

VĚDECKÉ SPISY VYSOKÉHO UČENÍ TECHNICKÉHO V BRNĚ

Edice Habilitační a inaugurační spisy, sv. 412

ISSN 1213-418X

Vladimír Velebný

HYALURONAN - BIOPOLYMER PRO TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

Ústav fyzikální a spotřební chemie

RNDr. Vladimír Velebný, CSc.

Hyaluronan – biopolymer pro tkáňové inženýrství

Hyaluronan – biopolymer for tissue engineering

Teze habilitační práce



Brno 2012

Klíčová slova

hyaluronan, kyselina hyaluronová, fragmenty hyaluronanu, oligosacharidy hyaluronanu, chemická modifikace biopolymerů, síťování biopolymerů, nanovlákná, mikrovlákna, nosič léků, scaffold

Key words

hyaluronan, hyaluronic acid, hyaluronan fragments, hyaluronan oligosaccharides, biopolymer chemical modification, biopolymer cross-linking, nano-fibres, micro-fibres, drug delivery systems, drug carriers, scaffold

Místo uložení habilitační práce

habilitační práce je uložena na Ústavu fyzikální a spotřební chemie, Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, Purkyňova 118, 612 00 Brno

© Vladimír Velebný, 2012

ISBN 978-80-214-4420-1

ISSN 1213-418X

OBSAH

PŘEDSTAVENÍ AUTORA.....	4
1 ÚVOD	5
2 HYALURONAN – ZÁKLADNÍ INFORMACE	7
3 FRAGMENTY HYALURONANU	9
4 CHEMICKÉ MODIFIKACE HYALURONANU	12
5 NANO A MIKROVLÁKNA Z HYALURONANU.....	17
6 ZÁVĚR.....	21
6.1 Hodnocení přínosu ke stavu poznání	21
6.2 Navýšení intelektuálního bohatství podniku.....	23
6.3 Využívání intelektuálního bohatství firmy	23
7 POUŽITÁ LITERATURA.....	25
ABSTRACT.....	27

PŘEDSTAVENÍ AUTORA

RNDr. Vladimír Velebný, CSc.

Narozen: 10. 6. 1949 v Litomyšli

Vzdělání:

1972 – absolvent – Biochemie, Přírodovědecká fakulta UJEP (dnes Masarykova universita) v Brně

1973 – RNDr. – Biochemie, Přírodovědecká fakulta UJEP (dnes Masarykova universita) v Brně

1981 – CSc. – Biochemie, Přírodovědecká fakulta UK v Praze

Zaměstnání:

1972 – Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UJEP (dnes Masarykova universita) v Brně – asistent

1972 – 1987 – Katedra lékařské biochemie, Lékařská fakulta UK, Hradec Králové – vědecký asistent, později vědecký pracovník

1987 – 1990 – JZD Letohrad – náměstek předsedy pro biotechnologie

1990 – založil jsem společnost Contipro, která se rozrostla na holding tři firem – ředitel holdingu, statutární zástupce všech tří firem

Zahraniční pobyty:

1980 – Semmelweiss University Budapest, Maďarsko (3 měsíce)

1983 – 1984 Université Paris-Creteil, Paříž, Francie (6 měsíců)

1992 – MBR, A.G. Zurich, Švýcarsko (1 měsíc)

Členství v odborných společnostech:

4 zahraniční, 2 tuzemské

Členství ve vědecké nebo oborové radě:

Lékařská fakulta UK v Hradci Králové, Chemickotechnologická fakulta UPce, Pardubice

Publikační činnost:

52 článků v odborných publikacích, 6 kapitol v monografiích, 27 patentů, užitných vzorů nebo jejich přihlášek, více jak 100 přednášek a plakátových sdělení na symposiích, konferencích a seminářích (invited speaker, Hyaluronan, Cleaveland, USA)

Pedagogická činnost:

Lékařská chemie a biochemie (přednášky i praktika) – Lékařská fakulta UK Hradec Králové

Předdiplomní seminář – Chemická fakulta VUT v Brně

Vybrané přednáška z oblasti biopolymerů – Chemická fakulta VUT v Brně

Škola molekulárních biotechnologií – Lékařská fakulta UP Olomouc

Další odborné aktivity:

klastr Nanomedic – iniciátor založení klastru (2006) a předseda představenstva

1 ÚVOD

Předkládaná habilitační práce shrnuje výsledky výzkumu a vývoje ve vybraných oblastech tkáňového inženýrství, který byl prováděn v laboratořích společnosti CPN, spol. s r.o. a Contipro C, a.s., dceřiných společností holdingu Contipro Group od roku 2005 do roku 2011. Získané výsledky jsou shrnuty v 7 časopiseckých publikacích s průměrným impakt faktorem 2,206, 1 rukopise a v 10 přihláškách vynálezů nebo již udělených patentů.

Tkáňové inženýrství je vědním oborem, jehož cílem je vyvinout a vyrobit náhradu za poškozenou, nefunkční nebo zcela chybějící tkáň, a to náhradu pokud možno plnohodnotnou, která by však měla být postupně nahrazena vlastní funkční tkání jedince. Přípravky tkáňového inženýrství by navíc měly aktivně podporovat začlenění náhrady do tkáně a rovněž by měly podporovat odbourání této náhrady v době, kdy je regenerovaná tkáň schopna převzít základní, v ideálním případě veškeré, funkce, které normální tkáň musí zabezpečovat. V tomto se tkáňové inženýrství přibližuje druhé vědní disciplíně, s kterou bývá často zaměňováno, a to regenerativní medicíně. Jaký je mezi nimi rozdíl? V podstatě je poměrně malý. Má-li být vytvořena víceméně plnohodnotná náhrada tkáně, musí být vytvořena nejenom vlastní extracelulární matrix, scaffold, ve které buňky rostou, nýbrž musí být rovněž vypěstovány vhodné buňky a tyto zasety a kultivovány ve scaffoldu. To je pro oba obory shodné. V dnešním pojetí tkáňového inženýrství je také shodné používání kmenových buněk v obou oborech. Hlavní rozdíl mezi nimi je hlavně v tom, že regenerativní medicína vedle přípravy umělých tkání využívá ještě injektáže samotných kmenových buněk nebo biologicky aktivních molekul přímo do poškozených tkání za účelem jejich regenerace.

Jak bylo řečeno výše, tkáňové inženýrství zahrnuje jak část reprezentovanou materiálovým inženýrstvím, tak část reprezentovanou buněčným inženýrstvím. Tyto dvě části nelze od sebe oddělovat. Implantovat do tkáně scaffold, který nese žádné buňky, je sice možné, a dokonce se i klinicky používá (implantace bezbuněčných náhrad chrupavek), avšak taková tkáňová náhrada je víceméně mrtvou součástí organismu a po její implantaci dojde buď k dodatečnému osídlení buňkami a následné přestavbě (tak tomu je i u zmíněných bezbuněčných implantátů do chrupavky), nebo dříve či později k jejímu vyloučení z organismu, nebo jejímu oddělení od organismu, pokud tento materiál není biodegradabilní a není biokompatibilní. Má-li tkáňová náhrada plně odpovídat výše uvedené definici, musí být oseta vhodným typem buněk s dostatečnou viabilitou.

Výše uvedená definice popsala hlavní úlohu tkáňového inženýrství, tj. přípravu tkáňových náhrad. Typickým příkladem je například náhrada poškozené kloubní chrupavky, nefunkčního pankreatu či poškozené nebo chybějící kosti. Do tkáňového inženýrství jsou však řazeny i jiné aplikace, zejména přípravky na hojení ran a také systémy pro cílenou distribuci a řízené uvolňování biologicky aktivních látek a léků. Přitom pod pojmem příprava na hojení, resp. kryty ran si nelze představovat klasické obvazy nebo jiné kryty externích ran, nýbrž přípravky používané k ošetření interních, pooperačních ran vzniklých v dutinách organismu, které v mnohém připomínají scaffoldy. Stejně tak je tomu i u nosičů biologicky aktivních látek, které řadíme do tkáňového inženýrství. Tyto nosiče reprezentují vysoce sofistikované systémy odpovídající na přítomnost externích či interních stimulů změnou svých fyzikálních charakteristik a uvolněním nesených biologicky aktivních látek, jako jsou např. různé růstové faktory. Mezi nejčastěji používané externí stimuly řadíme magnetické pole či změnu teploty tkáně a mezi interními stimuly to jsou nejčastěji změna pH, výskyt určitých molekul, jako je např. glukosa nebo výskyt určitých enzymů v bezprostředním okolí nosiče. I když poslední dvě kategorie (přípravky na hojení ran a přípravky pro cílené a řízené uvolňování léčiv či biologicky aktivních látek) nepředstavují přímou náhradu nefunkční tkáně, jsou to přípravky, které umožní nebo urychlí vytvoření vlastní funkční tkáně.

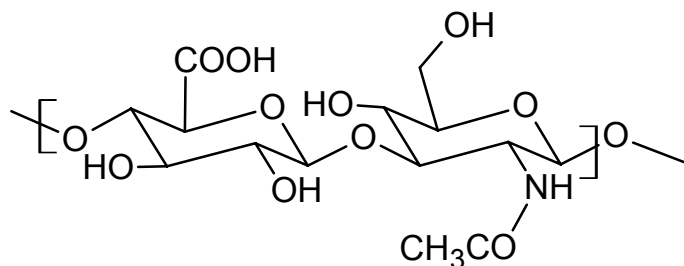
Je jasné, že pro přípravu scaffoldu nahrazujícího tkáň, krytů rány či nosiče pro řízené uvolňování biologicky aktivních látek, mohou být použity pouze vybrané materiály, které budou bez problému přijaty organismem. Na tyto materiály je kladena celá řada požadavků, zejména potom musí být biokompatibilní a biodegradovatelné, přičemž produkty degradace musí být dále odbouratelné a v případě, že nejsou buňkami využívány, musí být bez problémů vyloučeny z organismu. Navíc musí splňovat celou řadu požadavků na fyzikální vlastnosti, např. mechanickou pevnost, odvozených od místa a způsobu aplikace a biologických vlastností odvozených od typů buněk, kterými mají být osety. Ideálním materiálem pro užití v tkáňovém inženýrství jsou všechny biopolymery, které se přirozeně v daném typu tkáni vyskytují. Uvažujeme-li o průmyslové výrobě takovýchto náhrad, dojdeme potom k problému se získáváním vhodných biopolymerů v dostatečném množství. Je zcela vyloučené získávat potřebné biopolymery z lidských tkání. Získávat biopolymery ze zvířecích tkání je možné pouze v takovém případě, že se jedná o biopolymery, které jsou minimálně imunogenní nebo zcela neimunogenní. To ze hry vylučuje většinu bílkovin izolovaných ze zvířecích tkání s výjimkou některých bílkovin pojivových tkání. K problému reakce tkáni na cizorodou bílkovinu se ještě přiřazuje problém přenosu virů a prionů ze živočicha na člověka. Oba tyto problémy by se daly překonat použitím rekombinantních proteinů. Velkou brzdou je však v tomto okamžiku cena takového materiálu, která se pohybuje několik řádů nad cenou akceptovatelnou trhem. Určitou výjimkou, která je registračními autoritami akceptována, je hovězí kolagen typu I, který je dostupný v potřebném množství a i v dobré kvalitě (čistotě i zachované nativní konformaci). Kolagen však sám o sobě není schopen vytvořit scaffold potřebných vlastností, vždy musí být kombinován s dalším syntetickým polymerem nebo biopolymerem. Z pohledu přijatelnosti pro organismus je ideálním materiálem skupina polysacharidů existujících v živočišných tkáních nazývaných glykosaminoglykany. Všichni zástupci této skupiny, kam patří i hyaluronan, jsou prakticky neimunogenní, necytotoxické, nemutagenní a neteratogenní látky. Jejich průmyslové získávání, až na hyaluronan, však představuje velký problém, protože je možné je těžít pouze ze zdrojů živočišného původu, kde se vyskytují sice prakticky v každé tkáni, avšak ve velmi malém, průmyslově těžko využitelném, množství. Navíc jejich čistota není dostatečně vysoká, vždy obsahují určité množství imunogenních bílkovin, s kterými jsou velmi pevně, avšak nekovalentně spojeny. Jedinou výjimkou je hyaluronan, který lze vyrábět v dostatečném množství a přitom ve vysoké čistotě biotechnologicky z mikroorganismů, které jsou přirozeně, to znamená bez genetické úpravy producenta, obaleny kapsulou tvořenou čistým hyaluronanem. Hyaluronan proto, že je průmyslově vyrobitelný ve velkém množství, a také proto, že splňuje všechny bezpečnostní požadavky kladení na materiály používané ve tkáňovém inženýrství a navíc je silně hydrofilní a poměrně snadno chemicky modifikovatelný, je považován za ideální materiál pro tkáňové inženýrství.

Výsledky výzkumu a vývoje, které jsou uvedeny v předloženém habilitačním spise, zkoumají a demonstrují využití hyaluronanu a jeho derivátů v tkáňovém inženýrství ve třech různých stupních. Tím prvním je příprava fragmentů hyaluronanu, coby vhodného výchozího materiálu pro tkáňové inženýrství. Druhým stupněm je chemická modifikace těchto fragmentů. I když je hyaluronan přirozeně se vyskytující složkou extracelulární matrix, přesto není sám o sobě vhodným konstrukčním materiálem pro přípravky tkáňového inženýrství a musí být upravován chemickou modifikací. Tou lze podstatně změnit chemickou strukturu molekuly, což se odrazí ve změnách fyzikálních (mechanických) i biologických vlastností biopolymeru. Přitom se používají jak chemické reakce vedoucí ke změnám na molekule hyaluronanu, jako je například hydrofobizace hyaluronanu, tak reakce vedoucí ke spojování jednotlivých molekul hyaluronanu do třírozměrných sítí, které umožní vznik scaffoldů a dalších prostorových útvarů. Ve třetím stupni demonstrujeme využití nativního i chemicky změněného hyaluronanu pro přípravu mikrovláken a nanovláken, jakožto moderního nástroje výstavby tkáňových náhrad, stejně jako krytů ran či jako nosičů pro řízené uvolňování biologicky aktivní látky.

2 HYALURONAN – ZÁKLADNÍ INFORMACE

Vzhledem k tomu, že hyaluronan není látkou běžně známou, je na tomto místě vložena krátká kapitola podávající základní informace o hyaluronanu.

Hyaluronan je polysacharid patřící do skupiny glykosaminoglykanů. Jejich typickým znakem je struktura tvořená z opakujících se disacharidických jednotek. V případě hyaluronanu se opakující disacharidická jednotka skládá z monosacharidu kyseliny glukuronové, která je glykosidickou vazbou β 1-3 spojena s dalším monosacharidem N-acetylglukosaminem. Jednotlivé disacharidické jednotky jsou pospojovány v polymer s vysokým stupněm polymerace glykosidickými vazbami β 1-4.



Ze struktury hyaluronanu lze odvodit, že se bude jednat o polymer, který je díky existenci velkého množství hydroxylových skupin ve své struktuře schopen vázat vysoké množství vody, a který je ve vodě poměrně dobře rozpustný díky nábojové repulsi vyvolané karboxylovými skupinami disociovanými při pH hodnotě existující ve tkáni. Hydroxylové skupiny spolu s karboxylovými jsou velmi vhodným terčem pro chemickou modifikaci, disociovaná karboxylová skupina navíc představuje místo, kam se budou iontovou vazbou vázat nejenom kationy různých kovů, ale i polymerní kationy (což má zajímavé konsekvence v případě přípravků na hojení ran) či kladně nabitě lipidické látky.

Hyaluronan se vyskytuje u obratlovců prakticky ve všech tkáních, a to ve dvou podobách. Jednak vázaný do extracelulární matrix jako její organizátor a jednak volný jako humektant (kůže), lubrikant (větší klouby) či látka udržující tvar (oční bulva) nebo jako složka výplňové hmoty (pupeční šňůra) některých orgánů. Jeho úloha, resp. aktivita v organismu, je silně závislá na molekulové hmotnosti. Obecně platí, že hyaluronan s vysokou molekulovou hmotou nejeví prakticky žádnou biologickou aktivitu ve smyslu regulace pochodů v organismu nebo regulace buněk a slouží hlavně jako strukturní jednotka. Naproti tomu hyaluronan s nízkou nebo velmi nízkou molekulovou hmotností (obecně platí s molekulovou hmotností pod 500 kg/mol) má vliv na různé pochody v tkáních a buňkách, přičemž bylo prokázáno, že čím nižší je molekulová hmotnost, tím vyšší je biologická aktivita. Je až s podivem, jaké značné množství biologických funkcí je spojeno s tak jednoduchou molekulou.

Hyaluronan je syntetizován mnoha buňkami organismu obratlovců, zejména potom těmi, které jsou zapojeny do tvorby extracelulární matrix, resp. pojivové tkáně (např. fibroblasty, keratinocyty, ale i třeba krevní destičky). Syntézu zajišťuje enzym hyaluronan syntáza, který je lokalizovaný v membráně buněk a v podstatě spojuje aktivovanou glukuronovou kyselinu (UDP-glukuronovou kyselinu) s aktivovaným N-acetylglukosaminem (UDP-N-acetylglukosamin). Vytvořený hyaluronan je vysouván z buňky do extracelulárního prostoru, kde interaguje s proteoglykanovými podjednotkami za tvorby „brush-like structure“, lépe struktury podobné štětcu na vymývání lahví. Proteoglykanové podjednotky se připojují na hyaluronan sice nekovalentně, avšak velmi pevně, pomocí hyaluronan binding proteinu. Odstranění vazebního proteinu z hyaluronanu po extrakci z tkáně je velmi obtížné a vždy jeho určité malé procento zůstává vázáno na hyaluronan a je potenciálním imunogenním faktorem hyaluronanu získaného extrakcí z živočišných tkání [Itano 2008].

Role hyaluronanu v organismu je závislá na jeho molekulové hmotnosti. Odhlédneme-li od jeho úlohy jako lubrikantu nebo humektantu, je role vysokomolekulárního hyaluronanu hlavně organizační. Tím, že po interakci s proteoglykanovými podjednotkami vytváří obrovské nadmolekulární útvary, obsazuje poměrně značnou část extracelulárního prostoru a samozřejmě má podstatný vliv na organizaci dalších složek, které se v tomto prostoru vyskytují, zejména potom kolagenu, ale i dalších glykoproteinů. Svůj vliv na organizaci extracelulárního prostoru uplatňuje v podstatě třemi způsoby. Je známo, že hyaluronan váže značné množství vody. Ta je nezbytná pro správnou konformaci bílkovinných složek extracelulární matrix i pro interakci mezi jejími jednotlivými složkami. Zadržování velkého množství vody v extracelulární matrix je rovněž velmi důležité z pohledu života buněk, které extracelulární matrix osídluje. Extracelulární voda vůbec umožňuje existenci buněk a dále je nezbytným médiem, ve kterém se uskutečňuje přenos živin a kyslíku od krevních kapilár k buňkám. Voda rovněž umožňuje mezibuněčnou komunikaci uskutečňovanou pomocí difuze regulačních látek mezi buňkami a pomocí přenosu regulačních látek vytvořených v buňkách zakotvených v extracelulárním prostoru do krevních kapilár a odtud do celého systému. Struktura nadmolekulárních útvarů vzniklých po interakci hyaluronanu s proteoglykanovými podjednotkami umožňuje, aby se jednotlivé složky extracelulární matrix tímto útvarem různě „proplétaly“ a tak se formovaly například kolagenní fibrily, podpůrné struktury neuronů a dalších buněk a tkání. Bez nadsázky můžeme říci, že interakce hyaluronanu s dalšími složkami extracelulární matrix dává vnitřní strukturu (a určitým způsobem i tvar) a potřebné fyzikální a mechanické vlastnosti jednotlivým tkáním a orgánům [Allison 2006, Almond 2007, Nečas 2008, Svanovský 2007].

Extracelulární matrix je osídlena buňkami. Všechny tyto buňky jsou pevně zakotveny k extracelulární matrix. To se děje prostřednictvím celé řady specializovaných proteinů nebo receptorů, které interagují s různými složkami extracelulární matrix. Důležitá je interakce mezi hyaluronanem a buňkami zprostředkovaná receptorem CD 44, který se nachází na povrchu většiny buněk. Tento receptor není důležitý pouze pro vazbu buněk na extracelulární matrix, nýbrž také z pohledu regulace pochodů odehrávajících se v buňce a díky svému charakteru, jedná se o endocytózní receptor, také z pohledu cílené distribuce léků. Přitom není jedno, zda s receptorem interaguje vysokomolekulární hyaluronan nebo jeho fragmenty [Puré 2009, Toole 2009].

Fragmenty hyaluronanu se mohou v tkáni objevit ve třech případech. Tím prvním je běžná obnova hyaluronanu v tkáni. Je známo, že hyaluronan má poměrně rychlou obnovu, např. v kůži je jeho metabolický poločas v řádu desítek minut až hodin. V tom případě se ve tkáni objeví fragmenty hyaluronanu, které vzniknou nejdříve buď působením hyaluronidáz na proteoglykany a následně odštěpením proteoglykanových podjednotek z fragmentů hyaluronanu specifickými proteázami, nebo působením týchž enzymů, ale v obráceném pořadí, to znamená nejdříve odštěpením proteoglykanových podjednotek z hyaluronanu a potom fragmentací hyaluronanu hyaluronidázami. Produkované fragmenty mají vysokou molekulovou hmotnost, nejeví biologickou aktivitu a jsou krevním řečištěm zaneseny do jater, kde jsou zpracovány až na monosacharidy, které jsou dále metabolizovány standardním způsobem. Z toho je zřejmé, že fyziologické odbourání hyaluronanu prakticky nevede k produkci biologicky aktivních fragmentů přímo v tkáních. V tkáních však nemusí probíhat pouze fyziologické odbourání hyaluronanu. Pokud v tkáni probíhá zánět, ten může být nastartován zraněním, infekcí nebo např. i vyšší dávkou UV záření, objeví se v tkáni ve větší míře volné radikály různého původu, které hyaluronan degradují na fragmenty. Protože hyaluronan je velmi citlivý k volným radikálům, probíhá degradace ve zvýšené míře a objevují se fragmenty s nízkou nebo velmi nízkou molekulovou hmotností. Takovéto fragmenty se mohou objevit ve tkáni i po jejím napadení jinými živočichy či mikroorganismy. Většina hadích a pavoučích jedů obsahuje enzym hyaluronidázu, který velmi rychle rozkládá hyaluronan na různě velké fragmenty. Podobně je tomu u pijavky, která ve svých slinách rovněž obsahuje hyaluronidázu, která však na rozdíl od výše uvedených enzymů, jež štěpí (přednostně štěpí) glykosidickou vazbu 1-4, štěpí vazbu 1-3. Tím se do okolí

buněk dostávají fragmenty hyaluronanu, které na redukujícím konci nemají N-acetylglukosamin, ale kyselinu glukuronovou. Většina mikroorganismů nepoužívá ke štěpení hyaluronanu hydrolytickou reakci katalyzovanou hyaluronidázami, nýbrž eliminační reakci zprostředkovanou hyaluronan lyázami. Eliminační reakci podléhá glykosidická vazba β 1-4 a výsledkem je potom vznik dvojné vazby mezi atomy uhlíku 4 a 5 u kyseliny glukuronové na neredukujícím konci fragmentu. Působením nefyziologických podmínek na hyaluronan je tedy produkována řada různých „fyziologických“ (s N-acetylglukosamin na redukujícím konci, mají sudý počet monosacharidů a neobsahují modifikované monosacharidy) i „nefyziologických“ fragmentů hyaluronanu, které mohou ovlivňovat buňky [Girish 2007, Kakizaki 2010, Lee 2010, Stern 2007].

Proto, aby buňky mohly být nějakým signálem ovlivňovány, musí ho rozpoznat. To se děje prostřednictvím receptorů, které jsou lokalizovány na površích buněk a specificky interagují pouze s určitými látkami. Buňky mohou s hyaluronanem, který je v extracelulární matrix, interagovat prostřednictvím několika druhů receptorů. Největší pozornost se dosud zaměřila na receptor CD 44. Jedná se o glykoprotein se značnou variabilitou ve své struktuře (existuje minimálně 9 splicing forem tohoto receptoru), který prochází cytoplasmatickou membránou a jedním svým koncem vyčnívá do extracelulárního prostoru a druhým do intracelulárního prostoru. Část, která je v extracelulárním prostoru, interaguje s extracelulárním hyaluronanem, přičemž platí, že interakce se uskuteční, je-li k dispozici minimálně fragment hyaluronanu obsahující 4 monosacharidy v případě imunitních buněk, 6 monosacharidů u většiny ostatních buněk nebo 9 monosacharidů v případě keratinocytů. Délka fragmentu, nad minimální délku, hraje také určitou roli ve výsledku interakce.

Každá interakce ligandu s receptorem, a to zcela obecně, vede ke spuštění kaskády enzymů, které signál z povrchu buňky přenášejí do buněčného jádra a podle jeho povahy vyvolají aktivaci nebo supresi systému transkripce genu do RNA, která spustí další pochody v buňce vedoucí k syntéze proteinu nebo další regulační pochody ovlivňující stav buňky. Vysokomolekulární hyaluronan většinou interaguje s několika receptory CD 44 najednou, obaluje buňku a připoutává ji k extracelulární matrix. Pravděpodobně taková interakce, která spojí řadu receptorů, nevede k tvorbě žádného signálu, který by buňku vychýlil z její rovnovážné fyziologické polohy. Jiná situace je u krátkých fragmentů, které mohou u různých buněk vyvolat různou reakci. Velmi krátké fragmenty (tetrasacharidy) aktivují dendritické buňky, delší potom aktivují buňky endotelu k expresi faktoru způsobujícího tvorbu nových kapilár a jiné, s molekulovou hmotností okolo 12 kg/mol, aktivují geny pro syntézu hyaluronan syntázy a potlačují transkripci genů pro zánětlivé faktory. Fragmenty s molekulovou hmotností kolem 100 kg/mol aktivují transkripci genů pro syntézu integrinů. Z tohoto krátkého a neúplného přehledu je zřejmé, že interakce hyaluronanu s receptorem CD 44 vede u různých buněk ke zcela odlišným reakcím. Receptor CD 44 je zajímavý ještě z jednoho hlediska. Jak již bylo výše uvedeno, je to receptor endocytózního typu. To znamená, že pokud dojde k jeho interakci s fragmentem hyaluronanu, vchlípí se i s navázaným hyaluronanem do buňky, kde vytvoří speciální vakuoly, postupně endozom a lysozom, ve které je hyaluronan degradován. To znamená, že i nanočástice značená hyaluronanem nesoucí biologicky aktivní látku má šanci tímto způsobem být dopravena přímo do buňky stejně jako hyaluronan s navázanou biologicky aktivní látkou. Tohoto způsobu přenosu biologicky aktivní látky (léčiva) do buňky se snaží využít celá řada výzkumných týmů a vyvinout přípravky pro léčbu různých onemocnění, např. některých typů rakoviny, které by minimálně zatěžovaly organismus [Jiang 2007, Stern 2006].

3 FRAGMENTY HYALURONANU

I když se hyaluronan v tkáních za fyziologických podmínek vyskytuje převážně v polymerní podobě s vysokou molekulovou hmotností jednotky milionu gramů na mol, je v této podobě ve tkáňovém inženýrství prakticky nepoužitelný, a to zejména pro svou velmi dobrou rozpustnost ve

vodě, snadnou biodegradovatelnost ve tkáních a nevhodné mechanické vlastnosti. Proto je třeba sáhnout k chemickým modifikacím a pomocí nich připravit z nativního biopolymeru materiál pro tkáňové inženýrství. Pro chemické modifikace se však nehodí hyaluronan s molekulovou hmotností příliš vysokou. Jeho roztoky jednak vykazují vysokou viskozitu, což komplikuje práci s ním, jednak lze jen obtížně regulovat rovnoměrnost modifikace po celé délce řetězce.

To byl jeden důvod, proč jsme studovaly postupy přípravy fragmentů hyaluronanu. Druhým důvodem je fakt, že fragmenty s nízkou nebo velmi nízkou molekulovou hmotností jsou biologicky aktivní [Stern 2006]. Předpokládá se, že v nedaleké budoucnosti budou fragmenty hrát významnou roli jako farmaceuticky aktivní látky využitelné v terapii celé řady onemocnění.

Vzhledem k možnostem, které užití fragmentů hyaluronanu nabízí, byla jejich přípravě a charakterizaci produktů věnována v časopisecké i patentové literatuře poměrně malá pozornost. Zaměřili jsme se proto na studium průběhu degradačního procesu a výběru optimální kombinace podmínek vedoucích k požadovanému produktu a na izolaci a charakterizaci vedlejších degradačních produktů, které v průběhu degradace vznikají a které mohou ovlivňovat biologické vlastnosti fragmentů hyaluronanu.

Fragmenty hyaluronanu lze připravovat celou řadou postupů, jak je zřejmé z přehledu Sterna a spol. [Stern 2007]. My jsme studovali degradaci hyaluronanu v pevném stavu suchým teplem a degradaci hyaluronanu v kyselých nebo alkalických roztocích, v některých případech i za přítomnosti oxidačního činidla. Degradace byla urychlována zahřátím na bod varu konvenčním způsobem nebo mikrovlnným ohřevem nebo působením ultrazvuku.

O chemismu degradace hyaluronanu v pevné fázi není v literatuře nic uvedeno. My jsme zjistili, že během tohoto způsobu degradace nedochází v hyaluronanu k hydrolytické reakci, nýbrž k β -eliminaci a na zbytku glukuronové kyseliny, která je na neredukujícím konci oligosacharidů, se mezi uhlíkem 4 a 5 pyranosového cyklu objevuje dvojná vazba.

O chemismu kyselé a alkalické hydrolyzy hyaluronanu v roztoku lze v literatuře nalézt poněkud více informací. V případě kyselé hydrolyzy hyaluronanu budou výsledkem reakce směs „regulérních“ poly a oligosacharidů (s kyselinou glukuronovou na neredukujícím a N-acetylglukosaminem na redukujícím konci a se sudým počtem monosacharidů) vzniklých po rozštěpení glykosidické vazby 1-4 a „neregulérních“ poly a oligosacharidů vzniklých v důsledku štěpení vazby 1-3. V případě alkalické hydrolyzy probíhá několik paralelních reakcí, zastoupení jejich výsledných produktů je dáno pH hodnotou prostředí a reakční teplotou. Jednak může probíhat tzv. „peelingová“ reakce na N-acetylglukosaminu, který je následně odštěpen, a rovněž probíhá β -eliminační reakce na kyselině glukuronové vedoucí k tvorbě dvojně vazby mezi uhlíky 4 a 5 [Tokita 1995]. Náš vklad ke zkoumání procesu degradace nativního hyaluronanu na fragmenty s nízkou a velmi nízkou molekulovou hmotností lze shrnout následujícím způsobem:

Byl vypracován originální postup degradace hyaluronanu vedoucího k velmi malým fragmentům, spodní limit molekulové hmotnosti byl na hranici 5 kg/mol. K ohřevu roztoku jsme použili mikrovlnné záření. Degradace může být prováděna při různém pH, kombinace doby ohřevu a pH roztoku je nástrojem k regulaci velikosti fragmentů. Pokud degradace probíhala při pH 3,0, bylo možné získat poměrně rychle fragmenty s velmi nízkou molekulovou hmotností. Výhody použití mikrovlnného ohřevu proti konvenčním způsobům ohřevu spočívají jednak v určitém zvýšení rychlosti degradace (zvláště je-li třeba připravit fragmenty o vyšší molekulové hmotnosti) a také v redukcii tvorby vedlejších degradačních produktů [Bezáková 2008].

Ultrazvuk byl rovněž použit k urychlení fragmentace hyaluronanu. Degradace pod jeho vlivem vede k odlišným výsledkům a pravděpodobně probíhá i poněkud jiným mechanismem než klasická kyselé hydrolyza. Fragmentace ultrazvukem v kyselém prostředí bez přítomnosti oxidačních látek probíhá pouze do určité limitní hodnoty molekulové hmotnosti (okolo 100 kg/mol). Její rychlost není příliš závislá na pH roztoku. Poněkud rychleji probíhá fragmentace v alkalickém prostředí. Dramaticky jiná je situace, pokud jsou přítomny oxidační látky, zejména potom chlornan. Jeho přítomnost vede k urychlení fragmentace hyaluronanu. V alkalickém prostředí v přítomnosti

0,09% NaClO je dosaženo molekulové hmotnosti 133 kg/mol již za 15 min. Tento výsledek by mohl být zajímavý pro průmyslovou aplikaci, avšak přítomnost chlornanu využití tohoto postupu komplikuje, protože štěpení za těchto podmínek by muselo být prováděno v nádobách ze speciálních a velmi drahých materiálů [Dřimalová 2005].

Zkoumali jsme vedlejší degradační produkty vzniklé kyselou hydrolyzou hyaluronanu. Porovnávali jsme infračervená, NMR a UV spektra fragmentů hyaluronanu získaných působením ultrazvuku, mikrovlnného záření a fragmentů připravených za použití konvenčních zdrojů tepla se spektry nativního hyaluronanu. Z porovnání vyplynulo, že množství vedlejších degradačních produktů bude ve výsledné reakční směsi velmi malé, protože ani v infračervených spektrech, ani ve spektrech nukleární magnetické rezonance se neobjevily významnější změny, pouze v UV spektrech byl zachycen nárůst absorpance v oblasti 230 až 240 nm, což svědčí o tvorbě dvojně vazby na pyranosovém kruhu. Vzhledem k velmi malému obsahu vedlejších degradačních produktů ve výsledné reakční směsi, muselo být použito kombinace několika isolačních stupňů, abychom prokázali, že v produktu se nalézá pět hlavních frakcí vedlejších degradačních produktů, u kterých byla pomocí NMR a hmotnostní spektrometrie určena jejich struktura. Výsledky ukázaly, že po dlouhodobém působení kyselého prostředí na hyaluronan za varu, přibližně 0,7 % vysokomolekulárního hyaluronanu je degradováno až na furanové deriváty a 0,2 % na deriváty cyclopentanonu. Biologické testy provedené na keratinocytech a fibroblastech ukázaly, že většina degradačních produktů inhibuje růst těchto buněk. Při pokusech odstranit tyto potenciálně nebezpečné látky z fragmentů hyaluronanu bylo zjištěno, že již pouhá ultrafiltrace přes membránu s cut-off 2 kDa byla schopna odstranit prakticky všechny degradační produkty z reakční směsi.

V experimentech souvisejících s fragmentací hyaluronanu jsme narazili na neobvyklé změny v parametrech charakterizujících konformaci biopolymeru v roztoku v závislosti na jeho molekulové hmotnosti. Při dvojitým logaritmickém vynesení vnitřní viskozity proti molekulové hmotnosti bychom v případě lineárního polymeru, za který je hyaluronan pokládán, měli dostat přímku (Mark–Houwink rovnice dává do vztahu vnitřní viskozitu biopolymeru $[\eta]$, tj. míru hydrodynamického objemu obsazeného biopolymerem, s informací o interakci biopolymeru s rozpouštědlem, koeficient α). Vynesení logaritmu námi získaných hodnot vnitřní viskozity proti logaritmu molekulové hmotnosti vedlo ke křivce, kde bylo možné nalézt hodnoty pro koeficient α varírující v širokém rozmezí od hodnot přesahujících 1,0 až po hodnoty okolo 0,5, resp. i hodnoty nižší. Literatura [Podzimek 2010] uvádí pro lineární polymery v termodynamicky dobrých rozpouštědlech hodnotu α okolo 0,7. Pro expandované válcovité struktury lze v literatuře nalézt hodnoty nad 0,8, pro kompaktní sféry hodnoty směřující k 0. Při interpretaci výsledků jsme se mohli přidržet již publikovaného vysvětlení nesouladu mezi představou hyaluronanu jako lineárního biopolymeru a získanými výsledky při dvojitým logaritmickém vynesení vnitřní viskozity proti molekulové hmotnosti fragmentů hyaluronanu existencí různých konformérů hyaluronanu v roztoku v závislosti na jeho molekulové hmotnosti, nebo začít uvažovat zcela novým směrem, a to, že hyaluronan je větvený biopolymer. V publikaci uvedené v příloze č. 4 jsme na ohromném počtu měření jasně dokázali, že log – log vynesení vnitřní viskozity proti molekulové hmotnosti vede k tvorbě křivky a nikoli přímky. I když je na hyaluronan názíráno striktně jako na lineární biopolymer, který již z principu své tvorby nemůže být větven, může být hyaluronan během fermentace a později během izolace vystaven působení celé řady enzymů, které by mohly měnit jeho strukturu, i změnám prostředí, jako jsou např. změny pH, složení okolních roztoků, teploty apod., takže nelze vyloučit, že na původně lineárním hyaluronanu dochází k následným reakcím vedoucím k jeho větvení. Větvení může mít různou příčinu, ať je to reakce molekul hyaluronanu navzájem, nebo reakce hyaluronanu s dalšími polysacharidy či peptidy, které jsou přítomny ve fermentačním mediu. Na druhé straně je však třeba říci, že se dosud nepodařilo objevit žádnou část z větvení hyaluronanu. Při přípravě oligosacharidů hyaluronanu a pátrání po vedlejších produktech jeho kyselé hydrolyzy byla provedena řada chromatografických analýz, při kterých se dosud nenašel důkaz o větvení hyaluronanu. Podle mého soudu obě možnosti, to

znamená existence různých konformérů hyaluronanu v závislosti na jeho molekulové hmotnosti i existence hyaluronanu větveného na několika místech řetězce v důsledku připojení jiných biopolymerů či vlastních fragmentů, zůstávají přes to všechno v současné době ve hře.

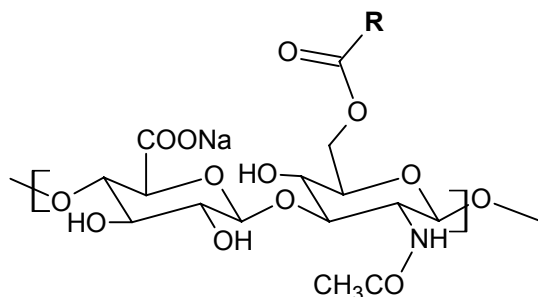
4 CHEMICKÉ MODIFIKACE HYALURONANU

Jak bylo řečeno výše, je nativní hyaluronan ve tkáňovém inženýrství prakticky nepoužitelný, a to zejména pro svou velmi dobrou rozpustnost ve vodě, snadnou biodegradovatelnost ve tkáních a nevhodné mechanické vlastnosti. Proto je třeba sáhnout k chemickým modifikacím a pomocí nich připravit z nativního biopolymeru materiál vhodný pro tkáňové inženýrství. Prvním krokem je navázání vhodných ligandů na hyaluronan a v případě, že lze ligandy následnou chemickou reakcí mezi sebou spojovat, tak také přípravu trojrozměrných struktur, hydrogelů. Hydrogel představuje finální materii, z které tkáňoví inženýři vytvářejí scaffoldy, nosiče léků, různé kryty ran a popálenin apod. Chemické modifikace dávají do rukou tkáňových inženýrů zcela univerzální nástroj pro přípravu hydrogelů s různými vlastnostmi. Jeho univerzálnost spočívá v tom, že pouhým výběrem typu chemické vazby, která připojuje ligand na hyaluronan, výběrem substituentů na ligandu, které se nacházejí v bezprostředním okolí vazby ligandu na hyaluronan, stupněm substituce, umístěním ligandu na hyaluronanu a typem použité síťovací reakce lze regulovat biokompatibilitu derivátu, rychlost jeho degradace a zejména jeho fyzikální vlastnosti. Tato část práce je zaměřena na zkoumání a vývoj nově aplikovaných chemických reakcí, pomocí kterých jsou vhodné ligandy připojovány na hyaluronan, a vybraných síťovacích reakcí, kterými se přetváří lineární molekuly modifikovaného hyaluronanu v trojrozměrné hydrogely. Je nutné si uvědomit, že chemické modifikace biopolymerů mohou být obecně využity k připojení jakékoliv molekuly, nejenom té sloužící k tvorbě hydrogelů, nýbrž také k připojení biologicky aktivní látky či molekuly zabezpečující fyzikální interakce mezi molekulami, např. nosiče z hydrofobizovaného hyaluronanu.

V tkáňovém inženýrství je třeba mít k dispozici hydrogely s celou škálou různých biologických vlastností, s různými mechanickými vlastnostmi i prostorovým uspořádáním a zejména s různou rychlostí odbourání z tkáně. Zejména o této poslední vlastnosti, tj. rychlosti (snadnosti) odštěpení ligandu od hyaluronanu prostým hydrolytickým nebo enzymatickým odštěpením, významným způsobem rozhoduje typ vazby ligandu na hyaluronan. Proto bylo našim cílem vyvinout celou paletu reakcí vedoucích k různým vazbám ligandů na hyaluronan, které by umožňovaly vytvořit různě stabilní hydrogely. Biologicky nejlabilnější je vazba esterová, zejména pokud je v hyaluronanu esterifikována primární hydroxylová skupina. V tkáni existuje značné množství esteráz, které s různou rychlostí esterovou vazbu ruší a v podstatě zpětně generují nemodifikovaný hyaluronan. Díky tomu, že není zablokován karboxyl, zůstane po odštěpení ligandu hyaluronan rozpustný, a tudíž přístupný hyaluronidázám, které jsou schopny ho poměrně rychle odbourat. Stabilnější vazba je karbamátová, která je pomalu v organismu odbouratelná. Prakticky neodbouratelný je derivát, kde je ligand vázán buď éterovou vazbou, nebo ve formě sekundárního aminu na místě primární hydroxylové skupiny či ve formě substituovaného amidu karboxylové skupiny.

Estery z hyaluronanu, ve kterých je z hyaluronanu využita právě primární či sekundární hydroxylová skupina (nikoli karboxylová), lze připravit klasickou reakcí, při kterých je jako reagent využíván chlorid nebo symetrický anhydrid mastné kyseliny. Použijí-li se k esterifikaci vyšší mastná kyselina, je možné připravit deriváty hyaluronanu, jehož molekula bude mít změněnou rozpustnost ve vodě a zvýšenou tendenci interagovat s hydrofobními molekulami přítomnými v jejím okolí. Připravit lze až hyaluronan, který tvoří ve vodných roztocích micelám podobné útvary, a může být tudíž využit při přípravě nosičů schopných transportovat lipofilní substance. Lze rovněž připravit ve vodě zčásti nebo zcela nerozpustný derivát, který najde uplatnění v tkáňovém inženýrství, např. při tvorbě různých biologicky velmi odolných, avšak stále

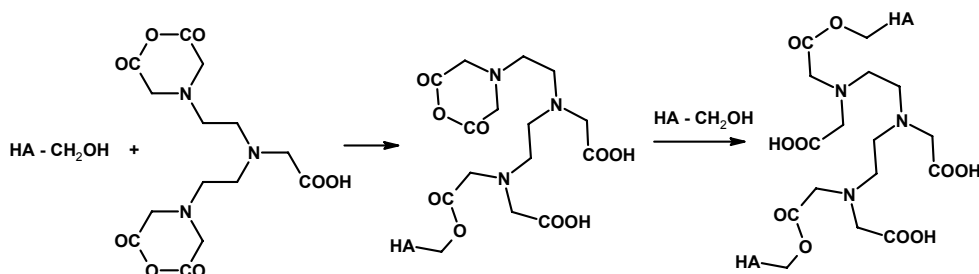
biodegradabilních struktur, při tvorbě nano i mikrovláken použitelných pro přípravu krytů ran, jako nosič léků pro jejich cílenou distribuci a řízené uvolňování a podobně. Vzhledem k tomu, že hydrofobizované deriváty hyaluronanu představují velmi zajímavou skupinu derivátů, byla velká snaha vyvinout vlastní postup přípravy esterů hyaluronanu s vyššími mastnými kyselinami.



Námi vyvinutý postup vychází z dříve popsaných reakcí směšného anhydridu a stal se v podstatě zcela univerzální metodou přípravy esterů hyaluronanu s organickými kyselinami, které vytváří s etylchlorformiátem směsný anhydrid. Jednoznačnou výhodou použití ethylchlorformiátu je skutečnost, že jednoduchou reakcí kyseliny s ethylchlorformiátem lze v podstatě připravit směsný anhydrid z jakékoli organické kyseliny, která ze své podstaty může směsné anhydridy tvořit. V průmyslovém měřítku totiž nejsou symetrické anhydridy některých kyselin vůbec dostupné a některé pouze za cenu, která není akceptovatelná trhem (některé symetrické anhydridy mastných kyselin jsou až desetkrát dražší než směsný anhydrid téže mastné kyseliny). Jejich další výhodou je fakt, že směsné anhydridy reagují ve většině případů rychleji a za nižších teplot než symetrické anhydridy. Skutečnost, že vedlejšími produkty reakce směšného anhydridu s hyaluronanem jsou oxid uhličitý a ethylalkohol, látky, které lze z reakční směsi snadno odstranit a které zároveň nijak nezatěžují životní prostředí, je další výhodou tohoto postupu přípravy esterů. Tvorba ethylalkoholu v průběhu reakce je však zároveň nevýhodou. Primární hydroxylová skupina ethanolu může být směsným anhydridem rovněž esterifikována a tím v podstatě probíhají v reakční směsi dvě konkurenční reakce, přičemž koncentrace konkurenčního akceptoru anhydridu (ethanol) s časem stoupá a dostupnost původně cílových primárních hydroxylových skupin hyaluronanu klesá. To se projevuje většinou ve snížení stupně substituce hyaluronanu ve srovnání se symetrickým anhydridem.

Reakce směšného anhydridu s hyaluronanem jsme použili při přípravě esterů hyaluronanu s mastnými kyselinami s počtem atomů uhlíku od 6 do 16. Ukázalo se, že v závislosti na stupni substituce a délce acylového řetězce, lze regulovat rozpustnost esterů hyaluronanu ve vodném prostředí. Z původně ve vodě velmi dobře rozpustného polymeru se stal polymer ve vodě nerozpustný, na omak mastný. Využití připravených derivátů je různé. Deriváty hyaluronanu substituované acyly se sudým počtem atomů uhlíku se využívají při vývoji nových typů scaffoldů pro náhradu chrupavky a kůže a jako materiály vhodné pro korektivní (estetickou) dermatologii jako dermální fillery. Deriváty připravené z mastné kyseliny s dlouhým acylem a vysokým stupněm substituce se využívají při vývoji ve vodě nerozpustných nano a mikrovláken. Další velmi zajímavou aplikací je využití silně hydrofobizovaných hyaluronanů pro přípravu nosičů nepolárních látek ve vodném prostředí. Zvláště tato poslední aplikace se zdá být velmi zajímavá, protože z dosud provedených experimentů lze usuzovat, že hydrofobizovaný hyaluronan tvoří nadmolekulární útvary podobné micelám, ve kterých existují hydrofobní domény, které jsou schopné vázat nepolární látky. V případě hyaluronanu by se jednalo o zcela nový typ nosiče, který by byl využitelný jak pro cílenou distribuci (hyaluronan je schopen interagovat s buněčným receptorem CD 44, který je silně exprimován u některých typů nádorů), tak pro řízené uvolňování biologicky aktivních látek (rychlost uvolňování aktivní látky je dána rychlostí degradace modifikovaného hyaluronanu, což lze poměrně dobře řídit).

Pomocí esterové vazby lze připojit k hyaluronanu celou řadu různých látek. Jednou z nich je i DTPA (diethylentriaminopentaoctová kyselina), látka, která se ve formě soli s gadoliniem používá k zobrazování pomocí MRI a také při tak zvané „Neutron capture therapy“ ($^{157}\text{Gd} + n_{\text{th}} \rightarrow ^{158}\text{Gd} + \gamma + 7.94\text{MeV}$). Během studia chemismu přípravy DTPA hyaluronanu bylo zjištěno, že DTPA může velmi efektivně tvořit příčné vazby mezi řetězci hyaluronanu. Molekulovou hmotnost fragmentu hyaluronanu se podařilo pomocí této síťovací reakce zvýšit až 60x.



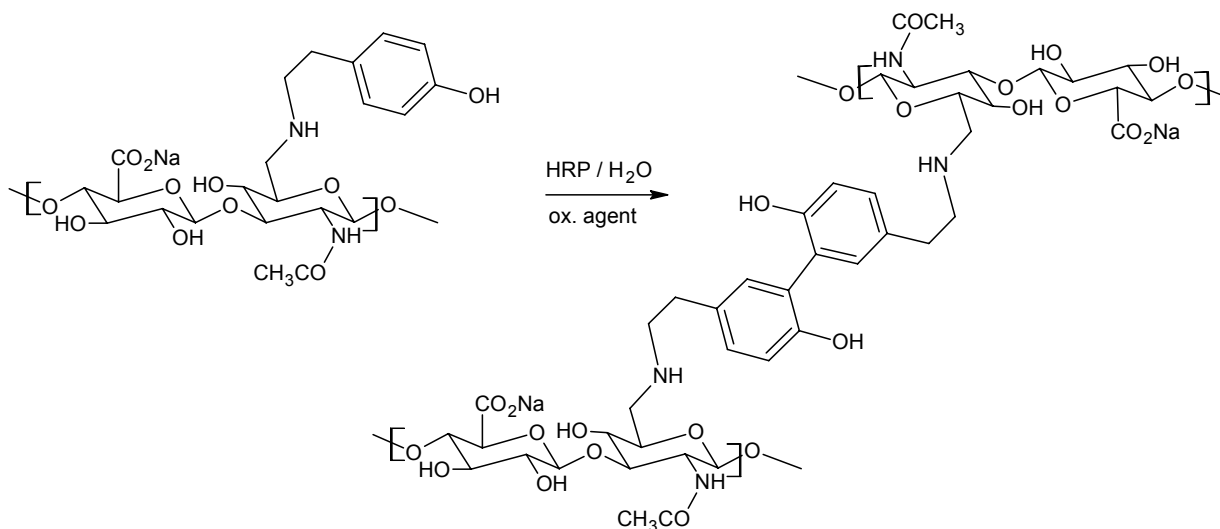
Zachování karboxylové skupiny v molekule hyaluronanu zabezpečí jednak jeho větší rozpustnost i v případě hydrofobních derivátů a dále jeho snadnější odbourávání z organismu. Proto jsme se zaměřili na vývoj esterifikační reakce, která využívala primární a sekundární alkoholické skupiny na monosacharidech. Pro některé specifické aplikace, pro které je třeba připravit estery, které se budou jen velmi pomalu v organismu odbourávat, je vhodné využít k esterifikaci karboxylovou skupinu hyaluronanu. V těchto reakcích hyaluronan hraje obrácenou roli než v reakcích se směsným anhydridem. Zde hyaluronan vystupuje jako kyselina. Estery tohoto typu jsou ve vodě nerozpustné již při nízkém stupni substituce, a to i v případě, že ester vytváří i poměrně hydrofilní alkohol. Estery jsou připravovány originálním postupem pomocí činidel obecného vzorce R – X nebo X – R – X, kde R může být alifatický, cycloalifatický, olefinický, arylalifatický nebo heterocyklický různě substituovaný zbytek a X halogenid ze skupiny chlor, brom a jod. V případě reakce monohalogenderivátu (R – X) vznikají pouze estery. V případě použití dihalogenderivátů (X – R – X) může docházet k tvorbě příčných vazeb mezi řetězci hyaluronanu. Námí vyvinutý postup je zcela originální a má řadu výhod oproti klasickým patentově chráněným postupům. Tou největší je skutečnost, že přípravu esterů je možné provádět ve vodném prostředí a je k ní možné použít sodnou nebo jinou sůl hyaluronanu s jednomocným kationtem. Podle klasických postupů bylo třeba připravovat tetralkylamonnou sůl, což představovalo krok navíc a reakce musela být prováděna pouze v organických rozpouštědlech.

Další skupinou derivátů hyaluronanu, které byla věnována určitá pozornost, jsou karbamátové deriváty. Ty sice nabízejí zajímavou a biologicky pomalu rozložitelnou vazbu, avšak způsob jejich přípravy využívající působení bromkyanu a primárního aminu na hyaluronan ve vodě se ukázal jako nevhodný, protože nevedl k jednoznačně definovaným produktům. Ve shodě s literaturou jsme dále prokázali, že vedle hlavní reakce, kterou lze jen velmi špatně řídit, probíhá celá řada vedlejších reakcí, mimo jiné probíhají reakce vedoucí k tvorbě příčných vazeb v bromkyanem aktivovaném hyaluronanu, což se projeví tvorbou gelů. Tvorba gelů, pokud je říditelná, je proces, o který usilujeme např. při přípravě scaffoldů. V případě bromkyanem aktivovaném hyaluronanu je tvorba gelů neříditelná, a tudíž pro tento účel je reakce nevyužitelná [Mlčochová 2006].

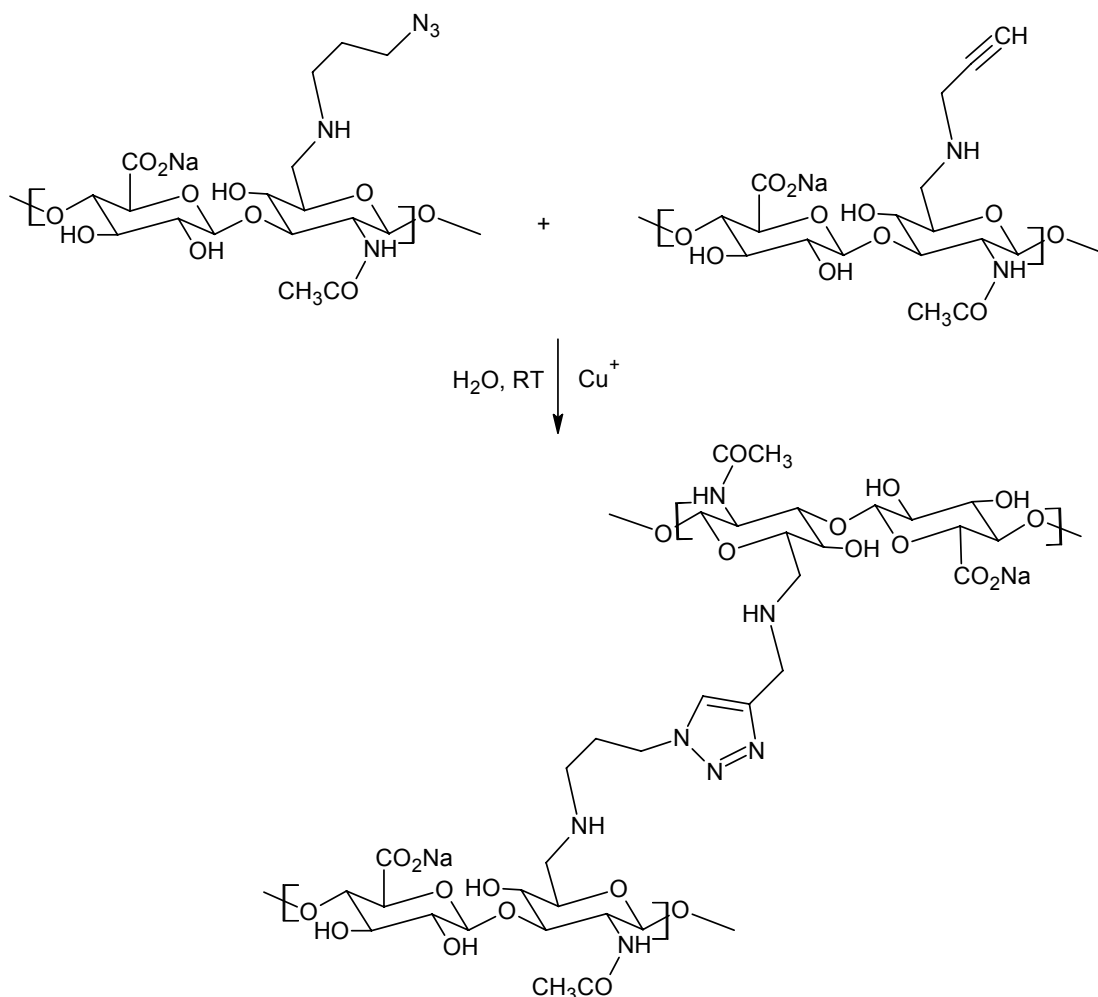
Velmi stálými deriváty hyaluronanu jsou substituované amidy připravené za využití karboxylové skupiny hyaluronanu. Takové deriváty jsou prakticky biologicky neodbouratelné a představují jednu z možností, vedle éterů a sekundárních aminů, jak připravit celou škálu derivátů hyaluronanu v organismu velmi stabilních. Vzhledem k potenciálu takových derivátů byl vyvíjen vlastní originální postup jejich syntézy. Vyšli jsme z reakce ethylchlorformiátu s karboxylem hyaluronanu. Reakce vede ke vzniku směsného anhydridu, který po reakci s primárním aminem vytvoří substituovaný amid. V případě amidu se může jednat o lineární nebo rozvětvený alifatický amin s obsahem aromatických nebo heteroaromatických skupin. Použití

tohoto derivátu je opět velmi široké a bude směřovat do takových aplikací, kde bude třeba pracovat s hydrolyticky i biologicky velmi stálými deriváty. Tento derivát může být využitelný jednak při přípravě scaffoldů, jednak nosičů pro cílenou distribuci a řízené uvolňování léků, včetně nano a mikrovláken. Nehodí se pro přímou vazbu léku, obecně biologicky aktivních látek, na hyaluronan, protože uvolnění látky bude velmi obtížné, ne-li nemožné [Huerta-Angeles 2011].

Velmi stálou vazbu ligandu na hyaluronan lze rovněž vytvořit z uhlíku 6 N-acetylglukosaminu, to znamená bez zapojení karboxylové skupiny hyaluronanu do reakce. Námí vyvinutý originální postup spočívá v oxidaci primární hydroxylové skupiny na aldehyd, který je poměrně reaktivní a může reagovat s celou řadou různých funkčních skupin. Pro účely tkáňového inženýrství se hodí reakce s primární aminoskupinou, která vede k iminu. Ligand připojený iminovou vazbou je připojen na hyaluronan jen velmi slabou vazbou, která by se v podmínkách organismu velmi rychle hydrolyzovala. Stabilizaci takto připojeného ligandu lze dosáhnout redukcí iminové skupiny na sekundární amin. Tímto způsobem by bylo možné velmi elegantně připravovat konjugáty hyaluronanu s peptidy např. při přípravě termoresponzivních gelů, při přípravě hyaluronanu s navázanou peptidovou sekvencí vhodnou k ukotvení buněk např. na struktury scaffoldu apod. Podobně jako ester představuje sekundární amin připojený k hyaluronanu v poloze 6 N-acetylglukosaminu zcela univerzální nástroj pro vazbu ligandu na hyaluronan. Lze ho využít pro přípravu hydrofobizovaného hyaluronanu podobně jako esterů vycházejících z téže polohy na molekule glukosaminu, avšak sekundární amin bude podstatně biologicky stabilnější. Samozřejmě že je možné tímto způsobem vázat na hyaluronan celou řadu různých ligandů, které lze využít třeba pro tvorbu příčné vazby a formování hydrogelů. Zajímavý ligand, který jsme připojovali, jsou deriváty tyraminu nebo 5 hydroxyindolu. Hyaluronan s oběma typy ligandů lze po přidavku peroxidu vodíku a enzymu peroxidázy síťovat do trojrozměrných struktur. Tato reakce má celou řadu výhod. Tou hlavní je skutečnost, že reakce může probíhat i v přítomnosti buněk, přídavek peroxidu ani enzymu nijak neovlivní jejich viabilitu. Druhou skutečností je fakt, že tato reakce může být prováděna in situ, protože teprve po smísení všech tří reakčních složek se do jedné až dvou minut vytvoří nerozpustný gel. Toto je dostatečně dlouhá doba na to, aby bylo možné směs reagentů dopravit na místo tvorby gelu a ten nechat vytvořit přesně podle prostorové potřeby defektu, který má vyplnit. Hydrogely připravené z těchto derivátů kromě výhod zmíněných výše mají jednu velkou nevýhodu, kterou je jejich malá mechanická pevnost. Rozhodně se nehodí pro přípravu scaffoldů pro náhradu chrupavky.



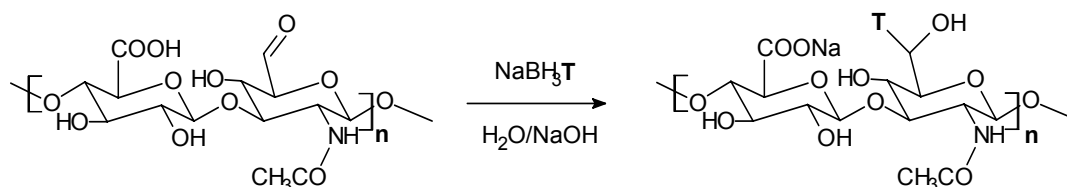
Pomocí aldehydu lze připojit na hyaluronan i oba reaktanty, které jsou využívány v tzv. „click chemistry“, to znamená vytvořit jak propargylový, tak i azidový derivát hyaluronanu, pomocí kterých lze snadno vytvořit příčnou vazbu mezi řetězci hyaluronanu. „Click“ reakce má celou řadu výhod, zejména snadnost provedení vlastní síťovací reakce. Její velkou nevýhodou je skutečnost, že tato reakce probíhá v přítomnosti měďnatých iontů a askorbátu, tedy látek, které prakticky vylučují její provedení v přítomnosti buněk (na rozdíl od předcházející reakce využívající tyrozínové deriváty).



Jiným derivátem, který byl připravován za pomoci reductivní aminace, je derivát hyaluronanu nesoucího cystein, cysteamin či podobnou thiolovou sloučeninu. Tyto sloučeniny se poměrně snadno v oxidační atmosféře (na vzduchu) spojují za vzniku disulfidických vazeb. Tohoto jevu lze využít jednak pro oxidativní reversibilní síťování thiolových derivátů hyaluronanu, jednak pro přípravu mukoadhezivních přípravků na bázi hyaluronanu. V obou těchto případech je však nutné vyřešit stabilizaci thiolových derivátů až do okamžiku sítěni či aplikace na sliznici nebo vyřešit systém pro generování thiolových derivátů těsně před reakcí, lépe v jejím průběhu. V současné době rozpracováváme koncept systému generování thiolových derivátů hyaluronanu v průběhu síťovací reakce.

Velmi zajímavá reakce vychází z aldehydu v poloze 6 N-acetylglukosaminu. Aldehyd lze redukovat borohydridem zpět na primární alkohol. Pokud je k redukci použit tritiový borohydrid, potom je přímo na uhlíku v poloze 6 navázáno tritium. Dochází tak ke specifickému

značení glukosaminu v hyaluronanu, navíc ke značení velmi stabilnímu, kde tritium není vyměnitelné ve vodném prostředí za vodík, jak by tomu bylo v případě tritia vázaného na kyslík hydroxyly nebo dusík aminoskupiny.



5 NANO A MIKROVLÁKNA Z HYALURONANU

Biopolymery mohou být zpracovány do různých forem. Jednou z nich jsou různé vláknenné struktury využitelné v celé řadě oblastí medicíny. Přitom se může jednat o vlákna s průměrem několika desítek až stovek nanometrů (nanovlákná) až po vlákna s průměrem stovek mikrometrů (mikrovlákná). Je samozřejmé, že vlákna, která se svým průměrem blíží rozměrům nadmolekulárních útvarů, které se vyskytují ve tkáních, najdou jiné uplatnění než vlákna mikronová, budou se jinak získávat, jinak zpracovávat a budou mít i jiné fyzikální i biologické vlastnosti než vlákna s mikronovými rozměry. Vzhledem ke specifickým a v podstatě těžko nahraditelným vlastnostem se předpokládá, že obě formy vláken sehrají významné specifické role jak v tkáňovém inženýrství, tak v regenerativní medicíně, tkáňových senzorech apod. Proto jsme se také věnovali vývoji vlastních postupů přípravy a manipulace s těmito vlákny a jejich finalizaci do podoby obchodovatelného finálního produktu.

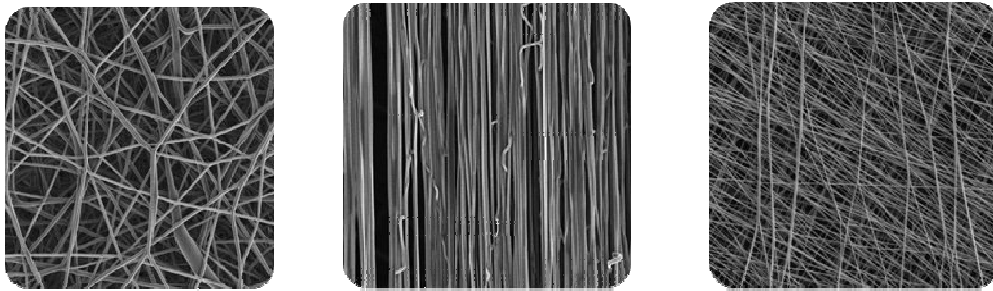
Nejčastěji jsou nanovlákná připravována pomocí tak zvaného elektrospinningu, tj. působením elektrického pole o velmi vysokém napětí (řádově desítek kV) na hladinu roztoku materiálu, z kterého má být vlákno vytaženo. Nejjednodušeji se to dá realizovat tak, že roztok biopolymeru je vytlačován z kapiláry, která tvoří jednu elektrodu, a kapka, která se na konci kapiláry tvoří, se působením elektrostatického pole přetváří do tzv. Taylorova kužele, z něhož po dosažení určitého napětí vystřeluje proud kapaliny směrem k opačně nabitě elektrodě. Ten se během letu mění ve svazek nanovláken. Během cesty mezi elektrodami musí dojít k odpaření rozpouštědla nebo alespoň jeho podstatné části, aby na elektrodu dopadlo již hotové vlákno a nemohlo docházet k jeho opětovnému rozpouštění ve zbytku neodpařeného rozpouštědla a vzniku různých poruch. Tvorbu nanovláken ovlivňuje celá řada parametrů, které můžeme rozdělit do tří skupin: jsou to vlastnosti roztoku, procesní podmínky a podmínky okolí. V této habilitační práci jsem se zabýval pouze vlastnostmi roztoků. Vlastnosti roztoku určuje jak vlastní rozpuštěná látka, tak i fyzikálně chemické parametry roztoku vlákněné látky. V případě rozpuštěné látky má velký vliv na to, zda se podaří z daného biopolymeru připravit vlákna a jaká bude jejich kvalita, zejména molekulová hmotnost biopolymeru, index polydispersity (distribuce molekulových hmotností), struktura biopolymeru a jeho koncentrace. Z fyzikálně chemických vlastností roztoku biopolymerů bych na prvním místě uvedl jeho viskozitu a dále vodivost a povrchové napětí spolu s vlastnostmi rozpouštědla. Přitom platí, že ne všechny zmíněné parametry mají stejnou váhu při tvorbě nanovláken, navíc většina z nich je navzájem závislá (např. viskozita roztoku je funkcí jak koncentrace, tak i molekulové hmotnosti polymeru). Přitom neexistuje obecná teorie, která by popsala souvislosti mezi jednotlivými parametry a výsledkem při vláknění. Pořád je zde velký prostor pro empirické zkoumání a hledání vhodných podmínek elektrospinningu [Tan 2005].

Elektrospinning vodných roztoků hyaluronanu je velmi obtížný. Hlavní překážkou úspěšného zvláknování je jeho neobvykle vysoká viskozita a povrchové napětí již u zředěných roztoků. Navíc silná schopnost hyaluronanu vázat vodu může vést ke slepení vzniklých vláken kvůli nedostatečnému odpaření vody jako rozpouštědla během letu vlákna k druhé elektrodě.

Vyvinuli jsme originální metody přípravy nanovláken jednak z nativního i chemicky modifikovaného hyaluronanu. To, že nanovláčka z hyaluronanu jsou mechanicky velmi nestálá, i když jsou deponovaná na podložku z pevného materiálu, nás vedlo k tomu, že jsme vyvinuli i směsná nanovláčka připravovaná ze směsi hyaluronanu s polyvinylalkoholem nebo polyethylenoxidem. Vedle hyaluronanu nás zajímaly i dva další polysacharidy s významnými imunomodulačními aktivitami, a to schizophyllan a glukomannan. Z obou dvou se nám podařilo připravit nanovláčka, která budou velmi dobře využitelná v přípravcích na hojení ran a popálenin. Vláknění všech tří polysacharidů probíhalo z vodně alkoholických roztoků biopolymerů nebo jejich směsí s dalším polymerem za neutrálního nebo mírně kyselého pH. V některých případech byla do vlákníciho roztoku přidávána farmakologicky akceptovatelná povrchově aktivní látka. Použití alkoholů a povrchově aktivní látky vedlo jednak ke snížení vysokého povrchového napětí roztoků polysacharidů a v případě alkoholů také ke zrychlení odpařování rozpouštědla během tvorby vlákna. Při použití tohoto rozpouštědlového systému nedochází ke slévání vláken, protože vlákno deponované na kolektor již není vlhké.

Obecně platí, že při klasickém uspořádání elektrospinningu vznikají nanovláčka, která jsou na kolektoru chaoticky uspořádána. Je to dáno principem a uspořádáním celého procesu elektrospinningu. Tak, jak roste intenzita elektrického pole, polokulovitý tvar kapky se mění na kuželovitý, vzniká Taylorův kužel, z kterého, jakmile napětí dosáhne kritické hodnoty a elektrostatické síly překonají povrchové napětí, vytryskne tenký nabitý pramínek roztoku. Na začátku je pramínek kapaliny rovný (stabilní), dál od elektrody se stává působením elektrických sil nestabilní a tvoří smyčky, spirály, rotuje a vlní se. Při tomto procesu se odpařuje rozpouštědlo a zůstává nabitě polymerní vlákno, respektive svazky nanovláken. Vláčka v nich se natahují a zužují a následně se náhodně ukládají na kolektor. Nepravidelné pohyby pramínku a posléze svazku nanovláken, jeho tvarová nestabilita jsou důležitými prvky elektrospinningu. Způsobují mechanické namáhání svazku nanovláken, jejich tzv. dloužení, které přispívá ke zlepšení mechanických vlastností. Náhodné uspořádání svazků nanovláken na kolektoru je nechtěnou daní za zlepšení jejich mechanických vlastností. Ve výsledku se totiž na kolektoru tvoří něco jako netkaná textilie. Takto vzniklá struktura je velmi vhodná pro filtrační účely, avšak nevhodná pro užití ve tkáňovém inženýrství. Náhodně uspořádaná vlákna vytváří velmi hustou síť, která je pro buňky neprostupná, a navíc, pokud by se i podařilo buňky do takového materiálu nasít, jenom těžko by přežily, protože by neměly dostatek prostoru kolem sebe. Navíc náhodně uspořádaná vlákna nedávají nanotextiliím dostatečnou mechanickou pevnost.

Pro potřeby tkáňového inženýrství je nutné umět řídit uspořádání vláken. Zlepší to mechanické vlastnosti svazků vláken, zejména pokud jsou vlákna paralelně uspořádána. Navíc, paralelně uspořádaná nanovláčka se mohou stát vodičem pro růst buněk, které je třeba orientovat směrově a ne náhodně (např. nervové buňky [Liu 2010]), a pro řízené deponování extracelulární matrix produkované pro určité speciální tkáň, jako jsou například různá ligamanta, cévy apod. [Han 2011, McMahon 2011]. Jejich pevnost v longitudinálním směru svazků vláken se výrazně zvýší. Možnost cíleně řídit depozici vláken také umožní vytvářet prostorové struktury s řízenou velikostí ok v 3 D prostoru i programovatelnou vzdáleností mezi jednotlivými vrstvami vláken.



Obrázek č. 1. Uspořádání nanovláken polyvinylalkoholu při použití standardního kolektoru (vlevo), nově vyvinutého kolektoru pro orientovaná vlákna (uprostřed). Nově vyvinutý kolektor umožňuje řídit směr vláken a vytvářet tak předem definované struktury (vpravo).

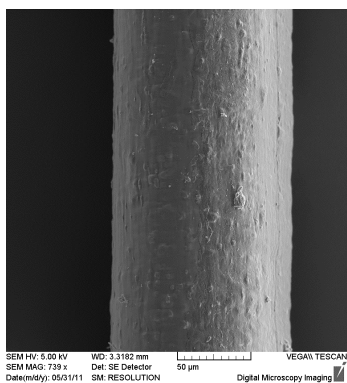
V současné době na trhu prakticky neexistuje zařízení, které by dovolovalo připravovat orientovaná vlákna s programovatelnou orientací, vzdáleností vrstev, velikostí kavit apod. Proto bylo třeba přikročit k vývoji takového zařízení v našich podmínkách.

V našich laboratořích byla vypracována teorie, na základě které byly konstruovány nové typy kolektorů, které umožňují přípravu paralelně orientovaných nanovláken a jejich další zpracování [Pokorný 2010, Pokorný 2011]. Použití nanovláken, i třeba paralelně uspořádaných, bude mít své limity a v některých oborech tkáňového inženýrství jim budou vyhrazeny jen určité speciální aplikace.

Mikrovlákna jsou další kategorií vláken, kterou jsme v holdingu studovali, zejména potom mikrovlákna vyrobená z hyaluronanu. Cílem je vyvinout mikrovlákna ve formě monofilu s průměrem vlákna v desítkách mikronů, která by byla textilně zpracovatelná do podoby nitě nebo příze, které by se využilo pro výrobu tkaniny, pleteniny nebo netkané textilie. Mikrovlákna jsou určena jednak pro přípravky na hojení externích, ale zejména interních ran, jako nosiče pro řízené uvolňování léků, separační a antiadhezivní materiály, sítky potřebné při různých chirurgických zákrocích, výplně nežádoucích dutin, pomůcky při anastomózách apod.

Mikrovlákna jsou vyvíjena jednak z nativního, jednak z chemicky modifikovaného hyaluronanu. To jim zabezpečuje celou řadu unikátních vlastností, jako je třeba regulovaná rozpustnost ve vodném prostředí, rychlost degradace tkáňovými enzymy, v případě silně hydrofobních derivátů hyaluronanu až nesmáčivost apod. Jejich nespornou výhodou je, že podle způsobu zpracování je možné vytvářet z nich plošné i prostorové struktury s různými mechanickými vlastnostmi (pružná pletenina, pevná tkanina), které navíc mohou být různě strukturované z pohledu obsahu aktivních látek i mechanických vlastností. Navíc vzhledem k tomu, že se nejedná o modifikaci hyaluronanu na karboxylové kyseliny, mohou být připravována vlákna nesoucí různé kovové i nekovové kationty.

V současné době je ukončen vývoj výroby vláken z nativního hyaluronanu, která mají vlastnosti podobné celulosovým vláknům, tj. pevnost v rozmezí 1,6 až 2,8 cN.dtex⁻¹. Tažnost vláken je menší než 10 %. Díky tomu, že vlákno je připraveno z čistého nativního hyaluronanu poměrně rychle, v řádu jednotek hodin, podléhá v tkáních degradaci. Textilie vyrobená z takového vlákna může sloužit jako nosič léků, antiadhezivní materiál apod. Vyvinutý monofil má průměr v desítkách až stovkách mikronů, a co je podstatné, monofil je textilně zpracovatelný do podoby nitě nebo příze, které jsou použitelné pro výrobu tkaniny, pleteniny nebo netkané textilie.



Obrázek č. 2. Elektronoptický snímek mikrovlákná z hyaluronanu a ukázka paličkovaného vzoru z tohoto vlákna

Mikrovlákná jsou určena pro přípravky na hojení interních ran, jako nosiče pro řízené uvolňování léků, separační a antiadhezivní materiály, sítky potřebné při různých chirurgických zákrocích, výplně nežádoucích dutin, pomůcky při anastomózách apod. Biodegradabilita vláken a tím pádem i textilních výrobků vyrobených z nich závisí na charakteru použitého hyaluronanu, vlákna z nativního hyaluronanu zmizí z organismu v řádu hodin, z hydrofobního hyaluronanu nebo síťovaného hyaluronanu v řádu dní až měsíců.

6 ZÁVĚR

Předložená habilitační práce prezentuje vybrané výsledky výzkumu a vývoje, který proběhl v posledních sedmi letech v oblasti hyaluronanu a jeho aplikací do tkáňového inženýrství ve výzkumném a vývojovém oddělení holdingu Contipro Group.

Výsledky lze hodnotit z různých pohledů. Vzhledem k tomu, že se jedná o podnikový výzkum, nestačí hodnotit výsledky pouze z pohledu přínosu ke stavu poznání, nýbrž také z pohledu přínosu pro podnik, jak navyšují intelektuální bohatství podniku a dále také jak jsou výsledky připraveny k realizaci v praxi, co se z nich podařilo zrealizovat nebo co se v nejbližší době realizovat bude.

6.1 HODNOCENÍ PŘÍNOSU KE STAVU POZNÁNÍ

Za významný lze hodnotit přínos k poznání vedlejších degradačních produktů po kyselé hydrolyze hyaluronanu. Tato problematika nebyla dosud ve vědecké literatuře řešena. Podařilo se vypracovat metodu separace pěti sloučenin, které reprezentují hlavní podíl vedlejších degradačních produktů, a určit jejich strukturu. U všech z nich se rovněž podařilo stanovit cytotoxicitu. Vypracovaná metoda sledování degradačních produktů bude aplikována na zkoumání degradačních produktů, které vznikají při degradaci ultrazvukem.

Štěpení ultrazvukem představuje zajímavou metodu degradace biopolymerů dosud málo průmyslově využívanou, zejména pro hyaluronan. I když při použití ultrazvuku se naráží na určité limity v molekulové hmotnosti, přesto tento postup slibuje zajímavé výsledky průmyslově využitelné.

Poněkud menší význam z pohledu poznání mají poznatky získané při zkoumání štěpení hyaluronanu pomocí mikrovlnného záření. Na základě provedených experimentů však byl vypracován průmyslový postup degradace hyaluronanu vedoucí až k velmi malým fragmentům, vyšším oligosacharidům, s molekulovou hmotností 5 kg/mol a vyšší.

Při zkoumání procesu degradace hyaluronanu se nám podařilo nashromáždit ohromné množství dat získaných při měření vnitřní viskozity hyaluronanu s různou molekulovou hmotností. To nám umožnilo dokázat, že vynesení závislosti vnitřní viskozity na molekulové hmotnosti v logaritmických škálách vede k tvorbě křivky a nikoli přímky. Zakřivená vynesení jsou typická pro větvené polymery. Proto jsme se snažili rozpracovat myšlenku, že hyaluronan je větvený biopolymer. Dosud bylo na hyaluronan nazíráno striktně jako na lineární biopolymer, který již z principu své tvorby nemůže být větven. Je velmi lákavé objasnit, co vlastně způsobuje zakřivení při logaritmickém vynesení vnitřní viskozity hyaluronanu proti molové hmotnosti. V současné době se rozbíhá projekt, ve kterém zkoumáme konformery hyaluronanu na straně jedné a hledáme rozvětvení v hyaluronanu na straně druhé.

V případě zkoumání chemické modifikace biopolymerů, tj. připojení ligandu na molekulu biopolymeru, nelze očekávat vytvoření zásadně nového poznání. Chemie funkčních skupin, zejména pokud se jedná o primární nebo sekundární hydroxylové skupiny a karboxylovou skupinu, je hodně prozkoumaná a jen ve zcela výjimečných případech lze očekávat objevení nových reakcí. Proto hlavní přínos bádání v oblasti modifikace biopolymerů se děje v aplikaci již známých reakcí na daný biopolymer za podmínek, které jsou pro něj vhodné.

Zkoumání síťovacích reakcí poskytuje více možností pro vytvoření zásadně nového poznání, objevení dosud nepoužívané reakce. I když pravděpodobnost vytvoření nového poznání je v tomto případě větší, nadále zůstává hlavní přínos zkoumání síťovacích reakcí v aplikaci již známých reakcí na biopolymer a podmínky, za kterých se musí síťovací reakce uskutečnit. Jedná se zejména o síťovací reakce prováděné in situ ve tkáních, reakce v přítomnosti buněk apod.

V případě reakcí, které byly popsány v této habilitační práci, jsme dosáhli největšího vkladu ke stavu poznání při studiu esterifikací hydroxylových skupin hyaluronanu směsnými anhydridy a při studiu specifické oxidace primární hydroxylové skupiny na aldehyd a jeho následné reduktivní

aminaci, při které vzniká sekundární amin. Obě reakce jsou pro hyaluronan původní, obě umožňují zavedení celé palety substituentů a obě jsou proveditelné za podmínek, které jsou pro hyaluronan a většinu ligandů, které přicházejí v úvahu, vhodné. Porovnáme-li biologickou odolnost vazeb, vidíme, že zatímco esterová vazba je biologicky labilní, sekundární amin naopak představuje biologicky velmi stálou sloučeninu. To znamená, že do stejného místa na molekule hyaluronanu lze vázat stejné ligandy jak biologicky méně, tak výrazně pevněji. V obou případech zůstává volná karboxylová skupina hyaluronanu, to znamená, že biologická aktivita hyaluronanu je lépe zachována než u jeho derivátů s modifikovaným karboxylem. Navíc použití směsných anhydridů dovoluje připravit ligandy pro vazbu na hyaluronan poměrně jednoduchou a snadno proveditelnou reakcí ze všech organických kyselin, které z principu mohou směsný anhydrid vytvořit. To významně rozšiřuje paletu látek, které lze touto reakcí na hyaluronan připojit v porovnání s dosud nejčastěji používaným derivátem organických kyselin, jako je symetrický anhydrid nebo chlorid kyseliny.

Použití alkyl halogenidů nebo alkyl dihalogenidů jako esterifikačních činidel podobně jako způsob přípravy substituovaných amidů hyaluronanu prostřednictvím reakce karboxylu hyaluronanu s ethylchlorformiátem jsou pro hyaluronan nově popsané reakce. I v tomto případě se jedná o reakce, kterými lze navázat prakticky stejné ligandy na stejné místo v hyaluronanu vazbami, které se diametrálně liší svou biologickou stabilitou. Na rozdíl od výše uvedených typů reakcí tyto zapojují do tvorby derivátů karboxyl hyaluronanu a tím mohou podstatně měnit jeho biologickou aktivitu.

Zcela originální reakcí je způsob velmi stálého radioaktivního značení hyaluronanu tritiem. V této reakci se vychází z aldehydu vytvořeného specifickou oxidací primární hydroxylové skupiny N-acetylglukosaminu. Ten je tritiováným borohydridem redukován zpět na primární alkohol. To znamená, že značený hyaluronan není chemicky pozměněn. Tritium je vázáno přímo na uhlík v poloze 6, značení je specifické, velmi stabilní, tritium není vyměnitelné ve vodném prostředí za vodík, jak by tomu bylo v případě tritia vázaného na kyslík hydroxyly nebo dusík aminoskupiny.

Použití DTPA jako síťovacího agens, bylo popsáno poprvé námi a lze ho tak považovat za skutečný přínos k poznání.

Vzhledem k počtu publikací popisujících přípravu nanovláken z hyaluronanu je každý příspěvek v zásadě možné považovat za podstatný přínos ke stavu poznání, protože žádná z těchto prací není doplňováním nebo rozvíjením již popsaného. Byl vypracován postup, který vede k tvorbě nanovláken z hyaluronanu za podstatně přijatelnějších podmínek, než které byly dosud popisovány v literatuře

Tvorba směsných vláken zejména s polyvinylalkoholem je významným přínosem ke stavu poznání. Zcela originální je popis podmínek pro tvorbu nanovláken z dalších dvou biologicky významných polysacharidů, a to schizophyllanu a glukomannanu. Zejména tvorba vláken z glukomannanu je i z teoretického hlediska poměrně zajímavá, protože glukomannan má dosti nízkou molekulovou hmotnost, která například v případě hyaluronanu k tvorbě nanovláken nestačí.

Mezi významné příspěvky ke stavu poznání lze řadit i teoretický článek rozebírající podstatu sil ovlivňujících způsob uspořádání nanovláken na kolektoru. Z něho se vyšlo při konstrukci nových a originálních typů kolektorů, které umožňují paralelní uspořádání, resp. řízené uspořádání nanovláken obecně.

Stejně výrazný je i náš přínos ke stavu poznání v oblasti mikrovláken připravovaných z hyaluronanu. V případě nativního hyaluronanu nebyla dosud popsána příprava textilně použitelných mikrovláken, přičemž tato se zdají být velmi slibná pro přípravu různých tkaných či netkaných textilií a pletenin velmi dobře využitelných jak v prostředcích na hojení ran, tak v přípravcích pro tkáňové inženýrství nebo jako nosiče léků či jiných biologicky aktivních sloučenin, např. v kosmetice.

Významný je i přínos k poznání formování mikrovláken z hydrofobizovaného hyaluronanu či hyaluronanu oxidovaného na aldehyd v poloze 6 glukosaminu a síťovaného dihydrazidem kyseliny adipové.

6.2 NAVÝŠENÍ INTELEKTUÁLNÍHO BOHATSTVÍ PODNIKU

Intelektuální bohatství podniku je nejlépe poměřovat jedinečností používaných surovin či postupů nebo jedinečností jeho výstupů či jejich aplikací. Podnik proto, aby mohl bezproblémově fungovat, potřebuje mít své nástroje, vstupy i výstupy chráněny patenty, a pokud to z nějakých důvodů nelze udělat, musí být schopny takové nástroje spolehlivě utajit.

Naše postupy používané k přípravě fragmentů hyaluronanu jsou pro přípravu fragmentů hyaluronanu s molekulovou hmotností vyšší než 6 kg/mol patentově chráněné. Pro přípravu oligosacharidů jsme vytvořili postup, který není patentově chráněn pro nevyhovitelnost ochrany, je pouze utajován. To znamená, že v oblasti výroby fragmentů hyaluronanu máme svoje know-how, své nástroje, které nám dovolí vyrábět tyto produkty bez toho, že bychom byli ohrožováni konkurencí z pohledu překračování cizí patentové ochrany.

Pro přípravu derivátů hyaluronanu jsme vytvořili čtyři originální nástroje, které nám umožní připojit jeden a tentýž ligand na dvě odlišná místa v molekule hyaluronanu dvěma typy vazeb z pohledu biologické stability. Těmito nástroji lze připojit na hyaluronan téměř libovolný ligand, který může sloužit jak ke změně fyzikálních vlastností jednotlivých molekul, tak k tvorbě třírozměrných struktur nebo k připojení biologicky aktivní nízkomolekulární látky, peptidu či bílkoviny. Všechny tyto postupy jsou patentovány. Další patenty, např. patent chránící značení hyaluronanu tritiem při využití aldehydu v poloze 6 glukosaminu nebo patent popisující přípravu thiolového derivátu hyaluronanu, jsou v přípravě.

Ze síťovacích reakcí pouze jednu je možné počítat do intelektuálního bohatství firmy. Je to reakce využívající DTPA k síťování hyaluronanu. Ostatní používané reakce buď nelze patentovat, nebo k patentové ochraně teprve spějí.

V případě nanovláken z hyaluronanu patří k firemnímu intelektuálnímu bohatství jak patenty chránící postupy přípravy nanovláken jako takových, tak zařízení, které je schopné připravit orientovaná nanovlákná. Zejména potom patent, který chrání konstrukci zařízení pro přípravu orientovaných nanovláken a další tři, které se pro stroj na výrobu nanovláken připravují, vytvářejí dostatečnou ochranu před konkurencí v těchto oblastech.

Mikrovlákná z hyaluronanu jsou v současné době doménou naší firmy. Patent, který chrání přípravu mikrovláken z nativního hyaluronanu, je pouze prvním z řady. Několik dalších se připravuje (další jsou např. příprava a užití staplových vláken z nativního hyaluronanu a dalších polysacharidů, příprava vláken z hydrofobizovaných hyaluronanu). Všechny tyto patenty bezesporu patří do intelektuálního bohatství firmy a budou dostatečnou ochranou nově se rozvíjejícího odvětví aplikací hyaluronanu.

Můžeme shrnout, že celkem bylo za posledních pět let v oblasti výzkumu a vývoje fragmentů hyaluronanu, jeho chemických modifikací a tvorby nano a mikrovláken a zařízení sloužících k jejich výrobě podáno deset přihlášek vynálezů, z nichž některé již byly uznány za patent, jiné jsou v procesu uznávání.

6.3 VYUŽÍVÁNÍ INTELEKTUÁLNÍHO BOHATSTVÍ FIRMY

Každé bohatství, pokud není využíváno, je pouze zbytečným shromaždištěm promarněných šancí. Stejně tak tomu je i v případě intelektuálního bohatství firmy. Není-li využíváno, je pouze zbytečně vynaloženým nákladem. V následující tabulce je přehled výrobků, které se podařilo zrealizovat nebo které do konce roku 2012 realizovány budou.

Oblast výzkumu a vývoje	Komerční název produktu	Stručný popis produktu	Uvedeno na trh, připravuje se
Fragmenty	OligoHyaFerre	Směs fragmentů hyaluronanu, surovina pro kosmetiku	Uveden na trh v roce 2009
	Verela	Hyaluronan s velmi nízkou molekulovou hmotností pro farmacii	Připravuje se pro rok 2012
	Oligosacharidy hyaluronanu	Chromatograficky čisté oligosacharidy hyaluronanu HA4 až HA8, laboratorní chemikálie	Uvedeny na trh v roce 2010
Chemické deriváty hyaluronanu	Tenneliderm	Hyaluronan hydrofobizovaný zbytkem hexanové kyseliny, surovina pro kosmetiku	Uveden na trh v roce 2009
	není stanoven	Hyaluronan hydrofobizovaný zbytky vyšších mastných kyselin, surovina pro přípravu vláken a nosičů	Část bude uvedena do konce roku 2011, část se připravuje pro rok 2012
Nano a mikrovlákna	není stanoven	Mikrovlákna na bázi nativního hyaluronanu a hydrofobizovaného hyaluronanu, surovina pro přípravu textilií z nativního hyaluronanu	Připravuje se pro rok 2012
	není stanoven	Laboratorní zařízení pro tvorbu nanovláken se čtyřmi kolektory a čtyřmi emitory	Připravuje se pro rok 2012

7 POUŽITÁ LITERATURA

- Allison D.D. and Grande-Allen K.J.: Hyaluronan: A Powerful Tissue Engineering Tool, *Tiss Eng*, 2006, 12, 2131-2140
- Almond A.: Hyaluronan, *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64, 1591-1596
- Bezáková Z., Hermannová M., Dřimalová E., Malovíková A., Ebringerová A. and Velebný V.: Effect of microwave irradiation on the molecular and structural properties of hyaluronan, *Carbohydr Polym*, 2008, 73, 640-646
- Dřimalová E., Velebný V., Sasinková V., Hromádková Z. and Ebringerová A.: *Carbohydr Polym* 2005, 61, 420-426
- Girish K.S. and Kemparaju K.: The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview, *Life Sci*, 2007, 80, 1921-1943
- Han J., Lazarovici P., Pomerantz C., Chemn X., Wei Y. and Lelkes P.: Co-Electrospun Blends of PLGA, Gelatin, and Elastin as Potential Nonthrombogenic Scaffolds for Vascular Tissue Engineering, *Biomacromolecules* 2011, 12, 399–408
- Huerta-Angeles G., Šmejkalová D., Chládková D., Ehlová T., Buffa R. and Velebný V.: Synthesis of highly substituted amide hyaluronan derivatives with tailored degree of substitution and their crosslinking via click chemistry, *Carbohydr Polym* 2011, 84, 1293-1300
- Itano N.: Simple Primary Structure, Complex Turnover Regulation and Multiple Roles of Hyaluronan, *J Biochem*, 2008, 144, 131-137
- Jiang D, Liang J. and Noble P.W.: Hyaluronan as an Immune Regulator in Human Diseases, *Physiol Rev*, 2011, 91, 221-264
- Kakizaki I., Ibori N., Kojima K., Yamaguchi M. and Endo M.: Mechanism for the hydrolysis of hyaluronan oligosaccharides by bovine testicular hyaluronidase, *FEBS J*, 2010, 277, 1776–1786
- Lee A., Grummer S.E., Kriegel D. and Marmur E.: Hyaluronidase, *Dermatol Surg*, 2010, 36, 1071–1077
- Liu X., Chen J., Gilmore K.J., Higgins M.J., Liu Y. and Wallace G.G.: Guidance of neurite outgrowth on aligned electrospun polypyrrole/poly(styrene-b-isobutylene-b-styrene) fiber platforms, *J Biomed Mater Res* 2010, 94A, 1004–1011
- McMahon R.E., Qu X., Jimenez-Vergara A.C., Bashur C.A., Guelcher S.A., Goldstein A.S. and Hahn M.: Hydrogel–Electrospun Mesh Composites for Coronary Artery Bypass Grafts, *Tiss Eng, Part C*, 2011, 17, 451-461
- Mlčochová P., Bystrický S., Steiner B., Machová E., Kooš M, Velebný V. and Krčmář M.: Synthesis and characterization of new biodegradable hyaluronan alkyl derivatives, *Biopolymers*, 2006, 82, 74-79
- Nečas J., Bartošíková L., Brauner P. and Kolář J.: Hyaluronic acid (hyaluronan): a review, *Veterinarní Medicína*, 2008; 53, 397–411
- Podzimek S., Hermannová M., Bilerová H., Bezáková Z. and Velebný V.: Solution properties of hyaluronic acid and comparison of SEC-MALS-VIS data with off-line capillary viscometry, *J Appl Polym Sci*, 2010, 116, 3013-3020
- Pokorný M., Niedoba K. and Velebný V.: Transversal electrostatic strength of patterned collector affecting alignment of electrospun nanofibers *Appl Phys Lett* 2010, 96, 193111

- Pokorný M. and Velebný V.: Collection methods for extra aligned nanofibers deposited by electrospinning, *Rev Sci Instrum*, 2011, 82, 055112
- Puré E. and Assoian R.K.: Rheostatic signalling by CD44 and hyaluronan, *Cell Sign*, 2009, 21, 651-655
- Stern R., Kogan G., Jedrzejewski M.J. and Šoltés L.: The many ways to cleave hyaluronan, *Biotechnol Adv*, 2007, 25, 537-557
- Stern R., Asari A.A. and Sugahara K.N.: Hyaluronan fragments: An information-rich system, *Eur J Cell Biol*, 2006, 85, 699-715
- Svanovský E.: Fyziologie a farmakologie kyseliny hyaluronové; *Čes Slov Farm*, 2007, 56, 264-268
- Tan S.H., Inai R., Kotaki M. and Ramakrishna S.: Systematic parameters study for ultrafine fibre fabrication via electrospinning process, *Polymer* 2005, 46, 6128-6140
- Tokita Z. and Okamoto A.: Hydrolytic degradation of hyaluronic acid, *Polym Degrad Stabil*, 1995, 48, 269-273
- Toole B.P.: Hyaluronan – CD 44 interaction in cancer: Paradoxes and possibilities, *Clin Cancer Res* 2009, 15, 7462-7468

ABSTRACT

This habilitation thesis summarizes the results of research and development from 2005 to 2011 in selected areas of tissue engineering. The results obtained are summed up in seven journal publications with an average impact factor of 2.206, a manuscript, and 10 patent applications or patents already granted. The results presented explore and demonstrate the application of hyaluronan and its derivatives in tissue engineering over three different stages. The first is the preparation of fragments of hyaluronan as a suitable starting material for tissue engineering. The second stage is the chemical modification of those fragments. In the third stage, the use of native and chemically modified hyaluronan in the preparation of microfibrils and nanofibrils is demonstrated.

Hyaluronan with a molecular weight that is too heavy is not suitable for chemical modification as the solutions exhibit a high viscosity and it is difficult to control the uniformity of modification along the polymer chain. Therefore, we studied processes for the preparation of hyaluronan fragments by industrially usable methods; we also separated and analysed the most important degradation products emerging after the acid hydrolysis of hyaluronan. We discovered that degradation in the solid phase can be used, in view of the formation of secondary degradation products, for the preparation of fragments with a molecular weight of greater than 450 kg/mol. Degradation does not take place hydrolytically; rather, β -elimination occurs, and a double bond appears between carbon atoms 4 and 5 of the pyranose ring in glucuronic acid, which is on the non-reducing end of the fragment. In the case of both acid and alkaline hydrolysis of hyaluronan, we concentrated on finding conditions suitable for the formation of fragments of the required molecular weight. A procedure was developed for hyaluronan degradation in an acidic environment (pH 3.0), leading to very small fragments with a molecular weight of up to 5 kg/mol. The solution may be heated with microwave radiation, which, compared to conventional heating, accelerates degradation. Ultrasonic hyaluronan degradation provides different results and probably takes place by means of a somewhat different mechanism than acid hydrolysis. Ultrasonic fragmentation without the presence of oxidizing agents takes place only up to a certain molecular weight limit (approximately 100 kg/mol). In the presence of an oxidizing agent (hypochlorite), hyaluronan fragmentation is accelerated and the limit value of the molecular weight obtained from degradation is reduced. We investigated the secondary degradation products resulting from the acid hydrolysis of hyaluronan. Five main fractions of secondary degradation products were found, the structure of which was determined. The results showed that, after prolonged exposure of hyaluronan to an acidic environment by boiling, approximately 0.7% of high-molecular hyaluronan is degraded into furan derivatives and 0.2% into cyclopentanone derivatives. Most degradation products inhibit the growth of keratinocytes and fibroblasts, but can be removed by ultrafiltration via a 2 kDa cut-off membrane. We also found that, compared to the molecular weight logarithm, the intrinsic viscosity logarithm follows not linear, but curved, plotting, which is typical of branched polymers. Hyaluronan is synthesized as a linear non-branched polymer; this discrepancy has thus far been interpreted in literature as a consequence of the existence of different conformers in its solutions. In our opinion, it is possible that hyaluronan is branched during the fermentation or purification process by random reactions.

The chemical modification of hyaluronan facilitates the binding of various ligands to hyaluronan and, in the event that ligands can be merged with each other by subsequent chemical reaction, the preparation of three-dimensional structures, i.e. hydrogels. Our research in this area was guided by a desire for originality in the procedure and by efforts to develop procedures that would bond ligands to hyaluronan by bonds variously resistant to tissue enzymes. Biologically, the ester bond is the most labile; the carbamate bond is more stable. A derivative where the ligand is bound by an ether bond or, alternatively, in the form of a secondary amine or a substituted amide of the carboxyl group is virtually non-degradable. Original reactions providing all of the above

types of bonds were developed. An ester bond combined with a mixed anhydride was used to attach acyl chains of varying length to hyaluronan, thus facilitating the preparation of hyaluronan able to create micelle-like structures and bind through hydrophobic interactions water-insoluble substances. We also used an ester bond to attach DTPA (diethylene triamine pentaacetic acid) to hyaluronan; this substance, in the form of salt with gadolinium, is used for MRI imaging and for neutron capture therapy. We also found that DTPA can very effectively form cross-links between chains of hyaluronan. Esters were also prepared by means of an original procedure using agents of the general formula R - X or X - R - X, where R may be an aliphatic, cycloaliphatic, olefinic, arylaliphatic or heterocyclic variously substituted residue and X a halide from the group of chlorine, bromine and iodine. Where a monohalogen derivative reaction (R - X) occurs, only esters are formed. If dihalogen derivatives (X - R - X) are used, cross-links between chains of hyaluronan are formed. A very stable hyaluronan derivative is substituted amides prepared using a hyaluronan carboxyl group in an original procedure where, by a reaction between ethyl chloroformate and hyaluronan carboxyl, a "mixed hyaluronan anhydride" is prepared that, by reacting with primary amines, forms a substituted amide. The original procedure we developed for the formation of secondary amines entails the oxidation of a primary hydroxyl group of N-acetylglucosamine into aldehyde, which can react with a variety of functional groups, and, in the case of tissue engineering, with a primary amino group. The reaction results in imine, a volatile compound that can be converted to a stable secondary amine via reduction. Interesting ligands linked by this bond to hyaluronan include derivatives of tyramine or 5-hydroxyindole, which can be enzymatically oxidized to form three-dimensional hydrogels in situ. Aldehyde can be used to attach to hyaluronan both reactants, as used in "click chemistry", i.e. to create both a propargyl and azide derivative of hyaluronan, through which a cross-link can easily be formed between hyaluronan chains bearing individual reaction partners. Another derivative, prepared by reductive amination from aldehyde, is a hyaluronan derivative bearing cysteamine. These hyaluronan derivatives are relatively easy to combine in an oxidizing atmosphere (air) to form disulphide bonds. This can be used for the oxidative reversible cross-linking of thiol hyaluronan derivatives. Aldehyde can be reduced by tritiated borohydride back to primary alcohol; tritium is bound directly on the carbon in position 6. This leads to the – very stable – specific marking of glucosamine in hyaluronan.

We developed an original method for the preparation of nanofibres from both native hyaluronan and a mixture of hyaluronan with polyvinyl alcohol or polyethylene oxide, and nanofibres from schizophyllan and glucomannan. Fibrillation took place using solutions of biopolymers or their mixtures with another biopolymer at neutral or slightly acidic pH, where the solvent is a mixture of water and a suitable alcohol, and where appropriate a smaller addition of pharmacologically acceptable surfactant. This solvent system does not result in the removal of fibres because the fibre deposited on the collector is no longer wet. Generally, in the classical electrospinning arrangement, nanofibres are formed which are chaotically arranged on the collector. As a result, something like a non-woven fabric is formed on the collector. This structure is quite unsuitable for use in tissue engineering. Randomly arranged fibres could be suitable if they grow on the surface of nanofabrics. What is more, randomly arranged fibres do not provide nanofabrics with adequate mechanical strength. Parallel-arranged nanofibres resolve the problems of nanofabric mechanical strength, and can also become a conductor for cell growth, in which respect the cells should be oriented directionally, with an extracellular matrix for controlled depositing. In our laboratories, a theory has been developed which formed the basis for the design of new types of collectors facilitating the preparation of parallel-oriented nanofibres and their further processing. The use of nanofibres, whether or not parallel-arranged, will have limits, and in some areas of tissue engineering these nanofibres will be reserved for certain special applications. A second fibre category which we addressed intensively comprised microfibrils prepared from native and chemically modified hyaluronan. The monofilament developed had a diameter of tens to hundreds

of microns, and, importantly, the monofilament was workable as a fabric into the form of a thread or yarn usable in the manufacture of fabric, knitted material or non-woven textiles. Microfibres are intended for internal wound healing products, as carriers for controlled drug release, separating and anti-adhesive materials, nets needed for various surgery, the filling of unwanted cavities, aids in anastomoses, etc. In the case of fibres from native hyaluronan, the strength ranges from 1.6 to 2.8 cN.dtex⁻¹ with ductibility of more than 10%. The biodegradability of fibres and thus of textile products made from them depends on the nature of the hyaluronan used; fibres made from native hyaluronan disappear from the body within hours, while fibres made from hydrophobic hyaluronan or cross-linked hyaluronan take days or months to disappear.