

Received: 2008.06.08
Accepted: 2008.11.06
Published: 2008.12.02

Hialuronian – struktura, metabolizm, funkcje i rola w procesach gojenia ran

Hyaluronan: Structure, metabolism, functions, and role in wound healing

Paweł Olczyk, Katarzyna Komosińska-Vassev, Katarzyna Winsz-Szczotka, Kornelia Kuźnik-Trocha, Krystyna Olczyk

Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Streszczenie

Hialuronian (HA), polianion kwasu hialuronowego, jest niesiarczanowanym, niepodlegającym procesowi epimeryzacji, nierozgałęzionym glikozoaminoglikanem (GAG), utworzonym z powtarzających się disacharydowych jednostek zawierających kwas D-glukuronowy i N-acetylo-D-glukoaminę [$\rightarrow 4\text{Glc}\alpha 1 \rightarrow 3\text{GlcNac}\beta 1 \rightarrow$]. HA jest głównym składnikiem macierzy pozakomórkowej (ECM) skóry, stawów, oka oraz wielu innych tkanek i narządów. Niezwykle prosta struktura tej obficie rozpowszechnionej w ustroju makrocząsteczki, pozostaje w sprzeczności ze złożonością fizykochemicznych właściwości i biologicznych funkcji HA, uzależnionych od wielkości molekuly i interakcji ze swoistymi białkami wiążącymi, tzw. hialadherynami. Hialuronian ma szczególne właściwości hydrofilne, reologiczne i wiskoelastyczne, przejawiając także właściwości cząsteczki sygnałowej. Ten naturalnie występujący biopolimer odgrywa znaczącą rolę w wielu biologicznych procesach, takich jak embriogeneza, zapalenie, powstawanie przerzutów i progresja nowotworowa, a ponadto – w metabolicznym obrocie tkanek czy procesie gojenia ran. Ten ostatni, jest dynamicznym, interaktywnym procesem, obejmującym wiele precyzyjnie powiązanych ze sobą etapów, wzajemnie nakładających się na siebie i prowadzących do przywrócenia integralności tkankowej. Proces gojenia odzwierciedla złożoną i skoordynowaną odpowiedź ustroju na uszkodzenie tkanki, będąc rezultatem interakcji różnych rodzajów komórek, jak i składników macierzy pozakomórkowej. Hialuronian, będący jednym ze składników macierzy pozakomórkowej, odgrywa główną rolę w każdej fazie procesu gojenia, stymulując komórkową migrację, różnicowanie i proliferację, uczestnicząc ponadto w regulacji metabolizmu i organizacji ECM.

Słowa kluczowe:

hialuronian • glikozoaminoglikany • gojenie ran

Summary

Hyaluronan (HA) is a nonsulfated nonpimerized linear glycosaminoglycan (GAG) existing *in vivo* as a polyanion of hyaluronic acid and composed of repeating disaccharide units of D-glucuronic acid and N-acetyl-D-glucosamine [$\rightarrow 4\text{Glc}\alpha 1 \rightarrow 3\text{GlcNac}\beta 1 \rightarrow$]. It is a major constituent of the extracellular matrix (ECM) of the skin, joints, eye, and many other tissues and organs. The simple structure of this ubiquitous macromolecule belies the complexity of its physico-chemical properties and biological functions, which depend on HA's molecular weight and interacting molecules called "hyaladherins". HA has extraordinary hydrophilic, rheological, and signaling properties and is viscoelastic. This naturally occurring biopolymer is dynamically involved in many biological processes, such as embryogenesis, inflammation, metastasis, tumor progres-

sion, tissue turnover, and wound healing. Wound healing is a dynamic interactive process involving many precisely interrelated phases, overlapping in time and leading to the restoration of tissue integrity. The healing process reflects the complex and coordinated body response to tissue injury resulting from the interaction of different cell types and extracellular matrix components. Hyaluronan plays a key role in each phase of wound healing by stimulating cell migration, differentiation, and proliferation as well as regulating ECM organization and metabolism.

Key words: hyaluronan • glycosaminoglycans • wound healing

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=873381>

Word count: 3768

Tables: –

Figures: 5

References: 78

Adres autora: dr n. farm. Paweł Olczyk, Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jedności 8, 41-200 Sosnowiec; e-mail: polczyk@sum.edu.pl

Wykaz skrótów: **HA** – hialuronian (hyaluronan); **GAG** – glikozaaminoglikany (glycosaminoglycans); **HAS** – syntazy hialuronianowe (hyaluronan synthases); **HYAL** – hialuronidazy (hyaluronidases).

STRUKTURA CHEMICZNA

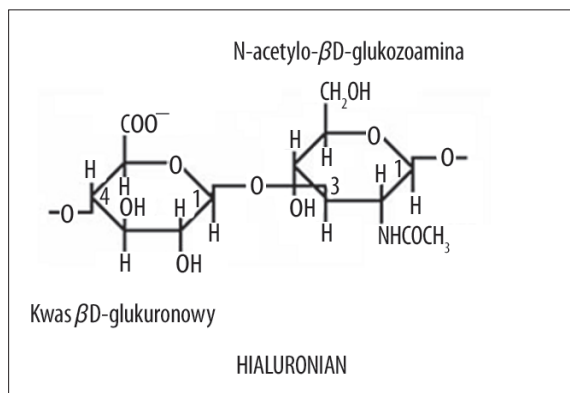
Hialuronian (HA), występujący *in vivo* jako polianion kwasu hialuronowego, jest niesiarczanowanym, ujemnie naładowanym biopolimerem, utworzonym z powtarzających się disacharydowych jednostek, zawierających kwas D-glukuronowy i N-acetylo-D-glukozaaminę [$\rightarrow 4\text{GlcA}\beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow$] [64, 74]. Strukturę jednostki disacharydowej HA przedstawiono na ryc. 1.

WŁAŚCIWOŚCI

Hialuronian należy do rodziny glikozaaminoglikanów (GAG), naturalnych heteropolisacharydów, występujących we wszystkich tkankach zwierzęcych [66,71]. HA syntetyzowany jest jako liniowy polimer. W roztworach wodnych cząsteczki hialuronianu przyjmują konformację sztywnej, lewoskrętnej helisy, stabilizowanej przez mostki wodorowe. Cząsteczki HA, utworzone z setek, a nawet tysięcy cukrowych podjednostek, tworzą jednego tylko rodzaju GAG, bowiem jego disacharydowe składowe nie podlegają jakimkolwiek modyfikacjom, tj. siarczanowaniu czy epimeryzacji, jak to się dzieje w przypadku pozostałych typów glikozaaminoglikanów, występujących w dużej liczbie izomerów [61,70]. Jedynymi zmiennymi, w odniesieniu do ustrojowego hialuronianu, są więc wielkość cząsteczki – determinowana długością polimeru, oraz – stężenie HA i miejsce jego występowania [70].

WYSTĘPOWANIE

Choć nieskomplikowana struktura hialuronianu wydaje się ograniczać zakres jego biologicznych funkcji, to ogromna liczba białek wiążących HA, często nazywanych hialadherynami, o zróżnicowanej tkankowej ekspresji, komórkowym umiejscowieniu, swoistości, powinowactwie wiązania, jak i podlegających zróżnicowanym mechani-



Ryc.1. Struktura disacharydowych jednostek [$\rightarrow 4\text{GlcA}\beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow$] tworzących hialuronian. GlcA – kwas glukuronowy; GlcNAc – N-acetyloglukozoamina [wg 74 zmodyfikowano]

zom regulacyjnym, determinują bogactwo jego oddziaływań w ustroju [11]. Tak więc, jak określił to jeden z największych współczesnych badaczy struktury i właściwości GAG – John Scott: „The hialuronan story is not simple” [61]. Cząsteczki kwasu hialuronowego występują zarówno we wszystkich tkankach i płynach ustrojowych organizmu kręgowców, jak i w otoczkach ścian komórkowych bakterii wielu patogennych szczepów z rodzaju *Pasteurella* czy *Streptococcus* [4,12,17,67]. W tym ostatnim przypadku, podobieństwo, a nawet identyczny skład bakteryjnego polisacharydu z polisacharydem organizmu wyższego, uniemożliwia uruchomienie przez ustrój gospodarza mechanizmów obronnych, takich jak proces fagocytozy i uczynnienie układu dopełniacza, wobec czynnika wirulencji, jakim jest bakteryjny HA [2,3].

W ustroju kręgowców, hialuronian jest umiejscowiony zarówno w macierzy pozakomórkowej (ECM), gdzie stano-

wi jej główny węglowodanowy komponent [3,29], na powierzchni komórek, jak i wewnątrzkomórkowo [25,67]. Masa cząsteczkowa omawianego biopolimeru zawiera się w granicach 10^5 – 10^7 Da, w zależności od rodzaju tkanki, choć przyjmuje także i znacznie mniejsze wartości, gdy ten wielkocząsteczkowy GAG ulega *in vivo* degradacji do mniejszych fragmentów, a nawet – oligosacharydów [67]. Czynnikiem sprawczym procesu depolimeryzacji HA są zarówno reaktywne formy tlenu, jak i białka enzymatyczne, takie jak hialuronidazy, β -glukuronidaza czy heksozoaminidaza [60].

FUNKCJE

W swej wielkocząsteczkowej postaci, hialuronian odgrywa w ustroju rolę homeostatyczną, nie wykazując zdolności aktywowania procesów immunologicznych [51]. Degradowany zaś w przebiegu procesów zapalnych, tkankowej destrukcji czy onkogenezy – do drobnocząsteczkowych fragmentów, przejawia zdolność indukowania w komórkach śródbłonkowych, nabłonkowych, dendrytycznych, w fibroblastach czy też makrofagach, ekspresji genów zapalnych, z następową ekspresją chemokina, takich jak MIP-1 α , MIP-1 β , KC, RANTES, MCP-1, IL-8, białko 10 indukowane INF, oraz z następową ekspresją cytokin, takich jak IL-12 czy TNF- α [51,64]. Fragmenty hialuronianu wykazują także zdolność indukcji biosyntezy enzymów degradujących macierz, takich jak metaloproteinazy, a ponadto i indukowanej postaci syntazy tlenu azotu (iNOS) czy inhibitora 1 aktywatora plazminogenu [60]. Obecnie także wiadomo, iż oligomery HA stymulują procesy komórkowej migracji, proliferacji i dojrzewania, wykazując również działanie proangiogenne [78]. Jednak natywne łańcuchy HA, o dużej masie cząsteczkowej, hamują procesy proliferacji, migracji, wykazują działanie antyangiogenne, przeciwzapalne i immunosupresyjne [64].

Nieznane są jednak mechanizmy leżące u podstaw zróżnicowanych funkcji tego biopolimeru w zależności od długości łańcucha hialuronianu. [14]. Wspomniana zależność jest jednak jedyną przyczyną zróżnicowanych funkcji hialuronianu, zważywszy na brak jakichkolwiek modyfikacji w strukturze węglowodanowego łańcucha omawianego GAG, które to występują w przypadku pozostałych typów glikoaminoglikanów [69].

Natywne, ujemnie naładowane, nierozgałęzione polimery hialuronianu o dużej masie cząsteczkowej, występują powszechnie w pozakomórkowej macierzy wszystkich tkanek zwierzęcych, odgrywają istotną rolę w utrzymaniu strukturalnej integralności tkanki. Biorą także udział w sekwestracji reaktywnych form tlenu, pozanacyniowej dystrybucji białek osocza, oraz w wodnoelektrolitowej homeostazie przestrzeni pozakomórkowej [17,51,69]. Niezwykle fizykochemiczne właściwości hialuronianu, wynikają z kombinacji jego przestrzennej struktury, przyjmującej postać spirali o przypadkowych skrętach. Cecha ta – ze względu na znaczące wymiary tego biopolimeru – znajduje swój wyraz w molekularnej „płataniu” zwojów HA, co wraz ze szczególnymi właściwościami higroskopijnymi (HA to jedna z najbardziej higroskopijnych cząsteczek występujących w naturze, wiążąca wodę w ilościach do 1000 razy przekraczających jej masę) sprawia, iż makrocząsteczka tego GAG przyjmuje ogromną hydrodynamiczną objętość, two-

ząc roztwory o dużej lepkości i elastyczności, wypełniające międzykomórkową przestrzeń, oraz stanowiące fizjologiczny „smar” dla powierzchni stawowych, czy pochwęk ścięgniastych [4,55,67]. Wspomniane, znaczne stopnia, uwodnienie cząsteczek HA sprawia, iż jego roztwory cechują się bardzo dobrą osmotycznością, co nabiera szczególnego znaczenia w przypadku nerek, gdzie omawiane roztwory pełnią funkcję buforu osmotycznego [4]. HA uczestniczy także w kontrolowaniu uwodnienia skóry, zarówno w różnych okresach ontogenezy, jak i w stanach patologicznych, np. procesach zapalnych [4]. Właśnie w skórze jest umiejscowiona połowa ustrojowych zasobów hialuronianu, gdzie ten naturalny, polianionowy polisacharyd zajmuje znaczącą część pozakomórkowej macierzy wspomnianej tkanki, determinując jej sprężystość, wilgotność i pożądaną strukturę, a ponadto zapewniając transport jonów i składników odżywczych [46,59,76]. Z omawianych właściwości wiązania wody przez HA wynika, że jego zawartość w tkankach determinuje stan ich uwodnienia [73].

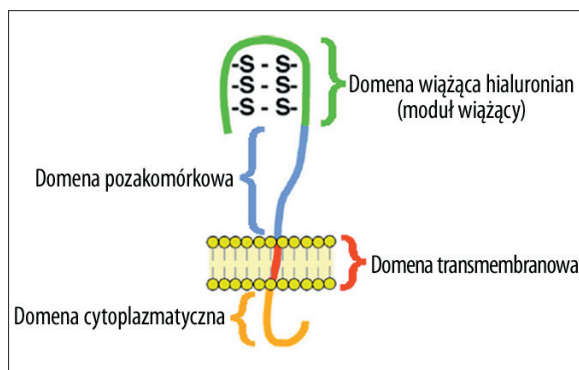
Duża masa cząsteczkowa, znaczne rozmiary natywnych polimerów hialuronianu, i opisane wyżej higroskopijne jego właściwości sprawiają, że GAG ten pełni istotną rolę w utrzymaniu strukturalnej i biomechanicznej integralności tkanek, tworząc zarazem zrab dla komórkowej migracji, różnicowania i proliferacji w pozakomórkowej macierzy [70,71].

BIAŁKA WIĄŻĄCE HIALURONIAN

Funkcje HA są realizowane za pośrednictwem interakcji omawianego biopolimeru z ogromem swoistych białek wiążących, tzw. hialadheryn [67].

Pierwszymi z opisanych hialadheryn były tzw. białko wiążące (link protein) oraz agrekan, wespół z którymi HA tworzy dobrze znane, masywne, multimolekularne proteoglikanowe (PG) agregaty [55,67]. Te ekspansywne kompleksy, w skład których wchodzi ponad 100 agrekanowych cząsteczek, połączonych z HA za pośrednictwem białek wiążących w wyniku niekowalencyjnych oddziaływań, odgrywają ogromną rolę w tworzeniu i stabilizacji pozakomórkowej macierzy chrząstki, generując jej viskoelastyczne właściwości i nadając zdolność „przenoszenia” znaczących obciążeń [73]. Wykazano, iż doświadczalne usunięcie genu białka wiążącego, bądź upośledzenie funkcjonalnych właściwości agrekanu, prowadzi do defektów szkieletu, a zwłaszcza tkanek chrzęstnych, czego wyrazem jest skrócenie kończyn, rozszczep podniebienia, czy inne czaszkowo-twarzowe zniekształcenia [67].

Strukturalne kompleksy HA z dużymi, agregującymi proteoglikanami – hialadherynami, występują także w tkankach pozachrzęstnych [73]. W skórze wykazano obecność wersikanu, a w tkance nerwowej hialuronektyny, brewikanu oraz neurokanu [36,73,78]. Wymienione kompleksy PG–HA są stabilizowane także białkami wiążącymi (link proteins), zaś same PG i wspomniane białka wiążące są zaliczane do hialadheryn tkankowych (inaczej hialektanów, hialektyn) [20,36,78]. Dobrze poznaną, pozakomórkową hialadheryną jest ponadto TSG-6 – białkowy produkt genu 6 stymulowanego TNF, wydzielany w odpowiedzi na bodźce zapalne, oraz uczestniczący w regulacji migracji leukocytów i procesach „remodelingu” macierzy [10].



Ryc. 2. Struktura receptora CD 44 [wg 72 zmodyfikowano]

Makrocząsteczki kwasu hialuronowego oddziałują ponadto z powierzchniowymi receptorami komórek macierzy pozakomórkowej, określanych mianem hialadheryn powierzchni komórek. Te ostatnie obejmują wiele swoistych białek, spośród których najlepiej poznanymi hialadherynami są CD44 oraz RHAMM [34, 53]. Odkrycie obu tych receptorów wskazało po raz pierwszy na bezpośredni udział hialuronianu w regulacji mobilności komórek oraz procesów inwazji i proliferacji [67]. Obydwa wspomniane receptory uczestniczą w wiązaniu zarówno HA o dużej masie cząsteczkowej, jak i drobnocząsteczkowych fragmentów tego GAG, choć fragmentacja HA nasila jego zdolność do aktywowania szlaków przekazywania sygnałów [67]. Głównym dla hialuronianu receptorem powierzchni komórek jest CD44, transmembranowa glikoproteina, występująca na powierzchni większości komórek [10,31,34]. Schemat struktury CD 44 przedstawiono na ryc. 2.

Wiele izoform tej hialadheryny stanowi wyraz różnorodności funkcji spełnianych przez „powierzchniowy” receptor komórkowy [73]. Wykazano, iż CD44 – integralne białko błonowe, pośredniczy w pobudzaniu procesów adhezji, agregacji, migracji i proliferacji komórkowej, w angiogenezie, w przekazywaniu sygnałów na szlaku macierz – komórka i komórka – macierz, czy też w internalizacji i degradacji HA [18,49,51,78,71]. Drugi z wcześniej wymienionych RHAMM, wiążąc w zdecydowanie mniejszym zakresie HA, występuje – podobnie jak CD44 – w wielu izoformach, choć oprócz umiejscowienia na powierzchni komórki, gdzie występując określany jest także mianem receptora CD168, cechuje się również wewnątrzkomórkowym umiejscowieniem, występując w cytosolu, w obrębie cytoszkieletu, oraz w jądrze [11,45,68,78]. Białko to pośredniczy w migracji i proliferacji prawidłowych oraz nowotworowych komórek [11,45]. HA wiąże się także z międzykomórkową cząsteczką adhezyjną – ICAM-1, określaną również mianem receptora CD54, a poprzednio mianem metabolicznego receptora HA, odpowiadającą głównie za pośredniczenie w aktywacji procesów zapalnych [78]. Spośród wielu hialadheryn wiążących hialuronian, wymienić należy także receptor LYVE-1, którego ekspresja obejmuje wyłącznie powierzchnię komórek śródbłonna limfatycznego, a któremu przypisuje się uczestnictwo w procesach degradacji omawianego GAG, a także w procesach transportu HA z tkanek do limfy i w prezentowaniu GAG receptorom CD44 leukocytów, z następowym nasileniem transmigracji tych komórek do limfy [11,51,73]. Inna z hialadheryn powierzchni komórek, tzw. receptor LEC, odpowiadająca z kolei za

klirens hialuronianu z krążenia, jest umiejscowiona na powierzchni śródbłonkowych komórek naczyń zatokowych wątroby [36]. Wspomnieć należy także o niedawno opisywanej rodzinie receptorów powierzchni komórek – receptorach typu „TOLL” z poznanymi dotąd dziesięcioma ich izoformami, którym przypisuje się uczestnictwo w pobudzaniu ekspresji interleukiny 8, rolę w rozpoznawaniu bakteryjnych produktów, takich jak lipopolisacharyd czy flagellina, w rozpoznawaniu składników ściany komórkowej drożdży, takich jak zymosan, w rozpoznawaniu wirusowego RNA czy rolę w patogenezie nowotworów [14,51,71,78]. Izofорма TOLL4, oddziałując z kwasem hialuronowym, aktywuje fazę zapalną procesu gojenia, nasilając biosyntezę cytokin prozapalnych [4,14].

Oprócz hialadheryn tkankowych i hialadheryn powierzchni komórek, w ustroju występują także hialadheryny umiejscowione wewnątrzkomórkowo [11]. Ta ostatnia, szczególna lokalizacja receptorów HA nie budzi już wątpliwości, odkąd stwierdzono, iż HA występuje także i wewnątrz komórek [25]. Wcześniej bowiem powszechnie sądzono, iż kwas hialuronowy, ze względu na jego ekspansywną, hydrodynamiczną strukturę, ogromne rozmiary cząsteczek i polianionowe właściwości, jest makrocząsteczką wyłącznie o pozakomórkowej lokalizacji [25]. Dotąd nie jest jednak znane pochodzenie wewnątrzkomórkowego HA [67]. Obecność hialuronianu w komórce może być konsekwencją zachodzącej na drodze receptorowej endocytozy pozakomórkowego HA, w przebiegu procesu tkankowej degradacji tego GAG. Może też, co nie wykluczone, być skutkiem pozareceptorowej, alternatywnej drogi internalizacji HA, lecz niezwiązanej z katabolizmem tego polisacharydu, a regulacją funkcji jądra, chromosomalną rearanżacją, czy procesami komórkowej proliferacji i lokomocji [8,67]. Dość dobrze opisano trzy swoiste receptory wewnątrzkomórkowe HA, oprócz wewnątrzkomórkowej izoformy receptora RHAMM. Są to receptor CDC37, któremu przypisuje się uczestnictwo w regulacji cyklu komórkowego, jak i w regulacji aktywności komórkowych kinaz, receptor P-32 (zwany także HAMP-1) o przypisywanej roli w transdukcji sygnału komórkowego i prawdopodobnie w interakcjach jądro-mitochondria, oraz trzecie białko – receptor IHAMP4, najprawdopodobniej uczestniczący w wewnątrzkomórkowym przekazaniu sygnałów [11,25].

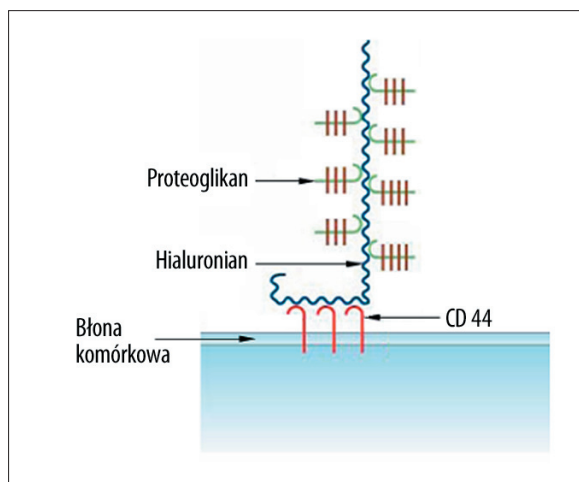
Dokładna charakterystyka strukturalnej organizacji i biologicznych aktywności, „rosnącej” nieustannie rodziny hialadheryn, stanowi przedmiot wyczerpujących opracowań przeglądowych [11,20,51,71,78].

Na ryc. 3 przedstawiono schemat interakcji hialuronianu z hialadherynami.

Makrocząsteczki kwasu hialuronowego, stanowiącego jeden z głównych składników macierzy pozakomórkowej tkanek zwierzęcych, oddziałują także z obecnymi w macierzy glikoproteinami, takimi jak fibronektyna, laminina oraz z białkami włóknistymi – kolagenem czy elastyną [57,73].

BIOSYNTeza HIALURONIANU

Nie tylko hialadheryny pośredniczą w interakcji hialuronianu z powierzchnią komórek [68]. Glikozaaminoglikan ten

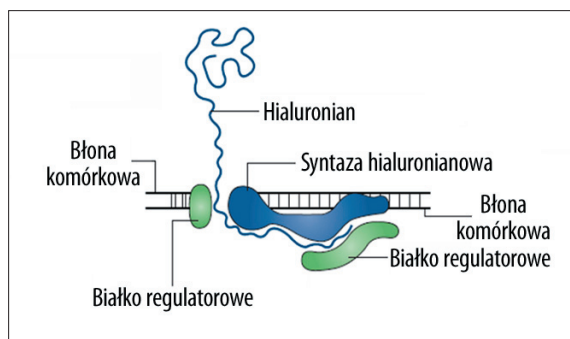


Ryc. 3. Schemat interakcji hialuronianu z hialadherynami powierzchni komórki oraz hialadherynami macierzy pozakomórkowej [wg 71 zmodyfikowano]

może być także „związany” z powierzchnią komórki poprzez transmembranową interakcję z syntazami hialuronianowymi (HAS), choć nieznaną jest udział wspomnianych interakcji w transdukcji sygnału, zachodzącej w przypadku oddziaływań hialuronianu z receptorami (hialadherynami) powierzchni komórek [71]. Syntazy hialuronianowe, scharakteryzowane w ponad 60 lat po odkryciu hialuronianu, bo w drugiej połowie lat dziewięćdziesiątych ub. w., to glikozylotransferazy, katalizujące biosyntezę kwasu hialuronowego, zachodzącą w wewnętrznej powierzchni błony plazmatycznej komórek bakteryjnych i eukariotycznych [2,30,33]. Te przezbłonowe białka enzymatyczne, obejmują u ssaków grupę trzech enzymów (HAS-1, HAS-2 i HAS-3). Zawierają one po dwa enzymatyczne składniki, z których pierwszy katalizuje reakcję transglikozylacji kwasu D-glukuronowego (GlcA), zaś drugi – N-acetylo-D-glukozaaminy (GlcNAc), z właściwych nukleotydowych prekursorów, tj. UDP-GlcA i UDP-GlcNAc, przyłączając naprzemiennie omawiane podjednostki monosacharydowe do redukującego końca wzrastającego łańcucha hialuronianu [2,55,69].

Wzrastający po wewnętrznej, cytoplazmatycznej stronie błony komórkowej, łańcuch HA ulega, od strony nieredukującego końca, translokacji na zewnątrz błony komórkowej, podczas gdy jego synteza jest nadal kontynuowana [58,71]. Ten niezwykle, unikalny mechanizm biosyntezy hialuronianu prowadzi do tworzenia polimerów o „nieograniczonej” niemal długości, a co za tym idzie o ogromnej masie cząsteczkowej, rzędu 10^7 Da, których właściwości leżą u podstaw wielu swoistych, omówionych wcześniej, ich fizjologicznych funkcji w ustroju [67,69]. Ten odmienny od sposobu biosyntezy innych GAG mechanizm sprawia także, iż omawiany biopolimer tworzy okołokomórkową otoczkę, ważną chociażby w aspekcie antyoksydacyjnej funkcji HA, kreując ponadto okołokomórkowe środowisko o pożądanym stopniu uwodnienia [40,71,78]. Schemat biosyntezy hialuronianu przedstawiono na ryc.4.

Odmienne chromosomalne umiejscowienie genów kodujących każdy z trzech izoenzymów HAS, wiąże się ze zróżnicowaną, tkankowo i komórkowo swoistą ekspresją białek



Ryc. 4. Biosynteza hialuronianu na wewnętrznej stronie komórkowej błony plazmatycznej. HA ulega translokacji na zewnątrz błony plazmatycznej, podczas gdy jego łańcuch związany jest nadal z syntazą hialuronianową, katalizującą proces biosyntezy [wg 71 zmodyfikowano]

lek enzymatycznych, zróżnicowanym zapotrzebowaniem na monosacharydowe substraty, z odmiennymi katalitycznymi właściwościami tych izoenzymów i odmienną długością finalnego produktu aktywności enzymatycznej – polimeru HA [26,55,67]. HAS-1 i HAS-3 katalizują biosyntezę polimerów o mniejszej długości łańcucha, a tym samym o mniejszej masie cząsteczkowej, wynoszącej odpowiednio 2×10^5 – 2×10^6 Da, w stosunku do produktów HAS-2, których masa cząsteczkowa osiąga wartość przekraczającą znacznie 2×10^6 Da [69]. Zważywszy, iż cząsteczki hialuronianu o małej masie cząsteczkowej efektywniej aktywują procesy wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnałów – poprzez hialadheryny powierzchni komórek, aniżeli te o większej masie, zróżnicowana ekspresja syntaz hialuronianowych i regulacja enzymatycznej aktywności znajdują istotne konsekwencje w modulowaniu funkcjonowania komórki [67]. Wykazano także, iż poszczególne izoenzymy HAS przejawiają różną szybkość elongacji powstającego biopolimeru. Łańcuchy HA syntetyzowane są najszybciej przez HAS-1, a najwolniej przez HAS-3 [30]. Spośród trzech izoenzymów syntazy hialuronianowej, jedynie brak HAS-2, prowadzący do zaburzeń sercowo-naczyniowych, okazał się letalny dla mysich płodów, podczas gdy delecja genów HAS-1 i HAS-3 nie prowadziła do zaburzeń w rozwoju embrionalnym [26,31,58]. Funkcje HAS nie są jednak w pełni poznane, stanowiąc przedmiot prowadzonych badań [30].

DEGRADACJA HIALURONIANU

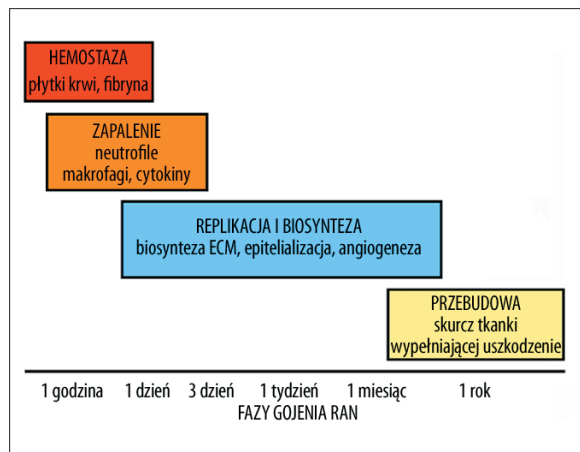
Integralnym elementem metabolizmu kwasu hialuronowego jest jego ustrojowa degradacja. Szybkość katabolizmu HA zależy od rodzaju tkanki [67]. Okres półtrwania tego biopolimeru we krwi wynosi od 2–5 min, poprzez 12 godzin w skórze, do 1–3 tygodni w chrząstce i 70 dni w ciele szklistym oka [67,69,78]. Wykazano, iż każdego dnia, około $1/3$ hialuronianu z ludzkiego ustroju jest usuwana i zastępowana nowo zsintetyzowanymi cząsteczkami [67]. W procesie katabolizmu HA, część tego polimeru ulega degradacji *in situ*, w miejscu jego biosyntezy i występowania w tkance, pozostała część transportowana jest wraz z limfą do węzłów chłonnych i tam degradowana, a nierozłożona w wymienionych strukturach limfatycznych pozostałość HA dociera do krążenia ogólnego, z którego usuwana jest przez komórki śródbłonkowe na-

czyń zatokowych wątroby, a w minimalnym stopniu eliminowana z ustroju przez nerki [17,67]. W przebiegu odbywającej się miejscowo degradacji, eliminacja HA z tkanek zachodzi drogą receptorową, głównie realizowaną za pośrednictwem CD44, endocytozy, nierzadko jednak poprzedzonej pozakomórkową degradacją, katalizowaną pozakomórkowymi hialuronidazami, bądź działaniem reaktywnych form tlenu (RFT) [67]. W komórce, HA degradowany jest w obrębie lizosomów pod wpływem hialuronidazy oraz egzoglikozydaz, takich jak β -glukuronidaza czy heksozaminidaza [8]. W ustroju ludzkim występuje pięć typów hialuronidaz (HYAL) – HYAL 1, HYAL 2, HYAL 3, HYAL 4 i PH 20 [16,26]. HYAL 1, umiejscowiona głównie wewnątrzlizosomalnie, występuje także i w płynach ustrojowych, HYAL 2, umiejscowiona głównie w lizosomach, ulega ekspresji także i na powierzchni komórek, wiążąc się z tą ostatnią poprzez glikozylofosfatydiloinozytol (GPI), HYAL 3 występuje głównie w jądrze i szpiku kostnym, HYAL 4 w łożysku i komórkach mięśni szkieletowych, zaś PH 20 – której przypisuje się rolę w procesie zapłodnienia – związana jest z powierzchnią plemników, poprzez GPI [8,26,35,67]. Na powierzchni błony plemników mysich wykazano ponadto istnienie kolejnego typu hialuronidazy, tj. Hyal 5 [35].

Optimum aktywności hialuronidaz przypada na kwaśny przedział pH, z wyjątkiem izoenzymu PH 20, który wykazuje aktywność także i w pH obojętnym [26]. Fizjologiczne znaczenie obecności Hyal 1 w osoczu krwi i moczu nie jest znane, ze względu na wskazane wcześniej wartości optimum pH dla tego enzymu [67]. Wspomnieć należy także o hialuronidazach pochodzenia bakteryjnego, które odgrywają rolę w rozprzestrzenianiu wspomnianych mikroorganizmów w obrębie pozakomórkowej macierzy [69]. Nie wiadomo jednak, czy produkty tej enzymatycznej, bakteryjnego pochodzenia, degradacji HA, są zdolne do odpowiedzi immunologicznej oraz aktywacji procesów sygnalizacyjnych, tak jak to się dzieje w przypadku drobnocząsteczkowych fragmentów HA, powstałych pod wpływem hialuronidaz ssaków [69]. Zważywszy jednak, iż produktem działania hialuronidaz bakteryjnych są disacharydy, a produktem degradacji HA pod wpływem hialuronidaz ssaków są hekso- i oktasacharydy i, jak wykazano, fragmenty mniejsze niż sześciocukrowe nie generują transdukcji sygnałów, najprawdopodobniej hialuronidazy bakteryjne są pozbawione wspomnianej wyżej aktywności [51,70].

W procesie katabolizmu HA, odbywającego się w węzłach chłonnych, uczestniczy opisany wyżej receptor LYVE-1, którego ekspresja obejmuje wyłącznie powierzchnię komórek śródbłonka limfatycznego, oraz receptor HARE, określane inaczej mianem stabiliny 2, czy FEEL-2, występujący ponadto na powierzchni śródbłonkowych komórek naczyń zatokowych wątroby, śledziony, a także na powierzchni komórek nabłonkowych rogówki, soczewki, brodawek nerkowych, jajowodów oraz komórek mezenchymalnych zastawek serca [23,24,32,67].

Badanie funkcji hialuronianu, które rozpoczęło się wraz z odkryciem tego glikanu w latach trzydziestych ub.w, ewoluujące początkowo dość wolno, nabrało szczególnego tempa w latach dziewięćdziesiątych XX w., kiedy to opisano enzymy syntetyzujące i degradujące HA, a także i całą



Ryc. 5. Fazy gojenia ran [wg 19 zmodyfikowano]

gamę hialadheryn [26,67]. Te ostatnie odkrycia pozwoliły ujawnić ogrom funkcji, jakie ten prosty w swej budowie, węglowodanowy biopolimer, spełnia w ustroju ludzkim odgrywając główną rolę w takich procesach jak rozwój embrionalny, wzrost nowotworów czy gojenie się ran.

HIALURONIAN W NAPRAWIE USZKODZEŃ TKANKOWYCH

Gojenie się ran jest złożonym, biologicznym procesem, polegającym na zastąpieniu uszkodzonej tkanki przez tkankę nowo utworzoną. Proces ten postępuje poprzez kolejne cztery fazy: hemostazy, zapalenia, proliferacji, inaczej replikacji i biosyntezy, oraz fazy przebudowy, inaczej remodelingu [5,19,77]. Przedostatnia z wymienionych – faza proliferacyjna, obejmuje trzy etapy, tj. biosyntezę składników ECM, epitelializację oraz angiogenezę [19].

Wyodrębnienia wspomnianych czterech faz dokonano z powodów praktycznych, zaś sam podział ma arbitralny charakter, bowiem kolejne fazy wzajemnie się „nakładają”, gdyż przed zakończeniem poprzedniej, rozpoczyna się faza następna [44]. Fazy gojenia przedstawiono schematycznie na ryc. 5.

Przywrócenie integralności tkankowej jest wynikiem interakcji komórek, takich jak płytki krwi, neutrofile, monocyty/makrofagi, fibroblasty, komórki śródbłonkowe i keratynocyty, oraz składników pozakomórkowej macierzy, takich jak fibronektyna, glikozoaminoglikany, proteoglikany, trombospodyna, tenascyna, witronektyna czy kolageny [19,43]. Wspomniana interakcja komórek ze składnikami ECM podlega regulacji biochemicznych mediatorów, licznych cytokin i czynników wzrostowych, takich jak pochodne kwasu arachidonowego (prostaglandyny i leukotrieny), interleukiny, interferony, TNF- α , PDGF, HGF, FGF, TGF, czy EGF [22,65]. Pierwsze z wymienionych uczestniczą w kształtowaniu odpowiedzi zapalnej, a kolejne, tj. czynniki wzrostowe uczestniczą w kontroli proliferacji, różnicowania i metabolizmu komórek zaangażowanych w proces gojenia. Te ostatnie mediatory uczestniczą także w regulacji procesów zapalnych, pełnią rolę chemotaktyczną dla neutrofilów, monocytów/makrofagów, fibroblastów i komórek nabłonkowych (keratynocytów), stymulując ponadto angiogenezę i tworzenie ECM [65].

Składniki ECM grają istotną rolę na każdym etapie procesu gojenia. Dotyczy to z jednej strony aspektu strukturalno-biomechanicznego omawianego procesu, bowiem komponenty ECM tworzą „rusztowanie” (prowizoryczną macierz, ziarninę, bliznę) niezbędne w procesie naprawy, zapewniając przy tym strukturalną integralność macierzy podczas każdej fazy gojenia [43]. Z drugiej strony rola składników ECM wiąże się z aspektem czynnościowym procesów gojenia, bowiem wspomniane składniki pełnią także funkcje przekazywania sygnałów w tym dynamicznym, interaktywnym ciągu biologicznych reakcji [15,41]. Wśród wymienionych komponentów ECM, najważniejszym – uczestniczącym aktywnie we wszystkich fazach gojenia – jest kwas hialuronowy, pełniący w przebiegu omawianego procesu funkcje zarówno strukturalno-biomechaniczne jak i regulatorowe [4,14,64]. We wczesnej fazie gojenia – fazie hemostazy, wielkocząsteczkowy HA nagromadza się w łożysku rany, a jego cząsteczki ulegają związaniu z fibryną i fibronektyną, formując tzw. tymczasową macierz, ułatwiającą rekrutację komórek zapalnych (neutrofilów, makrofagów, limfocytów) oraz fibroblastów [14,50,56]. Wraz z nastaniem kolejnej fazy gojenia – fazy zapalenia – uwidoczniają się kolejne funkcje hialuronianu, jakie GAG ten pełni w przebiegu opisywanego procesu.

Omawiany GAG, w postaci fragmentów o małej lub pośredniej masie cząsteczkowej, aktywuje fazę zapalną, nasilając biosyntezę prozapalnych cytokin: TNF- α , IL-1 β czy IL-8, w następstwie interakcji z receptorem CD44 oraz receptorem typu TOLL (TLR4) [4,14]. Stymulowane działaniem TNF- α i IL-1 β komórki śródbłonna naczyń syntetyzują HA, co ułatwia adhezję, aktywowanych działaniem cytokin, limfocytów przejawiających ekspresję receptora CD44 [4]. Jednak kwas hialuronowy może pełnić funkcję moderatora fazy zapalnej w następstwie wychwytu wolnych rodników oraz interakcji z hialadheryną – TSG-6 i inhibitorem proteazy surowiczej – I α I [4,9]. Interakcje hialuronianu z kompleksem TSG-6/I α I przyczyniają się do redukcji odpowiedzi zapalnej, po czym do stabilizacji ziarniny, powstającej w kolejnej fazie procesu gojenia, tj. fazy proliferacyjnej. W omawianym etapie gojenia, HA stymuluje nie tylko „odrywanie” fibroblastów od macierzy, lecz także bezpośrednio pobudza mitozę [4].

Macierz wczesnej ziarniny (do trzeciego dnia od uszkodzenia) zawiera duże ilości kwasu hialuronowego i fibronektyny. Cząsteczki HA, cechujące się zdolnością do silnego pęcznienia, tworzą utkanie ułatwiające napływającym komórkom penetrację miejsca rany [38]. Migracja komórek w prowizorycznej macierzy wypełniającej miejsce uszkodzenia, jest pobudzana przez hialuronian, w następstwie interakcji GAG z hialadherynami – CD44 oraz RHAMM [4]. Omawiany glikan wpływa ponadto na biosyntezę kolagenów w macierzy wypełniającej miejsce uszkodzenia [52]. Wykazano, iż natywne hialuronian, w postaci wielkocząsteczkowej, pobudza ekspresję kolagenu typu III podczas gojenia płodowego, a u osób dorosłych, we wczesnych etapach naprawy uszkodzeń tkankowych [9]. Natomiast, drobnocząsteczkowe fragmenty kwasu hialuronowego, utworzone np. z 12 jednostek disacharydowych, nasilają ekspresję kolagenu typu I – dominującego kolagenu skóry osób dorosłych, którego akumulacja nasilona jest w przebiegu procesów bliznowacenia czy procesów włóknienia [9].

W toku kolejnego etapu fazy proliferacyjnej – epitelializacji hialuronian, przez interakcję z receptorami CD44 i RHAMM, stymuluje migrację i proliferację keratynocytów. Zjawiska te są kluczowe zarówno w tworzeniu „prawidłowego” naskórka, jak i w jego „naprawie” [4,52].

Kwas hialuronowy odgrywa także istotną rolę w kolejnym etapie fazy proliferacyjnej – angiogenezie [4,52]. Wykazano, iż natywne o dużej masie cząsteczkowej, łańcuchy HA, przejawiają działanie antyangiogenne [4,9,64]. Natomiast, drobnocząsteczkowe fragmenty HA, takie jak 8-16 disacharydowe oligomery GAG stymulują powstawanie nowych naczyń krwionośnych [32]. Wspomniane fragmenty hialuronianu stymulują komórki śródbłonkowe w następstwie wiązania z hialadheryną ICAM-1 [4].

W ostatniej fazie procesu gojenia – fazie remodelingu, podczas której dochodzi do obkurczania się powierzchni rany oraz dojrzewania ziarniny do postaci blizny, hialuronian odgrywa także znaczącą rolę [5,28,37,62]. Drobnocząsteczkowe bowiem fragmenty HA stymulują ekspresję TGF- β 1 i - β 2, które to w istotny sposób promują tworzenie blizny [9]. Wielkocząsteczkowy hialuronian nasila natomiast ekspresję TGF- β 3 – czynnika wzrostowego znacząco redukującego proces bliznowacenia [9]. Wykazano, iż zawartość TGF- β 3 jest znacznie większa aniżeli TGF- β 1 czy - β 2 w macierzy – w przebiegu gojenia płodowego [9]. Naprawa uszkodzeń tkankowych, charakterystyczna dla płodowego okresu życia, cechuje się ponadto umiarkowanym nasileniem stanu zapalnego, jak i mniej nasilonym odkładaniem kolagenów, przy znacząco wyższej zawartości hialuronianu w łożysku rany w porównaniu ze zjawiskami występującymi w okresie pozapłodowym.

Jak wykazały badania doświadczalne zawartość HA w łożysku gojącej się rany ulega zmianom, w miarę progresji procesów naprawczych [1,63]. Stwierdzono, iż GAG ten jest dominującym glikanem tkanki ziarninującej, po czym w kolejnych etapach gojenia jego zawartość stopniowo się obniża osiągając *plateau* w końcowej fazie omawianego procesu [1,63].

Podobną tendencję zmian zawartości HA opisano w gojących się ranach ludzkiej skóry [14]. Z przytoczonymi wynikami korelują dane uzyskane przez nas w trakcie oceny wpływu wybranych leków na zawartość HA w przebiegu leczenia doświadczalnych ran oparzeniowych skóry świni rasy białej zwisłouchej. Zastosowanymi w eksperymencie lekami były sól srebrna sulfadiazyny (SSD) – stosowana powszechnie w miejscowym leczeniu oparzeń oraz preparat propolisowy – Propol T. Przeprowadzone przez nas badania wykazały, iż w przebiegu gojenia się oparzeń dochodzi w łożysku rany do wzrostu zawartości HA, a następnie do obniżenia i stabilizacji zawartości tego glikanu. Propol T wykazywał przy tym większą skuteczność, aniżeli SSD w pobudzaniu przemian hialuronianu – fundamentalnego składnika ECM, niezbędnego w procesie gojenia. Potwierdzeniem biochemicznej oceny skuteczności działania Propolu T były wyniki oceny klinicznej i histopatologicznej [48], jak i mikrobiologicznej [47].

Jak wynika z badań Weindla i wsp., w procesie gojenia ran wykorzystywane są także zmodyfikowane postacie

HA [78]. Koniugaty zmodyfikowanego chemicznie HA z atelo-kolagenem, są używane do wytwarzania allogeicznych substytutów skóry, pozwalających na skuteczną terapię ran oparzeniowych [39]. Duże nadzieje wiąże się ponadto z zastosowaniem opatrunków hialuronianowych, impregnowanych insulinopodobnym czynnikiem wzrostowym, celem przyspieszenia gojenia błony śluzowej zatok i przeciwdziałania pooperacyjnej adhezji po endoskopowym zabiegu chirurgicznym [54].

Upośledzone gojenie ran i/lub bliznowacenie, prowadzi do poważnych problemów klinicznych, związanych z zaburzeniem struktury i funkcji narządów dotkniętych uszkodzeniem, a także do pogorszenia jakości życia. Dlatego też, wszelkie działania prowadzące do skuteczniejszego leczenia ran – w tym ran pooparzeniowych, są cennym działaniem, mogącym przynieść ogromne korzyści, przede wszystkim chorym [42].

PIŚMIENICTWO

- [1] Bentley J.P.: Rate of chondroitin sulfate formation in wound healing. *Ann. Surg.*, 1967; 165: 186–191
- [2] Bodevin-Authelet S., Kusche-Gullberg M., Pummill P.E., DeAngelis P.L., Lindahl U.: Biosynthesis of hyaluronan: direction of chain elongation. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 8813–8818
- [3] Brown M.B., Jones S.A.: Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 2005; 19: 308–318
- [4] Chen W.Y., Abatangelo G.: Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair Regen.*, 1999; 7: 79–89
- [5] Chin G.A., Diegelmann R.F., Schultz G.S.: Cellular and molecular regulation of wound healing. W: *Wound healing*. red.: A.F. Falabella, R.S. Kirsner. Taylor & Francis Group, Boca Raton, London 2005, 17–37
- [6] Chung J.Y., Herbert M.E.: Myth: silver sulfadiazine is the best treatment for minor burns. *West. J. Med.*, 2001; 175: 205–206
- [7] Costagliola M., Agrosi M.: Second-degree burns: a comparative, multicenter, randomized trial of hyaluronic acid plus silver sulfadiazine vs. silver sulfadiazine alone. *Curr. Med. Res. Opin.*, 2005; 21: 1235–1240
- [8] D'Amico S.: Hyaluronidase 2 and the receptor for hyaluronic acid mediated motility (RHAMM); potential roles in keratinocyte differentiation involving hyaluronan. <http://www.lost-tranquility.com/Qualifyingexample2.pdf> (23.04.2008)
- [9] David-Raoudi M., Tranchepain F., Deschrevel B., Vincent J.C., Bogdanowicz P., Boumediene K., Pujol J.P.: Differential effects of hyaluronan and its fragments on fibroblasts: relation to wound healing. *Wound Repair Regen.*, 2008; 16: 274–287
- [10] Day A.J., de la Motte C.A.: Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation? *Trends Immunol.*, 2005; 26: 637–643
- [11] Day A.J., Prestwich G.D.: Hyaluronan-binding proteins: tying up the giant. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 4585–4588
- [12] DeAngelis P.L.: Evolution of glycosaminoglycans and their glycosyltransferases: implications for the extracellular matrices of animals and the capsules of pathogenic bacteria. *Anat. Rec.*, 2002; 268: 317–326
- [13] DeAngelis P.L., White C.L.: Identification and molecular cloning of a heparosan synthase from *Pasteurella multocida* type B. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 7209–7213
- [14] Dechert T.A., Ducale A.E., Ward S.I., Yager D.R.: Hyaluronan in human acute and chronic dermal wounds. *Wound Repair Regen.*, 2006; 14: 252–258
- [15] Dylewski M.L., Yu Y.M.: Protein and wound healing. W: *Nutrition and wound healing*. red.: J. Molnar. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London 2007, 49–63
- [16] Fischer J.W., Schrör K.: Regulation of hyaluronan synthesis by vasodilatory prostaglandins. Implications for atherosclerosis. *Thromb. Haemost.*, 2007; 98: 287–295
- [17] Fraser J.R., Laurent T.C., Laurent U.B.: Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J. Intern. Med.*, 1997; 242: 27–33
- [18] Fujii T., Sun Y.L., An K.N., Luo Z.P.: Mechanical properties of single hyaluronan molecules. *J. Biomech.*, 2002; 35: 527–531
- [19] Garner W., Nabavian R.: Normal wound healing. W: *Reconstruction and rehabilitation*. red.: R. Sood, B.M. Aucher. Saunders Elsevier, China 2006, 17–26
- [20] Girish K.S., Kemparaju K.: The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci.*, 2007; 80: 1921–1943
- [21] Gregory S.R., Piccolo N., Piccolo M.T., Piccolo M.S., Heggors J.P.: Comparison of propolis skin cream to silver sulfadiazine: a naturopathic alternative to antibiotics in treatment of minor burns. *J. Altern. Complement. Med.*, 2002; 8: 77–83
- [22] Hantash B.M., Zhao L., Knowles J.A., Lorenz H.P.: Adult and fetal wound healing. *Front. Biosci.*, 2008; 13: 51–61
- [23] Harris E.N., Kyosseva S.V., Weigel J.A., Weigel P.H.: Expression, processing, and glycosaminoglycan binding activity of the recombinant human 315-kDa hyaluronic acid receptor for endocytosis (HARE). *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 2785–2797
- [24] Harris E.N., Weigel J.A., Weigel P.H.: The human hyaluronan receptor for endocytosis (HARE/Stabilin-2) is a systemic clearance receptor for heparin. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 17341–17350
- [25] Hascall V.C., Majors A.K., De La Motte C.A., Evanko S.P., Wang A., Drazba J.A., Strong S.A., Wight T.N.: Intracellular hyaluronan: a new frontier for inflammation? *Biochim. Biophys. Acta*, 2004; 1673: 3–12
- [26] Heldin P.: Importance of hyaluronan biosynthesis and degradation in cell differentiation and tumor formation. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2003; 36: 967–973
- [27] Hoekstra M.J., Hupkens P., Dutrieux R.P., Bosch M.M., Brans T.A., Kreis R.W.: A comparative burn wound model in the New Yorkshire pig for the histopathological evaluation of local therapeutic regimens: silver sulfadiazine cream as a standard. *Brit. J. Plast. Surg.*, 1993; 46: 585–589
- [28] Hoffman M., Harger A., Lenkowski A., Hedner U., Roberts H.R., Monroe D.M.: Cutaneous wound healing is impaired in hemophilia B. *Blood*, 2006; 108: 3053–3060
- [29] Itano N., Atsumi F., Sawai T., Yamada Y., Miyaishi O., Senga T., Hamaguchi M., Kimata K.: Abnormal accumulation of hyaluronan matrix diminishes contact inhibition of cell growth and promotes cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 3609–3614
- [30] Jameson J.M., Cauvi G., Sharp L.L., Witherden D.A., Havran W.L.: $\gamma\delta$ T cell-induced hyaluronan production by epithelial cells regulates inflammation. *J. Exp. Med.*, 2005; 201: 1269–1279
- [31] Jiang D., Hodge J., Liang J., Noble P.W.: Innate immune regulation of lung injury and repair. W: *Tissue repair, contraction and the myofibroblast*. red.: C. Chaponnier, A. Desmoulière, G. Gabbiani. Springer Science+Business Media, LLC, New York 2006, 110–117
- [32] Jiang D., Liang J., Noble P.W.: Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2007; 23: 435–461
- [33] Kakizaki I., Kojima K., Takagaki K., Endo M., Kannagi R., Ito M., Maruo Y., Sato H., Yasuda T., Mita S., Kimata K., Itano N.: A novel mechanism for the inhibition of hyaluronan biosynthesis by 4-methylumbelliferone. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 33281–33289
- [34] Kikuchi S., Griffin C.T., Wang S.S., Bissell D.M.: Role of CD44 in epithelial wound repair: migration of rat hepatic stellate cells utilizes hyaluronic acid and CD44v6. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 15398–15404
- [35] Kim E., Baba D., Kimura M., Yamashita M., Kashiwabara S., Baba T.: Identification of a hyaluronidase, Hyal 5, involved in penetration of mouse sperm through cumulus mass. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 18028–18033
- [36] Knudson C.B., Knudson W.: Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis, and disease. *FASEB J.*, 1993; 7: 1233–1241
- [37] Koivukangas V.: Wound healing in a suction blister model. Academic dissertation, Faculty of Medicine, University of Oulu, Oulu 2004; <http://herkules.oulu.fi/isbn9514275810/isbn9514275810.pdf> (05.07.2008)
- [38] Koźma E.M., Olczyk K., Głowacki A., Korbut R.: Naprawa uszkodzeń tkankowych. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 1998; 52: 173–185
- [39] Kubo K., Kuroyanagi Y.: Development of a cultured dermal substitute composed of a spongy matrix of hyaluronic acid and atelo-collagen combined with fibroblasts: cryopreservation. *Artif. Organs*, 2004; 28: 182–188

- [40] Laurent T.C., Laurent U.B., Fraser J.R.: Serum hyaluronan as a disease marker. *Ann. Med.*, 1996; 28: 241–253
- [41] Li J., Kirsner R.S.: Extracellular matrix and wound healing. W: *Wound healing*, red.: A.F. Falabella, R.S. Kirsner. Taylor & Francis Group, Boca Raton, London 2005, 39–48
- [42] Mack J.A., Abramson S.R., Ben Y., Coffin J.C., Rothrock J.K., Maytin E.V., Hascall V.C., Largman C., Stelnicki E.J.: Hoxb13 knockout adult skin exhibits high levels of hyaluronan and enhanced wound healing. *FASEB J.*, 2003; 17: 1352–1354
- [43] Midwood K.S., Williams L.V., Schwarzbauer J.E.: Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2004; 36: 1031–1037
- [44] Molnar J.A.: Overview of nutrition and wound healing. W: *Nutrition and wound healing*, red.: J. Molnar. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London 2007, 1–14
- [45] Nedvezki S., Gonen E., Assayag N., Reich R., Williams R.O., Thurmond R.L., Huang J.F., Neudecker B.A., Wang F.S., Turley E.A., Naor D.: RHAMM, a receptor for hyaluronan-mediated motility, compensates for CD44 in inflamed CD44-knockout mice: a different interpretation of redundancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 18081–18086
- [46] Oishi Y., Kato H., Noguchi T.: Dietary protein as a potent regulator of the hyaluronan synthase gene in rat skin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2003; 67: 736–742
- [47] Olczyk P., Wojtyczka R., Stojko J., Komosińska-Vashev K., Winsz-Szczotka K., Kuźnik-Trocha K., Koźma E., Olczyk K.: Porównanie przeciwbakteryjnej aktywności soli srebrowej sulfadiazyny i maści propolisowej w gojeniu doświadczalnych ran oparzeniowych. *Farm. Przegl. Nauk.*, 2007; 4: 36–43
- [48] Olczyk P., Wróblewska-Adamek I., Stojko J., Komosińska-Vashev K., Olczyk K.: Histopatologiczna ocena skuteczności Propolu-T oraz soli srebrowej sulfadiazyny w leczeniu oparzeń. *Farm. Pol.*, 2007; 63: 1108–1116
- [49] Pasonen-Seppänen S., Karvinen S., Törrönen K., Hyttinen J.M., Jokela T., Lammi M.J., Tammi M.I., Tammi R.: EGF upregulates, whereas TGF- β downregulates, the hyaluronan synthases Has2 and Has3 in organotypic keratinocyte cultures: correlations with epidermal proliferation and differentiation. *J. Invest. Dermatol.*, 2003; 120: 1038–1044
- [50] Pogrel M.A., Pham H.D., Guntenhöner M., Stem R.: Profile of hyaluronidase activity distinguishes carbon dioxide laser from scalpel wound healing. *Ann. Surg.*, 1993; 217: 196–200
- [51] Powell J.D., Horton M.R.: Threat matrix: low-molecular-weight hyaluronan (HA) as a danger signal. *Immunol. Res.*, 2005; 31: 207–218
- [52] Price R.D., Berry M.G., Navsaria H.A.: Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.*, 2007; 60: 1110–1119
- [53] Prince C.W.: Roles of hyaluronan in bone resorption. *BMC Musculoskelet. Disord.*, 2004; 5: 12
- [54] Rajapaksa S., McIntosh D., Cowin A., Adams D., Wormald P.J.: The effect of insulin-like growth factor I incorporated into a hyaluronic acid-based nasal pack on nasal mucosal healing in a healthy sheep model and a sheep model of chronic sinusitis. *Am. J. Rhinol.*, 2005; 19: 251–256
- [55] Rees S.G., Curtis C.L., Dent C.M., Caterson B.: Catabolism of aggrecan proteoglycan aggregate components in short-term explant cultures of tendon. *Matrix Biol.*, 2005; 24: 219–231
- [56] Riessen R., Wight T.N., Pastore C., Henley C., Isner J.M.: Distribution of hyaluronan during extracellular matrix remodeling in human restenotic arteries and balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation*, 1996; 93: 1141–1147
- [57] Rigden D.J., Botzki A., Nukui M., Mewbourne R.B., Lamani E., Braun S., von Angerer E., Bernhardt G., Dove S., Buschauer A., Jedrzejak M.J.: Design of new benzoxazole-2-thione-derived inhibitors of *Streptococcus pneumoniae* hyaluronan lyase: structure of a complex with a 2-phenylindole. *Glycobiology*, 2006; 16: 757–765
- [58] Rilla K., Lammi M.J., Sironen R., Törrönen K., Luukkainen M., Hascall V.C., Midura R.J., Hyttinen M., Pelkonen J., Tammi M., Tammi R.: Changed lamellipodial extension, adhesion plaques and migration in epidermal keratinocytes containing constitutively expressed sense and antisense hyaluronan synthase 2 (Has2) genes. *J. Cell. Sci.*, 2002; 115: 3633–3643
- [59] Sayo T., Sakai S., Inoue S.: Synergistic effect of N-acetylglucosamine and retinoids on hyaluronan production in human keratinocytes. *Skin Pharmacol. Physiol.*, 2004; 17: 77–83
- [60] Scheibner K.A., Lutz M.A., Boodoo S., Fenton M.J., Powell J.D., Horton M.R.: Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J. Immunol.*, 2006; 177: 1272–1281
- [61] Scott J.E.: Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution. Some biological consequences. <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html> (10.04.2008)
- [62] Sethi K.K., Yannas I.V., Mudera V., Eastwood M., McFarland C., Brown R.A.: Evidence for sequential utilization of fibronectin, vitronectin, and collagen during fibroblast-mediated collagen contraction. *Wound Repair Regen.*, 2002; 10: 397–408
- [63] Siméon A., Wegrowski Y., Bontemps Y., Maquart F.X.: Expression of glycosaminoglycans and small proteoglycans in wounds: modulation by the tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu²⁺. *J. Invest. Dermatol.*, 2000; 115: 962–968
- [64] Slevin M., Kumar S., Gaffney J.: Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce multiple signaling pathways affecting vascular endothelial cell mitogenic and wound healing responses. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 41046–41059
- [65] Sommer C.V.: Inflammation, tissue repair, and fever. W: *Essentials of pathophysiology*, red.: C.M. Porth. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2007, 269–292
- [66] Studelska D.R., Giljum K., McDowell L.M., Zhang L.: Quantification of glycosaminoglycans by reversed-phase HPLC separation of fluorescent isoindole derivatives. *Glycobiology*, 2006; 16: 65–72
- [67] Tammi M.I., Day A.J., Turley E.A.: Hyaluronan and homeostasis. a balancing act. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 4581–4584
- [68] Tammi R., MacCallum D., Hascall V.C., Pienimäki J.P., Hyttinen M., Tammi M.: Hyaluronan bound to CD44 on keratinocytes is displaced by hyaluronan decasaccharides and not hexasaccharides. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 28878–28888
- [69] Taylor K.R., Gallo R.L.: Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J.*, 2006; 20: 9–22
- [70] Taylor K.R., Trowbridge J.M., Rudisill J.A., Termeer C.C., Simon J.C., Gallo R.L.: Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 17079–17084
- [71] Toole B.P.: Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nature Rev. Cancer*, 2004; 4: 528–539
- [72] Toole B.P., Slomiany M.G.: Hyaluronan, CD44 and Emmprin: partners in cancer cell chemoresistance. *Drug Resist. Updat.*, 2008; 11: 110–121
- [73] Turino G.M., Cantor J.O.: Hyaluronan in respiratory injury and repair. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2003; 167: 1169–1175
- [74] Volpi N.: Therapeutic applications of glycosaminoglycans. *Curr. Med. Chem.*, 2006; 13: 1799–1810
- [75] Vranckx J.J., Yao F., Petrie N., Augustinova H., Hoeller D., Visovatti S., Slama J., Eriksson E.: *In vivo* gene delivery of Ad-VEGF121 to full-thickness wounds in aged pigs results in high levels of VEGF expression but not in accelerated healing. *Wound Repair Regen.*, 2005; 13: 51–60
- [76] Waller J.M., Maibach H.I.: Age and skin structure and function, a quantitative approach (II): protein, glycosaminoglycan, water, and lipid content and structure. *Skin Res. Technol.*, 2006; 12: 145–154
- [77] Watson T.: Soft tissue wound healing. Review. <http://www.electrotherapy.org/downloads/Modalities/tissue%20repair.pdf> (12.04.2008)
- [78] Weindl G., Schaller M., Schäfer-Korting M., Korting H.C.: Hyaluronic acid in the treatment and prevention of skin diseases: molecular, biological, pharmaceutical and clinical aspects. *Skin Pharmacol. Physiol.*, 2004; 17: 207–213