

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

**Význam a stanovení kyseliny sialové v lidském organismu**  
Bakalářská práce

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Veronika Vališová**  
Osobní číslo: **C17133**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**  
Téma práce: **Význam a stanovení kyseliny sialové v lidském organismu**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování

1. Provedte literární rešerši zabývající se významem a stanovením kyseliny sialové v lidském organismu. Vysvětlete její vlastnosti, funkci a význam. Zaměřte se na různé metody stanovení a jejich využití v praxi.
2. Závěry kriticky zhodnoťte a porovnejte metody stanovení z hlediska citlivosti, přesnosti, náročnosti, příp. dalších aspektů.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Petra Bajerová, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

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

V Pardubicích dne 28. února 2020

**Prohlašuji:**

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

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

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

V Pardubicích dne 11. 6. 2020

Veronika Vališová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala paní doc. Ing. Petře Bajerové, Ph.D. za pomoc, ochotu a cenné rady při psaní bakalářské práce. Též děkuji své rodině, přátelům a blízkým za podporu nejen během vypracovávání této bakalářské práce, ale i během celého studia.

## **ANOTACE**

Tato práce se zabývá významem a funkcí kyseliny sialové v lidském organismu. Zaměřuje se na její stanovení různými metodami v různých biologických materiálech, jejich analytickými parametry, náročností metod a využitelností v praxi k diagnostice genetických chorob spojených s ukládáním kyseliny sialové, zánětů či rakoviny.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

kyselina sialová, imunita, biomarker, kapalinová chromatografie, spektrofotometrie, SERS, biosenzor

## **TITLE**

Importance and determination of sialic acid in human organism

## **ANNOTATION**

This thesis deals with importance and function of sialic acid in human organism. It focuses on determination of sialic acid in different biological materials, its analytical parameters, difficulty of these methods and practical utilization for diagnosis of genetics diseases connected with storage of sialic acid, inflammation or cancer.

## **KEYWORDS**

sialic acid, immunity, biomarker, liquid chromatography, spectrophotometry, SERS, biosensor

# OBSAH

|  |    |
|--|----|
| SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....                                      | 9  |
| SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK .....  | 10 |
| ÚVOD .....   | 12 |
| 1 CHARAKTERISTIKA SIALOVÝCH KYSELIN .....                            | 13 |
| 1.1 Historie objevu.....   | 13 |
| 1.2 Základní popis sialových kyselin.....                            | 13 |
| 1.3 Vymezení pojmu .....   | 15 |
| 2 FYZIKÁLNÍ A CHEMICKÉ VLASTNOSTI .....                              | 16 |
| 2.1 Referenční hodnoty.....  | 17 |
| 3 METABOLISMUS.....  | 18 |
| 3.1 Biosyntéza.....  | 18 |
| 3.2 Aktivace a tvorba sialoglykokonjugátů .....                      | 18 |
| 3.3 Reutilizace .....  | 19 |
| 4 FORMY KYSELINY SIALOVÉ V ORGANISMU.....                            | 20 |
| 4.1 Kyselina sialová vázaná v glykoproteinech.....                   | 20 |
| 4.2 Kyselina sialová vázaná v gangliosidech.....                     | 21 |
| 4.3 Volná forma kyseliny sialové.....                                | 21 |
| 5 CHOROBY SPOJENÉ S VOLNOU KYSELINOU SIALOVOU .....                  | 22 |
| 5.1 Lysozomální akumulace volné kyseliny sialové.....                | 22 |
| 5.1.1 Nemoc Salla.....   | 22 |
| 5.1.2 Infantilní forma nemoci z ukládání volné kyseliny sialové..... | 22 |
| 5.2 Sialidóza.....   | 22 |
| 5.2.1 Sialidóza typu I.....  | 23 |
| 5.2.2 Sialidóza typu II .....  | 23 |
| 6 VÝZNAM A FUNKCE.....   | 24 |
| 6.1 Ochranná funkce .....  | 24 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 6.2   | Interakce s patogeny .....  | 24 |
| 6.2.1 | Viry .....  | 24 |
| 6.2.2 | Bakterie.....   | 25 |
| 6.3   | Role kyseliny sialové v imunitě.....  | 25 |
| 6.3.1 | Dendritické buňky .....   | 25 |
| 6.3.2 | Sialyl-Lewis antigeny.....  | 25 |
| 6.4   | Funkce kyseliny sialové jako součást gangliosidů .....                                  | 26 |
| 6.5   | Potenciální biomarker .....   | 26 |
| 6.5.1 | Definice biomarkeru .....   | 26 |
| 6.5.2 | Biomarker zánětlivých procesů .....   | 26 |
| 6.5.3 | Tumormarker .....   | 27 |
| 7     | STANOVENÍ KYSELINY SIALOVÉ .....  | 28 |
| 7.1   | Úprava vzorku.....  | 28 |
| 7.2   | Kapalinová chromatografie.....  | 29 |
| 7.2.1 | Stanovení pomocí kapalinové chromatografie s tandemovým hmotnostním spektrometrem ..... | 29 |
| 7.2.2 | Stanovení pomocí kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí .....                | 29 |
| 7.3   | Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie .....  | 31 |
| 7.4   | Spektrofotometrické stanovení .....   | 31 |
| 7.5   | Elektrochemické metody .....  | 32 |
| 7.5.1 | Potenciometrické stanovení.....   | 33 |
| 7.5.2 | Amperometrické stanovení.....   | 33 |
| 7.5.3 | Impedimetrický cytosenzor .....   | 34 |
| 7.6   | Porovnání metod stanovení kyseliny sialové.....   | 35 |
|       | ZÁVĚR.....  | 40 |
|       | POUŽITÁ LITERATURA .....  | 41 |



## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Obrázek 1:  | Krystaly kyseliny sialové. Převzato z [1].  | 13 |
| Obrázek 2:  | Strukturní vzorec kyseliny neuraminové. Převzato z [7].   | 14 |
| Obrázek 3:  | Strukturní vzorce a funkční skupiny nejdůležitějších sialových kyselin. Převzato z [10].  | 15 |
| Obrázek 4:  | Strukturní vzorec kyseliny <i>N</i> -acetylneuraminové. Převzato a upraveno z [9].  | 16 |
| Obrázek 5:  | Metabolismus kyseliny <i>N</i> -acetylneuraminové. Převzato a upraveno z [14].  | 18 |
| Obrázek 6:  | Diverzita umístění kyseliny sialové. Převzato a upraveno z [28].  | 20 |
| Obrázek 7:  | Příklad struktury gangliosidu. Převzato z [32].   | 21 |
| Obrázek 8:  | Červená oční skvrna. Převzato z [40].   | 23 |
| Obrázek 9:  | Výrazné rysy obličeje u sialidózy typu II. Převzato z [42].   | 23 |
| Obrázek 10: | Strukturní vzorce analogů kyseliny sialové obsažených v léčivech Oseltamivir a Zanamivir. Převzato a upraveno z [47].               | 25 |
| Obrázek 11: | Schéma postupu analýzy se systémem LOV. Převzato z [24].  | 30 |
| Obrázek 12: | Dispergované zlaté nanočástice. Převzato z [77].  | 32 |
| Obrázek 13: | Agregované zlaté nanočástice - vytvořený cyklický ester. Převzato z [77].   | 32 |
| Obrázek 14: | Vzorec části vzniklého esteru po reakci kyseliny sialové s kyselinou 3-aminofenylboronovou. Převzato z [77].                        | 32 |
| Obrázek 15: | Průtokový systém s enzymatickým reaktorem a amperometrickou detekcí. Převzato z [80].   | 34 |
| Tabulka 1:  | Přehled základních fyzikálních a chemických vlastností kyseliny <i>N</i> -acetylneuraminové. Převzato a upraveno z [9, 17, 18, 19]. | 16 |
| Tabulka 2:  | Fyziologické hodnoty koncentrace kyseliny sialové v lidském organismu. Převzato a upraveno z [22, 23, 24].                          | 17 |
| Tabulka 3:  | Číselně vyjádřená preciznost, výtěžnost a citlivost jednotlivých metod (část 1.).   | 36 |
| Tabulka 4:  | Číselně vyjádřená preciznost, výtěžnost a citlivost jednotlivých metod (část 2.).   | 37 |

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

|             |   |
|-------------|---|
| 3-APBA      | 3-aminofenylboronová kyselina   |
| AFP         | alfa-fetoprotein  |
| CA 125      | karbohydrátový (tumorový) antigen 125   |
| CA 19-9     | karbohydrátový (tumorový) antigen 19-9  |
| CEA         | karcinoembryonální antigen  |
| CMP-Neu5Ac  | cytidin 5'-monofosfo- <i>N</i> -acetylneuraminová kyselina                          |
| DBCEEC      | 2-[2-(7 <i>H</i> -dibenzo[ <i>a,g</i> ]karbazol-7-yl)ethoxy] ethyl karbonylhydrazin |
| DBD-PZ      | 4-( <i>N,N</i> -dimethylsulfamoyl)-7-piperazino-benzofurazan                        |
| DMB         | 1,2-diamino-4,5-methylendioxybenzen   |
| ERGO        | elektrodepozicí redukováný oxid grafenu   |
| FSA         | volná kyselina sialová  |
| FSH         | folikulostimulační hormon   |
| GlcNAc      | <i>N</i> -acetylglukosamin  |
| GM1         | monosialotetrahexosylgangliosid   |
| HA          | hemaglutinin chřipky typu A   |
| hCG         | lidský choriogonadotropin   |
| HE-4        | lidský epididymální protein 4   |
| HPLC-FLD    | vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenčním detektorem                  |
| HPLC-MS/MS  | vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovým hmotnostním spektrometrem       |
| ISSD        | infantilní forma nemoci z ukládání volné kyseliny sialové                           |
| ITO         | oxid india a cínu   |
| KDN         | deaminoneuraminová kyselina   |
| LASA        | kyselina sialová vázaná na lipidy (též s lipidy asociovaná kyselina sialová)        |
| LH          | luteinizační hormon   |
| LOD         | mez detekce   |
| LOQ         | mez stanovitelnosti   |
| ManNAc      | <i>N</i> -acetylmannosamin  |
| Man-NAc-6-P | <i>N</i> -acetylmannosamin-6-fosfát   |
| MPBA        | 4-merkaptofenylboronová kyselina  |
| NANP        | <i>N</i> -acylneuraminát-9-fosfatáza  |

|             |   |
|-------------|---|
| Neu5Ac      | <i>N</i> -acetylneuraminová kyselina  |
| Neu5Gc      | <i>N</i> -glykolyneuraminová kyselina   |
| PABA        | poly(anilinboronová kyselina)   |
| PSA         | prostatický specifický antigen  |
| RNA         | ribonukleová kyselina   |
| SERS        | povrchem zesílená Ramanova spektroskopie  |
| SIGLEC      | lektin imunoglobulinového typu vázající kyselinu sialovou                         |
| SKE         | nasyčená kalomelová elektroda   |
| TSA         | celková kyselina sialová  |
| UFLC-MS/MS  | ultrarychlá kapalinová chromatografie s tandemovým hmotnostním spektrometrem      |
| UHPLC-MS/MS | ultravysokotlaká kapalinová chromatografie s tandemovým hmotnostním spektrometrem |
| UDP         | uridin difosfát   |
| μ-LC-LIF    | mikrokolonová chromatografie s laserem indukovanou fluorescencí                   |

## ÚVOD

Kyselina sialová je jednotný název pro několik derivátů kyseliny neuraminové, v užším slova smyslu – v klinické biochemii – se tímto názvem označuje sialová kyselina v našem organismu nejrozšířenější, a sice kyselina *N*-acetylneuraminová. Představuje významnou součást buněčných membrán a ovlivňuje buněčné funkce.

Cílem této bakalářské práce je seznámit s pojmem kyselina sialová jako takovým a zejména s výše zmíněnou kyselinou *N*-acetylneuraminovou. Důraz bude kladen na její význam a stanovení. Bakalářská práce je pomyslně rozdělena na část teoretickou a část, ve které budou popsány metody stanovení kyseliny sialové.

V teoretické části bude představen a ujasněn pojem kyselina sialová, také historie objevu kyseliny, názvosloví a chemická struktura. Následně bude objasněn význam kyseliny sialové v lidském těle a její funkce. Též budou zmíněny genetické choroby spojené s ukládáním volné kyseliny sialové.

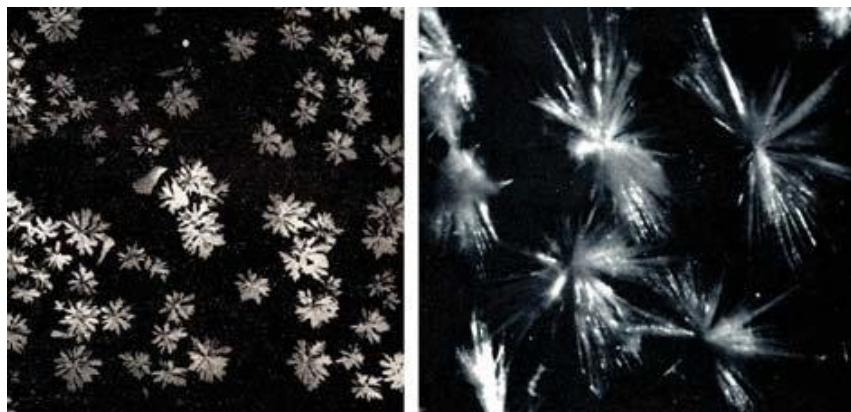
Důležitou součástí představuje kapitola zabývající se stanovením kyseliny sialové, kde budou probrány možnosti a způsoby stanovení kyseliny *N*-acetylneuraminové, přesnost a citlivost metod, jejich výhody a nevýhody a případné využití v praxi.

# 1 CHARAKTERISTIKA SIALOVÝCH KYSELIN

## 1.1 Historie objevu

Kyselina sialová byla objevena švédským biochemikem Gunnarem Blixem v roce 1936. Ten izoloval z mucinu submaxilární slinné žlázy hovězího dobytka krystalickou sloučeninu, která byla později pojmenována jako kyselina sialová (z řeckého slova *sialon*, neboli slina) [1, 2]. Mucin je látka nacházející se mj. ve slinách a je tvořena glykoproteiny [3].

Blix se zajímal o složení mucinu obsaženého ve slinách, přičemž v té době bylo známo, že mucin obsahuje sacharidy hexosaminy. Jakmile byl ve vodě nerozpustný submaxilární mucin zahřát na 100 °C v jeho izoelektrickém bodě, materiál se rozpustil a po frakcionaci části rozpustné v methanolu s méně polárními rozpouštědly se posléze v nádobce objevily kolonie krystalů kyseliny sialové viz obrázek 1 [1].

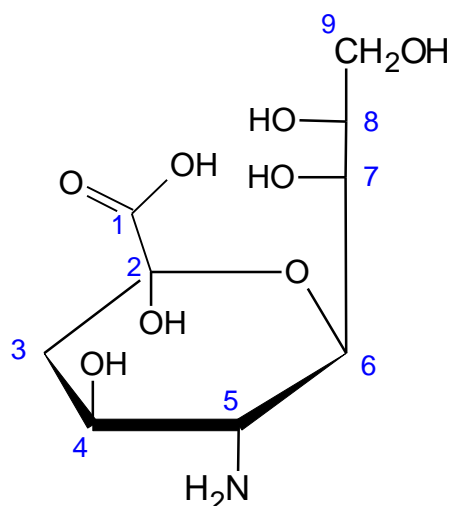


Obrázek 1: Krystaly kyseliny sialové. Převzato z [1].

Nezávisle na sobě byla kyselina sialová o 5 let později také izolována německým biochemikem Ernstem Klenkem z mozkových gangliosidů. Proto také vznikl název kyselina *neuraminová* – byla získána z *nervového* systému [4].

## 1.2 Základní popis sialových kyselin

Kyseliny sialové jsou cukernaté kyseliny, nacházející se v buňkách téměř všech obratlovců a v některých mikroorganismech [5]. Tímto triviálním názvem je označováno nejméně 50 derivátů kyseliny neuraminové (5-amino-3,5-dideoxy-D-glycero-nonulosonové), jejíž strukturní vzorec je zobrazen na obrázku 2 [6].



Obrázek 2: Strukturální vzorec kyseliny neuraminové. Převzato z [7].

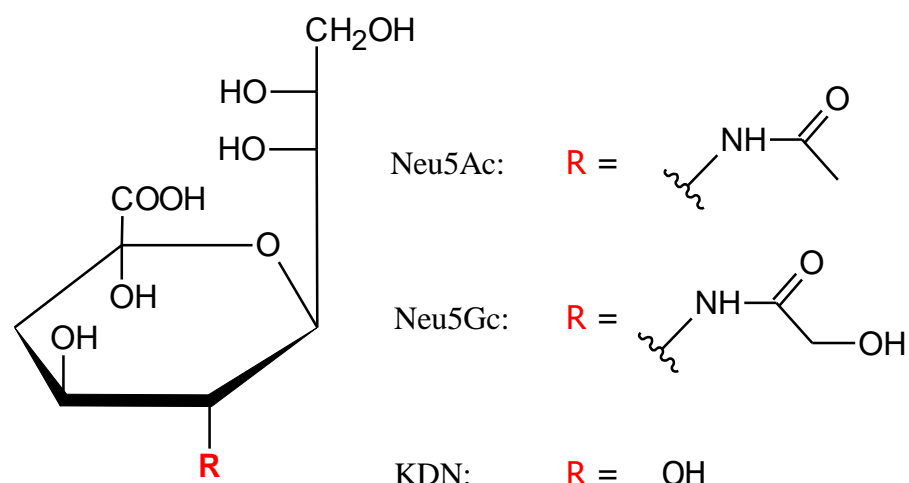
Kyselina neuraminová vzniká kondenzací kyseliny pyrohroznové a *N*-acetylmannosaminu. Nejvýznamnější v přírodě jsou její *N*- a *O*- substituované deriváty [7].

Kyseliny sialové se liší různými substituenty na amino- a hydroxyl- skupinách [8]. Tato skupina kyselin sdílí charakteristickou devítiuhlíkatou kostru se zbytkem karboxylové kyseliny, který je navázán na uhlíku 2, kde se nachází centrum anomeru, viz obrázek 2. Amino skupina na uhlíku 5 je převážně modifikována na *N*-acetyl či *N*-glykolylyl. Na postranní uhlíkatý řetězec se mohou navázat acetylové, fosfátové, sulfátové či metylové zbytky [5].

Kyseliny sialové jsou důležitou součástí glykoproteinů, gangliosidů, glykosaminoglykanů a mucinů a s nadsázkou řečeno, pokrývají povrch buněk, účastní se buněčného rozpoznávání a intracelulární signalizace [6, 9].

Kyseliny sialové jsou převážně vázány na galaktózu v řetězci glykanů přes vazbu  $\alpha(2-3)$ - ,  $\alpha(2-6)$ - , nebo  $\alpha(2-8)$ - [10].

Nejvýznamnější kyseliny sialové jsou *N*-acetylneuraminová kyselina (Neu5Ac), *N*-glykolylyneuraminová kyselina (Neu5Gc) a deaminoneuraminová kyselina (KDN), které se liší různými funkčními skupinami, jak je zobrazeno na obrázku 3 [10].



Obrázek 3: Strukturní vzorce a funkční skupiny nejdůležitějších sialových kyselin. Převzato z [10].

V průběhu evoluce došlo ke ztrátě schopnosti syntézy kyseliny *N*-glykolylnauraminové u lidí v důsledku delece exonu v genu CMAH, který kóduje CMP-Neu5Ac hydroxylázu (hydroxylací kyseliny *N*-acetylneuraminové totiž vzniká kyselina *N*-glykolylnauraminová) [11].

Nicméně, *N*-glykolylnauraminovou kyselinu lze do organismu dostat z potravy, zejm. červeného masa a kyselina je pak metabolicky inkorporována do glykokonjugátů. Glykany obsahující navázanou *N*-glykolylnauraminovou kyselinu se pak mohou chovat jako xenoautoantigeny. V organismu se vyskytují anti-Neu5Gc protilátky a při kontaktu se zmíněným antigenem mohou způsobit zánětlivou reakci nazývanou xenosialitida, která může vést až k rakovině [12, 13].

### 1.3 Vymezení pojmu

Jako kyselina sialová, resp. kyseliny sialové se mohou označovat všechny deriváty kyseliny neuraminové. V užším slova smyslu nazýváme triviálním názvem **kyselina sialová** kyselinu ***N*-acetylneuraminovou**, neboť ta je v našem těle nejrozšířenější [14].

V této bakalářské práci je proto pojmem kyselina sialová myšlena právě kyselina *N*-acetylneuraminová.

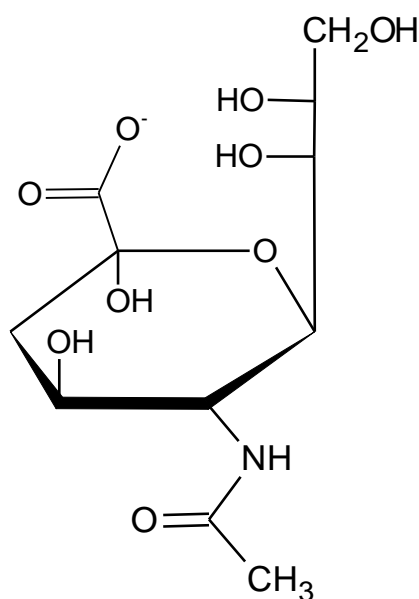
## 2 FYZIKÁLNÍ A CHEMICKÉ VLASTNOSTI

Kyselina sialová je relativně silná kyselina (má pKa 2,6) a proto podléhá hydrolyze [15]. Její čistá forma má vzhled bílého prášku [16]. Krystalizuje při 5 °C v roztoku vody a kyseliny octové v poměru 0,8:12 [9]. Další fyzikální a chemické vlastnosti kyseliny sialové jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Přehled základních fyzikálních a chemických vlastností kyseliny *N*-acetylneuraminové. Převzato a upraveno z [9, 17, 18, 19].

|  |   |
|--|---|
| Molekulový vzorec  | C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>9</sub> |
| Molekulová hmotnost  | 309,273 g/mol                                   |
| Bod tuhnutí  | 156 °C  |
| Bod tání   | 180–182 °C                                      |
| Bod varu   | 186 °C  |
| Hustota (při 25 °C)  | 1,2983 g/cm <sup>3</sup>                        |
| pKa  | 2,6   |
| Specifická optická otáčivost [ $\alpha$ ] <sup>20</sup> <sub>D</sub> | -33,1   |

Kyselina sialová je hydrofilní, záporně nabitá kyselina. Na obrázku 4 je vzorec kyseliny *N*-acetylneuraminové s vyznačeným záporným nábojem na karboxylovém zbytku. Hydrofilita a záporný náboj jsou vlastnosti významné pro mnoho procesů, kterých se tato kyselina účastní [20].



Obrázek 4: Strukturální vzorec kyseliny *N*-acetylneuraminové. Převzato a upraveno z [9].

Negativní náboj kupříkladu způsobuje, že se erythrocyty, které obsahují vysoké množství



kyseliny sialové na svém povrchu, nepřichytí na cévní endotelium, jenž má na svém povrchu též velké množství záporně nabitých kyseliny sialové. Vznikne tedy elektrická repulze a erytrocyty mohou cévou volně cirkulovat [21].

## 2.1 Referenční hodnoty

Pro rozlišení patologického a normálního stavu je důležité stanovit referenční hodnoty koncentrace kyseliny sialové v biologických tekutinách. V tabulce 2 jsou uvedeny přibližné fyziologické koncentrace volné (FSA) a celkové (TSA) kyseliny sialové.

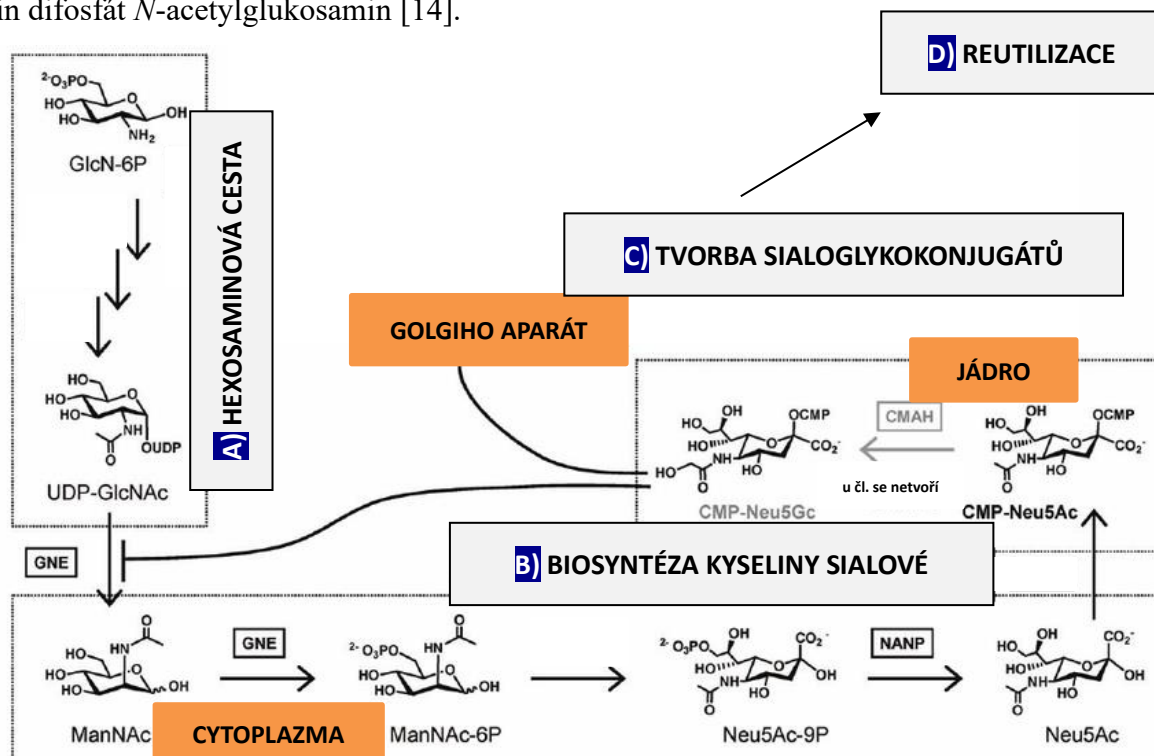
Tabulka 2: Fyziologické hodnoty koncentrace kyseliny sialové v lidském organismu. Převzato a upraveno z [22, 23, 24].

|                         | Forma kyseliny sialové |                        |             |                        |
|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------|------------------------|
|                         | FSA                    |                        | TSA         |                        |
| Sérum/plazma            | 1–3                    | μmol/l                 | 1,36–3,40   | mmol/l                 |
| Sliny                   | 17,1 ± 12,1            | μmol/l                 | 9,7–22,1    | mmol/l                 |
| Moč                     | 2,5–8,6                | mmol/mol<br>kreatininu | 31          | mmol/mol<br>kreatininu |
| Moč<br>(děti do 1 roku) | 32,2–45                | mmol/mol<br>kreatininu | 100,5–156,4 | mmol/mol<br>kreatininu |
| Mozkomišní<br>mok       | 11,9 ± 7,1             | μmol/l                 | -           |                        |
| Mateřské<br>mléko       | 32,4                   | μmol/l                 | 0,2–2,28    | mmol/l                 |

## 3 METABOLISMUS

### 3.1 Biosyntéza

Proces začíná hexosaminovou cestou (A, obrázek 5), kdy z glukosamin-6-fosfátu vzniká uridin difosfát *N*-acetylglukosamin [14].



Obrázek 5: Metabolismus kyseliny *N*-acetylneuraminové. Převzato a upraveno z [14].

Dále syntéza probíhá v cytosolu buňky (B, obrázek 5). Gen GNE kóduje enzym glukosamin (UDP-*N*-acetyl)-2-epimerázu/*N*-acetylmannosamin kinázu a dojde k odtrhnutí uridin difosfátové části z UDP-GlcNAc spolu se změnou konformace *N*-acetylglukosaminu (GlcNAc) na *N*-acetylmannosamin (ManNAc). *N*-acetylmannosamin je následně fosforylován na *N*-acetylmannosamin-6-fosfát (Man-NAc-6-P) [25, 26]. Kondenzací ManNAc-6-P s fosfoenolpyruvátem vzniká Neu5Ac-9-fosfát, který je defosforylován pomocí specifické fosfatázy, jenž kóduje gen NANP a konečně vzniká volná *N*-acetylneuraminová kyselina [27].

### 3.2 Aktivace a tvorba sialoglykokonjugátů

Aby byla volná kyselina sialová zakomponována do glykanů, je nutné, aby se nejprve v jádru aktivovala na CMP-Neu5Ac, jakožto nukleotidový donor, za katalýzy CMP-Neu5Ac syntázy. CMP-Neu5Ac se navrátí zpět do cytoplazmy (cytosolu) a poté do lumenu Golgiho aparátu pomocí specifického antiportu (C, obrázek 5) [27].

Aktivovaná forma kyseliny sialové se váže na terminální sacharidy glykosfingolipidů

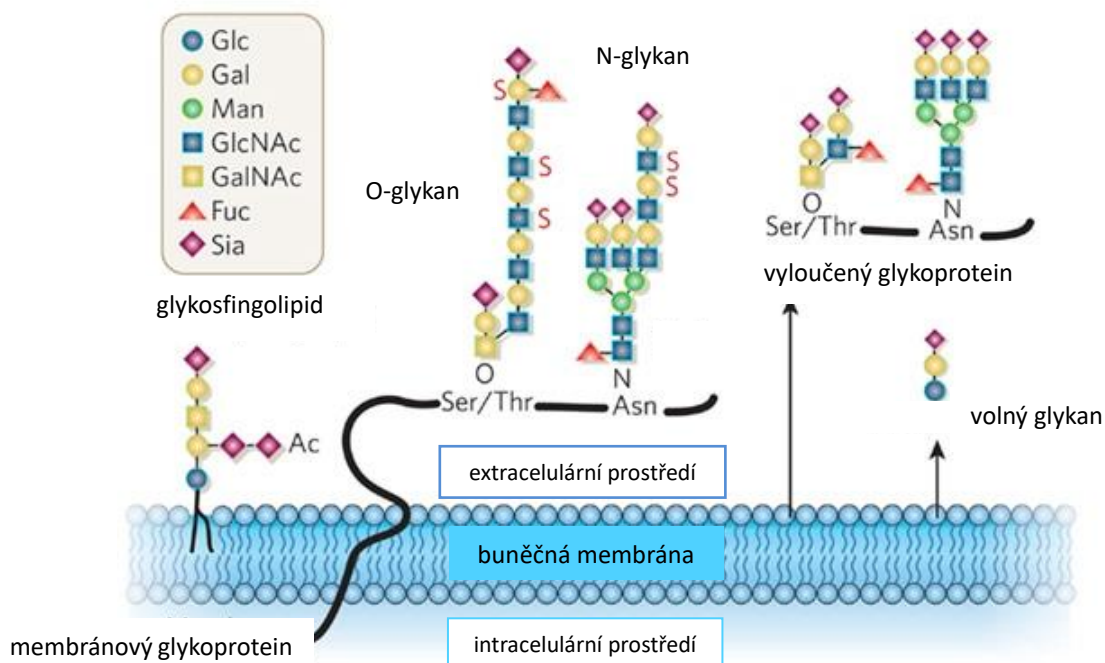
nebo glykoproteinů přes  $\alpha$ 2,3-,  $\alpha$ 2,6- nebo  $\alpha$ 2,8- konce (vazby) za pomoci až 20 různých sialyltransferáz. Každá sialyltransferáza má svou specifitu a váže kyselinu sialovou na konkrétní část molekuly [14].

### 3.3 Reutilizace

Pomocí specifických enzymů sialidáz (neuraminidázy) je z glykokonjugátů kyselina sialová odštěpena, děje se tak v lysozomech (D, obrázek 5). Dále je volná kyselina sialová navrácena zpět do cytoplazmy pomocí exporteru s názvem sialin a je buď znovu využita k tvorbě sialoglykokonjugátů, nebo je degradována za katalýzy specifické pyruvát lyázy, která rozštěpí kyselinu *N*-acetylneuraminovou na *N*-acetylmannosamin a pyruvát [27].

## 4 FORMY KYSELINY SIALOVÉ V ORGANISMU

Kyselina sialová se nachází na konci sacharidových řetězců v glykoproteinech a glykolipidech (gangliosidech), jak můžeme vidět na obrázku 6 (růžový kosočtverec):



Obrázek 6: Diverzita umístění kyseliny sialové. Převzato a upraveno z [28].

### 4.1 Kyselina sialová vázaná v glykoproteinech

Glykoproteiny jsou konjugované proteiny obsahující jeden a více sacharidů kovalentně navázané na protein, přičemž se sacharidy neopakují sériově. Počet vázaných sacharidů se velmi liší. Sacharidová část obsahuje obvykle kolem 12–15 cukerných zbytků. Sacharidy jsou na protein vázány: a) *N*-glykosidovou vazbou (na asparagin); b) *O*-glykosidovou vazbou (na serin či threonin); c) *O*-glykosidovou vazbou vazbou na 5-hydroxylysin [29].

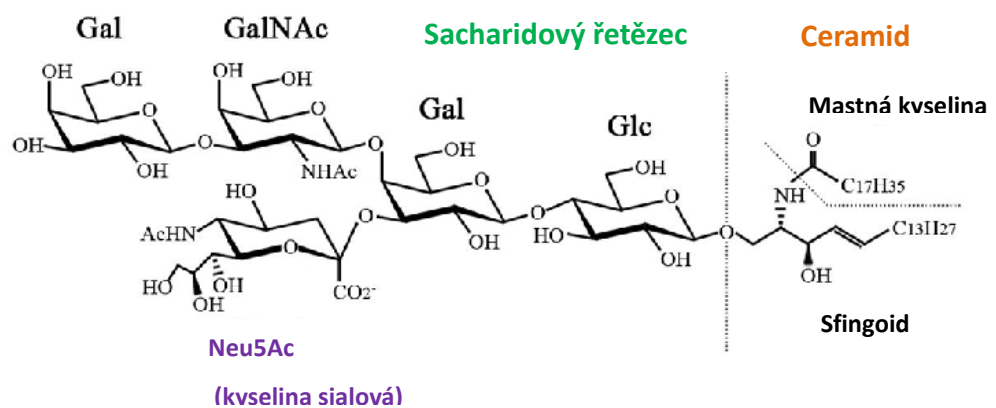
Kyselina sialová se váže glykosidickou vazbou na hydroxylovou skupinu na uhlíku 3 nebo 6 galaktózy nebo na hydroxylovou skupinu na uhlíku 6 *N*-acetylglukosaminu či *N*-acetylgalaktosaminu [30].

Glykoproteiny se nacházející v membránách buněk, kde ovlivňují funkci buněk, jsou součástí hlenů, které chrání tkáň. Některé glykoproteiny jsou i důležité hormony (FSH, LH, ...) a plazmatické proteiny (protrombin, plasminogen, imunoglobuliny, ...) [29].

## 4.2 Kyselina sialová vázaná v gangliosidech

Gangliosidy jsou glykosfingolipidy obsažené v gangliích centrálního nervového systému převážně na nervových zakončeních. Vyznačují se zvýšeným obsahem kyseliny sialové (až polovina celkového množství kyseliny sialové v organismu je právě v gangliosidech) [29].

Vzorový příklad struktury gangliosidu je uveden na obrázku 7. Tvoří je ceramid (hydrofobní část) zabudovaný do lipidové dvojvrstvy na buněčné membráně a sacharidový řetězec (hydrofilní část) složený z několika monosacharidů a kyseliny sialové, který vyčnívá z povrchu buňky. Z celkového množství lipidů v mozkové tkáni tvoří gangliosidy cca 6 %. Mimo mozkovou tkáň je najdeme v podstatě ve všech tkáních [31].



Obrázek 7: Příklad struktury gangliosidu. Převzato z [32].

## 4.3 Volná forma kyseliny sialové

Volná kyselina sialová se v organismu objevuje během posledního kroku metabolismu kyseliny sialové, kdy dochází k jejímu odštěpení z glykanového řetězce v určitém životním stadiu této molekuly. Poté může dojít buď k její degradaci na *N*-acetyl-mannosamin a pyruvát nebo k jejímu znovuvyužití a zabudování do jiného glykanového řetězce [27].

Při genetické poruše může dojít k jejímu nadměrnému ukládání, což má za následek rozsáhle zdravotní obtíže v podobě neprospívání, mentální retardace, četných změn ve tvaru obličeje až po malformace kostí [33, 34].

## 5 CHOROBY SPOJENÉ S VOLNOU KYSELINOU SIALOVOU

### 5.1 Lysozomální akumulace volné kyseliny sialové

Existují dva druhy této choroby: nemoc Salla (podle města ve Finsku, kde byla poprvé popsána) a ISSD (Infantile Sialic acid Storage Disease), neboli infantilní forma této nemoci [33].

Tyto vzácné autozomálně recesivní choroby jsou způsobeny hromaděním *N*-acetylneuraminové kyseliny v lysozomech. Vznikají mutací genu *SLC17A5*, který kóduje sialin, membránový protein transportující volnou kyselinu sialovou z lysozomu po jejím odštěpení ze sialoglykokonjugátů, které podléhají degradaci [34, 35].

Společnými symptomy těchto nemocí jsou poruchy v rozvoji intelektu, svalová hypotonie, špatné prospívání, záchvaty či malformace kostí [35].

Nemoci jsou rozpoznány podle zvýšeného množství volné kyseliny sialové v moči (např. pomocí kapalinové chromatografie). U lysozomální akumulace volné kyseliny sialové je zvýšená volná kyselina sialová v moči, kdežto u sialidózy je zvýšená vázaná kyselina sialová [35].

#### 5.1.1 Nemoc Salla

Nemoc je rozpoznána mezi 6. až 12. měsícem vývoje, neboť po narození ještě nejsou vidět klinické příznaky. U pacientů se objevuje nízký svalový tonus (svalová hypotonie), porucha koordinace pohybů (ataxie), objevuje se i nystagmus (rychlý pohyb očí probíhající mimovolně a rytmicky [36]) a záchvaty. Motorický vývoj je opožděn (např. chodit začnou děti průměrně až ve 4 letech) stejně jako je opožděn růst. Obvod hlavy je v normálu, hepatosplenomegalie se neobjevuje. Kognitivní schopnosti jsou silně narušeny [35].

#### 5.1.2 Infantilní forma nemoci z ukládání volné kyseliny sialové

Tato forma choroby lysozomální akumulace kyseliny sialové je nejvíce závažná, projevuje se již v prenatálním věku či bezprostředně po narození. Objevuje se psychomotorická retardace, otoky břicha z důvodu zadržování tekutiny, *dysostosis multiplex*, u plodu se objevuje *hydrops fetalis* a tekutina v dutině břišní. Délka života je velmi krátká [37].

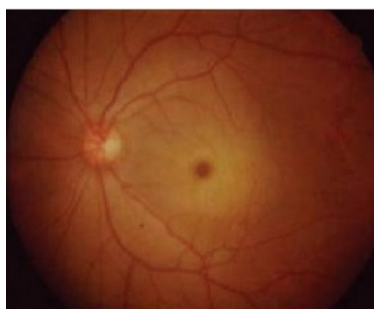
### 5.2 Sialidóza

Sialidóza, neboli mukopolidóza typu 1, je autozomálně recesivní onemocnění opět spojené s ukládáním v lysozomech, které je způsobeno defektem v genu, který kóduje neuraminidázu, enzym štěpící vazbu mezi kyselinou sialovou a glykolipidem či glykoproteinem.

Chorobu rozdělujeme do dvou typů. Sialidóza typu I se objevuje později a má mírnější průběh, kdežto sialidóza typu II je vážnější a objevuje se již v mladistvém věku [38].

### 5.2.1 Sialidóza typu I

Mezi symptomy této lehčí formy sialidózy patří mozková ataxie, neboli porucha hybnosti a koordinace pohybů, epilepsie, záškuby svalů a typická třešňově červená skvrna na očním pozadí, resp. makule (žlutá skvrna) viz obrázek 8 [39].



Obrázek 8: Červená oční skvrna. Převzato z [40].

Pacient může trpět i hypotonií, nastygmem, poruchou řeči a vidění [39]. Symptomy nemoci se rozvinou v pubertálním věku až dvacátém roku života. Často pacient skončí na vozíčku, kvůli poruchám pohybu. Inteligence, stejně jako délka života není touto chorobou ovlivněna. [41]

### 5.2.2 Sialidóza typu II

Typ II je mnohem závažnější a způsobuje nápadné symptomy, jako hepatosplenomegálie, poruchy ve vývoji kostí, výrazné rysy obličeje, zvětšený jazyk a nosní dírky orientované dopředu viz obrázek 9 [39].



Obrázek 9: Výrazné rysy obličeje u sialidózy typu II. Převzato z [42].

Objevuje se šedý zákal, myoklonus, hypotonie, kardiomyopatie. Pacient je mentálně retardovaný [39]. Nemoc se rozvíjí buď ještě před narozením a dítě se často narodí mrtvé, nebo zemře brzy po porodu. Může se objevit i během prvního roku života, či později v dětském věku. Čím později se tato forma objeví, tím jsou symptomy mírnější, nicméně hlavní znaky zůstávají a délka života se odvíjí jak od závažnosti symptomů, tak od doby prvních projevů [41].

## 6 VÝZNAM A FUNKCE

### 6.1 Ochranná funkce

Kyselina sialová je součástí glykoproteinu mucinu, který se nachází na povrchu dýchacích cest, v gastrointestinálním a urogenitálním traktu. Tvoří ochrannou bariéru tkání a zajišťuje hydrataci díky zápornému náboji a schopnosti vázat vodu. Sialoglykany vytváří na mucinech (a ostatních glykoproteinech) rozšířené polypeptidové konfigurace, které by se bez glykosylace zhroutily. Seskupení sialoglykanů podél polypeptidového řetězce může chránit protein před proteázami. Vysoké množství sialoglykanů vázaných na membránu buněk zajišťuje záporný náboj povrchu buňky, který funguje jako bariéra a reguluje funkce povrchu buňky [43]. Koncentrace kyseliny v glykokalyxu buňky může dosáhnout až 100 mmol/l [44].

### 6.2 Interakce s patogeny

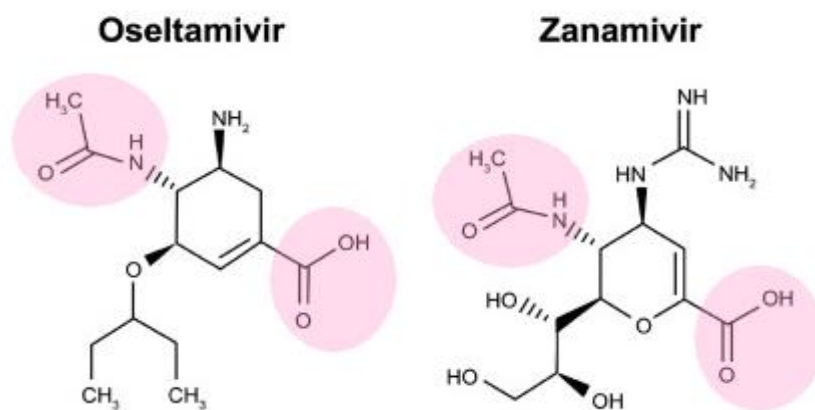
#### 6.2.1 Viry

Vzhledem ke své poloze na povrchu buněk, resp. na samém konci glykokonjugátů, se kyselina sialová účastní mezi prvními klíčové interakce s různými patogeny, kupříkladu viry. Je známo mnoho virů, které se vážou na kyselinu sialovou hostitele přes hemagglutinin a svými enzymy způsobují změnu kyseliny sialové na buňce. Např. enzymy sialidázy (neuraminidázy) z glykokonjugátů odstraňují kyselinu sialovou, nebo esterázy, které odštěpují estericky navázanou acetyl skupinu [45].

U běžného chřipkového viru proběhne navázání přes antigen (hemagglutinin) na receptor buňky hostitele, tedy kyselinu sialovou. Hemagglutinin HA je rozštěpen na složky HA1 a HA2 (dimer), dále se ukládá jako trimer. Následně, po adsorpci na receptor, se virus pomocí endocytózy vpraví do endozomu. Virus poté ztratí svůj obal a transportuje se do jádra, kde započne transkripce RNA viru [46].

Léky proti chřipce, např. Oseltamivir či Zanamivir fungují právě na principu inhibitorů neuraminidáz. V podstatě napodobují přirozený substrát neuraminidázy, jsou to analogy kyseliny sialové, které však mají vyšší afinitu k enzymu neuraminidáza a naváží se na něj. Na obrázku 10 jsou jejich strukturální vzorce. Růžově jsou označeny funkční skupiny kyseliny sialové. Tímto způsobem zabrání štěpení buněčné kyseliny sialové a virus se tak nedostane do buňky [47].





Obrázek 10: Strukturální vzorce analogů kyseliny sialové obsažených v léčivech Oseltamivir a Zanamivir. Převzato a upraveno z [47].

## 6.2.2 Bakterie

Bakterie obsahují na svém povrchu látky nazývané adheziny, molekuly, kterými lze zprostředkovat adhezi. Bylo nalezeno několik Gram-pozitivních i negativních bakterií, které využívaly jako ligandy sialované glykokonjugáty. Bakterie též obsahují lektiny, skupinu proteinů, která váže sacharidy [30, 48].

## 6.3 Role kyseliny sialové v imunitě

### 6.3.1 Dendritické buňky

Dendritické buňky vznikají z monocytů diferenciací. Zprostředkovávají spojení mezi nespecifickou a specifickou imunitou. Nachází se zejm. na místech, kde organismus interaguje s okolím, jako např. kůže nebo sliznice pokrývající trávicí trakt nebo dýchací cesty, avšak najdeme je v malém množství téměř ve všech orgánech [49].

Mají funkci rozpoznávací, kdy rozpoznají antigen a předají o něm informaci sekundárním lymfatickým orgánům, např. T buňkám [50].

Na těchto imunitních buňkách, konkrétně navázaných např. na protein neuropilin, se nachází polymerní forma kyseliny sialové zvaná polysialová kyselina, která formuje interakce s jinými buňkami [44].

### 6.3.2 Sialyl-Lewis antigeny

Kyselina sialová tvoří jednu z hlavních součástí oligosacharidové struktury, která se nazývá sialyl-Lewis antigen. V hojném množství se nachází na povrchu leukocytů a tvoří ho čtyři k sobě charakteristicky vázané sacharidy, popořadě: kyselina sialová, galaktóza, *N*-acetylglukosamin a fukóza. Sialyl-Lewis antigen je ligandem pro lektin s názvem P-selektin.

Tímto způsobem vazby se kupříkladu zprostředkovává kontakt mezi buňkami endotelu cévní stěny a leukocyty v krvi [51].

## **6.4 Funkce kyseliny sialové jako součást gangliosidů**

Gangliosidy hrají důležitou roli v buněčném rozpoznávání, pohyblivosti, adhezi a růstu, též se významně podílí na regulaci funkce iontového kanálu a signalizace receptoru. Jsou důležité v přenosu a ukládání informací do paměti, díky interakcím mezi vápníkem a membránovými proteiny [52]. V nervových buňkách též působí jako ligandy stability myelinu a podílí se svou účastí na regeneraci nervů. V oblastech Ranvierových zářezů a v presynaptických nervových zakončeních se jich nachází nejvíce [31].

Příkladem gangliosidu může být např. GM1. Za jeho negativní náboj může vděčit kyselině sialové, které rovněž zvyšuje hydrofilicitu sacharidového řetězce [53]. Zároveň se účastní synaptogeneze a neurotransmise [15].

## **6.5 Potenciální biomarker**

### **6.5.1 Definice biomarkeru**

Termín biomarker označuje znak či látku, které mohou být přesně a reprodukovatelně změřeny. Množství biomarkeru vyjadřuje stav nějakého biologického procesu (nemoci, rakoviny, zánětu...). Příkladem biomarkeru mohou být např. výsledky krevních testů, ale i krevní tlak či puls [54].

Velký význam biomarkerů je v diagnostice rakoviny, kde tyto nádorové biomarkery indikují přítomnost rakoviny nebo lze pomocí nich sledovat její průběh. Též lze pomocí nádorových markerů predikovat rozvoj nádoru a využít je ke včasnému screeningu rakoviny u rizikových osob (rakovina v rodině, alkoholici, osoby trpící obezitou, ...) [55].

Příklady nádorových markerů jsou např. CA 19-9, CA 125, CEA, AFP, PSA, hCG, HE-4, ferritin a jiné. Biomarkery, resp. onkomarkery jsou převážně glykoproteinové povahy [56].

### **6.5.2 Biomarker zánětlivých procesů**

Bylo zjištěno, že se při ateroskleróze zvyšuje množství vázané kyseliny sialové (TSA) a s lipidy asociované kyseliny sialové (LASA) v séru. Důvodem zvýšení může být skutečnost, že se organismus snaží působit proti zánětlivým změnám a zvýšenou syntézou kyseliny sialové zaplnit místa s deficiencí této kyseliny. Kyselina sialová má v endoteliu ochrannou funkci a aterosklerotické změny způsobují právě desializaci. Zjištěna byla i zvýšená aktivita sialyltransferázy. Dalším důvodem zvýšené kyseliny sialové v séru může být souvislost

se zvýšeným výskytem reaktantů akutní fáze, tedy povětšinou glykoproteinů s navázanou kyselinou sialovou [57].

### 6.5.3 Tumormarker

Zánětlivý proces může iniciovat počáteční stadium rakovinného bujení. Má se za to, že hypersializace buněčného povrchu indikuje jak proces zánětu, tak i rakovinu [58].

Zjistilo se, že se v séru markantně zvyšuje koncentrace celkové a na lipidy vázané kyseliny sialové (LASA) během rakovinného bujení, např. u leukémie, rakoviny vaječníků, rakoviny prsů nebo u kolorektálního karcinomu, dále též u rakoviny plic či neuroblastomu. Nicméně, jak už bylo naznačeno, tento nárůst koncentrace není charakteristický pro jeden typ rakoviny, nýbrž spíše značí, že v organismu nějaký typ rakoviny probíhá [59].

Hypersializace je způsobena zvýšenou mírou exprese sialyltransferáz nádorovou buňkou, zvýšenou dostupností aktivované kyseliny sialové během jejího metabolismu uvnitř buňky a též zvýšenou aktivitou neuramidáz, kdy dojde k odštěpení kyseliny sialové z glykokonjugátů. Hypersializace má své opodstatnění z hlediska odpovědi imunitního systému [58].

SIGLECs, neboli lektiny imunoglobulinového typu vázající kyselinu sialovou (z angl. Sialic acid-binding ImmunoGlobulin-type LECTins) nacházející se na buňkách imunitního systému jsou molekuly vázající kyselinu sialovou na buněčném povrchu a dávají organismu informaci, že buňka je tělu vlastní. Imunitní systém pak tuto buňku toleruje a nezničí ji. Této skutečnosti využívají nádorové buňky pomocí hypersializace svého povrchu [60].

Kyselina sialová interaguje též se selektiny, typem lektinů, které jsou vylučovány např. na endoteliu postiženém zánětem, kde slouží k adhezi a pohybu leukocytů, konkrétně kutálení, přičemž jejich hlavním ligandem je struktura zvaná sialyl-Lewis (konkrétně typ X), která obsahuje ve své molekule mj. kyselinu sialovou. Nádorové buňky však dokáží obejít tento mechanismus díky tomu, že na svém povrchu obsahují kyselinu sialovou a mohou tak metastázovat pomocí extravazace [58].

## 7 STANOVENÍ KYSELINY SIALOVÉ

Díky zájmů vědců o poznání funkce kyseliny sialové jakožto biologického indikátoru nádorových a zánětlivých onemocnění bylo prozkoumáno několik metod jejího stanovení. Zároveň bylo potřeba vyvinout metodu pro screening její zvýšené koncentrace v moči, kvůli genetickým onemocněním spojeným s jejím nadměrným ukládáním.

V této kapitole budou představeny různé metody stanovení kyseliny sialové, počínaje úpravou vzorků a kvantifikací analytických parametrů konče.

### 7.1 Úprava vzorku

Obvykle analýza kyselina sialové začíná jejím uvolněním z vazby na glykoprotein, glykolipid či gangliosid (pokud se nestanovuje pouze volná kyselina sialová). Lze použít dva způsoby pro uvolnění z vazby:

- Kyselá hydrolyza – je nejvíce používaná [61]. Za horka (70–90 °C) se do vzorku přidá kyselina, např. kyselina sírová (nejpoužívanější, koncentrace 25–100 mmol/l), chlorovodíková, octová, dále může být použita kyselina fluorooctová či kombinace s ultrazvukem nebo mikrovlnnou hydrolyzou, které zkracují délku hydrolyzy [23, 24, 35, 62, 63]. Výhodou je menší cena reagentů, vysoká reprodukovatelnost a snadné použití. Mezi nevýhody patří skutečnost, že kyselá hydrolyza může část kyseliny sialové poškodit [61].
- Enzymatická metoda – pomocí enzymů neuraminidáz. Nevýhodou je obtížná kontrola reakční kaskády v biologických vzorcích, záleží na druhu a struktuře vzorku a původu získaného enzymu. Enzymy se získávají např. z bakterií. Výhodou však je, že tato metoda je méně agresivní než kyselá hydrolyza [61, 64].

Po uvolnění kyseliny sialové je nutné vzorek purifikovat, jelikož biologické vzorky často obsahují proteinové, lipidické či glykanové frakce. Často se přistupuje na metodu precipitace proteinů pomocí organického rozpouštědla např. methanolu nebo acetonitrilu [62, 65, 66]. K oddělení precipitovaných proteinů a supernatantu se používá centrifugace, také filtrace polytetrafluorethylenovými mikroporézními filtry či mikroporézními filtračními destičkami [23, 67]. Využívaná je též iontová výměna, která je však poměrně nákladná nebo extrakce tuhou fází, která je jednodušší, ovšem náchylná vůči interferencím, a proto je vhodná spíše na dočištění [61].

Po úpravě vzorku se přistoupí na výběr vhodné instrumentace a podle potřeby je provedena derivatizace vzorku, jejíž možnosti budou probrány u jednotlivých metod.

## 7.2 Kapalinová chromatografie

Metody kapalinové chromatografie jsou pro stanovení kyseliny sialové využívané velmi často, zejména s detekcí tandemovým hmotnostním spektrometrem. Existují různé druhy kapalinové chromatografie, jako je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), ultrarychlá kapalinová chromatografie (UFLC), ultravysokotlaká kapalinová chromatografie (UHPLC) či mikrokolonová chromatografie ( $\mu$ -LC) [23, 24, 35, 62, 63, 66, 67, 68].

Analýzu lze provést jak bez derivatizace vzorku, tak s derivatizací, přičemž většinou derivatizace zvyšuje citlivost stanovení [35, 66, 67]. Převážná část chromatografů pro stanovení kyseliny sialové je opatřena C18 kolonou a polární mobilní fází, např. kyselina mravenčí, mravenčan amonný, acetonitril, methanol nebo voda. Používají se taktéž jejich směsi a většina analýz využívá gradientovou eluci [23, 24, 35, 62, 63, 66, 68]. Existuje i kapalinová chromatografie využívající perfluoroalkylovou stacionární fázi a mobilní fáze kyselinu trifluoroctovou s kyselinou propionovou a isopropanolem v destilované vodě, příp. methanolu, kde je i vzorek derivatizován fluorovou sloučeninou a díky interakci fluorovaných sloučenin nedochází k vlivu matricového efektu [67].

### 7.2.1 Stanovení pomocí kapalinové chromatografie s tandemovým hmotnostním spektrometrem

Po základní úpravě vzorku lze zvolit možnost bez derivatizace, kdy se biologický vzorek zpracuje a je připraven k analýze na kapalinovém chromatografu.

V případě volby derivatizace vzorku jsou možnosti následující [35, 66, 67]:

- Pomocí HCl v *n*-butanolu – zapříčiní butylaci molekuly kyseliny sialové [35].
- Heptadekafluoroundecylaminem – naváže amidovou skupinu na karboxylovou skupinu kyseliny sialové [67].
- 3,4-diaminotoluenem – reakcí vzniká stabilní derivát heterocyklické sloučeniny chinoxalin [66].

Jak v případě s derivatizací, tak i bez derivatizace je detektorem hmotností spektrometr s elektrospojovou ionizací [23, 35, 62, 66, 67].

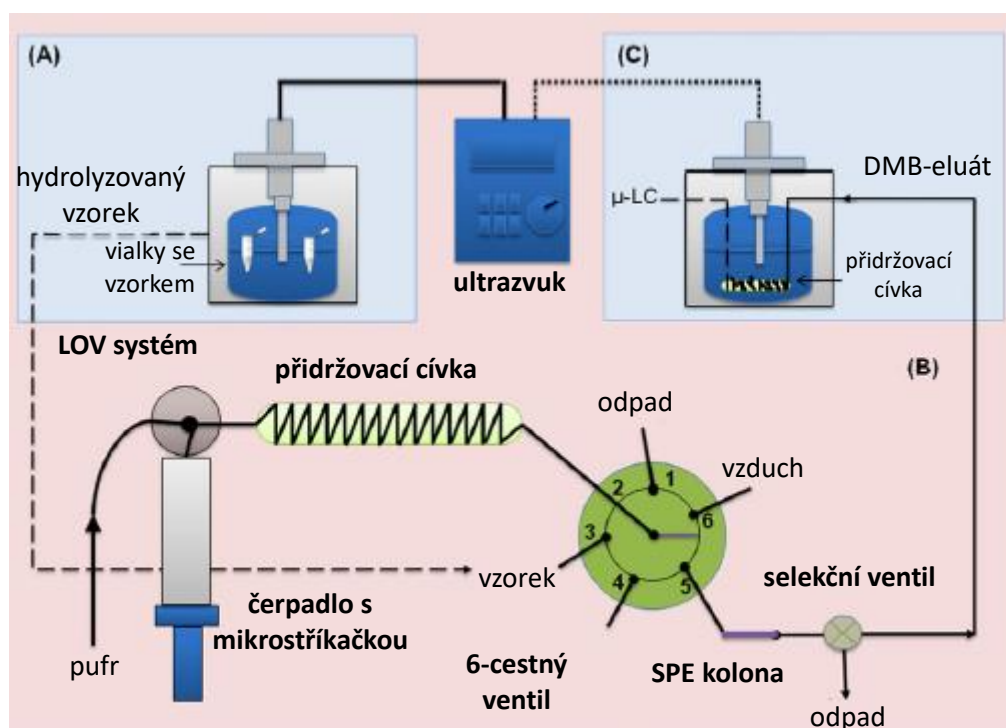
### 7.2.2 Stanovení pomocí kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí

Principem této metody je zejména derivatizace vzorku fluorogenním činidlem, které umožní, aby byla kyselina sialová detekována fluorimetrem. Po absorpci excitačního záření indukovaném výbojkou vyzáří analyt sekundární, tzv. emisní záření trávající  $10^{-8}$  až  $10^{-5}$  sekundy [69]. Fluorescenci je možné indukovat i laserem, což se využívá při detekci

nízké koncentrace značeného analytu při průtoku kapilárou [24, 70]. Vlnová délka excitačního záření se pohybuje v rozmezí 300–450 nm, vlnová délka emisního (fluorescenčního) záření 400–560 nm [24, 63, 68].

Mezi fluorogenní činidla, kterými lze označit kyselinu sialovou patří např. DBCEEC neboli 2-[2-(7H-dibenzo[*a,g*]karbazol-7-yl)-ethoxy]ethylkarbonylhydrazin, dále 4-(*N,N*-dimethylsulfamoyl)-7-piperazino-benzofurazan (DBD-PZ) či 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzen (DMB) [24, 63, 68].

Analýzu je možné spojit s automatizovanou extrakcí tuhou fází za asistence systému „lab-on-valve“ zobrazeném na obrázku 11 [24].



Obrázek 11: Schéma postupu analýzy se systémem LOV. Převzato z [24].

SPE kolonka obsahující sorbent aminopropyl se aktivuje roztokem acetonitrilu a vody a nadávkuje se do ní hydrolyzovaný vzorek. Eluce ze sorbentu se pak spojí zároveň s derivatizací, a sice tak, že se kolonka promyje roztokem DMB ve vodě a methanolu. Přepnutím ventilu se eluovaná frakce vede k přidržovací cívce, kde je ultrazvukována a posléze je připravená k analýze v kapalinovém chromatografu [24].

Derivatizaci je také možno provést zároveň s hydrolyzou přímo ve stríkačce, kdy se do komory stríkačky natáhne vzorek séra a kyselina octová, uzavře se víčkem a vloží se do ultrazvuku. Poté je do stríkačky natáhnut DBCEEC v ledové kyselině octové a opět se uzavře víčkem a vloží do ultrazvuku za horka. Po ochlazení na laboratorní teplotu se směs přefiltruje přes speciální stríkačkový mikrofiltr a filtrát se vstříkne rovnou do chromatografu [63].

### 7.3 Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie

Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie – SERS (z angl. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy) spočívá ve velkém zesílení intenzity Ramanova rozptylu (až  $10^{14}$ krát) díky blízkosti zakřiveného povrchu ušlechtilého kovu, např. zlatých nebo stříbrných nanočástic.

Ramanovo spektrum se proměří pomocí Ramanova spektrometru a laseru. Do hliníkové nádoby se umístí substrát – stříbrné nanočástice redukováné citrátem sodným společně se vzorkem, popř. standardem kyseliny sialové. Následně se na roztok s využitím optického mikroskopu namíří laserový paprsek o určité vlnové délce. Kromě stříbrných nanočástic nejsou potřeba jiné chemikálie či substráty [71, 72, 73].

Další postup pro stanovení Neu5Ac s využitím SERS byl konkrétně vyzkoušena na lidském séru a spočívá v nashromáždění zlatých nanočástic na skle z oxidu indium a cínu (ITO), kdy se tento povrch modifikuje navázáním 4-merkaptofenylboronové kyseliny (MPBA), která má schopnost zachycovat a reagovat s kyselinou sialovou za vzniku esterové vazby – takto vznikne tzv. sendvičová struktura, která zesiluje Ramanův rozptyl. Jelikož se běžně v séru nachází i glukóza, která by též reagovala s MPBA, je třeba ji ze vzorku odstranit pomocí enzymu glukózaoxidázy [65].

Postup je zdlouhavý, neboť je třeba postupně tvořit sendvičovou strukturu a několikrát opakovat 24hodinovou inkubaci, na druhé straně jde o metodu velmi citlivou, selektivní a bezinterferenční. Též lze tímto způsobem stanovit i glukózu [65].

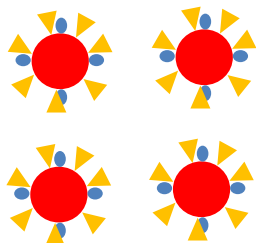
### 7.4 Spektrofotometrické stanovení

Spektrofotometrická stanovení patří k rychlým a jednoduchým způsobům, jak kvantifikovat kyselinu sialovou. Existují speciální kity, resp. sady, které obsahují všechny potřebné reagenty pro rychlé spektrofotometrické, popř. fluorimetrické stanovení kyseliny sialové v biologických vzorcích pomocí enzymů. Dají se zakoupit ve velkoobchodech s chemickými látkami jako je např. Sigma-Aldrich [74].

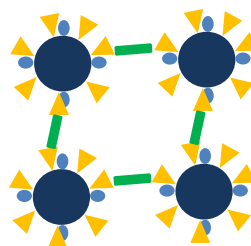
Tyto kity obsahují enzymy aldolázu kyseliny *N*-acetylneuraminové, pyruvát oxidázu a některé i laktátdehydrogenázu a neuraminidázu popř. kyselinu na hydrolýzu, dále pufrů a standardy kyseliny sialové [74, 75]. Enzymy jsou často v lyofilizované formě. Kity obsahují i podrobné návody a lze provést 25–100 testů, záleží na výrobku. Ze změny absorbance po proměření na spektrofotometru se vypočítá výsledná koncentrace kyseliny sialové [74, 75, 76].

Jiná spektrofotometrická, resp. kolorimetrická metoda, využívá agregaci zlatých nanočástic

pomocí kyseliny 3-aminofenylboronové, která je na nich navázaná a stabilizovaná a její funkční skupiny reagují s cis-diolovými skupinami kyseliny sialové za vzniku barevného cyklického esteru [77].

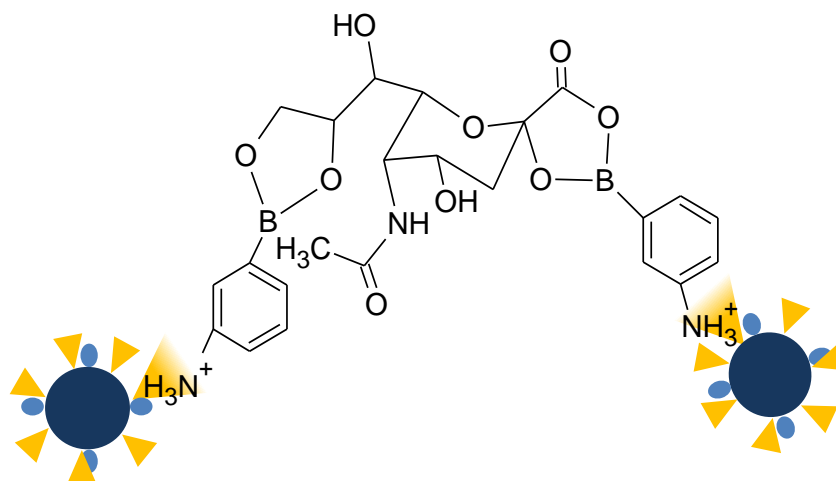


Obrázek 12: Dispergované zlaté nanočástice. Převzato z [77].



Obrázek 13: Agregované zlaté nanočástice - vytvořený cyklický ester. Převzato z [77].

Na obrázku 12 červené kolečko znázorňuje zlatou nanočástici s navázaným citrátem sodným (modrá kapka) a kyselinou 3-aminofenylboronovou (žlutý trojúhelník). Obrázek 13 pak zobrazuje agregované zlaté nanočástice a vytvořený cyklický ester (viz obrázek 14) po reakci s kyselinou sialovou (zelený obdélník). Tmavě modrá barva kolečka (zlaté partikule) označuje změnu barvy roztoku z červené na modrou [77].



Obrázek 14: Vzorec části vzniklého esteru po reakci kyseliny sialové s kyselinou 3-aminofenylboronovou. Převzato z [77].

Barevná změna z červené na modrou je měřena na spektrofotometru jakožto změna absorbance v rozmezí vlnových délek 400–800 nm [77].

Pro samotnou analýzu ve slinách byla konkrétně v tomto experimentu použita jejich náhrada, tedy uměle vytvořené sliny [77]. Reakční pH 5,6 bylo zjištěno jako ideální pro selektivní detekci kyseliny sialové, kdy během pokusu nebyla zjištěna žádná barevná změna při aplikaci jiných sacharidů [77].

## 7.5 Elektrochemické metody

Mezi elektrochemické metody patří amperometrie, kde se měří proud za konstantního



napětí, potenciometrie, kde se naopak měří napětí, resp. potenciál za konstantního proudu či impedimetrie – měření odporu. Pro stanovení koncentrace kyseliny sialové v biologických vzorcích je snaha vytvářet opakovatelně použitelné biosenzory [64, 78, 79, 80, 81].

### 7.5.1 Potenciometrické stanovení

Měření změny elektrického potenciálu je založeno na schopnosti kyseliny boronové vázat se na 1,2-diolovou skupinu kyseliny sialové. Vzniká tak stabilní cyklický boronátový ester, jehož vznik je zaznamenán pomocí změny potenciálu  $\Delta E$  [78, 79].

Elektroda se připraví elektrodepozicí redukovaného oxidu grafenu (ERGO) na elektrodu ze skelného uhlíku s následným pokrytím elektrody poly(anilinboronovou kyselinou) (PABA) pomocí elektropolymerizace [78]. Ta může být provedena za účasti standardu kyseliny sialové na elektrodě. Kyselina sialové se pak odstraní extrakcí uhličitánovým pufrům. Jedná se o tzv. molekulový imprinting [79].

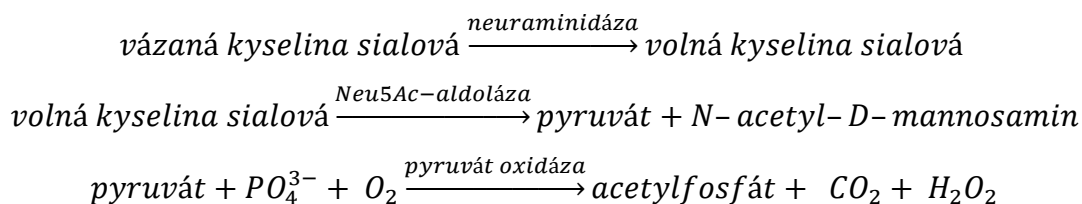
Místo elektrodepozice grafenem lze také využít karboxylované karbonové nanotrubičky, které se přidají do roztoku chitosanu a vzniklou suspenzí se potře elektroda ze skelného uhlíku. Chitosan napomáhá tomu, aby se na elektrodě vytvořil film pomocí elektrostatických interakcí [79].

Elektroda se uchovává ve fosfátovém pufru. U metody využívající grafenové nanotrubičky byl použit pufr o pH 7,4 a u metody využívající grafenový nanoprášek pH 4,75. Pufr o konkrétním pH se pak použije i k ředění séra [78, 79].

Pracovní elektrodou je pak zkonstruovaná elektroda, referentní SKE a pomocnou je platinový drátek [78, 79].

### 7.5.2 Amperometrické stanovení

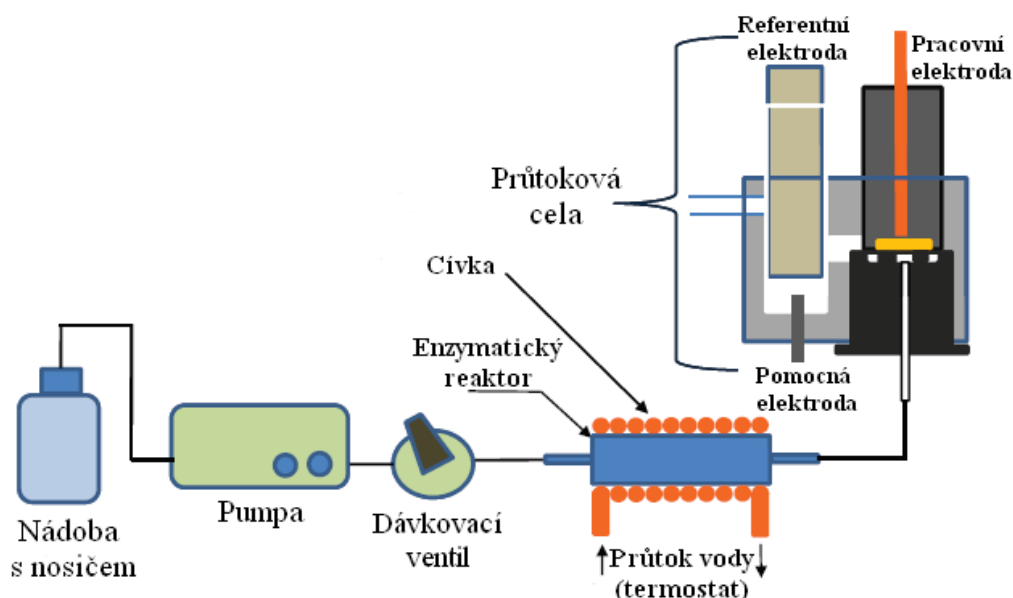
Amperometrický biosenzor je založený na enzymatické reakci s kyselinou sialovou v krvi. Senzor sestává z dvou enzymů: aldolázy kyseliny *N*-acetylneuraminové (Neu5Ac-aldoláza) a pyruvát oxidázy, které jsou imobilizovány a navázány na mikroporézní membráně umístěné na diskové platinové elektrodě. Enzymatickou reakcí, popsanou níže, vzniká peroxid vodíku, který je na anodě oxidován a tento proces je amperometricky detekován [64, 80].



V původní studii Marzouka a spol. z roku 2007 byla použita disková platinová elektroda

elektropolymerizací pokrytá ochrannou vrstvou *m*-fenylendiaminu. Následovala imobilizace enzymů tzv. cross-linkingem s 25% vodným roztokem glutaraldehydu a hovězím sérovým albuminem, přičemž celá tato směs byla pufována ve fosfátovém pufru. Enzymová směs se pomocí pipety nanasla na mikroporézní polyesterovou membránu, nechala se zesíťovat a zaschnout při laboratorní teplotě a poté se zafixovala na platinovou elektrodu. Membrána zajišťovala výbornou adhezi a ochranu enzymové vrstvy. Biosenzor se uchovává ve fosfátovém pufru při teplotě 4 °C [64].

V pokračující studii Marzouka a spol. z roku 2011 byla použita zlatá elektroda pokrytá vrstvou platiny a enzymy byly imobilizovány na pórovitém skle umístěné v kolonce z nerezové oceli. Tato kolonka s enzymy sloužila jako enzymatický reaktor. Konstrukce, jakožto průtokové zařízení, byla doplněna o pumpu, termostat, ve kterém byl enzymový reaktor a průtokovou celou, ve které byl umístěn biosenzor s referenční a pomocnou elektrodou viz obrázek 15 [80].



Obrázek 15: Průtokový systém s enzymatickým reaktorem a amperometrickou detekcí. Převzato z [80].

V obou případech byla vytvořená pracovní elektroda ještě doplněna o referenční chloridostříbrnou elektrodu a pomocnou elektrodu, kterou byl platinový drátek [64, 80].

### 7.5.3 Impedimetrický cytosenzor

Tento biosenzor byl vytvořen speciálně pro odhalení karcinomu ledvin pomocí detekce kyseliny sialové na povrchu buněk, které se dostávají z karcinomu do moči. Na základě rozpoznání kyseliny sialové se pak změní koncentrace buněk tohoto karcinomu v závislosti na změně impedance  $\Delta R_{ct}$ . Nejde tedy přímo o měření koncentrace kyseliny sialové.

Pracovní elektrodu tvoří zlatá elektroda modifikovaná filmem tvořeným pyrrolem a stříbrnými mikročásticemi v hovězím sérovém albuminu s integrovanými molekulami

kyseliny 3-aminofenylboronové, která byla již zmíněna jako látka, která specificky váže kyselinu sialovou [81].

## **7.6 Porovnání metod stanovení kyseliny sialové**

Při výběru analytické metody je vhodné znát, zda je metoda přesná a citlivá. V tabulkách 3 a 4 na dalších stránkách je číselně vyjádřena preciznost, výtěžnost a citlivost jednotlivých metod.

Metodou s nejnižší mezí detekce byla ultrarychlá kapalinová chromatografie s tandemovým hmotnostním spektrometrem, která měla LOD v řádech attomolů/l, je to tedy metoda velmi citlivá schopna zachytit stopová množství kyseliny sialové [67]. Kapalinová chromatografie s kolonou HILIC a fluorescenční detekcí měla též výbornou citlivost v řádech fmol/l [68]. Nejpřesnější z kapalinově-chromatografických metod, z hlediska hodnot preciznosti a výtěžnosti, byla vysokoučinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí [63].

Z optických metod byla přesnější kolorimetrie, naopak povrchem zesílená Ramanova spektroskopie byla citlivější [65, 77].

Z biosenzorů byl nejcitlivější potenciometrický biosenzor, který využíval grafitový nanoprášek a poly(anilinboronovou kyselinu) [78]. Nejpřesnější z biosenzorů byl však ten amperometrický, konkrétně vylepšený o enzymový reaktor a průtokový systém [80].

Tabulka 3: Číselně vyjádřená preciznost, výtěžnost a citlivost jednotlivých metod (část 1.).

| Metoda  | Biologický materiál | Forma kyseliny sialové | Preciznost            |                            | Výtěžnost             |                            | Citlivost             |                       | Zdroj |
|---|---------------------|------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|-----------------------|-------|
|   |                     |                        | V sérii (intra-assay) | Mezi sériemi (inter-assay) | V sérii (intra-assay) | Mezi sériemi (inter-assay) | LOD                   | LOQ                   |       |
|   |                     |                        | CV (%)                |                            | R (%)                 |                            | (mol/l)               |                       |       |
| HPLC-MS/MS                                      | Moč                 | TSA                    | 6,5                   | 3,6                        | neuveďeno             |                            | $1,7 \times 10^{-6}$  | $5 \times 10^{-6}$    | [23]  |
|   |                     | FSA                    | 4,6                   | 6,6                        |                       |                            | $3 \times 10^{-7}$    | $1 \times 10^{-6}$    |       |
| HPLC-MS/MS                                      | MM                  | TSA                    | 9,7                   | 12,8                       | 97,3                  |                            | $6 \times 10^{-7}$    | $2 \times 10^{-6}$    | [62]  |
|   |                     | FSA                    | 4,8                   | 10,4                       | 98,8                  |                            |                       |                       |       |
| HPLC-MS/MS<br>Derivatizace <i>n</i> -butanolem  | Moč                 | TSA                    | 1,1–3,1               | 3–8                        | neuveďeno             |                            | $4,2 \times 10^{-7}$  | $1,4 \times 10^{-6}$  | [35]  |
|   |                     | FSA                    | 3,2–6,0               | 5,2–7,7                    | 98,7–109,2            | 96,1–102,3                 |                       |                       |       |
| UFLC-MS/MS<br>Fluorová derivatizace             | Moč                 | FSA                    | neuveďeno             | 3,7–6,0                    | 98–102                |                            | $6 \times 10^{-17}$   | neuveďeno             | [67]  |
| UHPLC-MS/MS<br>Derivatizace 3,4-diaminotoluénem | Plazma              | FSA                    | 2,0–3,0               | 4,0–5,0                    | 99,0–105,0            | 95,0–103,0                 | neuveďeno             | $6,5 \times 10^{-8}$  | [66]  |
|   | Sérum               | TSA                    | 4,3                   | 14,3                       | 97,2                  |                            | $2,6 \times 10^{-9}$  | $3,2 \times 10^{-9}$  | [24]  |
| HPLC-FLD  | Sérum               | FSA                    | 1,5–2,8               | 2,8–3,4                    | 96,1–108,5            |                            | $6,7 \times 10^{-14}$ | $2,2 \times 10^{-13}$ | [68]  |
| HPLC-FLD  | Sérum               | TSA                    | 1,5–2,0               | 0,9–1,5                    | 96,6–99,0             | 97,2–98,8                  | $3,5 \times 10^{-9}$  | $1,2 \times 10^{-8}$  | [63]  |

Tabulka 4: Číselně vyjádřená preciznost, výtěžnost a citlivost jednotlivých metod (část 2.).

| Metoda   | Biologický materiál | Forma kyseliny sialové | Preciznost            |                            | Výtěžnost             |                            | Citlivost            |                      | Zdroj |
|--|---------------------|------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|----------------------|----------------------|-------|
|  |                     |                        | V sérii (intra-assay) | Mezi sériemi (inter-assay) | V sérii (intra-assay) | Mezi sériemi (inter-assay) | LOD                  | LOQ                  |       |
|  |                     |                        | CV (%)                |                            | R (%)                 |                            | (mol/l)              |                      |       |
| <b>SERS</b>  | Sérum               | FSA                    | 3,9                   | 6,7                        | neuveďeno             | neuveďeno                  | $1,2 \times 10^{-7}$ | neuveďeno            | [65]  |
| <b>Kolorimetrie</b><br>S 3-aminofenylboronovou kyselinou               | Sliny               | TSA                    | 1,9-4,2               | 4,2-6,4                    | 98,7-106,0            | 98,7-106,0                 | $6 \times 10^{-5}$   | $1,9 \times 10^{-4}$ | [77]  |
| <b>Potenciometrický biosenzor</b><br>PABA + uhlíkové nanotrubičky      | Sérum               | FSA                    | 2,3                   | neuveďeno                  | 93,0-105,0            | 93,0-105,0                 | $6 \times 10^{-5}$   | neuveďeno            | [79]  |
| <b>Potenciometrický biosenzor</b><br>PABA + grafitový nanoprášek       | Sérum               | FSA                    | 1,7-3,3               | 8,0                        | 94,0-109,0            | 94,0-109,0                 | $8 \times 10^{-7}$   | neuveďeno            | [78]  |
| <b>Amperometrický biosenzor</b>  | Plná krev           | TSA<br>FSA             | 2,3                   | neuveďeno                  | 96,0                  | 96,0                       | $1 \times 10^{-5}$   | neuveďeno            | [64]  |
| <b>Amperometrický biosenzor</b><br>Průtokové měření + enzymový reaktor | Plná krev           | TSA<br>FSA             | 1,1                   | neuveďeno                  | 97,5                  | 97,5                       | $2 \times 10^{-6}$   | neuveďeno            | [80]  |
| <b>Impedimetrický cytosenzor</b>                                       | Moč                 | Vázaná na bunčkách     | neuveďeno             | 3,9                        | neuveďeno             | neuveďeno                  | 6 buněk/ml           | neuveďeno            | [81]  |

Kapalinová chromatografie s tandemovým hmotnostním spektrometrem byla převážně použita ke kvantifikaci volné a vázané kyseliny sialové v moči, což je vhodné pro diagnózu nemocí spojených s jejím ukládáním [23, 35, 67]. Zvýšená koncentrace TSA v moči však může poukazovat i na rakovinu močového měchýře, selhání ledvin či non-inzulin dependentní *diabetes mellitus* [23]. HPLC-MS/MS může být též vhodná pro stanovení kyseliny sialové v mozkomíšním moku, za účelem diagnostiky meningitidy nebo nádoru mozku [62].

Fluorescenční detekce byla využita zejména u stanovení kyseliny sialové v séru a vyznačovala se vyšší citlivostí. Kombinace kapalinové chromatografie a fluorescenční detekce proto může být vhodná pro výzkum kyseliny sialové jakožto biomarkeru [24, 63, 68].

Co se týče časové náročnosti, delší jsou ta stanovení, u kterých je prováděna hydrolyza a derivatizace. Hydrolyza trvá cca 1 hodinu, derivatizace dle různých postupů může trvat 5 min ale i 60 min [24, 35, 63, 66, 67, 68]. I přesto je kapalinová chromatografie spolehlivou a relativně rychlou metodou vhodnou do praxe pro rutinní screening FSA a TSA v moči, séru či mozkomíšním moku [23, 24, 35, 62, 63, 66, 67, 68].

Spektrofotometrická stanovení patří k těm rychlejším a jednodušším metodám, zvláště když existují připravené sady, které obsahují všechny reagenty potřebné k měření i s návody. Hodí se tak do rutinních laboratoří, které jsou ve většině případů vybaveny spektrofotometrem [74, 75, 76]. Další možností spektrofotometrického stanovení je kolorimetrické stanovení založené na agregaci zlatých nanočástic prostřednictvím kyseliny boronové. Bylo zatím vyzkoušeno na simulovaných lidských slinách a při analýze opravdových slin by byl potřeba klást velký důraz na jejich očištění, protože sliny jsou velmi komplexní. Nejdélší částí této metody je příprava zlatých nanočástic z roztoku HAuCl<sub>4</sub>, které se však mohou připravit předem a lze je uchovávat v ledničce. Samotné smíchání nanočástic s kyselinou 3-aminofenylboronovou a několika standardy kyseliny sialové není nikterak složité a inkubační doba činí pouhých 5 min při laboratorní teplotě. Měření absorbance pak proběhlo na UV-VIS spektrometru. Instrumentace je jednoduchá a analýza je rychlá [77].

Metody povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie byly zkoumány hlavně při stanovení kyseliny sialové jakožto tumormarkeru. Klasické provedení SERS je rychlé a může sloužit ke zjištění rakoviny prsu či vaječníků ze slin [71, 73]. Nová modifikace – enzymaticky asistovaná Ramanova spektroskopie má výhodu ve vyšší citlivosti a ve vyloučení interferencí, obrovskou nevýhodou však je dlouhá doba přípravy. Vytvoření ITO/Au/MPBA substrátu trvá téměř 2,5 dne, inkubace tohoto substrátu v kyselině sialové trvá 2 hodiny, další inkubace v MPBA zabere 24 hodin, a nakonec se celá struktura musí nechat po 24 hodin v roztoku zlatých nanočástic. Metoda tedy není vhodná do rutinní praxe [65].

A na závěr, jako další z možností stanovení byly představeny biosenzory, jak amperometrický, tak potenciometrický či impedimetrický. Amperometrický biosenzor byl založen na enzymatické reakci s kyselinou sialovou v krvi a jeho úskalím byl pokles aktivity enzymů po 8 dnech, čím se snížila i jeho citlivost. Vylepšení tohoto senzoru spočívalo v zařazení enzymového reaktoru, který poskytl větší životnost enzymů, delší čas záchytu vzorku a tím pádem úplnou reakci se substrátem a dále byl senzor doplněn o průtokovou celu. Příprava senzoru byla jednoduchá a nebylo potřeba oddělovat sérum z plné krve centrifugací [64, 80].

Potenciometrický senzor s použitím grafenové vrstvy poskytl vyšší citlivost oproti druhé variantě s uhlíkovými nanotrubičkami. Grafenová vrstva zrychlila přenos elektronů a zvětšila povrch elektrody, což přispělo k vyšší citlivosti stejně jako specifická vazba kyseliny sialové s kyselinou aminofenylboronovou. Vykazoval dobré regenerační schopnosti a výbornou stabilitu (po 1 měsíci se jeho potenciometrická odpověď snížila jen na 91,8 %). Příprava této elektrody však vyžaduje o něco delší dobu [78, 79].

Oba typy biosenzorů by se daly opět využít ve výzkumu kyseliny sialové jako biomarkeru [64, 78, 79, 80].

Impedimetrický biosenzor nesloužil přímo k zjištění koncentrace kyseliny sialové, ale ke zjištění koncentrace ledvinových rakovinných buněk právě pomocí navázání 3-aminofenylboronové kyseliny na kyselinu sialovou, která hojně pokrývá povrch rakovinných buněk. Opět se jedná o vhodnou metodu k výzkumu kyseliny sialové jako biomarkeru/tumormarkeru [81].

## ZÁVĚR

Cílem práce bylo popsat vlastnosti, význam a funkce kyseliny sialové a rovněž možnosti jejího stanovení různými metodami.

Kyselina sialová tvoří významnou součást gangliosidů, glykoproteinů, antigenů, účastní se imunitních reakcí a interakcí s patogeny, taktéž svým charakteristickým umístěním tvoří ochrannou bariéru sliznic, má úkol v buněčné adhezi a též např. v pohybu erytrocytů cévním řečištěm. Mnohé studie zjistily, že kyselina sialová může fungovat jako marker zánětu, zejm. co se týká kardiovaskulární oblasti a též jako tumormarker, avšak ne specifický.

Existují i nemoci spojené s ukládáním volné i vázané kyseliny sialové, které způsobují mentální retardaci, neprospívání a různé malformace a projevují se mj. zvýšeným vylučováním kyseliny sialové v moči.

Metody stanovení kyseliny sialové jsou různé, mezi nejčastěji používané patří hlavně kapalinová chromatografie s detekcí tandemovým hmotnostním spektrometrem či fluorescenční detekcí. Dále pak spektrofotometrické stanovení, Ramanova spektroskopie a amperometrické či potenciometrické stanovení s využitím biosenzorů. Převážná část metod je založená na schopnosti kyseliny sialové navázat se na různé deriváty kyseliny boronové. Metoda s nejlepšími výsledky přesnosti a citlivosti je vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí. V praxi pro rutinní použití je vhodné spektrofotometrické stanovení s využitím kitů, které je rychlé a instrumentace je v laboratořích dostupná.



## POUŽITÁ LITERATURA

- [1] LUNDBLAD, Arne. Gunnar Blix and his discovery of sialic acids. Fascinating molecules in glycobiology. *Upsala Journal of Medical Sciences* [online]. 2015, **120**(2), 1-9 [cit. 2019-11-25]. DOI: 10.3109/03009734.2015.1027429. ISSN 0300-9734. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/03009734.2015.1027429>
- [2] Sial-, sialo-. *Velký lékařský slovník On-Line* [online]. ©1998-2019 [cit. 2019]. Dostupné z: <http://lekarske.slovníky.cz/lexikon-pojem/sial-sialo>
- [3] Mucin. *Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK* [online]. ©2011 [cit. 2019]. Dostupné z: <https://www.stefajir.cz/?q=mucin>
- [4] SCHNAAR, Ronald a Yuan LEE. Discoveries of the structures of sialic acid and CMP-sialic acid (1957–1960): a letter from Saul Roseman. *Glycobiology* [online]. 2017, **27**(6), 513-517 [cit. 2019-11-25]. DOI: 10.1093/glycob/cwx015. ISSN 0959-6658. Dostupné z: <http://academic.oup.com/glycob/article/27/6/513/2982648/Discoveries-of-the-structures-of-sialic-acid-and>
- [5] PEARCE, Oliver a Heinz LÄUBLI. Sialic acids in cancer biology and immunity. *Glycobiology* [online]. 2015, **26**(2), 111-128 [cit. 2019-11-25]. DOI: 10.1093/glycob/cwv097. ISSN 0959-6658. Dostupné z: <https://academic.oup.com/glycob/article-lookup/doi/10.1093/glycob/cwv097>
- [6] VARKI, Ajit. Sialic acids in human health and disease. *Trends in Molecular Medicine* [online]. 2008, **14**(8), 351-360 [cit. 2019-11-25]. DOI: 10.1016/j.molmed.2008.06.002. ISSN 14714914. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471491408001330>
- [7] Neuraminic Acid. *The Merck Index Online* [online]. Whitehouse Station, N.J., U.S.A.: The Royal Society of Chemistry, 2019 [cit. 2019-11-26]. Dostupné z: <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m7838/neuraminic%20acid?q=authorize>
- [8] SCHAUER, Roland. Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man. *Zoology* [online]. 2004, **107**(1), 49-64 [cit. 2019-11-25]. DOI: 10.1016/j.zool.2003.10.002. ISSN 09442006. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944200604000054>
- [9] Sialic Acids. *The Merck Index Online* [online]. Whitehouse Station, N.J., U.S.A.: The Royal Society of Chemistry, 2019 [cit. 2019-11-26]. Dostupné z: <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m9893/sialic%20acids%20derivative%20acetylneuraminic%20acid?q=authorize>

- [10] MURREY, Heather a Linda HSIEH-WILSON. The Chemical Neurobiology of Carbohydrates. *Chemical Reviews* [online]. 2008, **108**(5), 1708-1731 [cit. 2019-11-25]. DOI: 10.1021/cr078215f. ISSN 0009-2665. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr078215f>
- [11] DENG, Lingquan, Xi CHEN a Ajit VARKI. Exploration of Sialic Acid Diversity and Biology Using Sialoglycan Microarrays. *Biopolymers* [online]. 2013, **99**(10), 650-665 [cit. 2019-11-25]. DOI: 10.1002/bip.22314. ISSN 00063525. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bip.22314>
- [12] SAMRAJ, Annie, Oliver PEARCE, Heinz LÄUBLI et al. A red meat-derived glycan promotes inflammation and cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2015, **112**(2), 542-547 [cit. 2019-11-25]. DOI: 10.1073/pnas.1417508112. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1417508112>
- [13] ALISSON-SILVA, Frederico, Kunio KAWANISHI a Ajit VARKI. Human risk of diseases associated with red meat intake: Analysis of current theories and proposed role for metabolic incorporation of a non-human sialic acid. *Molecular Aspects of Medicine* [online]. 2016, **51**, 16-30 [cit. 2019-11-25]. DOI: 10.1016/j.mam.2016.07.002. ISSN 00982997. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098299716300401>
- [14] DU, Jian, Adam MELEDEO, Zhiyun WANG, Hargun KHANNA, Venkata PARUCHURI a Kevin YAREMA. Metabolic glycoengineering: Sialic acid and beyond. *Glycobiology* [online]. 2009, **19**(12), 1382-1401 [cit. 2019-11-25]. DOI: 10.1093/glycob/cwp115. ISSN 1460-2423. Dostupné z: <https://academic.oup.com/glycob/article-lookup/doi/10.1093/glycob/cwp115>
- [15] WANG, Bing a Jennie BRAND-MILLER. The role and potential of sialic acid in human nutrition. *European Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2003, **57**(11), 1351-1369 [cit. 2019-11-25]. DOI: 10.1038/sj.ejcn.1601704. ISSN 0954-3007. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/1601704>
- [16] *Bezpečnostní list: N-Acetylneuraminic acid*. In: . Praha: Sigma-Aldrich, 2018, ročník 2010, číslo 453.
- [17] Organic compounds. *Knovel* [online]. Elsevier, 2020 [cit. 2020-03-13]. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/itble/rcid:kpYHPPHC0B/id:kt0059W4W1/yaws-handbook-physical/organic-compounds>
- [18] Basic Physical Properties of Chemical Compounds. *Knovel* [online]. Elsevier, 2020 [cit. 2020-03-13]. Dostupné z:

- <https://app.knovel.com/hotlink/itble/rcid:kpKCTE000X/id:kt002VLXT1/knovel-critical-tables/basic-physical-properties>
- [19] CORREDIG, Milena. Gelation Properties of Milk Proteins. *Dairy Derived Ingredients - Food and Nutraceutical Uses* [online]. Woodhead Publishing, 2009, s. 397 [cit. 2020-03-13]. ISBN 978-1-84569-719-8
- [20] THAYSEN-ANDERSEN, Morten, Martin LARSEN, Nicolle PACKER a Giuseppe PALMISANO. Structural analysis of glycoprotein sialylation – Part I: pre-LC-MS analytical strategies. *RSC Advances* [online]. 2013, **3**(45) [cit. 2019-11-25]. DOI: 10.1039/c3ra42960a. ISSN 2046-2069. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3ra42960a>
- [21] LI, Fenjie a Junjun DING. Sialylation is involved in cell fate decision during development, reprogramming and cancer progression. *Protein & Cell* [online]. 2019, **10**(8), 550-565 [cit. 2019-11-25]. DOI: 10.1007/s13238-018-0597-5. ISSN 1674-800X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13238-018-0597-5>
- [22] Showing metabocard for N-Acetylneuraminic acid. *Human Metabolome Database* [online]. Alberta: University of Alberta and The Metabolomics Innovation Centre, 2019 [cit. 2019-11-27]. Dostupné z: <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0000230#references>
- [23] VAN DER HAM, Maria, Berthil H.C.M.T. PRINSEN, Jan G.M. HUIJMANS, Nicolaas G.G.M. ABELING, Bert DORLAND, Ruud BERGER, Tom J. DE KONING a Monique G.M. DE SAIN-VAN DER VELDEN. Quantification of free and total sialic acid excretion by LC–MS/MS. *Journal of Chromatography B* [online]. 2007, **848**(2), 251-257 [cit. 2020-03-30]. DOI: 10.1016/j.jchromb.2006.10.066. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023206008610>
- [24] OROZCO-SOLANO, Mara Isabel., Feliciano PRIEGO-CAPOTE a Maria Dolores LUQUE DE CASTRO. Ultrasound-assisted hydrolysis and chemical derivatization combined to lab-on-valve solid-phase extraction for the determination of sialic acids in human biofluids by  $\mu$ -liquid chromatography-laser induced fluorescence. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2013, **766**, 69-76 [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.1016/j.aca.2012.12.045. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267012018521>
- [25] GNE glucosamine (UDP-N-acetyl)-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase: Gene. *National Center for Biotechnology Information* [online]. USA: National Library of Medicine, 2020 [cit. 2020-04-03]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10020>

- [26] LI, Yanhong a Xi CHEN. Sialic acid metabolism and sialyltransferases: natural functions and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2012, **94**(4), 887-905 [cit. 2019-11-25]. DOI: 10.1007/s00253-012-4040-1. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-012-4040-1>
- [27] VARKI, Ajit. *Essentials of glycobiology* [online]. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009 [cit. 2019-11-27]. ISBN 9780879697709. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1920/>
- [28] SAMRAJ, Annie N., Heinz LÄUBLI, Nissi VARKI a Ajit VARKI. Involvement of a Non-Human Sialic Acid in Human Cancer. *Frontiers in Oncology* [online]. 2014, **4**(33) [cit. 2020-04-03]. DOI: 10.3389/fonc.2014.00033. ISSN 2234-943X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2014.00033/abstract>
- [29] DEVLIN, Thomas, ed. *Textbook of biochemistry: with clinical correlations*. 7th ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2011. ISBN 978-0-470-28173-4.
- [30] LEHMANN, Friederike, Evelin TIRALONGO a Joe TIRALONGO. Sialic acid-specific lectins: occurrence, specificity and function. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2006, **63**(12), 1331-1354 [cit. 2019-11-25]. DOI: 10.1007/s00018-005-5589-y. ISSN 1420-682X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-005-5589-y>
- [31] MALÍČKOVÁ, Karin, Ivana JANATKOVÁ, Petra ŠANDOVÁ a Tomáš ZIMA. Protilátky proti glykokonjugátům v diagnostice autoimunitních neuropatií. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie* [online]. Praha, 2007, **70103**(6), 631-636 [cit. 2020-03-30]. Dostupné z: <https://www.csmn.eu/casopisy/ceska-slovenska-neurologie/2007-6-1/protilatky-proti-glykokonjugatum-v-diagnostice-autoimunitnich-neuropatii-52501>
- [32] YU, Robert K., Yi-Tzang TSAI, Toshio ARIGA a Makoto YANAGISAWA. Structures, Biosynthesis, and Functions of Gangliosides-an Overview. *Journal of Oleo Science* [online]. 2011, **60**(10), 537-544 [cit. 2020-04-03]. DOI: 10.5650/jos.60.537. ISSN 1345-8957. Dostupné z: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jos/60.537?from=CrossRef>
- [33] BARMHERZIG, Rebecca, Garrett BULLIVANT, Dawn CORDEIRO, David SINASAC, Susan BLASER a Saadet MERCIMEK-MAHMUTOGLU. A New Patient With Intermediate Severe Salla Disease With Hypomyelination: A Literature Review for Salla Disease. *Pediatric Neurology* [online]. 2017, **74**, 87-912 [cit. 2019-11-25]. DOI: 10.1016/j.pediatrneurol.2017.05.022. ISSN 08878994. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887899417300747>
- [34] COUCE, María, Judit MACÍAS-VIDAL, Daisy CASTIÑEIRAS, María BÓVEDA, José

- FRAGA, Ana FERNÁNDEZ-MARMIESSE a María COLL. The early detection of Salla disease through second-tier tests in newborn screening: How to face incidental findings. *European Journal of Medical Genetics* [online]. 2014, **57**(9), 527-531 [cit. 2019-11-25]. DOI: 10.1016/j.ejmg.2014.06.005. ISSN 17697212. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1769721214001372>
- [35] TEBANI, Abdellah, Dimitri SCHLEMMER, Apolline IMBARD, Odile RIGAL, Dominique PORQUET a Jean-François BENOIST. Measurement of free and total sialic acid by isotopic dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *Journal of Chromatography B* [online]. 2011, **879**(31), 3694-3699 [cit. 2019-11-25]. DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.10.009. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S157002321100674X>
- [36] Nystagmus. *Velký lékařská slovník* [online]. Maxdorf, © 1998-2019 [cit. 2019-11-27]. Dostupné z: <http://lekarske.slovníky.cz/lexikon-pojem/nystagmus>
- [37] FROISSART, Roseline. Clinical, morphological, and molecular aspects of sialic acid storage disease manifesting in utero. *Journal of Medical Genetics* [online]. 2005, **42**(11), 829-836 [cit. 2019-11-25]. DOI: 10.1136/jmg.2004.029744. ISSN 1468-6244. Dostupné z: <http://jmg.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jmg.2004.029744>
- [38] MOHAMMAD, Ahmed, Katelyn BRUNO, S. HINES a Paldeep ATWAL. Type 1 sialidosis presenting with ataxia, seizures and myoclonus with no visual involvement. *Molecular Genetics and Metabolism Reports* [online]. 2018, **15**, 11-14 [cit. 2019-11-25]. DOI: 10.1016/j.ymgmr.2017.12.005. ISSN 22144269. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214426917301489>
- [39] VIEIRA DE REZENDE PINTO, Wladimir, Paulo SGOBBI DE SOUZA, José PEDROSO a Orlando BARSOTTINI. Variable phenotype and severity of sialidosis expressed in two siblings presenting with ataxia and macular cherry-red spots. *Journal of Clinical Neuroscience* [online]. 2013, **20**(9), 1327-1328 [cit. 2019-11-25]. DOI: 10.1016/j.jocn.2012.12.014. ISSN 09675868. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0967586813001161>
- [40] Cherry-red spot in the patient. In: *Journal of Movement Disorders* [online]. Korea: Korean Movement Disorder Society, 2009 [cit. 2020-04-03]. Dostupné z: [https://www.e-jmd.org/journal/Figure.php?xn=jmd-2-1-50-14.xml&id=f2-jmd-2-1-50-14&number=87&p\\_name=0613\\_87](https://www.e-jmd.org/journal/Figure.php?xn=jmd-2-1-50-14.xml&id=f2-jmd-2-1-50-14&number=87&p_name=0613_87)
- [41] Sialidosis. *Genetics Home Reference - NIH* [online]. USA: U.S. National Library of Medicine, 2019 [cit. 2019-11-27]. Dostupné z:

- <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/sialidosis>
- [42] Coarse face. In: *Genetics Home Reference* [online]. USA: National Library of Medicine, 2008 [cit. 2020-04-03]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/art/large/coarse-face.jpeg>
- [43] VARKI, Ajit. *Essentials of glycobiology*. Third edition. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017. ISBN 9781621821328.
- [44] VARKI, Ajit a Pascal GAGNEUX. Multifarious roles of sialic acids in immunity. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 2012, **1253**(1), 16-36 [cit. 2019-11-26]. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2012.06517.x. ISSN 00778923. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.2012.06517.x>
- [45] WASIK, Brian, Karen BARNARD a Colin PARRISH. Effects of Sialic Acid Modifications on Virus Binding and Infection. *Trends in Microbiology* [online]. 2016, **24**(12), 991-1001 [cit. 2019-11-26]. DOI: 10.1016/j.tim.2016.07.005. ISSN 0966842X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X16300932>
- [46] SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada, 2014. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-4771-2.
- [47] SAMSON, Mélanie, Andrés PIZZORNO, Yacine ABED a Guy BOIVIN. Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Antiviral Research* [online]. 2013, **98**(2), 174-185 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1016/j.antiviral.2013.03.014. ISSN 01663542. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166354213000685>
- [48] Lectins - an overview. *ScienceDirect Topics* [online]. Elsevier B.V., 2019 [cit. 2019-11-27]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/lectins>
- [49] NAVRÁTIL, Leoš. *Vnitřní lékařství pro nelékařské zdravotnické obory*. 1 vyd. Praha: Grada Publishing, 2008. ISBN 978-80-247-2319-8.
- [50] COOMBE, Deirdre, ed. a Christopher PARISH, ed. *Carbohydrates: the yet to be tasted sweet spot of immunity* [online]. Frontiers Media SA, 2015 [cit. 2019-11-26]. Frontiers Research Topics. DOI: 10.3389/978-2-88919-625-8. ISBN 9782889196258.
- [51] MASOPUST, Jaroslav a Richard PRŮŠA. *Patobiochemie buňky* [online]. 1. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, 2003 [cit. 2020-03-30]. ISBN 80-239-1011-0. Dostupné z: [dotdiag.cz](http://dotdiag.cz)
- [52] PALMANO, Kate, Angela ROWAN, Rozey GUILLERMO, Jian GUAN a Paul MCJARROW. The Role of Gangliosides in Neurodevelopment. *Nutrients* [online]. 2015, **7**(5), 3891-3913 [cit. 2019-11-25]. DOI: 10.3390/nu7053891. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2072-6643/7/5/3891>
- [53] AURELI, Massimo, Laura MAURI, Maria Grazia CIAMPA, Alessandro PRINETTI,

- Gino TOFFANO, Cynthia SECCHIERI a Sandro SONNINO. GM1 Ganglioside: Past Studies and Future Potential. *Molecular Neurobiology* [online]. 2016, **53**(3), 1824-1842 [cit. 2020-03-30]. DOI: 10.1007/s12035-015-9136-z. ISSN 0893-7648. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12035-015-9136-z>
- [54] STRIMBU, Kyle a Jorge TAVEL. What are biomarkers?. *Current Opinion in HIV and AIDS* [online]. 2010, **5**(6), 463-466 [cit. 2019-11-26]. DOI: 10.1097/COH.0b013e32833ed177. ISSN 1746-630X. Dostupné z: <https://insights.ovid.com/crossref?an=01222929-201011000-00003>
- [55] DUFFY, Michael J. Clinical use of tumor biomarkers: An overview. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2017, **25**(46), 157-161. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/322737795\\_Clinical\\_use\\_of\\_tumor\\_biomarkers\\_An\\_overview](https://www.researchgate.net/publication/322737795_Clinical_use_of_tumor_biomarkers_An_overview)
- [56] KUTIŠOVÁ, Silvia. Indikácie a použitie nádorových markerov v klinickej praxi. *NewsLab* [online]. 2016, **7**(1), 34-41 [cit. 2019-11-27]. ISSN 2454-0021. Dostupné z: <https://www.newslab.sk/indikacie-a-pouzitie-nadorovych-markerov-v-klinickej-praxi/>
- [57] RAJENDIRAN, Kalai Selvi, Palghat Hariharan ANANTHANARAYANAN, Santosh SATHEESH a Medha RAJAPPA. Elevated Levels of Serum Sialic Acid and High-Sensitivity C-Reactive Protein: Markers of Systemic Inflammation in Patients with Chronic Heart Failure. *British Journal of Biomedical Science* [online]. 2016, **71**(1), 29-32 [cit. 2020-03-17]. DOI: 10.1080/09674845.2014.11669959. ISSN 0967-4845. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09674845.2014.11669959>
- [58] RODRIGUES, Emily a Matthew MACAULEY. Hypersialylation in Cancer: Modulation of Inflammation and Therapeutic Opportunities. *Cancers* [online]. 2018, **10**(6) [cit. 2020-03-17]. DOI: 10.3390/cancers10060207. ISSN 2072-6694. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2072-6694/10/6/207>
- [59] ZHOU, Xiaoman, Ganglong YANG a Feng GUAN. Biological Functions and Analytical Strategies of Sialic Acids in Tumor. *Cells* [online]. 2020, **9**(2) [cit. 2020-03-30]. DOI: 10.3390/cells9020273. ISSN 2073-4409. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/2/273>
- [60] LÜBBERS, Joyce, Ernesto RODRÍGUEZ a Yvette VAN KOOYK. Modulation of Immune Tolerance via Siglec-Sialic Acid Interactions. *Frontiers in Immunology* [online]. 2018, **9** [cit. 2020-03-17]. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02807. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.02807/full>
- [61] LACOMBA, Ramón, Jaime SALCEDO, Amparo ALEGRÍA, María Jesús LAGARDA,

- Reyes BARBERÁ a Esther MATENCIO. Determination of sialic acid and gangliosides in biological samples and dairy products: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2010, **51**(2), 346-357 [cit. 2019-11-26]. DOI: 10.1016/j.jpba.2009.04.023. ISSN 07317085. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708509002611>
- [62] VAN DER HAM, Maria, Tom J. DE KONING, Dirk LEFEBER, André FLEER, Berthil H.C.M.T. PRINSEN a Monique G.M. DE SAIN-VAN DER VELDEN. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry assay for the quantification of free and total sialic acid in human cerebrospinal fluid. *Journal of Chromatography B* [online]. 2010, **878**(15-16), 1098-1102 [cit. 2020-05-05]. DOI: 10.1016/j.jchromb.2010.03.020. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023210001601>
- [63] WU, Chuanxiang, Lian XIA, Lijie LIU et al. A novel, sensitive and convenient method for determination of sialic acids in human serum utilizing ultrasonic-assisted closed in-syringe hydrolysis and derivatization prior to high performance liquid chromatography. *Analytical Methods* [online]. 2016, **8**(3), 554-563 [cit. 2020-05-05]. DOI: 10.1039/C5AY02648B. ISSN 1759-9660. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5AY02648B>
- [64] MARZOUK, Sayed A. M., Syed Salman ASHRAF a Khawla A. AL TAYYARI. Prototype Amperometric Biosensor for Sialic Acid Determination. *Analytical Chemistry* [online]. 2007, **79**(4), 1668-1674 [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.1021/ac061886d. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac061886d>
- [65] TENG, Xinyan, Fu CHEN, Yun GAO et al. Enzyme-Assist-Interference-Free Strategy for Raman Selective Determination of Sialic Acid. *Analytical Chemistry* [online]. 2020, **92**(4), 3332-3339 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b05264. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.9b05264>
- [66] WANG, Dan, Xiang ZHOU, Lin WANG, Sihe WANG a Xue-Long SUN. Quantification of free sialic acid in human plasma through a robust quinoxalinone derivatization and LC–MS/MS using isotope-labeled standard calibration. *Journal of Chromatography B* [online]. 2014, **944**, 75-81 [cit. 2019-11-25]. DOI: 10.1016/j.jchromb.2013.11.016. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023213006296>
- [67] HAYAMA, Tadashi, Yohei SAKAGUCHI, Hideyuki YOSHIDA, Miki ITOYAMA, Kenichiro TODOROKI, Masatoshi YAMAGUCHI a Hitoshi NOHTA. Fluorous derivatization combined with liquid chromatography/tandem mass spectrometry: a method for the selective and sensitive determination of sialic acids in biological samples.



- Rapid Communications in Mass Spectrometry* [online]. 2010, **24**(19), 2868-2874 [cit. 2020-05-05]. DOI: 10.1002/rcm.4710. ISSN 09514198. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/rcm.4710>
- [68] KAWASAKI, Akane, Makoto YASUDA, Ken-ichi MAWATARI et al. Sensitive Analysis of Sialic Acid and Related Compound by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Using Fluorescence Detection after Derivatization with DBD-PZ. *Analytical Sciences* [online]. 2018, **34**(7), 841-844 [cit. 2020-05-06]. DOI: 10.2116/analsci.18N001. ISSN 0910-6340. Dostupné z: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/analsci/34/7/34\\_18N001/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/analsci/34/7/34_18N001/_article)
- [69] Fluorescenční HPLC detektory. *HPLC: High Performance Liquid Chromatography* [online]. M. Douša, 2007 [cit. 2020-05-06]. Dostupné z: [http://www.hplc.cz/Teorie/FL\\_detector.html#\\_top](http://www.hplc.cz/Teorie/FL_detector.html#_top)
- [70] Laser. *Datový standard MZ ČR* [online]. MZ ČR, 2020 [cit. 2020-05-06]. Dostupné z: [http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD\\_DS4/hypertext/JVAAZ.htm](http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/JVAAZ.htm)
- [71] ZERMEÑO-NAVA, José de Jesús, Marco Ulises MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, Ana Laura RÁMIREZ-DE-ÁVILA, Aida Catalina HERNÁNDEZ-ARTEAGA, Ma. Guadalupe GARCÍA-VALDIVIESO, Alondra HERNÁNDEZ-CEDILLO, Miguel JOSÉ-YACAMÁN a Hugo Ricardo NAVARRO-CONTRERAS. Determination of sialic acid in saliva by means of surface-enhanced Raman spectroscopy as a marker in adnexal mass patients: ovarian cancer vs benign cases. *Journal of Ovarian Research* [online]. 2018, **11**(1) [cit. 2020-05-07]. DOI: 10.1186/s13048-018-0433-9. ISSN 1757-2215. Dostupné z: <https://ovarianresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13048-018-0433-9>
- [72] HERNÁNDEZ-CEDILLO, Alondra, Ma. Guadalupe GARCÍA-VALDIVIESO, Aida Catalina HERNÁNDEZ-ARTEAGA, Nuria PATIÑO-MARÍN, Ángel Antonio VÉRTIZ-HERNÁNDEZ, Miguel JOSÉ-YACAMÁN a Hugo Ricardo NAVARRO-CONTRERAS. Determination of sialic acid levels by using surface-enhanced Raman spectroscopy in periodontitis and gingivitis. *Oral Diseases* [online]. 2019, **25**(6), 1627-1633 [cit. 2020-05-07]. DOI: 10.1111/odi.13141. ISSN 1354-523X. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/odi.13141>
- [73] HERNÁNDEZ-ARTEAGA, Aida, José DE JESÚS ZERMEÑO NAVA, Eleazar Samuel KOLOSOVAS-MACHUCA, J. Jesús VELÁZQUEZ-SALAZAR, Ekaterina VINOGRADOVA, Miguel JOSÉ-YACAMÁN a Hugo Ricardo NAVARRO-CONTRERAS. Diagnosis of breast cancer by analysis of sialic acid concentrations in human saliva by surface-enhanced Raman spectroscopy of silver nanoparticles. *Nano*

- Research* [online]. 2017, **10**(11), 3662-3670 [cit. 2020-05-07]. DOI: 10.1007/s12274-017-1576-5. ISSN 1998-0124. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12274-017-1576-5>
- [74] Sialic Acid Quantitation Kit. *Sigma-Aldrich* [online]. Německo: Merck KGaA, 2020 [cit. 2020-05-12]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/sialicq?lang=en&region=CZ>
- [75] Sialic acid Assay Kit (ESLA-100). *BioAssay Systems* [online]. Hayward, USA: BioAssay Systems, 2020 [cit. 2020-05-12]. Dostupné z: [https://www.bioassaysys.com/Sialic-acid-Assay-Kit-\(ESLA-100\).html](https://www.bioassaysys.com/Sialic-acid-Assay-Kit-(ESLA-100).html)
- [76] Sialic Acid (NANA) Assay Kit (ab83375). *Antibodies, Proteins, Kits and Reagents for Life Science: Abcam* [online]. Cambridge (UK): Abcam, 2020 [cit. 2020-05-12]. Dostupné z: <https://www.abcam.com/sialic-acid-nana-assay-kit-ab83375.html>
- [77] JAYEOYE, Titilope John, Wilairat CHEEWASEDTHAM, Chatchai PUTSON a Thitima RUJIRALAI. Colorimetric determination of sialic acid based on boronic acid-mediated aggregation of gold nanoparticles. *Microchimica Acta* [online]. 2018, **185**(9) [cit. 2020-03-19]. DOI: 10.1007/s00604-018-2951-y. ISSN 0026-3672. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00604-018-2951-y>
- [78] ZHOU, Yanli, Hui DONG, Lantao LIU, Jing LIU a Maotian XU. A novel potentiometric sensor based on a poly(anilineboronic acid)/graphene modified electrode for probing sialic acid through boronic acid-diol recognition. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2014, **60**, 231-236 [cit. 2019-11-26]. DOI: 10.1016/j.bios.2014.04.012. ISSN 09565663. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566314002796>
- [79] HUANG, Fuhui, Bengao ZHU, Haochen ZHANG, Yue GAO, Chunmei DING, Hong TAN a Jianshu LI. A glassy carbon electrode modified with molecularly imprinted poly(aniline boronic acid) coated onto carbon nanotubes for potentiometric sensing of sialic acid. *Microchimica Acta* [online]. 2019, **186**(5) [cit. 2020-05-11]. DOI: 10.1007/s00604-019-3387-8. ISSN 0026-3672. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00604-019-3387-8>
- [80] MARZOUK, Sayed A.M., Jody D. HADDOW a Amr AMIN. Flow injection determination of sialic acid based on amperometric detection. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2011, **157**(2), 647-653 [cit. 2020-05-11]. DOI: 10.1016/j.snb.2011.05.045. ISSN 09254005. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400511004783>
- [81] ZHANG, Lei, Chao YU, Rufei GAO, Yazhen NIU, Yuliang LI, Jun CHEN a Junlin HE.

An impedimetric biosensor for the diagnosis of renal cell carcinoma based on the interaction between 3-aminophenyl boronic acid and sialic acid. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2017, **92**, 434-441 [cit. 2020-05-11]. DOI: 10.1016/j.bios.2016.10.083. ISSN 09565663. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095656631631123X>