Proizvodnja i način upotrebe hijaluronske kiseline u medicini

Ribarić, Vedran

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:790992

Rights / Prava: Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Vedran Ribarić
7557/PT

PROIZVODNJA I NAČIN UPOTREBE HIJALURONSKE KISELINE U MEDICINI

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Kemija i biokemija hrane

Mentor: prof. dr. sc. Irena Landeka Jurčević

Zagreb, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno - biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda
Laboratorij za kemiju i biokemiju hrane

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

PROIZVODNJA I NAČIN UPOTREBE HIJALURONSKE KISELINE U MEDICINI

Vedran Ribarić*, 0058212486*

Sažetak: Hijaluronska kiselina je prirodni biopolimer koji ima važne biološke funkcije u bakterijama i životinjama, uključujući ljude. Nalazi se u većini vezivnih tkiva, a posebno je koncentriran u sinovijalnoj tekućini, staklastoj tekućini oka, pupkovinama i pilećim krijestama kod životinja. Prirodno ga sintetizira klasa integralnih membranskih bjelančevina nazvanih hijaluron sintaze, a razgrađuje ga obitelj enzima nazvanih hijaluronidaze. Otkriće nekoliko neočekivanih složenih bioloških uloga hijaluronske kiseline promoviralo je novi poticaj za biologe i klinički interes za nekoliko područja medicine, kao što su oftalmologija, dermatologija i terapija karcinoma.

Ključne riječi: hijaluronska kiselina, proizvodnja, medicina, tumor, zacjeljivanje

Rad sadrži: 26 stranice, 2 slike, 0 tablica, 50 literaturna navoda
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničnom (pdf format) pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb
Mentor: prof. dr. sc. Irena Landeka Jurčević

Rad predan: 12. srpanj, 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Food Technology

Department of Food Quality Control
Laboratory for Food Chemistry and Biochemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

PRODUCTION AND METHOD OF USE OF HYALURONIC ACID IN MEDICINE

Vedran Ribarić, 0058212486

Abstract Hyaluronic acid is a natural biopolymer that has important biological functions in bacteria and animals, including humans. It is found in most connective tissues and is especially concentrated in synovial fluid, vitreous fluid of the eye, umbilical cord, and chicken crest in animals. It is naturally synthesized by a class of integral membrane proteins called hyaluronic synthase, and is broken down by a family of enzymes called hyaluronidase. The discovery of several unexpected complex biological roles of hyaluronic acid has promoted a new impetus for biologists and clinical interest in several areas of medicine, such as ophthalmology, dermatology, and cancer therapy.

Key words: hyaluronic acid, production, medicine, tumor, healing

Thesis contains: 26 pages, 2 figures, 0 table, 50 references
Original in: Croatian
Thesis is in printed and electronic form deposited in: the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb
Mentor: PhD. Irena Landeka Jurčević, Full professor

Defence date: July 12th, 2021

SADRŽAJ

1. UVOD ... 1
2. TEORIJSKI DIO ... 2
2.1. HIJALURONSKA KISELINA ... 3
2.1.1. Biološke funkcije hijaluronske kiseline ... 3
2.1.2. Kemijska struktura ... 3
2.1.3. Sinteza ... 4
2.1.4. Degradacija ... 5
2.2. EKSTRAKCIJA HIJALURONSKE KISELINE ... 6
2.2.1. Proizvodnja hijaluronske kiseline iz životinjskih izvora ... 6
2.2.1.1. Ekstrakcija hijalurona iz pilećih krijesta ... 6
2.2.1.2. Ekstrakcije i pročišćavanja hijaluronske kiseline iz oka ribe ... 7
2.2.2. Proizvodnja hijaluronske kiseline iz mikrobioloških izvora ... 8
2.2.2.1. Proizvodnja hijalurona pomoću Streptococcus zooepidemicus ... 8
2.2.2.2. Proizvodnja hijalurona pomoću Bacillus subtilis ... 10
2.2.2.3. Proizvodnja hijalurona pomoću Lactococcus Lactis ... 11
2.3. PRIMJENA HIJALURONSKE KISELINE U MEDICINI ... 12
2.3.1. Uloga hijaluronske kiseline u zacjeljivanju rana ... 12
2.3.2. Uloga hijaluronske kiseline u onkologiji ... 14
2.3.3. Uloga hijaluronske kiseline kod osteoartritisa i u regeneraciji hrskavice ... 16
2.3.4. Uloga hijaluronske kiseline u oftamologiji ... 18
2.3.5. Hijaluronska kiselina u estetskoj medicini ... 19
3. ZAKLJUČAK ... 21
4. LITERATURA ... 22

1. UVOD

Ovaj rad govori o svestranosti, prilagodljivosti i općenitoj važnosti hijaluronske kiseline u modernoj medicini. Hijaluronska kiselina je polisaharid s jedinstvenim svojstvima zbog kojih nalazi različite primjene u raznim granama medicine. Pronalazimo je kao važan dio tijela u svim kralježnjacima gdje ima važnu ulogu u tekućim vezivnim tkivima, hidrataciji i transportu te je nalazimo još u nekim bakterijama.

Kao prirodan sastojak tijela ima svojstvo neimunogenosti odnosno ne izaziva imunološku reakciju u tijelu i biokompatibilnosti tj. sposobnosti da u dodiru sa živim tkivom ne izaziva oštećenje tkiva ili alergijsku reakciju tkiva.

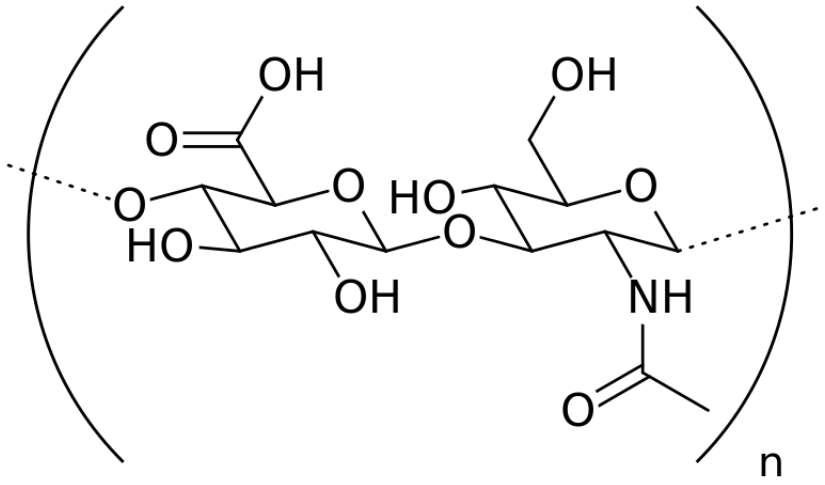
Hijaluronska kiselina koja se danas koristi dobiva se većinom iz mikroorganizama koji je proizvode kao nusproizvod zbog veće isplativosti i manjeg rizika od alergijskih reakcija koje su moguće kod ekstrakata iz životinjskih izvora.

U ovom radu obrađeno je nekoliko načina proizvodnje hijaluronske kiseline te nekoliko primjera gdje se hijaluronska kiselina najčešće koristi.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. HIJALURONSKA KISELINA

Hijaluronska kiselina je ugljikohidrat, točnije mukopolisaharid, koji se prirodno javlja u svim živim organizmima. Hijaluronska kiselina je dugački, ne razgranati polisaharid koji se sastoji od ponavljajućih disaharida D-glukuronske kiseline i N-acetil-D glukozamina s molekulskom težinom koja doseže do $2x10^7$ Da. Hijaluronska kiselina je kemijski spoj koji se može naći samo u životinjama. Kemijska formula hijaluronske kiseline je $(C_{14}H_{21}NO_{11})_n$ (slika 1). U svojoj strukturi (dužini) može sadržavati nekoliko tisuća šećera (Abatangelo i sur., 2020).



Slika 1. Kemijska struktura hijaluronske kiseline (Anonymus 1, 2021)

Hijaluronsku kiselinu prvi puta su izolirali Karl Meyer i John Palmer 1934. godine iz staklovine goveđeg oka, ali strukturu je opisao Laurent tek 1970. Balazs je 1986. predložio naziv "hijaluron" kao alternativu "hijaluronskoj kiselini", jer karboksilne skupine pri fiziološkom pH disociraju i tako privlače katione (Necas i sur., 2008).

Kad nije vezana za druge molekule, veže se za vodu dajući joj čvrstu viskoznu strukturu sličnu želeu. Zbog karboksilnih skupina, hijaluronska kiselina je negativno nabijena, visoko hidrofilna i pri velikim molekulskim težinama tvori viskoznu mrežu. Prisutna je u mnogim sojevima bakterija i kod svih kralježnjaka (naročito je prisutna u embrionalnim tkivima i u ekstracelularnom

matriksu mekih vezivnih tkiva međutim najveće koncentracije postiže u staklovini oka i u pupkovini) (Abatangelo i sur., 2020).

2.1.1. Biološke funkcije hijaluronske kiseline

Biološke funkcije hijaluronske kiseline uključuju održavanje elasto-viskoznosti tekućih vezivnih tkiva kao što su sinovijalna i staklasta tekućina zglobova, kontrolu hidratacije tkiva i transporta vode, supramolekularni sklop proteoglikana u izvanstaničnoj matrici i brojne uloge posredovane receptorima u odvajanju stanica kao što su mitoza, migracija, razvoj tumora i metastaza te upala (Necas i sur.,2008).

Zbog svojih fizikalno-kemijskih svojstava hijaluronska kiselina hidratizira ekstracelularni matriks i regulira homeostazu i otpornost tkiva na sile kompresije. Njezina je funkcija u tijelu, između ostalog, vezanje vode i podmazivanje pokretnih dijelova tijela, poput zglobova i mišića. Štoviše, stvara pericelularni omotač oko većine stanica gdje funkcionira kao signalna molekula koja djeluje u interakciji sa svojim vežućim proteinima i regulira staničnu adheziju, migraciju i proliferaciju. Nalazi se prvenstveno u izvanstaničnom matriksu i pericelularnom matriksu, ali se također pokazalo da se javlja i unutar stanice. Unutarstanične funkcije još nisu u potpunosti okarakterizirane, ali pretpostavlja se da ima ulogu u kontroli proliferacije i upale stanica (Abatangelo i sur., 2020).

Jedinstvena viskoelastična priroda hijalurona zajedno s biokompatibilnošću i neimunogenošću dovela je do njegove primjene u brojnim kliničkim primjenama, uključujući nadoknađivanje zglobne tekućine kod artritisa, kao kirurško pomagalo u kirurgiji oka te za olakšavanje zacjeljivanja i regeneracije kirurških rana (Necas i sur.,2008).

2.1.2. Kemijska struktura

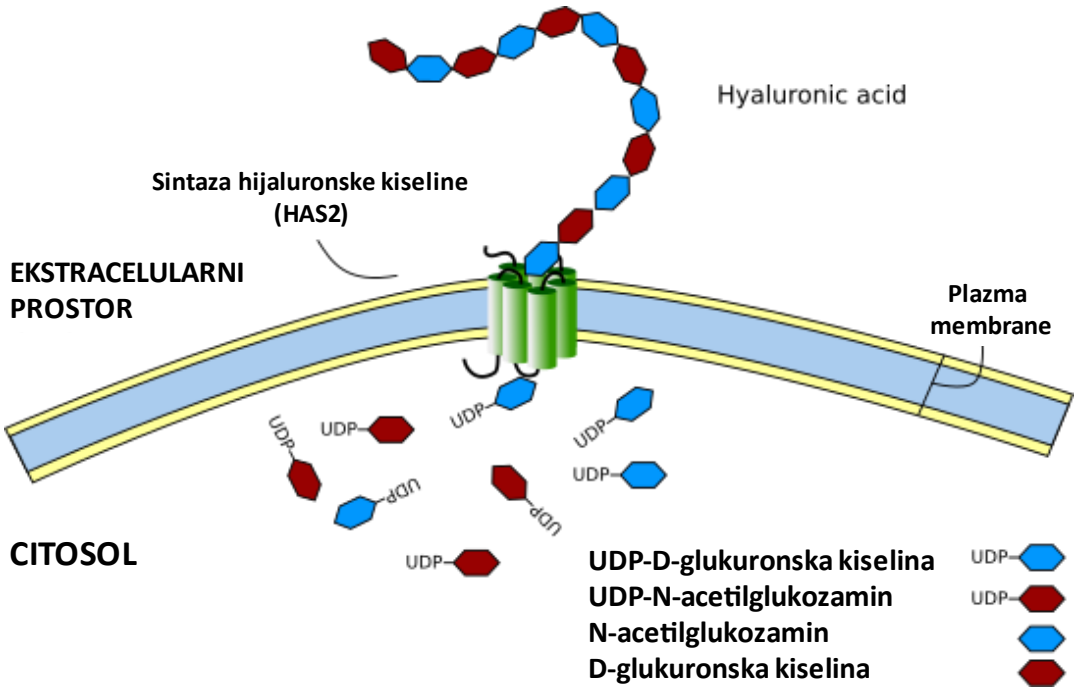
Molekule hijaluronske kiseline su anionski linearni heteropolisaharidi izgrađeni od redovito izmjeničnih ostataka D-glukuronske kiseline i N-acetil-D-glukozamina. U molekuli hijaluronske kiseline, glukozamin vezan je za glukuronsku kiselinu β-(1→4)- glikozidnom vezom, a glukuronska kiselina s glukozaminom β-(1→3)-glikozidnom vezom (Kogan i sur.,2007).

Hijaluronska kiselina može postojati na staničnoj površini u nevjerojatno velikom broju konformacijskih stanja poput izduženih lanaca, opuštenih zavojnica i normalnih zavojnica.

Karboksilne, hidroksilne i acetamidne skupine daju hidrofilna svojstva molekuli hijalurona. Za molekulu hijalurona karakteristično je stvaranje niza vodikovih veza koje stabiliziraju makromolekulu u vodenim otopinama. Vodikove veze stvaraju se između kisika karboksilne skupine i vodika acetilaminske skupine izravno ili kroz molekulu vode. Ostale vodikove veze nastaju između vodika hidroksilne skupine koji leži u ekvatorijalnoj ravnini i atoma kisika glikozidne veze, a stvorena struktura je vrlo stabilna i u vodenoj otopini i u slobodnom stanju (Selyanin i sur., 2015).

2.1.3. Sinteza

Stanična sinteza hijaluronske kiseline jedinstven je i visoko kontroliran proces. Za razliku od ostalih glikozaminoglikana koji se sintetiziraju unutar stanice u Golgijevom aparatu, a zatim izlučuju izvana egzocitozom, hijaluron sintetiziraju transmembranski enzimi nazvani hijaluron sintaze, od kojih kralježnjaci imaju tri vrste: HAS1, HAS2 i HAS3 (Lee i Spicer, 2000).



Slika 2. Sinteza hijaluronske kiseline sintazom hijaluronske kiseline – HAS2 (Anonymus 2, 2021)

Enzimi hijaluron sintaze sintetiziraju velike, linearne polimere ponavljajuće disaharidne strukture hijalurona naizmjeničnim dodavanjem glukuronske kiseline i N-acetilglukozamina u rastući lanac koristeći njihove aktivirane nukleotidne šećere (UDP - glukuronska kiselina i UDP-N-acetilglukozamin) kao supstrate. Hijaluronska kiselina se premješta u izvanstanični prostor dok se istovremeno produljuje polimerni lanac (slika 2).

Tri enzima različito se izražavaju tijekom morfogeneze i stvaraju hijaluron s različitim molekulskim težinama. Smatra se da HAS3 proizvodi molekule s nižom molekulskom masom od HAS1 i HAS2 koje su sposobne generirati hijaluron velike molekulske mase. Štoviše, HAS1 pokazuje sporiju aktivnost od HAS2 i HAS3 (Necas i sur.,2008).

2.1.4. Degradacija

Život molekule hijalurona brz je proces, a njezino vrijeme poluraspada varira od 12 do 24 sata u koži do nekoliko minuta u krvotoku. Hijaluronska kiselina prisutna u krvi katabolizira se u limfnim čvorovima i jetri, dok se ona prisutna u tkivima razgrađuje izvan stanice hijaluronidazom, reaktivnim vrstama kisika, superoksidom, dušikovim oksidom i peroksitnitritima koji nastaju tijekom upaljenih ili ozlijeđenih tkiva, a unutar stanice lizosomima (Fraser i Laurent, 1997).

U ljudi je identificirano šest različitih hijaluronidaza: Hyal-1, Hyal-2, Hyal-3, Hyal-4, PH-20 i Hyalp-1. Hyal-1 i Hyal-2. Najkarakterističnije su hijaluronidaze, vrlo izražene u somatskim tkivima (Stern i Jedrzejas,2006).

Hijaluronidaze djeluju zajedno kako bi razgradili hijaluronske lance. Na površini stanice, Hyal-2 veže i internalizira hijaluron u vezikulama gdje se molekule cijepaju na fragmente od 20 kDa. Nakon toga, fragmenti se dalje probavljaju putem Hyal-1 u tetrasaharide. PH-20 prisutan je u spermi i najaktivnija je hijaluronidaza sisavaca, a o aktivnosti Hyal-3, Hyal-4 i Hyalp1 se još ne zna puno (Abatangelo i sur., 2020).

Ravnoteža između sinteze i razgradnje hijalurona ima ključnu ulogu u određivanju, ne samo količine molekule, već i molekularne težine hijalurona i, shodno tome, njegovih svojstava. Predloženo je da hijaluron različitih molekularnih veličina može pokazivati različita, a ponekad i suprotna biološka djelovanja (Tavianatou i sur., 2019).

Na primjer, hijaluronska kiselina visoke molekulske mase djeluje protuupalno i kontrolira regrutiranje upalnih stanica, dok su molekule male molekulske mase proupalne i potiču angiogenezu i preoblikovanje tkiva u procesu zacjeljivanja rana (Stern i sur., 2006).

2.2. EKSTRAKCIJA HIJALURONSKE KISELINE

Hijaluronska kiselina se može ekstrahirati iz tkiva kralježnjaka ili iz bakterija koje stvaraju zaštitnu kapsulu od polisaharida. Tradicionalno se ekstrahirao iz pijetlovih krijesta, a sada se uglavnom proizvodi mikrobnom fermentacijom s nižim proizvodnim troškovima i manjim zagađenjem okoliša (Saranraj i Naidu, 2013) .

2.2.1. Proizvodnja hijaluronske kiseline iz životinjskih izvora

Do nedavno je ekonomski najisplativiji način dobivanja hijaluronske kiseline bio njegovo vađenje iz pilećih krijesti. Postupak uključuje naknadnu homogenizacije tkiva, ekstrakciju, pročišćavanje i pripremu konačnog komercijalnog hijalurona, koji može biti u obliku suhog praha, otopine, granula ili u ljekovitim tvarima (Selyanin i sur.,2015).

2.2.1.1. Ekstrakcija hijalurona iz pilećih krijesta

Pijetlove krijeste sadrže do 7,5 mg hijalurona na 1 g tkiva koji je uglavnom lokaliziran u sluzničnim vlaknima potkožnog sloja (Selyanin i sur., 2015). Prije ekstrakcije iz smrznutog tkiva, krijeste moraju biti dobro oprane vodom, acetonom, 95% etanolom ili smjesom etanola i kloroforma. Ovaj postupak je neophodan kako bi se izbjeglo enzimatsko i oksidativno uništavanje hijalurona. Tkivo treba usitniti u homogenizatoru, dezintegratoru ili kugličnom mlinu kako bi se omogućila maksimalna ekstrakcija. Za ekstrakciju se mogu koristiti različita otapala, uključujući destiliranu vodu pri različitim temperaturama, otopine soli i vodeno-organske smjese.

Kod ekstrakcije vodom pri temperaturi tkiva od 80-100°C moguće je izdvajanje do 93% hijaluroske kiseline te istovremeno dolazi do inaktivacije hijaluronidaze enzima koji uzrokuje degradaciju hijalurona. Međutim pri visokim temperaturama hijaluronska kiselina prolazi djelomičnu depolimerizaciju bez obzira na enzimatsku hidrolizu. Stoga je potrebno pronaći optimalnu temperaturu kako bi se osigurala inaktivacija enzima hijaluronidaze visokom temperaturom i izbjeglo (ili barem minimiziralo) uništavanje polimera.

Nakon ekstrakcije, hijaluronan mora proći pročišćavanje. Ekstrakt iz životinjskog tkiva obično sadrži mnoge nečistoće poput proteina, peptida, lipida, nukleinskih kiselina, mukopolisaharida i preteča niske molekulske mase. Proteini se uklanjaju ekstrakcijom vodom i

kloroformom ili smjesom kloroform izoamil alkohola. Međutim, hijaluron životinjskog podrijetla sadrži i kovalentno vezane peptide i proteine. Kako bi ih se uklonilo, moraju se upotrijebiti proteolitičkih enzimi poput pepsina, tripsina, papaina ili pronaze (Ignatova i Gurov, 1990).

Da bi se uklonili drugi mukopolisaharidi treba se izvršiti frakcijsko taloženje s cetilpiridinijevim kloridom, nakon čega se kompleks otapa u natrijevom kloridu. Polisaharidi se mogu ukloniti ionskom kromatografijom ili gel filtracijom na koloni agaroze ili Sephadexa. Za pročišćavanje hijaluronske kiseline mogu se koristiti i druge metode, uključujući ultrafiltraciju, absorpciju aktivnim ugljenom, ionsku izmjenu, elektrodijalizu ili elektroforezu (Selyanin i sur., 2015).

2.2.1.2. Ekstrakcije i pročišćavanja hijaluronske kiseline iz oka ribe

Staklovina iz očne jabučice određenih riba također sadrži znatne koncentracije hijalurona. Upotreba ovih tzv. "otpadnih tvari" riblje industrije kao izvora za ekstrakciju pomaže i smanjenju zagađenja okoliša na obalnim područjima. Štoviše supstrat bi izbjegao rizik od goveđe spongiformne encefalopatije koja može biti prisutna kod ekstrakcije hijalurona goveđeg podrijetla (Murado i sur., 2012).

Nadalje, komercijalne cijene hijalurona dobivene iz životinjskih izvora poput staklovine mnogo su više od cijena dobivenih fermentacijom. U staklovini ribe sabljarke (*Xiphias gladius*) koncentracija hijalurona je oko 0,055 g po kg staklovine dok je u staklovini morskih pasa (*Prionace sp.*) pet puta veća i iznosi oko 0,3 g po kg.

Proces ekstrakcije započinje podvrgavanjem smrznutih očnih jabučica uz dva ili tri serijska reza. Fragmenti se odmrzavaju na mreži paralelnih najlonskih niti što omogućuje propuštanje staklastog tijela i zadržava ostatak očne jabučice. U idućem koraku staklovina je homogenizirana i razbistrena centrifugiranjem. Nakon centrifugiranja dobivene su tri jasne faze: sediment nečistoća, mala frakcija lipida i veća frakcija viskozne staklovine. Idući korak u ekstrakciji je ultrafiltracija i dijafiltracija nakon koje slijedi elektrodepozicija odnosno taloženje čvrstog materijala na elektrodu pomoću elektrolize. Retentati dobiveni elektrodepozicijom i ultrafiltracijom zasoljavaju se s NaCl i polako talože s etanolom uz intenzivno miješanje kako bi se izbjeglo stvaranje flokula. Supernatant dobiven taloženjem se odbacuje, a dobiveni sediment u kojem se nalazi hijaluronska kiselina i proteini ponovno se otapaju intenzivnim miješanjem, dodajući količinu vode koja je potrebna za dobivanje odgovarajućeg odnosa vode i etanola za

kvantificiranje hijalurona i maksimiziranje neotopljene frakcije proteina. Dobivena suspenzija se potom centrifugira te se dobiveni sediment koji sadrži ne otopljene proteine odbacuje, a supernatant sa hijaluronskom kiselinom se zadržava (Murado i sur., 2012).

2.2.2. Proizvodnja hijaluronske kiseline iz mikrobioloških izvora

U pilećim krijestama hijaluronska kiselina je vezana s proteoglikanima što izolaciju visoke čistoće i visoke molekulske mase hijalurona čini skupom (O'Regan i sur., 1994).

Štoviše, upotreba biokemijskih sredstava životinjskog podrijetla za humanu terapiju nailazi na sve veće protivljenje zbog rizika od virusnih infekcija i drugih slučajnih uzročnika. Stoga mikrobna proizvodnja postupno zamjenjuje ekstrakciju kao preferirani izvor hijaluronske kiseline.

Hijaluron je uspješno proizveden u industrijskim razmjerima sa *Streptococcus sp.* kao glavnom sirovinom. Ipak, proizvodnja hijalurona iz *Streptococcus sp*. suočava se sa sve većom zabrinutošću zbog činjenice da su streptokoki patogeni. U tom kontekstu, proizvodnja hijalurona iz rekombinantnih izvora izaziva sve veći interes, a Novozymes je proizveo hijaluronsku kiselinu s rekombinantnom *Bacillus subtilis* u industrijskim razmjerima (Liu i sur., 2011).

Proizvodnja hijalurona iz bakterijskih kultura uključuje uklanjanje mikroorganizama, uklanjanje tvari male molekulske mase ultrafiltracijom, taloženje organskim otapalom i pročišćavanje konačnog proizvoda pomoću prethodno opisanih metoda za životinjska tkiva. Na kraju se komercijalni proizvod pojavljuje u obliku bijelog praha, pahuljica ili 1% otopine (otopina ima prosječnu molekulsku masu od 1 000 000 Da i može imati različitu raspodjelu molekulske mase).

2.2.2.1. Proizvodnja hijalurona pomoću Streptococcus zooepidemicus

Najčešće korišteni soj u proizvodnji hijaluronske kiseline je *Streptococcus zooepidemicus* , koji može proizvesti 6-7 g L^{-1} hijalurona u odgovarajućim uvjetima uzgoja. Međutim, proizvodnja hijaluronske kiseline iz *S. zooepidemicus* suočava se sa sljedeća tri izazova:

1.) Viskoznost bujona doseže čak 400-500 mPas pri koncentraciji 4-5 g L^{-1} hijalurona, što uzrokuje loše miješanje i malu brzinu prijenosa mase kisika, pa je proizvodnja jako ograničena.

2.) Postoji snažna kompeticija između sinteze hijaluronske kiseline i rasta stanica za uobičajene prekursore kao što su UDP-N-acetilglukozamin i UDP-glukuronska kiselina.
3.) Mliječna kiselina glavni je nusproizvod fermentacije hijalurona, a nakupljanje mliječne kiseline rezultira snažnom inhibicijom rasta stanica i sinteze hijalurona (Ogrodowski i sur., 2005).

Opsežne studije provedene su za poboljšanje proizvodnje hijaluronske kiseline sa *S. zooepidemicus*. Šećerna okosnica hijaluronske kiseline potječe od glukoze-6-fosfata i fruktoza-6-fosfata. Put sinteze hijalurona može se podijeliti u dva niza reakcija:

1.) U prvom nizu, glukoza-6-fosfat se α-fosfoglukomutazom pretvara u glukoza-1-fosfat. UDP-glukoza pirofosforilaza dodaje UTP glukozi-1-fosfatu da bi se proizvela UDP-glukoza. Konačno, oksidacijom primarnog alkohola u UDP glukozi UDP-glukoznom dehidrogenazom dobiva se prvi spoj potreban za sintezu hijalurona, UDP-glukuronska kiselina.
2.) U drugom nizu reakcija, glutamin-fruktoza-6-fosfat-amidotransferaza prenosi amido-skupinu iz glutamina u fruktoza-6-fosfat dajući glukozamin-6-fosfat. Premještanje fosfatne skupine fosfoglukozamin mutazom stvara glukozamin-1-fosfat. Acetilirani oblik ovog spoja proizveden je u sljedećem koraku fosfoglukozamin acetiltransferazom. Konačno, N-acetilglukozamin-1-fosfat pirofosforilaza aktivira međuprodukt dodavanjem UTP, čime se dobiva drugispoj potreban za sintezu hijalurona, UDP-N-acetilglukozamin (Rangaswamy i Jain, 2007).

Za sintezu hijaluronske kiseline i rast stanica potrebni su spojevi kao što su glukoza-1-fosfat, UDP-glukoza i UDP-N-acetilglukozamin. Stoga postoji konkurencija između sinteze hijalurona i staničnog rasta jer su im potrebni isti spojevi, a visoka specifična brzina rasta nije povoljna za sintezu hijalurona. Uz to se može vidjeti da se glikoliza i sinteza hijaluronske kiseline nadmeću za izvor ugljika. Stoga je slabljenje glikolitičkog procesa i smanjenje brzine stvaranja biomase učinkovito za povećanje koncentracije hijalurona. Streptokoki su nutritivno zahtjevne bakterije i ne mogu sintetizirati neke aminokiseline. Dodavanje nekih aminokiselina poput arginina i lizina u medij bilo je povoljno za rast stanica i proizvodnju hijalurona. Uvjeti kulture (pH, temperatura, brzina miješanja, brzina prozračivanja, posmični stres, otopljeni kisik i vrsta bioreaktora) značajno utječu na mikrobiološku proizvodnju hijalurona. pH i temperatura za

proizvodnju hijalurona pomoću *S. zooepidemicus* obično su iznosile 7,0, odnosno 37°C (Liu i sur, 2011).

Ekstrakcija nastalog hijalurona započinje tako da se jako viskozni fermentirani bujon koja ima 5 g HA L^{-1} ili više razrijedi se s jednakim volumenom vode i centrifugira tijekom 20 minuta na 4°C za uklanjanje stanica. Za pročišćavanje smjese dobivene centrifugiranjem koristi se više metoda kao što je taloženje pomoću više otapala, obrada kationskim detergentom, diafiltracija i obrada anionskim izmjenjivačkim smolama. Nedavno se pojavio i novi postupak pročišćavanja hijalurona koji uključuje filtraciju silika gelom u kombinaciji s obradom s aktivnim ugljenom nakon čega slijedi diafiltracija. Koristi se jedan korak taloženja otapalima koji drastično smanjuje upotrebu otapala za razliku od ostalih postupaka (Brown i sur., 1994; Han i sur., 2004).

Uklanjanje proteinskih nečistoća za 96% postiže se tretiranjem silikagelom i aktivnim ugljenom, a ne detergentima koji zahtijevaju višestruko pranje nakon obrade (Rangaswamy i Jain, 2007).

2.2.2.2. Proizvodnja hijalurona pomoću Bacillus subtilis

Bakterije iz razreda bacila već se dugo koriste za proizvodnju proizvoda u rasponu od hidrolitičkih enzima, poput proteaza i alfa-amilaze, do posebnih kemikalija, poput aminokiselina i vitamina. Ti organizmi mogu lučiti velike količine proizvoda, što ukazuje na njihov visoko razvijeni biosintetski kapacitet, i vrlo su ekonomični za uzgoj u industrijskim fermentorima. *Bacillus subtilis* ne sadrži egzotoksine i endotoksine te ne proizvodi hijaluronidazu koja bi mogla razgraditi hijaluronsku kiselinu. Konačno, *B. subtilis* jedan je od najkarakterističnijih gram-pozitivnih mikroorganizama, čiji je genom sekvenciran, a postoji široki niz alata dostupnih za genetske manipulacije (Widner i sur., 2005).

Dakle, ova bakterija nudi nekoliko prednosti kao mogući proizvođač hijalurona. Poznato je da samo nekoliko bakterijskih vrsta prirodno proizvodi hijaluronsku kiselinu, i to streptokoki skupine A i C (gram pozitivni) i *Pasteurella multocida* (gram negativna). Enzim koji katalizira ovu reakciju je hijaluron sintaza ili HAS. Do danas su klonirani i sekvencirani geni koji kodiraju HAS iz prokariota, eukariota, pa čak i virusa algi (Widner i sur., 2005).

Put za biosintezu hijalurona u streptokokima skupine A i C je određen, a može se lako prilagoditi za optimizaciju proizvodnje i u *B. subtilis*. Jedini enzim koji nedostaje *B. subtilis* je hijaluronan sintaza, koja je kodirana s hasA genom. Da bi se proizveo hijaluron u *B. subtilis*

oponaša se pristup proizvodnje iz *Streptococcus zooepidemicus*. To se može postići na nekoliko različitih načina. HAS operon iz skupine A ili C streptokoka se jednostavno može unijeti u *B. subtilis* ili se mogu stvoriti umjetni operoni koji se dijelom sastoje od gena *B. subtilis*. Drugi pristup je privlačniji, jer se endogeni geni često učinkovitije izražavaju u svom nativnom domaćinu. *B. subtilis* ima homologe za hasB, hasC i hasD gene, a oni su označeni tuaD, gtaB i gcaD. Stoga su konstruirani umjetni operoni koji su sadržavali gen hasA iz streptokoka zajedno s jednim ili više od navedenih gena izvedenih iz *B. subtilis* (Widner i sur., 2005).

Sinteza hijalurona dalje prati reakcijske puteve opisane kod *Streptococcusa zooepidemicusa*. Prinos i kvaliteta proizvoda su vrlo dobri, kako u pogledu molekulske mase, tako i polidisperznosti. Hijaluron se izlučuje u okolni medij i nije povezan sa stanicom, što bi trebalo uvelike pojednostaviti postupak obnavljanja i olakšati obradu u nastavku. Ekonomija proizvodnje dodatno je poboljšana zbog sposobnosti *B. subtilis* da raste na jednostavnijim podlogama, za razliku od streptokoka skupina A i C, koji su zahtjevni organizmi i za rast trebaju skuplje složene podloge (Widner i sur., 2005).

2.2.2.3. Proizvodnja hijalurona pomoću Lactococcus Lactis

Laktokoki su gram-pozitivne bakterije mliječne kiseline i koriste se u prehrambenoj industriji za proizvodnju i očuvanje fermentiranih proizvoda. Zbog njihovog statusa kao bakterije koje ne proizvode toksine odnosno kao sigurne bakterije, učinjeno je mnogo za genetsku modifikaciju vrsta Lactococcus kako bi se poboljšale njihove osobine uvođenjem specifičnih gena (Chien i Lee, 2007).

Kako bi se izbjegli nedostatci *S. zooepidemicus*, konstruirani su rekombinantni sojevi na bazi *L. lactis* koji sadrže operon biosinteze hijaluronske kiseline. Sustav ekspresije kontrolirane nisinom svestrani je strogo kontrolirani sustav ekspresije gena, zasnovan na mehanizmu autoregulacije bakteriocina nisina i jedan je od najuspješnijih i najčešće korištenih alata *L. lactis* (Sheng i sur., 2014).

Od enzima potrebnih za sintezu hijalurona *L. Lactis* sadrži homologe za hasB i hasD enzime dok je hasA, ključni enzim, koji katalizira polimerizaciju glukuronske kiseline i N-acetilglukozamina uveden pomoću sustava ekspresije kontrolirane nisinom pomoću konstruiranog rekombinantnog operona za biosintezu hijaluronske kiseline. Nakon uvođenja potrebnih gena u *Lactococcus Lactis* ona počinje proizvoditi hijaluronsku kiselinu pomoću reakcijskih puteva opisanih kod

Streptococcus Zooepidemicusa Budući da je *L. Lactis* prehrambena mliječno-kisela bakterija, proizvedeni hijaluron ima veliki potencijal za primjenu u području prehrambene i biomedicinske industrije (Sheng i sur., 2014).

2.3. PRIMJENA HIJALURONSKE KISELINE U MEDICINI

Viskoelastična svojstva, fiziološka aktivnost i biokompatibilnost hijalurona čine ga idealnim materijalom za farmakološke primjene, posebno u oftalmologiji, reumatologiji i dermatologiji. Nadalje, kemijskom modifikacijom molekula dobivaju se biokompatibilni i biorazgradivi biomaterijali na bazi hijalurona koji se koriste za pokrivanje rana i za tkivno inženjerstvo. Medicinske studije hijalurona uključuju njegovu ulogu u oplodnji, embriogenezi, razvoju imunološkog odgovora, zacjeljivanju rana, onkološkim i zaraznim bolestima, procesima starenja i problemima estetske medicine. Širok spektar praktične medicinske primjene hijalurona i dalje se temelji na njegovom protuupalnom, dezinficijenskim i zacjeljivačkim učincima.

Hijaluronska kiselina potiče regeneraciju epitela, sprečava stvaranje granulacijskog tkiva i ožiljaka, smanjuje oticanje i svrbež, normalizira cirkulaciju krvi i štiti unutarnje očno tkivo. U posljednjih nekoliko godina vrlo obećavajuće područje medicine i farmakologije dobilo je značajnu pozornost: ciljana isporuka lijekova određenim organima ili tkivima gdje bi se hijaluron mogao koristiti kao alternativna opcija u stvaranju makromolekularnog spremnika (Sudha i Rose, 2014).

2.3.1. Uloga hijaluronske kiseline u zacjeljivanju rana

Hijaluronska kiselina nema alergenska ili nadražujuća djelovanja, ali može pružiti protuupalni i biostimulativni učinak te ubrzati procese regeneracije. Ova svojstva, u kombinaciji s drugim lijekovima, koriste se za ubrzavanje zacjeljivanja opeklina, čireva i kirurških zahvata. Dokazano je da hijaluronska kiselina ima presudnu ulogu utječući na upalne, proliferativne i faze ponovnog modeliranja procesa zacjeljivanja kože. Ima protuupalna ili proupalna svojstva u odnosu na molekulsku masu Litwiniuk i sur., 2016).

Pokazalo se da lokalno primijenjena hijaluronska kiselina ubrzava zacjeljivanje rana na koži kod štakora i hrčaka (King i sur., 1991).

U istraživanju West i sur. pokazano je da su proizvodi razgradnje hijaluronske kiseline pro-angiogeni i primijećeno je da je taj učinak ograničen na fragmente duljine između 4 i 25

disaharida. Istodobno, sinteza i akumulacija hijalurona brzo se inducira u području oštećenja tkiva aktiviranjem gena i različitih hijaluron sintaza. To sugerira da je makromolekula aktivni sudionik reparativnih procesa oštećenog tkiva. Ovo je bilo jedno od prvih istraživanja modulacije rana hijaluronskom kiselinom (West i sur., 1991).

Taloženje kolagena fibroblastima jedan je od ključnih čimbenika za rekonstituciju matriksa na mjestu ožiljka i priroda tog taloženja u velikoj mjeri određuje kvalitetu ožiljka. Primjena dugolančane hijaluronske kiseline na gingivu rezultira smanjenom proliferacijom fibroblasta. Sprječava stvaranje adhezije u raznolikim područjima kao što su periferni živci i kralježnične lamele, te smanjuje ukupnu količinu kolagena koji se na mjestu ožiljka taloži dermalnim fibroblastima kože kako bi ožiljak bio što manji. Također postoje dokazi da je obnavljanje izvanstaničnog matriksa nakon primjene hijaluronske kiseline pojačano, a taloženje kolagena uređenije s manje razgradnje. Može djelovati kao promotor rane upale, važnog koraka u procesu zacjeljivanja rana, pojačavajući staničnu infiltraciju i proizvodnju proupalnih citokina (Kobayashi i Terao, 1997).

Hijaluronska kiselina također može igrati ulogu u kontroli angiogeneze tijekom popravka tkiva. Dokazano je da hijaluron visoke molekulske mase inhibira angiogenezu, dok hijaluron male molekulske mase potiče angiogenezu u nekoliko eksperimentalnih modela. Zacjeljivanje rana dinamičan je proces koji se sastoji od tri faze koje se preklapaju: upale, proliferacije i sazrijevanja (restrukturiranje). U prvoj fazi (faza upale) glavni proces je stvaranje krvnog ugruška koji čini privremeni matriks koji se sastoji od proteina poput fibrina i krvnih trombocita. kako bi se zaustavilo krvarenje. Čak i u ranim fazama primjećuje se porast koncentracije hijalurona, koji se veže na mrežu fibrina čineći prijelaznu matricu (Neuman i sur., 2015).

Hijaluron je u interakciji sa stanicama pomoću receptora i velikog broja proteina, specifično proteoglikana, stvarajući gusta "sita". Njezin dispergirajući matriks tvori male tubule za selektivnu difuziju molekula topivih u vodi. Makromolekula hijalurona sadrži redovito ponavljajuće hidrofobne regije, koje omogućuju interakciju između staničnih membrana i struktura matrice. Istodobno se aktiviraju enzimi izvanstaničnog matriksa koji kataliziraju razgradnju proteina i polisaharidnih polimera do fragmenata niže molekulske mase i novih funkcija. Ti proteinski i polisaharidni fragmenti sudjeluju u stvaranju prijelaznog matriksa. Moguće je vidjeti dvije glavne faze prijelaznog matriksa: gel i tekući kristali. Hijaluronska kiselina velike molekulske mase, kada se ubaci u proteinsku mrežu, stvara matricu sličnu gelu. Fragmentirani hijaluron i polipeptidi mogu

oblikovati strukture slične tekućim kristalima. Strukture tekućih kristala imaju puno veću pokretljivost, što olakšava migraciju stanica u ranu (Selyanin i sur., 2015).

U drugoj fazi (faza proliferacije ili faza fibroblasta) nastavlja se aktivna sinteza i razgradnja hijalurona i proteoglikana. Ovu fazu zacjeljivanja rane karakterizira aktivna proliferacija fibroblasta, sinteza velike količine hijaluronana i novog kolagena. Mnogi čimbenici rasta, nastali razgradnjom hijalurona i proteina, iniciraju migraciju matičnih stanica u ranu. Unutar rane diferenciraju se u "mlade" fibroblaste koji vjerojatno nisu ograničeni Hayflickovim brojem, brzo se dijele i proizvode značajnu količinu kolagena tipa III i IV (Price i sur., 2005).

U trećoj fazi (sazrijevanje, starenje i rekonstrukcija ili reorganizacija), kada nastaju granule i pojavi se višak kolagena matriksa, apoptozom se smanjuje broj stanica. Višak hijalurona podvrgava se depolimerizaciji, a kratki fragmenti makromolekula polisaharida stimuliraju nicanje krvnih žila u izvanstaničnom matriksu. Privremeni matriks uništava se matriksnim hijaluronidazama i metaloproteazama u procesu koji je, u osnovi, preuređivanje privremenog matriksa (Selyanin i sur., 2015.).

2.3.2. Uloga hijaluronske kiseline u onkologiji

Uloge hijaluronske kiseline, hijaluron sintetaze, hijaluronidaze i receptora za hijaluronsku kiselinu u borbi protiv raka složene su i određene receptorima za hijaluronsku kiselinu izraženim u stanicama raka. Postoje različiti mehanizmi djelovanja hijalurona na tumorske stanice.

Na molekularnoj razini, glavni mehanizam povezan je s činjenicom da se hijaluron visoke molekulske mase može vezati za receptore na staničnoj membrani tumorskih stanica, što rezultira usporenom migracijom i metastazama stanica. Za invaziju stanica karcinoma i stvaranje metastaza potrebna je proteoliza izvanstanične domene receptora CD44. U ovom slučaju, stanica se oslobađa veze s hijaluronom i uklanja iz "sidra". Dakle, polisaharid velike molekulske mase može se koristiti kao inhibitor rasta stanica raka i stvaranja metastaza (Selyanin i sur., 2015).

Širok spektar aktivnosti može se objasniti velikim brojem receptora koji vežu hijaluronsku kiselinu, poput glikoproteina CD44 na staničnoj površini, receptora za pokretljivost posredovanu hijaluronskom kiselinom (RHAMM) i nekoliko drugih receptora koji vežu hijaluron. Prvi od njih (CD44) sudjeluje u upalnim procesima, aterosklerozi i karcinogenezi. Drugi receptor (RHAMM) odgovoran je za pokretljivost stanica, zacjeljivanje tkiva i karcinogenezu (Salwowska i sur., 2016).

Dokazano je da je razina hijalurona povišena u različitim stanicama raka (Lin i Stern, 2001.) i vjeruje se da tvori manje gusti matriks, povećavajući tako pokretljivost stanice kao i invazivnu sposobnost u drugim tkivima (Hill i sur. , 2006.).

Dobro je poznato da različiti tumori (epitelni, jajnički, debelo crijevo, želudac i akutna leukemija) pretjerano eksprimiraju receptore koji vežu hijaluron, CD44 i RHAMM. Posljedično, ove tumorske stanice karakteriziraju pojačano vezanje hijaluronske kiseline. Interakcije CD44 i hijalurona imaju različite važne fiziološke uloge, uključujući posredovanje ili promicanje agregacije makrofaga, migraciju stanica, sklop pericelularnog matriksa hondrocita i aktivaciju leukocita. Paradoksalno je da se hijaluronska kiselina i enzimi koji eliminiraju hijaluronsku kiselinu, hijaluronidaze, mogu povezati s napredovanjem karcinoma. Pokazano je da prekomjerna ekspresija hijaluron sintaze povećava razinu hijaluronske kiseline, što dovodi do ubrzanja rasta i metastaziranja tumora. S druge strane, egzogeni oligomerni hijaluron inhibira napredovanje tumora, najvjerojatnije natječući se s endogenim polimernim hijaluronom (Necas i sur., 2008).

Interakcija između hijalurona i receptora CD44 utječe na proliferaciju, preživljavanje, pokretljivost, invazivnost i kemijsku otpornost stanica. S druge strane, prekomjerna ekspresija receptora RHAMM povezana je s promicanjem rasta i metastaziranja tumora. Dokazano je da hijaluronska kiselina niske molekulske mase potiče pokretljivost tumorskih stanica interakcijama s CD44 receptorima (Sugahara i sur., 2003).

Također je primijećeno da hijaluronska kiselina potiče napredovanje tumora regrutiranjem stromalnih stanica i angiogenezom. Vjeruje se da je hijaluron visoke molekulske mase odgovoran za migraciju, diferencijaciju stanica i prikupljanje tkiva matičnih stanica. Proces angiogeneze jedan je od temeljnih procesa neophodnih za preživljavanje karcinoma. Zbog obilne opskrbe krvlju, tumori mogu rasti i metastazirati. Mnogi autori ističu ulogu hijaluronidaza u potpori razvoju novotvorina putem hijaluronske kiseline. Ovo znanje rezultiralo je upotrebom ovih enzima u brojnim studijama. Među prijavljenim rezultatima zabilježeno je smanjenje rasta tumora i sinteze DNA u stanicama raka. Primjena hijaluronidaze u kombinaciji s antineoplastičnim sredstvima omogućuje im lakši prodor u stanicu što rezultira boljim odgovorom na liječenje i mogućom primjenom nižih doza lijekova. Ta se svojstva već neko vrijeme koriste u kemoterapiji. Višak hijaluronidaze dovodi do inhibicije proonkogenog djelovanja hijaluronske kiseline, što je dobiveno egzogenom primjenom. Sa svime navedenim treba imati na umu da i hijaluronska kiselina i njegova srodna hijaluronidaza imaju pro- i antitumorske učinke koji ovise o koncentraciji i podrijetlu (Salwowska i sur., 2016).

Budući da se hijaluronska kiselina može specifično vezati za razne stanice raka koje pretjerano eksprimiraju CD44, mnoga su se istraživanja usredotočila na farmaceutsku primjenu hijalurona za terapiju protiv raka. Većina spojeva hijalurona i lijekova razvijena je za kemoterapiju raka kao makromolekularni predlijekovi. Hijaluron je također sjedinjen sa raznim nanočesticama napunjenim lijekom za upotrebu kao ciljajući dio spoja. Ovi hijaluron konjugati koji sadrže antikancerogena sredstva pokazali su pojačanu sposobnost ciljanja tumora i veću terapijsku učinkovitost u usporedbi sa slobodnim antikancerogenim sredstvima (Choi i sur., 2010).

Konjugati hijaluronske kiselina i kolanske kiseline mogu tvoriti stabilne čestice nano veličine sastavljene od hidrofilne ljuske i hidrofobne unutarnje jezgre. Stvoreni konjugati selektivno ciljaju na tumorsko tkivo, kako zbog pasivne akumulacije putem pojačanog učinka permeacije i retencije, tako i zbog aktivnog ciljanja uzrokovanog snažnim afinitetom hijaluronske kiseline za receptor CD44 s visokom specifičnošću (Choi i sur., 2010).

Nanočestice vežu se za receptor na tumorskoj stanici i endocitozom ulaze u nju gdje se raspada nanočestica, a lijek djeluje direktno na tumor. Nanočestice koje su modificirane dijelovima za ciljanje mogu se prepoznati, povezati se i internalizirati u tumorske stanice putem endocitoze posredovane receptorima (CD44). Kao posljedica toga, lijekovi protiv raka smješteni unutar nanočestica mogu se osloboditi unutar tumorskih stanica (Byrne i sur., 2008).

2.3.3. Uloga hijaluronske kiseline kod osteoartritisa i u regeneraciji hrskavice

Zbog prirodne pojave hijalurona u sinovijalnoj tekućini, zglobnoj kapsuli i zglobnoj hrskavici, široko se koristi u ortopediji. Ovaj se spoj koristi uglavnom među bolestima zglobova poput osteoartritisa ili reumatoidnog artritisa.

Osteoartritis je najčešća bolest zglobova, koja dovodi do značajnog invaliditeta i pada kvalitete života. Kod ovog poremećaja dolazi do neravnoteže između procesa stvaranja i uništavanja zglobne hrskavice, u korist uništavanja. Hijaluronska kiselina igra vitalnu ulogu u razvoju hrskavice, održavanju sinovijalne tekućine i regeneraciji tetiva. Visoke koncentracije hijalurona pronađene su u ekstracelularnom matriksu svih odraslih zglobnih tkiva, uključujući sinovijalnu tekućinu i hrskavicu vanjskog sloja. Djelomično zbog viskoelastične prirode i sposobnosti stvaranja visoko hidratiziranih matriksa, hijaluron djeluje u zglobu kao lubrikant i amortizer (Necas i sur., 2008).

Uobičajena terapija za osteoartritis koristi sredstva za ublažavanje boli i nesteroidne protuupalne lijekove koji djeluju, ali imaju značajne štetne učinke i toksični su. Iz tih razloga, dodavanje hijaluronske kiseline i biomaterijala dobivenim iz hijaluronske kiseline bio je značajan napredak u terapiji za osteoartritis.

U osteoartritičnim zglobovima sinovijalna tekućina sadrži nižu koncentraciju hijalurona nego u zdravim zglobovima, pa intraartikularna terapija egzogenim hijaluronom može vratiti njena viskoelastična svojstva. Studije *in vivo* i *in vitro* pokazale su različite fiziološke učinke egzogene hijaluronske kiseline koji mogu biti u suprotnosti s mehanizmima koji su uključeni u patogenezu osteoartritisa. Zapravo, egzogeni hijaluron može pojačati sintezu hondrocita endogene hijaluronske kiseline i proteoglikana, spriječiti razgradnju hrskavice i pospješiti njezinu regeneraciju. Štoviše, može smanjiti proizvodnju proupalnih medijatora i metaloproteinaza matriksa, te smanjiti živčane impulse i osjetljivost živaca povezane s osteoartritčkom boli (Colen i sur., 2012).

U istraživanju Migliore i Procopio hijaluronska kiselina se davala u obliku pet tjednih injekcija (20 mg 2 ml^{-1} jednom tjedno tijekom 5 tjedana), strukturni učinci procjenjivani su mikroartroskopijom i morfološkom analizom uzoraka biopsije uzetih na početku i nakon 6 mjeseci u otvorenom kliničkom ispitivanju na 40 bolesnika s ostreoartrozom koljena. Nakon 6 mjeseci, mikroartroskopska procjena pokazala je da većina bolesnika (60%) nije pokazala promjene u odnosu na početno stanje, dok je 32,5% bolesnika pokazalo poboljšanje stanja, a 7,5% pogoršano stanje. Te su promjene popraćene statistički značajnim smanjenjem sinovijalne upale. Nakon 6 mjeseci, u usporedbi s početnim vrijednostima, primijećeno je statistički značajno rekonstituiranje površinskog amorfnog sloja hrskavice, poboljšanje gustoće i vitalnosti hondrocita te statistički značajno smanjenje sinovijalne upale praćeno značajnim povećanjem procesa sinovijalne obnove (Migliore i Procopio, 2015).

Slično je istraživanje pokazalo da su šest mjeseci nakon tretmana hijaluronom debljine površinskog amorfnog sloja, gustoća hondrocita i izgled teritorijalnog matriksa bili značajno veći u usporedbi s početnim stanjem (Guidolin i sur., 2001.).

Unutarzglobna hijaluronska kiselina korisno je terapijsko sredstvo u liječenju bolesnika s osteoartritisom. Podaci iz literature ukazuju na njegovu sposobnost smanjenja boli i poboljšanja funkcije zglobova. Štoviše, s obzirom na visoku podnošljivost, sposobnost kontrastiranja strukturnih oštećenja zglobova i odgađanja upotrebe protetskih operacija, može se smatrati sigurnom i učinkovitom dugotrajnom terapijom.

2.3.4. Uloga hijaluronske kiseline u oftamologiji

Hijaluronska kiselina je važna komponenta staklastog tijela oka, suznog filma, epitela rožnice i konjunktive. Staklasto tijelo oka uglavnom se sastoji od hijalurona koji proizvode stanice rožnice. Zbog viskoelastičnih svojstava hijalurona, staklasto tijelo osigurava trajni očni tlak i sprječava odvajanje mrežnice i pigmentnog epitela. Zbog viskoelastičnih svojstava često se koristi kao lubrikant i predstavlja glavni sastojak u formulacijama umjetnih suza, a koristi se i u ublažavanju suhoće oka. Smanjuje iritaciju, vlaži oko i nadoknađuje nedostatke natrijevog hijaluronata u suznom filmu (Abatangelo i sur., 2020).

Hijaluronska kiselina, prirodna komponenta staklastog tijela oka, pronašla je mnoge uspješne primjene u oftalmološkoj kirurgiji. Posebno je korisna kao matriks za ispunjenje prostora u oku; tako se intraokularna injekcija hijalurona tijekom operacije koristi za održavanje oblika prednje komore. Njegovi se učinci uglavnom temelje na uspostavljanju i održavanju ugodnih uvjeta za promicanje ozdravljenja postkirurškog područja. To se postiže stabilizacijom suznog filma, smanjenim trajanjem zacjeljivanja, smanjenim rizikom od adhezija, smanjenim stvaranjem slobodnih radikala i normalizacijom očnog tlaka. Široko se koristi tijekom operacija prednjeg segmenta oka, poput trabekulektomije, uklanjanja mrene, liječenja glaukoma, refraktivne kirurgije i plastične kirurgije rožnice (Salwowska i sur.,2016).

Razvijeno je nekoliko formulacija otopina hijalurona s aminokiselinama, antioksidantima i drugim spojevima. Mogu se propisati za hidrataciju očnih jabučica ili ubrizgavanje u prednju komoru oka tijekom operacije mrene. Takvi spojevi imaju prepoznatljiva svojstva, poput stabilizacije suznog filma, smanjenja trenja tijekom treptanja i sprečavanja štetnih tvari koje se vežu za oko, smanjenja simptoma suhoće oka (Selyanin i sur., 2015).

Sindrom suhog oka uobičajeni je očni poremećaj koji se odnosi na dob, spol, prehranu, okoliš, bolest ili operativni zahvat ili se javlja kao nuspojava lijekova (Wang i sur., 2020).

Hijaluron se može dodati umjetnim suzama kako bi se pojačalo i produžilo trajanje zadržavanja vlage i tako ublažio sindrom suhog oka (Huyhn i Priefer,2020). U kapima za oči, visoki sadržaj hijalurona stabilizira suzne filmove i povećava vrćaste stanice konjunktive. Zajedno s koncentracijom važana je prisutnost hijalurona velike molekulske težine kako bi kapi za oči imale protuupalno djelovanje. Hibridizacija hijaluronske kiseline visoke i niske molekularne mase u kapima za oči može zaštititi od dehidracije stanice rožnice i pospješiti zacjeljivanje rana. Klinička studija pokazala je da kapi za oči s hijaluronom velike molekularne mase mogu biti alternativni

tretman za pacijente s jakim suhim okom (Beck i sur., 2019). Hijaluronska kiselina može imati različite oblike u kapima za oči i može se koristiti u kombinaciji s drugim spojem, djelovati kao nosač za dostavu lijeka ili oblikovati bifunkcionalni peptidni polimer. Može koristiti s trigliceridima, fosfolipidima, vitaminom B12, koenzimom Q10, antibioticima ili steroidima. Hijaluron koji se koristi s navedenim spojevima mogao bi povećati debljinu suznog filma, poboljšati oksidativni stres u epitelu konjunktive pacijenata sa suhim okom, održavati površinu oka i smanjiti simptome sindroma suhog oka (Chang i sur., 2021).

Hijaluron je biokompatibilan i učinkovit u zadržavanju vlage na kontaktnim lećama. U polju kontaktnih leća primjenjuje gotovo 20 godina, a primjena uključuje ugradnju u leće, modifikaciju površine, stabilizaciju lijekova za oči i pomoć pri konstantnom oslobađanju lijeka. Budući da nošenje kontaktnih leća dulje vrijeme može uzrokovati suhoću oka, hijaluronom natopljene kontaktne leće zadržavaju vlagu, čime se rješava ovaj problem (Chang i sur., 2021).

Hijaluron je kritična komponenta u izvanstaničnom matriksu. Izvanstanični matriks pomaže u migraciji stanica, adheziji i proliferaciji takvih stanica kao što su matične stanice dobivene iz masnog tkiva i matične stanice limbalnog epitela. Te stanice pomažu u regeneraciji rožnice; konkretno, izradom skele za tkivo kojim se pospješuje zacjeljivanje rožnice (Suri i Schmidt, 2010).

Hijaluron hidrogel se također može koristiti u inženjerstvu tkiva rožnice. Prekomjerno obrađeni porozni hijaluron hidrogelovi djeluju kao nositelji stanica stanica endotela rožnice i mogu rekonstruirati endotel rožnice (Koivusalo i sur., 2019).

Hidrogelovi pokazuju biokompatibilnost sa stanicama endotela kunića. U provedenom istraživanju transplantacijom in vivo, hidrogel hijaluronske kiseline ugrađen je u prednju komoru ozlijeđenog zečjeg oka. Rezultati su ukazali na značajan porast stanica endotela nakon 4 tjedna liječenja. Biomikroskopska slika također je otkrila prozirnu rožnicu, što ukazuje na to da je hijaluron hidrogel uspješno rekonstruirao ozlijeđenu rožnicu (Lai i sur., 2015).

2.3.5. Hijaluronska kiselina u estetskoj medicini

Natrijev hijaluronat trenutno je najčešće korišteno kozmetičko punilo. Funkcija mu je popunjavanje i nabiranje prostora izvanstaničnog tkiva. U tekućim formulacijama koristi se za popunjavanje malih površinskih bora, dajući koži elastičnost i fleksibilnost, dok se umreženi

pripravci koriste za korekciju kontura lica, modeliranje dojke kod žena, prsnog koša kod muškaraca i stražnjice (Kanchwala i sur., 2005).

Izvrsni učinci mogu se postići u korekciji nazolabijalnih nabora i bora, ublažavanju vodoravnih bora na čelu, podizanju obrva, postavljanju nosa, promjeni oblika i volumena usana, modeliranju obraza, brade, oblikovanju tijela (povećanje i modeliranje grudi, bedra, stražnjica i listova), a nedavno i u poboljšanju oblika stidnih usana (labioplastija). Male količine hijalurona ubrizgavaju se intradermalno kako bi se dobilo približno 6 mjeseci punine (Tezel i Fredrickson, 2008).

Kao prirodna supstanca u tijelu, hijaluronska kiselina ima mali rizik od alergijske reakcije, ne zahtijeva testiranje kože prije ubrizgavanja, jednostavna je za upotrebu i oblikovanje, a trajnija je od kolagena. Štoviše, umrežena priroda hijaluronskog gela govori da se radi o vrlo svestranom proizvodu koji se može koristiti u više slučajeva i područja liječenja (Carruthers i Carruthers, 2007).

3. ZAKLJUČAK

Hijaluronska kiselina tek se u zadnje vrijeme počinje sve više koristiti u liječenju pacijenata iako je otkrivena relativno rano, 1934. godine. Zbog svojih raznolikih svojstava odličan je izbor za upotrebu u raznim granama medicine od estetske kirurgije do onkologije i zbog svojeg relativno jednostavnog načina proizvodnje može se proizvoditi u velikim količinama.

Uloge hijalurona u medicini su razne i kreću se od estetske medicine gdje ima ulogu kozmetičkog punila pa sve do onkologije gdje se koristi za navođenje antikancerogenih lijekova i dermatologije gdje stvaranjem privremenih matriksa ubrzava zacjeljivanje kože.

Zbog svega navedenog možemo zaključiti da hijaluronska kiselina trenutno ima veliku važnost u modernoj medicini, ali također ima i velik potencijal za upotrebu u drugim granama medicine koji bi se trebao ostvariti daljnjim istraživanjem.

4. LITERATURA

- Abatangelo G. , Vindigni V. , Avruscio G. , Pandis L. , Brun P. (2020) Hyaluronic Acid: Redefining Its Role. *Cells* **9**: 1743. https://doi.org/10.3390/cells9071743
- Anonymus 1, (2021) Kemijska struktura hijaluronske kiseline, https://pic.weblogographic.com/img/news/826/difference-between-hyaluronic-acid-and-glycolic-acid_1.jpg (800×454) (weblogographic.com). Pristupljeno, 10. svibnja 2021.
- Anonymus 2, (2021) Sinteza hijaluronske kiseline u sintazom hijaluronske kiseline – HAS2, https://www.bing.com/images/search?view=detailV2&ccid=aPhqNDL9&id=E21B10173A479B239D0184176F56E674286C2EE0&thid=OIP.aPhqNDL9vr_24lj3h1s8SAHaFD&mediaurl=https%3a%2f%2fth.bing.com%2fth%2fid%2fR68f86a3432fdbebff6e258f7875b3c48%3frik%3d4C5sKHTmVm8XhA%26riu%3dhttp%253a%252f%252fatlasgeneticsoncology.org%252fGenes%252fImages%252fHAS2Fig2.png%26ehk%3dhhiQZ%252fNyF%252fFroy%252bcSgrx44GX037CGvD50vPpt6kju0k%253d%26risl%3d%26pid%3dImgRaw&exph=368&expw=539&q=hyaluronic+acid+synthesis+has1%2c+has2%2c+has3&simid=608023084089673772&ck=6B1C52476F59325EEA8C443A6B9CE9FB&selectedIndex=0&FORM=IRPRST&ajaxhist=0&ajaxserp=0. Pristupljeno, 10. svibnja 2021.
- Beck R., Stachs O., Koschmieder A., Mueller-Lierheim W.G.K., Peschel S., van Setten G.B. (2019) Hyaluronic Acid as an Alternative to Autologous Human Serum Eye Drops: Initial Clinical Results with High-Molecular-Weight Hyaluronic Acid Eye Drops. *Case Reports in Ophthalmology* **10**: 244–255.
- Brown K. K., Ruiz L. L. C., van de Rijn I. (1994) Method for the microbiological production of non-antigenic hyaluronic acid. US Patent 5,316,926, 31 May 1994
- Byrne J.D., Betancourt T., Brannon-Peppas L.(2008) Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* **60(15)**: 1615–1626.
- Carruthers A.,Carruthers J. (2007) Non–Animal-Based Hyaluronic Acid Fillers: Scientific and Technical Considerations. *Plastic and Reconstructive Surgery Journal* **65**: 33-40.
- Chang W.H., Liu P.Y., Lin M.H., Lu C.J.,Chou H.Y., Nian C.Y., Jiang Y.T, Hsu Y.H.H. (2021) Applications of Hyaluronic Acid in Ophthalmology and Contact Lenses. *Molecules* **26**: 2485. https://doi.org/10.3390/molecules26092485

- Chien L.J., Lee C.K. (2007) Hyaluronic acid production by recombinant Lactococcus lactis. *Applied Microbiology and Biotechnology* **77**: 339–346.
- Choi K.Y., Chung H.,Min K.H.,Yoon H.Y., Kim K., Park J.H., Kwon I.C., Jeong S.Y. (2010) Self assembled hyaluronic acid nanoparticles for active tumor targeting. *Biomaterials* **31**: 106–114.
- Colen S., van den Bekerom M.P.J., Mulier M., Haverkamp D. (2012) Hyaluronic Acid in the Treatment of Knee Osteoarthritis. *Biodrugs* **26:** 257–268.
- Fraser J.R.E., Laurent T.C. (1997) Hyaluronan: Its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine* **242**: 27–33.
- Guidolin D.D., Ronchetti I.P., Lini E. (2001) Morphological analysis of articular cartilage biopsies from a randomized, clinical study comparing the effects of 500-730 kDa sodium hyaluronate (Hyalgan) and methylprednisolone acetate on primary osteoarthritis of the knee. *Osteoarthritis Cartilage* **9**: 371-381.
- Han H.Y., Jang S.H., Kim E.C. (2004) Microorganism producing hyaluronic acid and purification method of hyaluronic acid. Patent, WO 2004/016771, 26 Feb 2004.
- Hill A., McFarlane S., Johnston P.G., Waugh D.J.J. (2006) The emerging role of CD44 in regulating skeletal micrometastasis. *Cancer Letters* **237:** 1–9.
- Huynh A., Priefer R. (2020) Hyaluronic acid applications in ophthalmology, rheumatology, and dermatology. *Carbohydrate Research* **489:** 107950. https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.107950
- Ignatova E.Y., Gurov A.N. (1990) Principles of extraction and purification of hyaluronic acid. *Chemical-Pharmaceutical Journal* **24**: 42-46.
- Kanchwala S.K., Holloway L., Bucky L.P. (2005) Reliable soft tissue augmentation: a clinical comparison of injectable soft-tissue fillers for facial-volume augmentation. *Annals of Plastic Surgery* **55**: 30–35.
- King S.R., Hickerson W.L., Proctor K.G. (1991) Beneficial actions of exogenous hyaluronic acid on wound healing. *Surgery* **109**: 76-79.
- Kobayashi H., Terao T. (1997) Hyaluronic acid-specific regulation of cytokines by human uterine fibroblasts. *American Journal of Physiology* **273**: 1151–1159.
- Kogan G., Šoltes L., Stern R., Gemeiner P. (2007) Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters* **29**: 17–25.

- Koivusalo L., Kauppila M., Samanta S., Parihar V.S., Ilmarinen T., Miettinen S., Oommen O.P., Skottman H. (2019) Tissue adhesive hyaluronic acid hydrogels for sutureless stem cell delivery and regeneration of corneal epithelium and stroma. *Biomaterials* **225**: 119516. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119516
- Lai J.Y., Cheng H.Y., Ma D.H.K. (2015) Investigation of Overrun-Processed Porous Hyaluronic Acid Carriers in Corneal Endothelial Tissue Engineering. *PLoS ONE* **10:** e0136067. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136067
- Lee J. Y., Spicer A. P. (2000) Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Current Opinion in Cell Biology* **12**: 581–586.
- Lin G., Stern R. (2001) Plasma hyaluronidase (Hyal-1) promotes tumor cell cycling. *Cancer Letters* **163**, 95–101.
- Litwiniuk M., Krejner A., Grzela T., (2016) Hyaluronic Acid in Inflammation and Tissue Regeneration. *Wounds* **28(3)**: 78-88.
- Liu L., Liu Y., Li J., Du G., Chen J. (2011) Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microbial Cell Factories* **10**: 99. https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-99
- Migliore A., Procopio S. (2015) Effectiveness and utility of hyaluronic acid in osteoarthritis. Unit of Rheumatology. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism* **12**: 31-33.
- Murado M. A., Montemayor M. I. ,Cabo M. L., Vázquez J. A., González M. P. (2012) Optimization of extraction and purification process of hyaluronic acid from fish eyeball. *Food and bioproducts processing* **90**: 491–498.
- Necas J., Bartosikova L., Brauner P., Kolar J. (2008) Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni Medicina* **53**: 397–411.
- Neuman M.G., Nanau R.M., Oruña-Sanchez L., Coto G. (2015) Hyaluronic Acid and Wound Healing. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* **18**: 53–60.
- O'Regan M., Martini I., Crescenzi F., DeLuca C., Lansing M. (1994) Molecular mechanisms and genetics of hyaluronan biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules* **16**: 283–286.
- Ogrodowski C.S., Hokka C.O., Santana M. H. A. (2005) Production of Hyaluronic Acid by Streptococcus. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **122:** 753–761.
- Price R. D.,Myers S.,Leigh I.M., Navsaria H.A. (2005) The Role of Hyaluronic Acid in Wound Healing. *American Journal of Clinical Dermatology* **6**: 393-402.

- Rangaswamy V., Jain D. (2007) An efficient process for production and purification of hyaluronic acid from Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus. *Biotechnology Letters* **30**: 493–496.
- Salwowska N.M., Bebenek K.A.,Zadło D.A.,Wcisło-Dziadecka D.L. (2016) Physiochemical properties and application of hyaluronic acid: a systematic review. *Journal of Cosmetic Dermatology* **1**: 1-7.
- Saranraj P., Naidu M.A. (2013) Hyaluronic Acid Production and its Applications - A Review. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives* **4(5)**: 853–859.
- Selyanin M. A.,Boykov P. Y., Khabarov V. N. (2015) Hyaluronic Acid: Preparation, Properties, Application in Biology and Medicine, 1. izd., John Wiley & Sons
- Sheng J., Ling P., Wang F. (2014) Constructing a recombinant hyaluronic acid biosynthesis operon and producing food-grade hyaluronic acid in Lactococcus lactis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **142**: 197-206.
- Stern R., Asari A. A., Sugahara K. N. (2006) Hyaluronan fragments: an information-rich system. *European Journal of Cell Biology* **85**: 699–715.
- Stern R., Jedrzejas M.J. (2006) Hyaluronidases: Their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chemical Reviews* **37**: 818–839.
- Sudha P.N., Rose M.H. (2014) Beneficial Effects of Hyaluronic Acid. *Advances in Food and Nutrition Research* **72**: 137-176.
- Sugahara S.C., Murai T., Nishinakamura H. (2003) Hyaluronan oligosaccharides induce CD44 cleavage and promote cell migration in CD44-expressing tumor cells. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 32259–32265.
- Suri S., Schmidt C.E. (2010) Cell-Laden Hydrogel Constructs of Hyaluronic Acid, Collagen, and Laminin for Neural Tissue Engineering. *Tissue Engineering* Part A **16**: 1703–1716.
- Tavianatou A. G., Caon I., Franchi M., Piperigkou Z., Galesso D., Karamanos N. K. (2019) Hyaluronan: molecular size-dependent signaling and biological functions in inflammation and cancer. *The FEBS Journal* **286**: 2883–2908.
- Tezel A., Fredrickson G.H. (2008) The science of hyaluronic acid dermal fillers. *Journal of Cosmetic & Laser Therapy* **10**: 35–42.
- Wang, M.T.M., Muntz A., Lim J., Kim J.S., Lacerda L., Arora A., Craig J.P. (2020) Ageing and the natural history of dry eye disease: A prospective registry-based cross-sectional study. *The Ocular Surface* **18**: 736–741.

- West D.C., Hampson I.N., Arnold F. (1991) Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science* **228**: 1324-1326.
- Widner B., Behr R., Von Dollen S., Tang M., Heu T., Sloma A., Sternberg D., DeAngelis P. L., Weigel P. H., Brown S. (2005) Hyaluronic Acid Production in Bacillus subtilis. *Applied and environmental microbiology* **71(7)**: 3747–3752.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

_____

Vedran Ribarić