

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Expres proteinů metabolismu kyseliny hyaluronové po ozáření

Bakalářská práce

2022

Anna Kutílková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Anna Kutílková**
Osobní číslo: **C19254**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Expresse proteinů metabolismu kyseliny hyaluronové po ozáření**
Téma práce anglicky: **Expression Of Hyaluronic Acid Metabolism Proteins After Irradiation**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

- 1) Vypracujte literární rešerši o kyselině hyaluronové a jejím metabolismu v organismu.
- 2) Popište vliv ionizujícího záření na molekulu kyseliny hyaluronové a jednotlivé části jejího metabolismu.

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

Seznam doporučené literatury:

Pro vytvoření kompilačního textu využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI/ Pubmed, ScienceDirect, Web of Science, Scopus*, apod. Jako zdroje využijte zejména odborné články publikované v recenzovaných zahraničních časopisech.

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Anna Lierová, Ph.D.**
Katedra klinických oborů

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2021**

Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2022**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

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

V Pardubicích dne 28. února 2022

PROHLÁŠENÍ AUTORA

Prohlašuji:

Práci s názvem exprese proteinů kyseliny hyaluronové po ozáření 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 29. 6. 2022

Anna Kutílková

PODĚKOVÁNÍ

Mé poděkování patří doc. RNDr. Lucii Korecké, Ph.D. spolu s Mgr. Annou Lierovou, Ph.D. za vedení mé bakalářské práce a odbornou konzultaci. Děkuji za cenné rady, vstřícný přístup, poskytnuté informace a čas věnovaný odbornému dohledu mé bakalářské práce.

Poděkování patří také mé rodině za veškerou pomoc a obrovskou podporu při studiu.

ANOTACE

Tato bakalářská práce shrnuje informace o účincích záření na proteiny související s metabolismem kyseliny hyaluronové. Je popsána základní struktura kyseliny hyaluronové, její vlastnosti a využití, dále také metabolismus zahrnující enzymy a proteiny potřebné k její syntéze a degradaci. V poslední kapitole jsou vysvětleny účinky ionizujícího záření na kyselinu hyaluronovou a s ní související proteiny.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kyselina hyaluronová, ionizující záření, hyaladheriny, hyaluronansyntázy, hyaluronidáza, CD44.

EXPRESSION OF HYALURONIC ACID METABOLISM PROTEINS AFTER IRRADIATION

ANNOTATION

This bachelor thesis summarizes information on the effects of radiation on proteins related to hyaluronic acid metabolism. It describes the basic structure of hyaluronic acid, its properties and uses, as well as the metabolism involving enzymes and proteins required for its synthesis and degradation. The last chapter explains the effects of ionizing radiation on hyaluronic acid and its related proteins.

KEYWORDS

Hyaluronic acid, ionizing radiation, hyaladherins, hyaluronan synthase, hyaluronidase, CD44.

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| Seznam obrázků a tabulek | 9 |
| Seznam použitých zkratk | 10 |
| ÚVOD | 11 |
| CÍL PRÁCE | 12 |
| 1. GLYKOSAMINOGLYKANY | 13 |
| 2. KYSELINA HYALURONOVÁ A JEJÍ VLASTNOSTI | 15 |
| 1.1 Historie | 15 |
| 1.2 Chemická struktura..... | 15 |
| 1.3 Výskyt..... | 17 |
| 1.4 Biologické využití..... | 19 |
| 3. METABOLISMUS KYSELINY HYALURONOVÉ | 20 |
| 1.5 Syntéza..... | 20 |
| 1.5.1 Hyaluronansyntázy | 21 |
| 1.6 Odbourávání | 22 |
| 1.6.1 Hyaluronidáza 1, 2, 3..... | 23 |
| 1.7 Hyaladheriny | 24 |
| 1.7.1 Glykoprotein s diferenciacní skupinou 44 | 24 |
| 1.7.2 Protein genu 6 stimulovaný faktorem nekrotizujícím nádory | 27 |
| 1.7.3 Gliální protein vázající hyaluronát | 27 |
| 1.7.4 Endoteliální hyaluronanový receptor lymfatických cév 1 | 28 |
| 1.7.5 Receptor pro motilitu zprostředkovanou hyaluronanem | 28 |
| 1.7.6 Hyaluronanový receptor pro endocytózu..... | 28 |
| 1.7.7 Toll-like receptor 2 a Toll-like receptor 4 | 29 |
| 1.7.8 Molekula mezibuněčné adheze 1 | 29 |
| 1.7.9 Protein indukující buněčnou migraci a vázající hyaluronan..... | 29 |
| 4. METABOLISMUS KYSELINY HYALURONOVÉ PO OZÁŘENÍ | 31 |
| 1.8 Ionizující záření | 31 |
| 1.8.1 Biologické účinky ionizujícího záření | 32 |
| 1.9 Kyselina hyaluronová a ionizující záření | 34 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1.10 | Hyaluronansyntázy a ionizující záření | 36 |
| 1.11 | Glykoprotein CD44 a ionizující záření..... | 37 |
| 1.12 | Receptor pro motilitu zprostředkovanou hyaluronanem a ionizující záření..... | 38 |
| 1.13 | Další hyaladheriny a ionizující záření | 39 |
| 5. | DISKUSE A ZÁVĚR..... | 41 |
| 6. | Použitá literatura | 43 |

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

| | |
|--|----|
| Obrázek č. 1: Chemická struktura zástupců glykosaminoglykanů. | 13 |
| Obrázek č. 2: Chemická struktura HA | 16 |
| Obrázek č. 3: Struktura N-acetylglukosaminu | 16 |
| Obrázek č. 4: Tvorba kyseliny glukuronové oxidací glukózy | 17 |
| Obrázek č. 5: Schéma klíčových kroků syntézy a degradace HA..... | 21 |
| Obrázek č. 6: Podobnosti a rozdíly mezi příslušnými savčími HAS enzymy..... | 22 |
| Obrázek č. 7: Struktura proteinu a genu CD44 | 25 |
| Obrázek č. 8: Schematické znázornění účinku ionizujícího záření na buňku..... | 33 |
| Obrázek č. 9: Přehled biologických účinků ionizujícího záření..... | 33 |
| Obrázek č. 10: Graf závislosti viskozity na smykové rychlosti pro 1,25 % w/v hyaluronan v deionizované vodě | 34 |
| | |
| Tabulka č. 1: Distribuce HA různých tkání v těle krysy..... | 17 |
| Tabulka č. 2: Normální koncentrace HA v různých orgánech u různých savců ($\mu\text{g. g}^{-1}$)..... | 18 |
| Tabulka č. 3: Význam a funkce izoforem CD44..... | 26 |
| Tabulka č. 4: Fyzikální změny kyseliny hyaluronové ozářené gama zářením..... | 35 |

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|--------|--|
| CD44 | Antigen s diferenciační skupinou 44 (Cluster of differentiation 44) |
| CD44v | Variantské izoformy antigenu s diferenciační skupinou 44 |
| CEMIP | Protein indukující buněčnou migraci a vázající hyaluronan (Cell migration-inducing and hyaluronan-binding protein) |
| CRC | Kolorektální karcinom (Colorectal carcinoma) |
| EC | Endoteliální buňky (Endothelial cells) |
| ECM | Extracelulární matrix |
| GAGs | Glykosaminoglykany |
| GHAP | Gliální protein vázající hyaluronan (Glial hyaluronic acid-binding protein) |
| GlcA | Kyselina glukuronová (Glucuronic acid) |
| GlcNAc | N-acetylglukosamin |
| HA | Hyaluronová kyselina (hyaluronic acid) |
| HARE | Hyaluronanový receptor pro endocytózu (Hyaluronic acid receptor for endocytosis) |
| HAS | Hyaluronansyntáza |
| ICAM-1 | Molekula mezibuněčné adheze 1 (Intercellular adhesion molecule 1) |
| IZ | Ionizující záření |
| LYVE-1 | Endoteliální hyaluronanový receptor lymfatických cév 1 (Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1) |
| p53 | Jaderný fosfoprotein (tumor protein 53) |
| RHAMM | Receptor pro motilitu zprostředkovanou hyaluronanem (Receptor for hyaluronic acid mediated motility) |
| ROS | Reaktivní formy kyslíku (Reactive oxygen species) |
| TSG6 | Protein genu 6 stimulovaný faktorem nekrotizujícím nádory (Tumor necrosis factor-stimulated gene-6) |
| UDP | Uridindifosfát |

ÚVOD

Kyselina hyaluronová (HA) patří mezi glykosaminoglykany neboli lineární nevětvené polysacharidy, které jsou strukturní součástí extracelulární matrix. Byla objevena v roce 1934 ve sklivci skotu Karlem Mayerem a Johnem Palmerem. Vyskytuje se ve všech živých organismech, zejména v pojivových tkáních a má široké biologické využití zahrnující například klíčovou roli v procesu hojení ran v metabolismu škály. HA vzniká přirozeně třemi savčími enzymy, které nesou název hyaluronansyntázy (HAS1, HAS2, HAS3) a naopak je odbourávána třemi enzymy, kterými jsou hyaluronidázy (HYAL-1, HYAL-2, HYAL-3). Hyaladheriny jsou proteiny, které na sebe váží hyaluronovou kyselinu. Mezi hyaladheriny patří protein s diferenciací skupinou 44 (CD44), který představuje hlavní receptor pro kyselinu hyaluronovou, dále také gliální protein vázající hyaluronát (GHAP), protein genu stimulovaný faktorem nekrotizující nádory (TSG6), endoteliální hyaluronanový receptor lymfatických cév 1 (LYVE-1), receptor pro motilitu zprostředkovanou hyaluronanem (RHAMM), hyaluronanový receptor pro endocytózu (HARE), protein indukující buněčnou migraci a vázající hyaluronan (CEMIP), molekula buněčné adheze 1 (ICAM-1) a v neposlední řadě Toll-like receptory (TLR2, TLR4), neboli „receptory podobné genu *Toll*“, které slouží z rozpoznávání a zahájení vrozené imunitní odpovědi.

Ionizující záření lze definovat jako tok fotonů elektromagnetického záření, nebo hmotných částic, které mohou ionizovat atomy prostředí, ve kterém se nacházejí. S Ionizujícím zářením se setkáváme celý život, jeho expozice je přírodního původu, ale využití nalézá i v lékařském odvětví, kdy se používá k terapii a léčbě, a to souvisí právě i s kyselinou hyaluronovou. Nicméně mezi biologické účinky ionizujícího záření patří také poškození DNA, nebo chromozomů, což může vést ke zvýšenému riziku rozvoje rakoviny. Spojením kyseliny hyaluronové a ionizujícího záření dochází k ionizaci atomů HA, a to může vést ke změnám jejích vlastností, jako je viskozita, molekulová hmotnost, degradaci a dalším.

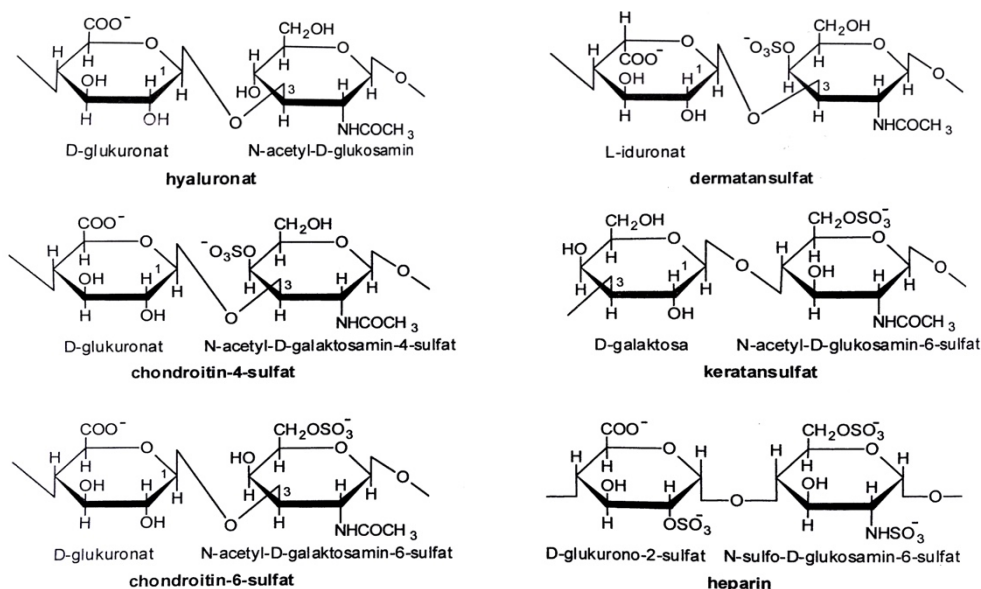
V této práci se budu v první řadě věnovat kyselině hyaluronové, jejím vlastnostem, metabolismu a souvisejícím proteinům a v druhé řadě se zaměřím na ionizující záření a jeho účinky na kyselinu hyaluronovou a proteiny související s její metabolismem.

CÍL PRÁCE

Cílem této práce je shrnutí a popsání struktury a metabolismu kyseliny hyaluronové a s ní souvisejících proteinů a následné zhodnocení účinků ionizujícího záření na kyselinu hyaluronovou a tyto proteiny. Výsledkem této práce je kompletní přehled sumarizující účinky záření na kyselinu hyaluronovou a jednotlivé proteiny.

1. GLYKOSAMINOGLYKANY

Glykosaminoglykany (GAGs) neboli mukopolysacharidy jsou negativně nabitě, nevětvené a lineární polysacharidy, které se skládají z derivátů uronových kyselin (kyselina glukuronová a galakturonová) a hexosaminových zbytků (glukosamin nebo galaktosamin). Mezi GAGs se řadí hyaluronová kyselina, chondroitin-4-sulfát, chondroitin-6-sulfát, dermatansulfát, keratansulfát a heparin, jejichž chemická struktura je znázorněna na obrázku č. 1 [1, 2]. Tvoří obsáhlou strukturní složku extracelulární matrix (ECM) spolu s proteoglykany a kolagenovými vlákny [3]. Jsou důležitou součástí mezibuněčné signalizace, která moduluje několik biochemických procesů, mezi které patří například regulace buněčného růstu, podpora adheze, hojení ran, migrace, diferenciací, či proliferace. GAGs hrají roli také při angiogenezi, imunitních reakcích, vývoji folikulů, hemostázy krve a při patologických úlohách různých onemocnění, které zahrnují vrozené, či infekční choroby, neplodnost a rakovinu. Jsou využívány k léčbě nemocí, či se předepisují jako terapeutika [4, 5, 6]. Pokud jsou mukopolysacharidy spojené s molekulou proteinu, označují se jako proteoglykany. Jako prvek základní substance jsou spojené se strukturními elementy tkání, kterými jsou kosti, kolagen a elastin. Díky velkému množství hydroxylových skupin a negativně nabitých nábojů jsou GAGs schopné vázat mnoho molekul vody a vyplňovat tak velký prostor, což umožňuje jejich působení jako mazivo, či výplně pro jiné struktury.



Obrázek č. 1: Chemická struktura zástupců glykosaminoglykanů. Převzato z: [1].

Všechny zmíněné GAGs obsahují sulfátové skupiny, výjimkou je kyselina hyaluronová, u které se zatím neprokázala ani kovalentní vazba na proteiny, což znamená, že netvoří zmíněné proteoglykany. Sulfátové skupiny jsou vázány jako O-estery nebo jako N-sulfáty (to se týká heparinu a heparansulfátu). Výše uvedené typy glykosaminoglykanů se navzájem liší v řadě vlastností, jako je přítomnost uronové kyseliny, aminocukru nebo vazbou mezi nimi, výskytem či absencí sulfátu, délkou řetězce, typem vazeb na osový protein, vlastnostmi osových proteinů, či svojí celkovou funkcí [6]. V následujícím odstavci se zaměřím právě na odlišnosti mezi jednotlivými mukopolysacharidy.

Chondroitinsulfáty, konkrétně chondroitin-4-sulfát a chondroitin-6-sulfát jsou proteoglykany, kdy chondroitinsulfát je vázán O-glykosidovou vazbou xylen-serin a jsou významnou součástí chrupavky. Opakující se disacharid tvoří kyselina glukuronová a N-acetylgalaktosamin, který je nahrazen sulfátem v pozici 4 nebo 6, jeden sulfát je součástí každé disacharidové jednotky. Jeden řetězec obsahuje zhruba 50 disacharidových jednotek. Heparin je opakující se disacharid tvořený glukosaminem a jedné z celkově dvou možných uronových kyselin. Většina glukosaminových skupin je N-sulfatována, pouze některé jsou acetylovány. Osový protein proteoglykanu u heparinu je výjimečný, jelikož se skládá pouze ze serinu a glycinu. Vyskytuje se v játrech, plicích, v žírných buňkách a v kůži. Heparansulfát je také jedním ze zástupců mukopolysacharidů, je součástí velkého počtu proteoglykanů povrchu buněk. Je tvořen glukosaminem a převážně uronovou kyselinou. Keratansulfát tvoří opakující se disacharidové jednotky galaktosa-N-acetylglukosaminu, jehož zbytky obsahují sulfát. Existují dva typy keratansulfátu – I a II, liší se strukturou vazby na protein. Keratansulfát I se vyskytuje většinou v rohovce a keratansulfát II převažuje v proteoglykanu, který váže kyselinu hyaluronovou v chrupavce. Dermatansulfát se vyskytuje hlavně v tkáních živočichů, tvoří ho l-iduronová kyselina připojená vazbou α -1,3 na N-acetyl-d-galaktosamin. Kyselina hyaluronová je tvořena nerozvětveným řetězcem opakujících se disacharidových jednotek, které obsahují kyselinu glukuronovou a N-acetylglukosamin [6]. Její bližší specifikace bude popsána v následující kapitole.

2. KYSELINA HYALURONOVÁ A JEJÍ VLASTNOSTI

Kyselina hyaluronová (HA), též nazývaná jako hyaluronan či hyaluronát, je nesulfatovaný, záporně nabitý, lineární polysacharid s vysokou molekulovou hmotností (dosahující až několik milionů) z třídy glykosaminoglykanů. Skládá se z opakující se základní jednotky dvou sacharidů, obvykle se vyskytuje jako vysokomolekulární hmota v synoviální tekutině, která obklopuje klouby, chrupavku, kůži i tkáň oka [1, 7, 8, 9]. Vyskytuje se primárně v ECM, ale byl potvrzen i intracelulární výskyt. HA je jednou z nejvíce hydrofilních molekul v přírodě a je tímto označována jako přírodní zvlhčovač [10]. Její jedinečný viskoelastický charakter spolu s neimunogenicitou a biokompatibilitou vedl k využití HA v několika klinických aplikacích, které zahrnují i doplnění kloubní tekutiny při artritidě [11], lepší hojení ran [12] nebo při oční chirurgii [13].

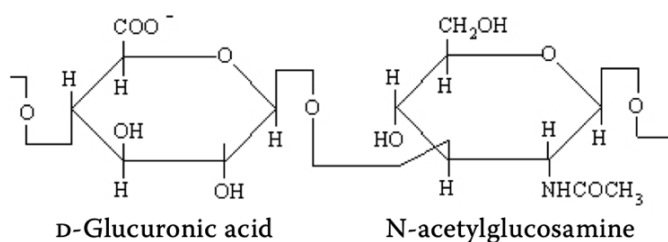
1.1 Historie

HA byla oficiálně objevena jako neznámá molekula v roce 1934 Karlem Meyerem a jeho kolegou Johnem Palmerem ve sklivci skotu. Studováním této izolované chemické látky došli k tomu, že obsahuje dvě molekuly sacharidu, z nichž jednou je kyselina uronová. Proto tato neznámá látka obsahující uronovou kyselinu dostala název hyaluronová kyselina, což odvodili z řeckého výrazu „*hyalos*“ (sklo) a uronová kyselina. V roce 1942 Endre Balazs požádal o patent na použití HA jako náhražky vaječného bílku do pekařských výrobků, v tomto roce byla tedy poprvé komerčně použita. V 50. letech 20. století (1950 – 1959) určil přesnou chemickou strukturu Karl Meyer společně s jeho kolegy. Z počátku byla izolována jako kyselina, ale dle fyziologických podmínek vykazovala známky jako sůl – hyaluronát sodný. Aby název odpovídal mezinárodní nomenklatuře polysacharidů, byl zaveden termín „hyaluronan“ v roce 1986 Endrem Balazsem, který jej vytvořil tak, aby zahrnovala různé formy, které tato molekula může mít, kyselá forma je kyselina hyaluronová a sůl je hyaluronát sodný [10].

1.2 Chemická struktura

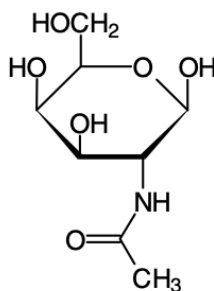
Kyselina hyaluronová je glykosaminoglykan, který se skládá z jednotek sacharidů N-acetylglukosaminu a kyseliny D-glukuronové, ty jsou mezi sebou spojeny střídáním $\beta 1 \rightarrow 3$ a $\beta 1 \rightarrow 4$ glykosidovými vazbami (obrázek č. 2). Tyto dva sacharidy jsou prostorovým uspořádáním podobné glukóze, která v β konfiguraci umožňuje, aby skupiny, které obsahuje, čímž jsou hydroxyly, anomerní uhlík na sousedním uhlíku a karboxylová skupina, byly ve stericky vhodných ekvatoriálních (rovníkových) polohách, zatímco malé atomy vodíku

obsazují méně stericky příznivé axiální (osové) polohy. Struktura je tedy energeticky značně stabilní [10].



Obrázek č. 2: Chemická struktura HA. Převzato z: [10].

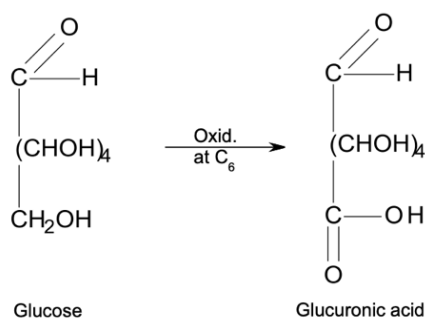
N-acetylglukosamin (obrázek č. 3) je derivátem glukózy s acetamidovou skupinou, která je navázána na 2^o uhlíku glykopyranozového cyklu. Jedná se o významnou složku řady biomolekul v tělech bakterií, živočichů i rostlin. Chitin je čistým polymerem N-acetylglukosaminu. N-acetylmuramová kyselina je éter N-acetylglukosaminu a laktátu, která je materiálem buněčné stěny [14]. Často je koncovým sacharidem oligosacharidové skupiny glykoproteinu, glykosidicky napojený s amidovým dusíkem zbytku proteinového asparaginu. V reakci acetylkoenzymu-A s glukosamin-6-fosfátem se zavádí acetylová skupina, vzniklý N-acetylglukosamin-6-fosfát podléhá mutázové reakci, kdy vzniká N-acetylglukosamin-1-fosfát, ze kterého poté vzniká UDP-N-acetylglukosamin, který je reaktantem v syntézách oligosacharidů a prekurzorem kyseliny N-acetylneuraminové [15].



Obrázek č. 3: Struktura N-acetylglukosaminu. Převzato z: [15].

Kyselina glukuronová je získávána oxidací glukózy (obrázek č. 4), je tedy derivátem glukózy s molekulovou hmotností 194,14 Da. V lidské tkáni se tvoří dehydrogenací glukózy uridindifosfátu (UDP), v prvním kroku je tvorba glukóza-6-fosfátu, jeho izomerace na glukózu-1-fosfát za vzniku UDP-glukózy, po následné oxidaci za pomoci nikotinamid adenin nukleotidu a UDP-glukózadehydrogenázy vzniká UDP-glukuronová kyselina. UDP-glukuronosyltransferázy jsou enzymy odpovědné za glukuronidaci, mají mnoho izoform a širokou specifčnost substrátu, která umožňuje glukuronové kyselině konjugaci s mnoho sloučeninami za vzniku glukuronidů, ty jsou poté vylučovány ve stolici, či moči. Glukuronová

kyselina je nejsilnějším přírodním detoxikátorem, velmi dobře rozpustná ve vodě a také významnou součástí dásní a slizů. [16, 17].



Obrázek č. 4: Tvorba kyseliny glukuronové oxidací glukózy. Převzato z: [17].

1.3 Výskyt

HA je téměř všudypřítomná a jeden z nejdůležitějších polysacharidů pocházející z těl lidí a všech obratlovců. Je klíčovou složkou různých vrstev pokožky, a to díky její schopnosti zadržovat vodu, nachází se v téměř všech biologických tekutinách a tkáních, a to hlavně v očních tekutinách a kloubech. Produkují ji dendritické buňky, což podporuje prezentaci antigenu a zvyšuje aktivaci a proliferaci T-buněk. Zvýšená hladina hyaluronanu je v rané fázi hojení ran [18-23]. Kyselinu hyaluronovou produkují také bakterie, a to konkrétně kmen *Streptococcus equi* a *Streptococcus zooepidemicus*, které umožnily větší množství produkce než při extrakčních metodách. Zmražením pupeční šňůry a kohoutích hřebínků, jsou zničeny buněčné membrány a HA je tak extrahována vodou a vysrážena v organických rozpouštědlech, jako je například chloroform, cetylpyridiniumchlorid či ethanol, kdy po čištění extraktu je zhruba 0,5 % proteinových nečistot a celkový výtěžek je 0,9 gramů HA na kilogram původního materiálu. Tato metoda je první průmyslově aplikovanou extrakcí pro izolaci a čištění HA farmaceutické kvality, kterou vyvinul Endre Balazs [24]. Reed a kol. provedli pečlivou analýzu těla krysy, která by měla být použitelná i pro ostatní savce. Z kůže byla získána téměř polovina HA a čtvrtina z kloubů a kostí, všechny hodnoty získané touto metodou jsou uvedeny v tabulce č. 1 [25].

Tabulka č. 1: Distribuce HA různých tkání v těle krysy. Převzato z: [25].

| | Hmotnost (g) | Celkem získaná HA (mg) | HA (%) |
|------------|--------------|------------------------|--------|
| Celá krysa | 201 | 60,5 | 100 |

| | | | |
|-------------------------|------|------|----|
| Kostra a podpůrné tkáně | 57,6 | 16,2 | 27 |
| Kůže | 40,2 | 33,8 | 56 |
| Svaly | 35,7 | 4,69 | 8 |
| Střevo a žaludek | 15,8 | 0,50 | 1 |
| Ostatní vnitřní orgány | 43,4 | 5,25 | 9 |

Nejvíce je zastoupená v pojivových tkáních, jako je pupečnicková šňůra, synoviální tekutina, sklivec a kůže, nachází se také ve významném množství v plicích, mozku, svalech a ledvinách, ale velmi malá koncentrace HA je v játrech a nejnižší koncentrace je v krevním séru. Běžné koncentrace hyaluronanu v různých tkáních a orgánech o různé funkci jsou uvedeny v tabulce č. 2 [25].

Tabulka č. 2: Normální koncentrace HA v různých orgánech u různých savců ($\mu\text{g} \cdot \text{G}^{-1}$). Převzato z: [25].

| Orgán či tekutina | člověk | ovce | králík | krysa |
|---------------------|-------------|-------------|---------------|--------------|
| Pupeční šňůra | 4100 | | | |
| Synoviální tekutina | 1400 – 3600 | 540 | 3890 | |
| Dermis (pokožka) | 200 | | | |
| Sklivec | 140-338 | 260 | 29 | |
| Plíce | | 98 – 243 | | 34 |
| Ledviny | | | 93 – 113 | 30 |
| Ledvinová papila | | | 250 | |
| Ledvinová kůra | | | 4 | |
| Mozek | 35 – 115 | | 54 – 76 | 74 |
| Sval | | | 27 | |
| Střevo | | | | 44 |
| Hrudní lymfa | 8,5 – 18 | 1,34 | | 5,4 |
| Játra | | | 1,5 | 4 |
| Moč | 0,1 – 0,3 | | | |
| Plazma (sérum) | 0,01 – 0,1 | 0,12 – 0,31 | 0,019 – 0,086 | 0,048 – 0,26 |

| | | | | |
|------------------------|-------------|-----------|---------|-----|
| Komorový mok | 0,3 – 2,2 | 1,6 – 5,4 | 0,6-2,5 | 0,2 |
| Bederní mozkomíšní mok | 0,02 – 0,32 | | | |

1.4 Biologické využití

HA je velmi významná molekula v řadě biologických funkcí. Má jedinečné fyzikálně-chemické vlastnosti, jako je biokompabilita, biodegradabilita, mukoadhezivita, viskoelasticita a je také hygroskopická. Plní klíčovou roli v metabolismu škóry (dermis) v procesech hojení ran a obnovy tkání, a to díky své schopnosti udržovat vlhké prostředí, které je důležité pro hojení, stimulaci růstových faktorů, buněčných složek a migraci buněk, které jsou nezbytné pro hojení [26].

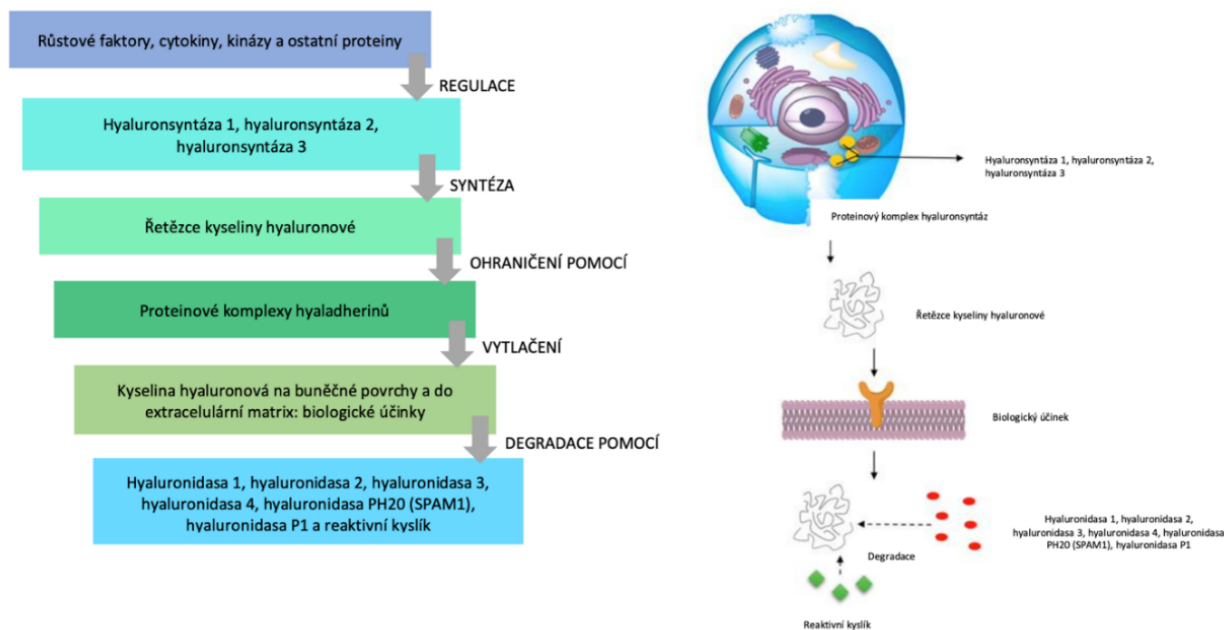
V oblasti medicíny se uplatňuje v oftalmologii [27], zubním lékařství [28], kloubní patologii [29], remodelaci kůže [30], cévních protéz a rekonstrukci nervů [31], pneumologii a rinologii [32], v estetické medicíně a kosmetice [33] nebo jako terapie při nádorových onemocněních [34] či při tkáňovém inženýrství [35]. Farmaceutické společnosti mají o kyselinu hyaluronovou velký zájem, pomocí nových technologií mohou vyrábět HA a spoustu jejích nových derivátů za účelem prodloužit dobu setrvání v lidských tkáních a její protizánětlivé účinky. Menší chemické modifikace v molekule umožnily výrobu ve vodě nerozpustných polymerů, které se vyrábějí v různých formách, jako jsou membrány, netkané sítě, gázy a gely, tyto materiály se používají pro krytí ran, lešení pro tkáňové inženýrství jako je – epidermis, dermis, chrupavka, kost a mikro-vaskularizovaná kůže [36].

3. METABOLISMUS KYSELINY HYALURONOVÉ

Hyaluronan je hlavní polysacharidovou složkou ECM a hraje klíčovou roli v organizaci architektury tkání a při regulaci funkcí buňky, mezi které můžeme zařadit proliferaci a migraci, pomocí interakcí s receptory buněčného povrchu a vazebnými molekulami. Kromě významných funkcí HA bylo také odhaleno, že jeho syntéza může regulovat buněčné funkce prostřednictvím přeprogramování buněčného metabolismu [37]. Proteiny, které vážou HA, jsou složkami extracelulárního matrix a stabilizují jeho integritu. Receptory hyaluronanu se podílejí na přenosu buněčného signálu, kdy jedna část receptorů obsahuje vazebné proteiny, jako je aggrecan, link protein, versican a neurocan, mezi receptory se zahrnuje antigen s diferenciací skupinou 44, tumor nekrotizující faktor α , gliální protein vázající hyaluronát a endoteliální hyaluronanový receptor lymfatických cév 1. Zatímco receptor pro motilitu zprostředkovanou hyaluronanem je nepříbuzný protein, který váže hyaluronan a vazebná místa pro HA mají podnět minimálního místa interakce s HA [10].

1.5 Syntéza

HA je syntetizována přirozeně, a to třídou integrálních membránových proteinů, které nesou název hyaluronansyntázy (HAS), u obratlovců byly objeveny 3 druhy hyaluronansyntáz – HAS1, HAS2, HAS3, které budou blíže specifikovány v následující podkapitole. Hyaluronansyntázy jsou enzymy, které syntetizují velké, lineární polymery opakující se disacharidovou strukturou hyaluronanu a to střídavým přidáváním kyseliny glukuronové a N-acetylglukosaminu do zvětšujícího se řetězce, pomocí jejich aktivovaných nukleotidových cukrů UDP [10]. U eukaryotických buněk je syntetizována na vnitřním povrchu plazmatické membrány jako lineární polymer, pro její podstatnou velikost je koordinovaně vytlačována přes membránu ven do extracelulárního prostoru. Produkce HA je řízena zejména hyaluronansyntázou 2 (HAS2), která může být regulována v různých stupních, a to od epigenetiky až po transkripční a posttranslační modifikace. Biosyntéza kyseliny hyaluronové je náročný proces z hlediska energie, který má významné spojení s udržováním metabolické homeostázy spolu s katabolismem HA. Rozhodující pro syntézu hyaluronanu je cytoplazmatická zásoba UDP-sacharidů, uridin-difosfát-N-acetylglukosamin je podstatný element živin a slouží jako donorový substrát pro O- β -N-acetylglukosamin několika cytosolických proteinů, počítaje HAS2 [38, 39]. Syntéza HA *in vitro* či *in vivo* ovlivňuje délku HA, jelikož každým enzymem se liší [18]. Jednotlivé klíčové kroky syntézy a degradace HA jsou znázorněny na obrázku č. 5.

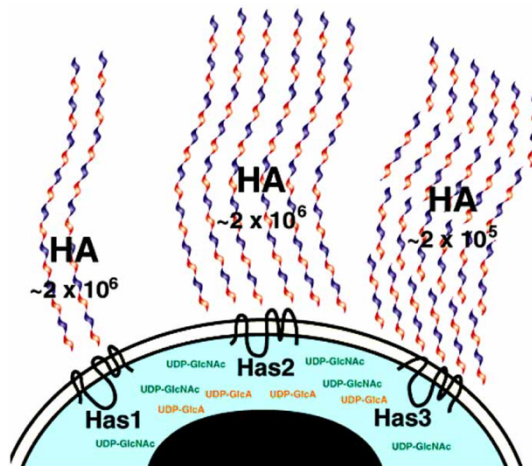


Obrázek č. 5: Schéma klíčových kroků syntézy a degradace HA. Převzato z: [39].

1.5.1 Hyaluronansyntázy

Hyaluronansyntázy zahrnují tři savčí enzymy, které vykazují odlišné enzymatické vlastnosti a mezi jejich významné úlohy patří syntéza řetězců HA o různých délkách. Existují 3 izoformy hyaluronansyntáz – HAS1, HAS2, HAS3, které se od sebe liší charakteristickými a regulačními systémy (obrázek č. 6) a jsou významné při řízení biosyntézy HA v několika fázích. Jak již bylo zmíněno tyto 3 izoformy byly identifikovány u obratlovců, jejichž aminokyselinové sekvence jsou konzervované skrze druhy. Byla analyzována primární struktura, kdy bylo zjištěno, že veškeré enzymy HAS, obsahují několikanásobné shluky hydrofobních aminokyselin na amino- i karboxylovém konci, což vykazuje, že jsou vloženy do lipidové dvojvrstvy [18]. První gen HAS, byl objeven u kmene *Streptococcus* v roce 1993, tento enzymový bakteriální protein o velikosti 42 kDa, který střídavě přidával N-acetylglukosamin a kyselinu glukuronovou na neredukující konec rostoucího řetězce hyaluronanu za použití dvou UDP-sacharidových substrátů, kdy se střídavě vytvářely $\beta 1 \rightarrow 3$ a $\beta 1 \rightarrow 4$ glykosidické vazby. Dnes jsou u eukaryot uznávány 3 enzymy HAS, které jsou kódované třemi příbuznými geny *HAS* na třech odlišných chromozomech. Spicer a kol. lokalizovali tři lidské a myší geny na 3 různých chromozomech, HAS1 byla u myši lokalizována na chromozomu 17, u člověka na chromozomu 19, HAS2 se u myši nachází na chromozomu 15 a u člověka na chromozomu 8, HAS3 u myši je na chromozomu 8 a u člověka na chromozomu 16 [40]. Produkty mají identické struktury, i když má každý enzym jiné vlastnosti. HAS1 je neméně aktivním enzymem, přesto je zodpovědný za syntézu několika polymerů od 2×10^5 Da po HA, která má vysokou molární hmotnost a to 2×10^6

Da. HAS2 je distribuována v normálních dospělých tkáních, je více aktivní a vytváří více než 2×10^6 Da formy HA. Může se jednat o HAS enzym, který reaguje na zvýšení syntézy vyvolané stresem, jako u šokových situací, septikémie, zánět, masivní poranění a ztrátě velkého množství krve, či při popáleninách. HAS2 je významná také na vývojových a opravných procesech, mezi které patří expanze a růst tkáně, podílí se na morfogenezi embryonálního a zejména srdečního polštáře, spojení má i s migrací, invazí a proliferací buněk a také s angiogenezí během vývoje [41]. HAS3 je z rodiny hyaluronansyntáz neaktivnějším enzymem, podporuje syntézu několika řetězců HA, které se liší velikostí od $0,2 \times 10^6$ po 2×10^6 Da. Produkty HAS3 mohou produkovat pericelulární glykokalyx a HA, která vzájemně působí s buněčnými povrchovými receptory [42].



Obrázek č. 6: Podobnosti a rozdíly mezi příslušnými savčími HAS enzymy. Převzato z: [42].

1.6 Odbourávání

Odbourávání, degradace neboli katabolismus HA je u savců výsledkem působení tří druhů enzymů, kterými jsou hyaluronidázy, β -d-glukuronidázy a β -N-acetylhexosaminidázy. Tyto enzymy se v těle nacházejí v různých formách, v séru a nitrobuněčně. Obecně je známo, že hyaluronidáza štěpí vysokomolekulární HA na menší oligosacharidy, zatímco β -d-glukuronidáza a β -N-acetylhexosaminidáza dále snižují oligosacharidové fragmenty odstraněním neredukujících koncových sacharidů. Produkty degradace HA jsou oligosacharidy a hyaluronan o velmi malé molekulové hmotnosti, tyto získané produkty vykazují proangiogenní vlastnosti. Hyaluronidáza katalyzuje hydrolýzu HA, tím se snižuje viskozita kyseliny a tímto krokem se zvyšuje propustnost tkání. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* a *Clostridium perfringens* produkují enzym hyaluronidázu ke zvýšení pohyblivosti mezi tkáněmi a také jako antigenní ochranu, která brání jejich rozpoznání fagocyty v imunitním systému [10]. Dále je degradace HA a ostatních

glykosaminoglykanů zprostředkovávána reaktivními formami kyslíku (ROS), ty pak mohou být součástí destrukce kloubních struktur. První výzkum degradace HA pomocí ROS provedl Pigman a Rizvi v roce 1959. Mezi ROS, které degradují HA patří hydroxylový radikál, superoxidový anion či peroxid vodíku [42, 43].

1.6.1 Hyaluronidáza 1, 2, 3

Jedná se o endoglykosidázy, neboli enzymy katabolizující HA, jsou velmi dobře distribuovány v tkáních, mají velký rozsah optimálního pH a také neobvyklý rozsah substrátů. V tkáních snižují normální viskozitu HA, snižují její lubrikační kvality a působí jako „rozšiřovací faktor“, který usnadňuje difúzi podkožně podaných látek, jako jsou antivirové vakcíny, či barviva. Hyaluronidázy mají využití v lékařském odvětví [44], v chemoterapeutikách [45] a aplikují se také v plastické chirurgii a dermatologii [46]. Meyer objevil účinek těchto proteinů a rozdělil hyaluronidázy do 3 skupin, a to na savčí hyaluronidázu (HYAL-3), hyaluronidázu z pijavic (HYAL-2) a mikrobiální hyaluronidázu (HYAL-1). Mezi mikrobiální lze zařadit bakteriální hyaluronidázy, jenž jsou β -endo-N-acetylglukosaminidázy a většina z nich má pro HA substrátovou specifitu. Jedná se o lyázy, které se liší od ostatních hyaluronidáz tím, že nevyužívají hydrolýzu, ale dochází k β -eliminační reakci na β -1,4 glykosidických vazbách, čímž vzniká nenasycený disacharid a je možné tuto reakci sledovat spektrofotometricky. Tyto enzymy byly izolovány z několika mikroorganismů, mezi které lze zahrnout kmen *Clostridium*, *Micrococcus*, *Streptococcus* a *Streptomyces*. Chybějící aktivita HYAL-1 byla zjištěna u lidí jako genetická porucha a byla nazvána jako Mukopolysacharidóza IX, porucha je spojena s kolujícími hladinami HA. HYAL-1 se jeví jako lyzozomální enzym, který může HA štěpit na malé disacharidy, ačkoliv hlavním produktem je tetrasacharid, tato skutečnost není zcela objasněna, jelikož HYAL-1 má pH optimální 3,8 a to je výrazně pod hodnotou pH 4,5 nalezeného v lyzozomech, tudíž není jasné, proč by se v oběhu měla HYAL-1 vyskytovat, jedná se o artefakty *in vitro* enzymových testů. Tato hyaluronidáza je jedinou přítomnou hyaluronidázou v lidské moči. Druhou třídou hyaluronidáz jsou savčí typy těchto enzymů, jedná se o endo- β -N-acetylhexosaminidázy, které degradují β -1,4 glykosidické vazby HA, produkující tetrasacharidy. Působí na HA, chondroitin, chondroitin-4,6-sulfát a dermatansulfát. Tyto enzymy lze nalézt v savčích spermiích a lyzozomech, v jedu hadů, plazů a blanokřídlých, exprese se odehrává v chondrocytech a ke zvýšení dochází, když fibroblasty podléhají diferenciaci chondrocytů. Jedná se o hydrolázy, přidávají vodu přes tu vazbu, která má být rozštěpena a vytváří tetra- a hexasacharidy jako konečné produkty. Tento chod reakce je obtížný ke sledování, a proto bylo nutné navrhnout speciální testy, které měří postup reakce.

HYAL-3 je mezi hyaluronidázami záhadou, jelikož je velmi exprimována, ale hyaluronidázové testy nedokáží identifikovat žádnou aktivitu. Je možná i koordinovaná exprese HYAL-2 a HYAL-3, obě jsou upregulovány zánětlivými cytokiny, mezi které patří interleukin-1 a tumor nekrotizující faktor alfa, ale HYAL-1 nikoliv. Třetí třídu hyaluronidáz produkují pijavice, někteří parazité a koryši, konkrétně jsou označovány jako β -endo-glukuronidázy. Jedná se o hydrolázy, mohou se proto zdát příbuznými enzymům obratlovců. Tyto hyaluronidázy degradují β -1,3 glykosidickou vazbu, a to vede ke vzniku tetrasacharidů a hexasacharidů. Konkrétně HA s vysokou molekulovou hmotností je štěpena na limitní produkt 20 kDA nebo 50 disacharidových jednotek. Na rozdíl od savčích glykosidáz degradují pouze HA a zůstávají nereagující vůči jiným glykosaminoglykanům. Lze je nalézt ve slinných žlázách mechovců a pijavic. HYAL-2 je upevněna k plazmatické membráně glykosylfosfatidylinositolovou vazbou a část se vyskytuje v rozpustné formě. Hyaluronidázy lze rozdělit také podle aktivity závislé na pH, a to na kyselé aktivní hyaluronidázy, tato skupina enzymů je aktivní při pH 3 a 4. Druhou skupinou jsou neutrální aktivní hyaluronidázy, které jsou aktivní při pH mezi 5 a 8, do této skupiny patří hyaluronidázy z hadího a včelího jedu [39, 47, 48, 95, 96].

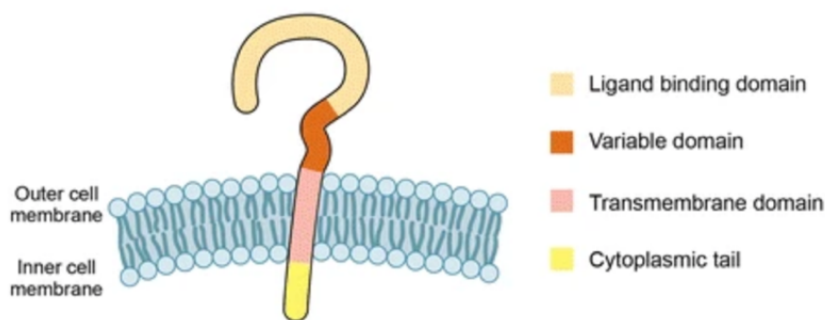
1.7 Hyaladheriny

Proteiny, které k sobě váží hyaluronan, byly zařazeny do skupiny nesoucí název hyaladheriny. Lze je rozdělit na proteoglykany vázající HA (extracelulární nebo matrixové hyaladheriny), HA buněčné povrchové receptory (celuární hyaladheriny). Hyaluronan má dva molekulární mechanismy interakce se svými hyaladheriny, HA může interagovat autokrinním způsobem se svými receptory na stejné buňce a druhým mechanismem má schopnost chovat se jako parakrinní látka, která váže své receptory na okolní buňky a tím pak aktivuje různé intracelulární signální kaskády. HA tedy působí jako lešení, které stabilizuje strukturu ECM díky svému pasivnímu strukturálnímu působení a také prostřednictvím aktivní interakce s několika extracelulárními hyaladheriny, jako je aggrecan, který je významný v chrupavce, neurocan a brevican, které jsou významné v centrální nervové soustavě a versican, což je velký fibroblastový proteoglykan, který je exprimován v embryonální chrupavce. Interakce kyseliny hyaluronové s jejími buněčnými povrchovými receptory je zprostředkována třemi biologickými procesy, kterými jsou – přenos signálu, tvorba pericelulárních povlaků a internalizace zprostředkovaná receptory [18, 49, 50].

1.7.1 Glykoprotein s diferenciací skupinou 44

Glykoprotein s diferenciací skupinou 44 (CD 44) je hlavním receptorem pro kyselinu hyaluronovou, kdy se váže se a aktivuje CD44, čímž aktivuje buněčné signální dráhy, které

indukují buněčnou proliferaci, zvyšují přežití buněk a buněčnou motilitu a modulují cytoskeletární změny. CD44 je nekinázový transmembránový glykoprotein, který je exprimován v mnoha izoformách difundovaných ve většině typů lidských buněk, včetně rakovinných kmenových buněk, kdy reguluje metastáze prostřednictvím šíření CD44 na buněčný povrch. Interaguje s vhodnými ligandy ECM a tím podporuje proces migrace a invaze, které jsou zahrnuty v metastázích. Štěpení a vylučování CD44, zvýšená hladina rozpustného CD44 v séru pacienta je markerem nádorové zátěže a metastáz u mnoha druhů rakoviny. Struktura proteinu a genu CD44 je znázorněna na obrázku č. 7.



Obrázek č. 7: Struktura proteinu a genu CD44. Převzato z: [51]

Jedná se o jednořetězcový glykoprotein kódovaný jedním genem umístěným na chromozomu 11 u lidí a u myši se nachází na chromozomu 2. CD44 může reagovat i s různými růstovými faktory, cytokiny a proteiny ECM, jako je například fibronektin. CD44 intracelulární doména interaguje s cytoskeletem, proto když naváže ECM hyaluronanu vytvoří se spojení mezi cytoskeletárními strukturami a biopolymerem. Tato interakce mezi HA a CD44 se účastní mnoha intracelulárních signálních drah, které řídí buněčné biologické procesy, mezi které lze zařadit angiogenezi, migraci buněk, proliferaci, agregaci, receptorem zprostředkovanou internalizaci či degradaci HA a adhezi ke složkám ECM. Tento receptor hraje důležitou roli při hojení ran a zánětech. Co se týče exprese tohoto receptoru normální buňkou dospělého a plodu, prvně byla standardní izoforma izolována z hematopoetických buněk a nyní se nachází v centrálním nervovém systému, epidermis nebo například v plicích. Distribuce izoform je omezená a exprimována na výběr epiteliálních buněk, u izoform s omezenou distribucí a sekvencí exonu je možné, že budou mít různé funkce ve srovnání se standardní izoformou. Vybrané epiteliální buňky, keratinocyty a makrofágy exprimují variantní izoformy CD44 (CD44v) a jsou přítomny v různých fázích na tkáních. Pokud dochází ke ztrátě CD44 je porušeno hojení ran, proliferace keratinocytů a je narušen metabolismus hyaluronanu. U nádorových buněk, kde má CD44 metastatický potenciál u lidské malignity je třeba dalšího

objasnění. Buňky rakoviny prsu ukazují na abnormální expresi CD44, a to včetně heterogenních exprimujících izoform CD44. Jak již bylo zmíněno, existuje celá rodina CD44 nekinázových transmembránových glykoproteinů a různé izoformy CD44v, které odehrávají různé funkční role. Isoformy CD44v se mohou chovat jako koreceptory, jelikož vážou růstové faktory na buněčný povrch a prezentují je specifickým receptorům. Neoplastické buňky prostaty exprimují vyšší hladiny CD44 a buňky prostaty, které jsou benigní, exprimují vyšší izoformy CD44 varianty 5 (CD44v5). Příklady jednotlivých variant izoform CD44 jsou uvedeny v tabulce č. 3 společně s jejich významem a funkcemi [18, 51, 52].

Tabulka č. 3: Význam a funkce izoform CD44. Převzato z: [51].

| Izoformy CD44 | Biologické funkce | Typ rakoviny |
|----------------------|--|--------------------------------------|
| CD44s | Růst nádoru, metastázy, nízká míra přežití | Rakovina slinivky |
| CD44s | Postup | Rakovina prsu |
| CD44v3 | Migrace, nadměrně exprimovaná v nádorové tkáni | Spinocelulární karcinom hlavy a krku |
| CD44v4, CD44v5 | Lokus plicních metastáz | Rakovina slinivky |
| CD44v6 | Metastáza; asociace s jaterními metastázami | Rakovina slinivky |
| CD44v6 | Exprese buněk epiteliálního fenotypu | Rakovina prostaty |
| CD44v6 | Tumorigenní a chemorezistence | Rakovina prostaty |
| CD44v6 | Migrace, metastázy, pokročilé stádium nádoru | Kolorektální adenokarcinomy |
| CD44v6 | Metastáza | Rakovina tlustého střeva |
| CD44v6, CD44v9 | Koreluje s metastázami do lymfatických uzlin, metastázami v játrech a stádiem TNM (nádor, uzliny, metastáza) | Rakovina slinivky |
| CD44v9 | Nižší míra přežití, koreluje s metastázami lymfatických uzlin/jater a stádiem TNM | Rakovina slinivky |

| | | |
|-----------------------------|---|---------------------------|
| CD44v9 | Spojeno s horší prognózou, přispělo k invazi a migraci zprostředkované přechodem z epitelu na mezenchym | Rakovina močového měchýře |
| CD44v4-10 | Podporovaná iniciace adenomu u Apc (Min/+) myší, iniciace nádoru | Kolorektální rakovina |
| CD44v8-10 | Iniciace nádoru | Rakovina žaludku |
| CD44v (v6-10, v7-10, v8-10) | Metastázy v plicích | Rakovina prostaty |

1.7.2 Protein genu 6 stimulovaný faktorem nekrotizujícím nádory

Protein genu 6 stimulovaný faktorem nekrotizujícím nádory (TSG6), který je u člověka kódován genem *TNFAIP6* a je lokalizován na chromozomu 2, u myši je také na chromozomu 2. Jedná se o zánětlivý cytokin produkovaný makrofágy či monocyty během akutního zánětu a je zodpovědný za různé signální události v buňkách, které vedou k nekróze či apoptóze. Je důležitý také díky své odolnosti proti infekcím a rakovině [53]. Zprostředkovává mnoho imunomodulačních a prospěšných aktivit menezchymální kmenové či stromální buňky. U člověka je exprese TSG6 zajištěna stromálními buňkami, je přítomen ve fibroblastech, sekrečních granulích neutrofilů a u myši se nachází v žírných buňkách. Není produkován ve zdravých dospělých tkáních, ale jeho exprese je indukována ve škále buněčných typů, jako odpověď na zánětlivé mediátory a růstové faktory. Váže se na četné ligandy, včetně molekul ECM, jako jsou glykosaminoglykany. Spolu s modulem Link se váže na hyaluronan a zprostředkovává tvorbu síťovaných struktur HA vyššího řádu, může působit jako kofaktor při přenosu těžkých řetězců IaI na hyaluronan, také je schopný tvořit komplexy s pentraxinem 3, které spojují až 20 hyaluronanových řetězců a tvoří tak uzel v ECM. Tyto komplexy jsou produkovány endoteliálními buňkami, makrofágy, fibroblasty a další buňky. Vazba na HA může sloužit v ECM jako prostředek k soustředění pro sekreci TSG6 z produkující buňky [54, 55, 56, 57].

1.7.3 Gliální protein vázající hyaluronát

Gliální protein vázající hyaluronát (GHAP) je glykoprotein s aminokyselinovou sekvencí, která je identická se sekvencí versicanu v oblasti vázající hyaluronát. Je kódován genem *versican*, u člověka se nachází na chromozomu 5 a u myši na chromozomu 13. GHAP je tedy pravděpodobně proteolytickým produktem versicanu, který odpovídá jeho amino-terminální doméně. Jedná se o protein bílé hmoty, vyskytuje se v astrocytech bílé hmoty a uvolňuje se

z tkání štěpením hyaluronidázou. Vazba na HA je přes jednu molekulu proteinu, která se váže na 17 opakujících se disacharidových jednotek [50, 51, 52, 60, 97, 98].

1.7.4 Endoteliální hyaluronanový receptor lymfatických cév 1

Endoteliální hyaluronanový receptor lymfatických cév 1 (LYVE-1) je protein vázající HA exprimovaný v lymfatickém vaskulárním endotelu a makrofázích. U lidí je kódován genem *LYVE1* na chromozomu 11 a u myši na chromozomu 7. LYVE-1 řídí obrat HA zprostředkováním jeho adsorpce z tkání do lymfy. Tímto procesem se podílí na regulaci hydratace tkání a jejich biomechanických vlastností, tvoří také komplexy s růstovými faktory, prostaglandiny a dalšími tkáňovými mediátory, které se podílejí na regulaci lymfangiogeneze a mezibuněčné adheze. Tento hyaladherin má funkci lymfatického dokovacího receptoru pro dendritické buňky, který se selektivně zapojuje do jejich povrchových glykokalyxů HA, aby reguloval vstup do periferních lymfatických uzlin a migraci. LYVE-1 upřednostňuje interakci s velkými polyvalentními komplexy HA oproti volným řetězcům HA, toto spojení je zprostředkováno připojením leukocytů potažených hyaluronovou kyselinou do lymfatických cév *in vivo* [18, 61].

1.7.5 Receptor pro motilitu zprostředkovanou hyaluronanem

Receptor pro motilitu zprostředkovanou hyaluronanem (RHAMM) je známý také jako CD168 a byl prvním izolovaným intracelulárním hyaladherinem. Je kódován genem *HMMR* u člověka na chromozomu 5 a u myši na chromozomu 11. Vyskytuje se v několika izoformách, které jsou přítomny v buněčné membráně, cytoplazmě a v jádře. RHAMM na povrchu buněk zprostředkovává a podporuje migraci buněk, zatímco intracelulární RHAMM moduluje buněčný cyklus, tvorbu a integritu mitotického vřeténka. Interakce HA a RHAMM je velmi významná při zánětech a opravě tkáně, jelikož spouští signální dráhy, a tak kontrolují buňky, jako jsou makrofágy a fibroblasty. Může zajistit proliferaci buněk rakoviny prsu, a to změnou signálních drah, které vedou k aktivaci extracelulárně regulované kinázy, může být tedy slibným markerem nádoru nebo cílem pro terapii rakoviny. Studie ukazují, že migraci buněk, kterou zprostředkovává CD44 během zánětu a hojení ran, může vyžadovat povrchovou expresi RHAMM [18, 62].

1.7.6 Hyaluronanový receptor pro endocytózu

Hyaluronanový receptor pro endocytózu (HARE) je také nazýván jako stabilin-2 byl prvně izolován ze sinusových endoteliálních buněk v játrech, slezině a lymfatických uzlinách, poté byl nalezen v endoteliální buňce oka, srdce, mozku a ledvin. Lidský gen, který kóduje tento receptor je na chromozomu 12 a u myši na chromozomu 10. Váže se na HA a další

glykosaminoglykany vyjma keratansulfátu, heparansulfátu. HARE zajišťuje systémovou clearance GAGs z oběhového a lymfatického systému prostřednictvím vychytávání z potahovaných jamek [18, 63].

1.7.7 Toll-like receptor 2 a Toll-like receptor 4

Toll-like receptory (TLR) v překladu „receptory podobné genu *Toll*“ rozpoznávají bakteriální lipopolysacharidy a lipopeptidy, jsou schopné zahájit vrozenou imunitní odpověď. TLR2 je u člověka kódován genem *TLR2* na chromozomu 4. TLR4 je u člověka kódován genem *TLR4* na chromozomu 9. Existují dva možné mechanismy objasnění, jak může HA ovlivňovat TLR. Podle prvního působí HA s nízkou molekulovou hmotností jako antagonist pro TLR2 a pro TLR4, což vyvolá zánětlivou reakci. V druhém případě se HA neváže na TLR, ale má schopnost regulovat interakce TLR s jejich ligandy skrze pericelulární želé bariéru, kterou tvoří. Za fyziologických podmínek vytváří HA s vysokou molekulovou hmotností kolem buněk ochranný povlak, který je hustý a viskózní a tím pokrývá povrchové receptory, jako jsou TLR a omezuje jejich interakce s ligandy. Během zánětu dochází k rychlé degradaci HA v důsledku snížení pH, zvýšení reaktivních forem kyslíku a možné přítomnosti patogenů, které produkují hyaluronidasu a proto klesá molekulová hmotnost HA, čímž se snižuje schopnost vázat vodu a tloušťka a viskozita jeho pericelulárního štítu. To má za následek zvýšenou dostupnost buněčných receptorů pro jejich ligandy, zahájení jejich přirozené imunitní odpovědi a zesílení zánětlivé reakce. Z tohoto důvodu se hyaluronan může podílet na patogenezi onemocnění, které jsou podmíněny imunologickými procesy [18, 64].

1.7.8 Molekula mezibuněčné adheze 1

Molekula mezibuněčné adheze 1 (ICAM-1), také nazýván jako CD54, je buněčný povrchový glykoprotein a adhezní receptor, řadí se mezi imunoglobuliny z rodiny ICAM. Je kódován genem *ICAM1* lokalizovaným u člověka na chromozomu 19 a u myši na chromozomu 9. Hraje důležitou roli v regulaci odvodu leukocytů z oběhu do místa zánětu. ICAM-1 je exprimován v endoteliálních, epiteliálních a imunitních buňkách, v reakci na podnícení zánětu je regulován. Jedná se o hlavní regulátor mnoha tkáňových funkcí od počátku až po patologické stavy. Hyaluronan podstatně zvyšuje expresi ICAM-1 na tubulárních buňkách a tím zvyšuje sekvenčně specifickou vazbu DNA transkripčních faktorů, kterým je nukleární faktor kappa B a aktivační protein 1 v tubulárních buňkách [65, 66].

1.7.9 Protein indukující buněčnou migraci a vzájemící hyaluronan

Protein indukující buněčnou migraci a vzájemící hyaluronan (CEMIP), také uváděn pod zkratkou KIAA1199, jedná se o proteinovou sekvenci, která má 3 domény, dvě GG domény, které jsou

složeny ze dvou konzervovaných glycinových zbytků, dále má protein speciální doménu G8. Doména GG se skládá ze sedmi β -řetězců a dvou α -spirál, její velikost je přibližně 100 aminokyselin. Doména G8 obsahuje 5 duplicitních párů β řetězce a 8 glycinových zbytků, domény G8 indukují potenciální trans-membránovou strukturu a předpokládá se, že mají signální peptidy, a proto může CEMIP hrát roli v procesu zpracování a extracelulární ligace. CEMIP je lokalizován v endoplazmatickém retikulu okolo jádra buňky, jedná se o sekreční protein, který je vysoce sekretován ve vnitřním uchu a jako onkogen se podílí na rakovině, je totiž vysoce exprimován buňkami rakoviny tlustého střeva. Gen kódující tento protein je KIAA1199 a u člověka nachází na chromozomu 15, u myši na chromozomu 7. Hraje důležitou roli ve vazbě a depolarizaci HA, bylo zjištěno, že knockdownem CEMIP byla zrušena degradace HA lidskými kožními fibroblasty. Tento hyaladherin má klíčovou úlohu v katabolismu HA ve škáře kůže a v artritické synovii [67, 68, 69].

4. METABOLISMUS KYSELINY HYALURONOVÉ PO OZÁŘENÍ

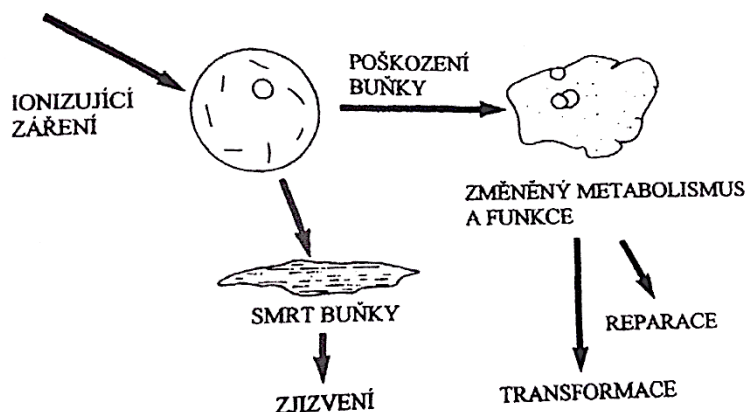
1.8 Ionizující záření

Ionizující záření (IZ) představuje tok hmotných částic, nebo fotonů elektromagnetického záření, které mají schopnost ionizovat atomy prostředí, ve kterém se nacházejí [70]. Lze ho rozlišit na dva typy, a to na fotonové záření neboli nepřímo ionizující záření, které nese elektrický náboj a díky tomu předává svoji energii přímo ionizujícím částicím. Do tohoto typu se řadí neutrony a záření rentgenové, které pochází z atomového obalu. Do fotonového záření patří také gama záření, které je emitované z jader atomů a v nukleární medicíně se využívá při všech vyšetřeních *in vivo* a u většiny *in vitro* vyšetření. Druhým typem je částicové záření neboli přímo ionizující záření, kdy částicemi jsou protony, uhlíkové ionty a částice alfa a beta, tyto částice nesou elektrický náboj, elektrony procházející prostředím reagují v poli jádra s elektrony atomových obalů a způsobují excitaci a ionizaci atomů. Alfa částice odpovídají jádrům hélia, složeny ze dvou protonů a dvou neutronů, k emisi alfa částice dochází ke snížení atomové hmotnosti o čtyři a také ke snížení atomového čísla o dvě. Tyto alfa částice mají kladný náboj +2 a mají výraznou ionizační sílu. Kvůli velké hustotě a náboji ztrácí rychleji energii, a to během krátké vzdálenosti a doby, alfa částice urazí průměrně vzdálenost 3 až 5 cm a většinou neproniká přes oblečení a pokožku, z tohoto důvodu musí být alfa částice emitovány blízko svého cíle, aby došlo k účinku nebo poškození. Emise částic alfa je uskutečněna radioaktivním rozpadem těžkých kovů, jako je radium, uran nebo plutonium. Zatímco beta částice se dělí na emise pozitivní – pozitrony a negativní – elektrony. Negativní beta částice má jeden záporný náboj a zvyšuje počet protonů o jeden a zároveň snižuje počet neutronů o jeden. Pozitivní beta emise se skládá z jednoho kladného náboje a snižuje počet protonů o jeden a zvyšuje počet neutronů o jeden. Nicméně v obou těchto případech se atomová hmotnost nemění, ale tvoří jiný prvek. Beta částice mohou oproti alfa částicím pronikat vodou a tkáněmi s vysokou energií, jsou schopné urazit větší vzdálenost. IZ má dostatek energie k uvolnění elektronů z atomů nebo molekul, které ionizují. Neionizující záření zahrnuje ultrafialové záření, viditelné světlo laserové, infračervené, mikrovlny a rádiové vlny. Za jeden rok se celosvětově provede více než 3600 milionů diagnostických radiologických vyšetření, 37 milionů výkonů nukleární medicíny a provede se 7,5 milionu radioterapeutických ošetření. Expozici IZ lze rozdělit do 3 situací. V prvním případě plánované expoziční situace, které vyplývají ze záměrného zavádění a provozování zdrojů záření se specifickými účely, jako je tomu u lékařského využití, v průmyslu

či výzkumu. Druhým typem situace je, když dojde například k ozáření radonem v domácnosti, na pracovišti, nebo ozáření z prostředí. Poslední typ situace expozice ionizujícího záření jsou nouzové situace, které jsou výsledkem neočekávaných událostí, kdy je třeba okamžitá reakce, jako jsou jaderné havárie nebo násilné konflikty s zneužitím jaderných zbraní [71, 72, 73].

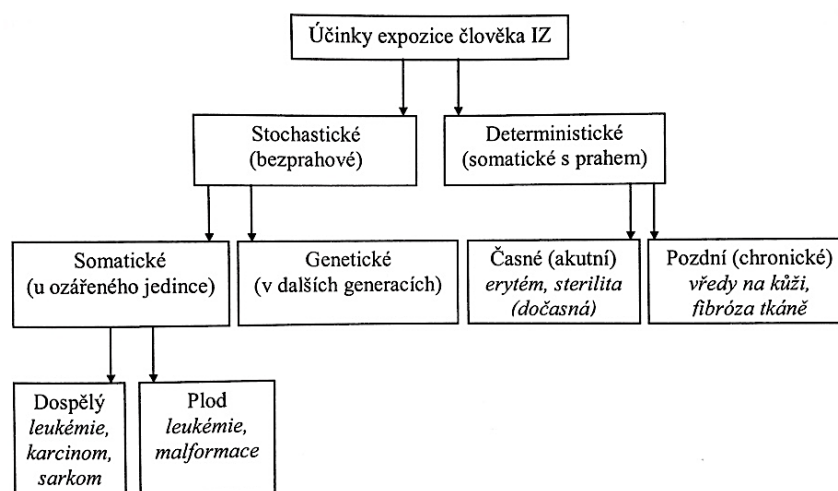
1.8.1 Biologické účinky ionizujícího záření

Ionizující záření na člověka může působit po externím nebo vnitřním vystavení. K ozáření může dojít interně – vnitřní kontaminace, když je radionuklidy proniknou do těla požitím, vdechnutím, nebo vstoupil do krevního řečiště injekcí či ranou. Nuklidy, které se ukládají do kůže, podléhají radioaktivnímu rozpadu a emitují záření. Dále může IZ působit po vnější expozici, kdy k záření dochází prostřednictvím zdroje v okolním prostředí, jako je voda, zemské povrchy nebo vzduch a ty se usadí na kůži, či oděvu – vnější kontaminace. Tento typ radioaktivního materiálu lze z těla odstranit pouze umytím místa. Radiační poškození tkáně nebo orgánu závisí na přijaté dávce záření nebo na absorbované dávce, závisí také na typu záření a citlivosti různých tkání. Alfa emise obsahují velké množství energie a u horníků, kteří těží přírodní uran, vdechují tyto částice, které se ukládají do plicní tkáně a mohou způsobit škodlivé účinky přímo na buňkách alveol, jelikož uran je charakteristický velmi dlouhým poločasem rozpadu a při svém rozpadu emituje silné alfa částice. Nad určitými prahy může záření narušit fungování tkání či orgánů a může způsobit akutní účinky, jako je zarudnutí kůže, vypadávání vlasů, popáleniny způsobené záření nebo akutní radiační syndrom. Prahová hodnota dávky pro akutní radiační syndrom je asi 1 Sv. Pokud je dávka záření nízká anebo je podávání dlouhou dobu, riziko je nižší, protože existuje větší pravděpodobnost nápravy poškození. Stále ale existuje riziko dlouhodobých účinků, jako je rakovina, které se mohou projevit až po desetiletích. Vystavením expozici ionizujícího záření v prenatálním období může vyvolat poškození mozku u plodu. Vnitřní i vnější ionizující záření může přímo i nepřímo poškodit DNA, alfa a beta částice jsou vysoce ionizující částice a způsobují tak přímé poškození DNA, jelikož mohou interagovat a přenášet svou energii přímo do DNA, to má za následek jedno vláknové nebo dvou vláknové zlomy nebo poškození chromozomů. U nepřímého poškození dochází k tvorbě volných radikálů, které jsou produkovány ionizací okolní vody. Mechanismus nepřímého účinku se vyskytuje přibližně u dvou třetin všech poškození buněk způsobených zářením. V důsledku mutací DNA, ke kterým dochází při s IZ, je důležité upozornit na zvýšené riziko rozvoje rakoviny (obrázek č. 8) [72, 73, 74].



Obrázek č. 8: Schematické znázornění účinku ionizujícího záření na buňku. Převzato z: [72].

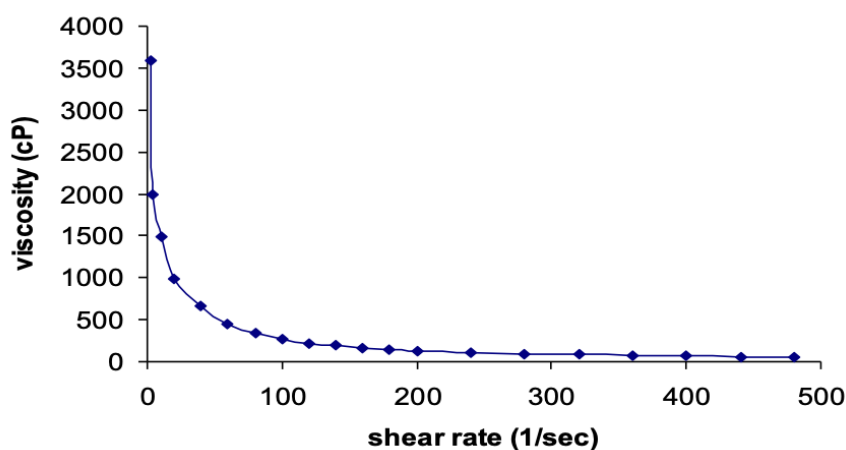
Jakékoliv množství IZ zvyšuje riziko stochastických účinků neboli pravděpodobnost vzniku zhoubného bujení po ozáření. Vystavení záření může vyvolat biologické účinky, existují dva typy účinku, a to účinky závislé na dávce a pravděpodobnost závislá na dávce. Účinky závislé na dávce jsou označovány jako deterministické účinky a ty se objevují v době, kdy byla překročena konkrétní prahová hodnota expozice. Mezi deterministické účinky lze zařadit akutní chorobu z ozáření a radiaci vyvolanou kataraktu nebo, dermatitidu. Stochastické účinky vyjadřují pravděpodobnost závislou na dávce, představuje výsledek, který se vyskytuje s určitou pravděpodobností, ale bez určité prahové hodnoty, při které se účinky spouští. Tyto účinky se objevují mnoho let po ozáření a zahrnují rozvoj nádorového onemocnění v důsledku vzniknutých mutací (obrázek č. 9) [75].



Obrázek č. 9: Přehled biologických účinků ionizujícího záření. Převzato z: [72].

1.9 Kyselina hyaluronová a ionizující záření

Působení IZ na kyselinu hyaluronovou má za následek ionizaci nebo excitaci atomů HA. Ionizace atomů představuje proces, kdy se z neutrálního atomu stává iont. Při excitaci atomů HA dochází k přechodu energetického stavu atomu na vyšší energetickou hladinu, dochází k tomu u atomů HA ale i u okolního ECM, a to vede k fyzikálním a chemickým změnám HA polymeru. Může docházet k zasíťování, poškození vazby nebo ke štěpení jednotlivých řetězců. Pokud se rozštěpí řetězce, dojde ke snížení molekulové hmotnosti a zároveň i viskozity. Zasíťováním se zvýší viskozita a tím i molekulová hmotnost HA molekuly. Při výzkumu ozáření HA rentgenovým zářením se k měření viskozity používá kuželový a deskový reometr a také kapilární viskozimetr. Tixotropie je označována jako děj, kdy suspenze, emulze a koloidy značí snížení viskozity při zvýšeném smykovém napětí, tento termín byl potvrzen při výzkumu účinku rentgenového záření na HA. Viskozita HA klesala při rostoucí smykové rychlosti (od 100 s^{-1} do 480 s^{-1}). Při nízké smykové rychlosti je roztok hyaluronanu viskózní (obrázek č. 10) a při vyšších smykových rychlostech je roztok HA spíše elastický. To znamená, že když je HA vystavena nižší smykové rychlosti, tak jsou konformační úpravy polysacharidového řetězce pomocí Brownova pohybu rychlé natolik, aby umožnily řetězcům udržet různé konfigurace pod stanoveným napětím a vzájemně po sobě klouzaly, to má za následek viskózní tok [76].



Obrázek č. 10: Graf závislosti viskozity na smykové rychlosti pro 1,25 % w/v hyaluronan v deionizované vodě. Převzato z: [76].

Při ozáření hyaluronanu rentgenovým zářením bylo tedy zjištěno snížení viskozity v závislosti na dávce. Při nižší dávce, jako je 10 Gy je také pozorováno snížení viskozity, nicméně při dávce 100 Gy je pozorován největší pokles viskozity [76, 77]. Ozáření HA gama zářením dochází k depolymerizaci hyaluronanu prostřednictvím rozštěpení glykosidických vazeb, které jsou mezi $\beta 1 \rightarrow 4$ -D-glukuronovou kyselinou a $\beta 1 \rightarrow 3$ -N-acetyl-D-glukosaminu. Měřením barvy

bylo zjištěno, že se barva HA po ozáření změní na intenzivně žlutou, snižuje se molekulová hmotnost od dávky 100 Gy a snižuje se dále při zvyšování dávky gama záření. Molekula HA s nižší molekulovou hmotností je také degradována prostřednictvím ultrazvuku, oxidační degradací, kyselou hydrolyzou, vysokou teplotou v autoklávu a radiolýzou, kdy vznikají – OH radikály a v reakci s HA dochází k její deformaci. Ozařováním HA v pevné fázi dochází ke snížení její molekulové hmotnosti při gama záření od 2 do 90 kGy. Řeháková et al. Uvádějí, že při ozáření hyaluronanu v prášku a v roztoku dávkou 6 kGy gama záření bylo možné pozorovat produkty s vysokou molekulovou hmotností, které vznikly rekombinací radikálů. Volné radikály totiž mohou zprostředkovat zvýšené zasíťování HA, a to v závislosti na dávce dehtu, z toho vyplývá, že ozařování může vést jak k degradaci, tak k zesíťování. Ozářením HA je pH vyšší než 5,0 a z toho vyplývá, že pokles viskozity je způsoben depolymerizací HA, nikoliv poklesem pH. V následující tabulce č. 4 jsou uvedeny změny pozorované po vystavení HA gama záření [78, 79].

Tabulka č. 4: Fyzikální změny kyseliny hyaluronové ozářené gama zářením. Převzato z: [79].

| IR dávka (kGy) | Molekulová hmotnost (kDa) | Viskozita (cP) | pH | Hodnoty barev | | |
|---------------------|---------------------------|----------------|-------|-------------------------------|------------------------|-------------------------|
| | | | | L* - hodnota (jasnější barva) | a- hodnota (zelenější) | b- hodnota (více žlutá) |
| 0 | 1110,14 | 499,25 | 6,09 | 97,71 | 0,008 | 0,053 |
| 1 | 154,97 | 18,00 | 5,49 | 99,83 | -0,027 | 0,048 |
| 3 | 67,81 | 13,00 | 5,44 | 99,84 | -0,045 | 0,093 |
| 5 | 33,72 | 10,50 | 5,43 | 99,85 | -0,077 | 0,171 |
| 10 | 26,77 | 11,00 | 5,37 | 99,82 | -0,104 | 0,279 |
| 50 | 6,52 | 11,00 | 5,01 | 99,49 | -0,437 | 1,136 |
| Směrodatná odchylka | 6,06 | 0,10 | 0,005 | 0,009 | 0,005 | 0,006 |

Výzkum patogeneze plicní fibrózy je zkoumán na potkanech, a to prostřednictvím ozáření dávkou 30 Gy IZ v oblasti hrudníku s následkem vzniku plicní fibrózy. Po usmrcení zvířat se prováděly analýzy po 2 týdnech a zjistilo se, že po 6 týdnech došlo k mastocytóze, která souvisí s masivním zvýšením HA [80]. Studie, která se zabývala poškozením střevního epitelu vlivem IZ potvrdila, že extracelulární HA, která se nachází ve střevě u myši v lamina propria, po ozáření celého těla dávkou 12 Gy došlo ke zvýšení množství HA v ECM obklopujícím střevní krypty a byla nalezena také v lamina propria v klcích. Zároveň došlo ke zvýšení všech HAS, hladiny HAS-1, HAS-2 a HAS-3 poté klesaly a dosáhly své základní úrovně po 72 hodinách od ozáření. Šest hodin po ozáření těla myši dávkou 12 Gy vedlo ke zvýšení plazmatické HA u myši na deseti násobek původního množství a na svou hladinu klesly po 72 hodinách. Po šesti hodinách po ozáření nebyl nalezen rozdíl v plazmatické HA u myši divokého typu a u myši, které mají defekty hematopoetického systému a defekty apoptózy a signalizace, což naznačuje, že indukce HA prostřednictvím záření není závislá na HA. Dále bylo studií potvrzeno, že exogenní HA zvyšuje přežití krypt a snižuje apoptózu, která je indukovaná zářením, tím je HA radioprotektivní ve střevech myši. HA se váže na CD44 a TLR4, myši byly ozářeny v přítomnosti a nepřítomnosti HA spolu s CD44 a TLR4. Bylo zjištěno zvýšené přežití střevních krypt myši s CD44, kterým byla podána HA, přežití krypt u myši s TLR4 bylo mírně zvýšeno a podání HA nemělo žádný vliv na přežití krypt myši s TLR4. Studií bylo prokázáno, že radioprotektivní účinek HA je zprostředkován cyklooxygenázou-2 [81].

1.10 Hyaluronansyntázy a ionizující záření

Z rodiny hyaluronansyntáz v reakci s IZ je významná konkrétně HAS2, jelikož inhibicí její indukce se zvyšuje radiosenzitivita (citlivost buněk) nádorových buněk, a to prostřednictvím poškození DNA. Ozáření spouští up-regulaci exprese HAS2 v buňkách rakoviny a to během 24 hodin, zatímco knockdown HAS2 zprostředkovává poškození DNA a zvyšuje apoptózu v buňkách. Ke sledování přežití buněk po radiaci indukované up-regulací HAS2 byla použita siRNA, která tuto up-regulaci blokovala. Dvě HAS2-siRNA byly aplikovány do buňky před ozářením. Po ozáření bylo zjištěno výrazný pokles míry přežitých buněk, např. z 53,2 % zbylo po ozáření 4,3 % přežitých buněk. Deplece HAS2 se podílí na poklesu přežití buněk po ozáření a radiací indukovaná up-regulace HAS2 napomáhá k radiorezistenci v rakovinných buňkách. HA chrání buňky mimo jiné i před poškozením DNA, proto byl proveden výzkum jaderných ložisek γ -H2AX, která značí poškození DNA. Pomocí fluorescenční mikroskopie bylo zjištěno, že počet γ -H2AX pozitivních buněk se zvýšil po šesti hodinách od ozáření, a to u kontrolních buněk, tak u buněk s nižším obsahem HAS2. Po 24 hodinách od ozáření došlo ke snížení

populace u kontrolních buněk, ale u buněk s deplecí HAS2 tento pokles nebyl tolik zřejmý, z toho vyplývá, že buňky ochuzené o HAS2 udržovaly v průběhu vyšší poškození DNA, které vyvolalo ozáření. Deplece HAS2 zvyšuje radiaci indukované poškození DNA v rakovinných buňkách, a to pravděpodobně snížením zotavení z poškození DNA. HAS2 se jeví jako slibný protinádorový cíl pro terapeutické záměry, a to díky radiosenzibilizaci rakovinných buněk [41]. Vyšší exprese HAS2 byla potvrzena v různých tkáních kolorektálního karcinomu (CRC). Ozářením buněčných linií kolorektálního karcinomu s nízkou produkcí HAS2 byla pozorována zvýšená apoptóza, z toho vyplývá, že hladina HAS2 souvisí s maligním fenotypem CRC. Knockdown HAS2 vede ke snížení růstové schopnosti a účinnosti tvorby maligních buněčných linií CRC. Úbytek HAS2 zvyšuje citlivost buněk kolorektálního karcinomu vůči proti rakovinové léčbě a také potlačuje metastatickou schopnost CRC prostřednictvím regulace epiteliálně-mezenchymálního přechodu. HAS2 podporuje malignitu CRC bez závislosti na secernovaných mechanizmech, které jsou spojeny s HA [82].

1.11 Glykoprotein CD44 a ionizující záření

Analýzou průtokovou cytometrií bylo potvrzeno, že u buněk, které mají na svém povrchu protein CD44, se po ozáření zvyšuje exprese tohoto proteinu, a to v závislosti na dávce záření, významně se zvýší při ozáření 8 Gy. CD44 je upregulován již 24 hodin po ozáření neboli se zvýšila jeho odpověď na ozáření. K jeho upregulaci může docházet při reakci na poškození DNA, které je způsobeno rentgenovým zářením, a tak může hrát roli při zisku radiorezistence buněk rakoviny pankreatu. Po ozáření je CD44 schopný udržet buňky při životě, a to díky udržování fosforylace extracelulární signálem regulovanou kinázou a také díky radiaci indukovaných změn v expresi proteinů epiteliálně-mezenchymálního přechodu [83]. Pomocí Western blot analýzy nebyl po 24 hodinách prokázán účinek ani změny po normoxickém a hypoxickém ozáření, ale po 48 hodinách bylo prokázáno odlišné chování hyaluronového receptoru, a to zvýšení jeho hladiny po hypoxii. Při normoxickém ozáření nebyla zjištěna žádná změna, zatímco hypoxické ozáření způsobilo také zvýšení tohoto receptoru. Při ionizujícím záření se zvyšuje exprese CD44 ve sféroidech MG-63. Prokázáno bylo také to, že modifikací exprese CD44 vede k odlišnému rozpoznání ligandu, které poté ovlivňuje vlastnost invaze a potenciál metastáz experimentálních nádorů [84]. U rakoviny močového měchýře byla pozorována exprese CD44 jako odpověď na radiaci, bylo prokázáno, že je rezistentní vůči léčbě rakoviny a napomáhá k růstu nádorů různých typů rakoviny. CD44 je důležité pro předpověď chování a odpovědi na ozáření nádorové buňky močového měchýře. U modelu nádoru netypické lokalizace nádoru u myši MB49 bylo potvrzeno, že nádor, který exprimuje CD44, je

vlivem ozáření více rezistentní vůči radiaci v důsledku menšího zpoždění růstu nádoru [85]. Studií bylo dokázáno, že ozářením lidských koronárních endoteliálních buněk vede ke zvýšení exprese CD44 a adheze monocytů k endoteliím. Tato zvýšená exprese CD44 po radiaci napomáhá leukocytům a makrofágům k vyšší přilnavosti [86]. Po ozařování plic myši byl pozorován malé oblasti fibrózy 4 týdny po ozáření dávkou 20 Gy, v rozmezí 1 – 120 dní po ozáření myši dávkou 20 Gy došlo k 4x nahromadění CD44 pozitivních buněk v plicích v porovnání myši ozářených dávkou 10 Gy [87]. Některé tkáně, do kterých lze zahrnout epitelové buňky obsahují CD44v s vyšší molekulovou hmotností, které vznikají alternativním způsobem. Ve studii distribuce CD44 ve zdravé a poraněné plicní tkáni u potkanů a malých prasat byla sledována důležitost CD44 v procesu fibrogenese. K dispozici pro sledování bylo 9 potkanů z modelu indukovaného zářením a 9 mini prasat s fibrózou indukovanou zářením. Ozářením indukovaných poraněných plicí mini prasat bylo pozorováno suprabazální CD44v9. U potkanů s fibrózou indukovanou zářením došlo 3 – 6 měsíců po ozáření k neobvykle zvýšené imunoreaktivitě pro CD44 a CD44v6 v průduškovém epitelu a v alveolárních epitelových buňkách typu I, také došlo ke zvýšené expresi CD44v9 v alveolárním epitelu. Zářením indukovanou fibrózou u mini prasat byla pozorována pozitivní reakce s CD44 v bazálních a suprabazálních bronchiálních buňkách a alveolární epitel vykazoval narušenou imunoreaktivitu CD44v9. V některých oblastech byly pozorovány hypertrofické pneumocyty II. typu, které vykazovaly polární profil exprese CD44v9. Ve velkých krevních cévách a intersticiu plic mini prasat s fibrózou byla pozorována up-regulace CD44. U potkanů a mini prasat bylo pozorováno manifestní stádium fibrózy, dřívější studie pozorovali fibrózu při pitvě pacientů, kdy byla fibróza v terminálním stádiu, a tak byla zjištěna snížená exprese CD44v6 a CD44v9 epitopů alveolárními epitelovými buňkami [88].

1.12 Receptor pro motilitu zprostředkovanou hyaluronanem a ionizující záření

RHAMM hraje roli v progresi nádoru rakoviny prsu, nádorové buňky MCF-7 obsahují velké množství RHAMM a mohly by v budoucnu předpovědět chování buněk rakoviny prsu k radioterapii. Ionizující záření vede k buněčné smrti v nádorových buňkách MCF-7 [89]. V mutovaných buňkách jaderného fosfoproteinu (p53), které jsou označovány jako MDA-MB-231 byl RHAMM exprimován řídce, a tak bylo dosaženo radioresistance vůči apoptóze indukované zářením a buňky MDA-MB-231 zůstaly po ozáření nedotčené. Buňky MDA-MB-231 nejsou citlivé na IZ při dávce 2 Gy, kdežto buňky MCF-7 jsou citlivé na záření prostřednictvím aktivace p53 a p38. Alternativní sestřihy RHAMM v1/v2 mají podíl na podpoře

tvorby metastáz u rakoviny jater. Dle studie lze tvrdit, že RHAMM má podíl u pacientů s rakovinou prsu na přežití buněk a mění fenotyp buněk. Dále bylo potvrzeno, že po ozáření dávkou 2 Gy byla hladina RHAMM v buňkách výrazně snížena, zatímco v buňkách MDA-MB-231 nedošlo k žádné změně hladiny RHAMM a nevykazovaly známky apoptózy. Sestřihové varianty RHAMM v1/v2 byly po ozáření sníženy v buňkách MCF-7. Buňky MDA-MB-231 měly výrazně nižší expresi všech izoform a nedošlo ke snížení po záření. Korelace záření s p53 reguluje RHAMM, jelikož byla potvrzena endogenně zvýšená hladina p53 v buňkách MDA-MB-231 a to může vypovídat o sníženém výskytu RHAMM v buněčné linii, zatímco knock-downem p53 a následnou up-regulací RHAMM v1/v2 došlo ke zrychlení apoptózy v buňkách MDA-MB-231, apoptotický účinek byl ještě zesílen ionizujícím zářením. Lze tvrdit, že farmakologická inhibice HA prostřednictvím 4-methylumbeliferonu v buňkách MCF-7 a MDA-MB-231 vede ke zvýšené radiosenzitivitě [89]. Radiosenzitivita buněčné linie adenokarcinomu nemalobuněčného karcinomu plic negativně koreluje s expresí genu RHAMM, inhibicí exprese RHAMM došlo ke zvýšení radiosenzitivity u epiteliálních buněk karcinomu plic, které tvoří buněčnou linii, také nazývány jako A549. Lze tvrdit, že RHAMM hraje roli jako potenciální cíl radiosenzibilizace plicního adenokarcinomu [90]. V CD34+ buňkách zdravých dárců byl RHAMM významně regulován při expanzi *in vitro* a během hojení při *in vivo*. Při studiu akutní myeloidní leukémie v souvislosti s RHAMM bylo zjištěno, že receptor pro motilitu zprostředkovanou kyselinou hyaluronovou není dobrým cílovým antigenem pro imunoterapii akutní myeloidní leukémie, jelikož rozdíl exprese tohoto receptoru v leukemických kmenových buňkách a exprese v hematopoetických kmenových buňkách zdravých dárců není tak výrazný [91].

1.13 Další hyaladheriny a ionizující záření

TSG6 hraje roli při zmírnění radiačně indukované kolorektální fibrózy tlustého střeva. Při studii úlohy TSG6 při potlačování fibrózy tlustého střeva byl utlumen TSG6 v mezenchymálních kmenových buňkách, tím bylo zjištěno, že TSG6 může inhibovat fibrózu prostřednictvím degranulace polarizace makrofágů [92]. Při patogenezi střevního zánětu vyvolaného ozářením břicha myši se sledovala role ICAM-1, exprese byla stanovena pomocí protilátek značených radioaktivním prvkem u myši po ozáření dávkou 10 Gy nebo při simulované radiaci. Po 24 hodinách až 14 dnech po ozáření došlo k výraznému zvýšení adherentních leukocytů, zatímco léčbou protilátkami anti-ICAM-1 a genetickým deficitem ICAM-1 došlo ke snížení adheze leukocytů po 24 hodinách po ozáření. Po ozáření břicha má ICAM-1 významnou roli při náboru leukocytů v časných bodech zánětu střev [93]. Lokálním ozáření spolu s ligandy TLR 7/8 u

kolorektálního karcinomu a karcinomu pankreatu u myši bylo zjištěno, že tato aktivace TLR 7/8 antagonistů má významný účinek pro léčbu kolorektálního karcinomu a karcinomu pankreatu, tato kombinace navíc inhibuje lokální růst nádoru, šíření metastáz a je účinná proti rozsáhlému spektru nádorů [94]. LYVE-1 byl použit k barvení lymfatických cév u sekundárního lymfoedému, po ozáření došlo ke zvětšení lymfedému a snížení počtu lymfatických cév obarvených prostřednictvím LYVE-1 [95]. Ostatní hyaladheriny zatím hledají svou souvislost s IZ, která by mohla přispět k novému výzkumu.

5. DISKUSE A ZÁVĚR

Kyselina hyaluronová patří mezi nevětvené lineární polysacharidy, které nesou název glykosaminoglykany. Má vysokou molekulovou hmotnost a skládá se z opakujících se sacharidů N-acetylglykosaminu a kyseliny D-glukuronové. Byla objevena ve sklivci skotu v roce 1934 Karlem Mayerem a Johnem Palmerem, vyskytuje se ve všech živých organismech, primárně v extracelulární matrix, v téměř všech tělních tekutinách a tkáních. Jedná se o významnou molekulu v řadě biologických funkcích, a to díky vlastnostem, které zahrnuje biokompabilita, biodegradabilita, mukoadhezivita, viskoelasticita a také její hygroskopická vlastnost. V procesu hojení ran a obnovy tkání plní významnou funkci v metabolismu šráry díky své schopnosti zadržovat vodu. Při syntéze kyseliny hyaluronové hrají roli hyaluronansyntázy, naopak při odbourávání plní svojí funkci hyaluronidázy. Její účinek spočívá ve vazbě na proteiny a receptory, které váží hylarunonan k sobě, tyto proteoglykany vázající hyaluronan a HA buněčné povrchové receptory patří do hyaladherinů. Může se vázat na stejné buňce se svými receptory, nebo má schopnost se vázat na své receptory okolních buněk a tím aktivuje intracelulární signální kaskády.

Ionizující záření je děj, při kterém proudí hmotné částice, či fotony elektromagnetického záření, které mají schopnost ionizovat atomy prostředí, ve kterém se nacházejí. Existují dva typy, a to nepřímo ionizující záření neboli fotonové, které nenesou elektrický náboj a předává tak svoji energii sekundárním přímo ionizujícím částicím. Druhým typem je přímo ionizující záření neboli částicové, kdy částice nesou elektrický náboj a po reakci s elektrony atomových obalů způsobují excitaci a ionizaci atomů.

Dle získaných informací, lze tvrdit, že působením ionizujícího záření na kyselinu hyaluronovou dochází k ionizaci atomů HA, a to vede k fyzikálním a chemickým změnám, mezi které patří zasíťování, které vede ke zvýšení molekulové hmotnosti HA, poškození vazby, nebo štěpení jednotlivých řetězců, které vede ke snížení její molekulové hmotnosti a viskozity. Dále lze tvrdit, že HA má radioprotektivní účinky ve střevech myši vlivem cyklooxygenázy-2. Při ozáření hyaluronansyntáz IZ dochází zejména u HAS2 ke zvýšení exprese v buňkách rakoviny a tím se zvyšuje přežití nádorových buněk, zatímco knockdown HAS2 způsobuje poškození DNA a zvyšuje apoptózu v buňkách. U ozáření proteinu s diferencí CD44 bylo potvrzeno, že u buněk, které mají na svém povrchu tento protein, se zvyšuje jeho exprese, ke které může dojít při reakci na poškození DNA a může tak hrát roli v přežití nádorových buněk, po ozáření má schopnost udržet buňky při životě. Po ozáření bylo potvrzeno zvýšení hladiny CD44 při hypoxii, je rezistentní vůči léčbě rakoviny a napomáhá k růstu nádorům různého druhu,

v koronárních endoteliálních buňkách je po ozáření zvýšená exprese CD44, a to napomáhá leukocytům a makrofágům k lepší přilnavosti. Ionizující záření má účinek na receptor pro motilitu zprostředkovanou hyaluronanem (RHAMM), jelikož tento receptor je obsažen v nádorových buňkách MCF-7 a ozáření vede k jejich buněčné smrti. Naopak u buněk MDA-MB-231 byla potvrzena radiorezistence vůči apoptóze, která byla indukována zářením. TSG6 hraje důležitou roli při inhibici kolorektální fibrózy tlustého střeva, která byla indukována radiací, prostřednictvím degranulace polarizace makrofágů. ICAM-1 je důležitý při ozáření břicha u zánětu střev, kdy hraje roli při náboru leukocytů v časných bodech zánětu. Aktivované TLR ligandy spolu s zářením se podílí na léčbě kolorektálního karcinomu, karcinomu pankreatu a na inhibici šíření metastáz a lokálnímu růstu nádorů. LYVE-1 je využíván k barvení lymfatických cév u lymfedému, kdy po ozáření dochází ke zvětšení lymfedému a snížení počtu lymfatických cév obarvených prostřednictvím LYVE-1. U dalších hyaladherinů jako je GHAP, HARE a CEMIP se stále hledá jejich souvislost s ionizujícím zářením, což otevírá nové možnosti dalších výzkumů.

Úloha kyseliny hyaluronové a jejích vazebných proteinů v živých organismech by mohla pomoci v řešení léčby u nádorových a dalších onemocnění, nicméně se stále provádějí další a nové studie hyaluronanu, jeho funkcí, vlastností a nových poznatků. V této práci jsou shrnuty její vlastnosti, metabolismus a vlastnosti vazebných proteinů hyaluronanu. Cílem bylo objasnit a zhodnotit účinky záření právě těchto vazebných proteinů kyseliny hyaluronové a tyto cíle byly úspěšně splněny.

6. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] KLOUDA P., 2013. *Základy biochemie*. 3. vyd. 35-36. Ostrava: Pavko, ISBN 978-80-86369-16-7.
- [2] ODSTRČIL J., 1995. *Biochemie*. 72, Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. ISBN 80-7013-190-x.
- [3] LEE D.H., OH J.H., CHUNG J.H. Glycosaminoglycan and proteoglycan in skin aging. *Journal of Dermatological Science*. 2016 Sep, 83(3), 174-81. ISSN 09231811. doi: 10.1016/j.jdermsci.2016.05.016. Epub 2016 May 27. PMID: 27378089.
- [4] CASALE J., CRANE J.S. Biochemistry, Glycosaminoglycans. 2021 May 9. In: StatPearls [internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan—. PMID: 31335015.
- [5] SONG Y., ZHANG F., LINHARDT R.J. Glycosaminoglycans. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2021;1325, 103-116. ISBN 978-3-030-70114-7. doi: 10.1007/978-3-030-70115-4_4. PMID: 34495531.
- [6] MURRAY R.K., 2002. *Harperova Biochemie*. 23. vyd., (4. české vyd.),144, 674-678, Jinončany: H & H, 2002. Lange medical book. ISBN 80-7319-013-3.
- [7] OLIVEIRA G. B. D., VALE A. M. D., SANTOS A. C. D., MOURA C. E. B. D., ROCHA H. A. D. O., OLIVIEIRA M. F. D. Composition and significance of glycosaminoglycans in the uterus and placenta of mammals. *Brazilian archives of biology and technology*. 2015, 58(4), 512-20. ISSN 1678-4324. DOI: 10.1590/s1516-8913201500281.
- [8] TIWARI S., BAHADUR P. Modified hyaluronic acid based materials for biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019, 121, 556-571. ISSN 01418130. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.049. PMID: 30321638.
- [9] NEUMAN M. G., NANAU R. M., ORUÑA-SANCHEZ L., COTO G. Hyaluronic acid and wound healing. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2015, 18(1), 53-60. ISSN 1482-1826. doi: 10.18433/j3k89d. PMID: 25877441.

- [10] NECAS J., BARTOSIKOVA L., BRAUNER P., KOLÁŘ J. Hyaluronic acid (Hyaluronan): A review. *Veterinarni Medicina*. 2008, 53(8), 397-411. ISSN 03758427. doi:10.17221/1930-VETMED.
- [11] YANG L., ZHANG J., WANG G. The effect of sodium hyaluronate treating knee osteoarthritis on synovial fluid interleukin -1 β and clinical treatment mechanism. *Pak J Pharm Sci*. 2015 Jan, 28(1 Suppl), 407-10. PMID: 25631505.
- [12] VOINCHET V., VASSEUR P., KERN J. Efficacy and safety of hyaluronic acid in the management of acute wounds. *Am J Clin Dermatol*. 2006, 7(6), 353-7. doi: 10.2165/00128071-200607060-00003. PMID: 17173469.
- [13] CHAIDAROON W., SATAYAWUT N., TANANUVAT N. Effect of 2% Hyaluronic Acid on the Rate of Healing of Corneal Epithelial Defect After Pterygium Surgery: A Randomized Controlled Trial. *Drug Des Devel Ther*. 2021 Oct 27, 15, 4435-4443. doi: 10.2147/DDDT.S336372. PMID: 34737549; PMCID: PMC8559235.
- [14] VÉGH V., 2014. N-acetylglukosamin. Praha: Edukafarm, dostupné z: http://www.edukafarm.cz/data/soubory/farminews-2014/FarmiNews%202014-2/14%20Vegh_N-acetylglukosamin_2014.pdf
- [15] CAMMACK R., ATWOOD T., CAMPBELL P., PARISH H., SMITH A., VELLA F., STIRLING J., 2011. *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology*. Rev. ed. New York: Oxford University Press. ISBN 978-0-19-852917-0.
- [16] DAINTITH J., 2008. *A Dictionary of Chemistry*. B.m.: OUP Oxford. ISBN 978-0-19-104492-2.
- [17] VĪNA I., SEMJONOV S., LINDE R., PATETKO A. Glucuronic acid containing fermented functional beverages produced by natural yeasts and bacteria associations. *Kombucha Research Studies | Kombucha Studies – Reviewed by Kombucha Brewers International*. 2013, 14(1). Dostupné z: <https://research.kombuchabrewers.org/wp-content/uploads/kk-research-files/glucuronic-acid-containing-fermented-functional-beverages-produced-by-natural-yeasts-and-bacteria-as.pdf>.
- [18] FALLACARA A., BALDINI E., MANFREDINI S., VERTUANI S. Hyaluronic Acid in the Third Millennium. *Polymers (Basel)*. 2018 Jun 25, 10(7), 701. doi: 10.3390/polym10070701. PMID: 30960626; PMCID: PMC6403654.

- [19] PAPA KONSTANTINO U E., ROTH M., KARAKIULAKIS G. Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. *Dermatoendocrinol.* 2012 Jul 1, 4(3), 253-8. doi: 10.4161/derm.21923. PMID: 23467280; PMCID: PMC3583886.
- [20] KOGAN G., SOLTÉS L., STERN R., GEMEINER P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol Lett.* 2007 Jan, 29(1), 17-25. doi: 10.1007/s10529-006-9219-z. Epub 2006 Nov 8. PMID: 17091377.
- [21] BOLLYKY P. L., EVANKO S. P., WU R. P., POTTER-PERIGO S., LONG S. A., KINSELLA B., REIJONEM H., GUEBTNER K., TENG B., CHAN C. K., BRAUN K. R., GEBE J. A., NEPOM G. T., WIGHT T. N. Th1 cytokines promote T-cell binding to antigen-presenting cells via enhanced hyaluronan production and accumulation at the immune synapse. *Cell Mol Immunol.* 2010 May, 7(3), 211-20. doi: 10.1038/cmi.2010.9. Epub 2010 Mar 15. PMID: 20228832; PMCID: PMC3027489.
- [22] GEORGE J., STERN R. Serum hyaluronan and hyaluronidase: very early markers of toxic liver injury. *Clin Chim Acta.* 2004 Oct, 348(1-2), 189-97. doi: 10.1016/j.cccn.2004.05.018. PMID: 15369754.
- [23] HYALURONIC ACID: Overview, Uses, Side Effects, Precautions, Interactions, Dosing and Reviews. WebMD – Better information. Better health. Therapeutic Research Faculty 2018. Dostupné z: <https://www.webmd.com/vitamins/ai/ingredientmono-1062/hyaluronic-acid>.
- [24] LAPČÍK L. Jr., LAPČÍK L., De Smedt S, Demeester J, Chabreck P. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications. *Chem Rev.* 1998 Dec 17, 98(8), 2663-2684. doi: 10.1021/cr941199z. PMID: 11848975.
- [25] FRASE J. R. E., LAURENT T. C., LAURENT U. B. G., 1997. Hyaluronan: its nature, distribution, function and turnover. 242, 27-33. PMID: 11848975.
- [26] LOKESHWAR V. B., MIRZA S., JORDAN A. Targeting hyaluronic acid family for cancer chemoprevention and therapy. *Adv Cancer Res.* 2014;123:35-65. doi: 10.1016/B978-0-12-800092-2.00002-2. PMID: 25081525; PMCID: PMC4791948.
- [27] PRESTWICH G. D. Hyaluronic acid-based clinical biomaterials derived for cell and molecule delivery in regenerative medicine. *J Control Release.* 2011 Oct 30;155(2):193-

9. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.04.007. Epub 2011 Apr 14. PMID: 21513749; PMCID: PMC3716467.
- [28] ABATANGELO G., VINDIGNI V., AVRUSCIO G., PANDIS L., BRUN P. Hyaluronic Acid: Redefining Its Role. *Cells*. 2020 Jul 21, 9(7), 1743. ISSN 2073-4409. doi: 10.3390/cells9071743. PMID: 32708202.
- [29] HUERTA Á. G., NEŠPOROVÁ K. Hyaluronan and its derivatives for ophthalmology: Recent advances and future perspectives. *Carbohydr Polym*. 2021 May 1, 259, 117697. doi: 10.1016/j.carbpol.2021.117697. Epub 2021 Jan 26. PMID: 33673986.
- [30] CASALE M., MOFFA A., VELLA P., SABATINO L., CAPUANO F., SALVINELLI B., LOPEZ M. A., CARINCI F., SALVINELLI F. Hyaluronic acid: Perspectives in dentistry. A systematic review. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2016 Dec, 29(4), 572-582. doi: 10.1177/0394632016652906. Epub 2016 Jun 8. PMID: 27280412; PMCID: PMC5806851.
- [31] MORDIN M., PARRISH W., MASAQUEL C., BISSON B., COPLEY-MERRIMAN C. Intra-articular Hyaluronic Acid for Osteoarthritis of the Knee in the United States: A Systematic Review of Economic Evaluations. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord*. 2021 Nov 19, 14, 11795441211047284. doi: 10.1177/11795441211047284. PMID: 34840501; PMCID: PMC8619730.
- [32] KING I. C., SOROOSHIAN P. Hyaluronan in skin wound healing: therapeutic applications. *J Wound Care*. 2020 Dec 2, 29(12), 782-787. doi: 10.12968/jowc.2020.29.12.782. PMID: 33320743.
- [33] ABATANGELO G., VINDIGNI V., AVRUSCIO G., PANDIS L., BRUN P. Hyaluronic Acid: Redefining Its Role. *Cells*. 2020 Jul 21, 9(7), 1743. doi: 10.3390/cells9071743. PMID: 32708202; PMCID: PMC7409253.
- [34] MÁIZ CARRO L., MARTINÉZ-GARCÍA M. A. Use of Hyaluronic Acid (HA) in Chronic Airway Diseases. *Cells*. 2020 Sep 29, 9(10), 2210. doi: 10.3390/cells9102210. PMID: 33003557; PMCID: PMC7601363.
- [35] BUKHARI S. N. A., ROSWANDIN. L., WAGAS M., HABIB H., HUSSAIN F., KHAN S., SOHAIL M., RAMLI N. A., THU H. E., HUSSIAN Z. Hyaluronic acid, a promising skin rejuvenating biomedicine: A review of recent updates and pre-clinical and clinical

- investigations on cosmetic and nutricosmetic effects. *Int J Biol Macromol.* 2018 Dec, 120(Pt B), 1682-1695. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.188. Epub 2018 Oct 1. PMID: 30287361.
- [36] KEEN M. A. Hyaluronic Acid in Dermatology. *Skinmed.* 2017 Dec 1, 15(6), 441-448. PMID: 29282181.
- [37] KOBAYASHI T., CHANMEE T., ITANO N. Hyaluronan: Metabolism and Function. *Biomolecules.* 2020 Nov 7, 10(11), 1525. doi: 10.3390/biom10111525. PMID: 33171800; PMCID: PMC7695009.
- [38] CAON I., PARNIGONI A., VIOLA M., KAROUSOU E., PASSI A., VIGETTI D. Cell Energy Metabolism and Hyaluronan Synthesis. *J Histochem Cytochem.* 2021 Jan, 69(1), 35-47. doi: 10.1369/0022155420929772. Epub 2020 Jul 6. PMID: 32623953; PMCID: PMC7780193.
- [39] VOLPI N., SCHILLER J., STERN R., SOLTES L. Role, Metabolism, Chemical Modifications and Applications of Hyaluronan. 16. *Current Medicinal Chemistry.* 2009, 1718-1745. ISSN 09298673. Dostupné z: doi:10.2174/092986709788186138.
- [40] WEIGEL P. H., HASCALL V. C., TAMMI M. 1997 May 30. Hyaluronan synthases. *J Biol Chem,* 272(22), 13997-4000. doi: 10.1074/jbc.272.22.13997. PMID: 9206724.
- [41] SHEN Y. N., SHIN H. - J., JOO H. - Y., PARK F. - R., KIM S. - H., HWANG S. - H., PARK S. J., KIM CH. - H., LEE K. - H. Inhibition of HAS2 induction enhances the radiosensitivity of cancer cells via persistent DNA damage, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 443, Issue 3, 2014, 796-801, ISSN 0006-291X, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.12.026>.
- [42] STRIDH S., PALM F., HANSELL P. Renal interstitial hyaluronan: functional aspects during normal and pathological conditions. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2012302, 11, R1235-R1249.
- [43] SOLTÉS L., MENDICHI R., KOGAN G., SCHILLER J., STANKOVSKA M., ARNHOLD J. Degradative action of reactive oxygen species on hyaluronan. *Biomacromolecules.* 2006 Mar;7(3), 659-68. doi: 10.1021/bm050867v. PMID: 16529395.

- [44] CLIFFORD J., WHATCOTT Clifford J. Whatcott, Haiyong Han, Richard G. Posner, Galen Hostetter, Daniel D. Von Hoff; Targeting the Tumor Microenvironment in Cancer: Why Hyaluronidase Deserves a Second Look. *Cancer Discov* 1 September 2011, 1 (4), 291–296. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-11-0136>
- [45] KLOCKER J., SABITZER H., RAUNIK W., WIESER S., SCHUMMER J. Hyaluronidase as additive to induction chemotherapy in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Lett.* 1998 Sep 11, 131(1), 113-5. doi: 10.1016/s0304-3835(98)00207-9. PMID: 9839626.
- [46] MURRAY G., CONVERY C., WALKER L., DAVIES E. Guideline for the Safe Use of Hyaluronidase in Aesthetic Medicine, Including Modified High-dose Protocol. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2021 Aug, 14(8), E69-E75. Epub 2021 Aug 1. PMID: 34840662; PMCID: PMC8570661.
- [47] CAVALLINI M., GAZZOLA R., METALLA M., VAIENTI L. The role of hyaluronidase in the treatment of complications from hyaluronic acid dermal fillers. *Aesthet Surg J.* 2013 Nov 1, 33(8), 1167-74. doi: 10.1177/1090820X13511970. Epub 2013 Nov 6. PMID: 24197934.
- [48] STERN R. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet?, *Glycobiology*, Volume 13, Issue 12, December 2003, 105R-115R, <https://doi.org/10.1093/glycob/cwg112>.
- [49] KNUDSON C. B., KNUDSON W. Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis, and disease. *FASEB J.* 1993 Oct, 7(13), 1233-41. PMID: 7691670.
- [50] BIGNAMI A., HOSLEY M., DAHL D. Hyaluronic acid and hyaluronic acid-binding proteins in brain extracellular matrix. *Anat Embryol* 188, 419–433 (1993). doi: 10.1007/BF00190136.
- [51] CHEN C., ZHAO S., KARNAD A., FREEMAN J. W. The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. *J Hematol Oncol.* 2018 May 10, 11(1), 64. doi: 10.1186/s13045-018-0605-5. PMID: 29747682; PMCID: PMC5946470.
- [52] SENBANJO L, CHELLAIAH M. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells, *Frontiers*, 07 March 2017, <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00018>.

- [53] IDRIS H. T., NAISMITH J. H. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech.* 2000 Aug 1, 50(3), 184-95. doi: 10.1002/1097-0029(20000801)50:3<184::AID-JEMT2>3.0.CO;2-H. PMID: 10891884.
- [54] ANTHONY J. DAY, CAROLINE M. MILNER, TSG-6: A multifunctional protein with anti-inflammatory and tissue-protective properties, *Matrix Biology*, 78–79, 2019, 60-83, ISSN 0945-053X.
- [55] BLUNDELL CH., SEYFRIED N. a J. DAY A. Structural and Functional Diversity of Hyaluronan-Binding Proteins. *Chemistry and Biology of Hyaluronan*. Elsevier, 2004, 189-204 ISBN 9780080443829. doi:10.1016/B978-008044382-9/50039-X.
- [56] LEE T. H., KLAMPFER L., SHOWS T. B., VILCEK J. Transcriptional regulation of TSG6, a tumor necrosis factor – and interleukin-1-inducible primary response gene coding for a secreted hyaluronan-binding protein. *J Biol Chem.* 1993 Mar 25, 268(9), 6154-60. PMID: 8454591.
- [57] EVANKO S. P., TAMMI M. I., TAMMI R. H., WIGHT T. N. Hyaluronan-dependent pericellular matrix. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007 Nov 10, 59(13), 1351-65. doi: 10.1016/j.addr.2007.08.008. Epub 2007 Aug 14. PMID: 17804111; PMCID: PMC2174428.
- [58] PERIDES G., ASHER R. A., LARK M. W., LANE W. S., SOBINSON R. A., BIGNAMI A. Glial hyaluronate-binding protein: a product of metalloproteinase digestion of versican? *Biochem J.* 1995 Dec 1, 312 (Pt 2)(Pt 2), 377-84. doi: 10.1042/bj3120377. PMID: 8526845; PMCID: PMC1136273.
- [59] BIGNAMI A., ADELMAN L. S., PERIDES G., DAHL D. Glial Hyaluronate-Binding Protein in Polar Spongioblastoma, *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, Volume 48, Issue 2, March 1989, 187–196, doi: 10.1097/00005072-198903000-00006.
- [60] PERIDES G., BIVIANO F., BIGNAMI A. Interaction of a brain extracellular matrix protein with hyaluronic acid, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, Volume 1075, Issue 3, 1991, 248-258, ISSN 0304-4165.

- [61] JACKSON D. G. Hyaluronan in the lymphatics: The key role of the hyaluronan receptor LYVE-1 in leucocyte trafficking. *Matrix Biol.* 2019 May, 78-79, 219-235. doi: 10.1016/j.matbio.2018.02.001. Epub 2018 Feb 6. PMID: 29425695.
- [62] SHIGEISHI H., HIGASHIKAWA K., TAKECHI M. Role of receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM) in human head and neck cancers. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2014 Oct, 140(10), 1629-40. doi: 10.1007/s00432-014-1653-z. Epub 2014 Mar 28. PMID: 24676428.
- [63] JIANG D., LIANG J., W. NOBLE P. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiological Reviews.* 2011, 91(1), 221–264. ISSN 1522- 1210.
- [64] LIU Y., YIN H., ZHAO M. *et al.* TLR2 and TLR4 in Autoimmune Diseases: a Comprehensive Review. *Clinic Rev Allerg Immunol* **47**, 136–147 (2014). <https://doi.org/10.1007/s12016-013-8402-y>
- [65] BUI T. M., WIESOLEK H. L., SUMAGIN R. ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. *J Leukoc Biol.* 2020 Sep, 108(3), 787-799. doi: 10.1002/JLB.2MR0220-549R. Epub 2020 Mar 17. PMID: 32182390; PMCID: PMC7977775.
- [66] OERTLI V., BECK-SHIMMER B., FAN X. WÜTRICH R. P. Mechanisms of hyaluronan-induced up-regulation of ICAM-1 and VCAM-1 expression by murine kidney tubular epithelial cells: hyaluronan triggers cell adhesion molecule expression through a mechanism involving activation of nuclear factor-kappa B and activating protein-1. *J Immunol.* 1998 Oct 1, 161(7), 3431-7. PMID: 9759861.
- [67] CHEN Y., ZHOU H., JIANG W. J., WANG J. F., TIAN Y., JIANG Y., XIA B. R. The role of CEMIP in tumors: An update based on cellular and molecular insights. *Biomed Pharmacother.* 2022 Feb, 146, 112504. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112504. Epub 2021 Dec 15. PMID: 34922110.
- [68] LIU J., YAN W., HAN P., TIAN D. The emerging role of KIAA1199 in cancer development and therapy. *Biomed Pharmacother.* 2021 Jun, 138, 111507. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111507. Epub 2021 Mar 24. PMID: 33773462.
- [69] YOSHIDA H., NAGAOKA A., KUSAKA-KIKUSHIMA A., TOBIISHI M., KAWABATA K., 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 Apr 2, 110(14), 5612-7. doi: 10.1073/pnas.1215432110. Epub 2013 Mar 18. PMID: 23509262; PMCID: PMC3619336.
- [70] HAVRÁNKOVÁ R. Biological effects of ionizing radiation. *Cas Lek Cesk*. 2020 Winter, 159(7-8), 258-260. English. PMID: 33445930.
- [71] ALBI E., CATALDI S., LAZZARINI A., CODINI M., BECCARI T., AMBESI-IMPIOMBATO F. S., CURCIO F. Radiation and Thyroid Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017 Apr 26, 18(5), 911. doi: 10.3390/ijms18050911. PMID: 28445397; PMCID: PMC5454824.
- [72] MYSLIVEČEK M. *Nukleární medicína. 1. díl*. Olomouc: Univerzita Palackého, 2007. Skripta. ISBN 978-80-244-1723-3.
- [73] NAKASHIMA J., DUONG H. Radiation Physics. 2021 May 8. In: StatPearls [internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. PMID: 32119402.
- [74] World Health Organization. Ionizing radiation, health effects and protective measures. In: 26. 4. 2016. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ionizing-radiation-health-effects-and-protective-measures>.
- [75] FRANE N., BITTERMAN A. Radiation Safety and Protection. 2021 May 29. In: StatPearls [internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan. PMID: 32491431.
- [76] DAAR E. S. (2010). *Effect of ionizing radiation on hyaluronan and fibrous pericardium* (Order No. 27557930). Available from ProQuest One Academic. (2285151344). Retrieved from <https://www.proquest.com/dissertations-theses/effect-ionizing-radiation-on-hyaluronan-fibrous/docview/2285151344/se-2?accountid=17239>.
- [77] FAIZAL M. Effect of x-radiation on hyaluronic acid. *JOURNAL of NUCLEAR and Related TECHNOLOGIES*, volume 14, Number 2, 18-32. December 2017. <https://jnrtmns.net/index.php/jnrt/article/view/11>.
- [78] AHMAD, AINEE, KABIR, HUR, AYOB, MUHAMMAD, ROSLI, NUR RATASHA, MOHAMED, FAIZAL, RADIMAN, SHAHIDAN, ABDUL RAHMAN, IRMAN. Effect of gamma irradiation on hyaluronic acid and dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)

- interaction, 2014. *AIP Conference Proceedings* 1614, 69-73 (2014), <https://doi.org/10.1063/1.4895173>.
- [79] KIM J. K., SRINIVASAN P., KIM J. H., CHOI J., PARK H. J., BYUN M. W., LEE J. W. Structural and antioxidant properties of gamma irradiated hyaluronic acid, *Food Chemistry*, Volume 109, Issue 4, 2008, 763-770, ISSN 0308-8146, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.038>.
- [80] NILSSON K., HENRIKSSON R., HELLSTRÖM S., TENGBLAD A., BJERMER L. K. (1990) Hyaluronan Reflects the Pre-fibrotic Inflammation in Irradiated Rat Lung: Concomitant Analysis of Parenchymal Tissues and Bronchoalveolar Lavage, *International Journal of Radiation Biology*, 58:3, 519-530, DOI: [10.1080/09553009014551861](https://doi.org/10.1080/09553009014551861).
- [81] RIEHL T. E., FOSTER L., STENSON W. F. Hyaluronic acid is radioprotective in the intestine through a TLR4 and COX-2-mediated mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012, 302(3), G309-G316. doi:10.1152/ajpgi.00248.2011.
- [82] KIM Y. H., LEE S. B., SHIM S., et al. Hyaluronic acid synthase 2 promotes malignant phenotypes of colorectal cancer cells through transforming growth factor beta signaling. *Cancer Sci*. 2019, 110(7), 2226-2236. doi:10.1111/cas.14070.
- [83] HASSN MESRATI M., SYAFRUDDIN S. E., MOHTAR M. A., SYAHIR A. CD44: A Multifunctional Mediator of Cancer Progression. *Biomolecules*. 2021 Dec 9, 11(12), 1850. doi: 10.3390/biom11121850. PMID: 34944493; PMCID: PMC8699317.
- [84] INDOVINA P., FERRANTE A., RAINALDI G., SANTINI M. T. Hypoxia and ionizing radiation: changes in adhesive properties and cell adhesion molecule expression in MG-63 three-dimensional tumor spheroids. *Cell Commun Adhes*. 2006 May-Jun, 13(3), 185-98. doi: 10.1080/15419060600734153. PMID: 16798617.
- [85] WU C. T., LIN W. Y., CHANG Y. H., CHEN W. C., CHEN M. F. Impact of CD44 expression on radiation response for bladder cancer. *J Cancer* 2017, 8(7), 1137-1144. doi:10.7150/jca.18297. PMID: 28607587.
- [86] VENKATESULU B. P., MAHADEVAN L. S., ALIRU M. L., YANG X., BODD M. H., SINGH P. K., YUSUF S. W., ABE J. I., KRISHNAN S. Radiation-Induced Endothelial Vascular Injury: A Review of Possible Mechanisms. *JACC Basic Transl Sci*. 2018 Aug

- 28, 3(4), 563-572. doi: 10.1016/j.jacbts.2018.01.014. PMID: 30175280; PMCID: PMC6115704.
- [87] IWAKAWA M., NODA S., OHTA T., OOHIRA C., TANAKA H., TSUJI A., ISHIKAWA A., IMAI T. Strain dependent differences in a histological study of CD44 and collagen fibers with an expression analysis of inflammatory response-related genes in irradiated murine lung. *J Radiat Res.* 2004 Sep, 45(3), 423-33. doi: 10.1269/jrr.45.423. PMID: 15613788.
- [88] KASPER M., BIERHAUS A., WHYTE A., BINNS R. M., SCHUH D., MÜLLER M. Expression of CD44 isoforms during bleomycin-or radiation-induced pulmonary fibrosis in rats and mini-pigs. *Histochem Cell Biol.* 1996 Mar, 105(3), 221-30. doi: 10.1007/BF01462295. PMID: 8681040.
- [89] SCHÜTZE A., VOGLEY C., GEORGES 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 Apr 19, 7(16), 21428-40. doi: 10.18632/oncotarget.7258. PMID: 26870892; PMCID: PMC5008296.
- [90] GAO C., LIU S., WANG Y., CHA G., XU X. Effect of receptor for hyaluronan-mediated motility inhibition on radiosensitivity of lung adenocarcinoma A549 cells. *Transl Cancer Res.* 2019 Apr, 8(2), 410-421. doi: 10.21037/tcr.2019.02.03. PMID: 35116773; PMCID: PMC8798256.
- [91] SNAUWAERT S., VANHEE S., GOETGELUK G., VERSTICHEL G., VAN CAENEGHEM Y., VELGHE I., PHILIPPÉ J., BERNEMAN Z. N., PLUM J., TAGHON T., LECLERCQ G., THIELEMANS K., KERRE T., VANDEKERCKHOVE B. RHAMM/HMMR (CD168) is not an ideal target antigen for immunotherapy of acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2012 Oct, 97(10), 1539-47. doi: 10.3324/haematol.2012.065581. Epub 2012 Apr 24. PMID: 22532518; PMCID: PMC3487554.
- [92] USUNIER B., BROSSARD C., L'HOMME B., LINARD C., BENDERITTER M., MILLIAT F., CHAPEL A. HGF and TSG-6 Released by Mesenchymal Stem Cells

- Attenuate Colon Radiation-Induced Fibrosis. *Int J Mol Sci.* 2021 Feb 11, 22(4), 1790. doi: 10.3390/ijms22041790. PMID: 33670243; PMCID: PMC7916908.
- [93] MOLLÀ M., GIRONELLA M., MIQUEL R., TOVAR V., ENGEL P., BIETE A., PIQUÉ J. M., PANÉS J. Relative roles of ICAM-1 and VCAM-1 in the pathogenesis of experimental radiation-induced intestinal inflammation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003 Sep 1, 57(1), 264-73. doi: 10.1016/s0360-3016(03)00523-6. PMID: 12909242.
- [94] SCHÖLCH S., RAUBER C., WEITZ J., KOCH M., HUBER P. E. TLR activation and ionizing radiation induce strong immune responses against multiple tumor entities. *Oncoimmunology.* 2015 May 7, 4(11):e1042201. doi: 10.1080/2162402X.2015.1042201. PMID: 26451314; PMCID: PMC4589041.
- [95] WANG Z., KIM K. Y., YOON S. H., PARK J. H., CHOI J., BAKHEET N., HU H. T., LOPERA J. E., SONG H. Y., JEON J. Y. Radiation Inhibits Lymph Drainage in an Acquired Lymphedema Mouse Hindlimb Model. *Lymphat Res Biol.* 2020 Feb, 18(1), 16-21. doi: 10.1089/lrb.2018.0072. Epub 2019 Jun 24. PMID: 31233351.