

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2021

Iveta Svobodová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Syntéza a charakterizace hyaluronan vázajících peptidů  
Bakalářská práce

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

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Iveta Svobodová**  
Osobní číslo: **C17219**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Syntéza a charakterizace hyaluronan vázajících peptidů**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

1. Proveďte literární rešerši zaměřenou na hyaluronan vázající peptidy.
2. Připravte sérii krátkých kladně nabitých dipeptidů.
3. Připravené dipeptidy charakterizujte dostupnými fyzikálně-chemickými metodami včetně ověření jejich afinity k hyaluronanu.
4. Vyhodnotit získané výsledky a sepsat bakalářskou práci.

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

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **prof. Ing. Radim Hrdina, CSc.**  
Ústav organické chemie a technologie

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

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji:

Práci s názvem „Syntéza a charakterizace hyaluronan vázajících peptidů“ 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 14. 7. 2021

Iveta Svobodová v.r.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala Ing. Sergeji Karlovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při psaní této práce. Děkuji také společnosti Contipro a.s. za umožnění zpracování experimentální části v jejich laboratořích s odbornou pomocí a za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Na závěr bych chtěla poděkovat panu prof. Ing. Radimu Hrdinovi, CSc. za pomoc při formální úpravě bakalářské práce a za závěrečné hodnocení.

## **ANOTACE**

Byly připraveny dipeptidy obsahující kladně nabitě aminokyseliny v různých kombinacích (arginyl-arginin, arginyl-lysin, lysyl-arginin a lysyl-lysin) metodou syntézy peptidů na pevné fázi s využitím polymerního nosiče typu RinkAmide. Jednotlivé dipeptidy byly čištěny a analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí. U připravených látek byla následně sledována vazebná afinita ke kyselině hyaluronové pomocí fyzikálně-chemických metod. Pro popis vazebných vlastností dipeptidů byla využita HA o dvou různých molekulových hmotnostech. U připravených sloučenin byla pozorována schopnost vázat kyselinu hyaluronovou, což se projevilo ve změně viskozity a hydrodynamického objemu.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

hyaluronan vázající peptidy, syntéza peptidů na pevné fázi, kyselina hyaluronová, dipeptid, DLS, viskozita

## **TITLE**

Synthesis and characterization of hyaluronan binding peptides

## **ANNOTATION**

Dipeptides containing positively charged amino acids in various combinations (arginyl-arginine, arginyl-lysine, lysyl-arginine and lysyl-lysine) were prepared by solid phase peptide synthesis using a RingAmide resin. All dipeptides were purified and analyzed by highly efficient liquid chromatography with mass detection. The binding affinity of prepared substances to hyaluronic acid was then monitored using physicochemical methods. HA of two different molecular weights was used to describe the binding properties of dipeptides. We observed the ability of the prepared compounds to bind hyaluronic acid as viscosity and hydrodynamic volume was affected by the presence of dipeptides.

## **KEYWORDS**

hyaluronan binding peptides, solid phase peptide synthesis, hyaluronic acid, dipeptide, DLS, viscosity

## OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ A SCHÉMAT .....	10
SEZNAM TABULEK.....	11
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK .....	12
ÚVOD .....	13
1 TEORETICKÁ ČÁST .....	14
1.1 Hyaluronan vázající peptidy .....	14
1.1.1 Vazebné motivy HABPs .....	15
1.1.2 Významní zástupci hyaladherinů.....	17
1.1.3 Dipeptid Arg-Arg.....	22
1.2 Kyselina hyaluronová.....	22
1.2.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti HA.....	23
1.2.2 Biosyntéza a degradace hyaluronanu.....	23
1.2.3 Aplikace HA .....	25
1.3 Extracelulární matrix chrupavky .....	25
1.4 Synoviální tekutina.....	26
1.5 Onemocnění pohybového aparátu – osteoartróza .....	28
1.6 Cíle BP .....	32
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	33
2.1 Obecné postupy .....	33
2.2 Syntéza peptidů .....	34
2.2.1 Odštěpení Fmoc-chránící skupiny z nosiče .....	34
2.2.2 Ukotvení první aminokyseliny k nosiči (Fmoc-Xaa <sub>1</sub> -NH-nosič) .....	34
2.2.3 Zablokování nezreagovaných skupin na nosiči .....	35
2.2.4 Odštěpení Fmoc-chránící skupiny (H-Xaa <sub>1</sub> -NH-nosič).....	35
2.2.5 Připojení aminokyseliny k rostoucímu řetězci peptidu na nosiči .....	36
2.2.6 Odštěpení peptidu z nosiče .....	37
2.3 Purifikace peptidů .....	39
2.3.1 Příprava vzorků.....	39
2.3.2 Vlastní purifikace.....	39
2.3.3 Isolace peptidu po purifikaci.....	40
2.4 Fyzikálně-chemické metody .....	41
2.4.1 Dynamický rozptyl světla .....	41
2.4.2 Reologická měření .....	43



3	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	45
3.1	Syntéza peptidů a jejich purifikace .....	45
3.2	Interakce HA s peptidy – DLS a reologie .....	48
4	ZÁVĚR.....	55
	POUŽITÁ LITERATURA.....	56

## SEZNAM OBRÁZKŮ A SCHÉMAT

<b>SCHÉMA 1</b> SCHÉMATICKÉ ZNÁZORNĚNÍ ARG-ARG.....	22
<b>SCHÉMA 2</b> STRUKTURA OPAKUJÍCÍ SE DISACHARIDOVÉ JEDNOTKY HA.....	22
<b>SCHÉMA 3</b> STRUKTURA FMOC-RINK AMIDE AM NOSIČE VČETNĚ JEHO SCHÉMATICKÉHO ZJEDNODUŠENÍ.....	33
<b>OBRÁZEK 1</b> PŘEHLED ZÁSTUPCŮ HABP A JEJICH ROZDĚLENÍ.....	15
<b>OBRÁZEK 2</b> TERCIÁRNÍ STRUKTURA LINK MODULU SE SCHEMATICKÝM ZNÁZORNĚNÍM A- HELIXŮ A $\beta$ -SKLÁDANÝCH LISTŮ .....	16
<b>OBRÁZEK 3</b> TYPY LINK MODULU .....	17
<b>OBRÁZEK 4</b> STRUKTURA TRANSMEMBRÁNOVÝCH RECEPTORŮ CD 44 A LYVE-1 .....	18
<b>OBRÁZEK 5</b> STRUKTURA RECEPTORU RHAMM .....	19
<b>OBRÁZEK 6</b> SCHEMATICKÉ ZNÁZORNĚNÍ LEKTIKANŮ .....	21
<b>OBRÁZEK 7</b> BIOSYNTETICKÁ CESTA KYSELINY HYALURONOVÉ V S. ZOOEPICEMICU.....	24
<b>OBRÁZEK 8</b> STRUKTURA ENZYMU HYALURONIDÁZY hHYAL-1 .....	25
<b>OBRÁZEK 9</b> POHLED DO TYPICKÉHO SYNOVIÁLNÍHO KLOUBU SE VŠEMI HLAVNÍMI STRUKTURAMI.....	27
<b>OBRÁZEK 10</b> SOUHRN PŘÍČIN BOLESTÍ U OA .....	29
<b>OBRÁZEK 11</b> STRUKTURA PŘIPRAVENÝCH DIPEPTIDŮ.....	38
<b>OBRÁZEK 12</b> DLS DATA PRO SYSTÉM 10 MG/ML 79 kDa HA VE VODĚ S RŮZNOU KONCENTRACÍ PEPTIDU RR. ....	42
<b>OBRÁZEK 13</b> DLS DATA PRO SYSTÉM 10 MG/ML 79 kDa HA VE VODĚ S RŮZNOU KONCENTRACÍ PEPTIDU KK. ....	42
<b>OBRÁZEK 14</b> DLS DATA PRO SYSTÉM 10 MG/ML 79 kDa HA VE VODĚ S RŮZNÝMI PEPTIDY O KONCENTRACI 2 MG/ML. ....	43
<b>OBRÁZEK 15</b> SCHÉMATICKÉ ZNÁZORNĚNÍ PRŮBĚHU SPPS.....	45
<b>OBRÁZEK 16</b> MOŽNÉ INTERMOLEKULÁRNÍ INTERAKCE MOLEKUL DIPEPTIDU KR V PŘÍPADĚ VOLNÉ C-TERMINÁLNÍ KARBOXYLOVÉ SKUPINY.....	46
<b>OBRÁZEK 17</b> MOŽNÉ INTRAMOLEKULÁRNÍ INTERAKCE MOLEKUL DIPEPTIDU KR V PŘÍPADĚ VOLNÉ C-TERMINÁLNÍ KARBOXYLOVÉ SKUPINY.....	46
<b>OBRÁZEK 18</b> STRUKTURA POUŽITÝCH CHRÁNĚNÝCH AMINOKYSELIN: FMOC-Lys(Boc)-OH (VLEVO) A FMOC-ARG(Pbf)-OH (VPRÁVO).....	47
<b>OBRÁZEK 19</b> UKÁZKA CHROMATOGRAMU.....	48
<b>OBRÁZEK 20</b> PŘEDPOKLÁDANÉ MOŽNÉ REAKCE PEPTIDU S HA.....	49
<b>OBRÁZEK 21</b> ZÁVISLOST SPECIFICKÉ VIZKOZITY ROZTOKU HA O KONCENTRACI 10 MG/ML (Mw 79 kDa) NA KONCENTRACI RŮZNÝCH PEPTIDŮ. ....	50
<b>OBRÁZEK 22</b> ZÁVISLOST SPECIFICKÉ VIZKOZITY ROZTOKU HA O KONCENTRACI 10 MG/ML (Mw 1,01 MDA) NA KONCENTRACI RŮZNÝCH PEPTIDŮ. ....	51
<b>OBRÁZEK 23</b> ZÁVISLOST SPECIFICKÉ VIZKOZITY ROZTOKU HA O KONCENTRACI 5 MG/ML (Mw 1,01 MDA) NA KONCENTRACI RŮZNÝCH PEPTIDŮ. ....	52
<b>OBRÁZEK 24</b> POROVNÁNÍ INTERAKČNÍHO PARAMETRU PRO RŮZNÉ SYSTÉMY A PEPTIDY O KONCENTRACI 2 MG/ML. ....	53

## SEZNAM TABULEK

TABULKA 1 SLOŽENÍ SYNOVIÁLNÍ TEKUTINY .....	28
TABULKA 2 SEZNAM HLAVNÍCH KOMERČNĚ DOSTUPNÝCH VISKOSUPLEMENTŮ.....	31
TABULKA 3 NAVÁŽKY FMOC-XAA <sub>1</sub> -OH .....	35
TABULKA 4 STANOVENÁ ABSORBANCE VZNIKLÉHO KOMPLEXU DIBENZOFULVEN-PIPERIDIN A VYPOČTENÝ STUPEŇ SUBSTITUCE NAVÁZANÉ AMINOKYSELINY XAA <sub>1</sub> .....	36
TABULKA 5 NAVÁŽKY FMOC-XAA <sub>2</sub> -OH .....	37
TABULKA 6 STANOVENÁ ABSORBANCE VZNIKLÉHO KOMPLEXU DIBENZOFULVEN-PIPERIDIN A VYPOČTENÝ STUPEŇ SUBSTITUCE NAVÁZANÉ AMINOKYSELINY XAA <sub>2</sub> .....	37
TABULKA 7 PŘÍPRAVA VZORKŮ K PURIFIKACI .....	39
TABULKA 8 PODMÍNKY PRO PURIFIKACI.....	40
TABULKA 9 PŘEHLED PŘIPRAVENÝCH PEPTIDŮ .....	40
TABULKA 10 JEDNOTLIVÉ KONCENTRACE A NAVÁŽKY PŘIPRAVENÝCH ROZTOKŮ PEPTIDŮ .....	41
TABULKA 11 STANOVENÁ SPECIFICKÁ VIZKOZITA A VYPOČÍTANÁ $\Delta$ PRO DIPEPTID <b>RR</b> .....	44
TABULKA 12 STANOVENÁ SPECIFICKÁ VIZKOZITA A VYPOČÍTANÁ $\Delta$ PRO DIPEPTID <b>KK</b> .....	44
TABULKA 13 STANOVENÁ SPECIFICKÁ VIZKOZITA A VYPOČÍTANÁ $\Delta$ PRO DIPEPTID <b>KR</b> .....	44
TABULKA 14 STANOVENÁ SPECIFICKÁ VIZKOZITA A VYPOČÍTANÁ $\Delta$ PRO DIPEPTID <b>RK</b> .....	44

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AMK	aminokyselina
Da	jednotka molekulové hmotnosti, $1 \text{ Da} = 1,66 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$
DCM	dichlormethan
DEE	diethyl ether
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropylkarbodiimid
DLS	dynamický rozptyl světla
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DODT	3,6-dioxaoktan-1,8-dithiol
ECM	extracelulární matrix
ER	endoplasmatické retikulum
ESI	elektrosprejová ionizace
Glc	D-glukóza
HA	kyselina hyaluronová
HABPs	hyaladheriny, hyaluronan vázající peptidy
HASs	hyaluronansyntázy
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IHABP	intracelulární hyaluronan vázající peptidy
I $\alpha$ I	inter-alpha-inhibitor
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
MS	hmotnostní spektrometrie
M <sub>w</sub>	molekulová hmotnost
OA	osteoartróza
Pbf	2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	fosfátem pufovaný solný roztok
PDA	detektor diodového pole
PVDF	polyvinylidín fluorid
SPPS	syntéza peptidů na pevné fázi
ST	synoviální tekutina
TFA	kyselina trifluoroctová
TIS	triisopropylsilan

## ÚVOD

Kyselina hyaluronová (hyaluronan, HA) hraje významnou roli v biologických procesech, a z tohoto důvodu je hojně využívána pro přípravu hydrogelů, scaffoldů a dalších biokompatibilních látek. Tyto produkty často obsahují i „umělé“ materiály, jako je polyethylenglykol nebo methakryláty, které jsou jen obtížně odbouratelné. Proto je snahou připravit materiál pouze z biologických komponent přítomných v tkáních a extracelulární matrix.

Hyaladheriny (hyaluronan vázající peptidy, HABPs) představují peptidy a receptory schopné vázat kyselinu hyaluronovou. Tento typ vazby je založen na elektrostatické interakci mezi karboxylovou skupinou kyseliny hyaluronové a postranními skupinami bazických aminokyselin hyaladherinů (Arg a Lys). Synteticky připravené komplexy HA-peptid slouží převážně k přípravě hydrogelů a dalších biokompatibilních materiálů vhodných pro tkáňové inženýrství a biomedicínské aplikace. Získané poznatky rovněž přispívají k pochopení funkce HA a procesů probíhajících v extracelulárním prostoru.

Definováním a přípravou peptidů, ať již známých sekvencí (receptory, fragmenty) nebo peptidů syntetizovaných *de novo*, lze modulovat komplex HA-peptid spojený fyzikální interakcí a připravit hydrogel, který bude napodobovat složením extracelulární matrix. Takto vzniklý komplex většinou splňuje požadavky na stabilitu a možnost odbourání skrze základní biochemické dráhy bez tvorby vedlejších toxických produktů nebo vzniku zánětu.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

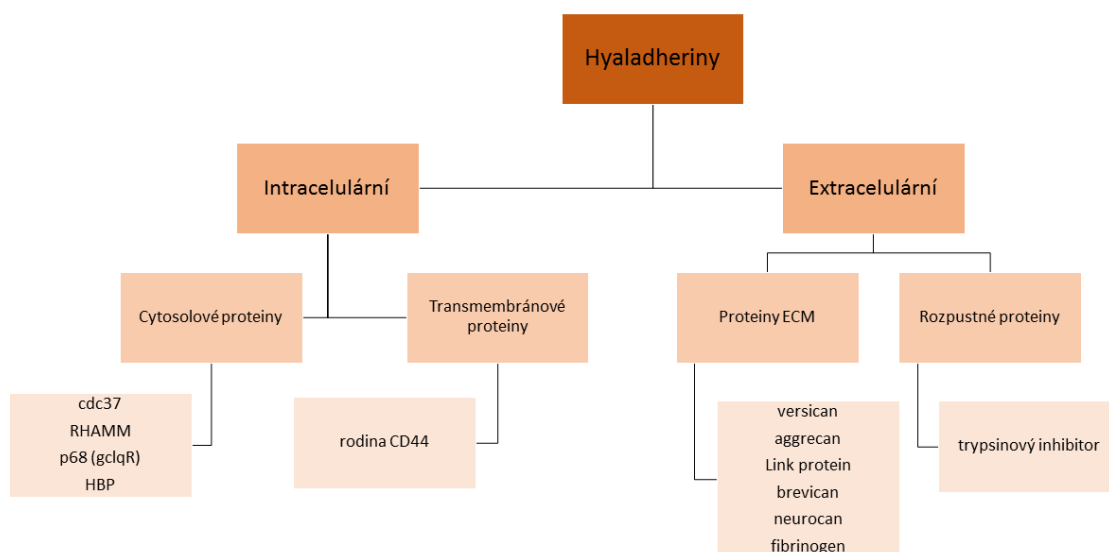
V současnosti se v populaci stále častěji vyskytují onemocnění pohybového aparátu, ať už jako důsledek úrazů či stárnutí a degradace složek synoviální tekutiny. Hlavními způsoby léčby jsou potom fyzioterapie, podání farmakologických přípravků a v nejhorších případech náhrada kloubu. Jedním z novějších léčebných postupů je snaha suplementovat synoviální tekutinu postiženého kloubu a obnovit tak její původní složení.

V této souvislosti se hovoří o využití hyaladherinů, tedy peptidů a receptorů, které jsou schopné vázat kyselinu hyaluronovou. Ze synteticky připraveného komplexu HA-peptid lze poté připravit hydrogel, který bude svým složením napodobovat extracelulární matrix a zároveň bude splňovat požadavky na stabilitu a biodegradabilitu.

## 1.1 Hyaluronan vázající peptidy

Hyaladheriny neboli hyaluronan vázající peptidy (hyaluronan binding proteins, HABPs) reprezentují skupinu proteinů, které jsou schopné za určitých podmínek vázat hyaluronan (HA).<sup>1</sup> Mezi hlavní zástupce (**Obrázek 1** na následující straně) patří receptory RHAMM, CD44 a LYVE-1, které se podílí na buněčné signalizaci, dále enzymy hyaluronan syntázy HASa-1, HASa-2 a HASa-3 a hyaluronidázy Hyal-1, Hyal-2, Hyal-3 a PH-20 (degradace HA).<sup>2</sup> Společným znakem těchto proteinů je přítomnost kladně nabitých postranních řetězců aminokyselin (AMK), které interagují se záporně nabitou karboxylovou skupinou HA.<sup>1</sup> Důležitou roli potom hraje modifikace postranních řetězců aminokyselin (sulfatace, glykosilace) i typ buněk, kde je hyaladherin exprimován.<sup>3</sup> Podstatná je i samotná HA a její vlastnosti (zejména délka polymerního řetězce a s tím spojená molekulová hmotnost či prostorové uspořádání). Minimální délka nezbytná pro vazbu hyaladherinů se v literatuře uvádí jako 6 – 10 dimerních podjednotek.<sup>4</sup>

Hyaluronan vázající peptidy je možné rozdělit na základě vazebných motivů v sekvenci proteinu. Doposud byly popsány 2 vazebné motivy – Link modul a BX<sub>7</sub>B motiv. Bylo zjištěno, že i dipeptid Arg-Arg interaguje s karboxylovou skupinou HA, avšak tato interakce je nespecifická a může k ní docházet i s dalšími záporně nabitými glykosaminoglykany.<sup>5</sup> U všech popsaných HABPs je však nezbytná přítomnost bazických aminokyselin, zejména argininu a lysinu, jejichž postranní řetězce interagují s karboxylovou skupinou HA.<sup>4,6,7</sup>



**Obrázek 1** Přehled zástupců HABP a jejich rozdělení, upraveno dle cit.<sup>8</sup>

### 1.1.1 Vazebné motivy HABPs

#### 1.1.1.1 BX<sub>7</sub>B

Jeden z hlavních vazebných motivů představuje BX<sub>7</sub>B, kde na pozici B jsou umístěny bazické aminokyseliny (arginin a/nebo lysin) oddělené 7 kódovanými aminokyselinami kromě kyseliny glutamové a asparagové.<sup>9,10</sup> Bylo potvrzeno, že interakce HA s RHAMM je elektrostatické povahy a konformační změny nemají na interakci vliv, jelikož k vazbě dochází i s denaturovaným a redukováným RHAMM receptorem.<sup>10</sup>

Kromě sekvencí přirozeně se vyskytujících v proteinech byly studovány i *de novo* připravené varianty a jejich vliv na interakci k HA. Byla uvažována i záměna za histidin na pozici B v BX<sub>7</sub>B, avšak vzniklá sekvence byla vůči HA inertní.<sup>9</sup> Ziebell a kol. zjistili, že je možné do těchto motivů vložit i D-AMK, přičemž takto modifikované sekvence vykazují větší flexibilitu a počet konformačních stavů peptidu, a tím i vyšší afinitu k HA.<sup>11</sup> Dále je možné zvýšit afinitu, pokud budou do sekvence umístěny i další bazické aminokyseliny a tím zvýšena nábojová hustota.<sup>9</sup>

Přestože v řadě proteinů obsahujících vazebný motiv BX<sub>7</sub>B (např. SPACR, CDC37 a P-32) lze předpokládat afinitu k HA, je nutné komplex HA-HABPs experimentálně potvrdit. Sekvence vazebného motivu ve struktuře proteinu/peptidu tedy automaticky neznamená, že se jedná o zástupce hyaladherinů.<sup>12</sup>

### 1.1.1.2 Link modul

Link modul je protein o sekvenci obsahující asi 100 aminokyselin a tvořící 2  $\alpha$ -helixy a 2 antiparalelní  $\beta$ -listy, které jsou uspořádány kolem hydrofobního jádra (**Obrázek 2**). Jeho terciární struktura je stabilizována 2 disulfidovými můstky. Zástupci, pro které je tento motiv charakteristický, jsou například receptor CD44, hyaluronektin, lektikany, TSG-6, LYVE-1, versican a aggrecan.<sup>4,7</sup>



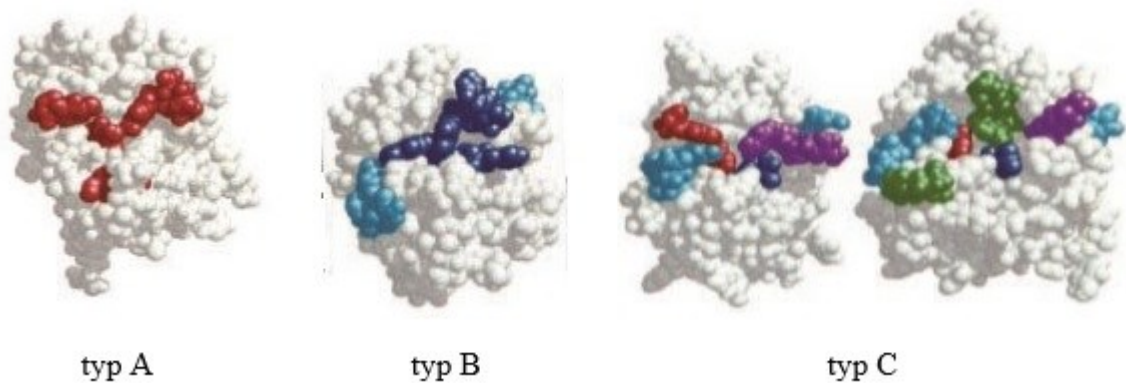
**Obrázek 2** Terciární struktura Link modulu se schematickým znázorněním  $\alpha$ -helixů a  $\beta$ -skládaných listů, převzato z cit.<sup>7</sup>

Podle velikosti se rozlišují celkem 3 typy Link modulů (**Obrázek 3**):

- Nejjednodušší variantou je typ A, který je součástí TSG-6 proteinu a je tvořený pouze jednoduchým Link modulem o 90 AMK.<sup>13</sup> Z krystalové struktury typu A byly odvozeny i zbylé 2 typy, ty však doposud nebyly potvrzeny experimentálně.
- Typ B, který byl nalezen v CD44, obsahuje navíc C- a N-koncové prodloužení a je tvořen ze 150 aminokyselinových residuí. Prodloužení navíc vytváří čtvrtý řetězec  $\beta$ -listu I a je stabilizováno prostřednictvím třetího disulfidového můstku mezi Cys<sup>28</sup> a Cys<sup>129</sup>.<sup>14</sup>
- Typ C představuje komplex 2 Link modulů (200 AMK) v Link proteinu a lektikanech.



Předpokládá se, že velikost vazebné domény, potažmo typ Link modulu, souvisí s délkou HA řetězce, který dané typy Link modulu rozeznávají – např. hexasacharid HA6 představuje minimální délku pro vazbu Link modulu typu A, na rozdíl od HA10, který je nejkratším oligosacharidem vázajícím typ C. V případě oligomerů s více než 20 jednotkami HA dochází k souběžné interakci se dvěma molekulami CD44.<sup>7,13,15</sup>

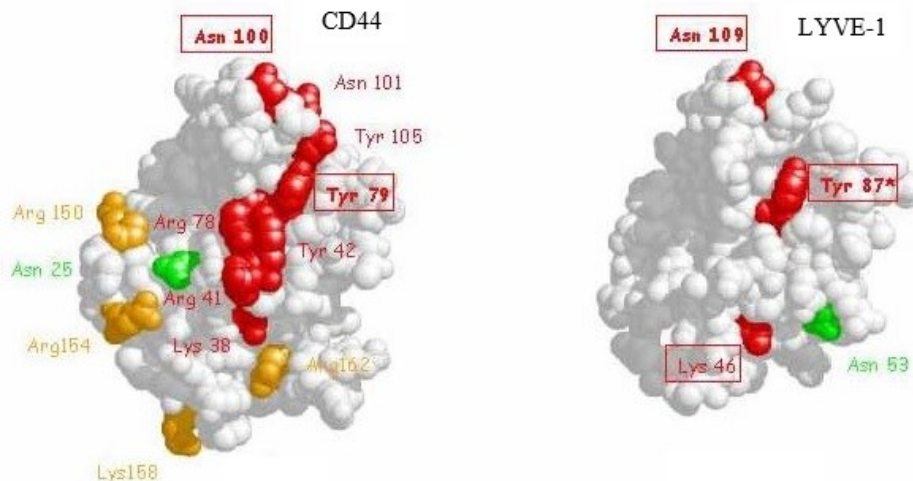


**Obrázek 3** Typy Link modulu, upraveno dle cit.<sup>7</sup>

## 1.1.2 Významní zástupci hyaladherinů

### 1.1.2.1 CD44 a LYVE-1

CD44 je ubiquitovaný protein, který se vyskytuje na povrchu většiny buněk v organismu (**Obrázek 4**) a je nejběžnějším receptorem (nejběžnější forma u savců má molekulovou hmotnost 85 kDa). Je přítomný téměř ve všech lidských buňkách, vitálních i rakovinných. Jedná se o transmembránový receptor typu I, existující v nejméně 10 modifikacích. Komplex CD44-HA se uplatňuje při připojení, organizaci a přeměně ECM na povrchu buněk a při zánětu ovlivňuje migraci lymfocytů.<sup>16,17</sup>



**Obrázek 4** Struktura transmembránových receptorů CD 44 a LYVE-1, upraveno z cit.<sup>18</sup>

Receptor CD44 představuje řadu funkcí na buněčné úrovni, zejména organizaci, připojení a přeměnu extracelulární matrix (ECM), komunikaci a transport signálů z ECM do buňky<sup>19,20</sup>, dále se podílí na migraci lymfocytů do oblasti zánětu.<sup>21</sup>

Alternativní sestřih celkem 10 různých exonů, které kódují receptor CD44, vede k expresi různých isoform tohoto proteinu nejen na povrchu vitálních, ale i rakovinných buněk.<sup>22,23</sup> Při interakci s HA hraje kromě isoformy, respektive primární aminokyselinové sekvence, svou roli také oligomerizace proteinu, jeho posttranslační modifikace (glykosilace a acylace)<sup>21,24</sup> a v neposlední řadě i buněčný typ, na jehož povrchu je CD44 exprimován.<sup>23,25</sup> Podle výsledků<sup>14</sup> je pro interakci důležitý i redoxní stav proteinu – redukce disulfidových můstků mezi <sup>77</sup>Cys a <sup>97</sup>Cys\* vede k destabilizaci vazebného místa a zrušení interakce s HA.

Receptor LYVE-1 je sekvenčním homologem CD44 (**Obrázek 4**), který má obdobný mechanismus působení a regulace buněčných pochodů.<sup>26</sup> Jeho exprese je převážně v endotheliu lymfatických žil, kde zajišťuje internalizaci a degradaci HA<sup>27</sup>, čímž se podílí na udržení homeostázy HA v tkáních. Nicméně na rozdíl od ostatních HABPs byla u LYVE-1 zjištěna schopnost tvořit homodimer pomocí disulfidového můstku, čímž získá až 15× vyšší afinitu k hyaluronanu v porovnání s monomerní formou. Další faktory, které ovlivňují interakci, jsou např. zvýšená exprese tohoto receptoru<sup>28</sup>, tvorba oddělených klastrů z LYVE-1 na povrchu buněk a sialylace<sup>29</sup>.

\* index před označením cysteinu značí jeho pozici v peptidovém řetězci, tj. <sup>77</sup>Cys je 77. aminokyselinou v sekvenci daného peptidu/proteinu

### 1.1.2.2 RHAMM

Receptor RHAMM (z anglického Receptor for Hyaluronan Mediated Motility, **Obrázek 5**) se v organismu vyskytuje ve dvou isoformách – extracelulární a intracelulární. Jelikož se vyskytuje převážně uvnitř buněk, bývá často označován i jako IHABP (intracellular hyaluronan binding protein) nebo CD168.<sup>17</sup> Extracelulární RHAMM funguje jako koreceptor, který podmiňuje signální dráhy až po vazbě na integrální receptory.<sup>30</sup> RHAMM se v podobě receptoru podílí na proliferaci, diferenciaci a lokomoci buněk. Po navázání extracelulární HA je vzniklý komplex HA-RHAMM transportován z endocytosolu do buňky, kde se váže na mikrotubuly BRCA 1 a BRCA 2.<sup>31</sup> Při transportu do extracelulárního prostoru interaguje s CD44 a následně se tento komplex váže na HA a aktivuje nitrobuňkové signální cesty.<sup>10</sup>



**Obrázek 5** Struktura receptoru RHAMM, převzato z cit.<sup>7</sup>

Cytosolová forma se podílí na stabilizaci cytoskeletu, kdy interaguje s makromolekulami aktinu a mikrotubulů.<sup>32,33</sup> Během buněčného cyklu se účastní tvorby mitotického vřeténka.<sup>30,34</sup> Extracelulární varianta RHAMM, v porovnání s CD44 obsahující transmembránovou doménu, je na buněčný povrch připojena pomocí integrálních proteinů nebo proteinů vázaných na glykosylfosfatidylinositol (GPI kotva).<sup>33</sup> Yang a kol. popsali přítomnost dvou BX<sub>7</sub>B motivů na C-konci RHAMM zodpovědných za vazbu k HA.<sup>10</sup> Tyto úseky jsou navíc oddělené leucinovým zipem.<sup>11</sup>

Za fyziologických podmínek je tento receptor exprimován v relativně malém množství, zvýšená sekrece je charakteristická pro hojení ran, v místě zánětu<sup>25</sup> a při tumorové neoplastické progresi a metastazování.<sup>30,34,35,36</sup>

### 1.1.2.3 IαI a TSG-6

Proteiny rodiny IαI (inter-alpha-inhibitor) tvoří komplexní molekuly z chondroitin sulfátu, na který se připojují 2 těžké řetězce (HC) a na *N*-konec je ukotven bikunin (dimer ze 2 Kunitzových jednotek). Bikunin inhibuje serinové proteázy, s nimiž tvoří kovalentní komplex, a tím chrání tkáň v místě zánětu.<sup>37</sup> IαI brání reaktivním formám kyslíku v depolymerizaci vysokomolekulární HA v synoviální tekutině u pacientů trpících artritidou.<sup>38</sup>

Doposud byly popsány dva způsoby vazby IαI k HA, buď kovalentně pomocí esterové vazby, nebo elektrostaticky. Kovalentní vazba se uplatňuje při stabilizaci ECM, zvýšení afinity makromolekul a jejich agregaci v matrix.<sup>37</sup>

Při tvorbě komplexu IαI-HA funguje protein TSG-6 jako katalyzátor. Reakce probíhá během 2 transesterifikačních kroků, nejprve dochází k transferu HC z chondroitin sulfátu na TSG-6 za vzniku reaktivního intermediátu a poté k transportu na HA. Vzniklý komplex IαI-HA je mnohem stabilnější než výchozí IαI-chondroitin sulfát.<sup>37</sup> Tato remodelace TSG-6 v ECM se uplatňuje i při ovulaci a v místě zánětu.<sup>39,40</sup>

Navzdory relativně malé znalosti funkce TSG-6 se jedná o jeden z nejlépe prostudovaných hyaladherinů z hlediska interakce s HA. TSG-6 je sekretován při zánětlivém podnětu.<sup>15</sup> Podílí se i na regulaci migrace leukocytů, kdy po adhezi buněk na komplex TSG-6-HA dochází k jejich inaktivaci.<sup>4</sup> Link modul byl použit jako modelový systém pro sledování vlivu afinity k HA v závislosti na iontové síle a pH, kdy se nejvíce uplatňuje His na pozici 45.<sup>41</sup> Při bodové mutaci His<sup>45</sup> za Ser byl pozorován pokles na méně než poloviční afinitu k HA.<sup>42</sup> Dále byl studován vliv délky řetězce HA a hybridních oligosacharidů obsahujících chondroitin sulfát a typ tkáně, kde je TSG-6 exprimován.<sup>13</sup>

### 1.1.2.4 CEMIP

Protein CEMIP (dříve známý také jako KIAA1199) ovlivňuje buněčnou migraci a ve fibroblastech degraduje HA. V endoplasmatickém retikulu (ER) vytváří komplex s imunoglobulinovým vazebným proteinem (BiP), což má za následek uvolnění Ca<sup>2+</sup> iontů z ER. Zvýšení hladiny Ca<sup>2+</sup> v cytosolu vede k aktivaci proteinkinázy C a následně k buněčné

migraci.<sup>43</sup> Podle Yoshidy a kol. je protein CEMIP zásadní pro katabolismus HA v kůži a synoviálních fibroblastech odebraných pacientům s osteoartritidou a revmatem.<sup>44</sup>

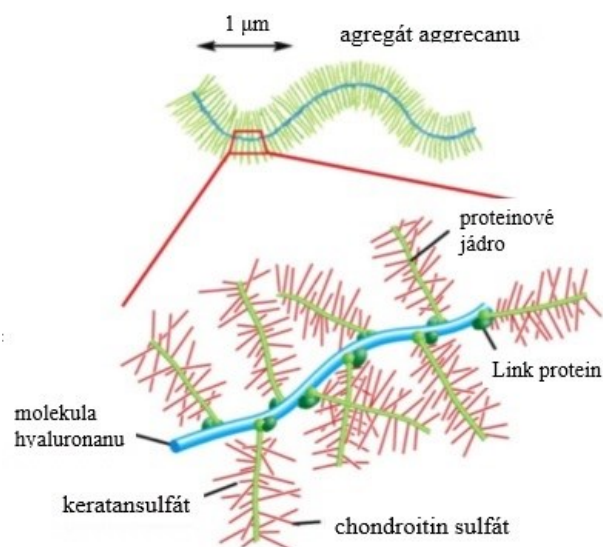
Z pohledu patofyziologie podmiňuje bodová mutace genu CEMIP ztrátu sluchu.<sup>45,46</sup>

U rakovinných buněk protein podporuje transformaci z epiteliální formy v agresivnější mezenchiální fenotyp.<sup>43</sup> Uvažuje se jeho využití jako potenciálního markeru pro stanovení rané fáze rakoviny tlustého střeva a žaludku<sup>47</sup> či rakoviny plic.<sup>48</sup>

#### 1.1.2.5 Lektikany

*Aggrecan*, *versican*, *neurocan* a *brevican* představují chondroitin sulfátové proteoglykany (**Obrázek 6**) exprimované zejména v mozkové ECM<sup>15</sup>, které jsou součástí rodiny lektikanových proteinů.<sup>1</sup> Aggrecan se vyskytuje i v chrupavce a ECM dalších tkání.<sup>49,50</sup> Versican je součástí měkkých tkání<sup>51</sup>, srdce a žil.<sup>52</sup>

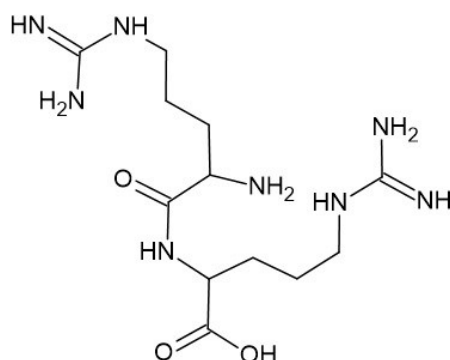
V ECM funguje HA jako scaffold<sup>4</sup>, ke kterému se lektikany připojují pomocí G1 domény, oblast je navíc stabilizována interakcí s Link proteinem.<sup>53,54</sup> Střední část lektikanů představuje úsek, na který jsou přes tyrosinová residua navázány chondroitin sulfát nebo keratin sulfát.<sup>49–51</sup> Takto vzniklý supramolekulární komplex plní obdobné funkce jako cytoskeletární komponenty uvnitř buňky – stabilizuje a udržuje homeostázu ECM, slouží k zachycení vody, iontů, růstových faktorů, chemokinů, aj.<sup>55</sup> V mozkové tkáni jsou navíc přítomny i tenascin R (trimer) a tenascin S (hexamer), které crosslinkují jednotlivé lektikany pomocí protein-protein interakcí.<sup>56</sup>



**Obrázek 6** Schematické znázornění lektikanů, upraveno dle <sup>4</sup>

### 1.1.3 Dipeptid Arg-Arg

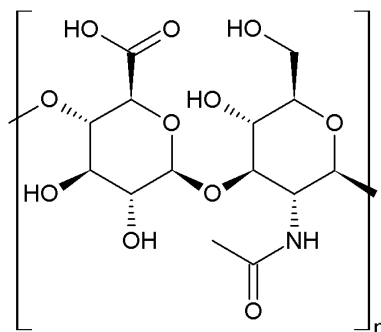
U dipeptidu Arg-Arg (*Schéma 1*) byla také potvrzena schopnost vázat HA, avšak tato sekvence je nespecifická. Navíc nebyl popsán vliv při prodloužení řetězce na N- ani na C-konci na afinitu.<sup>5</sup>



**Schéma 1** Schématické znázornění Arg-Arg

## 1.2 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová je přírodní lineární polysacharid, který se řadí do skupiny glykosaminoglykanů.<sup>57</sup> Vytváří lineární polymerní struktury, přičemž daný řetězec je tvořen opakujícími se disacharidovými jednotkami. Jedna disacharidová jednotka (*Schéma 2*) se skládá z kyseliny D-glukuronové a *N*-acetyl-D-glukosaminu, které vzájemně propojuje  $\beta(1\rightarrow3)$  glykosidická vazba. Tyto disacharidové jednotky jsou pak spojeny  $\beta(1\rightarrow4)$  glykosidickou vazbou v polysacharidovém řetězci.<sup>58,59</sup>



**Schéma 2** Struktura opakující se disacharidové jednotky HA

Poprvé byla pravděpodobně HA zmíněna v roce 1880 francouzským chemikem Portesem.<sup>60</sup> Popsána však byla až v roce 1934 Karlem Mayerem a jeho kolegou Johnem Palmerem, kteří ji izolovali ze sklivce hovězího oka.<sup>61</sup> Postupem času byla HA získávána z mnoha tkání včetně synoviální tekutiny, kohoutích hřebínků či pupeční šňůry.<sup>60</sup> Dále se HA vyskytuje ve větším množství v pokožce, kloubních chrupavkách, plicích či svalových tkáních.<sup>62</sup>

Právě extrakce z živočišných tkání je jedna ze současných metod průmyslové výroby kyseliny hyaluronové, přičemž nejdostupnější zdroje pro výrobu vysokomolekulární HA ve velkém měřítku jsou kohoutí hřebínky či sklivce a synoviální tekutina skotu. Druhou metodou je mikrobiální fermentace pomocí bakteriálních kmenů.<sup>63</sup> K bakteriální fermentaci se nyní používají bakterie *Streptococcus* skupiny C, které nejsou pro lidský organismus patogenní. Hlavním zástupcem této skupiny je *Streptococcus equi*, poddruh *S. zooepidemicus*.<sup>63,64</sup>

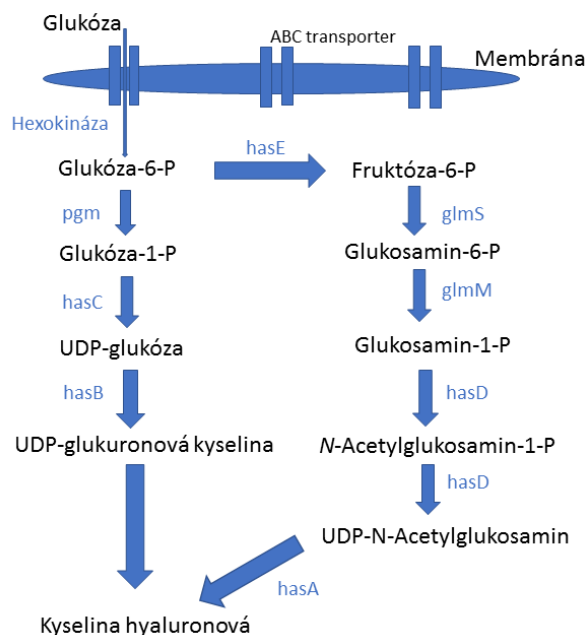
### 1.2.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti HA

Kyselina hyaluronová je biopolymer s jedinečnými fyzikálními a biologickými vlastnostmi. Nejvýraznější vlastností kyseliny hyaluronové je schopnost absorpce vody. Díky sacharidovým podjednotkám je schopna na sebe vázat velké množství vody a vytváří tak velmi viskózní hydrogel v koncentracích  $> 0,2$  mg/ml. Viskozita gelu pak závisí na délce řetězce, zesítnění polymeru, pH a chemické modifikaci.<sup>65</sup>

Fyziologicky HA neexistuje ve formě kyseliny, ale jako sodná sůl.<sup>66</sup> Hyaluronan tedy existuje *in vivo* nikoliv ve formě protonované kyseliny, ale ve formě polyanionu. Každá jeho D-glukuronátová jednotka nese při fyziologickém pH záporný náboj a ten je na karboxylových skupinách vyvážen mobilními kationty, jako je například  $\text{Na}^+$ .<sup>67</sup>

### 1.2.2 Biosyntéza a degradace hyaluronanu

HA je syntetizována na cytoplazmatické membráně vysoce specializovanými membránovými proteiny, tzv. hyaluronansyntázami (HASs)<sup>64</sup> a tento proces je shrnut na následujícím obrázku (**Obrázek 7**).

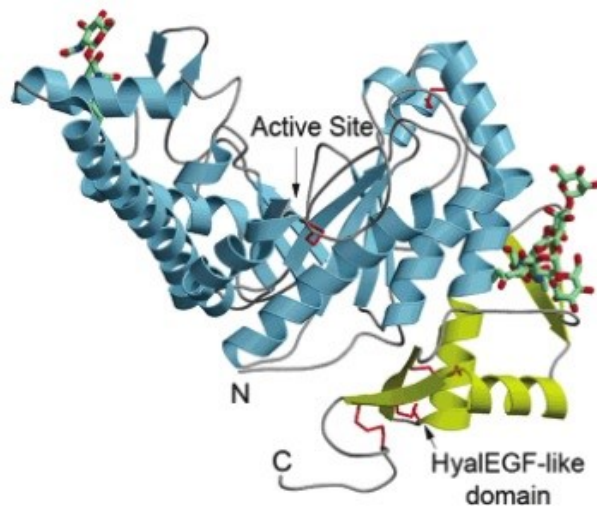


**Obrázek 7** Biosyntetická cesta kyseliny hyaluronové v *S. Zooepicemicu*, převzato z cit.<sup>68</sup>

HA podléhá fragmentaci katabolickým procesem lymfatických uzlin, krve, jater a ledvin, které mají různé biochemické úlohy.<sup>61</sup> Enzymatická degradace HA je u savců výsledkem působení tří typů enzymů: hyaluronidázy (hyázy),  $\beta$ -D-glukuronidázy a  $\beta$ -N-acetylhexosaminidázy. Obecně hyáza štěpí HA s vysokou molekulovou hmotností na menší oligosacharidy, zatímco  $\beta$ -N-acetylhexosaminidáza a  $\beta$ -D-glukuronidáza dále degradují oligosacharidové fragmenty odstraněním neredukujících koncových cukrů.<sup>69</sup>

Hyaluronidáza (**Obrázek 8**) snižuje viskozitu kyseliny hyaluronové, čímž se zvyšuje propustnost pro tkáň. Proto je používána v medicíně ve spojení s jinými léky, aby se urychlil jejich rozptýl. Nejběžnější aplikace je v oční chirurgii, ve které se používá v kombinaci s lokálními anestetiky. Některé bakterie, jako je *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *pneumoniae* a *Clostridium perfringens*, produkují hyaluronidázu jako prostředek zvyšující pohyblivost skrze tkáň těla a jako antigenní převlek, který brání jejich rozpoznání fagocyty imunitního systému.<sup>69</sup>





**Obrázek 8** Struktura enzymu hyaluronidázy hHyal-1, převzato z cit.<sup>70</sup>

### 1.2.3 Aplikace HA

Kyselina hyaluronová je všestranně využitelná látka, jež nachází uplatnění především v medicíně, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Biologické účinky pak závisí na její molekulové hmotnosti.<sup>71</sup>

Ve farmacii se kyselina hyaluronová používá jako účinný nosič pro transport léčiv. Využívá se hlavně její biokompatibilita, biologická rozložitelnost a vysoká kapacita pro cílení na místo potřeby.<sup>61</sup>

V ortopedii se kyselina hyaluronová používá při léčbě poraněné chrupavky nebo šlach či také pro výrobu umělých kostních štěpů.<sup>57</sup> Další způsob, jakým se v ortopedii využívá kyselina hyaluronová, je její injekční podání do kloubů postižených kloubními nemocemi, jako je např. osteoartróza. Tato metoda se nazývá viskosuplementace a v dnešní době se hojně používá jako bezpečná forma lokální léčby osteoartrózy.

## 1.3 Extracelulární matrix chrupavky

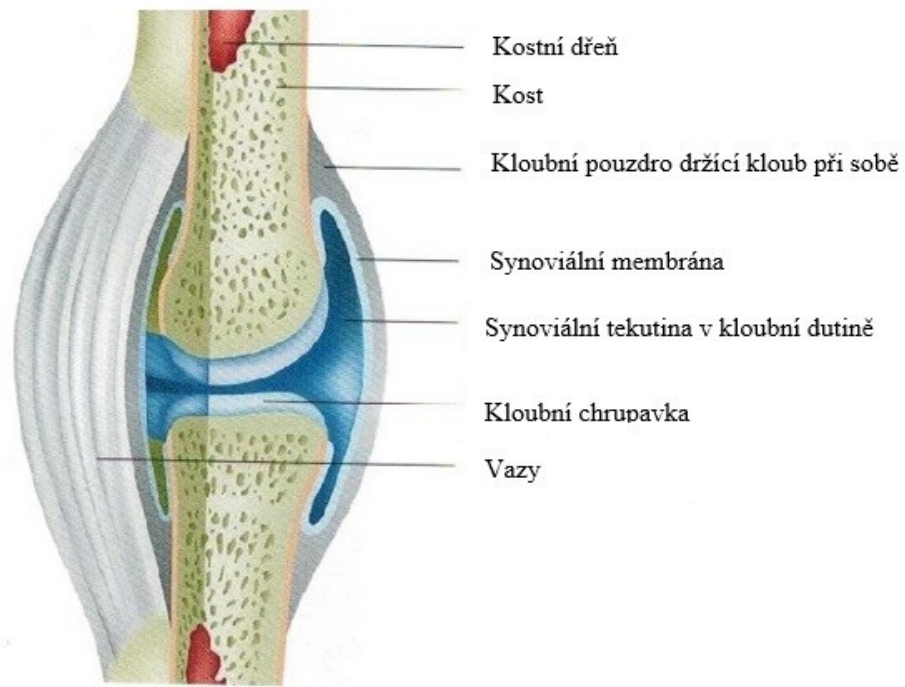
Součástí všech tkání je kromě buněk i extracelulární matrix tvořená směsí proteinů, polysacharidů a vody. Hlavními funkcemi jsou zejména morfologická organizace buněk, udržení homeostázy, retence vody a zajištění mechanické stability orgánů. ECM navíc nefunguje jako statické prostředí, ale dochází zde k neustálé remodelaci matrixovými metaloproteinázami.<sup>72,73</sup>

Složení chrupavky a její ECM je značně odlišné od ostatních tkání, jelikož musí zajišťovat pohyb v oblasti kloubních spojů. Prostředí kolem chondrocytů je bez cévního zásobení a s nízkým obsahem kyslíku, buňky jsou tak závislé převážně na glykolýze. Zvýšená koncentrace kyseliny mléčné v ECM pak snižuje pH<sup>74</sup>, které se pohybuje v rozmezí 6,6 – 6,9. Navíc se v matrix vyskytuje kolagen II a hydrofilní proteoglykany, které fungují jako atraktanty kationtů Na<sup>+</sup> a H<sup>+</sup> a osmoticky váží vodu.<sup>74,75</sup>

U starších buněk klesá exprese spojovacích proteinů (cadherin, catenin, aj.) a senescentní fibroblasty produkují vyšší množství interleukinů, cytokinů, ale i reaktivní formy kyslíku, čímž převádí extracelulární prostředí do stavu chronického zánětu.<sup>76,77</sup> Současně dochází ke zvýšené crosslinkaci kolagenových vláken UV zářením, vedlejšími produkty oxidace lipidů a glykací, a tím i ke snížení pružnosti a mechanické odolnosti.<sup>78</sup> Tento stav může potenciálně vést i ke vzniku zánětu nebo rakoviny a jiných onemocnění.<sup>77</sup>

## 1.4 Synoviální tekutina

Každý kloub v lidském těle (**Obrázek 9**) obsahuje synoviální tekutinu (ST), která slouží jako kloubní mazivo. Je vylučována do kloubní dutiny vnitřní membránou kloubu a množství ST se tak různí podle velikosti kloubů např. kolenní kloub obsahuje cca 3,5 ml synoviální tekutiny.<sup>79</sup> Kloubní tekutina se nazývá synoviální pravděpodobně kvůli její podobnosti s vaječným bílkem.<sup>80</sup> Je to viskózní látka, která má dvě hlavní funkce. Jednak pomáhá při výživě kloubní chrupavky tím, že slouží jako transportní médium pro výživové látky jako je glukóza, a dále se uplatňuje jako mazivo mezi artikulujícími povrchy.<sup>81</sup> Ve zdravých kloubech jsou tedy chrupavka a synoviální tekutina úzce spjaty a společně pracují na zajištění jednoho z nejnižších koeficientů tření, které můžeme v přírodě najít.<sup>79</sup>



**Obrázek 9** Pohled do typického synoviálního kloubu se všemi hlavními strukturami, upraveno z cit.<sup>82</sup>

Složení synoviální tekutiny (**Tabulka 1**) je podobné dialyzátu krevního séra, protože obsahuje stejné elektrolyty a nízkomolekulární látky. Hlavní rozdíl mezi nimi je však obsah proteinů a hyaluronanu. Právě vysoká koncentrace HA má velký podíl na viskozitě synoviální tekutiny. Synoviální tekutina zdravého člověka je většinou bezbarvá, popř. lehce nažloutlá a čirá. Jestliže se ovšem jeví jinak, může to značit různá onemocnění.<sup>81,80</sup>

**Tabulka 1** Složení synoviální tekutiny, upraveno z cit. <sup>80,81,83</sup>

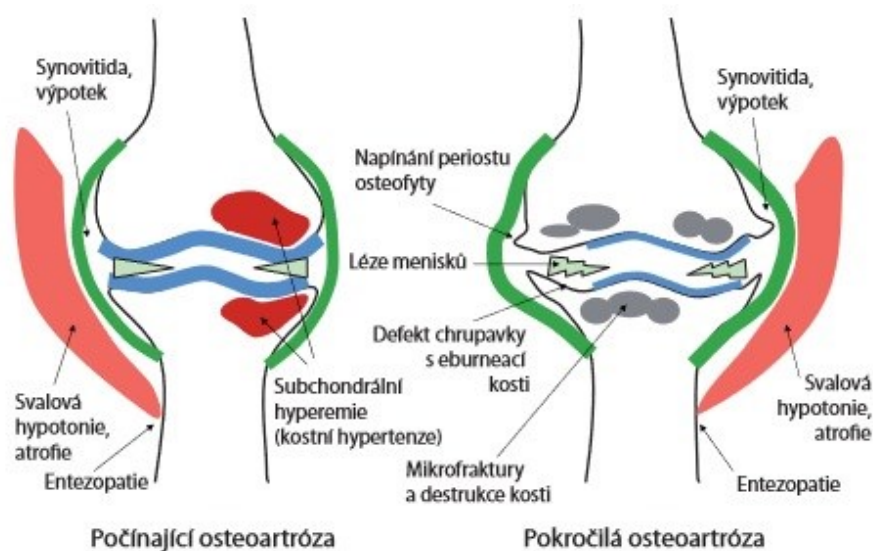
Složka	Poznámka
Proteiny	Obvyklý obsah v ST je 1000-3000 mg/dl. Zvýšené hodnoty při artritidě, dně či ulcerózní kolitidě.
Lipidy	Fosfolipidy v ST tvoří s proteiny tzv. lubricin, ten přispívá ke snížení tření.
Glukóza	Obsah Glc v ST by se měl vztahovat k hodnotám v séru (3,9-5,6 mmol/l). Velký pokles hodnot při kloubních onemocněních, která jsou klasifikována jako infekční (př. trauma, degenerativní změny, operační výkon).
Kyselina močová	Normální hodnoty v rozmezí 6-8 mg/dl. Přítomnost v ST ukazuje na onemocnění dnou.
Kyselina mléčná	Měření hodnot může pomoci při diagnostice artrózy. Normální hodnoty do 25 mg/dl. U kloubu postiženého artrózou až 1000 mg/dl.
Laktátdehydrogenáza (LD)	Enzym zapojený do metabolismu cukrů. Její hodnoty může zvyšovat artritida či dna.
Revmatoidní faktor (RF)	Tuto látku produkuje především lymfatická tkáň v kostní dřeni, lymfatických uzlinách slezině a v zánětem postiženém kloubu.
Kyselina hyaluronová	Přibližná koncentrace v ST je 250 mg/dl. Průměrná molekulová hmotnost ve zdravých kloubech je 3-5 MDa. V případě kloubního onemocnění se koncentrace a Mw kys. hyaluronové v ST snižuje.

## 1.5 Onemocnění pohybového aparátu – osteoartróza

Onemocnění kloubů a kostí se nejčastěji objevuje s přibývajícím věkem, jelikož kloubní degenerace je fyziologický proces stárnutí.<sup>84</sup> Mezi nejčastější onemocnění pohybového aparátu patří artritida, artróza či osteoporóza a za příčiny se většinou uvádí opotřebovanost kloubů, úrazy, záněty, hormonální nerovnováha či obezita. Základní prevencí je tedy dostatek přiměřeného pohybu, zdravá životospráva a vyvážená strava. Onemocnění kloubů je v populaci velmi rozšířeným problémem, proto je předmětem zájmu mnoha odborníků. V této práci se zaměřím na jedno z nejběžnějších onemocnění pohybového aparátu, tj. osteoartrózu, která souvisí se synoviální tekutinou, jejím složením, věkem a případnou léčbou, jež je v přímém kontextu s kyselinou hyaluronovou a hyaluronan vázajícími peptidy.

Artróza, jinak zvaná také osteoartróza (OA), degenerativní artritida a v anglické literatuře osteoarthritis, je nejčastějším onemocněním periferních kloubů. Uvádí se 60 % výskyt mezi 55. a 64. rokem a dokonce 80 % u osob starších 75 let.<sup>84</sup>

Věkem dochází ke stárnutí kloubní chrupavky, k poruše metabolismu její mezibuněčné hmoty a zhoršení její kvality.<sup>84</sup> V důsledku zvýšené degradace a nedostatečné novotvorby se snižuje množství a molekulová hmotnost proteoglykanů, je poškozena kolagenní síť a zvyšuje se obsah vody. První obtíže ale začne pacient pociťovat teprve při postižení ostatních kloubních tkání. Bolest vzniká v kloubu např. při zmnožení nitrokloubní tekutiny (intraartikulární výpotek), zánětlivé reakci kloubního pouzdra (synovitida), v počátečních stádiích OA nebo při obnažení či destrukci subchondrální kosti u pokročilé OA.<sup>85</sup> Právě bolest (**Obrázek 10**) a v pozdější době ztuhlost, omezená hybnost a nestabilita v postiženém kloubu jsou hlavními příznaky osteoartrózy, které přivádějí pacienta k lékaři.<sup>86</sup>



**Obrázek 10** Souhrn příčin bolestí u OA, převzato z cit.<sup>85</sup>

Osteoartrózu rozlišujeme podle více aspektů:

- dle rozsahu poškození může být monoartikulární, postihující pouze jeden kloub a polyartikulární, postihující dva a více kloubů.
- dle příčiny se potom dělí na primární a sekundární. Primární osteoartróza je častější a příčinou je stárnutí chrupavky. Typická je pro starší populaci. U sekundární osteoartrózy je určitý příčinný faktor, který nastartuje nebo urychlí proces degenerace. V současné době je jednou z hlavních příčin zvýšená celková zátěž na klouby, kam se řadí hlavně obezita.<sup>84</sup>

Léčba osteoartrózy je vždy komplexní a dělí se na nefarmakologickou, farmakologickou a operační. Terapie vychází z dlouhodobých zkušeností, kde základem jsou vyšetření, režimová opatření, léky na bolest a podpůrné pomůcky, berle a ortézy.<sup>85</sup>

Základem léčby je edukace pacienta, úprava životosprávy, pravidelné cvičení, popř. použití opěrných pomůcek. Dále se může přistoupit k fyzikální terapii (aplikace tepla/chladu) či akupunktúře. V horších případech se pak přistupuje k farmakologické léčbě<sup>85</sup>, kde jsou využívána analgetika, nesteroidní antirevmatika (NSA), kortikoidy a pomalu působící léky pro osteoartrózu (SYSADOA).<sup>84</sup>

Hlavním účelem konvenční léčby osteoartrózy je omezení bolesti. Nejběžnější nechirurgická léčba zahrnuje použití nesteroidních protizánětlivých léků (NSAIDs) a intraartikulární injekce s kyselinou hyaluronovou. Tento způsob léčby se nazývá viskosuplementace.<sup>79</sup>

Cílem viskosuplementace je redukovat bolest a obnovit reologické vlastnosti synoviální tekutiny.<sup>79</sup> ST je důležitá složka funkčního kloubu, která vyživuje kloubní chrupavku, podněcuje proliferaci a diferenciaci chondrocytů a redukuje tření mezi kloubními chrupavkami. Hlavní složkou ST přispívající k její viskoelasticitě je vysokomolekulární HA (> 1000 kDa). Ta může být v důsledku stárnutí či zánětu rozkládána hyaluronidázami na nízkomolekulární fragmenty.<sup>87</sup> Snížená molekulová hmotnost a koncentrace kyseliny hyaluronové poté způsobuje zhoršení elastických a viskózních vlastností synoviální tekutiny.<sup>79</sup>

Dodávání vysokomolekulární HA do synoviální tekutiny pacientů s artrózou zlepšuje lubrikaci kloubů, snižuje jejich bolest a také zánět.<sup>87,88</sup> Tato metoda je vhodná pro pacienty, kteří nemohou podstoupit ortopedickou operaci, mají zvýšený risk gastrointestinálních komplikací, užívají kortikosteroidy či antikoagulanty, jsou kuřáci či prošli selháním ledviny.<sup>89</sup>

Viskosuplementy jsou používány pro svou schopnost zmírnění bolesti a zlepšení pohyblivosti kloubů u pacientů s osteoartrózou tím, že obnovují fyziologickou homeostázu postiženého kloubu a obnovují reologické vlastnosti synoviální tekutiny. Hlavní faktor zodpovědný za zlepšení viskoelastických vlastností ST je komplex HA-HABPs.<sup>79</sup>

Komerčně dostupné viskosuplementy se liší v molekulové hmotnosti, ve vazbě molekul a dalších parametrech. Jedny z prvních komerčně dostupných přípravků s nízkomolekulární HA byly Hyalgan® a Artz®, dostupné v roce 1986. Později se na trhu objevilo několik dalších přípravků pro pomoc pacientům trpícím osteoartrózou.<sup>79</sup>

**Tabulka 2** Seznam hlavních komerčně dostupných viskosuplementů, upraveno z cit.<sup>79</sup>

Přípravek	Molekulární hmotnost [kDa]	Zdroj HA	koncentrace [mg/ml]
Hyalgan®	500 – 730	kohoutí hřebínky	10
Synvisc®	6000 – 7000	bakterie	8
Monovisc®	1000 – 2900	bakterie	20
Viscoseal®	1600	bakterie	10
Suprahyal®	500 – 1000	bakterie	10
Euflexxa®	2400 – 3600	bakterie	1
Geloren active®	nenalezeno	nenalezeno	60 mg v denní dávce

Viskosuplementace těmito přípravky je v léčbě osteoartrózy kolenních kloubů účinná. Pozitivně ovlivňuje bolest, funkci kloubů i celkový stav pacienta a toto zlepšení není pozorováno pouze bezprostředně po aplikaci, ale přetrvává 5 – 13 týdnů po poslední aplikaci.<sup>86</sup> V léčivých přípravcích se kyselina hyaluronová vyskytuje jako sodná sůl. Externě aplikovaná do kloubů při osteoartróze se HA používá již přes 25 let.<sup>86</sup>

## 1.6 Cíle BP

Vzhledem k výše uvedené literární části je zřejmé, že je snahou výrazně ovlivnit život pacientů trpících osteoartrózou a to tak, aby nebyla nutná každodenní farmakologická léčba. Z toho důvodu, a jak bylo v poslední části popsáno, je snaha vyvinout takový lubrikační prostředek, který se co nejvíce přiblíží „přírodní“ synoviální tekutině a zabezpečí správnou a dlouhotrvající lubrikaci kloubů. Jedním z možných přístupů je využít hyaluronan vázající peptidy, které jsou v synoviální tekutině přítomny, a využít jejich syntetické formy pro přípravu nových viskosuplementačních materiálů.

Cíle této bakalářské práce lze shrnout do následujících bodů:

- 1) příprava 4 dipeptidů, které ve své struktuře obsahují kladně nabitě aminokyseliny (lysin a arginin)
- 2) vyčištění a analýza připravených dipeptidů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí
- 3) popis vazebné afinity připravených dipeptidů ke kyselině hyaluronové s různou délkou polymerního řetězce

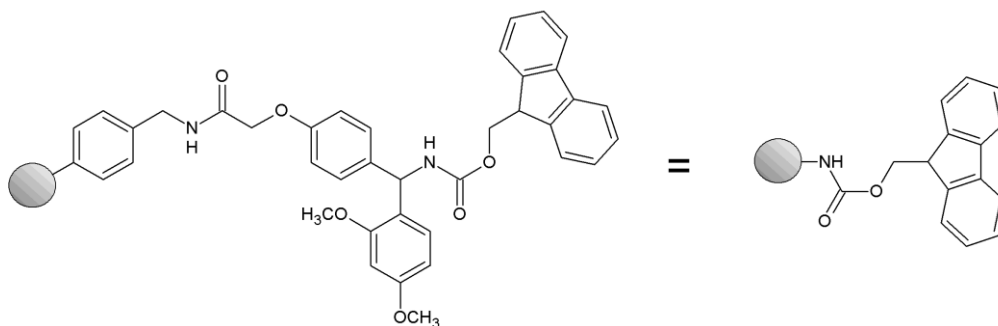


## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Obecné postupy

Pro syntézu peptidů byly používány skleněné stříkačky s kohoutem (Fortuna®) o objemu 100 ml. Stříkačky byly vybaveny propylenovou fritou o nejtěsnějším průměru stříkačky (reaktoru).

Do reaktoru byl předložen polymerní nosič (Fmoc-Rink Amide AM, *Schéma 3*) v potřebném množství. Vzhledem ke změnám objemu pryskyřice v závislosti na zvoleném rozpouštědle je množství použitého nosiče limitováno objemem reaktoru. Do 100ml skleněného reaktoru je možné předložit maximálně 7 g nosiče. Veškeré reakce (štěpení chránících skupin, kondenzační reakce a promývání řadou rozpouštědel) se provádějí přímo v reaktoru. Rozpouštědla a reakční roztoky se nasávají, pryskyřice je promývána rozpouštědly a je filtrována protlačováním suspenze přes fritu, následné kondenzace jsou prováděny v uzavřeném reaktoru. Po ukončení přípravy chráněného peptidu na nosiči je provedeno koncové promytí a peptidyl-pryskyřice se vysuší obvykle proudem vzduchu. Odštěpení peptidu z nosiče je provedeno přímo v reaktoru za použití odpovídajícího štěpného koktejlu, kterým je většinou směs TFA a vhodných ochranných látek (scavengerů). Jsou tak vyloučeny mechanické ztráty vznikající přenosem hmot. Míchání reakční směsi je zajištěno umístěním reaktoru na třepače.<sup>90,91</sup>



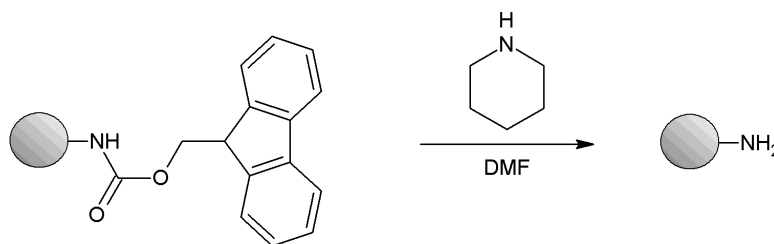
**Schéma 3** Struktura Fmoc-Rink Amide AM nosiče včetně jeho schématického zjednodušení

Hodnota substituce S (v mmol/g) polymerního nosiče po připojení C-koncového derivátu aminokyseliny se sledovala pomocí Fmoc „release“ testu.<sup>92,93</sup>

K monitorování průběhu syntézy peptidů na pevné fázi byl použit ninhydrinový (Kaiser) test.<sup>94</sup>

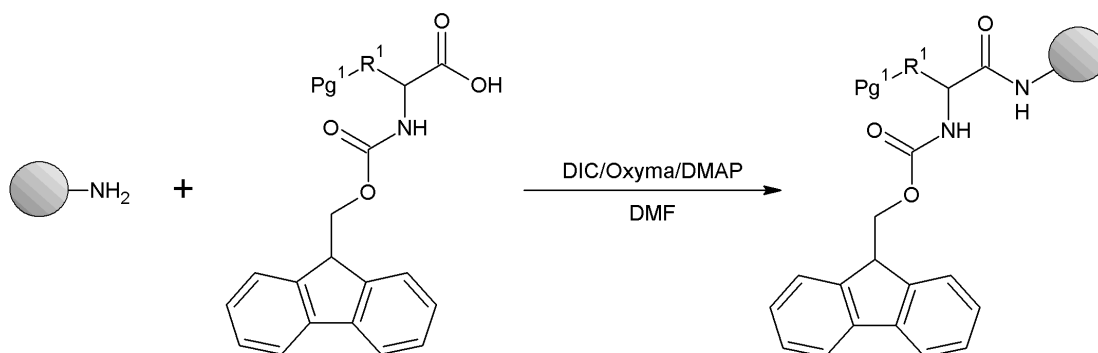
## 2.2 Syntéza peptidů

### 2.2.1 Odštěpení Fmoc-chránící skupiny z nosiče



Do reaktoru byl předložen Fmoc-Rink Amide AM (5 g; 4,4 mmol, S = 0,88 mmol/g), převrstven 50 ml DMF a míchán 30 min při laboratorní teplotě, aby došlo k jeho nabotnání. Rozpouštědlo bylo odfiltrováno a bylo přidáno 50 ml 20% roztoku piperidinu v DMF. Reakce probíhala 30 min za laboratorní teploty a pak byla ukončena odfiltrováním reakčního roztoku. Nosič byl následně promyt 3× DMF, 3× DCM a 3× DMF. Takto připravený substrát byl použit pro další kroky syntézy.

### 2.2.2 Ukotvení první aminokyseliny k nosiči (Fmoc-Xaa<sub>1</sub>-NH-nosič)

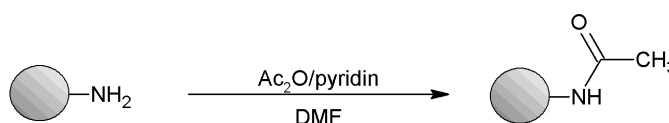


Do reaktoru k promytému nosiči byla předložena Fmoc-Xaa<sub>1</sub>-OH (navážky v **Tabulka 3**; 22 mmol), OxymaPure® (3,13 g; 22 mmol) a DMAP (0,161 g; 1,3 mmol) a bylo doplněno nejmenším možným množstvím DMF (peptide grade) tak, aby došlo k rozpuštění reagentů a zároveň se reakční směs s nerozpustným nosičem šetrně míchala. K suspenzi nosiče a reakčních složek byl dále přidán DIC (3,4 ml; 22 mmol) pro aktivaci karboxylové skupiny připojované aminokyseliny. Reakce probíhala za laboratorní teploty přes noc, pak byla ukončena odfiltrováním reakčního roztoku. Nosič byl následně promyt 3× DMF, 3× DCM a 3× DMF. Takto připravený substrát byl použit pro další kroky syntézy.

**Tabulka 3** Navážky Fmoc-Xaa<sub>1</sub>-OH

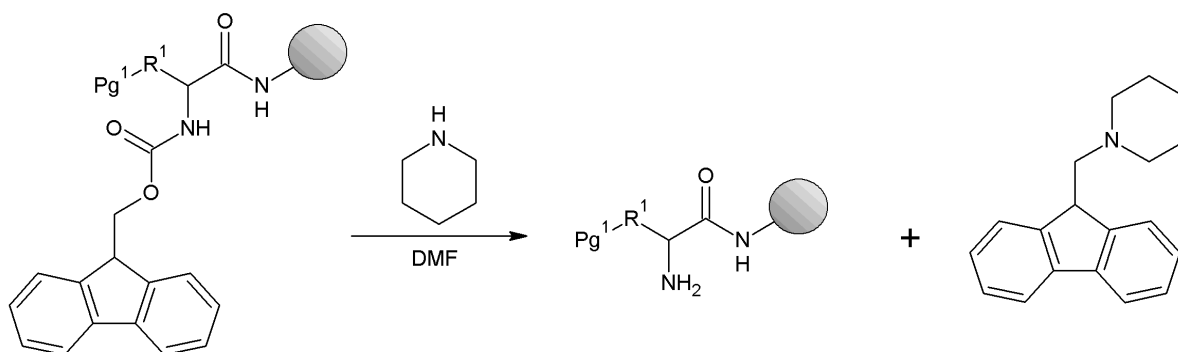
Peptid	Aminokyselina Xaa <sub>1</sub>	Navážka [g]
<b>KK</b>	Fmoc-Lys(Boc)-OH	10,31
<b>KR</b>	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	14,27
<b>RK</b>	Fmoc-Lys(Boc)-OH	10,31
<b>RR</b>	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	14,27

### 2.2.3 Zablokování nezreagovaných skupin na nosiči



Do reaktoru obsahující Fmoc-Xaa<sub>1</sub>-NH-nosič připravený podle postupu 2.2.2 bylo přidáno rozpouštědlo (30 ml DMF), pyridin (1,1 ml; 13 mmol) a acetahydrid (1,3 ml; 13 mmol). Acetylace probíhala po dobu 30 min za laboratorní teploty, pak byla ukončena odfiltrováním reakčního roztoku. Nosič byl následně promyt 3× DMF, 3× DCM a 3× DMF. Takto připravený substrát byl použit pro další kroky syntézy.

### 2.2.4 Odštěpení Fmoc-chránící skupiny (H-Xaa<sub>1</sub>-NH-nosič)



Do reaktoru obsahující Fmoc-Xaa<sub>1</sub>-NH-nosič připravený podle postupu 2.2.2 se zablokovanými nezreagovanými skupinami na nosiči podle postupu 2.2.3 byl přidán 20% roztok piperidinu v DMF. Reakce probíhala 5 min za laboratorní teploty. Reakce byla následně opakována s prodloužením doby štěpení na 20 min a pak byla ukončena odfiltrováním reakčního roztoku. Jednotlivé frakce po štěpení byly jímány do graduované nádoby a promyty DMF na požadovaný objem vztažený ke graduaci zvolené nádoby. Roztok získaný po štěpení

Fmoc-chránící skupiny (vzniklý dibenzofulven-piperidin komplex) byl spektrofotometricky analyzován při 300 nm po 100-násobném zředění (*Tabulka 4*). Substituce aminokyseliny na nosiči byla vypočtena podle následujícího vzorce:

$$S = \frac{\text{Abs} \cdot V [\text{ml}]}{7800 \cdot m [\text{g}]} \cdot 100$$

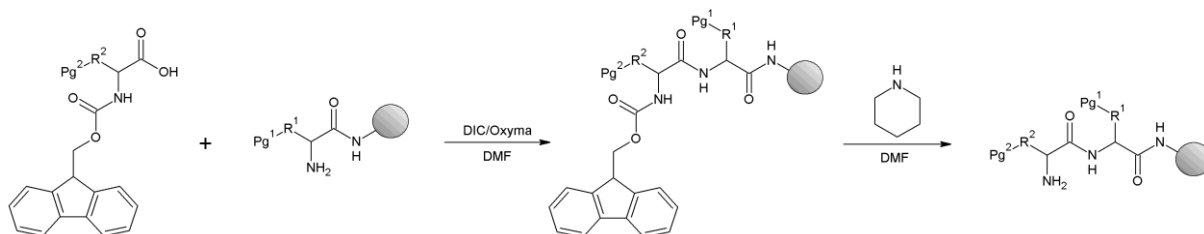
kde **S** je stupeň substituce v mmol/g, **Abs** je absorbance stanovená proti standardu (DMF) při 300 nm, **V** je celkový objem vzorku a **m** je vstupní hmotnost použitého nosiče.

**Tabulka 4** Stanovená absorbance vzniklého komplexu dibenzofulven-piperidin a vypočtený stupeň substituce navázané aminokyseliny Xaa<sub>1</sub>

Peptid	Absorbance deFmoc1	Substituce [mmol/g]
<b>KK</b>	1,347	0,8632
<b>KR</b>	1,402	0,8812
<b>RK</b>	1,342	0,8593
<b>RR</b>	1,343	0,8592

Nosič byl následně promyt 3× DMF, 3× DCM a 3× DMF. Takto připravený substrát byl použit pro další kroky syntézy.

### 2.2.5 Připojení aminokyseliny k rostoucímu řetězci peptidu na nosiči



Aminokyselina Fmoc-Xaa<sub>2</sub>-OH (navážky v *Tabulka 5*; 13 mmol) byla předložena na promytý nosič (H-Xaa<sub>1</sub>-NH-nosič), byla přidána OxymaPure® (1,88 g; 13 mmol) a doplněno nejmenším možným množstvím DMF (peptide grade) tak, aby došlo k rozpuštění reagentů a zároveň se reakční směs s nerozpustným nosičem šetrně míchala. K suspenzi nosiče a reakčních složek byl dále přidán DIC (2,0 ml; 13mmol) pro aktivaci karboxylové skupiny aminokyseliny. Reakce

probíhala za laboratorní teploty minimálně 2 h. Průběh reakce byl sledován prostřednictvím Kaiser testu. Reakce byla ukončena odfiltrováním reakčního roztoku. Nosič byl následně promyt 3× DMF, 3× DCM a 3× DMF.

**Tabulka 5** Navážky Fmoc-Xaa<sub>2</sub>-OH

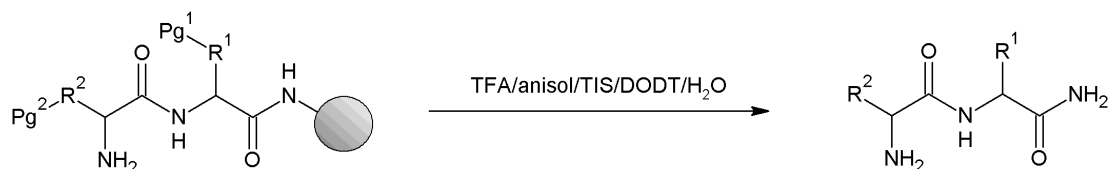
Peptid	Aminokyselina Xaa <sub>2</sub>	Navážka [g]
<b>KK</b>	Fmoc-Lys(Boc)-OH	6,19
<b>KR</b>	Fmoc-Lys(Boc)-OH	6,19
<b>RK</b>	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	8,56
<b>RR</b>	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	8,56

Po ukotvení druhé aminokyseliny byla odštěpena Fmoc-chránící skupina podle postupu 2.2.3. (*Tabulka 6*).

**Tabulka 6** Stanovená absorbance vzniklého komplexu dibenzofulven-piperidin a vypočtený stupeň substituce navázané aminokyseliny Xaa<sub>2</sub>

Peptid	Absorbance deFmoc2	Substituce [mmol/g]
<b>KK</b>	1,342	0,8598
<b>KR</b>	1,317	0,8274
<b>RK</b>	1,325	0,8486
<b>RR</b>	1,278	0,8174

### 2.2.6 Odštěpení peptidu z nosiče

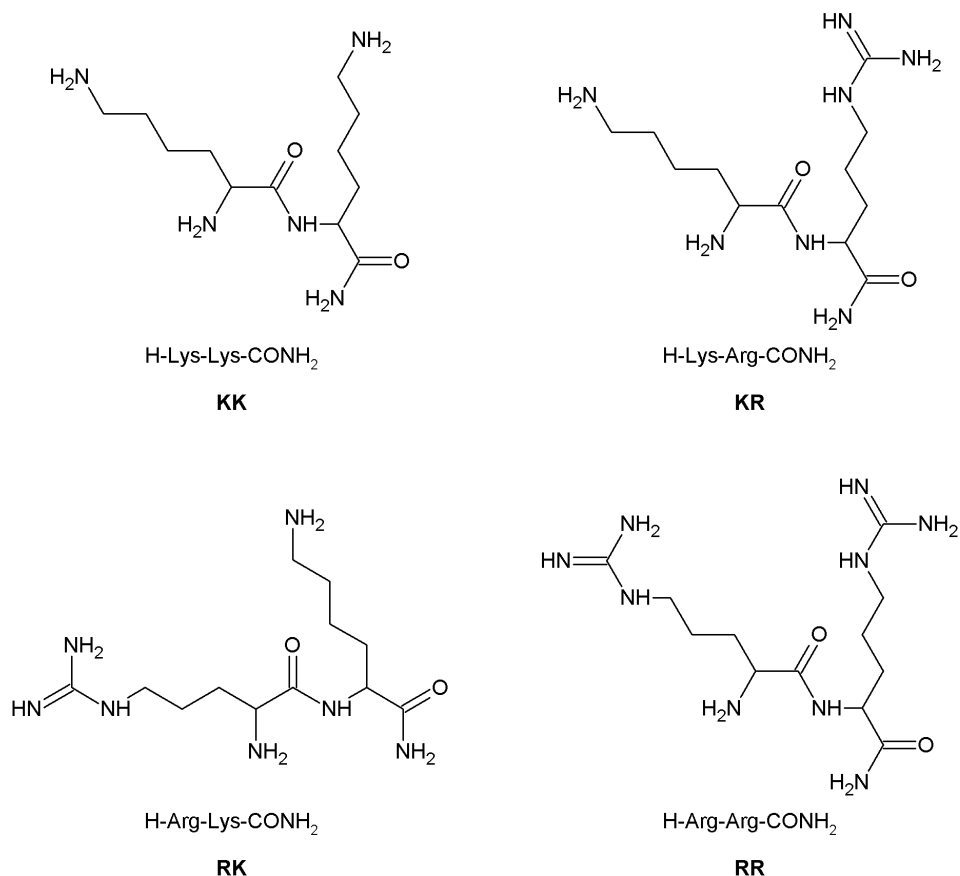


Před koncovým odštěpením dipeptidu z nosiče bylo provedeno koncové promytí 3× DCM a 3× DEE. Následně byl nosič vysušen proudem vzduchu. Štěpení bylo provedeno zvoleným štěpným roztokem o složení TFA/anisole/TIS/DODT/H<sub>2</sub>O (85/5/5/3/2 = v/v). Reakce probíhala

po dobu 2 hod, pak byla ukončena odfiltrováním reakčního roztoku. Reakce byla opakována po dobu 1 hod a pak byla opět ukončena odfiltrováním. Nosič byl promyt 1× TFA a 3× DCM. Roztok byl odpařen na rotační vakuové odparce až do minimálního objemu. K ochlazenému destilačnímu zbytku byl přidán diethylether. Vyloučený produkt byl filtrován přes fritu porozity S4 a zbytková rozpouštědla byla odstraněna v exsikátoru. Takto připravený surový peptid byl předán k purifikaci pomocí HPLC.

Výše uvedenými metodami byly připraveny 4 dipeptidy (**Obrázek 11**):

- lysyl-lysin-amid (H-Lys-Lys-CONH<sub>2</sub>, **KK**)
- lysin-arginin-amid (H-Lys-Arg-CONH<sub>2</sub>, **KR**)
- arginyl-lysin-amid (H-Arg-Lys-CONH<sub>2</sub>, **RK**)
- arginyl-arginin-amid (H-Arg-Arg-CONH<sub>2</sub>, **RR**)



**Obrázek 11** Struktura připravených dipeptidů

## 2.3 Purifikace peptidů

Purifikace peptidů byla provedena pomocí RP-HPLC na preparativním chromatografu vybaveném vysokotlakými pumpami, schopnými pracovat v gradientovém módu, autosamplerem, PDA a MS detektorem a sběračem frakcí: LC-MS Shimadzu 2020. Mobilními fázemi byly: A = 0,1% HCOOH ve vodě; B = acetonitril.

### 2.3.1 Příprava vzorků

Surový peptid byl rozpuštěn v příslušném rozpouštědle na danou koncentraci (*Tabulka 7*). Roztok byl přefiltrován pomocí injekční stříkačky přes 0,45  $\mu\text{m}$  PVDF filtr.

**Tabulka 7** Příprava vzorků k purifikaci

Označení peptidu	Sekvence peptidu	Rozpouštědlo	Koncentrace [mg/ml]
<b>KK</b>	H-KK-NH <sub>2</sub>	1:4 ACN:H <sub>2</sub> O	100
<b>KR</b>	H-KR-NH <sub>2</sub>	50% ACN	100
<b>RK</b>	H-RK-NH <sub>2</sub>	50% ACN	100
<b>RR</b>	H-RR-NH <sub>2</sub>	50% DMF	75

### 2.3.2 Vlastní purifikace

Typ kolony: kolona XBridge PREP C18 5 $\mu\text{m}$  OBD™ 50 × 50 mm

Průtok mobilní fáze: 30 ml/min

Podmínky jsou shrnuty v následující tabulce (*Tabulka 8*).

Detekce probíhala pomocí PDA detektoru při vlnové délce 210 nm a MS s ESI ionizací. Daná frakce peptidu byla sbírána pomocí automatického sběrače frakcí podle záznamu z chromatografu. Posbírané frakce byly shromažďovány do skleněné lahve Duran odpovídajícího objemu a značeny.

**Tabulka 8** Podmínky pro HPLC purifikaci

	<b>KK</b>		<b>KR</b>		<b>RK</b>		<b>RR</b>	
Gradient	Čas [min]	% B	Čas [min]	% B	Čas [min]	% B	Čas [min]	% B
	3,00	0,1	3,00	0,1	3,00	0,1	3,00	1,0
	7,00	2	7,00	2	7,00	2	7,00	5,0
	7,30	75	7,30	75	7,30	75	7,30	75
	9,30	75	9,30	75	9,30	75	9,30	75
	12,00	0,1	12,00	0,1	12,00	0,1	12,00	1,0
Nástrík [ $\mu$ l]	2000		2000		2000		2000	
Sběr frakce [min]	1,50 – 2,75		1,67 – 2,93		1,60 – 2,80		1,69 – 2,06	

### 2.3.3 Isolace peptidu po purifikaci

Purifikovaný peptid byl odpařen na rotační vakuové odparce dosucha. Následně byl 3× promyt destilovanou H<sub>2</sub>O a znovu odpařen na minimální objem, který byl kvantitativně převeden do PP nádoby na odběr vzorků adekvátní velikosti, zaparafilmován a zamražen. Zamražený vzorek, s otvory vytvořenými pomocí sterilní jehly v parafilmu, byl lyofilizován po dobu minimálně 2 dnů.

U připraveného vzorku byla na závěr provedena kontrola čistoty pomocí analytického RP-HPLC. Přehled připravených peptidů shrnuje **Tabulka 9**.

**Tabulka 9** Přehled připravených peptidů

Peptid	M <sub>w</sub>	m <sub>T</sub> [g]	m [g]	Výtěžek [%]
<b>KK</b>	274,36	2,4156	1,4574	60
<b>KR</b>	302,37	2,7144	1,2412	46
<b>RK</b>	302,37	2,6634	2,0993	79
<b>RR</b>	330,39	2,9132	0,1950	7



## 2.4 Fyzikálně-chemické metody

Byl připraven 2% roztok nativní HA rozpuštěním 2 g nativní HA s molekulovou hmotností 79 kDa v 100 ml demineralizované vody (demi-voda). Byl také připraven roztok vysokomolekulární HA o koncentraci 10 mg/ml, resp. 20 mg/ml rozpuštěním 1 g HA s molekulovou hmotností 1,01 MDa ve 100 ml, resp. 50 ml demi-vody.

Byly připraveny roztoky peptidů v demi-vodě. Jednotlivé koncentrace a navážky jsou uvedeny v tabulce níže:

**Tabulka 10** Jednotlivé koncentrace a navážky připravených roztoků peptidů

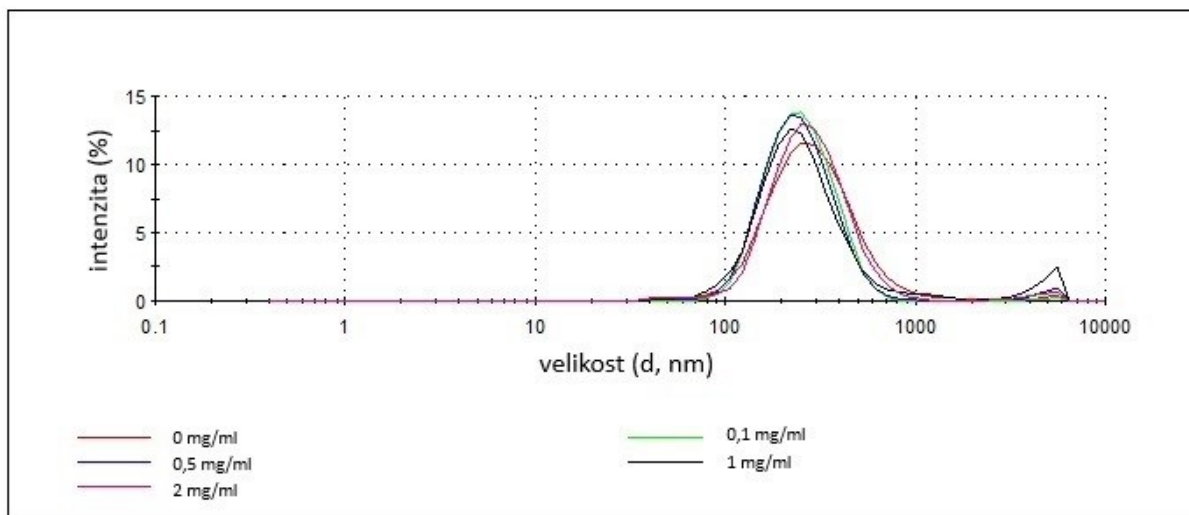
Koncentrace	KK [mg]	KR [mg]	RK [mg]	RR [mg]	H <sub>2</sub> O [ml]
2 mg/ml	9,55	10,3	9,92	10,3	5
1 mg/ml	5,02	5,16	5,41	4,61	5
0,5 mg/ml	5,15	5,39	4,64	5,56	10
0,1 mg/ml	2,81	2,79	2,47	2,68	25

Roztok peptidu byl následně smíchán s roztokem HA v různých kombinacích.

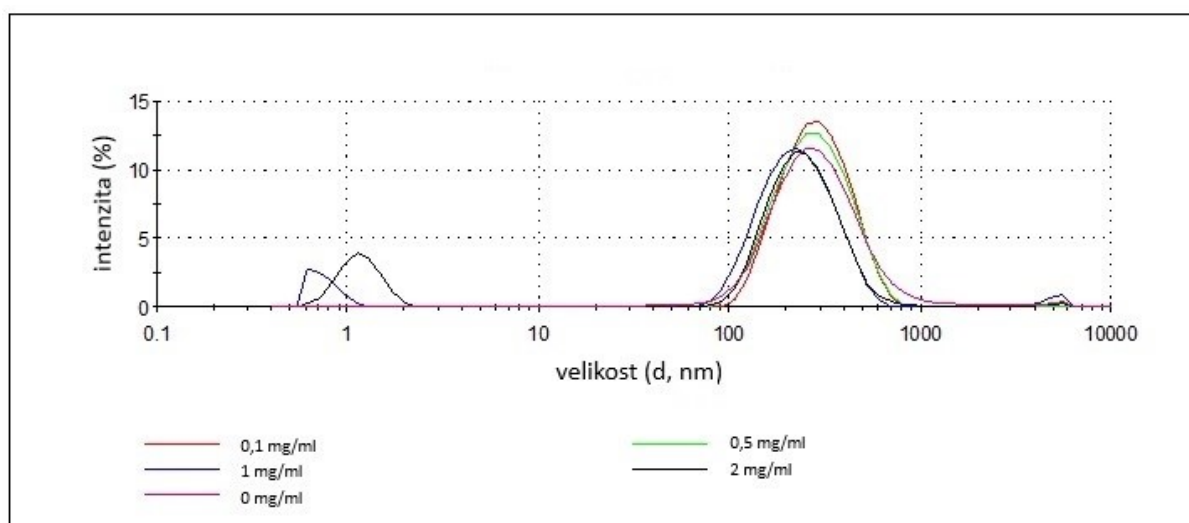
Některé vzorky s vyšší molekulovou hmotností a koncentrací byly příliš viskózní, proto mohlo dojít k nepřesnostem při pipetování. Z časových důvodů byl tento problém vyřešen mírným zahřátím některých roztoků.

### 2.4.1 Dynamický rozptyl světla

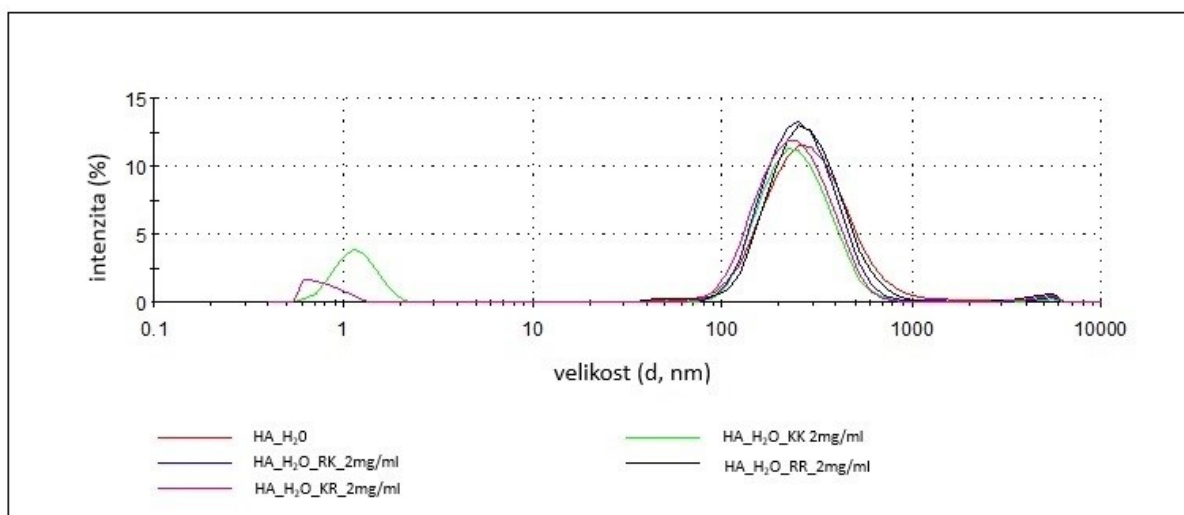
Stanovení dynamického rozptylu světla (DLS) bylo provedeno na Zetasizer Nano-ZS od firmy Malvern Instruments ve 20 opakováních s 10 běhy a zprůměrováno pro každý vzorek. DLS odezva byla vztažena k viskozitě vzorků a interpretována podle intenzity.



**Obrázek 12** DLS data pro systém 10 mg/ml 79 kDa HA ve vodě s různou koncentrací peptidu RR.



**Obrázek 13** DLS data pro systém 10 mg/ml 79 kDa HA ve vodě s různou koncentrací peptidu KK.



**Obrázek 14** DLS data pro systém 10 mg/ml 79 kDa HA ve vodě s různými peptidy o koncentraci 2 mg/ml.

#### 2.4.2 Reologická měření

Reologická měření byla provedena na reometru Kinexus Pro+ od firmy Malvern Instruments. Provedla se steady-state shear flow měření v rozmezí smykových rychlostí 1 – 1000 s<sup>-1</sup> ve třech opakováních při 25 °C. Byla vyhodnocena zero-shear rate viskozita a vypočtena specifická viskozita. U měření samostatných peptidů byl problém v citlivosti přístroje, proto byly stanoveny jen nejvyšší koncentrace 2 mg/ml. Interakční parametr byl spočítán následovně:

$$\Delta = \frac{\eta_{HA+peptid}}{\eta_{HA} + \eta_{peptid}}$$

kde  $\eta_{HA+peptid}$  je viskozita společného roztoku HA a peptidu,  $\eta_{HA}$  a  $\eta_{peptid}$  je viskozita samostatného roztoku HA a peptidu o stejné koncentraci jako ve směsi. Hodnota  $\Delta$  rovna 1 odpovídá systému bez specifických interakcí. Tento parametr umožňuje porovnávat interakce i mezi různými koncentracemi a molekulovými hmotnostmi HA.

**Tabulka 11** Stanovená specifická viskozita a vypočítaná  $\Delta$  pro dipeptid **RR**

$M_w$ HA	$\eta_{HA}$	$\eta_{RR}$	$\eta_{(HA+RR)}$	$\Delta$
<b>79 kDa</b>	5,98394	0,00962	4,48374	0,748093
<b>1 MDa (1%)</b>	3153,058	0,00962	741,09166	0,235038
<b>1 MDa (0,5%)</b>	473,0541	0,00962	146,4266	0,309528

**Tabulka 12** Stanovená specifická viskozita a vypočítaná  $\Delta$  pro dipeptid **KK**

$M_w$ HA	$\eta_{HA}$	$\eta_{KK}$	$\eta_{(HA+KK)}$	$\Delta$
<b>79 kDa</b>	5,98394	0,01207	3,77086	0,628895
<b>1 MDa (1%)</b>	3153,058	0,01207	1234,79318	0,391616
<b>1 MDa (0,5%)</b>	473,0541	0,01207	109,45828	0,231381

**Tabulka 13** Stanovená specifická viskozita a vypočítaná  $\Delta$  pro dipeptid **KR**

$M_w$ HA	$\eta_{HA}$	$\eta_{KR}$	$\eta_{(HA+KR)}$	$\Delta$
<b>79 kDa</b>	5,98394	0,01474	4,18997	0,698482
<b>1 MDa (1%)</b>	3153,058	0,01474	1528,418	0,484739
<b>1 MDa (0,5%)</b>	473,0541	0,01474	95,31022	0,201472

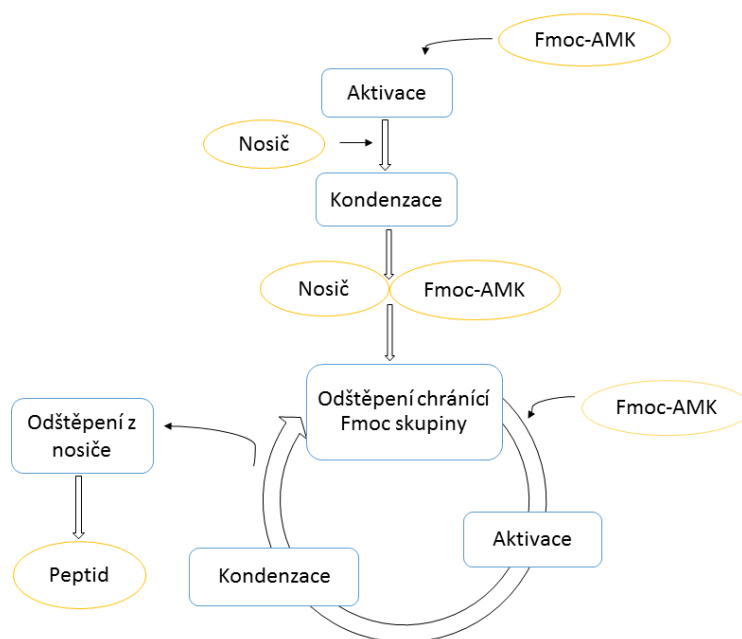
**Tabulka 14** Stanovená specifická viskozita a vypočítaná  $\Delta$  pro dipeptid **RK**

$M_w$ HA	$\eta_{HA}$	$\eta_{RK}$	$\eta_{(HA+RK)}$	$\Delta$
<b>79 kDa</b>	5,98394	0,00707	4,97728	0,830791
<b>1 MDa (1%)</b>	3153,058	0,00707	2225,052	0,705679
<b>1 MDa (0,5%)</b>	473,0541	0,00707	127,9542	0,270481

### 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

#### 3.1 Syntéza peptidů a jejich purifikace

Základní kroky syntézy peptidů na pevné fázi shrnuje **Obrázek 15**.

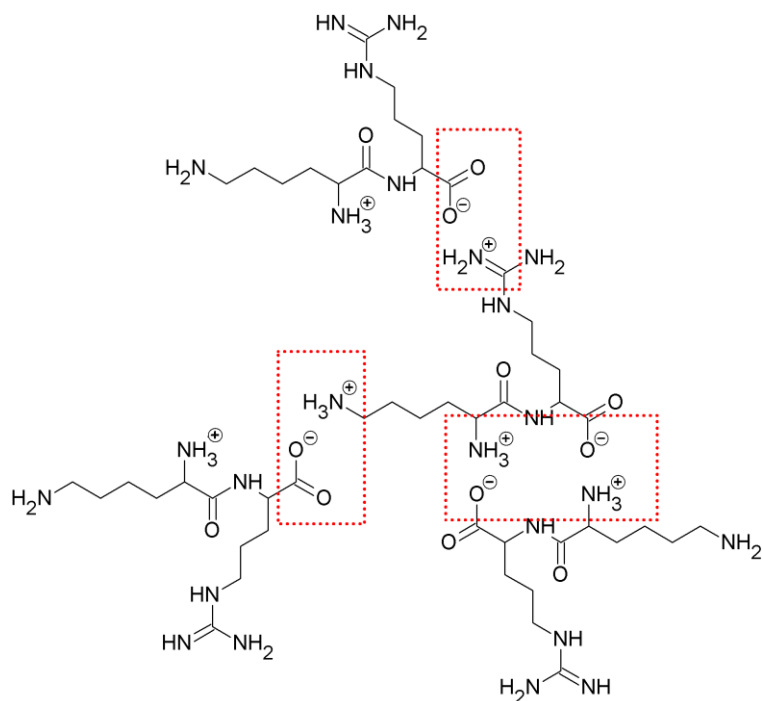


**Obrázek 15** Schématické znázornění průběhu SPPS

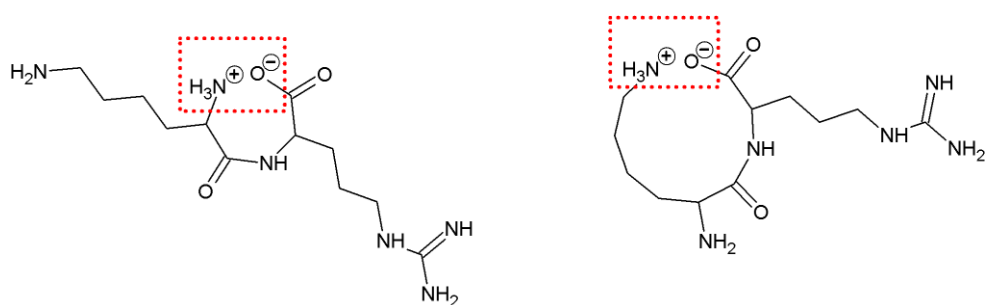
Syntéza peptidů na pevné fázi je známou a zcela rutinní chemickou syntézou využívající různé typy polymerních nosičů, rozpouštědel a činidel. SPPS využívá různé typy nosičů na základě požadavků na strukturu peptidu.<sup>95,96,97</sup> Lze syntetizovat jak peptidy s C-terminální karboxylovou (nosič typu Wang), ale i amidickou skupinou (Fmoc-Rink Amide AM nosič) či skupinami jinými, přičemž volíme specifické nosiče.<sup>98</sup>

Na základě literární rešerše byly zvoleny nejjednodušší hyaluronan vázající motivy, tj. dipeptidy obsahující bazické aminokyseliny lysin a arginin. Vzhledem k počtu aminokyselin a možných kombinací (variace s opakováním  $2^2 = 4$ ) byly připraveny všechny 4 varianty – **RR**, **KR**, **RK** a **KK**. Pro syntézu uvažovaných dipeptidů byl zvolen Fmoc-Rink Amide AM nosič, protože bylo nutné blokovat C-terminální konec peptidu kvůli potlačení interakcí mezi molekulami dipeptidu. Pokud by byly látky syntetizovány na nosiči typu Wang, byly by získány dipeptidy s kyselou C-terminální karboxylovou skupinou, která je schopna interakce

s bazickými skupinami lysinu a argininu. Příklady některý interakcí zobrazuje **Obrázek 16** a **Obrázek 17**.



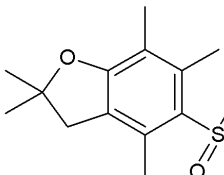
**Obrázek 16** Možné intermolekulární interakce molekul dipeptidu KR v případě volné C-terminální karboxylové skupiny.

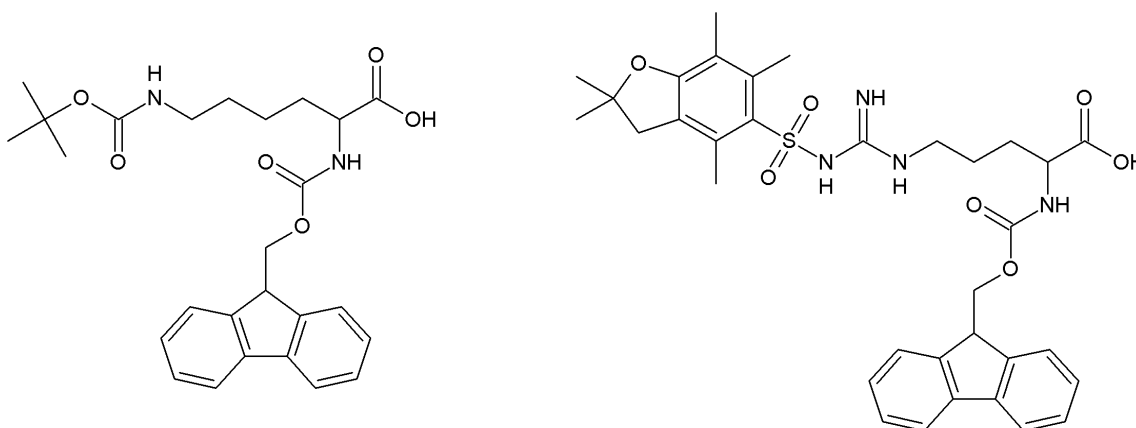


**Obrázek 17** Možné intramolekulární interakce molekul dipeptidu KR v případě volné C-terminální karboxylové skupiny.

Chemie peptidů je náročná na syntetické postupy a deriváty, protože velká část aminokyselin obsahuje ve své struktuře postranní řetězce. Při chemické syntéze peptidů nebo při reakcích jednotlivých aminokyselin je nutné nezapomínat na možnou reaktivitu těchto skupin. SPPS tedy velice často využívá rozličných chránících skupin nejen v postranních řetězcích, ale i na aminoskupině na  $\alpha$ -uhlíku. Je to zcela logická úvaha, protože při nechránění reaktivních skupin lze očekávat celou škálu nežádoucích vedlejších reakcí. Tyto chránící skupiny není možné volit náhodně. Je důležité zachovat princip ortogonalitu, což znamená, že jednotlivé chránící skupiny jsou štěpeny v různých podmínkách.<sup>99</sup> Proto byly v minulosti popsány dvě základní strategie chránění, kterých chemie peptidů využívá:

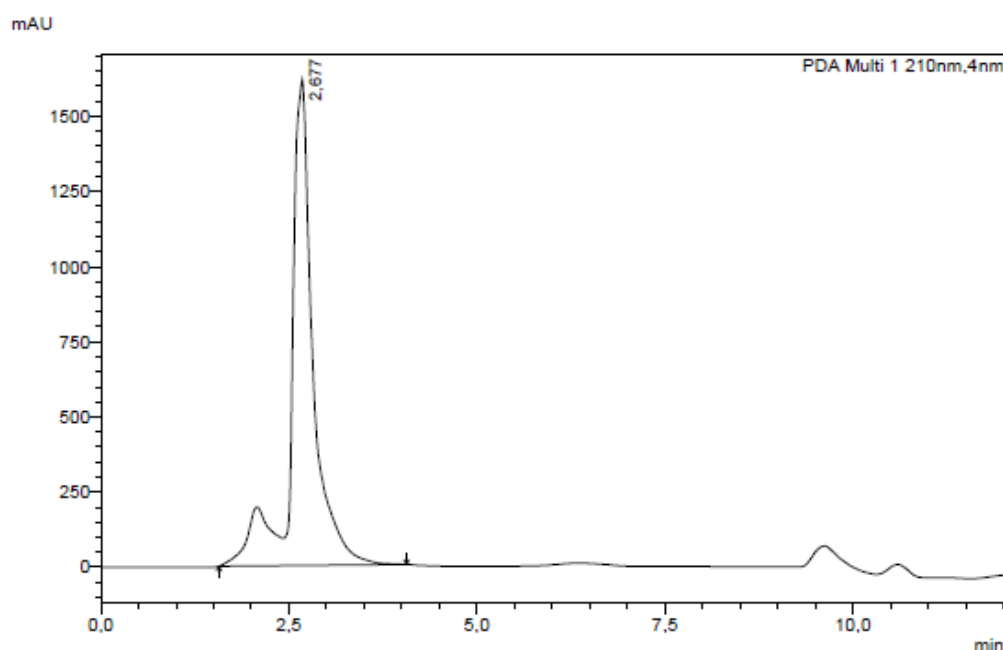
- 1) Fmoc/*t*Bu – využívající chránění aminoskupin pomocí Fmoc-, která je štěpitelná v bazickém prostředí (nejčastěji 20% piperidinem v DMF), zatímco *t*Bu-skupina je štěpitelná kyselé (nejčastěji kyselinou trifluoroctovou);
- 2) Boc/Bzl – tato strategie je na ústupu zejména kvůli agresivitě využívaných štěpících směsí. Boc- bývá nejčastěji štěpen HF, která vyžaduje nejen speciální vybavení, ale také zpřísněné požadavky na bezpečnost práce. Bzl-skupina je pak odštěpována hydrogenolyticky.

V případě přípravy dipeptidů byly využity pouze 2 aminokyseliny – lysin a arginin. Obě tyto látky zachovávají princip ortogonalitu a na  $\alpha$ -uhlíku nesou Fmoc-chránící skupinu, zatímco  $\omega$ -aminoskupina lysinu je chráněna kyselé štěpitelnou Boc-skupinou a guanidoskupina argininu je ochráněna Pbf-skupinou (). Postranní skupiny dipeptidu společně s Rink Amide nosičem jsou odštěpeny v posledním kroku syntézy kyselinou trifluoroctovou.



**Obrázek 18** Struktura použitých chráněných aminokyselin: Fmoc-Lys(Boc)-OH (vlevo) a Fmoc-Arg(Pbf)-OH (vpravo)

Peptid byl purifikován na koloně XBridge C18 za podmínek uvedených v kapitole 2.3 na straně 39. Z důvodu vysoké polaritativy daného peptidu byla frakce sbírána příliš brzy k začátku analýzy. Počáteční koncentrace mobilní fáze s vodou byla pouze 0,1 %, přesto byl pík téměř v mrtvém objemu. Pro přesnější purifikaci by bylo potřebné použít jiný typ kolony, např. kolony pro vysoce polární látky. Lze předpokládat, že poté by došlo k posunu frakce peptidu dále za čas mrtvého objemu. Tato kolona však nebyla k dispozici, proto probíhala purifikace a následné stanovení čistoty na dostupných kolonách za podmínek, jaké jsou uvedeny v Experimentální části.

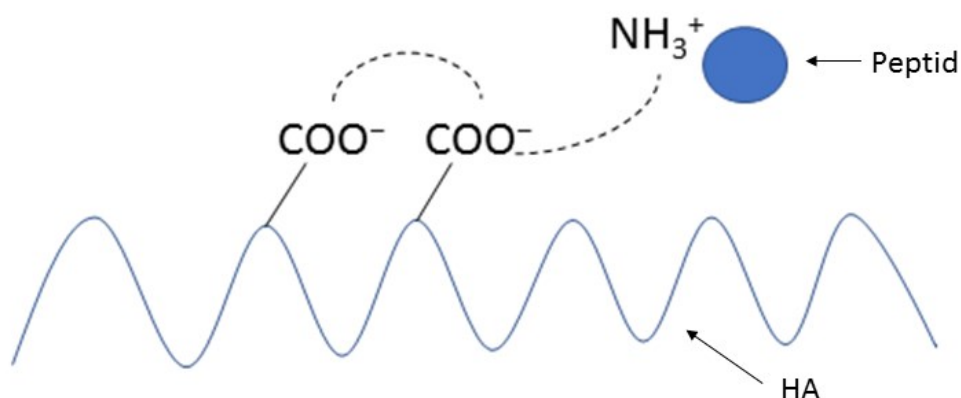


**Obrázek 19** Ukázka chromatogramu (peptid KR)

### 3.2 Interakce HA s peptidy – DLS a reologie

Pro studium interakce HA s dipeptidy byl použit dynamický rozptyl světla a reologická měření. DLS umožňuje stanovit velikost objektů přítomných v roztoku. Reologie je citlivá na změny v hydrodynamickém objemu, a proto je jí možné vztáhnout k mikrostruktuře anebo interakci různých systémů.

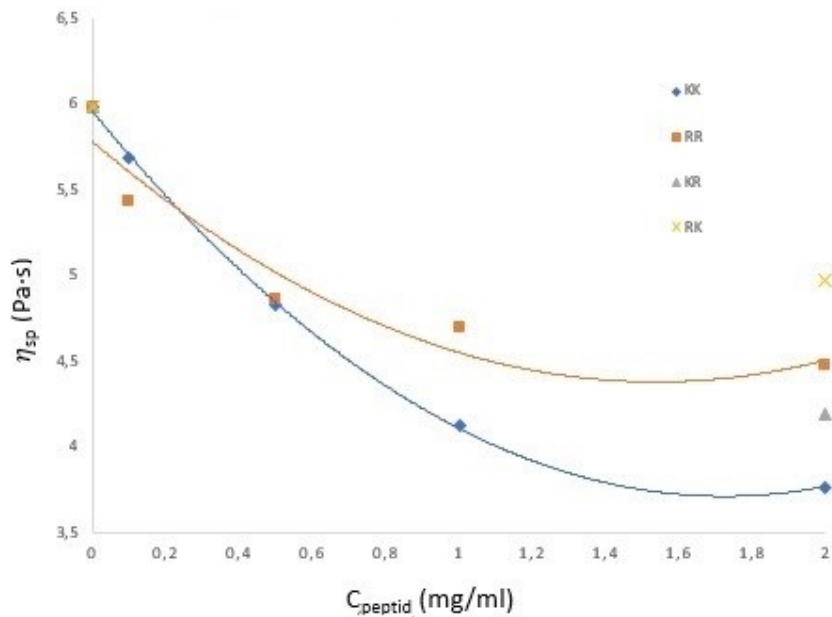




**Obrázek 20** Předpokládané možné reakce peptidu s HA.

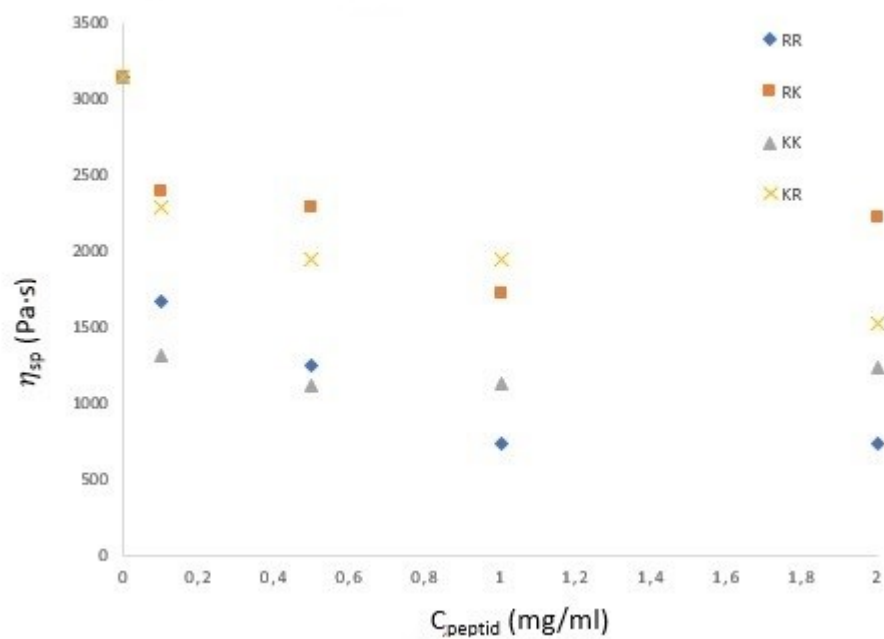
DLS analýzou byla pozorována přítomnost útvarů o průměrné velikosti zhruba 330 nm se širokou distribucí mezi 100 – 1000 nm pro nativní 79 kDa ve vodě (viz. **Obrázek 12 - Obrázek 14** na straně 42-43). Přítomnost peptidů vedla ke snížení velikosti objektů stanovených pro nativní HA, pro všechny peptidy a pro všechny zkoumané koncentrace. Avšak tento pokles byl velmi mírný v rámci distribuce velikostí. V případě peptidu **KK** o koncentraci 1 a 2 mg/ml a peptidu **KR** o koncentraci 2 mg/ml byla pozorována přítomnost velmi malých útvarů, které by mohly odpovídat samostatným molekulám peptidu.

Přítomnost peptidů vedla ve všech případech k poklesu viskozity v porovnání s viskozitou nativní HA. U roztoku HA o koncentraci 10 mg/ml ( $M_w$  79 kDa) s peptidy byl s rostoucí koncentrací peptidů **RR** a **KK** pozorován asymptomatický pokles specifické viskozity (**Obrázek 21**). Také byla pozorována různá odezva pro různé peptidy. To pravděpodobně značí různě silné interakce a rozdíly ve výsledné struktuře či v lokalizaci peptidu – v útvaru HA anebo na jeho povrchu. Peptid **KK** vedl k nejvýraznějšímu poklesu viskozity, naproti tomu peptid **RR** vedl k menšímu poklesu. Nejmenší snížení specifické viskozity bylo zaznamenáno u peptidu **RK**.



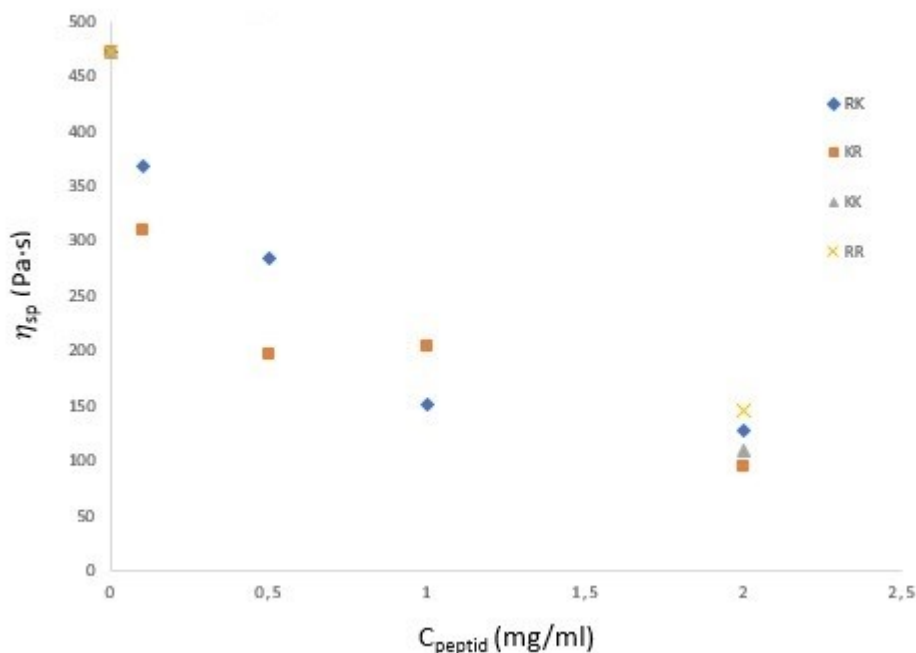
**Obrázek 21** Závislost specifické viskozity roztoku HA o koncentraci 10 mg/ml (Mw 79 kDa) na koncentraci různých peptidů.

U vyšší molekulové hmotnosti byly pozorovány velmi výrazné změny viskozity. Specifická viskozita roztoku HA o koncentraci 10 mg/ml (Mw 1,01 MDa) klesala s rostoucí koncentrací peptidu **RR** zhruba do hodnoty 1 mg/ml, poté zůstala konstantní (**Obrázek 22**). U této molekulové hmotnosti HA vedly interakce s peptidem **RR** k nejnižší pozorované specifické viskozitě. Specifická viskozita roztoku HA stejného složení s peptidem **KK** vykazovala nejvýraznější pokles u nejnižší sledované koncentrace (0,1 mg/ml), poté zůstala specifická viskozita téměř konstantní. Lze tedy předpokládat nasycení interakcí dokonce pod sledovaným rozsahem koncentrací tohoto peptidu. Peptid **KR** vedl k postupnému poklesu hodnot specifické viskozity při všech sledovaných koncentracích. Podobně tomu bylo u peptidu **RK**, u kterého ale došlo k mírnému zvýšení hodnoty u nejvyšší koncentrace. To mohlo být způsobeno zmíněnými nepřesnostmi při přípravě vzorků.



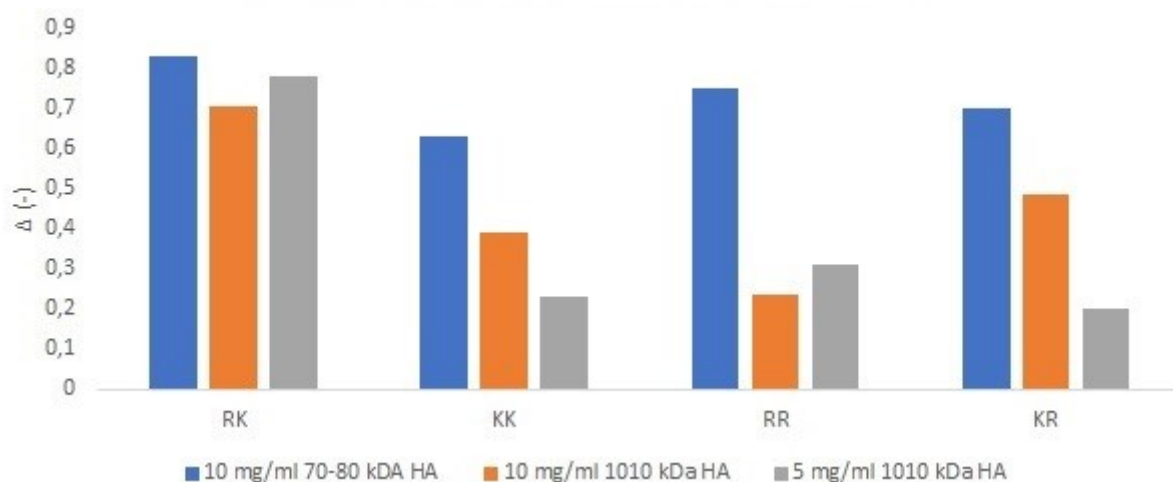
**Obrázek 22** Závislost specifické viskozity roztoku HA o koncentraci 10 mg/ml ( $M_w$  1,01 MDa) na koncentraci různých peptidů.

Velmi významný pokles specifické viskozity byl pozorovaný i pro roztok HA o koncentraci 5 mg/ml ( $M_w$  1,01 MDa), kde byl pozorován podobný trend jako u koncentrace 10 mg/ml (**Obrázek 23**). Ze získaných dat nebylo v tomto případě možné stanovit koncentrace, při kterých došlo k nasycení interakcí. Na to by bylo potřeba stanovit širší rozsah koncentrace peptidu. To ale nebylo dopředu možné odhadnout, jelikož se jednalo o prvotní měření tohoto systému.



**Obrázek 23** Závislost specifické viskozity roztoku HA o koncentraci 5 mg/ml ( $M_w$  1,01 MDa) na koncentraci různých peptidů.

Snížení viskozity směsí HA + peptid oproti nativní HA vedlo k interakčnímu parametru menšímu než 1 (**Obrázek 24**). To se odráží ve snížení hydrodynamického objemu. Očekávalo se opačné chování, kdy by kladně nabitě peptidy propojovaly elektrostatickými interakcemi řetězce HA a docházelo by k nárůstu viskozity až k tvorbě gelů. Pozorované chování může být vysvětleno intramolekulárními interakcemi, přičemž peptidy interagují s řetězcem uvnitř útvarů HA a tím zmenšují hydrodynamický objem. Druhou možností je interakce jen s povrchem útvarů HA a jejich stlačení prostřednictvím elektrostatických interakcí. Silnější interakce byly pozorovány u roztoku HA o koncentraci 5 mg/ml ( $M_w$  1,01 MDa) se všemi peptidy s výjimkou **RR**.



**Obrázek 24** Porovnání interakčního parametru pro různé systémy a peptidy o koncentraci 2 mg/ml.

Na základě provedených analýz bylo zjištěno, že interakce mezi zkoumanými peptidy a HA probíhaly intramolekulárně, navzdory tomu, že byly původně očekávány interakce intermolekulární. Hlavním důkazem bylo významné snížení specifické viskozity, a tím i hydrodynamického objemu v přítomnosti peptidů. Nedošlo proto k interakcím peptidů s různými řetězci HA, ale spíše uvnitř či na povrchu jednoho řetězce HA či jím tvořených útvarů v roztoku, důsledkem čehož docházelo ke snižování hydrodynamického objemu těchto útvarů. Navíc bylo pozorováno, že dochází k narušování zapleteninové sítě směrem k tvorbě samostatných útvarů. Nabité peptidy mohly působit podobně jako protiionty solí. Různé peptidy měly různou koncentrační závislost ve smyslu rychlosti poklesu s koncentrací. Také byly pozorovány limitní koncentrace, kde se interakce nasatily, anebo koncentrace, kde byla pozorována odezva pro volný peptid. Toto se též lišilo pro různé molekulové hmotnosti a koncentrace HA.

Na základě získaných dat není možné rozhodnout, který peptid vykazuje nejvýraznější vazebnou afinitu. Lze ale konstatovat, že dipeptid **KK** vykazuje výrazný potenciál pro další studium a charakterizaci zmíněných interakcí. To může být řešeno v navazující diplomové práci. Strukturní korelace by mohla pomoci s upřesněním, zda interakce probíhají primárně na povrchu nebo na útvarech HA. Na zodpovězení této otázky by mohla být teoreticky využita fázově citlivá voltametrie se střídavým potenciálem, která stanovuje adsorpčně desorpční

chování a interakce s nabitým hydrofobním povrchem. Další užitečnou technikou pro studium interakcí by mohla být izotermická titrační kalorimetrie. Zajímavé by bylo i chování v přítomnosti solí – fyziologický roztok, PBS anebo chování při různém pH.

## 4 ZÁVĚR

V rámci bakalářské práce byly nejprve popsány hyaluronan vázající peptidy a samotná kyselina hyaluronová. Obě tyto komponenty hrají výraznou roli v lidském těle a jejich deficit může vést k poruchám viskosuplementace ústícím až k poruchám pohybového aparátu. Jak bylo v teoretické části zmíněno, je snaha co nejvíce omezit farmakologické podávání analgetik pro tlumení bolesti a zavádění invazivních kloubních náhrad. Proto je v současné době trendem vyvíjet hydrogely a materiály na bázi synoviální tekutiny, což využívá jak HA, tak HABPs a jejich fragmenty.

Cílem této bakalářské práce tedy bylo připravit různé typy neselektivních dipeptidů na bázi kladně nabitých aminokyselin jako možných analogů k sekvenčně náročným hyaluronan vázajícím peptidům/proteinům. Byly tedy připraveny 4 dipeptidy (lysyl-lysin, arginyl-lysin, lysyl-arginin a arginyl-arginin) metodou syntézy peptidů na pevné fázi. Pro syntézu byl využit nosič typu RinkAmide, který poskytuje peptid ve formě amidu na C-terminálním konci. Touto modifikací bylo zabezpečeno, že peptid nebude vykazovat interakce mezi jednotlivými molekulami peptidu na základě elektrostatických interakcí.

Připravené peptidy byly čištěny a analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie, proto byly pro další charakterizace a studium interakcí využity ve svém čistém stavu.

Pro fyzikálně-chemický popis interakcí připravených peptidů s HA o různých délkách polymerního řetězce byly využity dynamický rozptyl světla a reologická měření. Pomocí DLS bylo zjištěno, že peptidy s HA tvoří komplex a dochází k intramolekulárním interakcím vedoucím ke vzniku polymerních klubek různé velikosti závislé na koncentraci peptidů. Bylo také pozorováno, že peptidy způsobují pokles specifické viskozity, což je v rozporu s původní hypotézou, že kladně nabitě peptidy budou sloužit jako hydrogelátory a povedou k tvorbě hydrogelů.

Na základě výše uvedeného lze konstatovat, že stanovené cíle bakalářské práce byly splněny.

## POUŽITÁ LITERATURA

- (1) Toole, B. P. Hyaluronan and Its Binding Proteins, the Hyaladherins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1990**, *2* (5), 839–844. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(90\)90081-O](https://doi.org/10.1016/0955-0674(90)90081-O).
- (2) Sherman, L. S.; Struve, J. N.; Rangwala, R.; Wallingford, N. M.; Tuohy, T. M. F.; Kuntz, C. Hyaluronate-Based Extracellular Matrix: Keeping Glia in Their Place. *Glia* **2002**, *38* (2), 93–102. <https://doi.org/10.1002/glia.10053>.
- (3) Lesley, J.; English, N.; Perschl, A.; Gregoroff, J.; Hyman, R. Variant Cell Lines Selected for Alterations in the Function of the Hyaluronan Receptor CD44 Show Differences in Glycosylation. *J Exp Med* **1995**, *182* (2), 431–437. <https://doi.org/10.1084/jem.182.2.431>.
- (4) Dicker, K. T.; Gurski, L. A.; Pradhan-Bhatt, S.; Witt, R. L.; Farach-Carson, M. C.; Jia, X. Hyaluronan: A Simple Polysaccharide with Diverse Biological Functions. *Acta Biomater* **2014**, *10* (4), 1558–1570. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.019>.
- (5) Amemiya, K.; Nakatani, T.; Saito, A.; Suzuki, A.; Munakata, H. Hyaluronan-Binding Motif Identified by Panning a Random Peptide Display Library. *Biochim Biophys Acta* **2005**, *1724* (1–2), 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.04.029>.
- (6) Day, A. J.; Sheehan, J. K. Hyaluronan: Polysaccharide Chaos to Protein Organisation. *Curr Opin Struct Biol* **2001**, *11* (5), 617–622. [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(00\)00256-6](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(00)00256-6).
- (7) Day, A. J.; Prestwich, G. D. Hyaluronan-Binding Proteins: Tying up the Giant. *J Biol Chem* **2002**, *277* (7), 4585–4588. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100036200>.
- (8) Dvořáková, M. Optimalizace Preparativní LC-MS Metody Frakcionace Oligosacharidů Hyaluronanu. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, 2013.
- (9) Yang, B.; Yang, B. I.; Savani, R. C.; Turley, E. A. Identification of a Common Hyaluronan Binding Motif in the Hyaluronan Binding Proteins RHAMM, CD44 and Link Protein. *The EMBO Journal* **1994**, *13* (2), 286–296. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06261.x>.
- (10) Yang, B.; Zhang, L.; Turley, E. A. Identification of Two Hyaluronan-Binding Domains in the Hyaluronan Receptor RHAMM. *Journal of Biological Chemistry* **1993**, *268* (12), 8617–8623. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)52919-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)52919-7).
- (11) Ziebell, M. R.; Prestwich, G. D. Interactions of Peptide Mimics of Hyaluronic Acid with the Receptor for Hyaluronan Mediated Motility (RHAMM). *J Comput Aided Mol Des* **2004**, *18* (10), 597–614. <https://doi.org/10.1007/s10822-004-5433-8>.



- (12) Torabi, F.; Bogle, O. A.; Estanyol, J. M.; Oliva, R.; Miller, D. Zona Pellucida-Binding Protein 2 (ZPBP2) and Several Proteins Containing BX7B Motifs in Human Sperm May Have Hyaluronic Acid Binding or Recognition Properties. *Mol Hum Reprod* **2017**, *23* (12), 803–816. <https://doi.org/10.1093/molehr/gax053>.
- (13) Higman, V. A.; Briggs, D. C.; Mahoney, D. J.; Blundell, C. D.; Sattelle, B. M.; Dyer, D. P.; Green, D. E.; DeAngelis, P. L.; Almond, A.; Milner, C. M.; Day, A. J. A Refined Model for the TSG-6 Link Module in Complex with Hyaluronan: Use of Defined Oligosaccharides to Probe Structure and Function. *J Biol Chem* **2014**, *289* (9), 5619–5634. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.542357>.
- (14) Kellett-Clarke, H.; Stegmann, M.; Barclay, A. N.; Metcalfe, C. CD44 Binding to Hyaluronic Acid Is Redox Regulated by a Labile Disulfide Bond in the Hyaluronic Acid Binding Site. *PLOS ONE* **2015**, *10* (9), e0138137. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138137>.
- (15) Kohda, D.; Morton, C. J.; Parkar, A. A.; Hatanaka, H.; Inagaki, F. M.; Campbell, I. D.; Day, A. J. Solution Structure of the Link Module: A Hyaluronan-Binding Domain Involved in Extracellular Matrix Stability and Cell Migration. *Cell* **1996**, *86* (5), 767–775. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80151-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80151-8).
- (16) Favreau, A. J.; Faller, C. E.; Guvench, O. CD44 Receptor Unfolding Enhances Binding by Freeing Basic Amino Acids to Contact Carbohydrate Ligand. *Biophys J* **2013**, *105* (5), 1217–1226. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.07.041>.
- (17) Vigetti, D.; Karousou, E.; Viola, M.; Deleonibus, S.; De Luca, G.; Passi, A. Hyaluronan: Biosynthesis and Signaling. *Biochim Biophys Acta* **2014**, *1840* (8), 2452–2459. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.02.001>.
- (18) Jackson, D. G. The Lymphatic Endothelial Hyaluronan Receptor LYVE-1. *Glycoforum* **2004**, *8*, A2.
- (19) Ponta, H.; Sherman, L.; Herrlich, P. A. CD44: From Adhesion Molecules to Signalling Regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2003**, *4* (1), 33–45. <https://doi.org/10.1038/nrm1004>.
- (20) Louderbough, J. M. V.; Schroeder, J. A. Understanding the Dual Nature of CD44 in Breast Cancer Progression. *Mol Cancer Res* **2011**, *9* (12), 1573–1586. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0156>.
- (21) Rochman, M.; Moll, J.; Herrlich, P.; Wallach, S. B.; Nedvetzki, S.; Sionov, R. V.; Golan, I.; Ish-Shalom, D.; Naor, D. The CD44 Receptor of Lymphoma Cells: Structure-

- Function Relationships and Mechanism of Activation. *Cell Adhes Commun* **2000**, 7 (4), 331–347. <https://doi.org/10.3109/15419060009015004>.
- (22) He, Q.; Lesley, J.; Hyman, R.; Ishihara, K.; Kincade, P. W. Molecular Isoforms of Murine CD44 and Evidence That the Membrane Proximal Domain Is Not Critical for Hyaluronate Recognition. *Journal of Cell Biology* **1992**, 119 (6), 1711–1719. <https://doi.org/10.1083/jcb.119.6.1711>.
- (23) Misra, S.; Heldin, P.; Hascall, V. C.; Karamanos, N. K.; Skandalis, S. S.; Markwald, R. R.; Ghatak, S. Hyaluronan-CD44 Interactions as Potential Targets for Cancer Therapy. *FEBS J* **2011**, 278 (9), 1429–1443. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08071.x>.
- (24) Thankamony, S. P.; Knudson, W. Acylation of CD44 and Its Association with Lipid Rafts Are Required for Receptor and Hyaluronan Endocytosis. *J Biol Chem* **2006**, 281 (45), 34601–34609. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601530200>.
- (25) Mackay, C. R.; Terpe, H. J.; Stauder, R.; Marston, W. L.; Stark, H.; Günthert, U. Expression and Modulation of CD44 Variant Isoforms in Humans. *J Cell Biol* **1994**, 124 (1–2), 71–82. <https://doi.org/10.1083/jcb.124.1.71>.
- (26) Banerji, S.; Ni, J.; Wang, S. X.; Clasper, S.; Su, J.; Tammi, R.; Jones, M.; Jackson, D. G. LYVE-1, a New Homologue of the CD44 Glycoprotein, Is a Lymph-Specific Receptor for Hyaluronan. *J Cell Biol* **1999**, 144 (4), 789–801. <https://doi.org/10.1083/jcb.144.4.789>.
- (27) Prevo, R.; Banerji, S.; Ferguson, D. J.; Clasper, S.; Jackson, D. G. Mouse LYVE-1 Is an Endocytic Receptor for Hyaluronan in Lymphatic Endothelium. *J Biol Chem* **2001**, 276 (22), 19420–19430. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011004200>.
- (28) Banerji, S.; Lawrance, W.; Metcalfe, C.; Briggs, D. C.; Yamauchi, A.; Dushek, O.; van der Merwe, P. A.; Day, A. J.; Jackson, D. G. Homodimerization of the Lymph Vessel Endothelial Receptor LYVE-1 through a Redox-Labile Disulfide Is Critical for Hyaluronan Binding in Lymphatic Endothelium. *J Biol Chem* **2016**, 291 (48), 25004–25018. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.736926>.
- (29) Nightingale, T. D.; Frayne, M. E. F.; Clasper, S.; Banerji, S.; Jackson, D. G. A Mechanism of Sialylation Functionally Silences the Hyaluronan Receptor LYVE-1 in Lymphatic Endothelium. *J Biol Chem* **2009**, 284 (6), 3935–3945. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805105200>.

- (30) Maxwell, C. A.; McCarthy, J.; Turley, E. Cell-Surface and Mitotic-Spindle RHAMM: Moonlighting or Dual Oncogenic Functions? *J Cell Sci* **2008**, *121* (Pt 7), 925–932. <https://doi.org/10.1242/jcs.022038>.
- (31) Ziebell, M. R.; Zhao, Z. G.; Luo, B.; Luo, Y.; Turley, E. A.; Prestwich, G. D. Peptides That Mimic Glycosaminoglycans: High-Affinity Ligands for a Hyaluronan Binding Domain. *Chem Biol* **2001**, *8* (11), 1081–1094. [https://doi.org/10.1016/s1074-5521\(01\)00078-3](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(01)00078-3).
- (32) Du, X.; Li, Y.; Xia, Y.-L.; Ai, S.-M.; Liang, J.; Sang, P.; Ji, X.-L.; Liu, S.-Q. Insights into Protein-Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. *Int J Mol Sci* **2016**, *17* (2). <https://doi.org/10.3390/ijms17020144>.
- (33) Assmann, V.; Jenkinson, D.; Marshall, J. F.; Hart, I. R. The Intracellular Hyaluronan Receptor RHAMM/IHABP Interacts with Microtubules and Actin Filaments. *J Cell Sci* **1999**, *112* (Pt 22), 3943–3954.
- (34) Telmer, P. G.; Tolg, C.; McCarthy, J. B.; Turley, E. A. How Does a Protein with Dual Mitotic Spindle and Extracellular Matrix Receptor Functions Affect Tumor Susceptibility and Progression? *Commun Integr Biol* **2011**, *4* (2), 182–185. <https://doi.org/10.4161/cib.4.2.14270>.
- (35) Teng, B. P.; Heffler, M. D.; Lai, E. C.; Zhao, Y.-L.; LeVea, C. M.; Golubovskaya, V. M.; Bullarddunn, K. M. Inhibition of Hyaluronan Synthase-3 Decreases Subcutaneous Colon Cancer Growth by Increasing Apoptosis. *Anticancer Agents Med Chem* **2011**, *11* (7), 620–628. <https://doi.org/10.2174/187152011796817655>.
- (36) Schütze, A.; Vogeley, C.; Gorges, T.; Twarock, S.; Butschan, J.; Babayan, A.; Klein, D.; Knauer, S. K.; Metzen, E.; Müller, V.; Jendrossek, V.; Pantel, K.; Milde-Langosch, K.; Fischer, J. W.; Röck, K. RHAMM Splice Variants Confer Radiosensitivity in Human Breast Cancer Cell Lines. *Oncotarget* **2016**, *7* (16), 21428–21440. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7258>.
- (37) Zhuo, L.; Kimata, K. Structure and Function of Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chains. *Connect Tissue Res* **2008**, *49* (5), 311–320. <https://doi.org/10.1080/03008200802325458>.
- (38) Hutadilok, N.; Ghosh, P.; Brooks, P. M. Binding of Haptoglobin, Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor, and Alpha 1 Proteinase Inhibitor to Synovial Fluid Hyaluronate and the Influence of These Proteins on Its Degradation by Oxygen Derived Free Radicals. *Ann Rheum Dis* **1988**, *47* (5), 377–385. <https://doi.org/10.1136/ard.47.5.377>.

- (39) Milner, C. M.; Day, A. J. TSG-6: A Multifunctional Protein Associated with Inflammation. *J Cell Sci* **2003**, *116* (Pt 10), 1863–1873. <https://doi.org/10.1242/jcs.00407>.
- (40) Bayliss, M. T.; Howat, S. L.; Dudhia, J.; Murphy, J. M.; Barry, F. P.; Edwards, J. C.; Day, A. J. Up-Regulation and Differential Expression of the Hyaluronan-Binding Protein TSG-6 in Cartilage and Synovium in Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **2001**, *9* (1), 42–48. <https://doi.org/10.1053/joca.2000.0348>.
- (41) Parkar, A. A.; Kahmann, J. D.; Howat, S. L.; Bayliss, M. T.; Day, A. J. TSG-6 Interacts with Hyaluronan and Aggrecan in a PH-Dependent Manner via a Common Functional Element: Implications for Its Regulation in Inflamed Cartilage. *FEBS Lett* **1998**, *428* (3), 171–176. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)00523-7](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00523-7).
- (42) Blundell, C. D.; Mahoney, D. J.; Cordell, M. R.; Almond, A.; Kahmann, J. D.; Perczel, A.; Taylor, J. D.; Campbell, I. D.; Day, A. J. Determining the Molecular Basis for the PH-Dependent Interaction between the Link Module of Human TSG-6 and Hyaluronan\*♦. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282* (17), 12976–12988. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611713200>.
- (43) Evensen, N. A.; Kuscu, C.; Nguyen, H.-L.; Zarrabi, K.; Dufour, A.; Kadam, P.; Hu, Y.-J.; Pulkoski-Gross, A.; Bahou, W. F.; Zucker, S.; Cao, J. Unraveling the Role of KIAA1199, a Novel Endoplasmic Reticulum Protein, in Cancer Cell Migration. *J Natl Cancer Inst* **2013**, *105* (18), 1402–1416. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt224>.
- (44) Yoshida, H.; Nagaoka, A.; Kusaka-Kikushima, A.; Tobiishi, M.; Kawabata, K.; Sayo, T.; Sakai, S.; Sugiyama, Y.; Enomoto, H.; Okada, Y.; Inoue, S. KIAA1199, a Deafness Gene of Unknown Function, Is a New Hyaluronan Binding Protein Involved in Hyaluronan Depolymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110* (14), 5612–5617. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215432110>.
- (45) Hosoya, M.; Fujioka, M.; Okano, H.; Ogawa, K. Distinct Expression Pattern of a Deafness Gene, KIAA1199, in a Primate Cochlea. *Biomed Res Int* **2016**, *2016*, 1781894. <https://doi.org/10.1155/2016/1781894>.
- (46) Abe, S.; Usami, S.; Nakamura, Y. Mutations in the Gene Encoding KIAA1199 Protein, an Inner-Ear Protein Expressed in Deiters' Cells and the Fibrocytes, as the Cause of Nonsyndromic Hearing Loss. *J Hum Genet* **2003**, *48* (11), 564–570. <https://doi.org/10.1007/s10038-003-0079-2>.

- (47) Birkenkamp-Demtroder, K.; Maghnouj, A.; Mansilla, F.; Thorsen, K.; Andersen, C. L.; Øster, B.; Hahn, S.; Ørntoft, T. F. Repression of KIAA1199 Attenuates Wnt-Signalling and Decreases the Proliferation of Colon Cancer Cells. *Br J Cancer* **2011**, *105* (4), 552–561. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.268>.
- (48) Deng, F.; Lei, J.; Zhang, X.; Huang, W.; Li, Y.; Wu, D. Overexpression of KIAA1199: An Independent Prognostic Marker in Non-small Cell Lung Cancer. *J Cancer Res Ther* **2017**, *13* (4), 664–668. [https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT\\_61\\_17](https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_61_17).
- (49) Morawski, M.; Brückner, G.; Arendt, T.; Matthews, R. T. Aggrecan: Beyond Cartilage and into the Brain. *Int J Biochem Cell Biol* **2012**, *44* (5), 690–693. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.01.010>.
- (50) Zhu, W.; Mow, V. C.; Rosenberg, L. C.; Tang, L. H. Determination of Kinetic Changes of Aggrecan-Hyaluronan Interactions in Solution from Its Rheological Properties. *J Biomech* **1994**, *27* (5), 571–579. [https://doi.org/10.1016/0021-9290\(94\)90066-3](https://doi.org/10.1016/0021-9290(94)90066-3).
- (51) Wight, T. N. Versican: A Versatile Extracellular Matrix Proteoglycan in Cell Biology. *Curr Opin Cell Biol* **2002**, *14* (5), 617–623. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(02\)00375-7](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(02)00375-7).
- (52) Bode-Lesniewska, B.; Dours-Zimmermann, M. T.; Odermatt, B. F.; Briner, J.; Heitz, P. U.; Zimmermann, D. R. Distribution of the Large Aggregating Proteoglycan Versican in Adult Human Tissues. *J Histochem Cytochem* **1996**, *44* (4), 303–312. <https://doi.org/10.1177/44.4.8601689>.
- (53) Altgärde, N.; Nilebäck, E.; de Battice, L.; Pashkuleva, I.; Reis, R. L.; Becher, J.; Möller, S.; Schnabelrauch, M.; Svedhem, S. Probing the Biofunctionality of Biotinylated Hyaluronan and Chondroitin Sulfate by Hyaluronidase Degradation and Aggrecan Interaction. *Acta Biomater* **2013**, *9* (9), 8158–8166. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.05.031>.
- (54) Nap, R. J.; Szleifer, I. Structure and Interactions of Aggrecans: Statistical Thermodynamic Approach. *Biophys J* **2008**, *95* (10), 4570–4583. <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.133801>.
- (55) Maeda, N. Proteoglycans and Neuronal Migration in the Cerebral Cortex during Development and Disease. *Front Neurosci* **2015**, *9*, 98. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00098>.
- (56) Gaudet, A. D.; Popovich, P. G. Extracellular Matrix Regulation of Inflammation in the Healthy and Injured Spinal Cord. *Exp Neurol* **2014**, *258*, 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.11.020>.

- (57) Arnoldová, K. Analýza Kyseliny Hyaluronové s Využitím Separačních Technik v Kapalinné Fázi. Diplomová práce, 2017.
- (58) Covington, A. D. *Tanning Chemistry: The Science of Leather*; Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, 2009.
- (59) Stern, R. Hyaluronan Catabolism: A New Metabolic Pathway. *European Journal of Cell Biology* **2004**, 83 (7), 317–325. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00392>.
- (60) Garg, H. G.; Hales, C. A. *Chemistry and Biology of Hyaluronan*; Elsevier Science Limited, 2004.
- (61) Kajtmanová, K. Hyaluronová Kyselina a Její Deriváty. Bakalářská práce, Pardubice, 2017.
- (62) Kogan, G.; Šoltés, L.; Stern, R.; Mendichi, R. HYALURONIC ACID: A BIOPOLYMER WITH VERSATILE PHYSICO-CHEMICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES. *Hyaluronic Acid* **2007**, 47.
- (63) Boeriu, C. G.; Springer, J.; Kooy, F. K.; Broek, L. A. M. van den; Eggink, G. Production Methods for Hyaluronan. *International Journal of Carbohydrate Chemistry* **2013**, 2013, 624967. <https://doi.org/10.1155/2013/624967>.
- (64) Nováková, G. KYSELINA HYALURONOVÁ. JEJÍ VLASTNOSTI A POUŽITÍ V KOSMETICE A LÉKAŘSTVÍ. Bakalářská práce, 2013.
- (65) Price, R. D.; Berry, M. G.; Navsaria, H. A. Hyaluronic Acid: The Scientific and Clinical Evidence. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* **2007**, 60 (10), 1110–1119. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2007.03.005>.
- (66) Teichmanová, K. Nanomateriály z biodegradabilních polymerů využitelné jako „drug delivery system“. Bakalářská práce, Pardubice, 2018.
- (67) Collins, M. N.; Birkinshaw, C. Hyaluronic Acid Based Scaffolds for Tissue Engineering--a Review. *Carbohydr Polym* **2013**, 92 (2), 1262–1279. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.028>.
- (68) Fehid, A. FLUORESCENČNÍ ZNAČENÍ KYSELINY HYALURONOVÉ. Bakalářská práce, UNIVERZITA PARDUBICE FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ, 2020.
- (69) Necas, J.; Bartosikova, L.; Brauner, P.; Kolar, J. Hyaluronic Acid (Hyaluronan): A Review. *Veterinarni Medicina* **2008**, 53 (No. 8), 397–411. <https://doi.org/10.17221/1930-VETMED>.

- (70) Chao, K.; Muthukumar, L.; Herzberg, O. Structure of Human Hyaluronidase-1, a Hyaluronan Hydrolyzing Enzyme Involved in Tumor Growth and Angiogenesis † , ‡. *Biochemistry* **2007**, *46*, 6911–6920. <https://doi.org/10.1021/bi700382g>.
- (71) Allison, D. D.; Grande-Allen, K. J. Review. Hyaluronan: A Powerful Tissue Engineering Tool. *Tissue Eng* **2006**, *12* (8), 2131–2140. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.2131>.
- (72) Bosman, F. T.; Stamenkovic, I. Functional Structure and Composition of the Extracellular Matrix. *J Pathol* **2003**, *200* (4), 423–428. <https://doi.org/10.1002/path.1437>.
- (73) Wilkins, R. J.; Browning, J. A.; Ellory, J. C. Surviving in a Matrix: Membrane Transport in Articular Chondrocytes. *J Membr Biol* **2000**, *177* (2), 95–108. <https://doi.org/10.1007/s002320001103>.
- (74) Wilkins, R. J.; Hall, A. C. Control of Matrix Synthesis in Isolated Bovine Chondrocytes by Extracellular and Intracellular PH. *Journal of Cellular Physiology* **1995**, *164* (3), 474–481. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041640305>.
- (75) Frantz, C.; Stewart, K. M.; Weaver, V. M. The Extracellular Matrix at a Glance. *J Cell Sci* **2010**, *123* (Pt 24), 4195–4200. <https://doi.org/10.1242/jcs.023820>.
- (76) Campisi, J.; d’Adda di Fagagna, F. Cellular Senescence: When Bad Things Happen to Good Cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007**, *8* (9), 729–740. <https://doi.org/10.1038/nrm2233>.
- (77) Coppé, J.-P.; Desprez, P.-Y.; Krtolica, A.; Campisi, J. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annu Rev Pathol* **2010**, *5*, 99–118. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144>.
- (78) Robins, S. P. Biochemistry and Functional Significance of Collagen Cross-Linking. *Biochem Soc Trans* **2007**, *35* (Pt 5), 849–852. <https://doi.org/10.1042/BST0350849>.
- (79) More, S.; Kotiya, A.; Kotia, A.; Ghosh, S. K.; Spyrou, L. A.; Sarris, I. E. Rheological Properties of Synovial Fluid Due to Viscosupplements: A Review for Osteoarthritis Remedy. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* **2020**, *196*, 105644. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2020.105644>.
- (80) Mundt, L. A.; Shanahan, K.; Graff, L. *Graff’s Textbook of Urinalysis and Body Fluids*, Third edition.; Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health: Philadelphia, 2016.
- (81) Hekrlé, P. VLIV SLOŽENÍ SYNOVIÁLNÍ KAPALINY A TOPOGRAFIE TŘECÍCH POVRCHŮ NA MAZÁNÍ KLOUBNÍCH NÁHRAD, 2018.

- (82) Roberts, A. M. *Kompletní lidské tělo: [unikátní obrazový průvodce]*; Knížní klub: Praha, 2012.
- (83) Wolfova, L.; Bystroňová, J.; Pravda, M.; Matonohová, J.; Nováková, J.; Velebný, V. Material on the Basis of Hyaluronic Acid for Synovial Fluid Viscosupplementation with Improved Viscoelastic Properties and In-Vivo Biostability. *Osteoarthritis and Cartilage* **2013**, *21*, S303. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2013.02.632>.
- (84) Ryba, L.; Chaloupka, R.; Repko, M.; Marková, I. Možnosti Léčby Artrózy v Ordinaci Praktického Lékaře. *Medicína pro praxi* **2018**, *15* (4), 215–220. <https://doi.org/10.36290/med.2018.040>.
- (85) Olejárová, Mud. M. Léčba bolesti u osteoartrózy. *Interní medicína pro praxi* **2009**, *11* (12), 552–557.
- (86) Svobodová, R. Současné možnosti léčby osteoartrózy <http://www.remedia.cz/Clanky/Farmakoterapie/Soucasne-moznosti-lecby-osteoartrózy/6-L-Zy.magarticle.aspx> (accessed 2021 -03 -14).
- (87) Faust, H. J.; Sommerfeld, S. D.; Rathod, S.; Rittenbach, A.; Ray Banerjee, S.; Tsui, B. M. W.; Pomper, M.; Amzel, M. L.; Singh, A.; Elisseeff, J. H. A Hyaluronic Acid Binding Peptide-Polymer System for Treating Osteoarthritis. *Biomaterials* **2018**, *183*, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.08.045>.
- (88) Wang, C.-C.; Wang, C.-T.; Chou, W.-C.; Kao, C.-L.; Tsai, K.-L. Hyaluronic Acid Injection Reduces Inflammatory and Apoptotic Markers through Modulation of AKT by Repressing the Oxidative Status of Neutrophils from Osteoarthritic Synovial Fluid. *International Journal of Biological Macromolecules* **2020**, *165*, 2765–2772. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.154>.
- (89) Curran, M. P. Hyaluronic Acid (Supartz®). *Drugs Aging* **2010**, *18*.
- (90) Amblard, M.; Fehrentz, J.-A.; Martinez, J.; Subra, G. Methods and Protocols of Modern Solid Phase Peptide Synthesis. *Mol Biotechnol* **2006**, *33* (3), 239–254. <https://doi.org/10.1385/MB:33:3:239>.
- (91) *Solid-Phase Peptide Synthesis*; Fields, G. B., Ed.; Methods in enzymology; Acad. Press: San Diego, Calif., 1997.
- (92) Eissler, S.; Kley, M.; Bächle, D.; Loidl, G.; Meier, T.; Samson, D. Substitution Determination of Fmoc-Substituted Resins at Different Wavelengths. *J Pept Sci* **2017**, *23* (10), 757–762. <https://doi.org/10.1002/psc.3021>.



- (93) Fields, G. Methods for Removing the Fmoc Group. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1994**, *35*, 17–27. <https://doi.org/10.1385/0-89603-273-6:17>.
- (94) Moore, S.; Stein, W. H. Photometric Ninhydrin Method for Use in the Chromatography of Amino Acids. *J Biol Chem* **1948**, *176* (1), 367–388.
- (95) Jaradat, D. M. M. Thirteen Decades of Peptide Synthesis: Key Developments in Solid Phase Peptide Synthesis and Amide Bond Formation Utilized in Peptide Ligation. *Amino Acids* **2018**, *50* (1), 39–68. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2516-0>.
- (96) Li, W.; O'Brien-Simpson, N. M.; Hossain, M. A.; Wade, J. D.; Li, W.; O'Brien-Simpson, N. M.; Hossain, M. A.; Wade, J. D. The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) Group in Chemical Peptide Synthesis – Its Past, Present, and Future. *Aust. J. Chem.* **2019**, *73* (4), 271–276. <https://doi.org/10.1071/CH19427>.
- (97) Al Musaimi, O.; de la Torre, B. G.; Albericio, F. Greening Fmoc/ *t* Bu Solid-Phase Peptide Synthesis. *Green Chem.* **2020**, *22* (4), 996–1018. <https://doi.org/10.1039/C9GC03982A>.
- (98) Moss, J. A. Guide for Resin and Linker Selection in Solid-Phase Peptide Synthesis. *Curr Protoc Protein Sci* **2005**, *Chapter 18*, Unit 18.7. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1807s40>.
- (99) Albericio, F. Orthogonal Protecting Groups for N $\alpha$ -Amino and C-Terminal Carboxyl Functions in Solid-Phase Peptide Synthesis. *Peptide Science* **2000**, *55* (2), 123–139. [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2000\)55:2<123::AID-BIP30>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2000)55:2<123::AID-BIP30>3.0.CO;2-F).