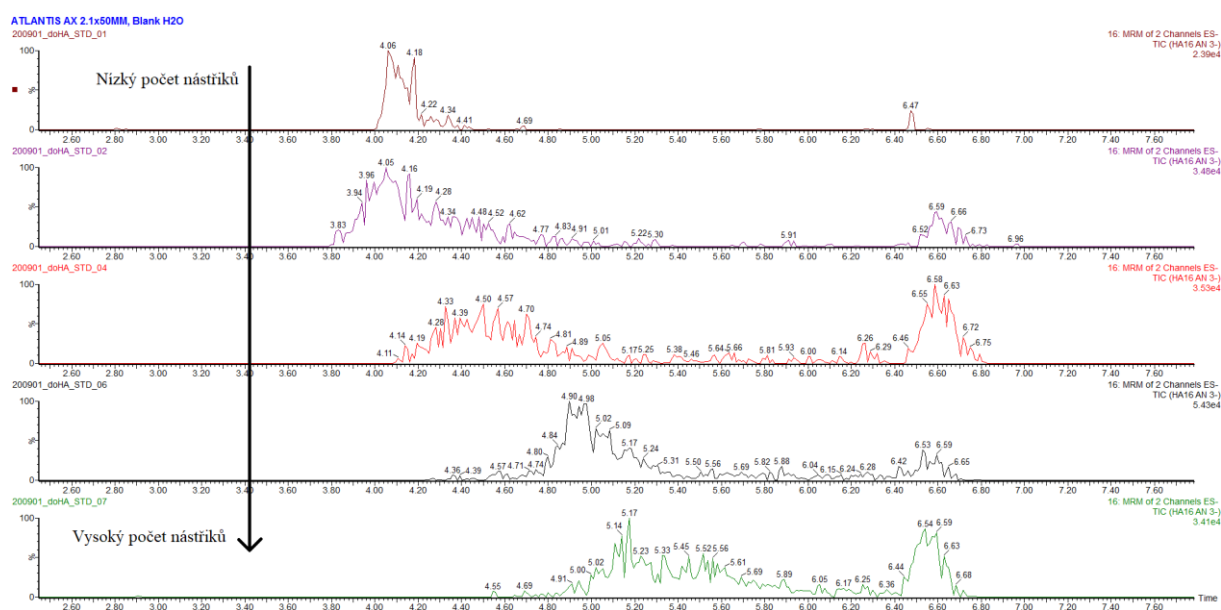


3.4.5 Shrnutí výsledků získaných při stanovení hladin jednotlivých uhlíkem ^{13}C značených oligomerů hyaluronanu v obsahu trávicího traktu myší po podání uhlíkem ^{13}C značené kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 15 a 1562 kDa

U skupiny myší, kterým byla podávána HA o molekulové hmotnosti 1562 kDa byly nalezeny násobně vyšší hladiny dimeru oproti skupině myší, kterým byla podávána HA o molekulové hmotnosti 15 kDa, konkrétně v obsahu žaludku (bezmála dvojnásobná), apendixu (více než pětinásobná) a tlustém střevě (bezmála trojnásobná). Naopak u skupiny, které byla podávána HA o molekulové hmotnosti 1562 kDa byla nalezena násobně nižší hladina středních a vyšších oHA v porovnání se skupinou, které byla podávána HA o molekulové hmotnosti 15 kDa. Konkrétně v obsahu žaludku, apendixu a tlustého střeva byla hladina středních a vyšších oHA srovnatelná u obou skupin myší. Výjimkou byl obsah tenkého střeva, ve kterém nebyly nalezeny zvýšené koncentrace dimeru HA ani u jedné ze skupin. Naopak byly v obsahu tenkého střeva nalezeny násobně vyšší koncentrace středních a vyšších oHA v porovnání s obsahem ostatních částí trávicího traktu, zejména skupiny myší, kterým byla podána HA o molekulové hmotnosti 15 kDa. Po přepočtu na procentuální množství podané dávky HA je odlišnost výsledků dána různým množství odebraných vzorků obsahu GIT. Kompletní získaná data jsou uvedena v tabulkách 17 a 18.

3.5 Diskuse

Byla vyvinuta poměrně spolehlivá, citlivá a selektivní metoda UPLC-MS pro analýzu oHA, kterou lze aplikovat pro průkaz a stanovení hladin oHA v různých biologických vzorcích. Při vývoji metody jsme se potýkali s několika komplikacemi, zejména komplikacemi se separací oHA. Častým problémem bylo rozmývání píků zejména vyšších oHA, ale také nižší citlivost, rozlišení a posun retenčních časů. Podstatné snížení citlivosti, zejména u vyšších oHA, bylo způsobeno neadekvátním rozlišením detektoru (trojitý kvadrupól). Při kontrole rozlišení totiž detekce většinou neprobíhala při maximální odezvě. Pro optimální citlivost je nutné, aby detekce probíhala při maximální odezvě. Proto bylo nutno přístroj kalibrovat tak, aby se výrazně zlepšila citlivost detekce analyzovaných látek. S rostoucím počtem nástřiků na kolonu se kolona postupně zanášela a docházelo k značnému nárůstu šumu, rozmývání píků a dokonce i k posunu retenčních časů v důsledku až dvojnásobného nárůstu tlaku uvnitř kolony. Tyto skutečnosti postihují analýzu zejména vyšších oHA. Na obrázku 12 je zobrazeno několik chromatografických záznamů separace HA16 v závislosti na počtu nástřiků, patrný je zejména vliv počtu nástřiků na retenční čas a selektivitu HA16. Použitá kolona a podmínky separace jsou uvedeny v kapitole 2.8.



Obrázek 12 Vliv počtu nástřiků na separaci hexadekameru kyseliny hyaluronové

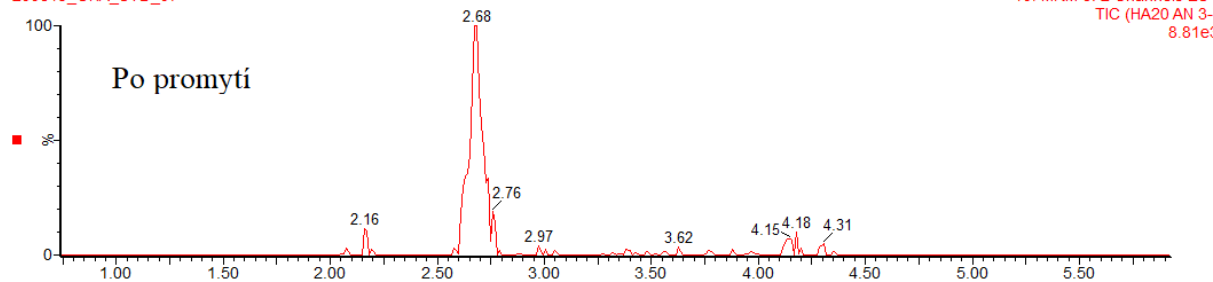
Z důvodu malého množství odebraného vzorku nebyly vzorky před analýzou filtrovány, nicméně byl zařazen in-line předkolonový filtr (s porozitou 0,2 μm). Filtry se poměrně brzy zanášely a byly poměrně často měněny. Problém se separací vyšších oHA jsme se pokoušeli

vyřešit využitím ochranné kolonky umístěné před analytickou kolonu, k významnému zlepšení separace však nedošlo. Vyskytl se i problém s posunem retenčních časů, ať již v důsledku zanesení samotné ochranné kolonky nebo v důsledku příliš pevného utažení spoje kapiláry ke koloně. Analyt se tak do kolony nedostával rovnoměrně, po mírném uvolnění spoje došlo částečně ke zlepšení. Příčinou zanášení kolony Atlantis Premier BEH C18 AX je pravděpodobně adheze analytu na kovové části kolony. Většina kovů je na povrchu potažena vrstvičkou oxidu, ve které mají ionty kovu kladné oxidační číslo, jsou elektron deficientní. Mnoho analytů však obsahuje funkční skupiny bohaté na elektrony, např. fosfáty či karboxylové skupiny mohou tedy adsorbovat k povrchu kolony. Tyto interakce jsou tím významnější, čím více je těchto funkčních skupin obsaženo v molekule [220]. oHA s řetězcem delším než 10 monomerů jsou těmito interakcemi již významně ovlivněny, neboť na každou jednotku disacharidu připadá jedna karboxylová skupina. Výsledkem může být špatný tvar píku, významné ztráty analytu a kvantitativní nepřesnosti [220]. Efektivním způsobem, jak předejít výše popsaným interakcím, je promytí kolony kyselinou fosforečnou [221]. Kyselina fosforečná pravděpodobně vyvazuje adsorbované látky z kovových částí kolony a zároveň vytváří na kovovém povrchu ochrannou vrstvičku zabraňující opětovné adsorpci látek, tento efekt trvá poměrně dlouho. Nutno podotknout, že se nejedná pouze o proplach kolony, ale také ventilů a ESI kapilár. Do hmotnostního spektrometru se pro svou silnou iontovou aktivitu kyselina fosforečná nesmí dostat, což je také důvodem, proč se nepoužívají v mobilních fázích fosfátové pufrů [221]. Na obrázcích 13-17 jsou zobrazeny chromatografické záznamy separace oHA před a po promytí výše zmíněných částí přístroje směsí kyseliny fosforečné a acetonitrilu. Použitá kolona a podmínky separace všech chromatografických záznamů jsou uvedeny v kapitole 2.8. Při porovnání těchto chromatografických záznamů je patrný poměrně zásadní vliv tohoto promývacího kroku na separaci oHA. Jedná se zejména o rozdíly v retenčních časech a účinnosti separace. Nejvýznamnější rozdíly byly zaznamenány u vyšších oHA, naopak u nižších oHA byly rozdíly méně významné. Také bylo zaznamenáno zvýšení citlivosti až o jeden řád.

ATLANTIS AX 2.1x50MM, STD OHA 1 UG/ML, after H3PO4 flush

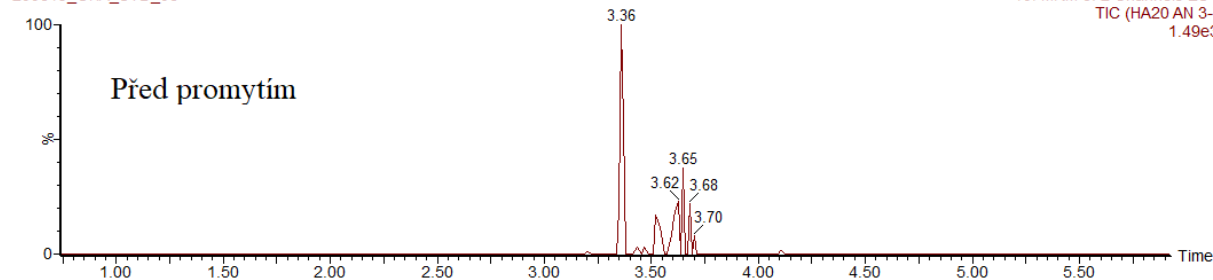
200619_OHA_STD_07

10: MRM of 2 Channels ES-TIC (HA20 AN 3-) 8.81e3



200619_OHA_STD_06

10: MRM of 2 Channels ES-TIC (HA20 AN 3-) 1.49e3

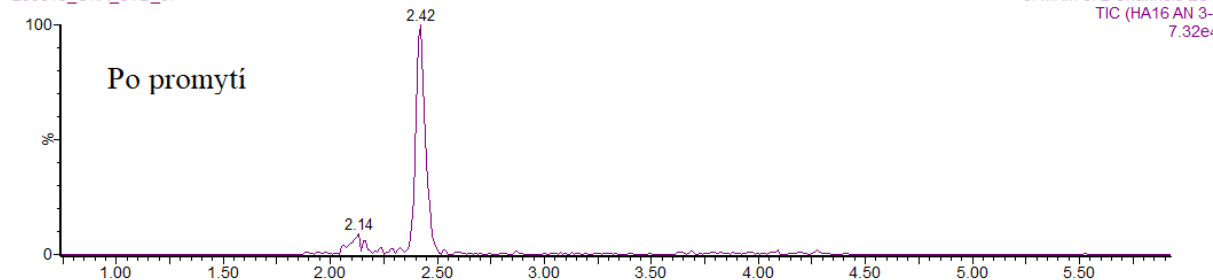


Obrázek 13 Vliv promytí na separaci eikosameru kyseliny hyaluronové

ATLANTIS AX 2.1x50MM, STD OHA 1 UG/ML

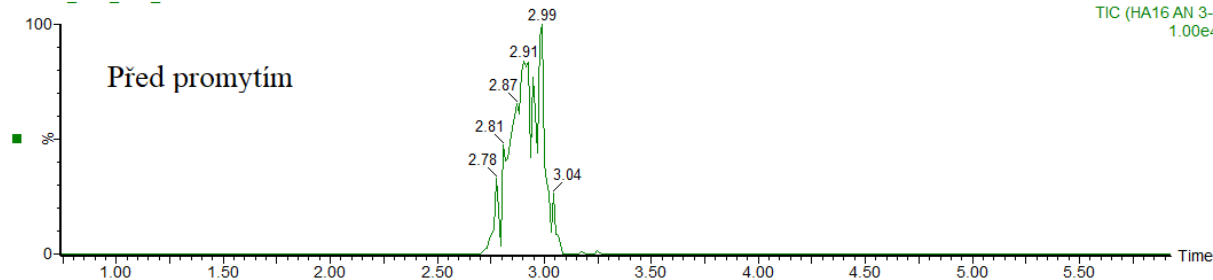
200619_OHA_STD_07

8: MRM of 2 Channels ES-TIC (HA16 AN 3-) 7.32e4



200619_OHA_STD_06

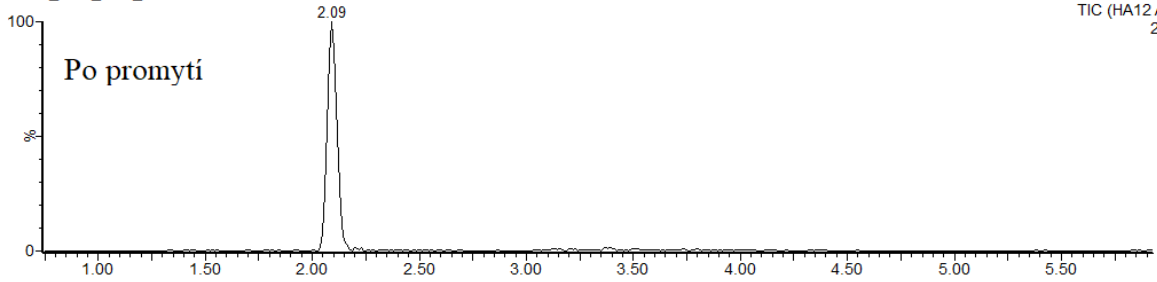
8: MRM of 2 Channels ES-TIC (HA16 AN 3-) 1.00e4



Obrázek 14 Vliv promytí na separaci hexadekameru kyseliny hyaluronové

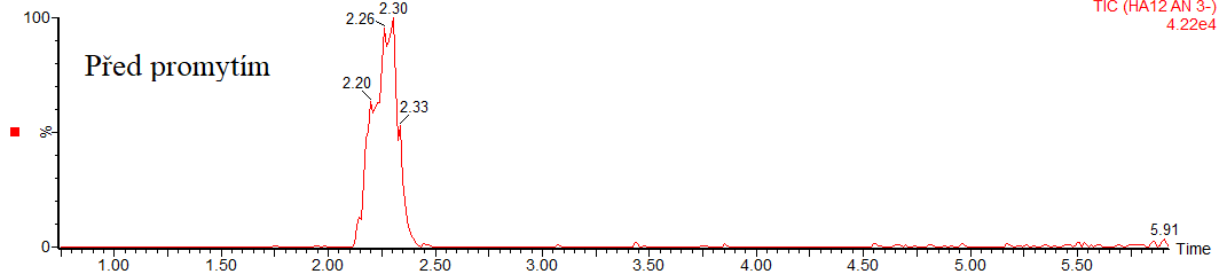
ATLANTIS AX 2.1x50MM, STD OHA 1 UG/ML

200619_OHA_STD_07



3: MRM of 2 Channels ES-TIC (HA12 AN 3-) 2.36e5

200619_OHA_STD_06

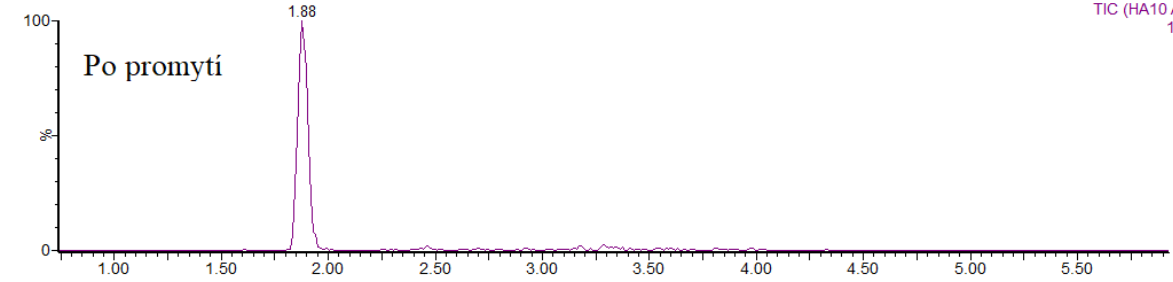


3: MRM of 2 Channels ES-TIC (HA12 AN 3-) 4.22e4

Obrázek 15 Vliv promytí na separaci dodekameru kyseliny hyaluronové

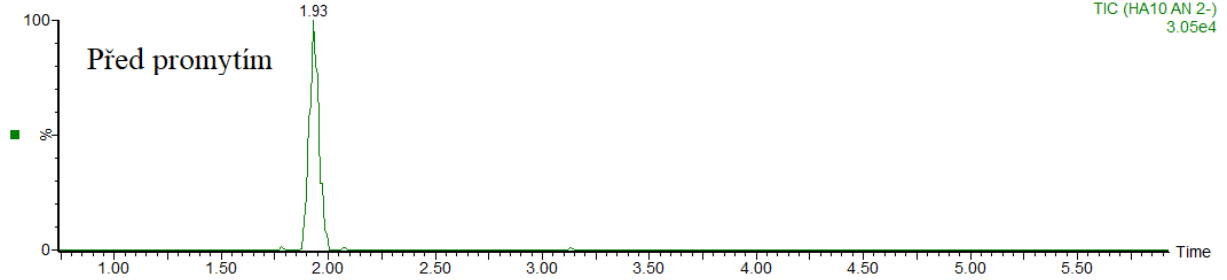
ATLANTIS AX 2.1x50MM, STD OHA 1 UG/ML

200619_OHA_STD_07



7: MRM of 2 Channels ES-TIC (HA10 AN 2-) 1.61e5

200619_OHA_STD_06



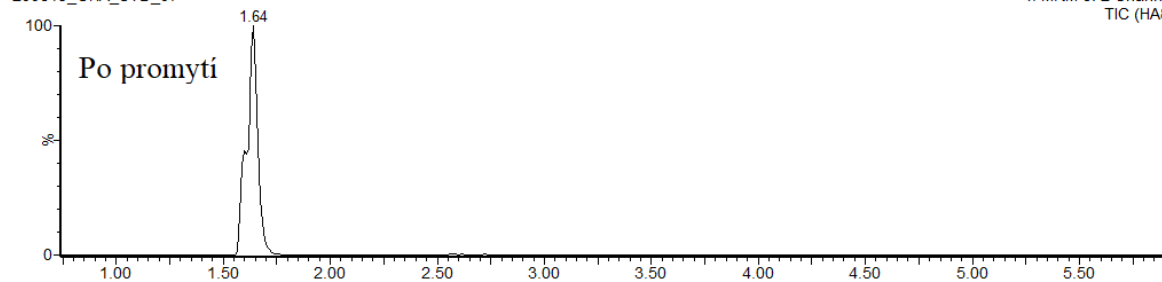
7: MRM of 2 Channels ES-TIC (HA10 AN 2-) 3.05e4

Obrázek 16 Vliv promytí na separaci dekameru kyseliny hyaluronové

ATLANTIS AX 2.1x50MM, STD OHA 1 UG/ML

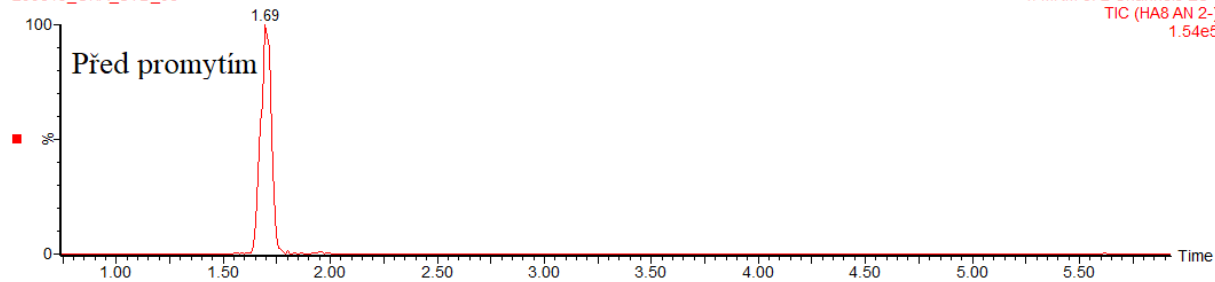
200619_OHA_STD_07

4: MRM of 2 Channels ES-
TIC (HA8 AN 2-)
5.92e5



200619_OHA_STD_06

4: MRM of 2 Channels ES-
TIC (HA8 AN 2-)
1.54e5



Obrázek 17 Vliv promytí na separaci oktameru kyseliny hyaluronové

4 ZÁVĚR

Kyselina hyaluronová je nevětvený nesulfatovaný heteropolysacharid, který má výjimečné fyzikálně-chemické vlastnosti, jako jsou biokompatibilita, biodegradabilita, mukoadhezivita, hygroskopicitata či viskoelasticitata. HA je velmi důležitá složka zejména v extracelulárním a pericelulárním prostoru, kde působí zároveň jako strukturální i signální molekula. Tyto mechanismy působení jsou silně závislé na molekulové hmotnosti HA. Za účelem zlepšení fyzikálně-chemických vlastností HA nebo farmakokinetických parametrů některých léků je možno HA chemicky modifikovat. Výjimečné vlastnosti, biologické funkce a možnosti modifikací HA jsou důvodem širokého využití například ve farmacii, při léčbě rakoviny, hojení ran, v oftalmologii, artrologii, pneumologii, rinologii, estetické medicíně a kosmetice nebo také při výrobě skafoldů. Stanovení hladin HA v séru může být využito také v diagnostice některých onemocnění, včetně rakoviny. Jelikož se hladiny HA v séru pohybují v řádech nanogramů, musí být metody pro stanovení této látky dostatečně citlivé, a vzhledem ke komplexnosti biologických vzorků, ve kterých se HA vyskytuje, také specifické.

Příprava vzorků před vlastní analýzou HA zahrnuje izolaci a purifikaci. Samotné stanovení HA je možno provést mnoha různými metodami. Nové kolorimetrické metody dosahují citlivosti až 0,3 mg/ml a opakovatelné kvantifikace v rozmezí 3-2000 mg/l. Tyto metody jsou levné, rychlé a vhodné pro stanovení celkového obsahu HA ve větších sériích vzorků, ale jsou málo citlivé oproti jiným metodám [177]. ELISA-like metody jsou dostatečně citlivé a specifické, v sendvičovém uspořádání dosahují citlivosti až 0,05 ng, v kompetitivním uspořádání prakticky nejsou omezeny molekulovou hmotností HA, avšak jsou finančně a časově náročné, samotná analýza trvá několik hodin. Metoda AlphaScreen[®] dosahuje citlivosti 0,08-4 ng a opakovatelné kvantifikace v rozmezí 30-1600 ng/ml [194]. Výborné citlivosti (0,5 ng/μl) lze dosáhnout také metodou CE s fluorescenční detekcí [188]. Metody UPLC-MS jsou velmi citlivé a specifické a podávají cenné informace o struktuře, jsou však vhodné pro analýzu oHA asi po 20-mer v závislosti na typu metody. Pro separaci oHA jsou využívány zejména metody HILIC nebo modifikované RPLC. Dle potřeby je možno zařadit také depolymerizaci a derivatizaci [68]. Derivatizací HA je možno dosáhnout výborné citlivosti, například limit detekce metody RPLC-MS pro stanovení AMAC derivátů HA je 0,1 ng [196, 198] Časová náročnost je dána jednak přípravou vzorku k analýze a jednak dobou separace, která se pohybuje v rozmezí 7-60 minut [68]. Kratší čas separace je na úkor nižší citlivosti, pro analýzu větších sérií vzorků je třeba zvolit kompromis rychlé separace a dostatečné citlivosti.

V rámci experimentální části byla vyvinuta poměrně spolehlivá, citlivá a selektivní metoda pro stanovení oHA v biologických vzorcích. Tato metoda zahrnuje úpravu vzorku extrakcí methanolem, separaci analytů metodou UPLC s online ESI-MS detekcí (trojitý kvadrupól). Doba přípravy vzorku k analýze trvá asi 3 hodiny, analyty jsou dostatečně separovány během 8 minut. Byla testována výtěžnost extrakce oHA pro jednotlivé matrice, testován vliv pH a množství matrice na výtěžnost extrakce. Dále byl testován vliv pH a koncentrace pufru v mobilní fázi na separaci oHA. Byl ověřen rozsah linearit, správnost a přesnost metody pro Δ HA8 a Δ HA16, s ohledem na velký rozptyl naměřených hodnot byl odhadnut LLOQ pro Δ HA8 (25 ng/ml) a Δ HA16 (50 ng/ml). Také byla ověřena stabilita oHA ve vzorcích trávicího traktu myší uchovávaných při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zavedená metoda byla využita pro stanovení oHA v reálných vzorcích gastrointestinálního traktu myší (obsahu žaludku, tenkého střeva, apendixu a tlustého střeva) pro účely studia farmakokinetiky HA o molekulové hmotnosti 15 kDa a 1562 kDa.

5 PŘÍLOHY

Tabulka 17 Hladiny vybraných uhlíkem ¹³C značených oligomerů hyaluronanu v obsahu jednotlivých částí trávicího traktu myši po podání uhlíkem ¹³C značené kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 15 a 1562 kDa

15 kDa HA		žaludek; průměr koncentrací (μg/g)						žaludek; směrodatné odchylky koncentrací (μg/g)					
doba působení (h)	ΔHA2	ΔHA8	ΔHA10	ΔHA12	ΔHA14	ΔHA16	ΔHA2	ΔHA8	ΔHA10	ΔHA12	ΔHA14	ΔHA16	
1	1,17	0,01	0,00	0,21	0,12	0,03	1,91	0,02	0,00	0,21	0,08	0,06	
2	1,91	0,04	0,00	0,30	0,20	0,08	1,66	0,04	0,00	0,22	0,15	0,07	
4	13,34	0,17	0,06	0,38	0,31	0,16	19,76	0,23	0,11	0,26	0,19	0,21	
6	8,51	0,25	0,15	0,83	0,74	0,46	3,29	0,21	0,25	0,51	0,43	0,43	
24	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	
1562 kDa HA		žaludek; průměr koncentrací (μg/g)						žaludek; směrodatné odchylky koncentrací (μg/g)					
doba působení (h)	ΔHA2	ΔHA8	ΔHA10	ΔHA12	ΔHA14	ΔHA16	ΔHA2	ΔHA8	ΔHA10	ΔHA12	ΔHA14	ΔHA16	
1	0,16	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
2	5,67	0,06	0,00	0,21	0,26	0,12	8,13	0,00	0,00	0,19	0,30	0,19	
4	2,59	0,09	0,06	0,33	0,21	0,34	3,76	0,11	0,00	0,49	0,22	0,59	
6	22,40	0,30	0,01	0,25	0,13	0,02	16,10	0,11	0,00	0,21	0,10	0,04	
24	0,00	0,00	0,00	0,04	0,03	0,00	0,00	0,14	0,11	0,00	0,02	0,00	
15 kDa HA		tenké střevo; průměr koncentrací (μg/g)						tenké střevo; směrodatné odchylky koncentrací (μg/g)					
doba působení (h)	ΔHA2	ΔHA8	ΔHA10	ΔHA12	ΔHA14	ΔHA16	ΔHA2	ΔHA8	ΔHA10	ΔHA12	ΔHA14	ΔHA16	
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12	
2	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,65	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	1,13	
4	0,88	0,00	0,00	0,43	0,00	0,34	1,08	0,00	0,00	0,37	0,00	0,59	
6	0,94	0,59	0,19	8,01	4,09	3,11	0,30	0,90	0,31	7,44	2,67	2,29	
24	0,00	0,00	0,10	0,00	0,49	0,00	0,00	0,00	0,17	0,00	0,43	0,00	
1562 kDa HA		tenké střevo; průměr koncentrací (μg/g)						tenké střevo; směrodatné odchylky koncentrací (μg/g)					
doba působení (h)	ΔHA2	ΔHA8	ΔHA10	ΔHA12	ΔHA14	ΔHA16	ΔHA2	ΔHA8	ΔHA10	ΔHA12	ΔHA14	ΔHA16	
1	0,00	0,00	0,00	3,58	1,05	0,00	0,00	0,00	0,00	6,21	1,32	0,00	
2	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
4	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
6	1,86	0,00	0,00	1,86	0,34	1,44	1,40	0,00	0,00	1,66	0,39	2,49	
24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,41	0,00	
15 kDa HA		apendix; průměr koncentrací (μg/g)						apendix; směrodatné odchylky koncentrací (μg/g)					
doba působení (h)	ΔHA2	ΔHA8	ΔHA10	ΔHA12	ΔHA14	ΔHA16	ΔHA2	ΔHA8	ΔHA10	ΔHA12	ΔHA14	ΔHA16	
1	0,43	0,01	0,00	0,09	0,02	0,00	0,25	0,00	0,00	0,00	0,03	0,01	
2	10,13	0,52	0,27	2,55	2,07	1,59	6,63	0,34	0,34	1,59	1,69	1,27	
4	12,85	0,32	0,05	1,16	0,61	1,28	13,37	0,39	0,09	1,75	1,06	2,22	
6	2,09	0,06	0,00	0,09	0,00	0,00	1,25	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	
24	0,00	0,01	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
1562 kDa HA		apendix; průměr koncentrací (μg/g)						apendix; směrodatné odchylky koncentrací (μg/g)					
doba působení (h)	ΔHA2	ΔHA8	ΔHA10	ΔHA12	ΔHA14	ΔHA16	ΔHA2	ΔHA8	ΔHA10	ΔHA12	ΔHA14	ΔHA16	
1	1,80	0,05	0,01	0,11	0,00	0,16	2,96	0,05	0,03	0,03	0,00	0,22	
2	15,84	0,31	0,03	1,02	0,69	0,17	13,00	0,36	0,04	1,19	0,62	0,22	
4	70,95	0,38	0,07	0,82	0,19	0,39	79,88	0,32	0,04	1,00	0,33	0,55	
6	8,55	0,16	0,00	0,15	0,00	0,02	7,47	0,31	0,04	0,10	0,00	0,03	
24	0,00	0,01	0,00	0,09	0,01	0,01	0,00	0,26	0,13	0,00	0,02	0,02	
15 kDa HA		tlusté střevo; průměr koncentrací (μg/g)						tlusté střevo; směrodatné odchylky koncentrací (μg/g)					
doba působení (h)	ΔHA2	ΔHA8	ΔHA10	ΔHA12	ΔHA14	ΔHA16	ΔHA2	ΔHA8	ΔHA10	ΔHA12	ΔHA14	ΔHA16	
1	0,07	0,05	0,00	0,24	0,15	0,27	0,08	0,00	0,00	0,20	0,00	0,00	
2	7,87	0,20	0,04	1,79	0,63	0,72	6,31	0,15	0,04	0,77	0,49	0,39	
4	23,62	0,49	0,10	1,85	0,72	0,84	14,09	0,28	0,17	2,24	0,94	0,93	
6	6,32	0,45	0,19	1,84	1,07	1,44	6,74	0,62	0,33	2,69	1,46	2,03	
24	0,00	0,05	0,00	0,85	0,16	0,27	0,00	0,00	0,00	0,74	0,03	0,00	
1562 kDa HA		tlusté střevo; průměr koncentrací (μg/g)						tlusté střevo; směrodatné odchylky koncentrací (μg/g)					
doba působení (h)	ΔHA2	ΔHA8	ΔHA10	ΔHA12	ΔHA14	ΔHA16	ΔHA2	ΔHA8	ΔHA10	ΔHA12	ΔHA14	ΔHA16	
1	0,60	0,06	0,00	0,06	0,15	0,29	1,01	0,01	0,00	0,04	0,01	0,04	
2	4,21	0,15	0,00	2,00	0,40	0,42	3,29	0,10	0,00	1,68	0,23	0,22	
4	61,74	0,70	0,24	2,53	1,26	1,55	82,34	0,37	0,15	0,10	0,38	0,91	
6	10,88	0,26	0,00	1,05	0,62	0,68	9,36	0,18	0,00	0,97	0,43	0,53	
24	0,00	0,05	0,00	1,43	0,26	0,27	0,00	0,00	0,00	1,61	0,12	0,00	

Tabulka 18 Procentuální množství vybraných uhlíkem ¹³C značených oligomerů hyaluronanu v obsahu jednotlivých částí trávicího traktu myši po podání uhlíkem ¹³C značené kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti 15 a 1562 kDa

15 kDa HA		žaludek; průměr vypočteného % dávky						žaludek; směrodatné odchylky % dávky					
doba působení (h)	ΔHA2	ΔHA8	ΔHA10	ΔHA12	ΔHA14	ΔHA16	ΔHA2	ΔHA8	ΔHA10	ΔHA12	ΔHA14	ΔHA16	
1	0,016%	0,000%	0,000%	0,003%	0,001%	0,000%	0,027%	0,000%	0,000%	0,003%	0,001%	0,001%	
2	0,047%	0,001%	0,000%	0,007%	0,005%	0,002%	0,051%	0,001%	0,000%	0,007%	0,006%	0,002%	
4	0,330%	0,005%	0,002%	0,012%	0,012%	0,005%	0,474%	0,005%	0,003%	0,006%	0,013%	0,005%	
6	0,081%	0,002%	0,001%	0,008%	0,007%	0,004%	0,028%	0,002%	0,002%	0,004%	0,004%	0,004%	
24	0,000%	0,000%	0,000%	0,001%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	
1562 kDa HA		žaludek; průměr vypočteného % dávky						žaludek; směrodatné odchylky % dávky					
doba působení (h)	ΔHA2	ΔHA8	ΔHA10	ΔHA12	ΔHA14	ΔHA16	ΔHA2	ΔHA8	ΔHA10	ΔHA12	ΔHA14	ΔHA16	
1	0,010%	0,000%	0,000%	0,003%	0,000%	0,000%	0,012%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	
2	0,121%	0,001%	0,000%	0,005%	0,006%	0,002%	0,170%	0,002%	0,000%	0,004%	0,006%	0,004%	
4	0,097%	0,004%	0,003%	0,012%	0,006%	0,014%	0,163%	0,006%	0,004%	0,021%	0,010%	0,024%	
6	0,568%	0,008%	0,000%	0,007%	0,003%	0,001%	0,452%	0,006%	0,001%	0,006%	0,002%	0,001%	
24	0,000%	0,000%	0,000%	0,001%	0,001%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	
15 kDa HA		tenké střevo; průměr vypočteného % dávky						tenké střevo; směrodatné odchylky % dávky					
doba působení (h)	ΔHA2	ΔHA8	ΔHA10	ΔHA12	ΔHA14	ΔHA16	ΔHA2	ΔHA8	ΔHA10	ΔHA12	ΔHA14	ΔHA16	
1	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	0,001%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	0,002%	
2	0,003%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	0,022%	0,003%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	0,038%	
4	0,017%	0,000%	0,000%	0,010%	0,000%	0,006%	0,018%	0,000%	0,000%	0,009%	0,000%	0,010%	
6	0,026%	0,021%	0,007%	0,248%	0,122%	0,085%	0,019%	0,034%	0,012%	0,298%	0,126%	0,073%	
24	0,000%	0,000%	0,003%	0,000%	0,013%	0,000%	0,000%	0,000%	0,006%	0,000%	0,013%	0,000%	
1562 kDa HA		tenké střevo; průměr vypočteného % dávky						tenké střevo; směrodatné odchylky % dávky					
doba působení (h)	ΔHA2	ΔHA8	ΔHA10	ΔHA12	ΔHA14	ΔHA16	ΔHA2	ΔHA8	ΔHA10	ΔHA12	ΔHA14	ΔHA16	
1	0,000%	0,000%	0,000%	0,083%	0,026%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	0,144%	0,029%	0,000%	
2	0,003%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	0,004%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	
4	0,001%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	0,001%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	
6	0,050%	0,000%	0,000%	0,049%	0,009%	0,036%	0,033%	0,000%	0,000%	0,043%	0,010%	0,063%	
24	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	0,006%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	0,010%	0,000%	
15 kDa HA		apendix; průměr vypočteného % dávky						apendix; směrodatné odchylky % dávky					
doba působení (h)	ΔHA2	ΔHA8	ΔHA10	ΔHA12	ΔHA14	ΔHA16	ΔHA2	ΔHA8	ΔHA10	ΔHA12	ΔHA14	ΔHA16	
1	0,009%	0,000%	0,000%	0,002%	0,000%	0,000%	0,006%	0,000%	0,000%	0,000%	0,001%	0,000%	
2	0,269%	0,014%	0,008%	0,068%	0,054%	0,044%	0,173%	0,010%	0,011%	0,043%	0,040%	0,038%	
4	0,325%	0,010%	0,002%	0,037%	0,020%	0,042%	0,285%	0,013%	0,003%	0,058%	0,034%	0,072%	
6	0,046%	0,001%	0,000%	0,002%	0,000%	0,000%	0,026%	0,001%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	
24	0,000%	0,000%	0,000%	0,003%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	
1562 kDa HA		apendix; průměr vypočteného % dávky						apendix; směrodatné odchylky % dávky					
doba působení (h)	ΔHA2	ΔHA8	ΔHA10	ΔHA12	ΔHA14	ΔHA16	ΔHA2	ΔHA8	ΔHA10	ΔHA12	ΔHA14	ΔHA16	
1	0,033%	0,001%	0,000%	0,002%	0,000%	0,003%	0,054%	0,001%	0,000%	0,001%	0,000%	0,004%	
2	0,472%	0,009%	0,001%	0,030%	0,021%	0,005%	0,388%	0,009%	0,001%	0,035%	0,018%	0,006%	
4	2,203%	0,013%	0,003%	0,028%	0,006%	0,013%	2,374%	0,010%	0,005%	0,035%	0,011%	0,019%	
6	0,255%	0,005%	0,000%	0,004%	0,000%	0,001%	0,241%	0,005%	0,000%	0,004%	0,000%	0,001%	
24	0,000%	0,000%	0,000%	0,002%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	0,001%	0,001%	0,000%	
15 kDa HA		tlusté střevo; průměr vypočteného % dávky						tlusté střevo; směrodatné odchylky % dávky					
doba působení (h)	ΔHA2	ΔHA8	ΔHA10	ΔHA12	ΔHA14	ΔHA16	ΔHA2	ΔHA8	ΔHA10	ΔHA12	ΔHA14	ΔHA16	
1	0,001%	0,001%	0,000%	0,003%	0,002%	0,004%	0,001%	0,000%	0,000%	0,003%	0,001%	0,001%	
2	0,141%	0,004%	0,001%	0,035%	0,009%	0,014%	0,130%	0,006%	0,001%	0,036%	0,006%	0,015%	
4	0,307%	0,006%	0,001%	0,021%	0,008%	0,010%	0,208%	0,002%	0,002%	0,023%	0,010%	0,009%	
6	0,085%	0,006%	0,002%	0,024%	0,014%	0,019%	0,079%	0,007%	0,004%	0,033%	0,017%	0,024%	
24	0,000%	0,001%	0,000%	0,011%	0,002%	0,004%	0,000%	0,000%	0,000%	0,010%	0,000%	0,001%	
1562 kDa HA		tlusté střevo; průměr vypočteného % dávky						tlusté střevo; směrodatné odchylky % dávky					
doba působení (h)	ΔHA2	ΔHA8	ΔHA10	ΔHA12	ΔHA14	ΔHA16	ΔHA2	ΔHA8	ΔHA10	ΔHA12	ΔHA14	ΔHA16	
1	0,008%	0,001%	0,000%	0,001%	0,002%	0,003%	0,013%	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	0,001%	
2	0,058%	0,002%	0,000%	0,026%	0,005%	0,006%	0,049%	0,001%	0,000%	0,021%	0,003%	0,005%	
4	1,001%	0,010%	0,003%	0,035%	0,017%	0,019%	1,430%	0,008%	0,003%	0,008%	0,008%	0,008%	
6	0,104%	0,002%	0,000%	0,010%	0,006%	0,007%	0,102%	0,002%	0,000%	0,011%	0,003%	0,006%	
24	0,000%	0,001%	0,000%	0,019%	0,003%	0,004%	0,000%	0,000%	0,000%	0,021%	0,001%	0,000%	

6 SEZNAM LITERATURY

- [1] NECAS, J., L. BARTOSIKOVA, P. BRAUNER a J. KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinární Medicína* [online]. 2008. ISSN 03758427, 18059392. Dostupné z: doi:10.17221/1930-VETMED
- [2] PRICE, R. D., M.G. BERRY a H. A. NAVSARIA. Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* [online]. 2007. ISSN 17486815. Dostupné z: doi:10.1016/j.bjps.2007.03.005
- [3] GUPTA, R. C., R. LALL, A. SRIVASTAVA a A. SINHA. Hyaluronic acid: molecular mechanisms and therapeutic trajectory. *Frontiers in Veterinary Science* [online]. 2019. ISSN 2297-1769. Dostupné z: doi:10.3389/fvets.2019.00192
- [4] FALLACARA, A., E. BALDINI, S. MANFREDINI a S. VERTUANI. Hyaluronic acid in the third millennium. *Polymers* [online]. 2018. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym10070701
- [5] BOERIU, C. G., J. SPRINGER, F. K. KOOY, L. A. M. VAN DEN BROEK a G. EGGINK. Production methods for hyaluronan. *International Journal of Carbohydrate Chemistry* [online]. 2013. ISSN 1687-9341, 1687-935X. Dostupné z: doi:10.1155/2013/624967
- [6] MILLER, D. a R. STEGMANN. Use of Na-hyaluronate in anterior segment eye surgery. *American Intra-Ocular Implant Society Journal* [online]. 1980. ISSN 01462776. Dostupné z: doi:10.1016/S0146-2776(80)80097-8
- [7] BALAZS, E. A. a J. L. DENLINGER. Sodium hyaluronate and joint function. *Journal of Equine Veterinary Science* [online]. 1985. ISSN 07370806. Dostupné z: doi:10.1016/S0737-0806(85)80102-7
- [8] DOUGADOS, M., M. NGUYEN, V. LISTRAT a B. AMOR. High molecular weight sodium hyaluronate (hyalectin) in osteoarthritis of the knee: a 1 year placebo-controlled trial. *Osteoarthritis and Cartilage* [online]. 1993. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8886085/>
- [9] JUHLIN, L. Hyaluronan in skin. *Journal of Internal Medicine* [online]. 1997. ISSN 09546820. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2796.1997.00175.x

- [10] ABATANGELO, G., M. MARTELLI a P. VECCHIA. Healing of hyaluronic acid-enriched wounds: histological observations. *Journal of Surgical Research* [online]. 1983. ISSN 00224804. Dostupné z: doi:10.1016/0022-4804(83)90030-6
- [11] DURANTI, F., G. SALTI, B. BOVANI, M. CALANDRA a M. L. ROSATI. Injectable hyaluronic acid gel for soft tissue augmentation: a clinical and histological study. *Dermatologic Surgery* [online]. 1998. ISSN 1076-0512. Dostupné z: doi:10.1111/j.1524-4725.1998.tb00007.x
- [12] BENEDETTI, L.M., E.M. TOPP a V.J. STELLA. Microspheres of hyaluronic acid esters—fabrication methods and in vitro hydrocortisone release. *Journal of Controlled Release* [online]. 1990. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/0168-3659(90)90072-2
- [13] COWMAN, M. K. a S. MATSUOKA. Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydrate Research* [online]. 2005. ISSN 00086215. Dostupné z: doi:10.1016/j.carres.2005.01.022
- [14] SCOTT, J. E. a F. HEATLEY. Hyaluronan forms specific stable tertiary structures in aqueous solution: A ¹³C NMR study. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1999. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.96.9.4850
- [15] ŠIMEK, M., K. LEMR, M. HERMANNOVÁ a V. HAVLÍČEK. Analysis of hyaluronan and its derivatives using chromatographic and mass spectrometric techniques. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2020. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2020.117014
- [16] KNOPF-MARQUES, H., M. PRAVDA, L. WOLFOVA, V. VELEBNY, P. SCHAAF, N. E. VRANA a P. LAVALLE. Hyaluronic acid and its derivatives in coating and delivery systems: applications in tissue engineering, regenerative medicine and immunomodulation. *Advanced Healthcare Materials* [online]. 2016. ISSN 21922640. Dostupné z: doi:10.1002/adhm.201600316
- [17] FRASER, J. R. E., T. C. LAURENT a U. B. G. LAURENT. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine* [online]. 1997. ISSN 09546820. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2796.1997.00170.x
- [18] HEATLEY, F a J E SCOTT. A water molecule participates in the secondary structure of hyaluronan. *Biochemical Journal* [online]. 1988. ISSN 0264-6021, 1470-8728. Dostupné z: doi:10.1042/bj2540489

- [19] SCOTT, J E, C CUMMINGS, A BRASS a Y CHEN. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. Hyaluronan is a very efficient network-forming polymer. *Biochemical Journal* [online]. 1991. ISSN 0264-6021, 1470-8728. Dostupné z: doi:10.1042/bj2740699
- [20] KOBAYASHI, Y., A. OKAMOTO a K. NISHINARI. Viscoelasticity of hyaluronic acid with different molecular weights. *Biorheology* [online]. 1994. ISSN 18785034, 0006355X. Dostupné z: doi:10.3233/BIR-1994-31302
- [21] LAURENT, T. C, U. B. LAURENT a J R. E FRASER. The structure and function of hyaluronan: an overview. *Immunology and Cell Biology* [online]. 1996. ISSN 08189641. Dostupné z: doi:10.1038/icb.1996.32
- [22] RWEI, S.-P., S.-W. CHEN, C.-F. MAO a H.-W. FANG. Viscoelasticity and wearability of hyaluronate solutions. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2008. ISSN 1369703X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bej.2007.12.021
- [23] LAPČÍK, L., S. DE SMEDT, J. DEMEESTER a P. CHABREČEK. Hyaluronan: preparation, structure, properties, and applications †. *Chemical Reviews* [online]. 1998. ISSN 0009-2665, 1520-6890. Dostupné z: doi:10.1021/cr941199z
- [24] MALEKI, A., A.-L. KJØNIKSEN a B. NYSTRÖM. Effect of pH on the behavior of hyaluronic acid in dilute and semidilute aqueous solutions. *Macromolecular Symposia* [online]. 2008. ISSN 10221360, 15213900. Dostupné z: doi:10.1002/masy.200851418
- [25] PISÁRČÍK, M., D. BAKOŠ a M. ČEPPAN. Non-Newtonian properties of hyaluronic acid aqueous solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 1995. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/0927-7757(95)03097-W
- [26] DE OLIVEIRA, J. D., L. S. CARVALHO, A. M. V. GOMES, L. R. QUEIROZ, B. S. MAGALHÃES a N. S. PARACHIN. Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms. *Microbial Cell Factories* [online]. 2016. ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/s12934-016-0517-4
- [27] SCHIRALDI, C., A. LA a M. DE. Biotechnological production and application of hyaluronan. *Biopolymers* [online]. 2010. ISBN 978-953-307-109-1. Dostupné z: doi:10.5772/10271

- [28] VOLPI, N. a F. MACCARI. Purification and characterization of hyaluronic acid from the mollusc bivalve *Mytilus galloprovincialis*. *Biochimie* [online]. 2003. ISSN 03009084. Dostupné z: doi:10.1016/S0300-9084(03)00083-X
- [29] KOGAN, G., L. ŠOLTÉS, R. STERN a P. GEMEINER. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters* [online]. 2006. ISSN 0141-5492, 1573-6776. Dostupné z: doi:10.1007/s10529-006-9219-z
- [30] VOLPI, N., J. SCHILLER, R. STERN a L. SOLTES. Role, metabolism, chemical modifications and applications of hyaluronan. *Current Medicinal Chemistry* [online]. 2009. ISSN 09298673. Dostupné z: doi:10.2174/092986709788186138
- [31] COWMAN, M. K. Hyaluronan and hyaluronan fragments. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* [online]. 2017. ISBN 978-0-12-812077-4. Dostupné z: doi:10.1016/bs.accb.2017.10.001
- [32] COWMAN, M. K., H.-G. LEE, K. L. SCHWERTFEGER, J. B. MCCARTHY a E. A. TURLEY. The content and size of hyaluronan in biological fluids and tissues. *Frontiers in Immunology* [online]. 2015. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2015.00261
- [33] ADAMIA, S., C. MAXWELL a L. PILARSKI. Hyaluronan and hyaluronan synthases: potential therapeutic targets in cancer. *Current Drug Target - Cardiovascular & Hematological Disorders* [online]. 2005. ISSN 15680061. Dostupné z: doi:10.2174/1568006053005056
- [34] CYPHERT, J. M., C. S. TREMPUS a S. GARANTZIOTIS. Size matters: molecular weight specificity of hyaluronan effects in cell biology. *International Journal of Cell Biology* [online]. 2015. ISSN 1687-8876, 1687-8884. Dostupné z: doi:10.1155/2015/563818
- [35] ROBERT, L., A.-M. ROBERT a G. RENARD. Biological effects of hyaluronan in connective tissues, eye, skin, venous wall, role in aging. *Pathologie Biologie* [online]. 2010. ISSN 03698114. Dostupné z: doi:10.1016/j.patbio.2009.09.010
- [36] JIANG, D., J. LIANG a P. W. NOBLE. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiological Reviews* [online]. 2011. ISSN 0031-9333, 1522-1210. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.00052.2009
- [37] AYA, K. L. a R. STERN. Hyaluronan in wound healing: rediscovering a major player. *Wound Repair and Regeneration* [online]. 2014. ISSN 1067-1927, 1524-475X. Dostupné z: doi:10.1111/wrr.12214

- [38] MATTHEOLABAKIS, G., L. MILANE, A. SINGH a M. M. AMIJI. Hyaluronic acid targeting of CD44 for cancer therapy: from receptor biology to nanomedicine. *Journal of Drug Targeting* [online]. 2015. ISSN 1061-186X, 1029-2330. Dostupné z: doi:10.3109/1061186X.2015.1052072
- [39] SCHANTÉ, C. E., G. ZUBER, C. HERLIN a T. F. VANDAMME. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2011. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2011.03.019
- [40] GARANTZIOTIS, S., M. BREZINA, P. CASTELNUOVO a L. DRAGO. The role of hyaluronan in the pathobiology and treatment of respiratory disease. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* [online]. 2016. ISSN 1040-0605, 1522-1504. Dostupné z: doi:10.1152/ajplung.00168.2015
- [41] MCCARTHY, J. B., K. L. SCHWERTFEGER, M. K. COWMAN, P. G. TELMER a E. A. TURLEY. Hyaluronan, inflammation, and breast cancer progression. *Frontiers in Immunology*. [online]. 2015. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2015.00236/full>
- [42] OE, M., T. TASHIRO, H. YOSHIDA, H. NISHIYAMA, Y. MASUDA, K. MARUYAMA, T. KOIKEDA, R. MARUYA a N. FUKUI. Oral hyaluronan relieves knee pain: a review. *Nutrition Journal* [online]. 2015. ISSN 1475-2891. Dostupné z: doi:10.1186/s12937-016-0128-2
- [43] GARANTZIOTIS, S. a R. C. SAVANI. Hyaluronan biology: a complex balancing act of structure, function, location and context. *Matrix Biology* [online]. 2019. ISSN 0945053X. Dostupné z: doi:10.1016/j.matbio.2019.02.002
- [44] KAWADA, C., T. YOSHIDA, H. YOSHIDA, R. MATSUOKA, W. SAKAMOTO, W. ODANAKA, T. SATO, T. YAMASAKI, T. KANEMITSU, Y. MASUDA a O. URUSHIBATA. Ingested hyaluronan moisturizes dry skin. *Nutrition Journal* [online]. 2014. ISSN 1475-2891. Dostupné z: doi:10.1186/1475-2891-13-70
- [45] WEIGEL, P. H., V. C. HASCALL a M. TAMMI. Hyaluronan synthases. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1997. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.272.22.13997

- [46] ITANO, N. a K. KIMATA. Mammalian hyaluronan synthases. *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)* [online]. 2002. ISSN 1521-6543, 1521-6551. Dostupné z: doi:10.1080/15216540214929
- [47] JIANG, D., J. LIANG a P. W. NOBLE. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* [online]. 2007. ISSN 1081-0706, 1530-8995. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123337
- [48] VIGETTI, D., E. KAROUSOU, M. VIOLA, S. DELEONIBUS, G. DE LUCA a A. PASSI. Hyaluronan: biosynthesis and signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 2014. ISSN 03044165. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagen.2014.02.001
- [49] GIRISH, K.S. a K. KEMPARAJU. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sciences* [online]. 2007. ISSN 00243205. Dostupné z: doi:10.1016/j.lfs.2007.02.037
- [50] STERN, R. a M. J. JEDRZEJAS. Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chemical Reviews* [online]. 2006. ISSN 0009-2665, 1520-6890. Dostupné z: doi:10.1021/cr050247k
- [51] CSOKA, A. B., G. I. FROST a R. STERN. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biology* [online]. 2001. ISSN 0945053X. Dostupné z: doi:10.1016/S0945-053X(01)00172-X
- [52] LOKESHWAR, V. B., D. RUBINOWICZ, G. L. SCHROEDER, E. FORGACS, J. D. MINNA, N. L. BLOCK, M. NADJI a B. L. LOKESHWAR. Stromal and epithelial expression of tumor markers hyaluronic acid and HYAL1 hyaluronidase in prostate cancer. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2001. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M008432200
- [53] LOKESHWAR, V. B. a M. G. SELZER. Hyaluronidase: both a tumor promoter and suppressor. *Seminars in Cancer Biology* [online]. 2008. ISSN 1044579X. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcancer.2008.03.008
- [54] ŠOLTÉS, L., R. MENDICHI, G. KOGAN, J. SCHILLER, M. STANKOVSKÁ a J. ARNHOLD. Degradative action of reactive oxygen species on hyaluronan. *Biomacromolecules* [online]. 2006. ISSN 1525-7797, 1526-4602. Dostupné z: doi:10.1021/bm050867v

- [55] MONZON, M. E., N. FREGIEN, N. SCHMID, N. S. FALCON, M. CAMPOS, S. M. CASALINO-MATSUDA a R. M. FORTEZA. Reactive oxygen species and hyaluronidase 2 regulate airway epithelial hyaluronan fragmentation*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2010. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M110.135194
- [56] SCHILLER, J., B. FUCHS, J. ARNHOLD a K. ARNOLD. Contribution of reactive oxygen species to cartilage degradation in rheumatic diseases: molecular pathways, diagnosis and potential therapeutic strategies. *Current Medicinal Chemistry* [online]. 2003. ISSN 09298673. Dostupné z: doi:10.2174/0929867033456828
- [57] TOOLE, B. P. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nature Reviews Cancer* [online]. 2004. ISSN 1474-175X, 1474-1768. Dostupné z: doi:10.1038/nrc1391
- [58] EBID, R., J. LICHTNEKERT a H-J. ANDERS. Hyaluronan is not a ligand but a regulator of toll-like receptor signaling in mesangial cells: role of extracellular matrix in innate immunity. *ISRN Nephrology* [online]. 2014. ISSN 2314-405X. Dostupné z: doi:10.1155/2014/714081
- [59] TAMER, T. M.. Hyaluronan and synovial joint: function, distribution and healing. *Interdisciplinary Toxicology* [online]. 2013. ISSN 1337-9569, 1337-6853. Dostupné z: doi:10.2478/intox-2013-0019
- [60] HELDIN, P., C-Y. LIN, C. KOLLIPOULOS, Y-H. CHEN a S. S. SKANDALIS. Regulation of hyaluronan biosynthesis and clinical impact of excessive hyaluronan production. *Matrix Biology* [online]. 2019. ISSN 0945053X. Dostupné z: doi:10.1016/j.matbio.2018.01.017
- [61] WU, M., M. CAO, Y. HE, Y. LIU, C. YANG, Y. DU, W. WANG a F. GAO. A novel role of low molecular weight hyaluronan in breast cancer metastasis. *The FASEB Journal* [online]. 2015. ISSN 0892-6638, 1530-6860. Dostupné z: doi:10.1096/fj.14-259978
- [62] KIM, M. Y., J. MUTO a R. L. GALLO. Hyaluronic acid oligosaccharides suppress tlr3-dependent cytokine expression in a TLR4-dependent manner. *PLoS ONE* [online]. 2013. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0072421
- [63] MISRA, S., B. P. TOOLE a S. GHATAK. Hyaluronan constitutively regulates activation of multiple receptor tyrosine kinases in epithelial and carcinoma cells*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2006. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.C600138200

- [64] GAO, F., C. X. YANG, W. MO, Y. W. LIU a Y. Q. HE. Hyaluronan oligosaccharides are potential stimulators to angiogenesis via RHAMM mediated signal pathway in wound healing. *Clinical & Investigative Medicine* [online]. 2008. ISSN 1488-2353. Dostupné z: doi:10.25011/cim.v31i3.3467
- [65] YANG, C., M. CAO, H. LIU, Y. HE, J. XU, Y. DU, Y. LIU, W. WANG, L. CUI, J. HU a F. GAO. The high and low molecular weight forms of hyaluronan have distinct effects on CD44 clustering*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2012. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M112.349209
- [66] REED, R. K., U. B. LAURENT, J. R. FRASER a T. C. LAURENT. Removal rate of [3H]hyaluronan injected subcutaneously in rabbits. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* [online]. 1990. ISSN 0363-6135, 1522-1539. Dostupné z: doi:10.1152/ajpheart.1990.259.2.H532
- [67] SVANOVSKY, E., V. VELEBNÝ, A. LAZNICKOVA a M. LAZNICEK. The effect of molecular weight on the biodistribution of hyaluronic acid radiolabeled with ¹¹¹In after intravenous administration to rats. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* [online]. 2008. ISSN 0378-7966, 2107-0180. Dostupné z: doi:10.1007/BF03191112
- [68] ŠIMEK, M., K. NEŠPOROVÁ, A. KOCURKOVÁ, T. FOGLOVÁ, G. AMBROŽOVÁ, V. VELEBNÝ, L. KUBALA a M. HERMANNOVÁ. How the molecular weight affects THE in vivo fate of exogenous hyaluronan delivered intravenously: a stable-isotope labelling strategy. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2021. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2021.117927
- [69] DE SOUZA, A. B., M. V. CHAUD a M. H. A. SANTANA. Hyaluronic acid behavior in oral administration and perspectives for nanotechnology-based formulations: a review. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2019. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2019.115001
- [70] MUTO, J., K. YAMASAKI, K. R. TAYLOR a R. L. GALLO. Engagement of CD44 by hyaluronan suppresses TLR4 signaling and the septic response to LPS. *Molecular Immunology* [online]. 2009. ISSN 01615890. Dostupné z: doi:10.1016/j.molimm.2009.08.026

- [71] RUBAS, W. a G. M. GRASS. Gastrointestinal lymphatic absorption of peptides and proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 1991. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/0169-409X(91)90047-G
- [72] BURGDORF, S., A. KAUTZ, V. BOHNERT, P. A. KNOLLE a C. KURTS. Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science* [online]. 2007. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1137971
- [73] KIMURA, M., T. MAESHIMA, T. KUBOTA, H. KURIHARA, Y. MASUDA a Y. NOMURA. Absorption of orally administered hyaluronan. *Journal of Medicinal Food* [online]. 2016. ISSN 1096-620X, 1557-7600. Dostupné z: doi:10.1089/jmf.2016.3725
- [74] BALOGH, L., A. POLYAK, D. MATHE, R. KIRALY, J. THUROCZY, M. TEREZ, G. JANOKI, Y. TING, L. R. BUCCI a A. G. SCHAUSS. Absorption, uptake and tissue affinity of high-molecular-weight hyaluronan after oral administration in rats and dogs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2008. ISSN 0021-8561, 1520-5118. Dostupné z: doi:10.1021/jf8017029
- [75] KAWADA, C., M. KIMURA, Y. MASUDA a Y. NOMURA. Oral administration of hyaluronan prevents skin dryness and epidermal thickening in ultraviolet irradiated hairless mice. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [online]. 2015. ISSN 10111344. Dostupné z: doi:10.1016/j.jphotobiol.2015.09.020
- [76] DI CERBO, A., M. APONTE, R. ESPOSITO, M. BONDI a B. PALMIERI. Comparison of the effects of hyaluronidase and hyaluronic acid on probiotics growth. *BMC Microbiology* [online]. 2013. ISSN 1471-2180. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2180-13-243
- [77] KOROPATKIN, N. M., E. A. CAMERON a E. C. MARTENS. How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2012. ISSN 1740-1526, 1740-1534. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro2746
- [78] MATSUKI, T., T. PÉDRON, B. REGNAULT, C. MULET, T. HARA a P. J. SANSONETTI. Epithelial cell proliferation arrest induced by lactate and acetate from lactobacillus casei and bifidobacterium breve. *PLoS ONE* [online]. 2013. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0063053
- [79] ABREU, M. T. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nature Reviews Immunology* [online]. 2010. ISSN 1474-1733, 1474-1741. Dostupné z: doi:10.1038/nri2707

- [80] SALATIN, S. a A. YARI KHOSROUSHAHI. Overviews on the cellular uptake mechanism of polysaccharide colloidal nanoparticles. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* [online]. 2017. ISSN 15821838. Dostupné z: doi:10.1111/jcmm.13110
- [81] ABBOTT, L. C. a A. D. MAYNARD. Exposure assessment approaches for engineered nanomaterials: perspective. *Risk Analysis* [online]. 2010. ISSN 02724332. Dostupné z: doi:10.1111/j.1539-6924.2010.01446.x
- [82] XIAO, B., M. K. HAN, E. VIENNOIS, L. WANG, M. ZHANG, X. SI a D. MERLIN. Hyaluronic acid-functionalized polymeric nanoparticles for colon cancer-targeted combination chemotherapy. *Nanoscale* [online]. 2015. ISSN 2040-3364, 2040-3372. Dostupné z: doi:10.1039/C5NR04831A
- [83] SHIEDLIN, A., R. BIGELOW, W. CHRISTOPHER, S. ARBABI, L. YANG, R. V. MAIER, N. WAINWRIGHT, A. CHILDS a R. J. MILLER. Evaluation of hyaluronan from different sources: *Streptococcus zooepidemicus*, rooster comb, bovine vitreous, and human umbilical cord. *Biomacromolecules* [online]. 2004. ISSN 1525-7797, 1526-4602. Dostupné z: doi:10.1021/bm0498427
- [84] RANGASWAMY, V. a D. JAIN. An efficient process for production and purification of hyaluronic acid from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Biotechnology Letters* [online]. 2008. ISSN 0141-5492, 1573-6776. Dostupné z: doi:10.1007/s10529-007-9562-8
- [85] KIM, J.-H., S.-J. YOO, D.-K. OH, Y.-G. KWEON, D.-W. PARK, C.-H. LEE a G.-H. GIL. Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 1996. ISSN 01410229. Dostupné z: doi:10.1016/S0141-0229(96)00019-1
- [86] KAUR, M. a G. JAYARAMAN. Hyaluronan production and molecular weight is enhanced in pathway-engineered strains of lactate dehydrogenase-deficient *Lactococcus lactis*. *Metabolic Engineering Communications* [online]. 2016. ISSN 22140301. Dostupné z: doi:10.1016/j.meteno.2016.01.003
- [87] CHIEN, L.-J. a C.-K. LEE. enhanced hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis* by coexpressing bacterial hemoglobin. *Biotechnology Progress* [online]. 2007. ISSN 8756-7938. Dostupné z: doi:10.1021/bp070036w

- [88] YU, H. a G. STEPHANOPOULOS. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid. *Metabolic Engineering* [online]. 2008. ISSN 10967176. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymben.2007.09.001
- [89] DEANGELIS, P. Monodisperse hyaluronan polymers: synthesis and potential applications. *Current Pharmaceutical Biotechnology* [online]. 2008. ISSN 13892010. Dostupné z: doi:10.2174/138920108785161550
- [90] STERN, R., G. KOGAN, M. J. JEDRZEJAS a L. ŠOLTÉS. The many ways to cleave hyaluronan. *Biotechnology Advances* [online]. 2007. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2007.07.001
- [91] FALLACARA, A., S. VERTUANI, G. PANOZZO, A. PECORELLI, G. VALACCHI a S. MANFREDINI. Novel artificial tears containing cross-linked hyaluronic acid: an in vitro re-epithelialization study. *Molecules* [online]. 2017. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules22122104
- [92] FALLACARA, A., S. MANFREDINI, E DURINI a S. VERTUANI. Hyaluronic acid fillers in soft tissue regeneration. *Facial Plastic Surgery* [online]. 2017. ISSN 0736-6825, 1098-8793. Dostupné z: doi:10.1055/s-0036-1597685
- [93] SHIMOJO, A. A. M., A. M. B. PIRES, R. LICHY, A. A. RODRIGUES a M. H. A. SANTANA. The crosslinking degree controls the mechanical, rheological, and swelling properties of hyaluronic acid microparticles: properties of hyaluronic acid microparticles. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2015. ISSN 15493296. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.35225
- [94] COLLINS, M. N. a C. BIRKINSHAW. Physical properties of crosslinked hyaluronic acid hydrogels. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 2008. ISSN 0957-4530, 1573-4838. Dostupné z: doi:10.1007/s10856-008-3476-4
- [95] MALEKI, A., A.-L. KJØNIKSEN a B. NYSTRÖM. Characterization of the chemical degradation of hyaluronic acid during chemical gelation in the presence of different cross-linker agents. *Carbohydrate Research* [online]. 2007. ISSN 00086215. Dostupné z: doi:10.1016/j.carres.2007.08.021
- [96] LARRAÑETA, E., M. HENRY, N. J. IRWIN, J. TROTTER, A. A. PERMINOVA, R. F. DONNELLY. Synthesis and characterization of hyaluronic acid hydrogels crosslinked using

a solvent-free process for potential biomedical applications. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2017. Dostupné z: <https://www.journals.elsevier.com/carbohydrate-polymers>

[97] BHATTACHARYA, D. S., D. SVECHKAREV, J. J. SOUCHEK, T. K. HILL, M. A. TAYLOR, A. NATARAJAN a A. M. MOHS. Impact of structurally modifying hyaluronic acid on CD44 interaction. *J. Mater. Chem. B* [online]. 2017. ISSN 2050-750X, 2050-7518. Dostupné z: [doi:10.1039/C7TB01895A](https://doi.org/10.1039/C7TB01895A)

[98] BUFFA, R., P. ŠEDO VÁ, I. BASARABOVÁ, T. BOBULA, P. PROCHÁZKOVÁ, H. VÁGNEROVÁ, I. DOLEČKOVÁ, S. MORAVČÍKOVÁ, L. HEJLOVÁ a V. VELEBNÝ. A new unsaturated derivative of hyaluronic acid – synthesis, analysis and applications. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2017. ISSN 01448617. Dostupné z: [doi:10.1016/j.carbpol.2017.01.071](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.01.071)

[99] KELLY, S. J, K. B TAYLOR, S. LI a M. J JEDRZEJAS. Kinetic properties of *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase. *Glycobiology* [online]. 2000. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11358878/>

[100] BUFFA, R., P. ŠEDO VÁ, I. BASARABOVÁ, M. MORAVCOVÁ, L. WOLFOVÁ, T. BOBULA a V. VELEBNÝ. α,β -Unsaturated aldehyde of hyaluronan—synthesis, analysis and applications. *Carbohydrate Polymers*. [online]. 2015. Dostupné z: <https://www.journals.elsevier.com/carbohydrate-polymers>

[101] HARMAN, D. Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 2006. ISSN 0077-8923. Dostupné z: [doi:10.1196/annals.1354.003](https://doi.org/10.1196/annals.1354.003)

[102] CLANCY, D., J. BIRDSALL. Flies, worms and the free radical theory of ageing. *Ageing Research Reviews*. [online]. 2013. Dostupné z: <https://www.journals.elsevier.com/ageing-research-reviews>

[103] KONG, J.-H., E. J. OH, S. Y. CHAE, K. C. LEE a S. K. HAHN. Long acting hyaluronate – exendin 4 conjugate for the treatment of type 2 diabetes. *Biomaterials* [online]. 2010. ISSN 01429612. Dostupné z: [doi:10.1016/j.biomaterials.2010.01.091](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.091)

[104] MERO, A. a M. CAMPISI. Hyaluronic acid bioconjugates for the delivery of bioactive molecules. *Polymers* [online]. 2014. ISSN 2073-4360. Dostupné z: [doi:10.3390/polym6020346](https://doi.org/10.3390/polym6020346)

- [105] MANJU, S. a K. SREENIVASAN. Conjugation of curcumin onto hyaluronic acid enhances its aqueous solubility and stability. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2011. ISSN 00219797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcis.2011.03.071
- [106] SHARMA, M., K. SAHU, S. P. SINGH a B. JAIN. Wound healing activity of curcumin conjugated to hyaluronic acid: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* [online]. 2018. ISSN 2169-1401, 2169-141X. Dostupné z: doi:10.1080/21691401.2017.1358731
- [107] NGUYEN, V. D., S. ZHENG, J. HAN, V. H. LE, J.-O. PARK a S. PARK. Nanohybrid magnetic liposome functionalized with hyaluronic acid for enhanced cellular uptake and near-infrared-triggered drug release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2017. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2017.03.008
- [108] HAYWARD, S. L., C. L. WILSON a S. KIDAMBI. Hyaluronic acid-conjugated liposome nanoparticles for targeted delivery to CD44 overexpressing glioblastoma cells. *Oncotarget* [online]. 2016. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.8926
- [109] HAN, D. H. SHIN, J. S. KIM, K. Y. WEON, C.-Y. JANG a J.-S. KIM. Hyaluronan-conjugated liposomes encapsulating gemcitabine for breast cancer stem cells. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2016. ISSN 1178-2013. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S95850
- [110] MOUSTAFA, M. A., Y. S.R. ELNAGGAR, W. M. EL-REFAIE a O. Y. ABDALLAH. Hyalugel-integrated liposomes as a novel ocular nanosized delivery system of fluconazole with promising prolonged effect. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2017. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2017.10.007
- [111] MANCONI, M., M. L. MANCA, D. VALENTI, E. ESCRIBANO, H. HILLAIROU, A. M. FADDA a E. FATTAL. Chitosan and hyaluronan coated liposomes for pulmonary administration of curcumin. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2017. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2017.04.044
- [112] ŠIMEK, M., M. HERMANNOVÁ, D. ŠMEJKALOVÁ, T. FOGLOVÁ, K. SOUČEK, L. BINÓ a V. VELEBNÝ. LC-MS/MS study of *in vivo* fate of hyaluronan polymeric micelles carrying doxorubicin. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2019. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2018.12.104

- [113] MAUDENS, P., S. MEYER, C. A. SEEMAYER, O. JORDAN a E. ALLÉMANN. Self-assembled thermoresponsive nanostructures of hyaluronic acid conjugates for osteoarthritis therapy. *Nanoscale* [online]. 2018. ISSN 2040-3364, 2040-3372. Dostupné z: doi:10.1039/C7NR07614B
- [114] KIM, H., H. T. PARK, Y. M. TAE, W. H. KONG, D. K. SUNG, B. W. HWANG, K. S. KIM, Y. K. KIM a S. K. HAHN. Bioimaging and pulmonary applications of self-assembled Flt1 peptide–hyaluronic acid conjugate nanoparticles. *Biomaterials* [online]. 2013. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2013.07.062
- [115] PANDEY, M., H. CHOUDHURY, T A. P. GUNASEGARAN, S.S. NATHAN, S. MD, B. GORAIN, M. TRIPATHY a Z. HUSSAIN. Hyaluronic acid-modified betamethasone encapsulated polymeric nanoparticles: fabrication, characterisation, in vitro release kinetics, and dermal targeting. *Drug Delivery and Translational Research* [online]. 2019. ISSN 2190-393X, 2190-3948. Dostupné z: doi:10.1007/s13346-018-0480-1
- [116] HWANG, S.M., D.D. KIM, S.J. CHUNG a C.K. SHIM. Delivery of ofloxacin to the lung and alveolar macrophages via hyaluronan microspheres for the treatment of tuberculosis. *Journal of Controlled Release* [online]. 2008. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2008.04.009
- [117] SIMSOLO, E. E., İ. EROĞLU, S. T. TANRIVERDI a Ö. ÖZER. Formulation and evaluation of organogels containing hyaluronan microparticles for topical delivery of caffeine. *AAPS PharmSciTech* [online]. 2018. ISSN 1530-9932. Dostupné z: doi:10.1208/s12249-018-0955-x
- [118] KOIVUSALO, L., J. KARVINEN, E. SORSA, I. JÖNKKÄRI, J. VÄLIAHO, P. KALLIO, T. ILMARINEN, S. MIETTINEN, H. SKOTTMAN a M. KELLOMÄKI. Hydrazone crosslinked hyaluronan-based hydrogels for therapeutic delivery of adipose stem cells to treat corneal defects. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2018. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2017.12.013
- [119] EL KECHAI, N., E. MAMELLE, Y. NGUYEN, N. HUANG, V. NICOLAS, P. CHAMINADE, S. YEN-NICOLAÿ, C. GUEUTIN, B. GRANGER, E. FERRARY, F. AGNELY a A. BOCHOT. Hyaluronic acid liposomal gel sustains delivery of a corticoid to the inner ear. *Journal of Controlled Release* [online]. 2016. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2016.02.013

- [120] LUO, Y., K. R. KIRKER a G. D. PRESTWICH. Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: new biomaterials for drug delivery. *Journal of Controlled Release* [online]. 2000. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-3659(00)00300-X
- [121] EGBU, R., S. BROCCINI, P. T. KHAW a S. AWWAD. Antibody loaded collapsible hyaluronic acid hydrogels for intraocular delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2018. ISSN 09396411. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejpb.2017.12.019
- [122] KROIN, J. S., R. KC, X. LI, J. L. HAMILTON, V. DAS, A. J. VAN WIJNEN, O. M. DALL, D. A. SHELLY, T. KENWORTH a H.-J. IM. Intraarticular slow-release triamcinolone acetate reduces allodynia in an experimental mouse knee osteoarthritis model. *Gene* [online]. 2016. ISSN 03781119. Dostupné z: doi:10.1016/j.gene.2016.06.049
- [123] PIRARD, D., P. VEREECKEN, C. MÉLOT a M. HEENEN. Three percent diclofenac in 2.5% hyaluronan gel in the treatment of actinic keratoses: a meta-analysis of the recent studies. *Archives of Dermatological Research* [online]. 2005. ISSN 0340-3696, 1432-069X. Dostupné z: doi:10.1007/s00403-005-0601-9
- [124] LESLEY, J., V. C. HASCALL a M. TAMMI. Hyaluronan binding by cell surface CD44. *JBC Papers in Press* [online]. 2000. Dostupné z: <https://www.jbc.org/>
- [125] GHATAK, S., S. MISRA a B. P. TOOLE. Hyaluronan oligosaccharides inhibit anchorage-independent growth of tumor cells by suppressing the phosphoinositide 3-kinase/akt cell survival pathway. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2002. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M202404200
- [126] POONAM PARASHAR, MEENA RATHOR, MONIKA DWIVEDI, a SHUBHINI SARAF. Hyaluronic acid decorated naringenin nanoparticles: appraisal of chemopreventive and curative potential for lung cancer. *Pharmaceutics* [online]. 2018. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics10010033
- [127] WANG, T., J. HOU, C. SU, L. ZHAO a Y. SHI. Hyaluronic acid-coated chitosan nanoparticles induce ROS-mediated tumor cell apoptosis and enhance antitumor efficiency by targeted drug delivery via CD44. *Journal of Nanobiotechnology* [online]. 2017. ISSN 1477-3155. Dostupné z: doi:10.1186/s12951-016-0245-2
- [128] WEIGEL, P. H., G. M. FULLER a R. D. LEBOEUF. A model for the role of hyaluronic acid and fibrin in the early events during the inflammatory response and wound healing. *Journal*

of Theoretical Biology [online]. 1986. ISSN 00225193. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-5193(86)80076-5

[129] KIRK, J. F, G. RITTER, I. FINGER, D. SANKAR, J. D REDDY, J. D TALTON, C. NATARAJ, S. NARISAWA, J. L. MILLÁN a R. R COBB. Mechanical and biocompatible characterization of a cross-linked collagen-hyaluronic acid wound dressing. *Biomatter* [online]. 2013. ISSN 2159-2535. Dostupné z: doi:10.4161/biom.25633

[130] SHI, L., Y. ZHAO, Q. XIE, C. FAN, J. HILBORN, J. DAI a D. A. OSSIPOV. Moldable hyaluronan hydrogel enabled by dynamic metal-bisphosphonate coordination chemistry for wound healing. *Advanced Healthcare Materials* [online]. 2018. ISSN 21922640. Dostupné z: doi:10.1002/adhm.201700973

[131] LI, H., Y. XUE, B. JIA, Y. BAI, Y. ZUO, S. WANG, Y. ZHAO, W. YANG a H. TANG. The preparation of hyaluronic acid grafted pullulan polymers and their use in the formation of novel biocompatible wound healing film. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2018. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2018.01.102

[132] BERCE, C., M.-S. MURESAN, O. SORITAU, B. PETRUSHEV, L. TEFAS, I. RIGO, G. UNGUREANU, C. CATOI, A. IRIMIE a C. TOMULEASA. Cutaneous wound healing using polymeric surgical dressings based on chitosan, sodium hyaluronate and resveratrol. A preclinical experimental study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2018. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2017.12.041

[133] SANAD, R. A.-B. a H. M. ABDEL-BAR. Chitosan–hyaluronic acid composite sponge scaffold enriched with Andrographolide-loaded lipid nanoparticles for enhanced wound healing. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2017. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2017.05.098

[134] NEUMAYER, T, A. PRINZ a O. FINDL. Effect of a new cohesive ophthalmic viscosurgical device on corneal protection and intraocular pressure in small-incision cataract surgery. *Journal of Cataract and Refractive Surgery* [online]. 2008. ISSN 0886-3350. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcrs.2008.04.018

[135] SALWOWSKA, N M, K. A BEBENEK, D. A ŻĄDŁO a D. L WCISŁO-DZIADECKA. Physicochemical properties and application of hyaluronic acid: a systematic review. *Journal of Cosmetic Dermatology* [online]. 2016. ISSN 14732130. Dostupné z: doi:10.1111/jocd.12237

- [136] YANG, G., L. ESPANDAR, N. MAMALIS a G. D. PRESTWICH. A cross-linked hyaluronan gel accelerates healing of corneal epithelial abrasion and alkali burn injuries in rabbits: cross-linked ha hydrogel improves corneal healing. *Veterinary Ophthalmology* [online]. 2010. ISSN 14635216, 14635224. Dostupné z: doi:10.1111/j.1463-5224.2010.00771.x
- [137] VANDERMEER, G., Y. CHAMY a P.-J. PISELLA. Comparison of objective optical quality measured by double-pass aberrometry in patients with moderate dry eye: Normal saline vs. artificial tears: A pilot study. *Journal Français d'Ophthalmologie* [online]. 2018. ISSN 01815512. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfo.2017.12.001
- [138] CARRACEDO, G., C. VILLA-COLLAR, A. MARTIN-GIL, M. SERRAMITO a L. SANTAMARÍA. Comparison between viscous teardrops and saline solution to fill orthokeratology contact lenses before overnight wear. *Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice* [online]. 2018. ISSN 1542-2321. Dostupné z: doi:10.1097/ICL.0000000000000416
- [139] BOWMAN, S, M. E. AWAD, M. W. HAMRICK, M. HUNTER a S. FULZELE. Recent advances in hyaluronic acid based therapy for osteoarthritis. *Clinical and Translational Medicine* [online]. 2018. ISSN 2001-1326, 2001-1326. Dostupné z: doi:10.1186/s40169-017-0180-3
- [140] GHOSH, P a D. GUIDOLIN. Potential mechanism of action of intra-articular hyaluronan therapy in osteoarthritis: Are the effects molecular weight dependent? *Seminars in Arthritis and Rheumatism* [online]. 2002. ISSN 00490172. Dostupné z: doi:10.1053/sarh.2002.33720
- [141] WADDELL, D. D. Viscosupplementation with hyaluronans for osteoarthritis of the knee: clinical efficacy and economic implications. *Drugs & Aging* [online]. 2007. ISSN 1170-229X. Dostupné z: doi:10.2165/00002512-200724080-00002
- [142] TAKAHASHI, K., S. HASHIMOTO, T. KUBO, Y. HIRASAWA, M. LOTZ a D. AMIEL. Hyaluronan suppressed nitric oxide production in the meniscus and synovium of rabbit osteoarthritis model. *Journal of Orthopaedic Research* [online]. 2001. ISSN 0736-0266, 1554-527X. Dostupné z: doi:10.1016/S0736-0266(00)90024-X
- [143] SUN, S.-F., C.-W. HSU, H.-S. LIN, I.-H. LIOU, Y.-H. CHEN a C.-L. HUNG. Comparison of single intra-articular injection of novel hyaluronan (HYA-JOINT plus) with synvisc-one for knee osteoarthritis: a randomized, controlled, double-blind trial of efficacy and

safety. *Journal of Bone and Joint Surgery* [online]. 2017. ISSN 0021-9355, 1535-1386. Dostupné z: doi:10.2106/JBJS.16.00469

[144] GELARDI, M., L. IANNUZZI a N. QUARANTA. Intranasal sodium hyaluronate on the nasal cytology of patients with allergic and nonallergic rhinitis: sodium hyaluronate in allergic-nonallergic rhinitis. *International Forum of Allergy & Rhinology* [online]. 2013. ISSN 20426976. Dostupné z: doi:10.1002/alr.21193

[145] GERDIN, B. a R. HÄLLGREN. Dynamic role of hyaluronan (HYA) in connective tissue activation and inflammation. *Journal of Internal Medicine* [online]. 1997. ISSN 09546820. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2796.1997.00173.x

[146] GAVINA, M., A. LUCIANI, V. R. VILLELLA, S. ESPOSITO, E. FERRARI, I. BRESSANI, A. CASALE, E. M. BRUSCIA, L. MAIURI a V. RAIA. Nebulized hyaluronan ameliorates lung inflammation in cystic fibrosis mice: hyaluronan reduces lung inflammation. *Pediatric Pulmonology* [online]. 2013. ISSN 87556863. Dostupné z: doi:10.1002/ppul.22637

[147] GODDARD, J. C. a D. A. W. JANSSEN. Intravesical hyaluronic acid and chondroitin sulfate for recurrent urinary tract infections: systematic review and meta-analysis. *International Urogynecology Journal* [online]. 2018. ISSN 0937-3462, 1433-3023. Dostupné z: doi:10.1007/s00192-017-3508-z

[148] YILDIZHAN, M., M. DUNDAR, B. DEMIRCI a N. ÇULHACI. The effects of hyaluronic acid on traumatic urethral inflammation. *Urologia Internationalis* [online]. 2020. ISSN 0042-1138, 1423-0399. Dostupné z: doi:10.1159/000504766

[149] MUHN, C. The evolving role of hyaluronic acid fillers for facial volume restoration and contouring: a Canadian overview. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* [online]. 2012. ISSN 1178-7015. Dostupné z: doi:10.2147/CCID.S30794

[150] NOBILE, V., D. BUONOCORE, A. MICHELOTTI a F. MARZATICO. Anti-aging and filling efficacy of six types hyaluronic acid based dermo-cosmetic treatment: double blind, randomized clinical trial of efficacy and safety. *Journal of Cosmetic Dermatology* [online]. 2014. ISSN 1473-2130, 1473-2165. Dostupné z: doi:10.1111/jocd.12120

[151] JANIŠ, R., V. PATA, P. EGNER, J. PAVLAČKOVÁ, A. ZAPLETALOVÁ a K. KEJLOVÁ. Comparison of metrological techniques for evaluation of the impact of a cosmetic product containing hyaluronic acid on the properties of skin surface. *Biointerphases* [online]. 2017. ISSN 1934-8630, 1559-4106. Dostupné z: doi:10.1116/1.4985696

- [152] TROMMER, H., S. WARTEWIG, R. BÖTTCHER, A. PÖPPL, J. HOENTSCH, J. H. OZEGOWSKI a R. H.H. NEUBERT. The effects of hyaluronan and its fragments on lipid models exposed to UV irradiation. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2003. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-5173(03)00033-4
- [153] HAŠOVÁ, M., T. CRHÁK, B. ŠAFRÁNKOVÁ, J. DVOŘÁKOVÁ, T. MUTHNÝ, V. VELEBNÝ a L. KUBALA. Hyaluronan minimizes effects of UV irradiation on human keratinocytes. *Archives of Dermatological Research* [online]. 2011. ISSN 0340-3696, 1432-069X. Dostupné z: doi:10.1007/s00403-011-1146-8
- [154] DRAELOS, Z. D. Nutrition and enhancing youthful-appearing skin. *Clinics in Dermatology* [online]. 2010. ISSN 0738081X. Dostupné z: doi:10.1016/j.clindermatol.2010.03.019
- [155] OE, M., K. MITSUGI, W. ODANAKA, H. YOSHIDA, R. MATSUOKA, S. SEINO, T. KANEMITSU a Y. MASUDA. Dietary hyaluronic acid migrates into the skin of rats. *The Scientific World Journal* [online]. 2014. ISSN 2356-6140, 1537-744X. Dostupné z: doi:10.1155/2014/378024
- [156] ZGHEIB, C., J. XU a K. W. LIECHTY. Targeting inflammatory cytokines and extracellular matrix composition to promote wound regeneration. *Advances in Wound Care* [online]. 2014. ISSN 2162-1918, 2162-1934. Dostupné z: doi:10.1089/wound.2013.0456
- [157] SATO, T. a H. IWASO. An effectiveness study of hyaluronic acid hyabest® (j) in the treatment of osteoarthritis of the knee on the patients in the United States. *J. New Rem. & Clin* [online]. 2009. Dostupné z: <https://www.proceanis.com/media/3d/1d/e8/1605786436/An-effectiveness-study-of-hyaluronic-acid-in-the-treatment-of-osteoarthritis.pdf>
- [158] SOLÀ, R., R.-M. VALLS, I. MARTORELL, M. GIRALT, A. PEDRET, N. TALTAVULL, M. ROMEU, À. RODRÍGUEZ, D. MORIÑA, V. LOPEZ DE FRUTOS, M. MONTERO, M. CASAJUANA, L. PÉREZ, J. FABA, G. BERNAL, A. ASTILLEROS, R. GONZÁLEZ, F. PUIGGRÓS, L. AROLA, C. CHETRIT a D. MARTINEZ-PUIG. A low-fat yoghurt supplemented with a rooster comb extract on muscle joint function in adults with mild knee pain: a randomized, double blind, parallel, placebo-controlled, clinical trial of efficacy. *Food & Function* [online]. 2015. ISSN 2042-6496, 2042-650X. Dostupné z: doi:10.1039/C5FO00321K

- [159] GÖLLNER, I., W. VOSS, U. VON HEHN a S. KAMMERER. Ingestion of an oral hyaluronan solution improves skin hydration, wrinkle reduction, elasticity, and skin roughness: results of a clinical study. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine* [online]. 2017. ISSN 2156-5872, 2156-5899. Dostupné z: doi:10.1177/2156587217743640
- [160] LARSON, B. 3D cell culture: a review of current techniques. *BioTek* [online]. 2015. Dostupné z: <https://www.biotek.com/resources/white-papers/3d-cell-culture-a-review-of-current-techniques/>
- [161] GURSKI, L. A., A. K. JHA, C. ZHANG, X. JIA a M. C. FARACH-CARSON. Hyaluronic acid-based hydrogels as 3D matrices for in vitro evaluation of chemotherapeutic drugs using poorly adherent prostate cancer cells. *Biomaterials* [online]. 2009. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2009.07.054
- [162] JEFFERY, A. F., M A. CHURCHWARD, V. K. MUSHAHWAR, K. G. TODD a A. L. ELIAS. Hyaluronic acid-based 3D culture model for in vitro testing of electrode biocompatibility. *Biomacromolecules* [online]. 2014. ISSN 1525-7797, 1526-4602. Dostupné z: doi:10.1021/bm500318d
- [163] OUYANG, L., C. B. HIGHLEY, C. B. RODELL, W. SUN a J. A. BURDICK. 3D printing of shear-thinning hyaluronic acid hydrogels with secondary cross-linking. *ACS Biomaterials Science & Engineering* [online]. 2016. ISSN 2373-9878, 2373-9878. Dostupné z: doi:10.1021/acsbomaterials.6b00158
- [164] CRAWFORD, D. H. G., T. L. MURPHY, L. E. RAMM, L. M. FLETCHER, A. D. CLOUSTON, G. J. ANDERSON, V. N. SUBRAMANIAM, L. W. POWELL a G. A. RAMM. Serum hyaluronic acid with serum ferritin accurately predicts cirrhosis and reduces the need for liver biopsy in C282Y hemochromatosis. *Hepatology* [online]. 2009. ISSN 02709139. Dostupné z: doi:10.1002/hep.22650
- [165] DELPECH B., B. PHILIPPE a C. MAINGONNAT. Immunoassay of the hyaluronic acid-hyaluronectin interaction: application to the detection of hyaluronic acid in serum of normal subjects and cancer patients. *Analytical Biochemistry* [online]. 1985. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2416243/>
- [166] LOKESHWAR, V. B., C. ÖBEK, H. T. PHAM, D. WEI, M. J. YOUNG, R. C. DUNCAN, M. S. SOLOWAY a N. L. BLOCK. Urinary hyaluronic acid and hyaluronidase:

- markers for bladder cancer detection and evaluation of grade. *Journal of Urology* [online]. 2000. ISSN 0022-5347, 1527-3792. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-5347(05)68050-0
- [167] RUHAAK, L R, G ZAUNER, C HUHN, C BRUGGINK, A M DEELDER a M WUHRER. Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Anal Bioanal Chem* [online]. 2010. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-010-3532-z
- [168] ZAIA, J. On-line separations combined with MS for analysis of glycosaminoglycans. *Mass Spectrometry Reviews* [online]. 2009. ISSN 0277-7037, 1098-2787. Dostupné z: doi:10.1002/mas.20200
- [169] EL-SAFORY, N. S., A. E. FAZARY a C.-K. LEE. Hyaluronidases, a group of glycosidases: current and future perspectives. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2010. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2010.02.047
- [170] SOLAKYILDIRIM, K. Recent advances in glycosaminoglycan analysis by various mass spectrometry techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2019. ISSN 1618-2642, 1618-2650. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-019-01722-4
- [171] VEILLON, L., Y. HUANG, W. PENG, X. DONG, B. G. CHO a Y. MECHREF. Characterization of isomeric glycan structures by LC-MS/MS: liquid phase separations. *Electrophoresis* [online]. 2017. ISSN 01730835. Dostupné z: doi:10.1002/elps.201700042
- [172] MALAVAKI, C., I. KANAKIS, A. THEOCHARIS, F. LAMARI a N. KARAMANOS. Hyaluronan determination: biological significance & analytical tools. *Current Pharmaceutical Analysis* [online]. 2007. ISSN 15734129. Dostupné z: doi:10.2174/157341207780598940
- [173] 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* [online]. 2010. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2009.09.030
- [174] ZHAO, X., B. YANG, P. DATTA, L. GASMILI, F. ZHANG a R. J. LINHARDT. Cell-based microscale isolation of glycoaminoglycans for glycomics study. *Journal of Carbohydrate Chemistry* [online]. 2012. ISSN 0732-8303, 1532-2327. Dostupné z: doi:10.1080/07328303.2012.658126

- [175] ZHANG, Q., H. LI, X. FENG, B.-F. LIU a X. LIU. Purification of derivatized oligosaccharides by solid phase extraction for glycomic analysis. *PLoS ONE* [online]. 2014. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0094232
- [176] SCOTT, J. E. Aliphatic ammonium salts in the assay of acidic polysaccharides from tissues. *Methods of Biochemical Analysis* [online]. 1960. ISBN 978-0-470-30657-4. Dostupné z: doi:10.1002/9780470110249.ch4
- [177] PEPELIAEV, S., R. HRUDÍKOVÁ, J. JÍLKOVÁ, J. PAVLÍK, D. SMIRNOU, Z. ČERNÝ a L. FRANKE. Colorimetric enzyme-coupled assay for hyaluronic acid determination in complex samples. *European Polymer Journal* [online]. 2017. ISSN 00143057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2017.07.036
- [178] TAKEGAWA, Y., K. ARAKI, N. FUJITANI, J. FURUKAWA, H. SUGIYAMA, H. SAKAI a Y. SHINOHARA. Simultaneous analysis of heparan sulfate, chondroitin/dermatan sulfates, and hyaluronan disaccharides by glycoblotting-assisted sample preparation followed by single-step zwitter-ionic-hydrophilic interaction chromatography. *Analytical Chemistry* [online]. 2011. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:10.1021/ac2021079
- [179] MAI, V. Q., T. T. VO a M. MEERE. Modelling hyaluronan degradation by *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase. *Mathematical Biosciences* [online]. 2018. ISSN 00255564. Dostupné z: doi:10.1016/j.mbs.2018.07.002
- [180] TAO, L., F. SONG, N. XU, D. LI, R. J. LINHARDT a Z. ZHANG. New insights into the action of bacterial chondroitinase AC I and hyaluronidase on hyaluronic acid. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2017. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2016.12.010
- [181] KAKIZAKI, I., N. IBORI, K. KOJIMA, M. YAMAGUCHI a M. ENDO. Mechanism for the hydrolysis of hyaluronan oligosaccharides by bovine testicular hyaluronidase: hydrolytic mechanism of testicular hyaluronidase. *FEBS Journal* [online]. 2010. ISSN 1742464X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07600.x
- [182] LV, M., M. WANG, W. CAI, W. HAO, P. YUAN a Z. KANG. Characterisation of separated end hyaluronan oligosaccharides from leech hyaluronidase and evaluation of angiogenesis. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2016. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2016.01.052

- [183] HE, J., H. HUANG, X. ZOU, Y. WANG, G. DU a Z. KANG. Construction of saturated odd- and even-numbered hyaluronan oligosaccharide building block library. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2020. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2019.115700
- [184] GIRISH, K., K. KEMPARAJU, S. NAGARAJU a B. VISHWANATH. Hyaluronidase inhibitors: a biological and therapeutic perspective. *Current Medicinal Chemistry* [online]. 2009. ISSN 09298673. Dostupné z: doi:10.2174/092986709788453078
- [185] LIU, B., J. LU, C. AI, B. ZHANG, L. GUO, S. SONG a B. ZHU. Quick characterization of uronic acid-containing polysaccharides in 5 shellfishes by oligosaccharide analysis upon acid hydrolysis. *Carbohydrate Research*. 2016. Dostupné z: <https://www.journals.elsevier.com/carbohydrate-research>
- [186] MAO, W., C. THANAWIROON a R. J. LINHARDT. Capillary electrophoresis for the analysis of glycosaminoglycans and glycosaminoglycan-derived oligosaccharides. *Biomedical Chromatography* [online]. 2002. ISSN 0269-3879, 1099-0801. Dostupné z: doi:10.1002/bmc.153
- [187] VREEKER, G. C. M. a M. WUHRER. Reversed-phase separation methods for glycan analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2017. ISSN 1618-2642, 1618-2650. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-016-0073-0
- [188] CHANG, Y., B. YANG, X. ZHAO a R. J. LINHARDT. Analysis of glycosaminoglycan-derived disaccharides by capillary electrophoresis using laser-induced fluorescence detection. *Analytical Biochemistry* [online]. 2012. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2012.05.004
- [189] ANTIA, I. U., K. MATHEW, D. R. YAGNIK, F. A. HILLS a A. J. SHAH. Analysis of procainamide-derivatised heparan sulphate disaccharides in biological samples using hydrophilic interaction liquid chromatography mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* [online]. 2017. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0703-1>
- [190] JOURDIAN, G. W, M. WOLFMAN, R. SARBER a J. DISTLER. A specific, sensitive method for the determination of hyaluronatel. *Analytical Biochemistry* [online]. 1979. Dostupné z: doi:10.1016/0003-2697(79)90609-2
- [191] OUESLATI, N., P. LEBLANC, C. HARSCOAT-SCHIAVO, E. RONDAGS, S. MEUNIER, R. KAPEL a I. MARC. CTAB turbidimetric method for assaying hyaluronic acid

in complex environments and under cross-linked form. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2014. Dostupné z: <https://www.journals.elsevier.com/carbohydrate-polymers>

[192] HASERODT, S., M. AYTEKIN a R. A. DWEIK. A comparison of the sensitivity, specificity, and molecular weight accuracy of three different commercially available hyaluronan ELISA-like assays. *Glycobiology* [online]. 2011. ISSN 0959-6658, 1460-2423. Dostupné z: [doi:10.1093/glycob/cwq145](https://doi.org/10.1093/glycob/cwq145)

[193] YUAN, H., R. AMIN, X. YE, C. A. DE LA MOTTE a M. K. COWMAN. Determination of hyaluronan molecular mass distribution in human breast milk. *Analytical Biochemistry* [online]. 2015. ISSN 00032697. Dostupné z: [doi:10.1016/j.ab.2014.12.020](https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.12.020)

[194] HUANG, X., T. A SCHMIDT, C. SHORTT, S. ARORA, A. ASARI, T. KIRSCH a M. K. COWMAN. A competitive alphascreen assay for detection of hyaluronan. *Analytical Glycobiology* [online]. 2017. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/glycob/cwx109>

[195] HONG GEE a M. K. COWMAN An agarose gel electrophoretic method for analysis of hyaluronan molecular weight distribution. *Analytical Biochemistry* [online]. 1993. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000326978471267X>

[196] YANG, B., Y. CHANG, A. M. WEYERS, E. STERNER a R. J. LINHARDT. Disaccharide analysis of glycosaminoglycan mixtures by ultra-high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2012. ISSN 00219673. Dostupné z: [doi:10.1016/j.chroma.2011.12.063](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.12.063)

[197] KADLECOVÁ, Z., K. KALÍKOVÁ, D. FOLPRECHTOVÁ, E. TESAŘOVÁ a M. GILAR. Method for evaluation of ionic interactions in liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2020. ISSN 00219673. Dostupné z: [doi:10.1016/j.chroma.2020.461301](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461301)

[198] WEYERS, A., B. YANG, J.-H. PARK, Y.-S. KIM, S.-M. KIM, S.-E. LEE, F. ZHANG, K. B. LEE a R. J. LINHARDT. Microanalysis of stomach cancer glycosaminoglycans. *Glycoconj J* [online]. 2013. Dostupné z: [doi:10.1007/s10719-013-9476-8](https://doi.org/10.1007/s10719-013-9476-8)

[199] VOLPI, N. On-Line HPLC/ESI-MS separation and characterization of hyaluronan oligosaccharides from 2-mers to 40-mers. *Analytical Chemistry* [online]. 2007. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac070837d>

- [200] WENDE, F. J., S. GOHIL, H. MOJARRADI, T. GERFAUD, L. I. NORD, A. KARLSSON, J.-G. BOITEAU, A. H. KENNE a C. SANDSTRÖM. Determination of substitution positions in hyaluronic acid hydrogels using NMR and MS based methods. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2016. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2015.09.112
- [201] PABST, M. a F. ALTMANN. Influence of electrosorption, solvent, temperature, and ion polarity on the performance of LC-ESI-MS using graphitic carbon for acidic oligosaccharides. *Analytical Chemistry* [online]. 2008. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:10.1021/ac801024r
- [202] TOYODA, H., F. MURAKI, T. IMANARI a A. KINOSHITA-TOYODA. Microdetermination of hyaluronan in human plasma by high-performance liquid chromatography with a graphitized carbon column and postcolumn fluorometric detection. *Journal of Chromatography B* [online]. 2011. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2011.03.007
- [203] OSAGO, H., T. SHIBATA, N. HARA, S. KUWATA, M. KONO, Y. UCHIO a M. TSUCHIYA. Quantitative analysis of glycosaminoglycans, chondroitin/dermatan sulfate, hyaluronic acid, heparan sulfate, and keratan sulfate by liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* [online]. 2014. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2014.08.005
- [204] VIGLIANO, M., A. BIANCHERA, R. BETTINI a L. ELVIRI. Determination of hyaluronic acid in a chitosan-based formulation by RP C18 and HILIC LC–ESI-MS: an evaluation of matrix effect. *Chromatographia* [online]. 2013. ISSN 0009-5893, 1612-1112. Dostupné z: doi:10.1007/s10337-013-2533-4
- [205] TURIÁK, L., G. TÓTH, O. OZOHANICS, Á RÉVÉSZ, A. ÁCS, K. VÉKEY, J. ZAIA a L. DRAHOS. Sensitive method for glycosaminoglycan analysis of tissue sections. *Journal of Chromatography A* [online]. 2018. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.02.034>
- [206] TÓTH, G., K. VÉKEY, L. DRAHOS, V. HORVÁTH a L. TURIÁK. Salt and solvent effects in the microscale chromatographic separation of heparan sulfate disaccharides. *Journal of Chromatography A* [online]. 2020. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2019.460548

- [207] SHANMUGA DOSS, S., N. P. BHATT a G. JAYARAMAN. Improving the accuracy of hyaluronic acid molecular weight estimation by conventional size exclusion chromatography. *Journal of Chromatography B* [online]. 2017. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2017.06.006
- [208] MAHONEY, D. J, R. T APLIN, A. CALABRO, V. C HASCALL a A. J DAY. Novel methods for the preparation and characterization of hyaluronan oligosaccharides of defined length. *Glycobiology* [online]. 2001. Dostupné z: doi:10.1093/glycob/11.12.1025
- [209] BOWERS, J. J., B. D.M. HODGES, O. M. SAAD, J. A. LEARY a S. A. MCLUCKEY. Proton hydrates as soft ion/ion proton transfer reagents for multiply deprotonated biomolecules. *International Journal of Mass Spectrometry* [online]. 2008. ISSN 13873806. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijms.2008.05.038
- [210] CHAO, H.-C., M. SHIH a S. A. MCLUCKEY. Generation of multiply charged protein anions from multiply charged protein cations via gas-phase ion/ion reactions. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* [online]. 2020. ISSN 1044-0305, 1879-1123. Dostupné z: doi:10.1021/jasms.0c00062
- [211] SAKAI, S., K. HIRANO, H. TOYODA, R. J. LINHARDT a T. TOIDA. Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis of hyaluronan oligosaccharides. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2007. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2007.05.005
- [212] YEUNG, B. a D. MARECAK. Molecular weight determination of hyaluronic acid by gel filtration chromatography coupled to matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 1999. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(99)00647-0
- [213] PREBYL, B. S, C. KACZMAREK, A. A TUINMAN a D. C BAKER. Characterizing the electrospray-ionization mass spectral fragmentation pattern of enzymatically derived hyaluronic acid oligomers. *Carbohydrate Research* [online]. 2003. ISSN 00086215. Dostupné z: doi:10.1016/S0008-6215(03)00180-0
- [214] NIMPTSCH, K., R. SÜSS, M. SCHNABELRAUCH, A. NIMPTSCH a J. SCHILLER. Positive ion MALDI-TOF mass spectra are more suitable than negative ion spectra to characterize sulphated glycosaminoglycan oligosaccharides. *International Journal of Mass Spectrometry* [online]. 2012. ISSN 13873806. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijms.2011.11.003

- [215] JACKSON, A. U., N. TALATY, R. G. COOKS a G. J. BERKEL. Salt tolerance of desorption electrospray ionization (DESI). *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* [online]. 2007. ISSN 1044-0305, 1879-1123. Dostupné z: doi:10.1016/j.jasms.2007.09.018
- [216] PRZYBYLSKI, C., F. GONNET, W. BUCHMANN a R. DANIEL. Critical parameters for the analysis of anionic oligosaccharides by desorption electrospray ionization mass spectrometry: DESI-MS of anionic oligosaccharides. *Journal of Mass Spectrometry* [online]. 2012. ISSN 10765174. Dostupné z: doi:10.1002/jms.3052
- [217] BOROVCOVÁ, L., M. HERMANNOVÁ, V. PAUK, M. ŠIMEK, V. HAVLÍČEK a K. LEMR. Simple area determination of strongly overlapping ion mobility peaks. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2017. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2017.05.003
- [218] KAILEMIA, M. J., M. PARK, D. A. KAPLAN, A. VENOT, G.-J. BOONS, L. LI, R. J. LINHARDT a I. J. AMSTER. High-field asymmetric-waveform ion mobility spectrometry and electron detachment dissociation of isobaric mixtures of glycosaminoglycans. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* [online]. 2014. ISSN 1044-0305, 1879-1123. Dostupné z: doi:10.1007/s13361-013-0771-1
- [219] WALTER, T. H., B. A. ALDEN, C. BOISSEL, J. FIELD, N. LAWRENCE, D. OSTERMAN a A. PATEL. A New mixed-mode reversed-phase/anion-exchange stationary phase based on hybrid particles. *Waters* [online]. 2020. Dostupné z: <https://www.waters.com/nextgen/fi/en/library/application-notes/2020/a-new-mixed-mode-reversed-phase-anion-exchange-stationary-phase-based-on-hybrid-particles.html>
- [220] LAUBER, M, T H WALTER, M GILAR, M DELANO, C BOISSEL, K SMITH, R BIRDSALL, P RAINVILLE, J BELANGER a K WYNDHAM. Low adsorption HPLC columns based on maxpeak high performance surfaces. *Waters* [online]. 2020. Dostupné z: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006930en.pdf>
- [221] WAKAMATSU, A., K. MORIMOTO, M. SHIMIZU a S. KUDOH. A severe peak tailing of phosphate compounds caused by interaction with stainless steel used for liquid chromatography and electrospray mass spectrometry. *Journal of Separation Science* [online]. 2005. ISSN 1615-9306, 1615-9314. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.200400027