

Kwas hialuronowy – charakterystyka, otrzymywanie i zastosowanie

Danuta Czajkowska,* Małgorzata Milner-Krawczyk, Marta Kazanecka

Wydział Chemiczny, Instytut Biotechnologii, Zakład Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych, Politechnika Warszawska, 00-664 Warszawa

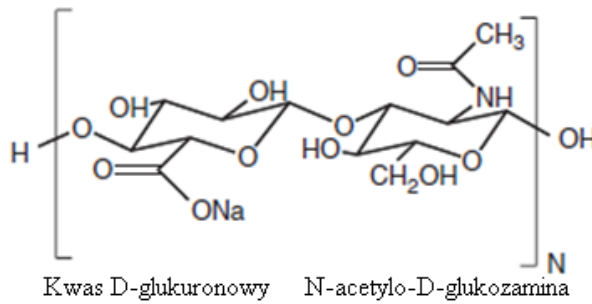
*dczajkowska@ch.pw.edu.pl

***Streszczenie:** W pracy przedstawiono przegląd danych literaturowych dotyczących budowy i właściwości kwasu hialuronowego (HA). Wskazano miejsca występowania tego związku w organizmie człowieka oraz pełnione przez niego funkcje. Omówiono sposoby otrzymywania związku z materiału zwierzęcego oraz przy wykorzystaniu procesów biotechnologicznych. Wskazano cechy dodatnie i ujemne preparatów otrzymanych dwoma ww. sposobami. W części artykułu dotyczącej wytwarzania kwasu przez bakterie zwrócono szczególną uwagę na modyfikacje genomu bakterii fermentacji mlekowej oraz szczepów *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis*, pod kątem poprawy produktywności kwasu. Polegały one na wprowadzeniu genów kodujących enzymy: syntazę hialuronową, UDP-glukozo-dehydrogenazę oraz UDP-glukozo-pirofosforylazę. Przedstawiono metody i warunki hodowli bakterii oraz uzyskiwane wydajności HA. Omówiono również możliwości zastosowania związku oraz jego pochodnych w leczeniu różnego typu schorzeń, w diagnostyce medycznej, w medycynie estetycznej i kosmetyce oraz w farmacji przy otrzymywaniu docelowych leków powoli uwalniających substancje aktywne.*

***Słowa kluczowe:** kwas hialuronowy, właściwości, funkcja, zastosowanie*

Budowa i charakterystyka kwasu hialuronowego

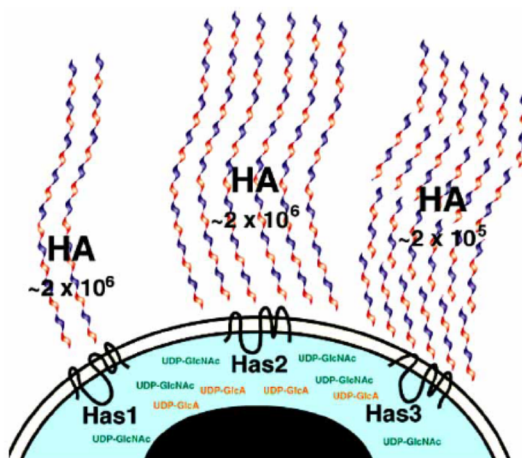
Kwas hialuronowy (HA) należy do grupy związków określanych terminem glikozaminoglikany (GAG). Są to polisacharydy, zbudowane z wielu powtarzających się jednostek disacharydów. Częsteczką disacharydu HA składa się z cząsteczki kwasu D-glukuronowego i cząsteczki N-acetyloglukozaminy połączonych naprzemiennie wiązaniami β -(1-4) i β -(1-3) glikozydowymi (rysunek 1). Kwas hialuronowy jest naturalnym związkiem, mającym taką samą budowę chemiczną zarówno u człowieka, jak i u innych kręgowców oraz bakterii. W organizmach żywych występuje zazwyczaj w postaci soli sodowej – hialuronianu sodu [1, 2].



Rysunek 1. Budowa disacharydu kwasu hialuronowego [2]

Kwas hialuronowy wykazuje wiele właściwości, które mają istotne znaczenie w licznych zastosowaniach. Jedną z nich jest zdolność wiązania dużych ilości wody [1]. Jest to możliwe dzięki anionowej budowie kwasu, której efektem jest przyciąganie różnorodnych kationów, np. Ca^{2+} . Związek charakteryzuje się wysoką aktywnością osmotyczną, a ta z kolei umożliwia przyciąganie znacznych ilości wody na drodze osmozy. Dla przykładu, kiedy stężenie kwasu hialuronowego w roztworze osiągnie poziom 0,1 mg/ml, jedna cząsteczka kwasu jest w stanie związać nawet 1 litr płynu. Nie uwzględniając ograniczeń przestrzennych, spowodowałoby to 1000-krotne powiększenie jej objętości. W naturalnym środowisku, jakim jest macierz zewnątrzkomórkowa, takie pęczniejące cząstki kwasu napierają na zewnątrz, wywołując ciśnienie turgorowe, które wzrasta proporcjonalnie do ilości pobranej wody. Ponadto HA ma interesujące właściwości lepkosprężyste, wynikające z jego polimerowego charakteru. Cecha kwasu hialuronowego określana terminem „biozgodność” wynika z tego, że naturalnie występuje on w skórze, więc w bardzo niskim stopniu wywołuje niekorzystne reakcje organizmu. Może być całkowicie wchłaniany przez organizm, co jest niewątpliwą zaletą podczas stosowania go jako implantu w medycynie kosmetycznej.

Kwas hialuronowy w organizmach zwierzęcych jest syntetyzowany w błonie komórkowej. W procesie tym bierze udział syntaza hialuronianowa usytuowana po wewnętrznej stronie błony. Uczestniczy ona w naprzemiennym łączeniu reszt kwasu glukuronowego i N-acetyloglukozaminy [3]. Nowo zsyntetyzowany polimer jest transportowany do przestrzeni pozakomórkowej. Syntaza hialuronianowa charakteryzuje się wysoką aktywnością. Jest ona w stanie spolimeryzować około 100 cząsteczek monosacharydów na sekundę w warunkach *in vitro*. U ssaków stwierdzono występowanie trzech syntaz hialuronowych: Has 1, Has 2 i Has 3. Pierwsza z nich katalizuje polimeryzację małych ilości HA o masie cząsteczkowej 2×10^6 Da; druga większych ilości tego kwasu o tej samej wielkości cząstek, natomiast trzecia, najaktywniejsza, polimeryzuje duże ilości HA o wielkości cząstek do 2×10^5 Da – rysunek 2 [3, 4].



Rysunek 2. Kwas hialuronowy syntetyzowany przez syntazy hialuronowe występujące u ssaków Has1, Has2, Has3 [4]

Występowanie i funkcje kwasu hialuronowego w organizmie ludzkim

Szacuje się, że u dorosłego człowieka o masie ciała 70 kg, znajduje się około 15 g HA w postaci hialuronianu sodu [4]. Początkowo uważano, że HA jest jedynie wypełniaczem tkanki łącznej. Późniejsze badania, ujawniły jednak, że może być on połączony z komórkami za pomocą receptorów znajdujących się na ich powierzchni i pośredniczyć w wielu ważnych procesach fizjologicznych.

Największa ilość kwasu hialuronowego znajduje się w macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) tkanek łącznych. Występuje on w jednym z komponentów ECM, we frakcji proteoglikanów. Niemalże połowa kwasu hialuronowego znajdującego się w ciele człowieka występuje w skórze, a większość jego jest odnajdywana w przestrzeni międzykomórkowej. Szacuje się, że w ludzkiej skórze właściwej jest 200-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HA, a w naskórku 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Kwas hialuronowy, poza pełnieniem funkcji macierzy, w której są zatopione komórki, odgrywa rolę związku wiążącego wodę, wpływając na objętość i ściśliwość skóry. Może on zwiększać oporność tkanki na stres mechaniczny poprzez wiązanie i zatrzymywanie wody w przestrzeniach międzykomórkowych. Odgrywa także rolę w wyłapywaniu wolnych rodników, powstających na skutek promieniowania ultrafioletowego [5, 6].

Kolejnym miejscem występowania kwasu hialuronowego w organizmie ludzkim jest chrząstka [5]. Związek ten występuje tu jako ważny strukturalnie element macierzy, której sieć kolagenowa wypełniona jest proteoglikanami z HA. Kwas hialuronowy bierze również udział w chondrogeniezie. Niewielkie fragmenty tego związku indukują aktywację czynników transkrypcyjnych w chondrocytach.

Kwas hialuronowy odgrywa ponadto istotną rolę w mazi stawowej [5, 6]. W płynie stawowym torebki stawowej, występuje znaczna ilość HA (1400-

3600 $\mu\text{g/ml}$) o dużej masie cząsteczkowej. Występuje on w formie niezwiązanej z białkami. Zapewnia on niezbędne nawilżenie stawów. Służy jako amortyzator, redukujący tarcie między poruszającymi się kośćmi, przez co zmniejsza się zużywanie się stawów.

Kwas hialuronowy występuje również w ciałku szklistym oka [7]. Substancja żelowa znajdująca się w tym organie, jest wyspecjalizowanym typem wysoce uwodnionej zewnątrzkomórkowej macierzy. Składa się ona ze wzajemnie powiązanych sieci glikozaminoglikanów i włókien kolagenowych. Zawartość glikozaminoglikanów (a wśród nich kwasu hialuronowego), a także ich konformacja, są odpowiedzialne za odpowiednią strukturę i funkcje ciałka szklistego. Stężenie kwasu hialuronowego w ciałku szklistym wynosi około 190-320 $\mu\text{g/ml}$, z czego 45-77% to HA o dużej masie cząsteczkowej, większej niż 1000 kDa. Właśnie ten rodzaj polimeru zapewnia lepkość sprężystość, cechę niezbędną w ciałku szklistym. Kwas hialuronowy współtworzy także film łzowy [7].

Omawiany związek odgrywa istotną rolę w biomechanicznych właściwościach strun głosowych [8]. Wpływa on na lepkość, przepływ tkankowy, osmozę, amortyzację wstrząsów oraz gojenie się ran w tym organie. Jest to szczególnie ważne w przypadku strun, które są nieustannie narażone na urazy spowodowane wibracjami. Istotne znaczenie kwasu hialuronowego we właściwym funkcjonowaniu strun głosowych zostało udowodnione w doświadczeniach Chana i in. [9]. Naukowcy oceniali próbki strun głosowych, w których z zewnątrzkomórkowej macierzy usuwano hialuronian sodu za pomocą enzymu hialuronidazy. Brak HA powodował spadek elastyczności tkanek, sztywność oraz znaczny wzrost lepkości (o 70%). W efekcie powodowało to niewłaściwe działanie strun głosowych. Powyższe badania potwierdziły skuteczność stosowania kwasu hialuronowego jako chirurgicznego implantu strun głosowych.

Kwas hialuronowy występuje także w nerkach. Duże ilości HA stwierdzono w wewnętrznej części rdzenia, w tzw. brodawce nerkowej, natomiast bardzo niewielkie stężenie w korze [1]. Ta różnica ma istotne znaczenie w wytwarzaniu bardziej lub mniej stężonego moczu. Kwas hialuronowy wpływa na homeostazę, dystrybucję i przepływ wody oraz wspólnie z wazopresyną reguluje reabsorpcję wody do rdzenia nerkowego.

Wysoką zawartość kwasu hialuronowego o dużej masie cząsteczkowej odnotowano także w tkance łącznej pępowiny ludzkiej (4100 $\mu\text{g/ml}$). Zapobiega on zerwaniu się połączenia pomiędzy matką a płodem [5]. Związek ten jest również obecny w mózgu, a także w moczu i surowicy krwi [5].

Badania Volpi i in. [4] wskazały na udział HA w wielu procesach związanych z owulacją i zapłodnieniem. Występujący w dużych ilościach kwas hialuronowy tworzy elastyczną, gąbczastą i odkształcalną macierz, która ułatwia uwalnianie oocytu podczas owulacji. Po owulacji, komórki pęcherzyka jajnikowego otaczającego oocyt pozostają osadzone w sieci kwasu hialuronowego. Zaobserwowano także związek pomiędzy zdolnością plemników do penetracji roztworu o dużej lepkości wynikającej z obecności HA a ruchliwością plemników i efektywnością

zapłodnienia. Itano [10] wskazał także na istotną rolę kwasu hialuronowego w rozwoju embrionalnym człowieka.

Stern i in. [11] stwierdzili, że funkcje biologiczne kwasu w organizmie ludzkim zależą od wielkości cząsteczek polimeru. Fragmenty kwasu o dużej masie cząsteczkowej wykazują działanie immunosupresyjne i przeciwzapalne. Hamują również fagocytozę, wpływają na integralność tkanek, chroniąc je przed uszkodzeniami i apoptozą. Taki rodzaj kwasu hialuronowego uczestniczy także w procesach owulacji, zapłodnieniu i embriogenezie. Podczas procesów zapalnych powstaje nadzwyczajna forma wielkocząsteczkowego kwasu, silnie usieciowana, tworząca kompleksy z licznymi włóknami w miejscach zapalnych [12]. W ten sposób tworzy się tarcza ochronna i zapewniona jest niepodzielność tkanek w pobliżu miejsca zapalnego. W samym miejscu zapalnym wielkocząsteczkowe łańcuchy kwasu hialuronowego zostają zdegradowane do mniejszych (wielkości 4-6 sacharydów) przez działanie reaktywnych form tlenu i hialuronidazy. Drobnocząsteczkowe fragmenty kwasu mogą przyłączać się do receptorów komórek odpornościowych, aktywując je i wpływając na szereg procesów, takich jak indukcja ekspresji cytokiny. Kwas hialuronowy o dużej masie molowej gromadzi się także w pobliżu uszkodzeń w układzie nerwowym. Jest to obserwowane szczególnie w przypadku stwardnienia rozsianego [11]. Polimery o średniej wielkości, złożone z 25-50 disacharydów, wykazują działanie przeciwzapalne, stymulują procesy immunologiczne i naczyniotwórcze [5]. Oligosacharydy mniejsze od ww. są antyapoptotyczne i mają związek z białkami szoku termicznego [13].

Zaobserwowano zależność pomiędzy agresywnością nowotworów a zawartością kwasu hialuronowego w tkankach położonych w ich pobliżu [6]. Stwierdzono, że w przypadku występowania nowotworu złośliwego, w tkankach położonych w pobliżu guza obserwuje się nadmierną produkcję kwasu hialuronowego o niewielkich masach cząsteczkowych. Zwiększa się również jego stężenie w surowicy krwi. HA jest wypełniaczem przestrzeni, ale może również otwierać drogę dla komórek nowotworowych, co ma związek z przerzutami, np. raka piersi czy jelita grubego. Kwas hialuronowy oddziałuje z powierzchniowymi receptorami komórek rakowych, zwiększając ich przeżywalność i inwazyjność.

Zastosowanie kwasu hialuronowego i jego pochodnych

Kwas hialuronowy jest wykorzystywany w medycynie, farmacji, w chirurgii plastycznej i w kosmetyce. Jednym z głównych zastosowań kwasu hialuronowego jest jego użycie w chirurgii ortopedycznej [5, 14]. W chorobach artretycznych, takich jak osteoartretyzm czy reumatoidalne zapalenie stawów, objętość mazi stawowej wzrasta, co prowadzi do obniżenia stężenia kwasu. Ponadto wielkocząsteczkowy HA jest rozkładany przez reaktywne formy tlenu, które redukują jego lepkość i upośledzają jego nawilżające i amortyzujące właściwości. Struktura stawu ulega zniszczeniu, zmienione tkanki są rozpoznawane przez układ immunologiczny jako ciało obce, co powoduje, że choroba staje się schorzeniem ogólnoustrojowym, wpływającym na funkcjonowanie całego organizmu. Walka z chorobą polega na uzupełnieniu ubytków w mazi stawowej

za pomocą iniekcji dostawowych. Stwierdzono, że podawanie HA łagodzi ból i objawy choroby zwyrodnieniowej stawów. Ponadto następuje odnowienie lepko-sprężystych właściwości płynu stawowego, stymulacja produkcji endogennych cząsteczek kwasu oraz powstrzymanie rozkładu chrząstki.

Kwas hialuronowy jest używany ponadto przy wielu zabiegach okulistycznych [5]. Najczęściej stosuje się preparaty będące połączeniem kwasu hialuronowego z hydroksypropylometylocelulozą [15]. Wykorzystuje się go przy implantacji rogówki, wszczepianiu soczewki wewnątrzgałkowej, operacjach zaćmy i jaskry oraz laserowej chirurgii oka. Kwas hialuronowy jest również składnikiem kropli do oczu używanych w „zespolu suchego oka” [4]. Omawiany związek jest bardzo podobny do mucyny, głównego składnika łez. Użyteczność HA opiera się na nawilżaniu oka, stanowieniu bariery ochronnej przed szkodliwymi czynnikami środowiska. Istotny jest fakt, że nie jest on usuwany z powierzchni oka nawet podczas mrugnięć.

HA wykorzystuje się także w otolaryngologii [5]. W tym zastosowaniu używa się preparaty zawierające usieciowany kwas, gdyż zapewnia to przedłużenie czasu jego przebywania w organizmie, nawet do roku. Istnieją możliwości zastosowania HA do przyspieszenia gojenia się ran błony bębenkowej ucha, jako bioimplantu do chirurgicznej naprawy ubytków strun głosowych, regeneracji zranionych lub zabliznionych fałd, rekonstrukcji krtani i głośni [9].

Preparaty kwasu hialuronowego o dużej masie cząsteczkowej, stosowane miejscowo, wspomagają gojenie się świeżych ran skóry oraz są przydatne przy przewlekłych stanach zranienia lub oparzeniach [5]. Ze względu na właściwości antyoksydacyjne, HA służy jako składnik przeciwwzapalny w materiałach opatrunkowych. W połączeniu z dekspentanolem, jest używany jako preparat silnie nawilżający i regenerujący. Żele na bazie HA są stosowane przy leczeniu owrzodzenia jamy ustnej, przyspieszają gojenie, redukując ból, objawy zapalenia i dyskomfort [16].

Interesującym kierunkiem jest wykorzystanie oligosacharadów HA do opóźniania wzrostu guza, a nawet jego apoptozy [17]. Podczas takiej terapii, komórki nowotworowe stają się bardziej wrażliwe na działanie leków, niż w przypadku terapii bez HA. Wprowadzenie takiej formy leczenia, pozwala na zmniejszenie ilości leków używanych w chemioterapii.

Ciekawym zastosowaniem HA w inżynierii tkankowej jest odbudowa chrząstki, bazująca na żelu opartym na fibrynie i HA [18]. Stanowi on dobrą substancję transportującą chondrocyty do uszkodzonego fragmentu tkanki.

Najczęściej produkty bazujące na kwasie hialuronowym są wykorzystywane w chirurgii plastycznej jako implanty poprawiające wygląd skóry [5, 19]. Umożliwiają one bezpieczne wypełnianie zmarszczek i wklęsłych blizn na twarzy. W kosmetyce stosuje się żele HA całkowicie lub częściowo nasycone wodą [20]. Pierwsze z nich nie pobierają wody z otaczających je tkanek; drugie natomiast chłoną wodę z otoczenia, zwiększając swoją objętość, a tym samym dając efekt wolumizacji. Żele HA są bardziej efektywne niż te z kolagenem, gdyż

charakteryzują się większą elastycznością. Co więcej, implanty takie można aplikować poprzez wstrzykiwanie, nie trzeba wszczepiać ich operacyjnie, co eliminuje ryzyko infekcji. Jedną z wielu korzyści w tego typu zabiegach jest to, że nie ma okresu rekonwalescencji. Pacjent po zabiegu może praktycznie od razu przystąpić do codziennych czynności. Kwas hialuronowy obecnie jest stosowany do poprawy wyglądu skóry twarzy, fałd nosowo-wargowych, łuków brwiowych, kości policzkowych, powiększenia ust, drobnych korekacji nosa czy podbródka [21].

Kwas hialuronowy, po wstrzyknięciu do skóry, jest stosunkowo szybko degradowany przez hialuronidazy i wolne rodniki, które naturalnie tam występują [2]. Ponadto związek ten, nawet o wysokiej masie cząsteczkowej, ma słabe właściwości biomechaniczne. Podejmowane są zatem próby ulepszenia właściwości HA poprzez proces sieciowania [22]. W procesie tym używa się środków sieciujących, które tworzą połączenia pomiędzy cząsteczkami kwasu hialuronowego. Środki te mają różne grupy funkcyjne, przez co reagują w odmienny sposób z kwasem hialuronowym. Zazwyczaj do sieciowania stosuje się formaldehyd, aldehyd glutarowy, epoksydy, diwinylosulfon, karbodiimidy. Biorąc pod uwagę biostabilność nowo powstałych preparatów, stwierdzono, że kwas hialuronowy usieciowany karbodiimidami może przetrwać *in vivo* 15 dni, usieciowany epoksydami powyżej 3 miesięcy, natomiast sieciowany HA z wiązaniami estrowymi degraduje szybciej niż jakikolwiek inny preparat. Niekiedy jednak pojedyncze sieciowanie jest niewystarczające dla stabilności produktu. Z tego względu opracowano technologie podwójnego sieciowania – najpierw poprzez tworzenie wiązań eterowych, a potem estrowych [22]. Drugie wiązania poprawiają biostabilność poprzez zwiększenie stopnia usieciowania, zwiększają także oporność zmodyfikowanego produktu na trawienie hialuronidazami oraz na działanie wolnych rodników poprzez utrudnienie docierania tych czynników do łańcuchów polimerów.

Właściwości kwasu hialuronowego jako biopolimeru zostały również wykorzystane do otrzymywania preparatów farmaceutycznych, których celem jest dostarczenie leku w określone miejsce w organizmie i jego powolne uwolnienie [23]. Opracowano metody produkcji hydrożeli, w których obecność grup hydroksylowych i sieciowanie umożliwia ich sprężenie z lekiem. Innym rozwiązaniem jest tworzenie mikrokapsulek z HA zawierających lek. Yadav i in. [23] wskazali, że w tkankach nowotworowych czy w tkankach ze stanem zapalnym, występuje nadekspresja receptorów kwasu hialuronowego. Sprzyja to zwiększeniu wiązania kompleksu HA-lek i ma istotny wpływ na efektywność leczenia.

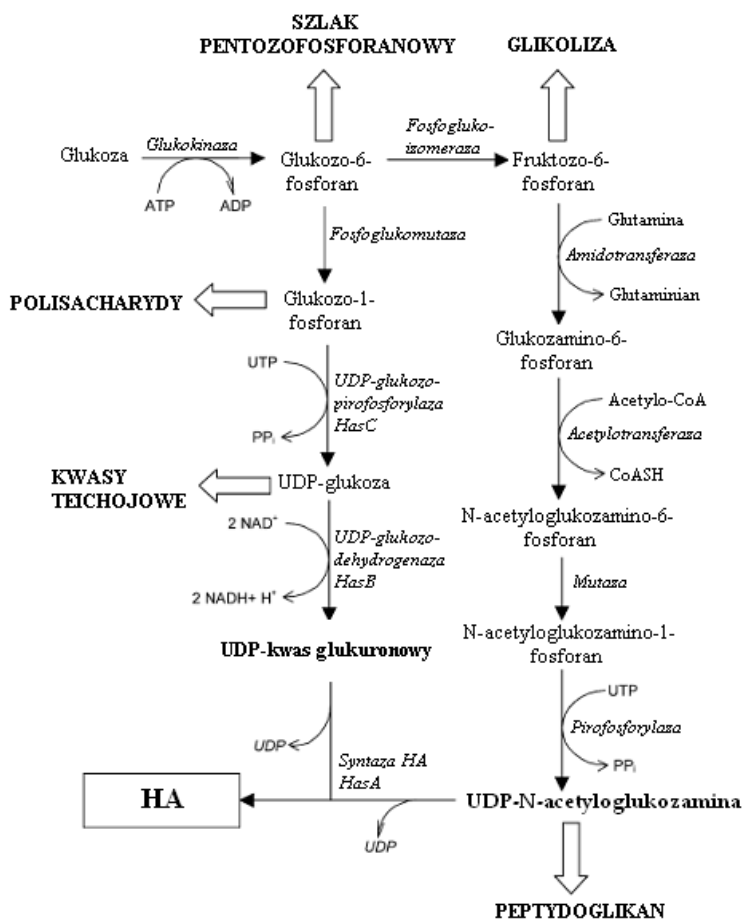
W medycynie klinicznej, kwas hialuronowy jest stosowany jako marker do diagnozowania wielu chorób, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów, nowotwory, schorzenia wątroby [5]. Według badań Geramizadeh i in. [24] określenie poziomu HA w surowicy krwi może być przydatne do oceny stopnia zwłóknienia wątroby u pacjentów z zapaleniem wątroby typu B. U osób z HBV, zawartość HA waha się na poziomie $73,4 \pm 124,8$ ng/ml, przy normie $20,4 \pm 15,5$ ng/ml. U pacjentów z rozległą marskością wątroby poziom HA

oscyluje wokół wartości 309.7 ± 143.5 ng/ml, a u tych z łagodną w granicach $24,7 \pm 31.9$ ng/ml. HA może być stosowany jako biochemiczny marker w diagnostyce atrezji dróg żółciowych powodowanej powszechnie przez przedłużoną żółtaczkę wieku niemowlęcego [25]. Kishida i in. [26] w swoich badaniach udowodnili, że omawiany związek może być również wskaźnikiem obecności stanu zapalnego w szyjce macicy lub w błonie płodowej, które mogą być przyczyną przedwczesnego porodu. Badania Kogana i in. [6] wskazały też na możliwość szybkiego zdiagnozowania obecności nowotworu złośliwego u człowieka.

Otrzymywanie kwasu hialuronowego z organizmów zwierzęcych oraz metodami biotechnologicznymi

Jak dotąd podstawowym sposobem otrzymywania HA jest jego izolacja z różnych części organizmów zwierzęcych, tj. grzebieni kogucich, gałek ocznych kręgowców, skóry rekina, pępowiny. W procesie tym otrzymuje się głównie wielkocząsteczkowy HA. Średnia masa molowa powszechnie dostępnych ekstrakcyjnych preparatów HA z tkanek zwierzęcych, ma wielkość od kilkuset tysięcy Da do około 2,5 MDa. Grzebienie kogucie, to tkanka zwierzęca o największej zawartości HA (7500 µg/ml) [5]. Kang i in. [27] opisali efektywną metodę otrzymywania HA z materiału zwierzęcego, w której można było uzyskać z 500 g grzebieni kogucich 500 mg suchego kwasu hialuronowego, natomiast Amagai i in. [28] – metodę otrzymywania kwasu z gałek ocznych tuńczyka wielkookiego *Thunnus obesus*. Źródłem kwasu hialuronowego może być również ludzka pępowina [29].

Proces pozyskiwania kwasu hialuronowego ze źródeł zwierzęcych ma kilka istotnych wad [4]. HA występuje naturalnie w organizmach zwierzęcych jako kompleks z innymi biopolimerami, na przykład białkami. Związki te, będąc zanieczyszczeniem preparatów HA mogą wykazywać działanie alergenne. I tak Andre i in. [30], prowadząc badania na grupie 4320 pacjentów, odnotowali wystąpienie nadwrażliwości u 34 osób (w 16 przypadkach zmiany wystąpiły niemal bezpośrednio po wstrzyknięciu HA, u pozostałych osób pojawiły się z pewnym opóźnieniem). Obserwowane reakcje zapalne w pobliżu miejsc wstrzyknięcia kwasu, to: opuchlizna, zaczerwienienie, ropnie, guzki, ziarnina typu ciała obcego. Ponadto w próbkach kwasu mogą znajdować się śladowe ilości kationów metali, co może stanowić potencjalne ryzyko zmniejszenia masy cząsteczkowej HA, a w konsekwencji zmianę jego właściwości. Obecność w preparatach pozostałości kwasów nukleinowych doprowadza czasami do indukcji cytokinin zapalnych [4]. Z tych powodów, po każdym procesie produkcji istnieje konieczność przeprowadzania specjalnych procedur oczyszczających, mających na celu otrzymanie czystego kwasu. Stosuje się różnorodne metody, takie jak: traktowanie próbek proteazami; wytrącanie kwasu hialuronowego, np. chlorkiem cetylopirydyny; oczyszczanie na membranie ultrafiltracyjnej; wytrącanie HA bez rozpuszczalnika i liofilizacja.



Rysunek 3. Schemat powstawania kwasu hialuronowego u bakterii z rodzaju *Streptococcus* [31]

Ze względu na wyżej wymienione niedoskonałości kwasu hialuronowego otrzymywanego ze źródeł zwierzęcych, coraz większą uwagę zwraca się na metody bazujące na hodowli odpowiednich szczepów bakterii. Kwas hialuronowy wyizolowano po raz pierwszy z chorobotwórczych bakterii z rodzaju *Streptococcus* [31]. Występował on w grubej otoczce tych mikroorganizmów. Badając metabolizm tych drobnoustrojów, Chong i in. [31] stwierdzili, że kwas D-glukuronowy i N-acetylglucozamina (składniki disacharydu HA) powstawały w komórkach bakterii odpowiednio z glukozy-6-fosforanu i fruktozy-6-fosforanu. W procesie tym uczestniczyło wiele enzymów: fosfoglukomutaza, UDP-glukozy-dehydrogenaza, UDP-glukozy-pirofosforylaza, syntaza HA, amidotransferaza, acetylotransferaza, mutaza i pirofosforylaza (rysunek 3). Na zsyntetyzowanie 1 mola HA były zużywane 4 mole ATP.

Ze względu na to, że w procesach biotechnologicznych nie mogą być wykorzystywane bakterie chorobotwórcze, podjęto próby znalezienia drobno-ustrojów mających status GRAS, które można byłoby wykorzystać w procesach biosyntezy kwasu hialuronowego. Szczególną uwagę zwrócono na niepatogenne bakterie fermentacji mlekowej.

Izawa i in. [32] dokonali skriningu 46 szczepów bakterii *Streptococcus thermophilus* wyizolowanych z produktów spożywczych. Przeprowadzili hodowlę bakterii na odtłuszczonej mleku i określili ilość wyprodukowanego HA. Zdolność wytwarzania biopolimeru odnotowano u sześciu szczepów. Największą ilość kwasu (8 mg/l) wytwarzał szczep YIT2084. Po jego hodowli w optymalnych warunkach (temp. 35°C, 100 obr/min, pH 6,8) na pożywce z mleka z peptydami sojowymi jako źródłem azotu uzyskano 208 mg HA/l. Chie i Lee [33] podjęli próbę opracowania procesu otrzymywania HA przy wykorzystaniu szczepów bakterii fermentacji mlekowej modyfikowanych genetycznie. W tym celu użyli bakterii *Lactococcus lactis*, do genomu których wprowadzali geny syntazy HA i UDP-glukozy-dehydrogenazy. Geny odpowiedzialne za syntezę tych enzymów uzyskano z genomu *Streptococcus equi* subsp. *zooeidemicus*. System ekspresji ww. genów w bakteriach *L. lactis* znajdował się pod kontrolą nizyny (naturalnej bakteriocyliny, wytwarzanej przez te bakterie). Przeprowadzono dwuetapową hodowlę rekombinata LL-NA z genem *has* oraz podwójnego rekombinata LL-NAB z genem *has* i genem kodującym UDP-glukozy-dehydrogenazę. W pierwszym etapie namnażano biomasę na pożywce zawierające 0,5% w/v glukozy. W drugim etapie, bakterie hodowano w pożywce z 1% w/v glukozy, do której w pewnym momencie dodawano nizynę w celu zaindukowania ekspresji wstawionych genów. Po zakończeniu hodowli, w wariancie doświadczenia z bakteriami LL-NA zawartość HA wynosiła około 0,08 g/l, natomiast w wariancie z rekombinantem LL-NAB była ponad 8-krotnie wyższa. Otrzymane wyniki potwierdziły fakt, że poziom ekspresji genu kodującego UDP-glukozy-dehydrogenazę u *L. lactis* jest niski. Zatem zasadne jest wprowadzenie dodatkowego genu kodującego UDP-glukozy-dehydrogenazę ze *Streptococcus*.

Próbą udoskonalenia wyżej opisanej metody produkcji HA było wprowadzenie do genomu bakterii *L. lactis*, obok dwóch opisanych wcześniej genów, także genu kodującego UDP-glukozy-pirofosforylazę [34]. Szczep SJR2 zawierał gen *hasA* (syntaza HA) i *hasB* (UDP-glukozy-dehydrogenaza), natomiast szczep SJR3 gen *hasA*, *hasB* oraz *hasC* (UDP-glukozy-pirofosforylaza). Po 15 godzinnej hodowli obu rekombinantów uzyskano w przypadku rekombinata SJR2 około 100 mg HA/l, natomiast w przypadku SJR3 nieco ponad 200 mg HA/l. Prasad i in. [34] przeprowadzili hodowlę dwóch wyżej wymienionych szczepów w bioreaktorze. Najlepsze wyniki zawartości HA (1,8 g/l) uzyskano w hodowli napowietrzanej szczepu SJR3.

W chwili obecnej najczęściej wykorzystywanymi szczepami do produkcji HA są naturalne szczepy *S. equi* i *S. equi* subsp. *zooeidemicus* [4]. W warunkach

tlenowych, w temperaturze hodowli w zakresie 36-40°C oraz przy pH obojętnym, ilość wytwarzanego HA wahała się w granicach 3-6 g/l. Wydajność ta zależy od uzyskanej masy cząsteczkowej kwasu. Czas hodowli jest ograniczony ze względu na rosnącą lepkość cieczy pohodowlanej, wynikającą z właściwości samego kwasu. Przeprowadzono wiele prób mających na celu zwiększenie ilości wytwarzanego kwasu hialuronowego w hodowlach bakterii *S. zooepidemicus*. Liu i in. [35] badali wpływ dodawania n-dodekanu na ilość wyprodukowanego HA. Badacze stwierdzili, że przy stężeniu n-dodekanu wynoszącym 5% następuje wzrost produkcji kwasu hialuronowego o 30%. Związek ten wpływał również na wielkość masy cząsteczkowej HA. Wzrosła ona z poziomu $(1,3 \pm 0,1) \times 10^6$ Da do $(1,9 \pm 0,2) \times 10^6$ Da, gdy stężenie n-dodekanu wynosiło 3%, a następnie zmalała do $1,6 \times 10^6$ Da przy stężeniu 5%. Zwiększenie ilości wytwarzanego kwasu hialuronowego przez *S. zooepidemicus* można było także osiągnąć poprzez zastosowanie w hodowli przerywanego stresu alkalicznego [36]. W tego typu hodowli, pH było utrzymywane na poziomie 7,0 przez pierwsze 6 godzin, po czym było szybko podwyższane do wartości pH 8,0 na 0,5 godziny, następnie do wartości pH 8,5 na 1 godz. i do pH 9 na 1,5 godz. Ostatecznie powracano do pH 7 na 1 godz. przed zakończeniem procesu fermentacji. Stosując opisany sposób hodowli udało się uzyskać wzrost produkcji kwasu hialuronowego z poziomu $5 \pm 0,1$ g/l (kontrola) do $6,5 \pm 0,2$ g/l.

Ze względu na konieczność hodowli bakterii kwasu mlekowego, w tym także z rodzaju *Streptococcus* na drogich pożywkach, zaczęto poszukiwać mniej wymagających szczepów drobnoustrojów. Jednym z obiecujących, potencjalnych kandydatów do produkcji kwasu hialuronowego są Gram-dodatnie bakterie *Bacillus subtilis* [5, 37]. Ich genom został dobrze zbadany, co ułatwia manipulację genetyczną. Ponadto zaletą tych szczepów jest łatwość hodowli na dużą skalę oraz brak wytwarzania egzo- i endotoksyn. Co więcej, *B. subtilis* nie produkuje hialuronidazy, która mogłaby zniszczyć syntetyzowany przez bakterie HA.

W procesie otrzymywania kwasu hialuronowego wykorzystano szczep *B. subtilis* RB161 niosący gen *hasA* ze *Streptococcus equisimilis* [5]. Tak skonstruowany szczep wytwarzał zewnątrzkomórkowo HA o masie cząsteczkowej w zakresie 1 MDa. Produkcja HA przez te bakterie była ekonomiczna, ponieważ rosły one na minimalnej, a więc taniej pożywce. Widner i in. [37] opisali hodowlę szczepu *B. subtilis* RB161 metodą okresową z zasilaniem pod kątem uzyskiwania HA. Przeprowadzili ją w bioreaktorze o pojemności 3 l, na minimalnej pożywce, zawierającej sacharozę jako źródło węgla. Ilość HA zwiększała się do około 25 h hodowli i osiągała poziom około 1,0 g/l. Zwiększenie produkcji kwasu hialuronowego przez *B. subtilis* można było uzyskać poprzez koekspresję enzymu UDP-glukozy-dehydrogenazy ze *Streptococcus* z syntazą HA, co powodowało dwukrotny wzrost ilości wytworzonego kwasu [38]. Przeprowadzono również badania wpływu genu kodującego bakteryjną hemoglobinę, pochodzącego z *Vitreoscilla* na wzrost i produkcję HA przez te bakterie [38].

Po 30 h hodowli, obserwowano zwiększenie populacji komórek o 25% oraz produkcji kwasu hialuronowego o 100%. Wydajność HA wynosiła 1,8 g/l

Kolejną bakterią wykorzystywaną do wytwarzania kwasu hialuronowego była *Escherichia coli* [39, 40]. Mao i in. [40] opisali szczep JM109, do którego wprowadzili gen *pmHas* kodujący syntazę HA, (pochodzący z bakterii *Pasteurella multocida*) oraz gen *kfiD* kodujący UDP-glukozy-dehydrogenazę (pochodzący ze szczepu K5 *E. coli*). Szczepem wyjściowym, poddawany modyfikacjom genetycznym, był szczep *E. coli* JM109/pBQ niewytwarzający HA. Początkowo ww. autorzy przeprowadzali hodowle wstrząsane w kolbach. Stosując rekombinowany szczep JM109/pHK, uzyskali w czasie 24 godzin hodowli kwas o masie cząsteczkowej 1,5 MDa w ilości 0,55 g/l. W kolejnym etapie przeprowadzili hodowlę bakterii w 1 l bioreaktorze zawierającym 500 ml bulionu Terrific, do którego dodatkowo wprowadzano 100 µg/ml ampicyliny i 100 µg/ml kanamycyny. Pierwszy etap hodowli trwał 4 godziny, pH było utrzymywane na poziomie 6,8, temperatura na poziomie 37°C. Po tym okresie, w celu wywołania ekspresji genów *pmHas* i *kfiD*, do pożywki dodawano izopropylotiogalaktozyd (IPTG), glukozę i fosforan amonu, w ilościach, odpowiednio 1 mM, 50 g/l i 10 g/l pożywki. Temperaturę obniżono do 30°C, aby umożliwić lepszą ekspresję zrekombinowanych białek. Po 14 godzinach dodawano drugą porcję pożywki o tym samym składzie. Wprowadzono również różne ilości glukozaminy (do stężenia 25 g/l) i fosfomycyny (do stężenia 200 µg/ml). Wyniki doświadczeń wykazały, że w hodowli z okresowym zasilaniem można było otrzymać w cieczy 2,0-3,8 g/l kwasu hialuronowego (0,027 g HA/g glukozy). Wydajność rekombinantów *E. coli* była jednak 2-3 razy niższa niż naturalnych producentów kwasu hialuronowego *Streptococcus* (0,065-0,088 g HA/g glukozy). Produktywność jest lepsza w warunkach tlenowych i zwiększa się o 35% przy utrzymywaniu rozpuszczalności tlenu na poziomie 10%. Synteza kwasu hialuronowego jest powiązana z namnażaniem biomasy. Zbyt duża ilość biomasy może powodować trudności w dostarczaniu składników odżywczych do wszystkich bakterii, co powoduje zahamowanie wytwarzania kwasu hialuronowego. Oddzielenie od siebie dwóch procesów: namnażania biomasy i produkcji HA, umożliwia uzyskanie lepszych wydajności produktu. Użycie do inhibicji wzrostu bakterii fosfomycyny powoduje zwiększenie produkcji HA o 70%. Dodatek glukozaminy (skrócenie szlaku biosyntezy HA) przyczynia się do wzrostu produkcji kwasu o 37%. Do modyfikacji bakterii *E. coli* używano również genów kodujących syntazę kwasu hialuronowego pochodzących ze *S. pyogenes* lub *S. equisimilis* [39]. Uzyskano mniejsze wydajności kwasu (odpowiednio: 48 mg/l z 48-godzinnej hodowli i 190 mg/l z 24-godzinnej hodowli).

Metody pozyskiwania kwasu hialuronowego z wykorzystaniem mikroorganizmów mają kilka wad [5]. Niektóre z nich to: ryzyko mutacji w szczepach bakteryjnych, możliwość wytwarzania różnych toksyn, pirogenów i immunogenów. Te powody przyczyniają się do tego, że kwas hialuronowy pochodzący z grzebieni kogucich jest nadal preferowanym preparatem służącym do leczenia

człowieka w przypadkach, gdy preparat jest wstrzykiwany do oka czy stawu kolanowego. Obecność niekorzystnych substancji wymusza konieczność zastosowania procedur mających na celu oczyszczenie preparatów. W chwili obecnej wykorzystuje się wiele różnych sposobów oczyszczania kwasu hialuronowego pochodzenia mikrobiologicznego, podczas których zwraca się szczególną uwagę na to, aby nie uległ on degradacji [4]. Po zakończeniu hodowli, otrzymuje się lepłą ciecz pofermentacyjną, którą rozcieńcza się wodą i odfiltrowuje lub odwirowuje w celu oddzielenia biomasy bakteryjnej. HA jest wydzielany zewnątrzkomórkowo, więc znajduje się w cieczy pochodowlanej, którą poddaje się kilku etapom oczyszczania. Dla przykładu, Rangaswamy i Jain [41] lepłą zawiesinę zawierającą 5 g HA/l rozcieńczyli wodą i wirowali przez 20 min w temp. 4°C. Kwas hialuronowy obecny w cieczy wytrącali 2-propanolem, a następnie zawieszali w octanie sodu. Roztwór ten w temperaturze pokojowej wytrząsali z żelazem krzemionkowym (2%) przy 150 obr/min przez 2 godziny i wirowali przez 20 min w 4°C. Następnie roztwór przepuszczali przez filtr węglowy i po 5-krotnym rozcieńczeniu oczyszczali za pomocą ultrafiltracji w trybie diafiltracji. Ostatnim etapem była filtracja sterylizująca, w której wykorzystywali filtry o wielkości porów 0,22 µm. W powyższej metodzie 96% zanieczyszczeń było usuwanych poprzez działanie żelazem krzemionkowym i przy wykorzystaniu filtrów węglowych. Dalsze postępowanie pozwalało uzyskać produkt z 0,06% białek w stosunku do HA. Opisana powyżej metoda była prosta, efektywna, dawała wysoką wydajność oczyszczania próbek kwasu hialuronowego, a preparaty HA otrzymane w ten sposób ze względu na swoją czystość mogły być używane w medycynie.

Podsumowanie

Niedoskonałości ekstrakcyjnego kwasu hialuronowego otrzymywanego z materiału zwierzęcego i jednocześnie olbrzymie możliwości zastosowania omawianego polimeru wskazują na potrzebę kontynuacji badań nad otrzymywaniem i oczyszczaniem kwasu hialuronowego przy wykorzystaniu bakterii. Dalsze prace zmierzające do opracowania opłacalnej technologii produkcji kwasu powinny być ukierunkowane na doskonalenie szczepów poprzez świadomą modyfikację ich genomów oraz doskonalenie metod hodowli niwelujących negatywne zależności między ilością namnożonej biomasy a produkcją HA.

Literatura

1. Rügheimer L. Hyaluronan: A matrix component. Proc AIP Conf **2008**, 1049:126-132.
2. Kablik J, Monheit GD, Yu L, Chang G, Gershkovich J. Comparative physical properties of hyaluronic acid dermal fillers. Dermatol Surg **2009**, 35 Suppl 1:302-312.
3. Daroszewski J, Rybka J, Gamian A. Glikozaminoglikany w patogeniezie i diagnostyce oftalmopatii Gravesa. Postepy Hig Med Dosw **2006**, 60:370-378.

4. Volpi N, Schiller J, Stern R, Soltes L. Role, metabolism, chemical modifications and applications of hyaluronan. *Curr Med Chem* **2009**, 16:1718-1745.
5. Kogan G, Soltes L, Stern R, Gemeiner P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol Lett* **2007**, 29:17-25.
6. Kogan G, Soltes L, Stern R, Schiller J, Mendichi R. Hyaluronic acid: Its function and degradation in *in vivo* systems. *Stud Nat Prod Chem* **2008**, 34:789-882.
7. Theocharis DA, Skandalis SS, Noulas AV, Papageorgakopoulou N, Theocharis AD, Karamanos NK. Hyaluronan and chondroitin sulfate proteoglycans in the supramolecular organization of the mammalian vitreous body. *Connect Tissue Res* **2008**, 49:124-128.
8. Ward PD, Thibeault SL, Gray SD. Hyaluronic acid: its role in voice. *J Voice* **2002**, 16:303-309.
9. Chan RW, Gray SD, Titze IR. The importance of hyaluronic acid in vocal fold biomechanics. *Otolaryngol Head Neck Surg* **2001**, 124:607-614.
10. Itano N. Simple primary structure, complex turnover regulation and multiple roles of hyaluronan. *J Biochem* **2008**, 144:131-137.
11. Stern R, Asari AA, Sugahara KN. Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol* **2006**, 85:699-715.
12. Krasieński R, Tchórzewski H. Hialuronian jako czynnik regulujący proces zapalenia. *Postepy Hig Med Dosw* **2007**, 61:683-689.
13. Xu H, Ito T, Tawada A, Maeda H, Yamanokuchi H, Isahara K, Yoshida K, Uchiyama Y, Asari A. Effect of hyaluronan oligosaccharides on the expression of heat shock protein 72. *J Biol Chem* **2002**, 277:17308-17314.
14. Kalman DS, Heimer M, Valdeon A, Schwartz H, Sheldon E. Effect of a natural extract of chicken combs with a high content of hyaluronic acid (Hyal-Joint) on pain relief and quality of life in subjects with knee osteoarthritis: a pilot randomized double-blind placebo-controlled trial. *Nutr J* **2008**, 7,3:1-9.
15. Maltese A, Borzacchiello A, Mayol L, Bucolo C, Maugeri F, Nicolais L, Ambrosio L. Novel polysaccharides-based viscoelastic formulations for ophthalmic surgery: rheological characterization. *Biomaterials* **2006**, 27:5134-5142.
16. Lee JH, Jung JY, Bang D. The efficacy of topical 0.2% hyaluronic acid gel on recurrent oral ulcers: comparison between recurrent aphthous ulcers and the oral ulcers of Behcet's disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **2008**, 22:590-595.
17. Toole BP, Ghatak S, Misra S. Hyaluronan oligosaccharides as a potential anticancer therapeutic. *Curr Pharm Biotechnol* **2008**, 9:249-252.
18. Park SH, Cui JH, Park SR, Min BH. Potential of fortified fibrin/hyaluronic acid composite gel as a cell delivery vehicle for chondrocytes. *Artif Organs* **2009**, 33:439-447.
19. Raspaldo H. Volumizing effect of a new hyaluronic acid sub-dermal facial filler: a retrospective analysis based on 102 cases. *J Cosmet Laser Ther* **2008**, 10:134-142.
20. Tezel A, Fredrickson GH. The science of hyaluronic acid dermal fillers. *J Cosmet Laser Ther* **2008**, 10:35-42.
21. Andre P. New trends in face rejuvenation by hyaluronic acid injections. *J Cosmet Dermatol* **2008**, 7:251-258.
22. Zhao X. Synthesis and characterization of a novel hyaluronic acid hydrogel. *J Biomater Sci Polym Ed* **2006**, 17:419-433.
23. Yadav AK, Mishra P, Agrawal GP. An insight on hyaluronic acid in drug targeting and drug delivery. *J Drug Target*, **2008**, 16:91-107.
24. Geramizadeh B, Janfeshan K, Saberfirooz M. Serum hyaluronic acid as a noninvasive marker of hepatic fibrosis in chronic hepatitis B. *Saudi J Gastroenterol*. **2008**, 14:174-177.

25. Ukarapol N, Wongsawasdi L, Ong-Chai S, Riddhiputra P, Kongtawelert P. Hyaluronic acid: additional biochemical marker in the diagnosis of biliary atresia. *Pediatr Int* **2007**, 49:608-611.
26. Kishida T, Yabushita H, Wakatsuki A, Zhuo L, Kimata K. Hyaluronan (HA) and serum-derived hyaluronan-associated protein (SHAP)-HA complex as predictive markers of cervical ripening in premature labor. *Connect Tissue Res* **2008**, 49:105-108.
27. Kang DY, Kim WS, Heo IS, Park YH, Lee S. Extraction of hyaluronic acid (HA) from rooster comb and characterization using flow field-flow fractionation (FIFFF) coupled with multiangle light scattering (MALS). *J Sep Sci* **2010**, 33:3530-3536.
28. Amagai I, Tashiro Y, Ogawa H. Improvement of the extraction procedure for hyaluronan from fish eyeball and the molecular characterization. *Fisheries Sci* **2009**, 75:805-810.
29. Lago G, Oruna L, Cremata JA, Perez C, Coto G, Lauzan E, Kennedy JF. Isolation, purification and characterization of hyaluronan from human umbilical cord residues. *Carbohydr Polym* **2005**, 62:321-326.
30. Andre P, Lowe NJ, Parc A, Clerici TH, Zimmermann U. Adverse reactions to dermal fillers: a review of European experiences. *J Cosmet Laser Ther* **2005**, 7:171-176.
31. Chong BF, Blank LM, McLaughlin R, Nielsen LK. Microbial hyaluronic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol* **2005**, 66:341-351.
32. Izawa N, Hanamizu T, Iizuka R, Sone T, Mizukoshi H, Kimura K, Chiba K. *Streptococcus thermophilus* produces exopolysaccharides including hyaluronic acid. *J Biosci Bioeng* **2009**, 107:119-123.
33. Chien LJ, Lee CK. Hyaluronic acid production by recombinant *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **2007**, 77:339-346.
34. Prasad SB, Jayaraman G, Ramachandran KB. Hyaluronic acid production is enhanced by the additional co-expression of UDP-glucose pyrophosphorylase in *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **2010**, 86:273-283.
35. Liu L, Yang H, Zhang D, Du G, Chen J, Wang M, Sun J. Enhancement of hyaluronic acid production by batch culture of *Streptococcus zooepidemicus* with n-dodecane as an oxygen vector. *J Microbiol Biotechnol* **2009**, 19:596-603.
36. Liu L, Wang M, Du G, Chen J. Enhanced hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus* by an intermittent alkaline-stress strategy. *Lett Appl Microbiol* **2008**, 46:383-388.
37. Widner B, Behr R, Von Dollen S, Tang M, Heu T, Sloma A, Sternberg D, Deangelis PL, Weigel PH, Brown S. Hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* **2005**, 71:3747-3752.
38. Chien LJ, Lee CK. Enhanced hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis* by coexpressing bacterial hemoglobin. *Biotechnol Prog* **2007**, 23:1017-1022.
39. Yu H, Stephanopoulos G. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid. *Metab Eng* **2008**, 10:24-32.
40. Mao Z, Shin HD, Chen R. A recombinant *E. coli* bioprocess for hyaluronan synthesis. *Appl Microbiol Biotechnol* **2009**, 84:63-69.
41. Rangaswamy V, Jain D. An efficient process for production and purification of hyaluronic acid from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Biotechnol Lett* **2008**, 30:493-496.

Hyaluronic acid – characterization, production and application

***Abstract:** In this review, bibliography concerning the structure and the properties of hyaluronic acid (HA) as well as the localization and the functions of this compound in human organism were presented. The methods of HA preparations obtainment including the extraction of animal tissues and production in biotechnological processes were described. The advantages and disadvantages of above mentioned methods were pointed. In the section of this review dealt with HA microbiological production, modifications of the genomes of lactic acid bacteria as well as *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* strains to improve the HA productivity were shown. Consideration was taken to introduce hyaluronic synthases, UDP – glucose dehydrogenase and UDP-glucose pyrophosphorylase genes. Methods and culture conditions of bacteria as well as HA yield were presented. Applications of hyaluronic acid and its derivatives in therapy, diagnostics, aesthetic medicine as well as in cosmetology were presented. An insight on HA utilization in drug targeting and drug delivery was made.*