

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

VEDLEJŠÍ DEGRADAČNÍ PRODUKTY HYALURONANU

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Externí konzultant diplomové práce: Ing. Tereza Šílová (rozená Ehlová)

Hradec Králové 2014

Bc. Petra Lišková

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Datum

Podpis

Ráda bych poděkovala Doc. Barboře Szotákové, Ph.D. za ochotnou pomoc při sestavování diplomové práce, Ing. Tereze Šílové (rozené Ehlové) a Mgr. Ondřejovi Kotlandovi za odborné vedení, trpělivost a cenné rady při zpracování diplomové práce, Mgr. Martině Hermannové, Ph.D., Ing. Daniele Šmejkalové, Ph.D. a Mgr. Kristině Nešporové za provedení a hodnocení odborných analýz. V neposlední řadě děkuji ostatním pracovníkům skupiny Fragmenty hyaluronanu z firmy Contipro Pharma a.s. a své rodině za psychickou podporu.

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Petra Lišková

Školitel: Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Externí konzultant: Ing. Tereza Šílová (rozená Ehlová)

Název diplomové práce: Vedlejší degradační produkty hyaluronanu

ABSTRAKT

Předložená diplomová práce se zabývá vedlejšími degradačními produkty hyaluronanu vznikajícími při alkalické hydrolýze.

Teoretická rešerše shrnuje základní poznatky o kyselině hyaluronové (HA). První část je věnována historii, struktuře, chemickým a biologickým vlastnostem HA včetně možných způsobů degradace HA. Na závěr je uveden význam a použití HA. Druhá část popisuje instrumentální metody, které se používají k separaci a purifikaci HA nebo jejich fragmentů, a možnosti jejich identifikace.

Experimentální část se zabývá alkalickou hydrolýzou (tzv peelingovou reakcí), následnou separací a identifikací vzniklých fragmentů HA. Nejprve bylo nutné optimalizovat podmínky peelingové reakce pro co nejvyšší výtěžky degradačních produktů, poté byl tetramer HA štěpen v 0,1M hydroxidu sodném při laboratorní teplotě. Pro oddělení majoritně vznikajících vysokomolekulárních fragmentů HA byla použita gelová permeační chromatografie a následně byly jednotlivé degradační produkty separovány pomocí HPLC na reverzní fázi C12. Celkem bylo izolováno 8 frakcí, z nichž pouze 4 byly získány v dostatečném množství pro MS, NMR a základní testy cytotoxicity.

Veškerá data byla naměřena v rámci probíhajícího výzkumu ve společnosti Contipro Pharma, a.s., Dolní Dobrouč, Česká Republika.

Charles Univerzity in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Petra Lišková

Supervisor: Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Consultant: Ing. Tereza Šílová (born Ehlová)

Title of diploma thesis: Side degradation products of hyaluronan

ABSTRACT

The presented diploma thesis deals with the side degradation products of hyaluronan generated during alkaline hydrolysis.

Theoretical part includes basic information about hyaluronic acid (HA). The first part deals with the history, structure, chemical and biological properties of HA, including possible ways of degradation of HA. The importance and application of HA are mentioned in the conclusion. The second part describes the instrumental methods, used for separation and purification of HA or HA fragments, and possibilities of identification.

Experimental part deals with the alkali hydrolysis (peeling reaction), following separation and identification of the resulting fragments of HA. At first, it was necessary to optimize the reaction conditions of peeling reaction for the highest yields of degradation products. Then tetramer HA was degraded in 0,1M sodium hydroxide at laboratory temperature. Gel permeation chromatography was used for the separation of high molecular weight fragments. The individual degradation products were separated on reverse HPLC phase C12. There was isolated 8 fractions, but only 4 fractions were obtained in sufficient quantities for MS, NMR analysis and elementary cytotoxicity assays.

All acquired data were measured during actual research in company Contipro Pharma, a.s., Dolní Dobrouč, Czech Republic.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	CÍL PRÁCE	8
3	TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1	Charakteristika kyseliny hyaluronové	9
3.1.1	Historie kyseliny hyaluronové.....	9
3.1.2	Struktura kyseliny hyaluronové.....	10
3.1.3	Metabolismus kyseliny hyaluronové	11
3.2	Degradace kyseliny hyaluronové	12
3.2.1	Degradace nescifická	13
3.2.1.1	<i>Alkalická hydrolyza kyseliny hyaluronové</i>	<i>13</i>
3.2.2	Degradace specifická.....	15
3.2.2.1	<i>Enzymatická degradace kyseliny hyaluronové</i>	<i>15</i>
3.2.3	Izolace a výroba HA	18
3.2.4	Význam a využití HA	18
3.3	Analýza kyseliny hyaluronové	20
3.3.1	Kapalinová chromatografie	20
3.3.1.1	<i>Kapalinový chromatograf</i>	<i>20</i>
3.3.1.2	<i>Kapalinová chromatografie na reverzní fázi</i>	<i>24</i>
3.3.1.3	<i>Gelová permeační chromatografie</i>	<i>25</i>
3.3.2	Hmotnostní spektrometrie	26
3.3.3	Nukleární magnetická rezonance (NMR).....	28
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
4.1	Chemikálie	30
4.2	Přístroje	30
4.3	Metody a postupy	31
4.3.1	Příprava vedlejších degradačních produktů kyseliny hyaluronové alkalickou hydrolyzou (peelingová reakce).....	31
4.3.1.1	<i>Optimalizace podmínek štěpení</i>	<i>31</i>
4.3.1.2	<i>Štěpení HA za optimalizovaných podmínek</i>	<i>32</i>

4.3.2	Gelová permeační chromatografie.....	32
4.3.3	Separace na reverzní fázi (RP-LC).....	33
4.3.3.1	<i>Optimalizace podmínek separace</i>	33
4.3.3.2	<i>Separace za optimalizovaných podmínek</i>	35
4.3.4	Lyofilizace	35
4.3.5	Identifikace vzorku pomocí LC-MS (liquid chromatography – mass spectrometry).....	36
4.3.6	Analýza pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR)	37
4.3.7	Testy viability	37
5	VÝSLEDKY	38
5.1	Optimalizace	38
5.1.1	Optimalizace podmínek alkalické hydrolyzy kyseliny hyaluronové.....	38
5.1.2	Optimalizace podmínek separace kapalinové chromatografie na reverzní fázi (RP-LC)	39
5.2	Preparace vedlejších degradačních produktů	44
5.3	Identifikace vedlejších degradačních produktů kyseliny hyaluronové	45
5.3.1	Hmotnostně spektrometrické (MS) analýzy degradačních produktů	45
5.3.2	Identifikace vedlejších degradačních produktů kyseliny hyaluronové nukleární magnetickou rezonancí (NMR)	51
5.4	Testy viability	51
6	DISKUZE	54
7	ZÁVĚR	58
8	SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	59
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	66

1 ÚVOD

Od doby, kdy byla kyselina hyaluronová (HA – hyaluronic acid) objevena, se stala předmětem mnoha odborných studií. Jde o látku, která má široce využitelné vlastnosti v lékařství, kosmetice i farmaceutickém průmyslu. Výzkum, zabývající se touto sloučeninou, v současné době zdaleka nekončí. Vědecké týmy po celém světě se snaží odhalit vlastnosti HA a nalézt její další uplatnění.

Motivací pro vytvoření této diplomové práce bylo odhalit strukturu vedlejších degradačních produktů HA vznikajících působením hydroxidu sodného, který se používá jak pro přípravu oligosacharidů HA s lichým počtem monosacharidických jednotek, tak pro čištění filtračních i výrobních zařízení. I přes předpoklad, že se vedlejší degradační produkty HA odstraní ultrafiltrací, která následuje po každé peelingové reakci, je žádoucí odhalit jejich strukturu a definovat jejich základní biologické vlastnosti. Popsání přesné molekulové struktury vedlejších degradačních produktů HA napomůže k bližšímu pochopení katabolismu HA.

2 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části je seznámit se se strukturou, základními vlastnostmi a katabolismem HA, případně fragmentů HA, a popsat analytické metody jejich charakterizace.

Cílem experimentální části je izolovat vedlejší degradační produkty HA vznikající při alkalické hydrolyze, odhalit jejich strukturu a pomocí příslušných testů určit, zda se jedná o látky toxické.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Charakteristika kyseliny hyaluronové

3.1.1 Historie kyseliny hyaluronové

Objev kyseliny hyaluronové (HA) se datuje do roku 1934, kdy Karl Meyer se svým společníkem Johnem Palmerem izolovali dříve neznámou látku ze sklivce oka skotu. Tuto látku poté pojmenovali jako hyaluronic acid (hyaluronová kyselina). Název vznikl spojením slov “hyalos”, což je výraz z řečtiny pro sklo, a slova “uronic acid” [1]. V té době Meyer a Palmer netušili, že právě objevili jednu z významných přírodních makromolekul, která bude v budoucnu užitečná nejenom v lékařství [2]. Poprvé byla HA využita komerčně při experimentu Endre Balazse v roce 1942, který se pokusil nahradit bílek v pekárenských výrobcích právě HA [3].

V padesátých letech dvacátého století se HA poprvé uplatnila v medicíně. Při plastické operaci oka byla použita jako náhražka sklivce [3]. Původně se HA izolovala z lidské pupeční šňůry. Tímto postupem lze však získat poměrně malá množství HA o nepříliš vysoké molekulové hmotnosti. V následujících letech se proto HA začala izolovat ze zvířecích zdrojů, například z kohoutích hřebínků. Tímto postupem lze získat větší množství HA s vyšší molekulovou hmotností [3].

Chemická struktura HA byla odhalena v padesátých letech týmem Karla Meyera. Poprvé HA izolovali jako kyselinu, ovšem při dalším výzkumu zjistili, že se přirozeně vyskytuje jako sůl – hyaluronát sodný [1]. V dnešní době je molekula HA obecně nazývána jako „hyaluronan“. Tento termín byl oficiálně představen v roce 1986 a zařadil se do pravidel nomenklatury jako souhrnné označení pro obě formy polysacharidu [4]. Strukturou a biologickými vlastnostmi této látky se začaly zabývat mnohé laboratoře a výzkumná centra po celém světě. Hlavním cílem se jim stalo určení molekulové hmotnosti a objasnění závislosti na viskozitě [5].

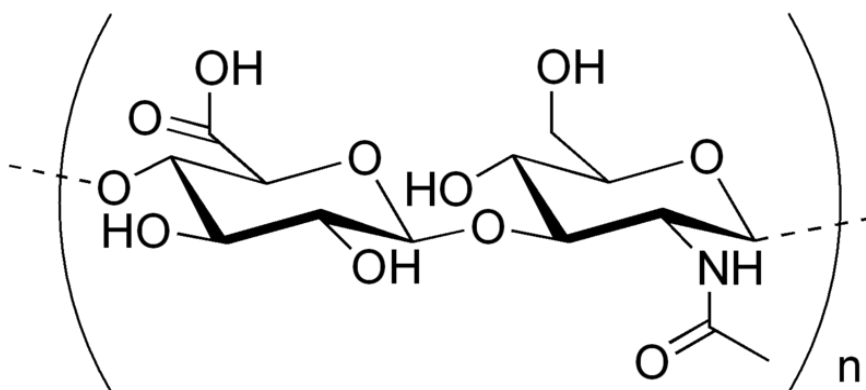
3.1.2 Struktura kyseliny hyaluronové

HA je lineární polysacharid náležící do rodiny glykosaminoglykanů. Tato skupina, někdy nazývaná mukopolysacharidy, tvoří hlavní komponenty extracelulární matrix. Glykosaminoglykany rovněž zastávají řadu funkcí v pojivových tkáních [2]. Mezi nejvýznamnější zástupce glykosaminoglykanů patří chondroitin sulfát, dermatan sulfát, heparan sulfát, keratan sulfát a hyaluronan [6].

Všechny glykosaminoglykany jsou lineárními nerozvětvenými molekulami, které se skládají z opakujících se disacharidových jednotek, obsahující *N*-acetylhexosamin a hexosu [6]. Sulfatované glykosaminoglykany se mohou vázat na proteiny a tvořit proteoglykany [6; 7].

Základní strukturu HA tvoří opakující se jednotky disacharidů *N*-acetyl-*D*-glukosaminu a kyseliny glukuronové spojené β -1,3 a β -1,4 glykosidickými vazbami (Obrázek 1). Každá disacharidová jednotka má molekulovou hmotnost 397 Da [5].

Nativní HA ve tkáních je polydisperzní směs řetězců HA různých délek, které ve své struktuře obsahují 2000 až 25000 disacharidových jednotek. Molekulová hmotnost těchto polymerů se pohybuje v rozmezí 1 – 10 MDa a jejich velikost v roztoku mezi 0,04 a 5 μ m. Hyaluronan je jediný nesulfatovaný člen rodiny glykosaminoglykanů, a proto netvoří proteoglykany [5; 6].

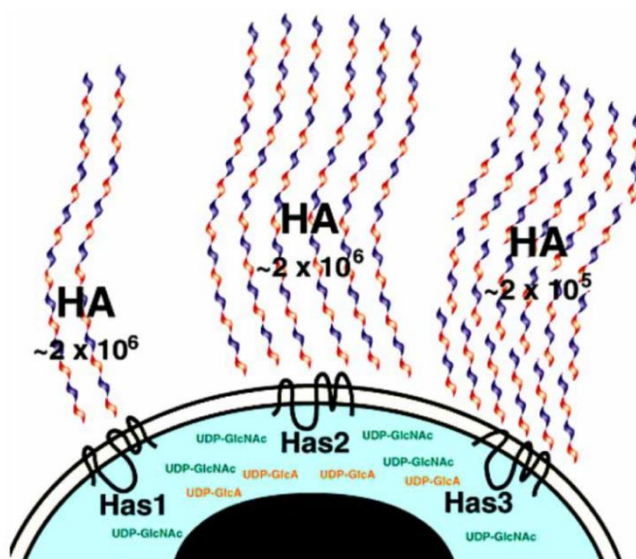


Obrázek 1 Primární chemická struktura kyseliny hyaluronové

3.1.3 Metabolismus kyseliny hyaluronové

Průměrné lidské tělo o hmotnosti 70 kg obsahuje přibližně 15 g HA, jejíž množství je nepřetržitě obnovováno [8]. HA je syntetizována řadou buněk, přičemž nejvýznamněji se na syntéze podílejí fibroblasty, keratinocyty a chondrocyty. Zvýšení tvorby HA lze ovlivnit růstovými faktory, ke kterým patří transformující růstový faktor TGF- β 1, PDGF (platelet derived growth factor) nebo EGF (endothelial growth factor) [9; 10]. Může docházet i k patologickému hromadění HA v organismu, které označujeme jako hyaluronóza [10].

Na rozdíl od ostatních glykosaminoglykanů, které jsou syntetizovány Golgiho aparátem a endoplazmatickým retikulem uvnitř buňky, je HA syntetizována na vnitřní straně plazmatické membrány pomocí integrálního membránového proteinu – hyaluronansyntasy (HAS). Hyaluronansyntasa existuje ve třech izoformách: HAS1, HAS2 a HAS3 (Obrázek 2), z nichž každá je zodpovědná za syntézu různě dlouhých řetězců HA [11; 12]. Při syntéze HA dochází k prodlužování řetězce polymeru střídavým přidáváním aktivovaných prekurzorů UDP-glukuronové kyseliny a UDP-N-acetylglukosaminu [2]. Díky tomu, že HAS jsou transmembránové proteiny, nově vznikající řetězec HA je syntetizován skrz cytoplazmatickou membránu do extracelulárního prostoru [11; 13].



Obrázek 2 Hyaluronansyntasy na povrchu buňky [8]

Degradace HA v těle (biodegradace) může obecně probíhat enzymatickou nebo chemickou cestou. Enzymatická cesta zahrnuje specifické enzymy – hyaluronidasy, které můžeme obecně rozdělit do tří hlavních skupin – savčí, bakteriální a parazitární (Obrázek 7). V těle savců se nachází 5 typů, a to Hyal-1 až 4 a PH-20 [10].

Za katabolismus intracelulárního HA je odpovědná hyaluronidasa Hyal-1, která štěpí HA na tetrasacharidy [8]. Po následném odbourání dalšími enzymy (β -glukuronidasa a β -*N*-acetyl-glukosaminidasa) vznikají konečné produkty *N*-acetyl-*D*-glukosamin a kyselina glukuronová, které mohou být recyklovány zpět na HA nebo dále katabolizovány [2].

Hyaluronidasa Hyal-2 se uplatňuje při katabolismu extracelulární HA, kdy je HA po rozštěpení transportována lymfatickým systémem do krve [2]. Následuje vyloučení játry nebo ledvinami [10].

PH-20 narušuje při oplození ochranný obal oocyty, který je bohatý na HA, čímž umožňuje průnik nejrychlejší spermie k vajíčku [14].

Detailnější mechanismus degradace HA savčími hyaluronidasami a dalšími skupinami enzymů je uveden v kapitole 3.2.

3.2 Degradace kyseliny hyaluronové

Depolymerizační reakce, při kterých se snižuje molekulová hmotnost hyaluronanu, lze na základě jejich mechanismu rozdělit do dvou skupin. První skupinou jsou reakce nesespecifické, při kterých nelze přesně lokalizovat místo na polymeru, kde štěpení proběhne. Nahodilý způsob degradace má za následek vznik komplexní směsi fragmentů hyaluronanu, kterou lze obtížně charakterizovat. Nesespecifické reakce jsou zpravidla vyvolány působením vnějších fyzikálních vlivů, jako jsou ultrazvuk [15], volné radikály [16], vysoké teploty [15; 17], kyseliny [18], zásady (viz kapitola 3.2.1.1), mikrovlnné záření [15] aj.

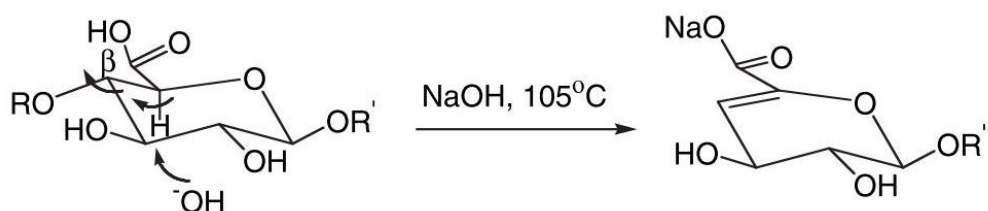
Druhou skupinou reakcí vedoucích k degradaci hyaluronanu jsou reakce, při kterých jsou štěpeny vazby specificky. Tento typ reakcí je zpravidla katalyzován enzymy (viz kapitola 3.2.2.1).

3.2.1 Degradace nespecifická

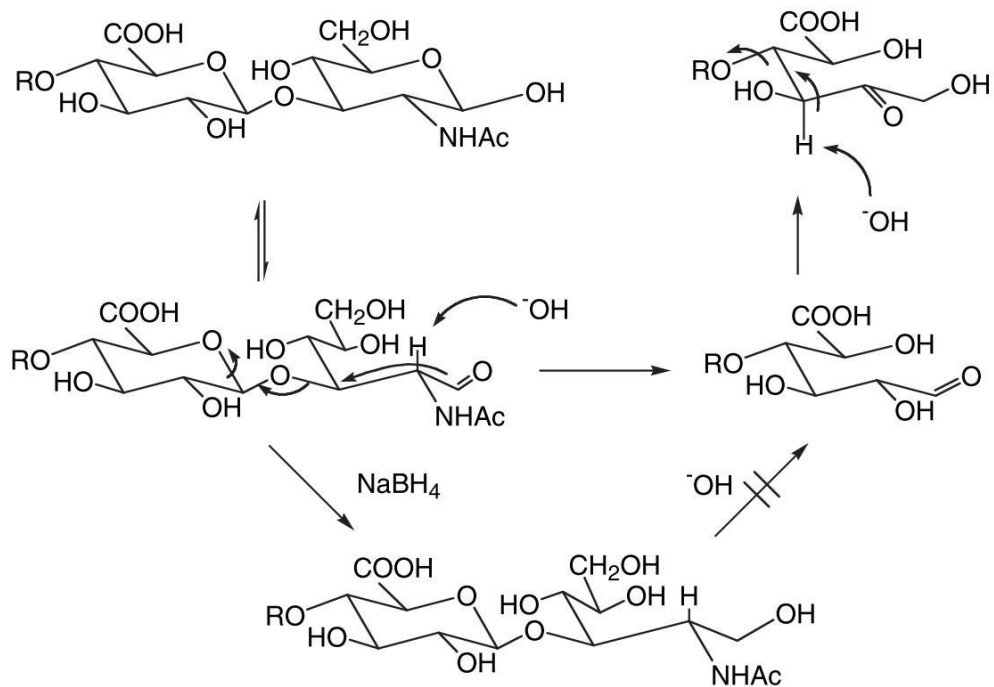
3.2.1.1 Alkalická hydrolýza kyseliny hyaluronové

Při specifické i nespecifické degradaci HA je důležitou hodnotou pH reakční směsi. Při enzymatické depolymerizační reakci je nutné dodržet optimální pH pro funkci přítomného enzymu, což je většinou pH neutrální nebo mírně kyselé [19; 20]. Při nespecifickém štěpení je sama kyselina nebo zásada zodpovědná za přeměnu struktury molekuly HA [18; 19; 20].

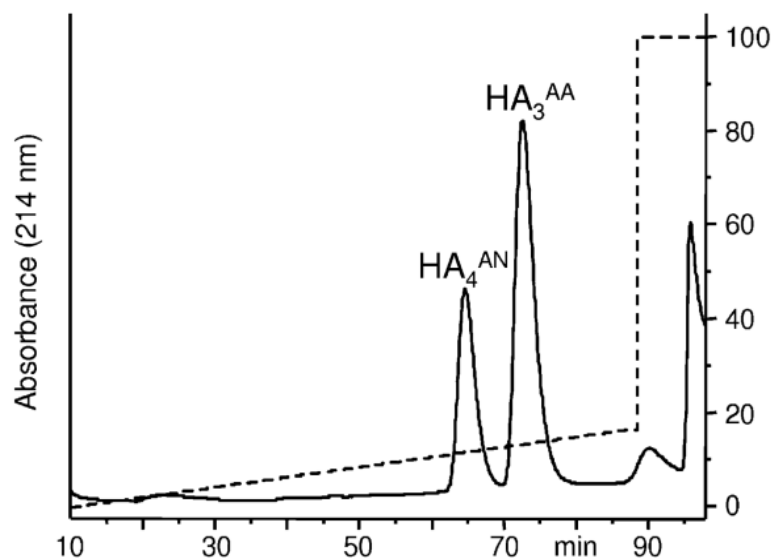
Při alkalické hydrolýze probíhají dvě chemické reakce najednou [21]. První z nich je β -eliminace kyseliny glukuronové (Obrázek 3), která vede ke vzniku dvojné vazby mezi 4 a 5 uhlíkem. Dále je odštěpen *N*-acetylglukosamin vlivem tzv. peelingové reakce (Obrázek 4). Výsledné zastoupení produktů je závislé jak na přesné hodnotě pH, tak na teplotě reakční směsi [19; 22]. Majoritním výsledným produktem je HA kratší o jeden *N*-acetylglukosamin z redukujícího konce, dále je reakce doprovázena vznikem vedlejších degradačních produktů [7; 23]. Produkty alkalického peelingu lze rozdělit do tří hlavních skupin. První tvoří zbytek nerozštěpené HA a HA kratší o *N*-acetylglukosamin (Obrázek 5), druhou odštěpené molekuly *N*-acetylglukosaminu a třetí skupina zahrnuje nízkomolekulární vedlejší degradační produkty [22].



Obrázek 3 β -eliminace kyseliny glukuronové při alkalické hydrolýze HA [7]



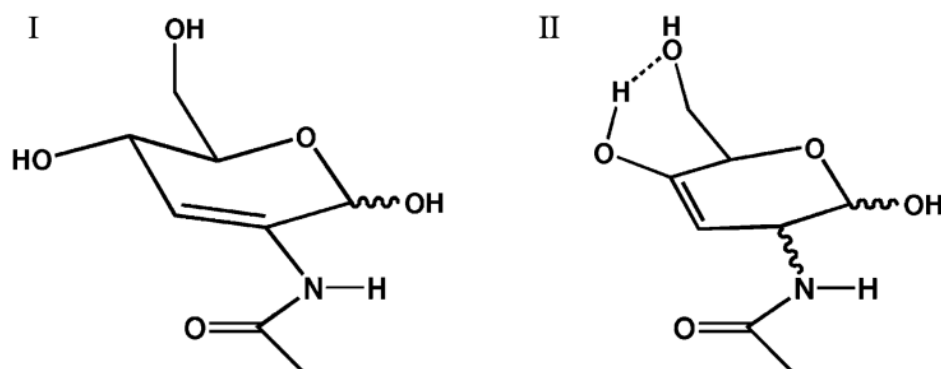
Obrázek 4 Peelingová reakce [7]



Obrázek 5 Příklad výsledného chromatogramu po alkalické hydrolyze HA v 40mM roztoku NaOH po dobu 30 minut [22]

(HA_4 – původní tetramer, HA_3 – vzniklý trimer)

Blundell a Almond (2006) ve své práci popsali, že při alkalickém peelingu vzniká kromě majoritního degradačního produktu Δ -*N*-acetylglukosaminu (Obrázek 6 I) minoritně i směs stereoizomerů (E)-3-dehydroxy-3-en-D-GlcNAc a (E)-3-dehydroxy-3-en-D-ManNAc (Obrázek 6 II) [22].



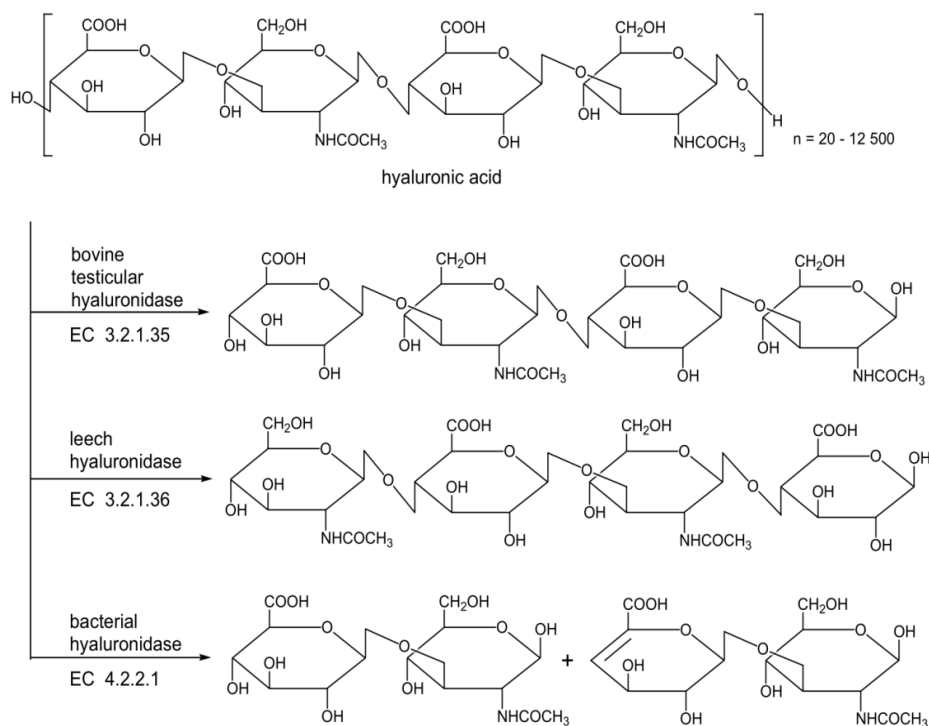
Obrázek 6 Vedlejší degradační produkty po alkalické hydrolýze HA [22]

3.2.2 Degradace specifická

3.2.2.1 Enzymatická degradace kyseliny hyaluronové

Klasifikace

Enzymy štěpící HA lze rozdělit do tří základních skupin. Jsou to enzymy eukaryotní, o kterých je z velké části pojednáno v předchozí kapitole (3.1.3), a enzymy prokaryotní a parazitární [24]. Klasifikace hyaluronidas byla sestavena Meyerem v sedmdesátých letech [25]. Tato klasifikace rozdělila enzymy štěpící HA do tří hlavních tříd (Obrázek 7).



Obrázek 7 Klasifikace hyaluronidas [25]

První skupinou hyaluronidas jsou hyaluronát-4-glykanohydrolasy (ES 3.2.1.35), které štěpí β-1,4 glykosidickou vazbu [26]. Mezi nejznámější zástupce patří enzymy testikulární (BTH – bovine testicular hyaluronidase), lyzozomální (β-glukuronidasa, β-N-acetyl-glukosaminidasa) a hyaluronidasy obsažené ve včelím a vosím jedu. Kromě HA mohou štěpit i další glykosaminoglykany, jako je chondroitin sulfát nebo dermatan sulfát [26; 27].

Druhá skupina je reprezentována hyaluronidasami vyskytujícími se ve slinných žlázách pijavic a měchovců [10; 24]. Hyaluronát-3-glykanohydrolasy (EC 3.2.1.36) štěpí β-1,3 glykosidickou vazbu, tak vznikají fragmenty s glukuronovou kyselinou na redukujícím konci [24].

Hyaluronidasy izolované z bakterií se nazývají HA lyasy (EC 4.2.2.1) a degradují molekulu HA β-eliminační reakcí, čímž vzniká nenasycený disacharid [28]. HA lyasy jsou produkovány mnohými mikrobiálními kmeny, jako jsou *Clostridium*, *Micrococcus*, *Streptococcus* a *Streptomyces* [24; 29].

Eukaryotní enzymy

Hlavní eukaryotní enzymy, které se v lidském organismu podílejí na metabolismu HA, jsou zmíněny v kapitole 3.1.3. Mechanismus působení BTH (viz Obrázek 7) [30].

Dalším významným zástupcem je enzym BTH (bovinní testikulární hyaluronidasa), která byla po dlouhou dobu známa jako složka extraktu hovězích nebo ovčích varlat [31]. V roce 1997 Meyer svou studií prokázal, že je BTH součástí transmembránového proteinu PH-20, který se podílí svým štěpením HA při oplození vajíčka [32] (kapitola 3.1.3). Přípravky obsahující BTH se používají v lékařství často ve spojení s kolagenasou k oddělení extracelulární matrix mezi buňkami živočišné tkáně. Tímto postupem se uvolní životaschopné buňky pro použití v tkáňových kulturách [31; 33].

Prokaryotní enzymy

Mezi prokaryotické enzymy - lyasy patří bakteriální β -endoglykosidasy, které specificky štěpí β -1,4 vazbu HA i v jiných glykosaminoglykanech [24; 26]. Tyto enzymy fungují na principu β -eliminace za vzniku nenasycené vazby. Přítomnost dvojnásobné vazby mezi uhlíky 4 a 5 umožňuje stanovovat aktivitu enzymových preparátů přímo spektrofotometricky. Stejně snadná metoda stanovení aktivity není pro eukaryotní enzymy (hydrolasy) k dispozici [26]. Relativně snadné stanovení aktivity prokaryotických enzymů poskytuje velké množství informací a usnadňuje tak jejich důkladnou charakterizaci [29].

Exoglykosidasy, které zahrnují β -glukuronidasu a β -*N*-acetyl-hexosaminidasu, jsou vhodné k degradaci HA při odstraňování jednotlivých monosacharidových jednotek [26]. Endolytické štěpení vytváří nová substrátová umístění pro tyto exoglykosidasy. Avšak příspěvek k celkovému katabolismu HA u bakterií nebo jejich eukaryotických hostitelů není zatím znám [26; 34].

3.2.3 Izolace a výroba HA

V současné době se HA vyrábí relativně snadno a ve velkém měřítku biotechnologicky s použitím geneticky modifikovaných bakterií pěstovaných ve velkoobjemových fermentorech. Izolace HA z živočišných tkání se dnes prakticky, většinou kvůli etické otázce, nepoužívá [35; 36]. V minulosti se při takové izolaci HA používaly hlavně kohoutí hřebínky, sklivec oka skotu nebo lidský pupečník (viz kapitola 3.1.1). Nejen, že tento postup byl velice časově i finančně náročný, ale ani výtěžky nebyly dostatečné. [35].

Jako bakteriální producenti HA se nejčastěji používají různí zástupci rodu *Streptococcus*, a to zejména zvířecích patogenů, kteří syntetizují HA jako ochranu proti rozpoznání imunitním systémem hostitele [10; 36]. Jako první byly k průmyslové produkci HA využity oslabené kmeny *Streptococcus zooepidemicus* a *Streptococcus equi* [36; 37]. Díky těmto bakteriím jsou některé firmy schopné vyprodukovat až několik tun HA ročně [38].

Dalším slibným organismem pro výrobu HA je geneticky modifikovaný kmen *Bacillus subtilis* [39]. Do genomu této bakterie byl v laboratoři vložen gen *hasA*, kódující enzym HA syntasy. Velikou výhodou použití *B. subtilis* je nejen poměrně nenáročná kultivace ve velkém měřítku ale, díky tomu, že tento kmen neprodukuje žádné endo- ani exotoxiny, nemusí být výsledný produkt složitě purifikován [37; 38].

3.2.4 Význam a využití HA

HA nachází díky svým vlastnostem široké uplatnění nejen v biomedicínských aplikacích, ale například i v kosmetice a farmaceutickém průmyslu. HA je výjimečná zejména pro své reologické vlastnosti, vysokou biokompatibilitu a viskoelasticitu a schopnost vázat velké množství vody. Jelikož je HA přirozenou součástí mnoha tkání, při její aplikaci se nerozvíjí reakce imunitního systému.

HA je úzce spojena s funkcí oka. Nejenže je součástí epitelu rohovky, ale má také důležité zastoupení ve sklívci nebo slzných kanálcích [40]. Proto se, díky vysoké

viskoelasticitě, v oftalmologii využívají fyziologické roztoky HA. Uplatňují se například při operacích oka, kdy tvoří náhradu sklivce, nebo jako ochranné medium oka při odstraňování šedého zákalu nebo při implantaci nitrooční čočky [35; 41].

Další důležitou oblastí použití HA je u pacientů s postižením kloubů. Tato onemocnění postihují hlavně starší generaci a patří mezi ně revmatoidní artritida a osteoartróza [42; 38]. Jedná se o degenerativní onemocnění chrupavky, která nejčastěji postihují klouby kolenní a kyčelní, mohou se však vyskytovat i v páteři nebo v kloubech horních končetin [38]. Podobně jako u lidí se uplatňuje injekční aplikace vysokomolekulárního HA přímo do kloubu (viskosuplementace) rovněž ve veterinární medicíně [43]. Mezi nejčastější pacienty patří dostihoví koně nebo velká plemena psů, u kterých je frekvence kloubních onemocnění poměrně vysoká [44]. Firma Contipro nabízí pro taková zvířata přípravek pro intraartikulární aplikaci (Bonharen) nebo doplňkové krmivo pro koně s obsahem HA (Geloren) (Contipro Pharma a.s.).

Přípravky s HA se používají při hojení ran. Léčba chronické rány je -na rozdíl od akutní- častější a většinou také komplikovanější. Svůj podíl na tom nese celkové stárnutí populace a s tím spojené ubývání HA v tkáních včetně kůže [45]. Další komplikace mohou nastat u pacientů s diabetem, kteří mají zvýšenou hladinu glukosy v krvi. To vede k poškození cév i nervů v končetinách a přispívá k rozvoji bakteriální infekce [45; 46]. Pro léčbu syndromu diabetické nohy se velmi úspěšně používá výrobek Hyodine[®] (Contipro Pharma, a.s.), který kromě HA obsahuje komplex jódu chránící přítomnou HA proti degradaci bakteriálními enzymy.

Vrásky se objevují v důsledku ubývání HA v kůži během procesu stárnutí [35]. Použití krémů s obsahem HA napomáhá hydrataci pleti, navrácí jí pružnost, a tím snižuje hloubku vrásek. Po aplikaci na pokožku vzniká tenký film HA, který má schopnost na sebe vázat molekuly vody ze vzduchu, tím zajišťuje pleti dostatečnou hydrataci po dlouhou dobu [38; 47]. Přípravky s HA mají navíc schopnost chránit pokožku před UV zářením [48].

Své využití nacházejí kromě vysokomolekulární HA i její fragmenty, které se v organismu účastní fyziologických i patologických procesů [34]. Jsou to biologicky aktivní látky, které v těle mohou ovlivňovat produkci cytokinů, čímž se podílejí na aktivaci imunitní odpovědi [34; 49]. Specifická funkce HA fragmentů závisí na jejich molekulové hmotnosti. HA s molekulovou hmotností (M_w) 1000 kDa nebo vyšší jsou

obecně známy jako inhibitory proliferace a migrace buněk, naproti tomu fragmenty HA s nízkou M_w (3-300 kDa) obvykle podporují buněčnou proliferaci a migraci, a podílejí se na prozánětlivých procesech [49; 50; 51]. Oligosacharidy HA nalézají své uplatnění u přípravků pro ochranu a hydrataci kůže, také pomáhají zmírňovat projevy procesu stárnutí [52].

3.3 Analýza kyseliny hyaluronové

3.3.1 Kapalinová chromatografie

Základním principem kapalinové chromatografie je mnohonásobné opakované ustalování rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází, kdy stacionární fáze je většinou sorbent tvořený pevnými částicemi o různé velikosti a mobilní fáze je kapalina [53; 54]. Nadávkovaný vzorek je unášen mobilní fází a při průchodu přes stacionární fázi dochází k interakci funkčních skupin analytu s funkčními skupinami sorbentu, tím dochází k retenci částic analytu na koloně. Retence na koloně trvá různě dlouhou dobu a je ovlivněna funkčními skupinami stacionární fáze a složením fáze mobilní [54; 55]. Zjednodušeně lze říci, že se jedná o rozdělení složek směsi mezi dvěma fázemi v závislosti na afinitě analytu ke každé z nich. Kapalinová chromatografie se využívá především k separaci směsí látek, které jsou netěkavé nebo málo těkavé a termicky labilní [56; 54].

3.3.1.1 Kapalinový chromatograf

Mobilní fáze

Mobilní fáze je čerpána ze zásobníku pomocí čerpadla (Obrázek 8). Obvykle prochází filtrem umístěným před čerpadlem [56]. Složení mobilní fáze může být v průběhu analýzy konstantní – izokratická eluce, kterou lze použít pro směsi látek, jejichž afinita ke stacionární fázi (a z toho vyplývající retenční čas) se příliš neliší [53; 56]. Pokud je analyzována směs látek s rozdílnou afinitou ke stacionární fázi, izokratickou elucí nelze dosáhnout optimálního rozdělení v přiměřeném čase, proto je

na místě zvolit eluci gradientovou, při které se k první mobilní fázi plynule přimíchává fáze druhá s větší eluční silou. Vytváří se tak plynulý gradient mobilních fází [53; 56].

Čerpadlo

Ve většině HPLC aplikací se běžně používají pístová nebo membránová čerpadla, která dosahují obvykle průtoku v rozsahu od stovek $\mu\text{l}/\text{min}$ do desítek ml/min při tlaku až 40MPa [57]. Dobré čerpadlo musí umožňovat konstantní tok mobilní fáze bez pulzace [55].

Aktuálním trendem v instrumentálních metodách je rychlejší a účinnější analýza za spotřeby co nejmenšího množství vzorku i reagensů. V chromatografii to znamená použití UHPLC čerpadla, které je schopno vyvinout tlak až 130MPa [55; 57].

Dávkování vzorku

Dávkování vzorku probíhá buď manuálně pomocí injekční stříkačky, kdy ovšem může být komplikací nedokonalá zručnost pracovníka a nastříknutí nechtěné vzduchové bubliny, nebo automatizovaně s využitím automatického dávkovače (autosampleru). Ten je většinou složen z pohyblivé jehly spojené s dávkovací smyčkou a plata pro umístění vialky se vzorkem [54]. Nástřik je řízen ovládacím softwarem, ve kterém se zadávají souřadnice příslušné vialky a požadovaný objem nastříkovaného vzorku. U kapalinových chromatografů typu HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) se používá dávkování pomocí vícecestného ventilu s připojenou dávkovací smyčkou [54; 57; 58]. V praxi se většinou setkáme se šesticestným nebo sedmicestným ventilem. Dávkovaný objem je dán velikostí smyčky – jednotky až stovky μl [56; 54].

Kolona – stacionární fáze

Chromatografická kolona je kovová (ocel, nerez) nebo skleněná trubice různé délky a průměru, která je naplněna stacionární fází (Obrázek 8) [58]. Náplň je tvořena malými sférickými částicemi o velikosti 1,7–10 μm [57; 58]. Kovové kolony jsou většinou plněné a testované přímo výrobcem, zatímco skleněné kolony se mohou plnit sorbentem přímo v laboratoři. Důležité je rovnoměrné a homogenní rozložení sorbentu v koloně [53; 57].

Separace jsou založeny na povrchových interakcích sorbentu a analytu, proto je výběr stacionární fáze klíčový. Většina používaných sorbentů je založena na bázi oxidu křemičitého (silica), který je chemicky inertní a má dobré chromatografické a mechanické vlastnosti. Dostupné jsou ale i stacionární fáze na bázi oxidu hlinitého (alumina), oxidu zirkoničitého (zirconia), oxidu titaničitého (titania) nebo organických polymerů [57]. V závislosti na typech ligandů navázaných na povrch částic lze stacionární fáze rozdělit na fáze s polárním, nepolárním (reverzním)(3.3.1.2), iontovým nebo chirálním charakterem [56; 57]. U gelové permeační chromatografie je používán gelový sorbent, který vytvoří tzv. molekulové síto, a složky směsi jsou rozdělovány na základě velikosti molekul [54; 57; 58].

Stacionární fáze při ionexové chromatografii - ionexy mají na svém povrchu chemické skupiny nesoucí náboj. Ionexy rozdělujeme podle náboje na anexy nesoucí na povrchu kladný náboj a přitahující tak anionty a katexy se skupinami nabitými záporně a přitahující kationty [56]. Při separaci dochází k reverzibilní výměně iontů ze vzorku s ionty elektrostaticky vázanými k pevnému chemicky inertnímu podkladu. Tyto stacionární fáze nacházejí své uplatnění při separaci nabitých i amfoterních látek, které získávají náboj při změně pH [56; 58]. Ionexy se používají pro separaci směsí aminokyselin, peptidů nebo oligosacharidů [59; 60].

Trendem posledního desetiletí je používání tzv. monolitických kolon. Sorbent je tvořen porézním monolitickým materiálem (celá kolona se chová jako jediná porézní částice), který obsahuje dvě velikosti pórů [57; 61]. Makropóry (průměr řádově μm) snižují odpor stacionární fáze, a tím umožňují použití vyšších průtoků mobilní fáze bez nárůstu tlaku na koloně. Mezopóry (průměr řádově desítky nm) zvětšují aktivní povrch pro separaci, čímž zvyšují účinnost separačního procesu [57].

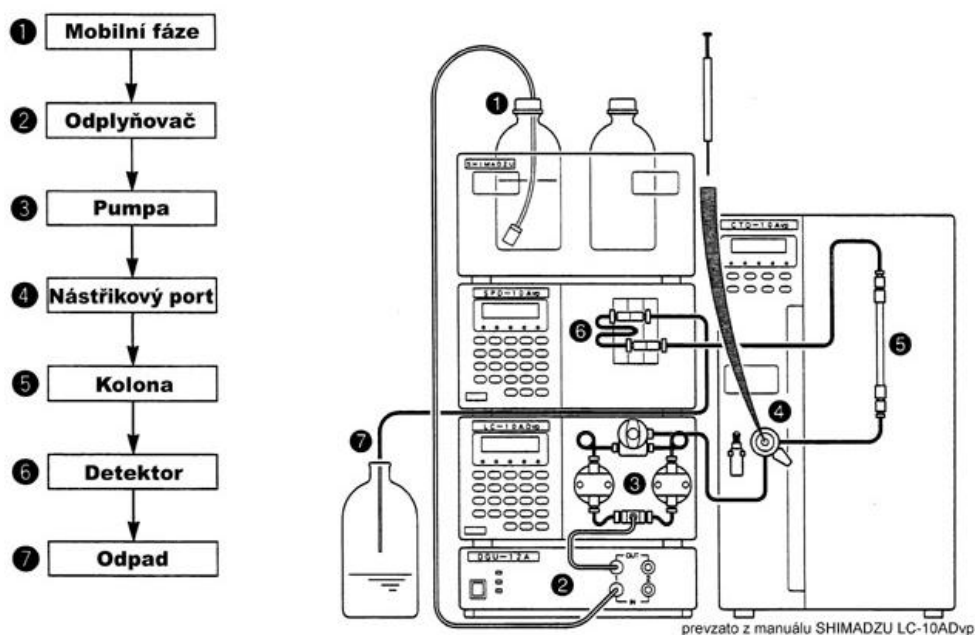
Detektor

Průtokový detektor je připojen na výstupu kolony (Obrázek 8). Velká důležitost je kladena na citlivost, robustnost a stabilitu detektoru, neboť na těchto vlastnostech závisí výsledek analýzy [53; 58]. V minulosti byl signál detektoru snímán zapisovačem, dnes je celý přístroj včetně detektoru ovládán počítačem s chromatografickým softwarem, který slouží k vyhodnocování výsledků a dalšímu zpracovávání dat [53].

Pro svou jednoduchost a dostatečnou citlivost je nejpoužívanějším detektorem spektrofotometr neboli UV-VIS detektor [58]. Pracuje na principu interakce látek s elektromagnetickým zářením v UV nebo viditelné oblasti spektra a měří absorbanci eluátu vycházejícího z kolony. Jednodušší spektrofotometry měří pouze při jedné vlnové délce, ty složitější ji mohou měnit pomocí monochromátoru nebo díky diodovému poli měřit celé spektrum v zadaném rozmezí vlnových délek (DAD – Diode Array Detector) [56; 57]. Podmínkou pro použití spektrofotometrického detektoru je, aby měřený analyt absorboval záření o zadané vlnové délce. Absorbance závisí na vlnové délce a na přítomnosti funkčních skupin analytu a podle Lambert-Beerova zákona je přímo úměrná koncentraci látky ve vzorku [53; 54; 58].

Druhým nejpoužívanějším je detektor fluorescenční. Jedná se o detektor vysoce selektivní, jelikož lze analyzovat látky pouze přímo fluoreskující nebo látky, které fluoreskují po derivatizaci s vhodným činidlem [58]. V první fázi je molekula vzorku excitována (převedena do excitovaného stavu) absorpcí elektromagnetického záření, které poskytuje vnější zdroj. Ve druhé fázi je přebytečná energie vyzářena v podobě emisního záření a detekována fluorimetrem. Intenzita emisního záření je přímo úměrná koncentraci fluoreskující látky ve vzorku [54; 56].

Dále se v kapalinové chromatografii používají detektory hmotnostní (viz kapitola 3.3.2), detektory založené na elektrochemických dějích (konduktometr, potenciometr nebo ampérmetr) nebo refraktometrický detektor [54; 58].



Obrázek 8 Schéma kapalinového chromatografu (HPLC)

(převzato z manuálu SHIMADZU LC-10ADvp)

3.3.1.2 Kapalinová chromatografie na reverzní fázi

Během vývoje chromatografie bylo využití normálních fází potlačeno ve prospěch chromatografie na reverzních fázích, a to hlavně kvůli širšímu rozsahu použití a větší robustnosti [53]. Hlavní nevýhodou normálních fází je vysoká povrchová aktivita a kyselost silikagelu, což vede k problémové analýze bazických vzorků [57].

Kapalinová chromatografie na reverzní fázi se principiálně neliší od klasické chromatografie. Největší rozdíl je ve složení mobilní a stacionární fáze, kdy u reverzní chromatografie má stacionární fáze nepolární charakter a mobilní fáze polární. Základ reverzní fáze tvoří silikagel, na kterém jsou navázány postranní řetězce tvořené 1 – 30 uhlíky [57]. Mobilní fázi jsou většinou vodné roztoky.

Reverzní fáze jsou dnes nejpoužívanějšími stacionárními fázemi ve spojení s HPLC. Nejpopulárnější se staly reverzní fáze s uhlíkatým řetězcem C18 nebo ODS (oktadecylsilikagel) [53; 62].

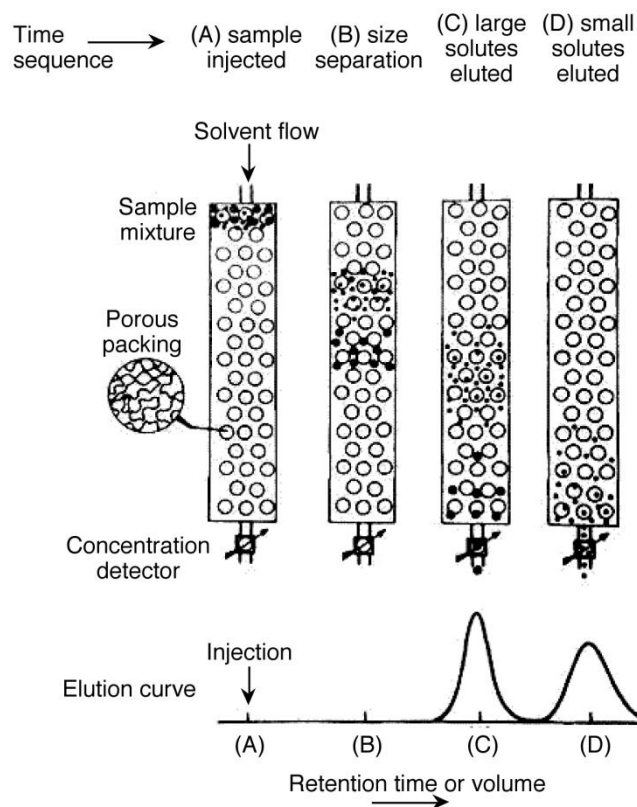
3.3.1.3 Gelová permeační chromatografie

Pomocí gelové permeační chromatografie (GPC; Obrázek 9) jsou látky rozdělčovány na základě jejich velikosti a tvaru [58]. Stacionární fáze má podobu gelu a tvoří tzv. molekulové síto, které je složeno ze sférických částic. Tyto částice jsou inertními polymery, které s molekulami vzorku neinteragují, a obsahují póry o známé velikosti udávané jako prahová hodnota molekulové hmotnosti (cutoff) obvykle v rozmezí 5 až 20 μm . [56; 58; 63]. Při průchodu přes molekulové síto jsou malé molekuly zadržovány delší dobu, neboť vstupují do všech pórů sorbentu, zatímco velké molekuly sítím zadržovány nejsou, a proto eluují v dřívějším čase [7; 56].

Nejčastěji se při GPC volí hydrofilní gely na bázi agarosy, dextranu nebo polyakrylamidu. Před separací je nutné zvolit správný gel pro daný vzorek, protože každý gel obsahuje póry různých velikostí, tzv. frakcionační rozsah gelu [56; 63]. Mohlo by pak dojít k tomu, že vlivem špatně zvoleného gelu se vzorek vůbec nerozdělí a všechny molekuly budou vycházet z kolony ve stejném retenčním čase [56; 58].

Kvalitu separace pomocí GPC lze ovlivnit vhodným zvolením podmínek, mezi něž patří stacionární fáze – gel se správnými velikostmi pórů, výška sloupce gelu, objem dávkovaného vzorku a průtok mobilní fáze [56]. Podstatný vliv na správnost separace má i koncentrace vzorku. Před separací je nutné vzorek dostatečně naředit, což je zejména důležité u vzorků vysokomolekulární HA, která s vodou tvoří vysoce viskózní roztoky. Pravidlem je, že objem vzorku, který je na kolonu nastříkovan, by neměl přesáhnout 1-5% objemu lože gelového sorbentu. Pro optimalizaci separace viskózních vzorků se doporučuje snížení průtoku mobilní fáze [56; 63].

GPC se v praxi využívá pro odsolování vzorků polysacharidů, nukleových kyselin nebo proteinů, své uplatnění má i při frakcionaci směsí [63]. Díky tomu, že částice vzorku s gelem chemicky neinteragují, je zachována biologická aktivita a dochází k minimálním ztrátám vzorku, což je významnou výhodou GPC oproti jiným typům chromatografie [56; 63].



Obrázek 9 Schéma gelové permeační chromatografie [64]

3.3.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS - mass spectrometry) je citlivá a selektivní analytická metoda, která podává informaci o molekulové hmotnosti, elementárním složení a zastoupení izotopů ve studovaném vzorku [58; 65]. Základním principem je převedení neutrálních molekul na ionty a jejich rozlišení podle poměru hmotnost/náboj [56; 58; 65]. Hojně se MS využívá jako detektor pro plynovou nebo kapalinovou chromatografii [65].

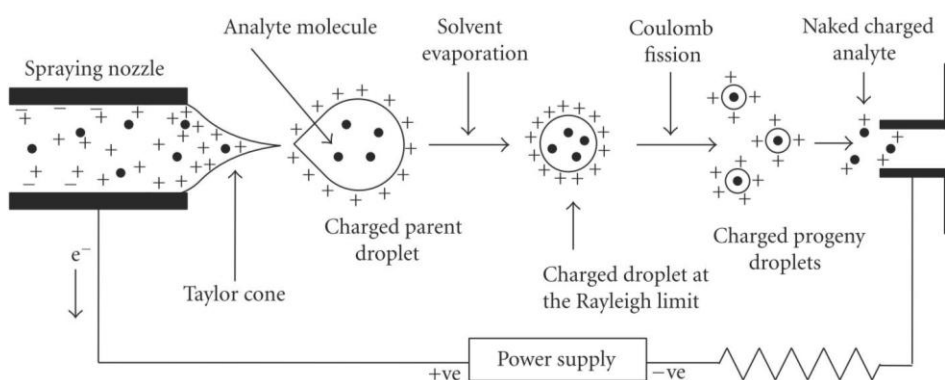
Iontový zdroj

Iontový zdroj slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice. Zřejmě nejčastějším typem iontového zdroje používaným pro přímé spojení s kapalinovým chromatogramem je ESI (ionizace elektrosprejem), kdy je analyt rozpuštěný ve vhodném eluentu přiváděn kovovou kapilárou do iontového zdroje [65]. Na kapiláru je vloženo napětí (3-5kV). Vzorek je unášen nosným plynem (nejčastěji dusíkem) a na výstupu z kapiláry vznikají kapičky, které nesou velké množství nábojů.

Postupným odpařováním rozpouštědla a vlivem koncentrace souhlasně nabitých iontů vzorku dojde ke coulombické explozi a uvolnění jednotlivých iontů (Obrázek 10) [65; 66]. ESI se nejčastěji spojuje s hmotnostními analyzátory nepříliš náročnými na kvalitu vakua – například s kvadrupólem nebo iontovou pastí [65].

Při použití laserové desorpce za účasti matrice (MALDI) je vzorek smísen s vhodnou matricí, která se podílí na ionizaci analytu [65; 67]. Puls laserového záření je matricí absorbován, dochází k přenosu energie, ionizaci a desorpci iontů vzorku. MALDI většinou pracuje v kombinaci s TOF (time of flight) detektorem [67].

Další volbou může být chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) nebo elektronová ionizace (EI), která patří mezi tvrdé ionizační techniky [58; 65].



Obrázek 10 Schéma procesu ionizace elektrosprejem [65]

Hmotnostní analyzátor

Hmotnostní analyzátor slouží k rozdělení iontů podle jejich poměru m/z (hmotnost/náboj) [58; 65]. Je umístěn za iontovým zdrojem a před detektorem. Separace probíhá za vysokého vakua ($10^{-3} - 10^{-10}$ Pa) [58].

Velkou skupinu tvoří analyzátory kvadrupólové. Kvadrupól je tvořen čtyřmi tyčemi, na které je vkládáno střídavé elektrické napětí. V danou chvíli je frekvence střídavého napětí taková, že po stabilní trajektorii se v něm může pohybovat pouze iont s určitou hodnotou m/z , takový iont kvadrupólem projde, ostatní ionty jsou vyloučeny [56; 65]. Plynulou změnou frekvence střídavého napětí (skenováním) postupně projdou na detektor ionty se všemi hodnotami m/z v nastaveném rozsahu [58; 65]. Kvadrupól je

pravděpodobně nejrozšířenější hmotnostní analyzátor díky poměrně nízké pořizovací ceně, nevýhodou však je nižší hmotnostní rozlišení [65].

V průletovém (TOF – time of flight) analyzátoru jsou ionty rozdělovány podle doby průletu od zdroje k detektoru [65; 68; 69]. Urychlené ionty se pohybují různou rychlostí v závislosti na hodnotě m/z , tato hodnota se vypočítá ze změřeného času. Ionty s menší hodnotou m/z o stejné kinetické energii se pohybují rychleji a dostanou se na detektor dříve [68]. Jak již bylo zmíněno dříve, analyzátor doby letu se používá ve spojení s MALDI [65; 69]. TOF analyzátor dosahuje po ICR (iontová cyklotronová rezonance) nejvyššího hmotnostního rozlišení [68].

V posledních letech se v laboratořích rozmáhá trend tzv. tandemového uspořádání. Jedná se o spojení více analyzátorů za sebou. Typické jsou kombinace dvou kvadrupólů, kvadrupólu a průletového analyzátoru, iontové pasti s iontovou cyklotronovou rezonancí a další [65].

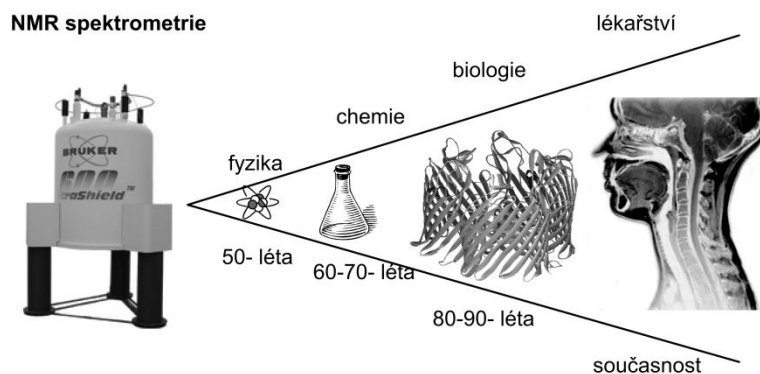
Detektor

Ionty separované ve hmotnostním analyzátoru jsou zaznamenány detektorem a signál je převáděn do digitální podoby. V elektronovém násobiči ionty dopadají na povrch elektrody, ze které vyrazí elektrony, ty jsou dále zesíleny dynodovým systémem [56; 65]. Na podobném principu pracuje fotonásobič s tím rozdílem, že ionty dopadají na fosforovou destičku, energie se uvolní ve formě fotonu, který je opět zesílen dynodami [56]. Ve Faradayově kleci dopadnou ionty na sběrnou elektrodu, na které je rezistorem měřen úbytek napětí, ten je úměrný počtu dopadajících iontů [56; 65].

3.3.3 Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Zpočátku našla NMR (nukleární magnetická rezonance) své uplatnění pouze v oblasti fyziky. Až po pochopení závislosti chemické struktury s tvarem NMR signálů se prosadila tato metoda strukturní analýzy i v chemii [70]. Používá se pro stanovení struktury zejména malých organických molekul. Další aplikace magnetické rezonance

je v medicíně, kde plní funkci neinvazivní diagnostické metody (viz Obrázek 11) [56; 70].



Obrázek 11 Historický pohled na uplatnění NMR technologie v oblastech vědy [70]

Základním principem NMR je interakce atomového jádra a magnetického pole [56; 70]. Atom musí splňovat podmínku nenulového jaderného spinu, jehož hodnota souvisí s počtem protonů a neutronů v jádře [70]. NMR studuje rozdělení energií jaderného spinu v magnetickém poli a s ním spojené přechody mezi spinovými stavy. Přechod mezi těmito hladinami lze vyvolat absorpcí kvanta elektromagnetického záření [56; 70].

NMR spektroskopie využívá vlastnosti atomu vodíku, jehož atomová jádra, která díky svému vysokému gyromagnetickému poměru a téměř 100% přirozenému izotopovému zastoupení, jsou vůbec nejcitlivější k NMR experimentům [70]. Odezva spinů vodíkových jader na excitaci je největší a přítomnost vodíkového atomu tak lze ve struktuře molekuly vystopovat i na relativně velkou vzdálenost [70]. Ze změřeného spektra pak můžeme vyčíst intenzitu signálů, chemické posuny protonů a interakce mezi nimi [56; 70].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie

Chemikálie název	Značka/ zkratka	Výrobce	Poznámky
kyselina chlorovodíková	HCl	Sigma-Aldrich, s.r.o.	ACS reagent
hydroxid sodný	NaOH	Sigma-Aldrich, s.r.o.	čistota ≥ 98 %; ACS reagent
kyselina mravenčí	HCOOH	Sigma-Aldrich, s.r.o.	čistota 98 - 100 %; ACS reagent
methanol	CH ₃ OH	Sigma-Aldrich, s.r.o.	čistota $\geq 99,9$ % gradient grade
acetonitril	CH ₃ CN	Sigma-Aldrich, s.r.o.	čistota $\geq 99,9$ %
kyselina trifluoroctová	CF ₃ COOH	Sigma-Aldrich, s.r.o.	čistota ≥ 99 %
demineralizovaná voda	H ₂ O	Contipro Biotech s.r.o.	z firemního rozvodu, odběrové místo v laboratoři E239
tetramer HA	HA4	Contipro Biotech, s.r.o.	čistota ≥ 95 %; šarže OS - 051012
tetramer HA	HA4	Contipro Biotech, s.r.o.	čistota ≥ 95 %; šarže SH4-170812
hydrogenuhlíčan amonný	NH ₄ HCO ₃	Sigma-Aldrich, s.r.o.	čistota $\geq 99,0$ %, Reagent Plus
hydrogenfosforečnan sodný	NaH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich, s.r.o.	čistota 98 – 100%

4.2 Přístroje

Kapalinový chromatogram Acquity H-class s PDA detektorem, Waters; Milford; CT, USA

Kapalinový chromatogram Shimadzu složený z modulů: SLC-10A VP, SPD-20A, SIL-10AP, LC-8A, Shimadzu corporation; Kyoto, Japonsko

Kapalinový chromatograf Alliance s UV/VIS detektorem, Waters; Milford, CT, USA

Vakuová odparka Rotavapor R-210, BÜCHI; Flawil, Švýcarsko

Kapalinový chromatogram Acquity s hmotnostním detektorem Synapt

HDMS, Waters; Milford, CT, USA

Lyofilizační jednotka Alpha 2-4 LSC, Christ; Osterode am Harz, Německo

4.3 Metody a postupy

4.3.1 Příprava vedlejších degradačních produktů kyseliny hyaluronové alkalickou hydrolyzou (peelingová reakce)

4.3.1.1 Optimalizace podmínek štěpení

Bylo připraveno 27 vzorků tetrameru HA (šarže OS-051012; Contipro) o koncentraci 4 mg/ml. Rozpouštědlem byl zvolen hydroxid sodný ve třech různých koncentracích: 1 M, 0,5 M a 0,1 M. Pro objem hydroxidu 5 ml bylo navažováno $20 \pm 0,2$ mg tetrameru.

Optimalizace probíhala za odlišných podmínek u každé trojice z 27 vzorků. Lišila se vždy koncentrace hydroxidu a teplota reakce. Tři různé teploty byly zvoleny dle možností laboratoře: teplota klimatizované laboratoře (21°C), chladnička (6°C) a vodní lázeň (39°C). Reakce byla zastavena neutralizací pomocí kyseliny chlorovodíkové (pH 6-7) u vzorků z vodní lázně a z laboratoře po 30 minutách, u vzorků z lednice po 24 hodinách.

Složení směsi po alkalické hydrolyze bylo analyzováno metodou HPLC na přístroji Acquity (Waters) s UV detekcí při 210 nm. Analýza probíhala při 30°C s použitím kolony Luna NH₂ (250 x 4,6 mm) od firmy Phenomenex. Analyty byly eluovány při průtoku 1 ml/min gradientem 2 mobilních fází: A) 16 mM NaH₂PO₄ a B) 0,4 M NaH₂PO₄. Průběh gradientové eluce byl proveden podle programu (viz Tabulka 1). Celková doba analýzy byla 35 minut. Objem nástřiku vzorku byl 30 µl. Data byla vyhodnocena systémem Empower (Waters).

Tabulka 1 Gradientová eluce při HPLC analýze na koloně Luna NH₂ (Phenomenex)

Čas	Mobilní fáze A	Mobilní fáze B
0 min	97,5%	2,5%
20 min	40%	60%
22 min	0%	100%
23 min	0%	100%
24 min	75%	25%
25 min	97,5%	2,5%

Hodnotila se podobnost chromatogramu (počet a retenční časy píků) vůči směsi po standardním peelingu (0,01 M NaOH / 4 hod při laboratorní teplotě) tak, aby se maximalizovaly plochy píků vedlejších degradačních produktů – tedy jiných produktů než jsou zbytkový HA4 a majoritně vznikající HA3, ale zároveň aby nevznikaly jiné produkty (další píky v chromatogramu) než při standardním peelingu.

4.3.1.2 Štěpení HA za optimalizovaných podmínek

Bylo naváženo 3x 1 g tetrameru HA (šarže SH4-170812, čistota $\geq 95\%$; Contipro). Ke každé navážce bylo přidáno 250 ml 0,1M roztoku hydroxidu sodného a po 30-ti minutách byla reakce ukončena neutralizací kyselinou chlorovodíkovou.

Tento postup byl kvůli nízkým výtěžkům původní reakce opakován ještě jednou s navážkou HA 1,695 g (tetramer HA, šarže SH4-170812, čistota $\geq 95\%$; Contipro). Následující kroky se shodovaly s předchozím experimentem.

4.3.2 Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie probíhala na HPLC systému značky Shimadzu s UV detekcí při 210 a 232 nm, s použitím kolony ECO 132304 (25 x 1000 mm) od firmy YMC a sorbentu Bio-Gel P2 fine (45 – 90 μm) od firmy Bio-Rad při průtoku 1 ml/min. Látky ve vzorku byly eluovány izokraticky mobilní fází 50 mM (NH₄)HCO₃.

Vzorek byl dávkován v objemu 2,5 ml pomocí injekční stříkačky. Eluce větších molekul (molekuly trimeru a tetrameru HA) probíhala od 150 do 220 minuty.

Sbírána byla druhá frakce (molekuly vedlejších degradačních produktů) s retenčním časem od 350 do 420 minuty.

Sesbírané frakce o objemu asi 240 ml byly odpařeny na vakuové odparce Rotavapor R-210 (výrobce BÜCHI) při tlaku v rozsahu 25 až 50 mbar za teploty vodní lázně 40°C.

4.3.3 Separace na reverzní fázi (RP-LC)

4.3.3.1 *Optimalizace podmínek separace*

Optimalizace podmínek separace frakcí vedlejších degradačních produktů HA probíhala na HPLC systému Alliance s UV detekcí při 210 a 232 nm (Waters), s použitím kolony Jupiter 4u Proteo 90A (250 x 4,60 mm) při gradientové eluci podle programu (viz Tabulka 2). Optimalizovány byly teplota kolony, složení a rychlost průtoku mobilní fáze.

Tabulka 2 Gradientová eluce při optimalizaci podmínek RP-HPLC separace

Čas	Mobilní fáze A	Mobilní fáze B
0 min	100%	0%
3 min	100%	0%
33 min	85%	15%
35 min	20%	80%
36 min	100%	0%
41 min	100%	0%

Složení mobilních fází

Bylo testováno různé složení mobilní fáze. Jako kyselý modifikátor vodné složky byla zvolena kyselina mravenčí nebo trifluoroctová kyselina. Organickou složku mobilní fáze tvořil methanol nebo acetonitril (viz Tabulka 3). Separace proběhla za všech kombinací kyselé a organické složky mobilní fáze. Dávkováno bylo 10 µl vzorku při průtoku 1 ml/min a gradientu mobilních fází (viz Tabulka 2).

Tabulka 3 Kombinace mobilních fází při optimalizaci

Mobilní fáze A	Mobilní fáze B
0,1% kyselina mravenčí	100% methanol
0,1% trifluoroctová kyselina	100% methanol
0,1% kyselina mravenčí	100% acetonitril
0,1% trifluoroctová kyselina	100% acetonitril

Výsledné chromatogramy byly porovnány. Hodnoceno bylo rozlišení, které bylo vypočítáno dle vzorce:

$$R_S = \frac{2 (V_{R2} - V_{R1})}{w_{b2} + w_{b1}}$$

R_S – hodnota rozlišení; $V_{R1, R2}$ – retenční čas píku 1,2; $w_{b2, b1}$ – šířka píku 1,2

Rozlišení je veličina bezrozměrná a větší hodnota R_S znamená lepší separaci.

Teplota

Analýza byla provedena při teplotách 25, 30, 35, 40, 45 a 50°C. Dávkováno bylo 10 μ l vzorku, separace probíhala gradientovou elucí dvou mobilních fází: A) 0,1% HCOOH a B) 100% methanol dle programu (viz Tabulka 2).

Hodnoceno bylo rozdělení jednotlivých složek směsi, slévání sousedících píků, ostrost a tvar píků. Výsledná teplota byla stanovena podle nejvyšší hodnoty rozlišení dvou sousedících píků.

Rychlost průtoku

Separace probíhaly při průtoku 1 ml/min, 0,8 ml/min a 0,6 ml/min gradientovou elucí dvou mobilních fází (viz Tabulka 2). Mobilní fáze A) 0,1% HCOOH

a mobilní fáze B) 100% methanol. Dávkováno bylo 10 µl vzorku, teplota kolony byla 25°C.

Výsledné chromatogramy byly hodnoceny z hlediska účinnosti separace. Ze dvou sousedících píků byla vypočítána hodnota rozlišení, u které platí, že čím je vyšší, tím je separace účinnější.

4.3.3.2 *Separace za optimalizovaných podmínek*

Separace jednotlivých frakcí vedlejších degradačních produktů a jejich sbírání probíhalo na HPLC systému Alliance s UV detekcí při 210 a 232 nm a se sběračem frakcí WFCIII (rack se zkumavkami o objemu max. 20 ml) (Waters). Dávkováno bylo 50 µl vzorku. Průtok mobilní fáze byl 4,5 ml/min a gradient naprogramovaný dle Tabulky 2. Pro preparativní účely byla použita totožná kolona Jupiter 4u Proteo 90A s větším průměrem (250 x 10,00 mm). Pro dosažení ekvivalentní separace se průtok mobilní fáze vypočetl dle vzorce:

$$\text{průtok MF preparace (ml/min)} = \frac{\text{průtok na anal koloně} \left(\frac{\text{ml}}{\text{min}}\right) * (\text{průměr prep kolony (mm)})^2}{\text{průměr anal kolony}^2 (\text{mm})}$$

$$\text{průtok MF preparace (ml/min)} = \frac{1 * 10^2}{4,6^2} = 4,73 \text{ ml/min}$$

Sbíráno bylo celkem 8 frakcí – tedy 8 největších píků chromatogramu. Separace byla opakována, dokud nebyl spotřebován veškerý vzorek, a odpovídající frakce byly spojeny. Po ukončení separace byly spojené frakce odpařeny na vakuové odparce Rotavapor R-210 (Büchi) při tlaku 25 až 50 mbar a při teplotě lázně 40°C. Rezidua kyseliny mravenčí z mobilní fáze byla odstraněna opakovaným promýváním odparky demineralizovanou H₂O.

4.3.4 **Lyofilizace**

Vzorky byly po odpaření rozpuštěny v malém množství demineralizované vody a přeneseny na Petriho misky a zmrazeny. Sušení probíhalo na lyofilizační jednotce Alpha 2-4 LSC (Christ) při teplotě -80°C a tlaku 4 mbar. Poté byly vzorky zváženy.

4.3.5 Identifikace vzorku pomocí LC-MS (liquid chromatography – mass spectrometry)

LC-MS identifikace vedlejších degradačních produktů hyaluronanu byla provedena na Acquity UPLC s detekcí pomocí hmotnostního spektrometru Synapt HDMS (Waters). Separace probíhala při laboratorní teplotě na koloně Jupiter 4u Proteo 90A (250 x 4,6 mm) od firmy Phenomenex. Analyty byly eluovány při průtoku 0,5 ml/min gradientem 2 mobilních fází: A) 0,1% HCOOH ve vodě a B) 100% methanol. Gradientová eluce probíhala podle následujícího programu (viz Tabulka 4). Celková doba analýzy byla 50 minut. Objem nástřiku vzorku byl 5 μ l. Data byla vyhodnocována v softwaru MassLynx (Waters).

Tabulka 4 Gradientová eluce při LC-MS analýze

Čas	Mobilní fáze A	Mobilní fáze B
0 min	100%	0%
5 min	100%	0%
20 min	70%	30%
35 min	5%	95%
38 min	5%	95%
40 min	100%	0%

Hmotnostní spektrometr s ionizací elektrosprejem pracoval v negativním módu. Eluát z kolony byl do zdroje spektrometru přiváděn přímo po HPLC separaci. Rychlost sběru dat byla 1 scan/s. Jako sušící (50 l/hod) a desolvatační (700 l/hod) plyn byl použit dusík. Napětí na kapiláře bylo 2,7 kV. Těleso iontového zdroje bylo vyhříváno na 100°C, desolvatační plyn měl teplotu 250°C. Pro každý vzorek se měření provádělo v rozsahu od 50 do 2000 m/z. Při MS/MS analýzách byla použita rampa kolizních napětí 15 – 30 V. Transferové napětí v kolizní cele bylo nastaveno fixně na 4 V. Jako kolizní plyn byl při MS/MS analýze použit argon.

4.3.6 Analýza pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR)

Strukturní analýza pomocí NMR se prováděla tak, jak je popsáno ve článku Šmejkalové a dalších z roku 2012 [18].

4.3.7 Testy viability

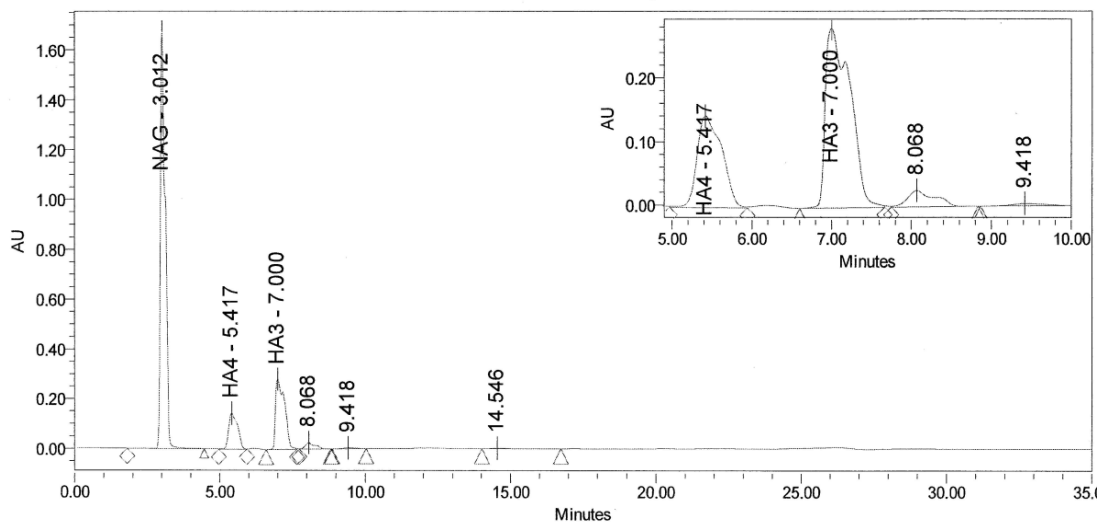
Testy cytotoxicity vedlejších degradačních produktů byly provedeny na několika buněčných liniích sledováním viability buněk. Testy byly provedeny pracovníky firmy Contipro (skupiny Fyziologie buňky) pod vedením Mgr. Kristiny Nešporové.

5 VÝSLEDKY

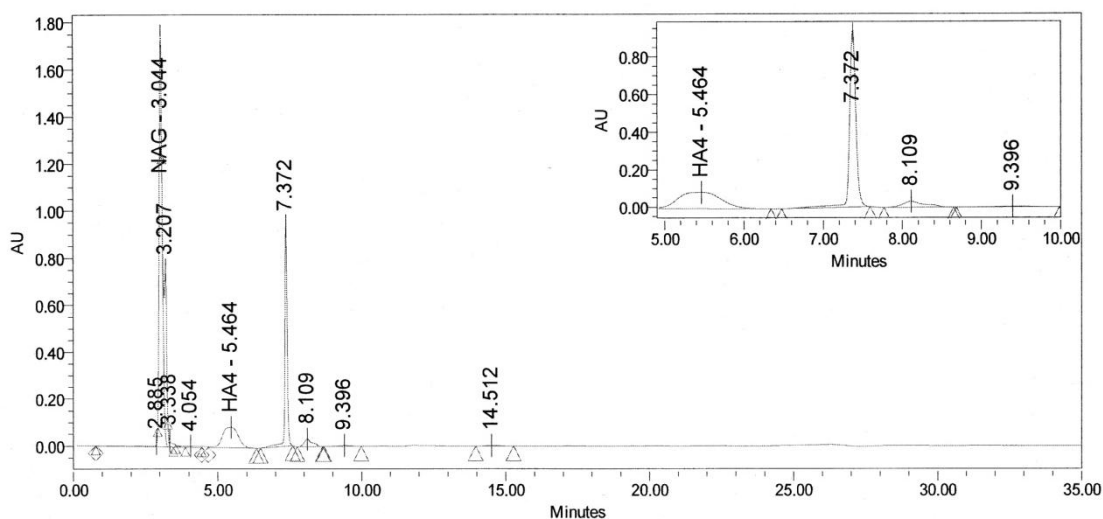
5.1 Optimalizace

5.1.1 Optimalizace podmínek alkalické hydrolýzy kyseliny hyaluronové

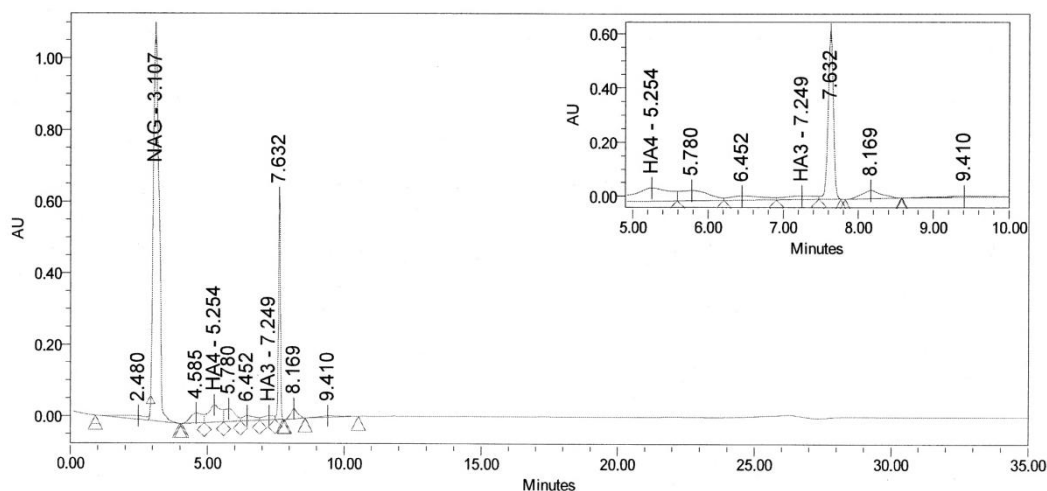
Podmínky byly optimalizovány tak, jak je popsáno v kapitole 4.3.1.1.



Obrázek 12 Chromatogram po peelingové reakci, která proběhla při laboratorní teplotě s použitím hydroxidu sodného o koncentraci **0,1 M**. Analýza byla provedena na koloně Luna NH₂ s UV detekcí při 210 nm.



Obrázek 13 Chromatogram po peelingové reakci, která proběhla při laboratorní teplotě s použitím hydroxidu sodného o koncentraci **0,5 M**. Analýza byla provedena na koloně Luna NH₂ s UV detekcí při 210 nm.



Obrázek 14 Chromatogram po peelingové reakci, která proběhla při laboratorní teplotě s použitím hydroxidu sodného o koncentraci **1 M**. Analýza byla provedena na koloně Luna NH₂ s UV detekcí při 210 nm.

Chromatogramy vzorků po alkalické hydrolýze tetrameru HA za různých podmínek (Obrázek 12; Obrázek 13; Obrázek 14) byly porovnány s chromatogramy produktů standardního peelingu (0,01 M NaOH / 4hod při laboratorní teplotě). Hodnocen byl počet a plochy píků. Při použití hydroxidu o vyšší koncentraci (Obrázek 13; Obrázek 14) byly pozorovány píky, které se při standardním peelingu nevyskytují. Při peelingu v hydroxidu o koncentraci 0,1 M (Obrázek 12) se naopak počet píků vůči standardnímu peelingu nezměnil, ale zvětšily se plochy píků VDP, proto byla tato koncentrace hydroxidu použita při následném peelingu tetrameru HA.

5.1.2 Optimalizace podmínek separace kapalinové chromatografie na reverzní fázi (RP-LC)

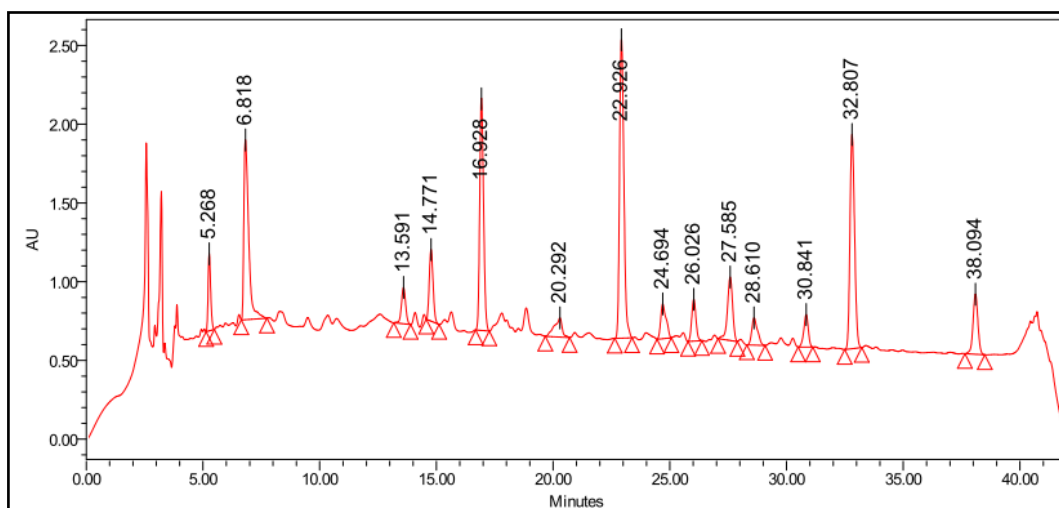
Gradient mobilních fází

Optimalizace probíhala tak, jak je popsáno v kapitole 4.3.3.1. Výsledné chromatogramy byly porovnány. Hodnotila se vypočítaná hodnota rozlišení jediných dvou píků, které se vyskytovaly samostatně při separacích za všech podmínek (Tabulka 5). Nejlepší separace bylo dosaženo v gradientu, kde vodnou složku tvořila 0,1% kyselina mravenčí a organickou složku 100% methanol (Obrázek 15).

Tabulka 5 Vypočítaná rozlišení při optimalizaci složení mobilní fáze

Složení mobilní fáze	Retenční čas píků (min)	Šířka píků (sec)	Rozlišení
MeOH + FA	16,928	35,000	9,05
	22,926	44,500	
MeOH + TFA	16,613	56,500	6,08
	22,842	66,500	
ACN + FA	15,411	75,500	4,12
	20,556	74,500	
ACN + TFA	17,161	33,500	7,58
	21,332	32,500	

MeOH – methanol, FA – kyselina mravenčí, TFA – kyselina trifluoroctová, ACN – acetonitril



Obrázek 15 Chromatogram směsi VDP získaných po peelingové reakci tetrameru HA. Analýza byla provedena na koloně Jupiter 4u Proteo 90A s UV detekcí 210 nm při eluci gradientem **methanolu** v 0,1% **kyselině mravenčí** podle programu (Tabulka 2).

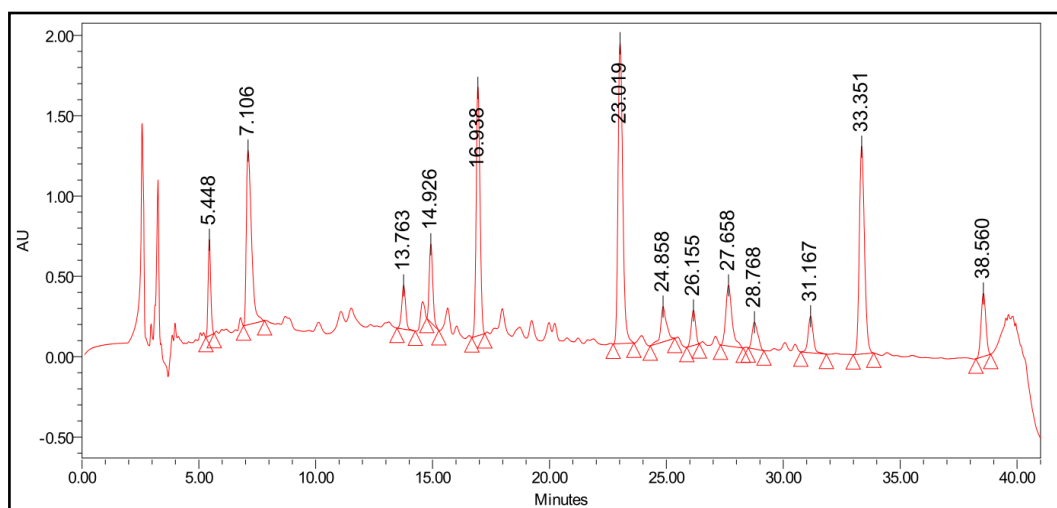
Teplota

Optimalizace teploty proběhla tak, jak je popsáno v kapitole 4.3.3.1

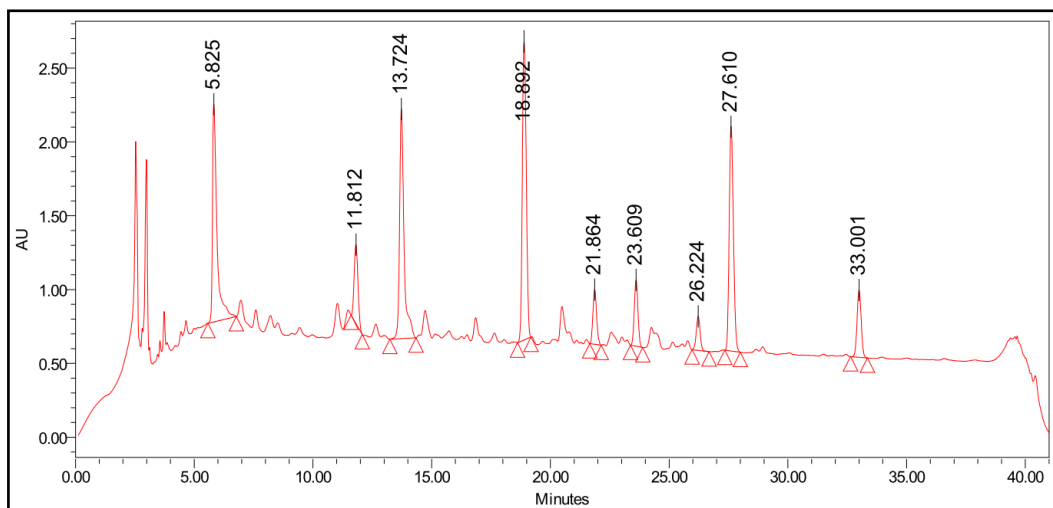
Nejlepší rozdělení proběhlo při nejnižší testované teplotě 25°C (Obrázek 16). S rostoucí teplotou docházelo ke slévání sousedních píků (Obrázek 17), tedy k horší separaci. Nejúčinnější separaci při 25°C potvrdila i nejvyšší hodnota rozlišení (Tabulka 6).

Tabulka 6 Výpočet rozlišení při optimalizaci teploty kolony

Teplota kolony	Retenční čas píků (min)	Šířka píků (sec)	Rozlišení
25°C	16,938	33,500	8,44
	23,019	53,000	
30°C	16,572	35,500	7,81
	22,56	56,500	
35°C	15,693	43,000	6,30
	21,362	65,000	
40°C	14,727	34,000	6,91
	20,138	60,000	
45°C	13,724	66,000	6,20
	18,892	34,000	
50°C	12,678	50,500	6,31
	17,62	43,500	



Obrázek 16 Chromatogram směsi VDP získaných po peelingové reakci tetrameru HA. Analýza byla provedena na koloně Jupiter 4u Proteo 90A s UV detekcí 210 nm při eluci gradientem methanolu v 0,1% kyselině mravenčí podle programu (Tabulka 2) a při teplotě kolony 25°C.



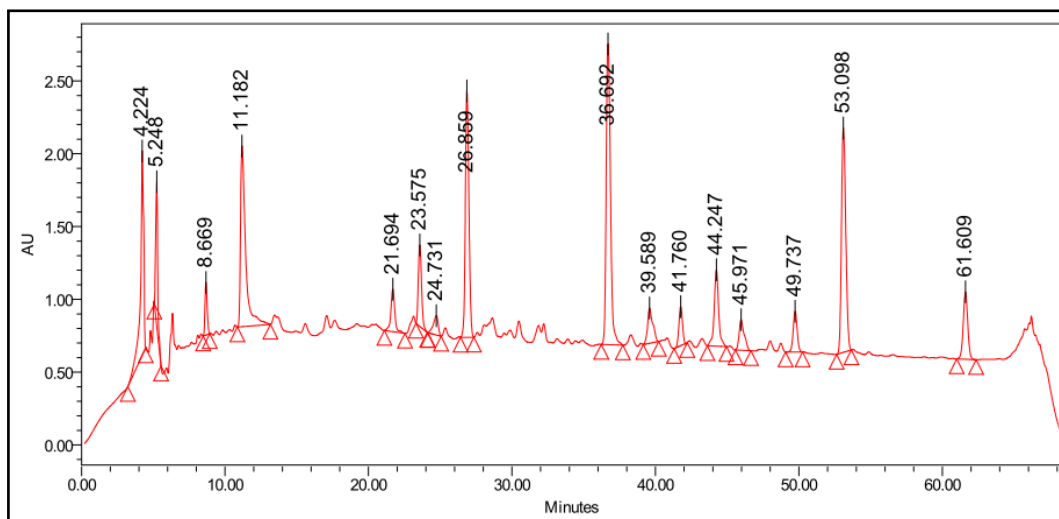
Obrázek 17 Chromatogram směsi VDP získaných po peelingové reakci tetrameru HA. Analýza byla provedena na koloně Jupiter 4u Proteo 90A s UV detekcí 210 nm při eluci gradientem methanolu v 0,1% kyselině mravenčí podle programu (Tabulka 2) a při teplotě kolony 45°C.

Rychlost průtoku

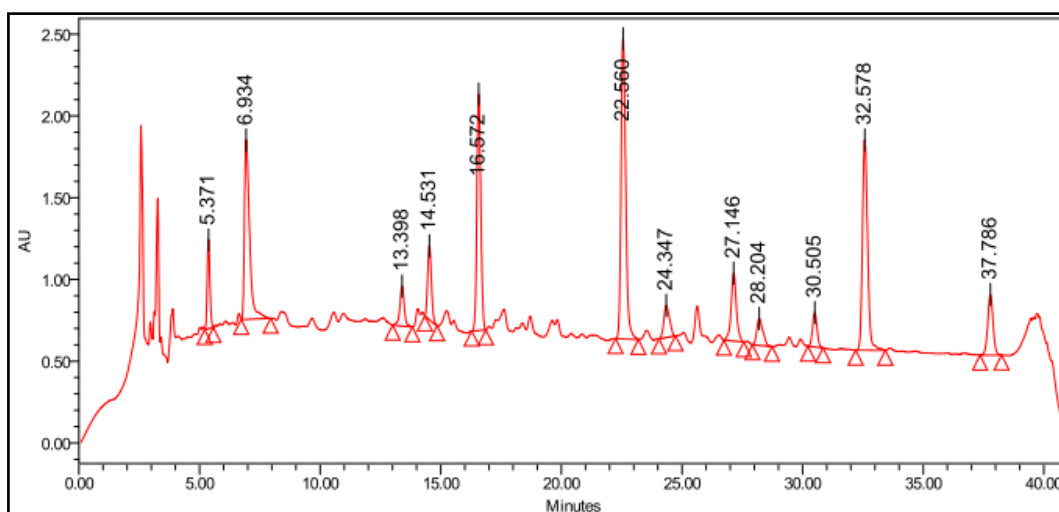
Optimalizace rychlosti průtoku proběhla za podmínek popsaných v kapitole 4.3.3.1. Podle vypočítaného rozlišení (Tabulka 7) odpovídal nejlepší separaci průtok 0,6 ml/min, ale kvůli slévání píků na začátku chromatogramu (Obrázek 18), jsme zvolili průtok mobilní fáze 1 ml/min (Obrázek 19).

Tabulka 7 Výpočet rozlišení při optimalizaci průtoku

Průtok	Retenční časy píků (min)	Šířka píků (sec)	Rozlišení
0,6 ml/min	44,247	80,000	1,43
	45,971	65,000	
0,8 ml/min	30,662	42,000	1,12
	31,818	81,500	
1 ml/min	27,585	49,500	1,27
	28,610	47,000	

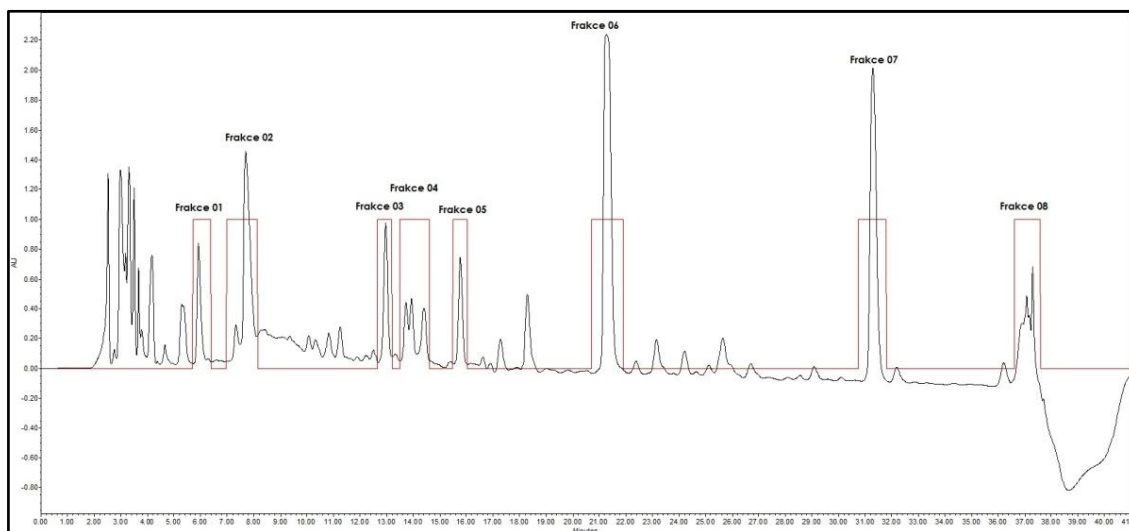


Obrázek 18 Chromatogram směsi VDP získaných po peelingové reakci tetrameru HA. Analýza byla provedena na koloně Jupiter 4u Proteo 90A s UV detekcí 210 nm při eluci gradientem methanolu v 0,1% kyselině mravenčí podle programu (Tabulka 2), při teplotě kolony 25°C a průtoku mobilní fáze **0,6 ml/min**.



Obrázek 19 Chromatogram směsi VDP získaných po peelingové reakci tetrameru HA. Analýza byla provedena na koloně Jupiter 4u Proteo 90A s UV detekcí 210 nm při eluci gradientem methanolu v 0,1% kyselině mravenčí podle programu (Tabulka 2), při teplotě kolony 25°C a průtoku mobilní fáze **1,0 ml/min**.

5.2 Preparace vedlejších degradačních produktů



Obrázek 20 Chromatogram směsi VDP získaných po peelingové reakci tetrameru HA. Analýza byla provedena na koloně Jupiter 4u Proteo 90A s UV detekcí 210 nm při eluci gradientem methanolu v 0,1% kyselině mravenčí podle programu (Tabulka 2), při teplotě kolony 25°C a průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min. Doplněn o intervaly sbírání. Na začátku gradientu eluuje směs neidentifikovaných látek, které ale eluují před mrtvým objemem, proto se jimi práce nezabývá. Sbíráno bylo celkem 8 frakcí.

Zvětšení kolony na semipreparativní (10 mm) nemělo vliv na kvalitu separace (viz Obrázek 20). Opakovanými nástřiky byly ve výsledku získány jednotky až desítky mg jednotlivých frakcí (Tabulka 8). Vzhledem k tomu, že tato množství nebyla dostatečná pro NMR a testy cytotoxicity, celý postup byl opakován ještě jednou s výslednými výtěžky uvedenými ve druhém sloupci tabulky (Tabulka 8).

Tabulka 8 Výtěžky po lyofilizaci

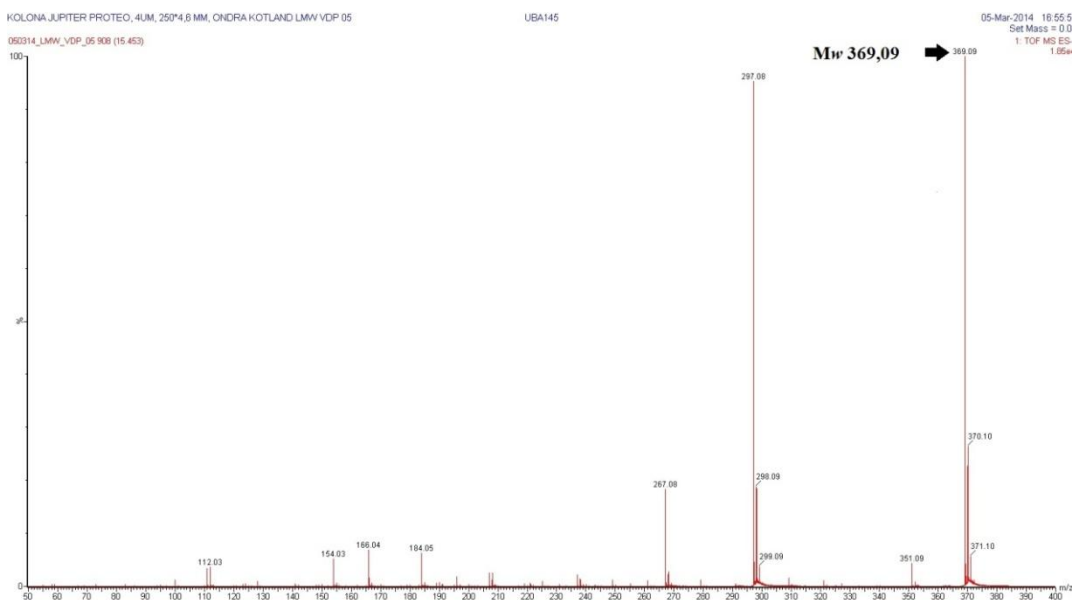
Frakce	Výtěžek	
	1. experiment	2. experiment
01	MS	3,5 mg
02	MS	43,9*mg
03	2,5 mg	4,1 mg
04	8,4 mg	7,6 mg
05	12,8 mg	3,4 mg
06	14,9 mg	17,06 mg
07	9,7 mg	17,08 mg
08	8,5 mg	13,45 mg

MS – vzorky byly pro malý výtěžek rozpuštěny rovnou na Petriho misce a podrobeny MS analýze; *Při druhém experimentu se vzorek 02 nepodařilo ani po týdenním stání v exsikátoru nad P₂O₅ dosušit, proto je v tabulce uveden výtěžek vlhkého lyofilizátu.

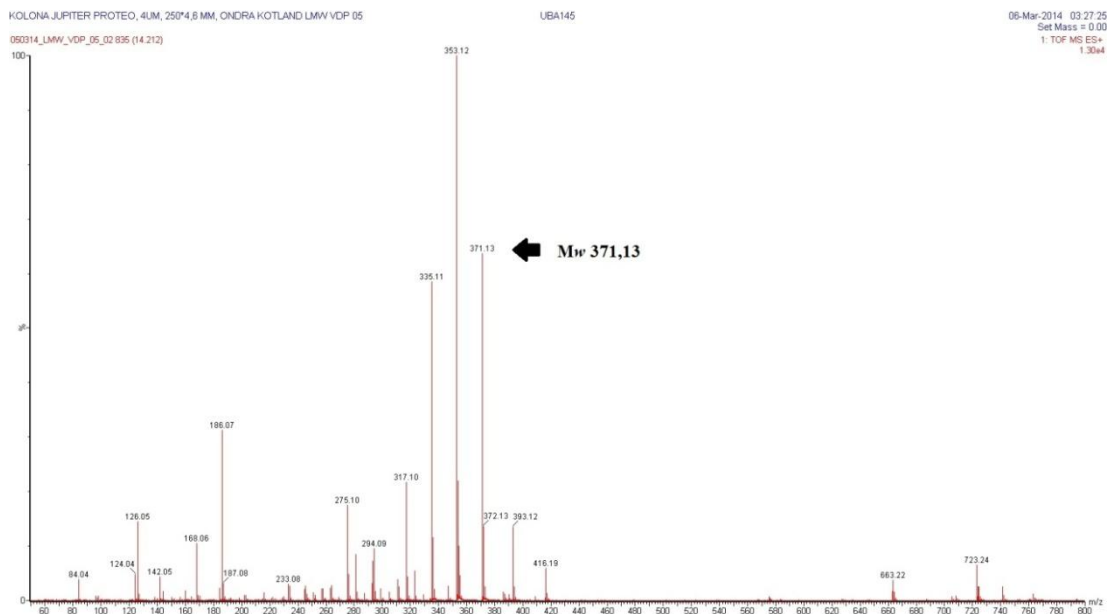
5.3 Identifikace vedlejších degradačních produktů kyseliny hyaluronové

5.3.1 Hmotnostně spektrometrické (MS) analýzy degradačních produktů

Analýza na kapalinovém chromatogramu s hmotnostním detektorem proběhla tak, jak je popsáno v kapitole 4.3.5.

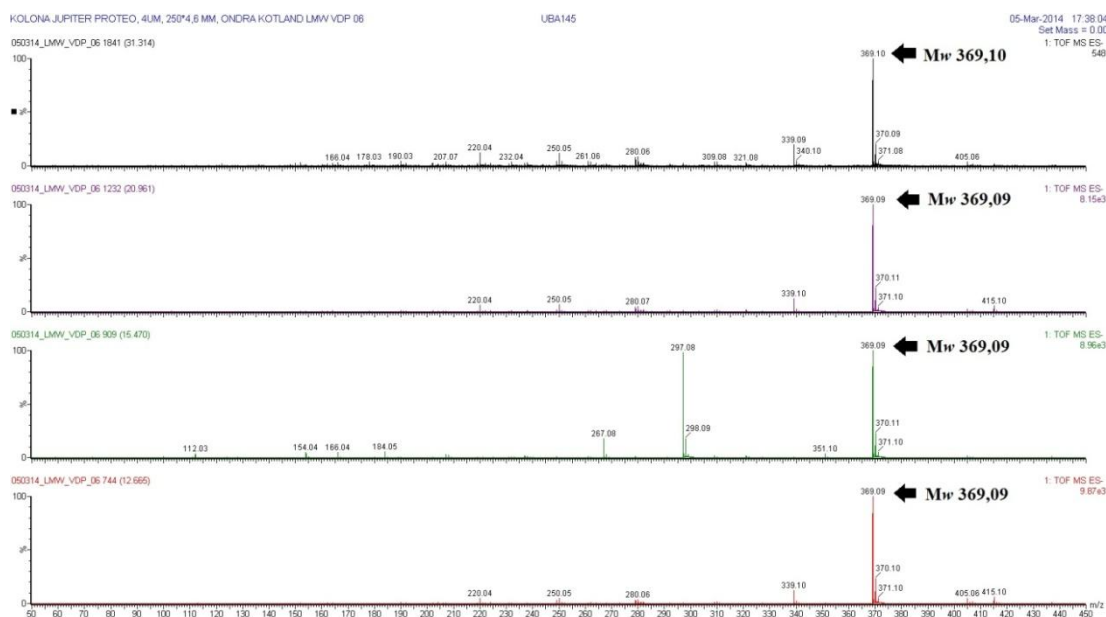


Obrázek 21 MS spektrum **frakce 05** v negativním módu. Analýza proběhla na koloně Jupiter 4u Proteo 90A při gradientové eluci podle programu (Tabulka 4).

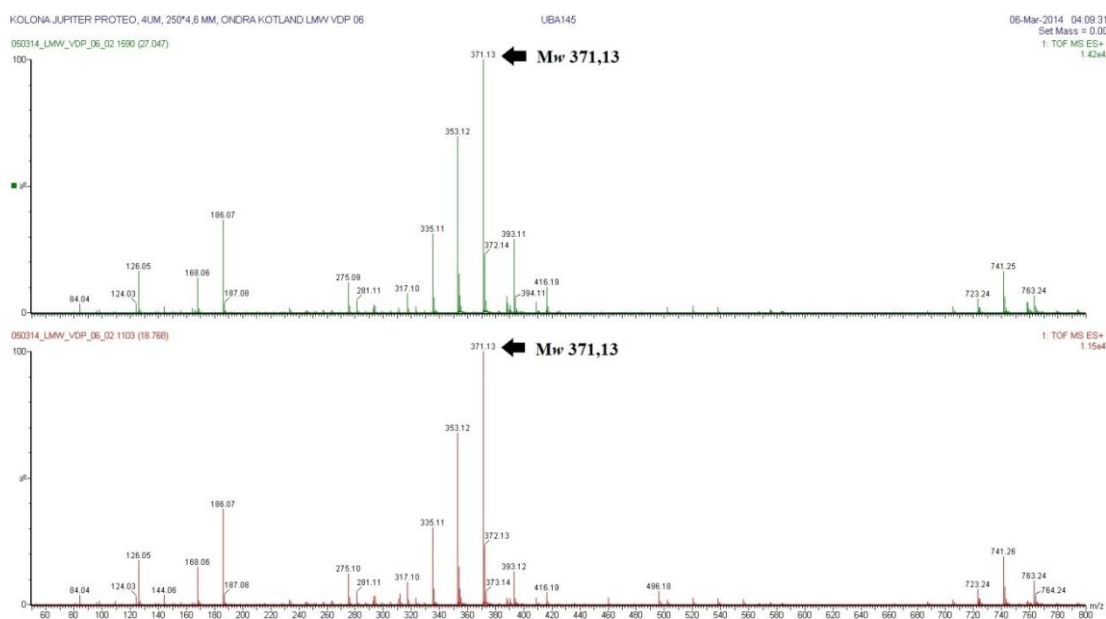


Obrázek 22 MS spektrum **frakce 05** v pozitivním módu. Analýza proběhla na koloně Jupiter 4u Proteo 90A při gradientové eluci podle programu (Tabulka 4).

Z hmotnostních spekter frakce 05 (Obrázek 21; Obrázek 22) je patrné, že se jedná o látku s molekulovou hmotností 370,1. Neutrální ztráty z fragmentace v iontovém zdroji nenapovídají nic bližšího o struktuře látky, jde totiž většinou o neutrální ztráty odpovídající molekule H_2O nebo stavební jednotce sacharidů CH_2O , které jsou běžné ve spektrech látky sacharidové povahy. Ve spektru nalézáme i další neutrální ztráty s netypickou molekulovou hmotností, jejichž struktura nebyla určena.

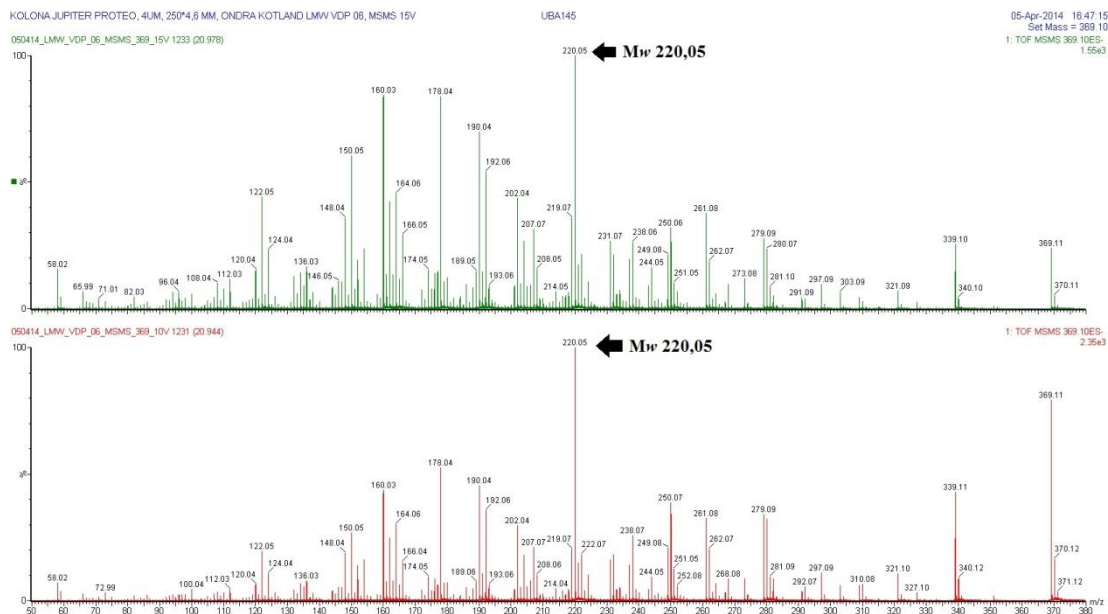


Obrázek 23 MS spektrum frakce 06 v negativním módu. Analýza proběhla na koloně Jupiter 4u Proteo 90A při gradientové eluci podle programu (Tabulka 4).

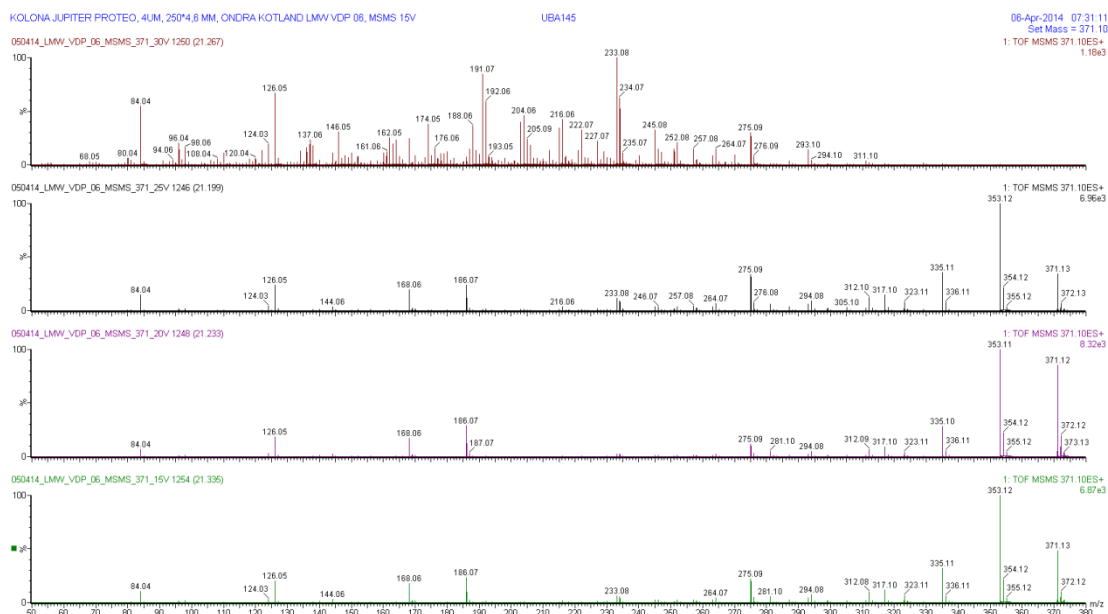


Obrázek 24 MS spektrum frakce 06 v pozitivním módu. Analýza proběhla na koloně Jupiter 4u Proteo 90A při gradientové eluci podle programu (Tabulka 4).

Z hmotnostních spekter frakce 06 v negativním i pozitivním módu (Obrázek 23; Obrázek 24) je patrné, že tento vzorek má, stejně jako vzorek 05 (Obrázek 21; Obrázek 22), molekulovou hmotnost 370,1. Ve spektrech se vyskytovaly stejné známé i neznámé neutrální ztráty jako ve spektrech vzorku 05. Pro bližší určení struktury molekuly byla zvolena ještě analýza MS/MS.

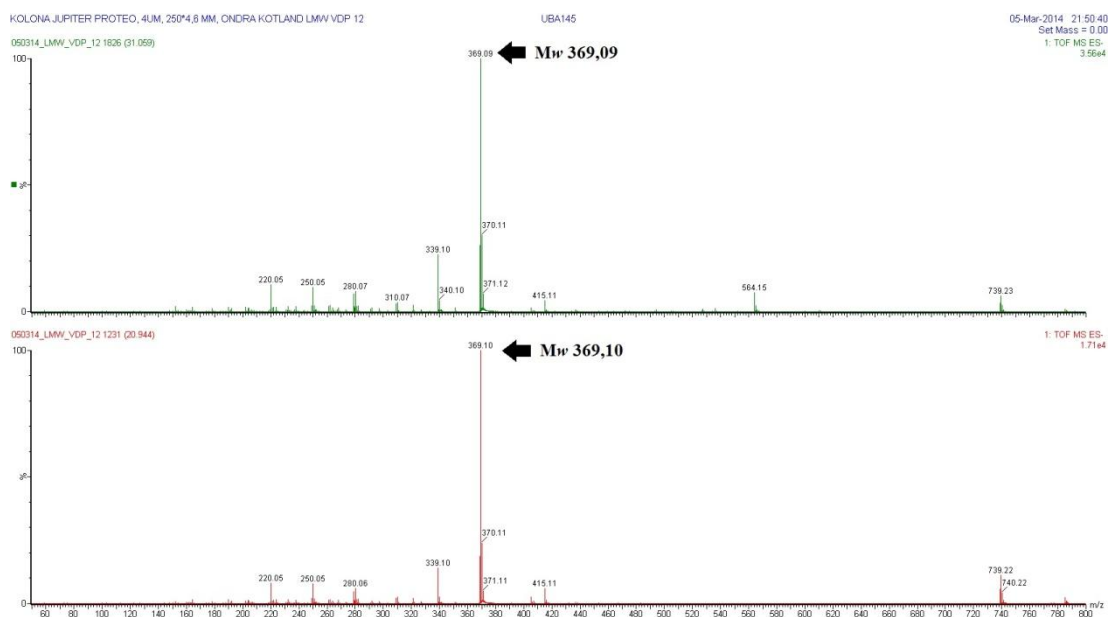


Obrázek 25 MS/MS spektrum frakce 06 - daughter scan v negativním módu. Analýza proběhla na koloně Jupiter 4u Proteo 90A při gradientové eluci podle programu (Tabulka 4).



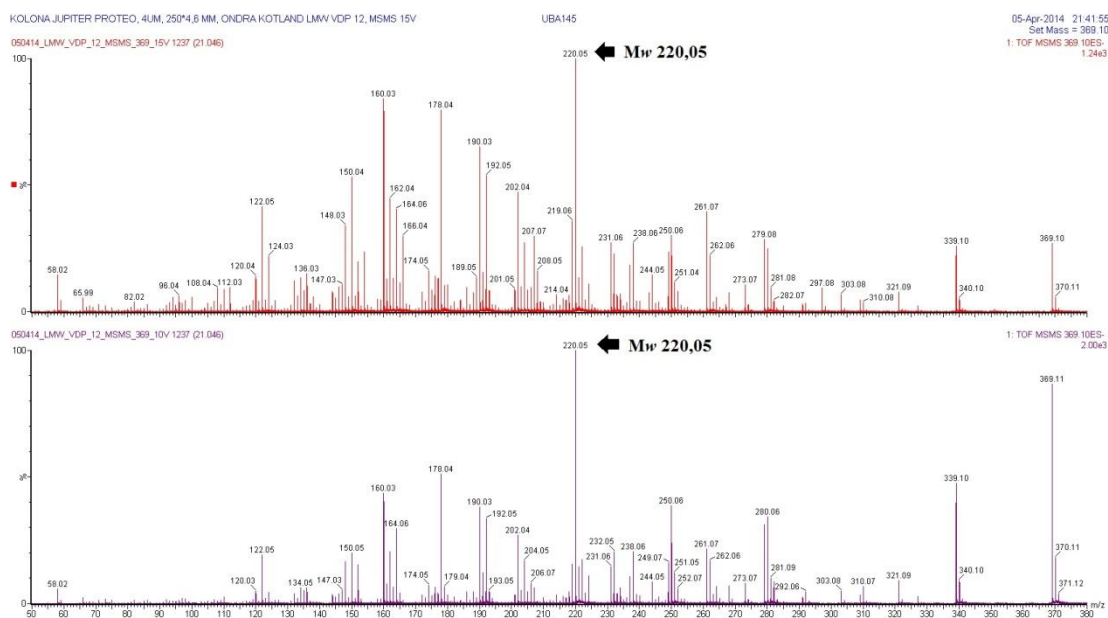
Obrázek 26 MS/MS spektrum frakce 06 - daughter scan v pozitivním módu. Analýza proběhla na koloně Jupiter 4u Proteo 90A při gradientové eluci podle programu (Tabulka 4).

Podle naměřených spekter MS/MS (daughter scan) v negativním módu (Obrázek 25) byl zajímavým zjištěním pík na m/z 220,05, který by odpovídal hmotě *N*-acetylglukosaminu, pro který ovšem není typická ionizace v negativním módu. V pozitivním módu naopak *N*-acetylglukosamin poskytuje signál na hmotě 222,10 který v našem naměřeném spektru nedominuje (Obrázek 26). Zřejmě se tedy jedná o derivát *N*-acetylglukosaminu.

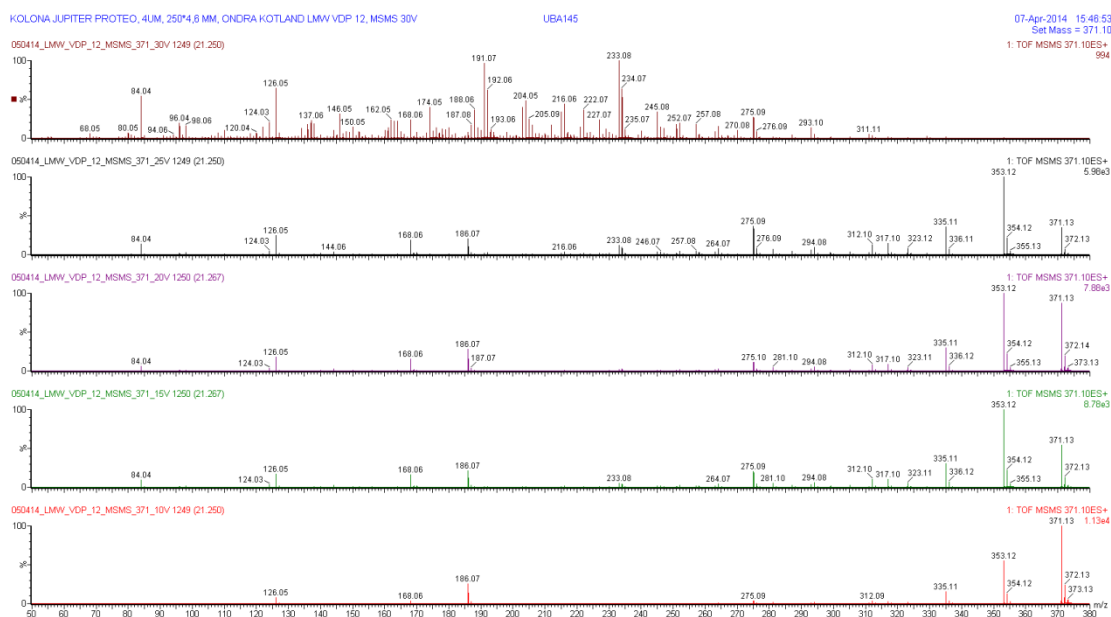


Obrázek 27 MS spektrum frakce 07 v negativním módu. Analýza proběhla na koloně Jupiter 4u Proteo 90A při gradientové eluci podle programu (Tabulka 4).

Z MS spektra frakce 07 je patrné, že se jedná o látku s molekulovou hmotností 370,1. Vyskytují se zde neutrální ztráty odpovídající molekule H_2O , CH_2O nebo sodíkových aduktů, což nenapovídá nic bližšího o struktuře látky. Dále byl vzorek měřen metodou MS/MS.

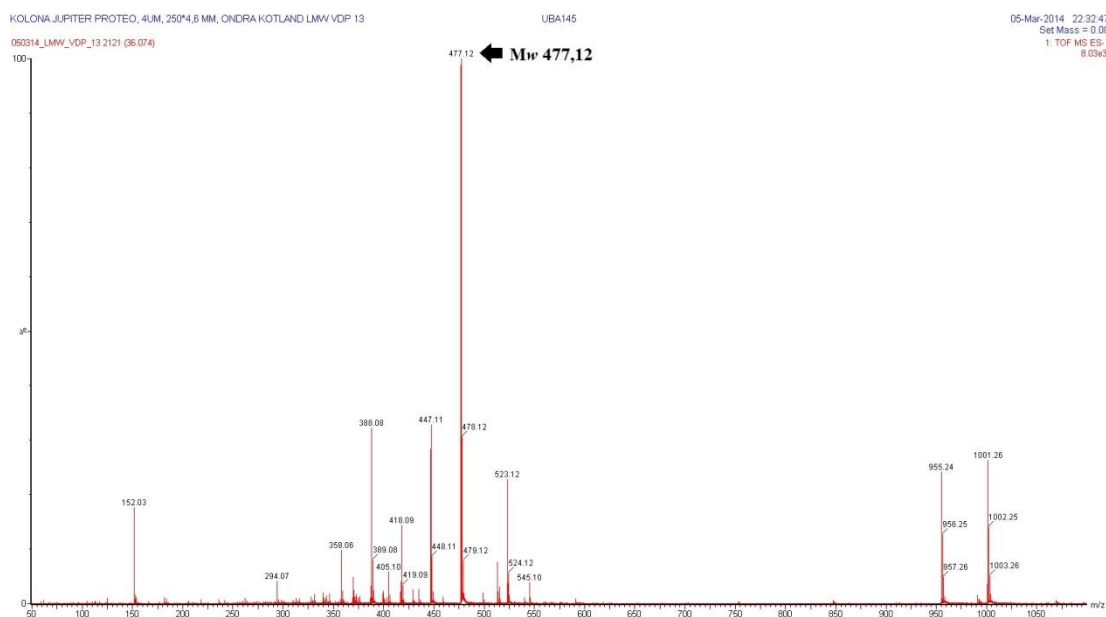


Obrázek 28 MS/MS spektrum frakce 07 - daughter scan v negativním módu. Analýza proběhla na koloně Jupiter 4u Proteo 90A při gradientové eluci podle programu (Tabulka 4).



Obrázek 29 MS/MS spektrum frakce 07 - daughter scan v pozitivním módu. Analýza proběhla na koloně Jupiter 4u Proteo 90A při gradientové eluci podle programu (Tabulka 4).

MS/MS analýza frakce 07 (Obrázek 28; Obrázek 29) odhalila téměř totožná spektra jako u frakce 06. Jedná se proto pravděpodobněji o její izomer.



Obrázek 30 MS spektrum frakce 08 v negativním módu. Analýza proběhla na koloně Jupiter 4u Proteo 90A při gradientové eluci podle programu (Tabulka 4).

Z hmotnostního spektra frakce 08 (Obrázek 30) je zřejmé, že se jedná o látku s molekulovou hmotností 478,12. Neutrální ztráty v podobě molekul H_2O , CH_2O nebo sodíkových aduktů nepodávají bližší informaci o struktuře látky.

5.3.2 Identifikace vedlejších degradačních produktů kyseliny hyaluronové nukleární magnetickou rezonancí (NMR)

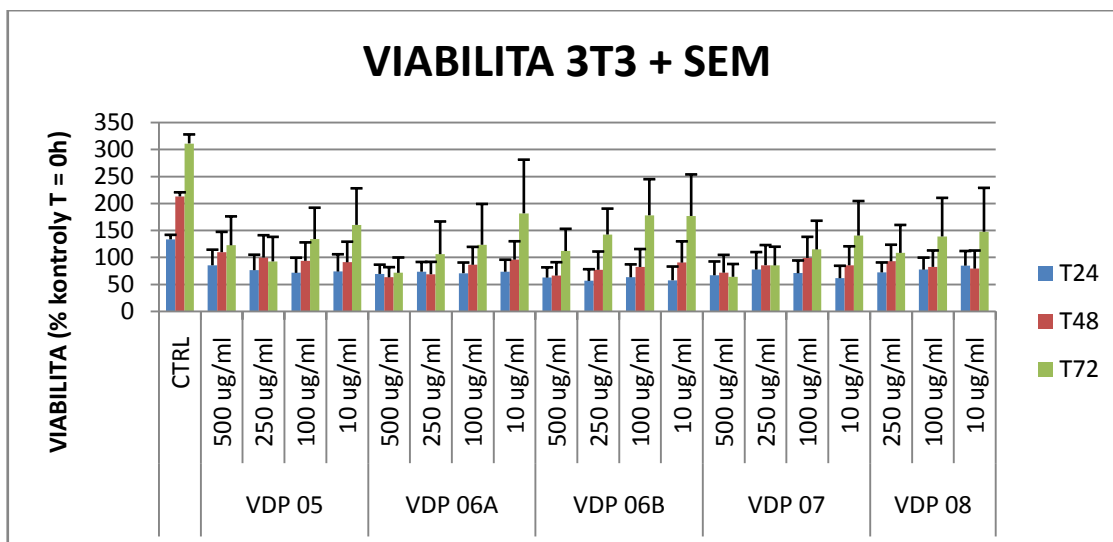
Frakce 05, 06 a 07 jsou anomerní struktury a jejich sumární vzorec stanovený z NMR spekter je $C_{16}H_{22}N_2O_8$, který odpovídá molekulové hmotnosti 370,1 stanovené metodou MS. Dále nám NMR spektra podávají další informace o struktuře. Molekula obsahuje 4 kvarterní uhlíky umístěné blízko od sebe (posuny 150, 140, 130 a 120 ppm), sekvenci CH-CH-CH-CH-CH₂ (110, 74, 80, 75 a 62 ppm), jednu sekvenci CH-CH₂ (62 a 62 ppm), jedno samostatné CH (110 ppm) a dvě seskupení NH-CO-CH₃.

Vzorek 08 má odlišnou molekulovou hmotnost, podle NMR spekter však bylo zjištěno, že strukturně se příliš neliší a pravděpodobně se jedná o látku podobnou předchozím třem vzorkům, ovšem s uhlíkatou strukturou navíc.

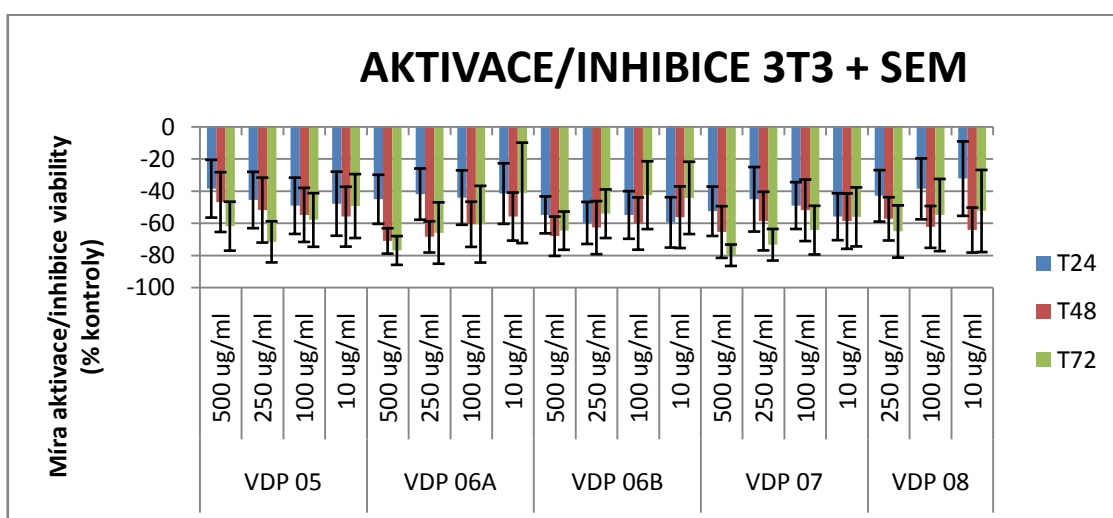
NMR spektra v diplomové práci uvedená nejsou, jelikož jejich interpretace je poměrně složitá. Měření a vyhodnocení NMR spekter prováděla Ing. Daniela Šmejkalová, Ph.D.

5.4 Testy viability

Testy cytotoxicity vedlejších degradačních produktů byly provedeny na několika buněčných liniích sledováním viability buněk. Testy byly provedeny pracovníky firmy Contipro (skupiny Fyziologie buňky) pod vedením Mgr. Kristiny Nešporové.



Obrázek 31 Výsledky testů viability myších 3T3 fibroblastů v přítomnosti vedlejších degradačních produktů alkalické hydrolyzy tetrameru HA. Relativní počty živých buněk vůči kontrole v čase 0. SEM – střední chyba průměru



Obrázek 32 Výsledky testů viability myších 3T3 fibroblastů v přítomnosti vedlejších degradačních produktů alkalické hydrolyzy tetrameru HA. Relativní počty živých buněk vůči kontrolám v čase 24, 48 a 72 hodin. SEM – střední chyba průměru

Podle výsledků testů viability se ve všech případech (vzorek 05, 06A, 06B, 07 a 08) jedná o VDP, které jsou slabě cytotoxické, tedy negativně ovlivňují proliferaci buněk. Jelikož jsme u vzorku 06 dosáhli dostatečných výtěžků v obou experimentech, mohly být provedeny testy cytotoxicity vzorku 06 ve dvou replikátech (vzorek 06A a vzorek 06B).

Testované vzorky o koncentraci 250 $\mu\text{l/ml}$ inhibují růst myších 3T3 fibroblastů vůči kontrole o 71,5 % (vzorek 05 po 72h); o 66,0 % (vzorek 06A po 72h); o 54,0 % (vzorek 06B po 72h); o 73,3 % (vzorek 07 po 72h); o 65,0 % (vzorek 08 po 72h).

6 DISKUZE

Na poli výzkumu v oblasti hyaluronanu došlo v průběhu několika desítek let k obrovskému rozmachu. Díky moderním technologiím zpracování a analýzy mohly být na trh uvedeny nové zdravotnické prostředky na bázi HA, které zlepšují kvalitu života pacientů (např. nosní spreje, kapky do očí, krémy proti vráskám, přípravky pro kloubní výživu a mnohé další). Na začátku výzkumu HA bylo jedním z hlavních témat stanovit její molekulovou hmotnost a poznat způsoby její depolymerace. V současné době je HA součástí moderních materiálů jako jsou nanovlákná, scaffoldy a nosiče léčiv, které nachází uplatnění především v medicíně [28; 38; 40; 45; 46; 47; 52].

Nelze opomenout ani význam fragmentů HA, které modulují odpověď imunitního systému a zapojují se např. do regulace zánětlivé reakce nebo antitumorové imunity [34, 50; 51]. Fragменты s různou molekulovou hmotností přispěly k rozvoji tzv. personalizované medicíny, kdy se léčba pomocí HA „šije“ pacientovi přímo „na míru“. Vývoj léčebných přípravků na bázi fragmentů HA je podmíněn, kromě jiného, i dokonalým poznáním a porozuměním procesu degradace HA. Již teoretická část této diplomové práce věnuje podstatný díl štěpení HA (Kapitola 3.2). Většina publikovaných odborných článků se zmiňuje o degradaci enzymatické - specifické, již méně autorů se zabývá degradací nespecifickou, způsobenou vnějšími vlivy, mezi které patří kyselá a alkalická hydrolýza HA. Je však pravdou, že řada fragmentů HA se připravuje součinností enzymatické hydrolýzy a nespecifické degradace (např. radikálová reakce, degradace teplem, kyselá a alkalická hydrolýza). Oligosacharidy s lichým počtem monosacharidových jednotek lze např. připravit enzymatickou hydrolýzou vysokomolekulárního HA následovanou alkalickou hydrolýzou [71]. Proto je potřeba znát degradační produkty nejen reakcí specifických, ale i těch nespecifických. Práce věnované nespecifické degradaci HA se většinou zabývaly majoritně vznikajícími fragmenty HA [18; 23] nebo pro danou problematiku nebylo nutné použití moderních identifikačních metod [20], jako je nukleární magnetická rezonance nebo hmotnostní spektrometrie. Výjimku tvoří článek Blundella a Almonda z roku 2006 [22], který se zabývá VDP HA vznikajícím v alkalickém prostředí, a jehož výsledky mohou být porovnány s výsledky této diplomové práce.

Experimentální část práce se zabývá popisem strukturních rysů a vlastností VDP vznikajících při alkalické hydrolyze HA (Kapitola 4.3.1.1). Proto byly nejprve optimalizovány podmínky alkalické hydrolyzy (peelingové reakce) tak, aby vznikala co největší množství VDP. Byly zvoleny různé koncentrace hydroxidu sodného v kombinaci s různými teplotami reakce. Green se při svém experimentu degradace celobiózy zabýval rychlostí peelingové reakce při extrémních teplotách, kdy použil teplotu 100°C až 170°C [72], na rozdíl od něj Hopwood štěpil keratan sulfát při laboratorní teplotě [73]. Protože se tato práce zabývá degradačními produkty, které mohou vznikat zejména v technologickém postupu přípravy lýchých oligosacharidů HA, byly zvoleny teploty 6°C (lednice), 21°C (laboratorní teplota) a 38°C (vodní lázeň). Koncentrace hydroxidu sodného (0,1 M, 0,5 M a 1 M) se shodovaly s koncentracemi použitými u zmíněných autorů [72; 73]. V optimalizovaných podmínkách probíhala reakce ve vodném roztoku NaOH o koncentraci 0,1 M při laboratorní teplotě (21°C) 30 minut. Za těchto podmínek bylo sice dosaženo nejvyšších výtěžků VDP (Obrázek 12), typických pro standardní provedení peelingu (0,01M NaOH, 4hod, 21°C). Při peelingu v NaOH o vyšších koncentracích (0,5 M - Obrázek 13; 1,0 M – Obrázek 14) naproti tomu docházelo ke vzniku dalších druhů VDP (nové píky v chromatogramu z kolony Luna NH₂; Kapitola 5.1.1). Směs po peelingu byla frakcionována GPC (Kapitola 4.3.2), při které byly odděleny VDP od majoritních produktů reakce (hlavní produkt HA₃ a zbytkový nezreagovaný HA₄).

Směs VDP poté byla frakcionována pomocí HPLC na reverzní fázi. Podmínky separace, jako je rychlost průtoku mobilní fáze, teplota kolony nebo složení mobilní fáze, byly předmětem další optimalizace (Kapitola 4.3.3). Z výsledných chromatogramů byly vypočítány hodnoty rozlišení (Tabulka 5; Tabulka 6; Tabulka 7). Hodnota rozlišení se v ideálním případě počítá ze dvou sousedních píků, u kterých je největší riziko slévání, v tomto případě ale nastala situace, kdy v průběhu optimalizace docházelo k takovému slévání, že nebylo možné hodnotu vypočítat právě z takových píků, ale výpočet byl proveden z píků od sebe celkem vzdálených (Obrázek 16; Obrázek 17). Právě proto bylo nutné chromatogramy hodnotit nejen podle této hodnoty. Například u chromatogramů s použitím různých rychlostí průtoku mobilní fáze (Obrázek 18; Obrázek 19) bylo zřejmé, že na začátku gradientu s průtokem 0,6 ml/min dochází k většímu slévání píků než při průtoku 1 ml/min. Přestože vyšší rozlišení vyšlo u průtoku 0,6 ml/min, pro separaci byl zvolen průtok 1 ml/min. Po optimalizaci podmínek

probíhala separace na reverzní fázi s gradientem mobilních fází (kyselina mravenčí a methanol - Tabulka 3) dle programu (Tabulka 2) a po přepočtu na kolonu s větším průměrem při průtoku 4,5 ml/min a teplotě 25°C.

Vzniklé frakce s dostatečnými výtěžky (05, 06, 07 a 08 (Tabulka 8)) byly podrobeny instrumentální analýze pomocí hmotnostního spektrometru, nukleární magnetické rezonance a základnímu testu toxicity.

Lze shrnout, že u frakcí 05 (Obrázek 21; Obrázek 22), 06 (Obrázek 23; Obrázek 24) a 07 (Obrázek 27) se jedná o látky s molekulovou hmotností 370,1, u frakce 08 (Obrázek 30) je molekulová hmotnost 478,1. Detailnější informaci o struktuře látky nám jednoduchá hmotnostní spektra nepodávají. Lze z nich odečíst pouze neutrální ztráty (H₂O, CH₂O, sodíkové adukty), podle nichž strukturu sacharidové látky blíže neurčíme. Podle MS/MS spekter frakcí 06 (Obrázek 25; Obrázek 26) a 07 (Obrázek 28; Obrázek 29) se domníváme, že se jedná o látky strukturně podobné *N*-acetylglukosaminu.

Blundell a Almond (2006) zjistili, že při alkalické hydrolýze oligosacharidů HA vzniká (kromě majoritních lichých oligosacharidů) také směs dvou vedlejších degradačních produktů HA, které identifikovali pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) jako deriváty *N*-acetylglukosaminu lišící se polohou dvojně vazby (Obrázek 6). V této diplomové práci naproti tomu byly nalezeny degradační produkty, které pravděpodobně vznikají kondenzací dvou neznámých derivátů *N*-acetylglukosaminu. Podle vyhodnocení NMR spekter Ing. Danielou Šmejkalovou, PhD. mají všechny vzorky podobnou strukturu, ale bohužel i v kombinaci s hmotnostními spektry nebyly odhaleny jejich přesné struktury. Můžeme však s jistotou říci, že se nejedná o stejné deriváty *N*-acetylglukosaminu ani o kondenzaci takových dvou derivátů *N*-acetylglukosaminu, jaké stanovil Blundell a Almond (2006), liší se jak molekulová hmotnost, tak výsledky NMR. K odlišným strukturám, než jaké určili Blundell s Almondem (2006) jsme došli pravděpodobně proto, že jsme vycházeli z odlišného výchozího materiálu (čistý tetramer HA) a použili jsme odlišné podmínky peelingové reakce (zejména koncentraci NaOH).

V praxi, kdy se alkalická hydrolýza používá k výrobě oligosacharidů HA s lichým počtem monosacharidických jednotek, jsou nízkomolekulární VDP odstraněny dalším technologickým postupem (ionexová chromatografie směsi po peelingu,

diafiltrace sebraných frakcí). HA s hydroxidem také může přijít do styku při chybě obsluhy zařízení ve výrobním procesu (např. nedostatečné vymytí ultrafiltračních kazet po sanitaci NaOH). Velkoobjemové nádoby jsou čištěny právě pomocí hydroxidu sodného, takže zde vzniká riziko kontaminace výsledného produktu.

Provedení i hodnocení testů cytotoxicity VDP prováděla Mgr. Kristina Nešporová. Výsledky testů prokázaly, že všechny měřené vzorky jsou cytotoxické. Testované vzorky o koncentraci 250 µl/ml inhibují růst myších 3T3 fibroblastů vůči kontrole o 71,5 % (vzorek 05 po 72h); o 66,0 % (vzorek 06A po 72h); o 54,0 % (vzorek 06B po 72h); o 73,3 % (vzorek 07 po 72h); o 65,0 % (vzorek 08 po 72h).

Z výsledných grafů (Obrázek 31; Obrázek 32) je zřejmé, že toxicita je závislá na čase inkubace a na koncentraci testované látky. Zároveň je známo, že množství vznikajících VDP závisí na použitém pH při peelingové reakci (tj. na použité koncentraci hydroxidu sodného). Za normálních podmínek, které se používají při standardním provedení peelingu sudých oligosacharidů HA na liché, jsou množství vznikajících VDP zanedbatelná. Rozhodně by však bylo zajímavé stanovit množství VDP v hotových produktech připravených standardním peelingem.

Definitivní určení struktur VDP HA, stanovení jejich množství v produktech a další popis jejich toxicity budou předmětem dalšího výzkumu v oblasti VDP HA.

7 ZÁVĚR

K teoretické části byla prostudována literatura obsahující základní poznatky o HA, štěpení HA, degradačních produktech a způsobu jejich analýzy.

Byly připraveny vedlejší degradační produkty HA alkalickou hydrolýzou (peelingem) a pomocí instrumentálních metod separovány a analyzovány.

Výsledky hmotnostní spektrometrie:

- molekulová hmotnost frakcí 05, 06 a 07 je 370,1
- molekulová hmotnost frakce 08 je 478,1

Výsledky nukleární magnetické rezonance:

- sumární vzorec frakcí 05, 06 a 07 je $C_{16}H_{22}N_2O_8$
- molekula obsahuje
 - 4 kvartérní uhlíky blízko od sebe
 - sekvenci CH-CH-CH-CH-CH₂
 - sekvenci CH-CH₂
 - jedno samostatné CH
 - dvě seskupení NH-CO-CH₃
- molekula vznikla pravděpodobně kondenzací dvou derivátů *N*-acetylglukosaminu

Výsledky testů cytotoxicity na linii myších fibroblastů prokázaly, že frakce 05, 06, 07 a 08 vedlejších degradačních produktů jsou látky s cytotoxickým účinkem.

8 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- [1]. Meyer K., Palmer J.W.: *The polysaccharide of the vitreous humor*. Journal of Biological Chemistry, 1934, vol. 107, s. 629-634.
- [2]. Laurent T.C., Fraser J.R.: *Hyaluronan*. The FASEB Journal, 1992, vol. 6, s. 2397-2404.
- [3]. Nečas J., Bartošíková L., Brauner P., Kolář J.: *Hyaluronic acid (hyaluronan): a review*, 2008, vol. 53, s. 397-411.
- [4]. Balazs E.A., Laurent T.C., Jeanloz R.W.: *Nomenclature of hyaluronic acid*, 1986, Biochemical Journal, vol. 235, s. 903.
- [5]. Hascall V.C., Laurent T.C.: *Hyaluronan: Structure and physical properties* [online]. Poslední revize 12.1997 [cit. 2014-03-17] Dostupné z <<http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>>.
- [6]. Garg H.G., Hales Ch.A.: *Chemistry and biology of hyaluronan*. 1.vydání. Oxford, 2004. 624 s. ISBN 0-08-044382-6.
- [7]. Kuo J.W.: *Practical aspects of hyaluronan based medical products*. 1.vydání. Taylor & Francis Group, 2006. 240 s. ISBN 978-0-8493-3324-8.
- [8]. Volpi N., Schiller J., Stern R., Šoltés L.: *Role, Metabolism, Chemical Modifications and Applications of Hyaluronan*. 2009, Current Medicinal Chemistry, vol. 16, s. 1718-1745.
- [9]. O'Regan M., Martini M., Crescenzi F., De Luca C., Lansing M.: *Molecular mechanisms and genetics of hyaluronan biosynthesis*. 1994, International Journal of Biological Macromolecules, vol. 16, s. 283-286.
- [10]. Slíva J., Minárik J.: *Hyaluronát – nejen pasivní pozorovatel*. 2009, New EU Magazine of Medicine, vol. 1-2, s. 75-79.
- [11]. Sadowitz B., Seymour K., Gahtan V., Maier K.G.: *The Role of Hyaluronic Acid in Atherosclerosis and Intimal Hyperplasia*. 2012, The Journal of surgical research, vol. 173, s. 63-72.

- [12]. Bodevin S., Kusche-Gullberg M., Pummill P.E., DeAngelis P.L., Lindahl U.: *Biosynthesis of Hyaluronan - direction of chain elongation*. 2005, Journal of Biological Chemistry, vol. 10, s. 8813-8818.
- [13]. Weigel P.H., Hascall V.C., Tammi M.: *Hyaluronan syntases*. 1997, The Journal of Biological Chemistry, vol. 22, s. 13997-14000.
- [14]. Stern R.: *Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet?* 2003, Glycobiology, vol.13, s.105-115.
- [15]. Dřimalová E., Velebný V., Sasinková V., Hromádková Z., Ebringerová A.: *Degradation of hyaluronan by ultrasonication in comparison to microwave and conventional heating*. 2005, Carbohydrate Polymers, vol. 61, s. 420-426.
- [16]. Yamazaki K., Fukuda K., Matsukawa M., Hara F., Yoshida K., Akagi M., Munakata H., Hamanishi Ch.: *Reactive oxygen species depolymerize hyaluronan: involvement of the hydroxyl radical*. 2003, Pathophysiology, vol. 9, s. 215-220.
- [17]. Jong-il Ch., Jae-Kyung K., Jae-Hun K., Dong-Keon K., Ju-Woon L.: *Degradation of hyaluronic acid powder by electron beam irradiation, gamma ray irradiation, microwave irradiation and thermal treatment: A comparative study*. 2010, Carbohydrate Polymers, vol. 79, s. 1080-1085.
- [18]. Šmejkalová D., Hermannová M., Buffa R., Čožíková D., Vištejnová L., Matulková Z., Hrabica J., Velebný V.: *Structural characterization and biological properties of degradation byproducts from hyaluronan after acid hydrolysis*. 2012, Carbohydrates Polymers, vol. 88, s. 1425-1434.
- [19]. Lenormand H., Deschrevel B., Vincent J.: *pH effects on the hyaluronan hydrolysis catalysed by hyaluronidase in the presence of proteins: Part I. Dual aspect of the pH-dependence*. 2010, Matrix Biology, vol. 29, s. 330-337.
- [20]. BeMiller J.N., Whistler R.L.: *Alkaline degradation of amino sugars*. 1962, The Journal of Organic Chemistry, vol. 27, s. 1161-1164.
- [21]. Tokita Y., Okamoto A.: *Hydrolytic degradation of hyaluronic acid*. 1995, Polymer Degradation and Stability, vol. 48, s. 269-273.
- [22]. Blundell Ch.D., Almond A.: *Enzymatic and chemical methods for the generation of pure hyaluronan oligosaccharides with both odd and even numbers of monosaccharide units*. 2006, Analytical Biochemistry, vol. 353, s. 236-247.

- [23]. Stern R., Kogan G., Jedrzejak M.J., Šoltés L.: *The many ways to cleave hyaluronan*. 2007, *Biotechnology Advances*, vol. 25, s. 537-557.
- [24]. Stern R., Jedrzejak M.J.: *The Hyaluronidases: Their Genomics, Structure, and Mechanism of Action*. 2006, *Chemical review*, vol. 106, s. 818-839.
- [25]. Meyer K.: *Hyaluronidases*. z knihy Boyer P.D.: *The enzymes*. 1.vydání, London, Academic Press, 1971, Sv. 5, s 307-320. ISBN 978-0-12-122705-0
- [26]. Kreil G.: *Hyaluronidases - a group of neglected enzymes*. 1995, *Protein Science*, vol. 4, s. 1666-1669.
- [27]. Watanabe K., Yamaguchi Y.: *Molecular identification of a putative human hyaluronan synthase*. 1996, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, s. 22945-22948.
- [28]. Menzel E.J., Farr C.: *Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: biochemistry, biological activities and therapeutic uses*. 1998, *Cancer Letters*, vol. 131, s. 3-11.
- [29]. Li S., Jedrzejak M.J.: *Hyaluronan binding and degradation by Streptococcus agalactiae hyaluronate lyase*. 2001, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, s. 407-416.
- [30]. Highsmith S., Garvin J.H., Chipman D.M.: *Mechanism of Action of Bovine Testicular Hyaluronidase*. 1975, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 250, s. 7473-7480.
- [31]. Oetl M., Hoehstetter J., Asen I., Bernhardt G., Buschauer A.: *Comparative characterization of bovine testicular hyaluronidase and a hyaluronate lyase from Streptococcus agalactiae in pharmaceutical preparations*. 2003, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 18, s. 267-277.
- [32]. Meyer M.F., Kreil G., Aschauer H.: *The soluble hyaluronidase from bull testes is a fragment of the membrane-bound PH-20 enzyme*. 1997, *FEBS Letters*, vol. 413, s. 385-388.
- [33]. Deschrevel B., Tranchepain F., Vincent J.C.: *Chain-length dependence of the kinetics of the hyaluronan hydrolysis catalyzed by bovine testicular hyaluronidase*. 2008, *Matrix Biology*, vol. 27, s. 475-486.
- [34]. Stern R., Asari A.A., Sugahara K.N.: *Hyaluronan fragments: An information-rich system*. 2006, *European Journal of Cell Biology*, vol. 85, s. 699-715.

- [35]. Schiraldi Ch., La Gatta A., De Ros M.: *Biotechnological Production and Application of Hyaluronan*. 2010, Biopolymers, s. 387-412.
- [36]. Liu L., Liu Y., Li J., Du G., Chen J.: *Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives*. 2011, Microbial Cell Factories, vol. 10, s. 1-10.
- [37]. Boeriu C.G., Springer J., Kooy F.K., van den Broek L., Eggink G.: *Production Methods for Hyaluronan*. 2013, International Journal of Carbohydrate Chemistry, vol. 2013, s. 1-14.
- [38]. Kogan G., Šoltés L., Stern R., Gemeiner P.: *Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications*. 2006, Biotechnology Letters, vol. 29, s. 17-25.
- [39]. Widner B., Behr R., Brown S.: *Hyaluronic Acid Production in Bacillus subtilis*. 2005, Applied and Environmental Microbiology, vol. 71, s. 3747-3752.
- [40]. Price R.D., Berry M.G., Navsaria H.A.: *Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence*. 2007, Journal of Plastic, vol. 60, s. 1110-1119.
- [41]. Rah M.J.: *A review of hyaluronan and its ophthalmic application*. 2011, Optometry, vol. 173, s. 38-43.
- [42]. Fraser J.R.E., Brown T.J., Cahill T.N.P., Laurent T.C., Laurent U.B.G.: *The turnover of hyaluronan in synovial joints*. 1996, Immunology and Cell Biology, vol. 74.
- [43]. Moreland L.W.: *Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanism of action*. 2003, Arthritis Research & Therapy, vol. 5, s. 54-67.
- [44]. Laurent A.E.: *Hyaluronan in joint disease*. 1997, Journal of Internal Medicine, vol. 242, s. 57-60.
- [45]. Chen W.Y.J., Abatangelo G.: *Functions of hyaluronan in wound repair*. 1999, Wound repair and regeneration, vol. 7, s. 79-89.
- [46]. Jiang D., Liang J., Noble P.W.: *Hyaluronan in Tissue Injury and Repair*. 2007, The Annual Review of Cell and Developmental Biology, vol. 23, s. 435-461.

- [47]. Brown M.B., Jones S.A.: *Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin*. 2005, Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, vol. 19, s. 308-318.
- [48]. Hašová M., Crhák T., Šafránková B., Dvořáková J., Muthný T., Velebný V., Kubala L.: *Hyaluronan minimizes effects of UV irradiation on human keratinocytes*. 2011, Archives of Dermatological Research, vol. 303, s. 277-284.
- [49]. Reed M.J., Damodarasamy M., Chan Ch.K., Johnson N.R., Wight T.N., Vernon R.B.: *Cleavage of hyaluronan is impaired in aged dermal wounds*. 2013, Matrix Biology, vol. 32, s. 45-51.
- [50]. Ferguson E.L., Roberts J., Moseley R., Griffiths P.C., Thomas D.W.: *Evaluation of the physical and biological properties of hyaluronan and hyaluronan fragments*. 2011, International Journal of Pharmaceutics, vol. 420, s. 84-92.
- [51]. Campo G.M., Avenoso A., Campo S., D'Ascola A., Nastasi G., Calatroni A.: *Small hyaluronan oligosaccharides induce inflammation by engaging both toll-like-4 and CD44 receptors in human chondrocytes*. 2010, Biochemical Pharmacology, vol. 80, s. 480-490.
- [52]. Weindl G., Schaller M., Schafer-Korting M., Korting H.C.: *Hyaluronic Acid in the Treatment and Prevention of Skin Diseases: Molecular Biological, Pharmaceutical and Clinical aspects*. 2004, Skin Pharmacology and Physiology, vol. 17, s. 207-213.
- [53]. Karlíček R., Polášek M., Pospíšilová M., Solich P.: *Analytická chemie pro farmaceuty*. 2.vydání, Praha: Karolinum, 2005, 282 s. ISBN 80-246-0348-9
- [54]. Motyka K., Hlaváč J.: *Stručný přehled separačních metod*. 1.vydání, Univerzita Palackého v Olomouci, 2009, 45 s. ISBN 978-80-244-2304-3
- [55]. Bird I.M.: *High performance liquid chromatography: principles and clinical applications*. 1989, British Medical Journal, vol. 299, s. 783-787.
- [56]. Klouda P.: *Moderní analytické metody*. 1.vydání, Ostrava, 2003, 132 s. ISBN 978-80-86369-07-5
- [57]. Nováková L., Vlčková H.: *A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation*. 2009, Analytica Chimica Acta, vol. 656, s. 8-35.

- [58]. Volka K., Fogl J., Popl M., Suchánek M.: *Analytická chemie II*. 1.vydání, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 1995, 236 s. ISBN 80-7080-227-8
- [59]. Bruggink C., Wuhrer M., Koeleman A.M., Barreto V., Liu Y., Pohl Ch., Ingendoh A., Hokke C.H., Deelder A.M.: *Oligosaccharide analysis by capillary-scale high-pH anion-exchange chromatography with on-line ion-trap mass spectrometry*. 2005, Journal of Chromatography B, vol. 829, s. 136-143.
- [60]. Boudesocquea L., Lameirasa P., Amarouchea N., Giraudb M., Quattrinib F., Mc Garrityb J., Nuzillarda J., Renault J.: *Ion-exchange centrifugal partition chromatography: A methodological approach for peptide separation*. 2012, Journal of Chromatography A, vol. 1236, s. 115-22.
- [61]. Sýkora D., Tesařová E., Vosmanská M., Zvolánková M.: *Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC*. 2007, Chemické listy, vol. 101, s. 190-199.
- [62]. He Y., Hou W., Thompson M., Holovics H., Hobson T., Jones M.T.: *Size exclusion chromatography of polysaccharides with reverse phase liquid chromatography*. 2014, Journal of Chromatography A, vol. 1323, s. 97-103.
- [63]. Stojaspal R.: *Aplikace gelové permeační chromatografie pro charakterizaci biopolymerů*. 2007, Bakalářská práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav potravinářského inženýrství.
- [64]. Striegel A.M., Yau W.W., Kirkland J.J., Bly D.D.: *Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography - Practice of Gel Permeation and Gel Filtration Chromatography*. 2.vydání. New Jersey: Hoboken, 2009, 469 s. ISBN 978-0-471-20172-4
- [65]. Friedecký D., Lemr K.: *Úvod do hmotnostní spektrometrie*. 2012, Klinická biochemie a metabolismus, vol. 20, s. 152-157.
- [66]. Banerjee S., Mazumdar S.: *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte*. 2012, International Journal of Analytical Chemistry, s. 1-40.
- [67]. Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita S., Yoshida Y., Yoshida T.: *Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry*. 1988, Rapid Communications in Mass Spectrometry, vol. 2, s. 151-153.
- [68]. Häkansson P.: *An Introduction to the Time-of-Flight Technique*. 1999, Brazilian Journal of Physics, vol. 29, s. 422-427.

- [69]. Sakai S., Hirano K., Toyoda H., Linhardt R.J., Toida T.: *Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis of hyaluronan oligosaccharides*. 2007, *Analytica Chimica Acta*, vol. 593, s. 207-213.
- [70]. Brus J., Kříž J.: *Minulost a současnost NMR spektrometrie - Pohled do nitra molekul a člověka*. 2007, *Chemické Listy*, vol. 101, s. 122-130.
- [71]. Linker A., Meyer K., Hoffman P.: *The Production of Hyaluronate Oligosaccharides by Leech Hyaluronidase and Alkali*. 1960, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 235, s. 924-97.
- [72]. Green J.W., Pearl I.A., Haigh F.C.: *Fast reactions in alkaline pulping II. - The peeling reaction*. 1977, *IPC Technical Paper Series*, vol. 42.
- [73]. Hopwood J.J., Robinson H.C.: *The Alkali-Labile Linkage Between Keratan Sulphate and Protein*. 1974, *Biochemical Journal*, vol. 141, s. 57-69.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

3T3	linie myších fibroblastů
APCI	ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
BTH	bovinní testikulární hyaluronidasa
DAD	detektor diodového pole
EGF	endoteliální růstový faktor
EI	elektronová ionizace
ESI	ionizace elektrosprejem
GPC	gelová permeační chromatografie
HA	hyaluronová kyselina
HA3	hyaluronová kyselina - trimer
HA4	hyaluronová kyselina - tetramer
HAS	hyaluronansyntasa
HPLC	vysoko-účinná kapalinová chromatografie
Hyal	hyaluronidasa
ICR	iontová cyklotronová rezonance
MALDI	desorpce laserem za účasti matrice
MS	hmotnostní spektrometrie
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
NMR	nukleární magnetická rezonance
ODS	oktadecylsilikát
PDGF	růstový faktor krevních destiček
RP-LC	kapalinová chromatografie na reverzní fázi
TGF	transformující růstový faktor
TOF	analyzátor doby letu
UDP	uridindifosfát
UHPLC	ultra-účinná kapalinová chromatografie
UV-VIS	ultrafialová-viditelná oblast světla
VDP	vedlejší degradační produkty