

アレルギー性皮膚炎に対するナノ粒子化ヘパリンの抑制効果

京都大学大学院薬学研究科

山下 富義

Allergic contact dermatitis is a delayed hypersensitivity reaction triggered by contact with particular substances or haptens. Molecular mechanisms of the inflammatory disorder are yet to be well established, but in recent years have been suggested to involve activation of natural immunity via Toll-like receptors (TLRs) or Nod-like receptors (NLRs). We have previously developed a glycol-split heparin-sphingosine conjugate and found that it forms self-assembling nano-sized micelles and exhibits an anti-inflammatory effect associated with down-regulation of TLR4 signaling pathway. The present study was initiated to apply self-assembling heparin derivatives to treatment and prevention of contact dermatitis disorders. Firstly, we synthesized the derivatives of glycosaminoglycans (heparins, chondroitin sulfates, and hyaluronic acids), and found that glycol-split low-molecular-weight heparin-stearylamine conjugate (gs-LHST) was the greatest inhibitory effect against lipopolysaccharide-induced TNF- α production in primary cultured murine peritoneal macrophages. Then, we prepared polyethylene glycol ointment containing nano-dispersed gs-LHST, and applied it to a dinitrofluorobenzene (DNFB)-sensitized mouse contact dermatitis model. DNFB-induced ear thickening was significantly suppressed when gs-LHST-containing ointment was applied 2 hours prior to every DNFB sensitization. The anti-inflammatory effect of gs-LHST-containing ointment was comparable to that of prednisolone-containing ointment. However, the effect of gs-LHST-containing ointment was not observed in the genetically TLR4-mutated strain C3H/HeJ, suggesting that blockade of TLR4 signaling pathways by gs-LHST might be attributed to suppression of DNFB-induced ear thickening. Real-time polymerase chain reaction (PCR) analyses indicated that gs-LHST-containing ointment can reduce elevated mRNA expression levels of anti-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) and oxidative stress-responsive gene (HO-1). These results suggested that gs-LHST might be effective to inhibit cyclic inflammatory chain reactions involving TLR4 and reactive oxygen species.

1. 緒 言

接触性皮膚炎は種々の化学物質や金属などのハプテンにより引き起こされる遅延型のアレルギーである¹⁾。その症状は丘疹や発赤など外見の変化を伴うため、患者のQuality of Life (QOL) を大きく損なうことも少なくない。接触性皮膚炎が発症する詳細なメカニズムは依然不明であるが、その一部でToll様受容体 (TLR) やNod様受容体 (NLR) などを介した自然免疫の活性化と、それに伴う炎症反応の関与が近年の研究から示唆されている¹⁻⁴⁾。これまでに、TLR4 リガンドであるLPSや熱ショックタンパク質により接触性皮膚炎が増悪することや^{5, 6)}、接触性皮膚炎を引き起こす代表的な金属であるニッケルがヒトのTLR4を直接刺激することが報告されてきた⁷⁾。また、TLRの刺激で産生されるTNF- α やIL-1 β などの炎症性サイトカインが角化細胞の増殖やT細胞の浸潤に関与することも示されている⁸⁾。

我々はこれまでに、ヘパリンのウロン酸部位を開環した低抗凝固作用ヘパリンにD-エリスロスフィンゴシンを縮

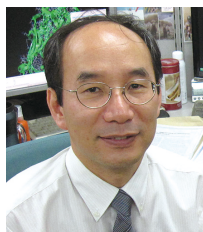
合させたヘパリン誘導体が、水溶液中でナノミセル粒子を形成するとともに、LPS活性化マクロファージからの炎症性サイトカインの産生を強力に阻害することを明らかにした^{9, 10)}。さらに、本ヘパリンナノ粒子は、マクロファージをLPSで刺激した後のIRAK-1のリン酸化やIkB α の分解およびNF κ Bの核内への移行を抑制したことから、TLR4シグナル伝達経路を抑制することが示唆されている⁹⁾。

そこで、本研究では、ヘパリンナノ粒子の接触性皮膚炎治療への応用を最終的な目的として、次に示す実験を行った。まず、種々のグリコサミノグリカンがヘパリンと同様に抗炎症作用を有する点に着目し^{11, 12)}、グリコサミノグリカンに脂肪族アミンを縮合させた結合体を合成し、高い抗炎症効果を持ったグリコサミノグリカンナノ粒子を創製した。次に、そのスクリーニングによって見出された低分子量ヘパリン (以下、LHP) 由来ナノ粒子の皮膚疾患への応用を目的に軟膏剤を調製し、2,4-ジニトロフルオロベンゼン (DNFB) 誘発接触性皮膚炎モデルに対する治療効果を検討した。以下、これらの研究成果について報告する。

2. 方 法

2. 1. グリコサミノグリカン-ステアリルアミン結合体の合成

各種グリコサミノグリカン1gを0.1 M過ヨウ素酸ナトリウム溶液 20 mLに溶解し4℃で72時間反応させた。未反応の過ヨウ素酸ナトリウムをグリセロールで分解、透析、凍結乾燥して得られた白色粉末を0.2 M水素化ホウ素ナト



Suppressive effect of self-assembling nano-sized heparin on allergic dermatitis

Fumiyo Yamashita

Kyoto University, Graduate School of Pharmaceutical Sciences

リウム溶液に溶解し、4℃で72時間反応させた。反応液を蒸留水中で2日間透析した後凍結乾燥することで、各種グリコール開裂グリコサミノグリカンを得た。次に、この20mgをホルムアミド1.5mLに溶解し、EDC 10mgで活性化した後、ステアリルアミン5mgを添加し、25℃で24時間反応させた。反応終了後、エタノール沈殿法により生成物を回収し、蒸留水中で2日間透析することにより精製し、凍結乾燥することによって、目的のグリコサミノグリカン-ステアリルアミン結合体を得た。

2. 2. グリコサミノグリカンナノ粒子の物性測定

各種グリコサミノグリカン-ステアリルアミン結合体を0.01 mg/mLの濃度で蒸留水に溶解し、37℃で5分間、42 KHzの超音波を照射することで微細化を行った。粒子径およびゼータ電位はMalvern社製ゼーターサイザーナノZSを用いて測定した。各種グリコサミノグリカン-ステアリルアミン結合体の臨界ミセル濃度は、ピレンを用いた蛍光プローブ法¹³⁾により測定した。各種グリコサミノグリカン-ステアリルアミン結合体の水分散溶液を異なった濃度で調製し、ピレン溶液と混和した。ピレンの最終濃度は 7.5×10^{-8} Mであった。混合液は12時間静置して平衡化し、励起波長339 nm、発光波長390 nmで蛍光測定を行った。

2. 3. LPS刺激マウス腹腔マクロファージに対する抗炎症効果の評価

5週齢のICR系雌性マウスに2.9%チオグリコレート培地を1 mL腹腔内投与し、4日後にRPMI1640培地5 mLを用いて腹腔マクロファージを採取した。採取された腹腔マクロファージは10% ウシ胎児血清を含有するRPMI1640培地に再懸濁した後、96 wellマイクロプレートに 1.0×10^5 cells/wellで播種し、37℃、5% CO₂の条件で培養した。2時間後に培地交換して非接着細胞を取り除いた。24時間後培地をOptiMEMに交換し、異なる濃度の各種グリコサミノグリカン-ステアリルアミン結合体を添加した後、LPSを最終濃度20 ng/mLで添加した。24時間培養後、上清中のTNF- α 量をmurine TNF- α ELISA Kitを用いて定量した。細胞毒性の評価はWST-1アッセイ法により評価した。

2. 4. グリコール開裂低分子量ヘパリン-ステアリルアミン結合体含有水性軟膏の調製

グリコール開裂低分子量ヘパリン-ステアリルアミン結合体 (gs-LHST) は、前述の方法により合成した。水性軟膏は、ポリエチレングリコール4000、ポリエチレングリコール400、および水を重量比4:4:1の割合で加熱混合した溶液にgs-LHSTを添加し、ホモジナイザーで攪拌しながら徐々に冷却することによって調製した。

2. 5. 接触性皮膚炎モデルマウスにおける抗炎症作用の評価

重量比4:1の割合で混合したアセトン-オリーブオイル混合液に、2,4-ジニトロフルオロベンゼン (DNFB) を0.5%の濃度で溶解した。6週齢のBALB/c系雌性マウス (一部の実験では、C3H/HeJ、C3H/HeNマウスを用いた) の腹部を除毛し、0日目および翌日に0.5% DNFB溶液25 μ Lを塗布した。5日目から3日間に渡って0.3% DNFB溶液10 μ Lをマウスの右耳介に塗布することで再感作し炎症を惹起させた。コントロール群として、DNFBを含まない溶液のみを塗布した。抗炎症実験では、0.3% DNFB溶液を耳介に適用する2時間前に、0.2%もしくは0.5%のgs-LHSTを含有するポリエチレングリコール水性軟膏10 mgを塗布した。ネガティブコントロールとしては薬物を含有しない軟膏基剤、ポジティブコントロールとしては0.5%プレドニゾロン軟膏を用いた。各軟膏の抗炎症作用は、0.3% DNFB溶液を適用24時間後の耳介厚をデジタルシックススケージにより測定するとともに、最終日(8日目)に耳介を摘出し、各種炎症マーカー遺伝子の発現をリアルタイムPCR法により測定することによって評価した。

3. 結果

3. 1. 各種グリコサミノグリカンナノ粒子の物性評価

未分画ヘパリン、低分子量ヘパリン、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸の4つのグリコサミノグリカンに対して、過ヨウ素酸化によるグリコール開裂を行い、ステアリルアミンとの結合体を合成した (以下、それぞれをgs-HPST、gs-LHST、gs-CSST、gs-HASTと称する)。各グリコサミノグリカン誘導体を分散して得られるナノ粒子の粒子径は100~150 nm程度、ゼータ電位は-20~-40 mVであり、臨界ミセル濃度も0.014-0.018 mg/mLと各誘導体間で大きな差は認められなかった。

3. 2. LPS刺激マウス腹腔マクロファージに対する抗炎症効果

LPS刺激時にマクロファージから産生されるTNF- α 量をELISA法により定量したところ、コンドロイチン硫酸を除いてグリコサミノグリカン存在下TNF- α 産生がわずかに減少した。グリコサミノグリカンをグリコール開裂するとTNF- α の産生抑制効果は完全に消失したが、ステアリルアミンと縮合させることによって、通常のグリコサミノグリカンに比べて強力にTNF- α の産生を抑制できるようになった。各グリコサミノグリカン-ステアリルアミン結合体のTNF- α 産生抑制効果に関して用量依存性を評価し、IC₅₀値を算出したところ、gs-LHSTで最も効果が高く (0.010 mg/mL)、次いでgs-HPST (0.018 mg/mL)、gs-CSST (0.033 mg/mL)、gs-HAST (0.113 mg/mL) の

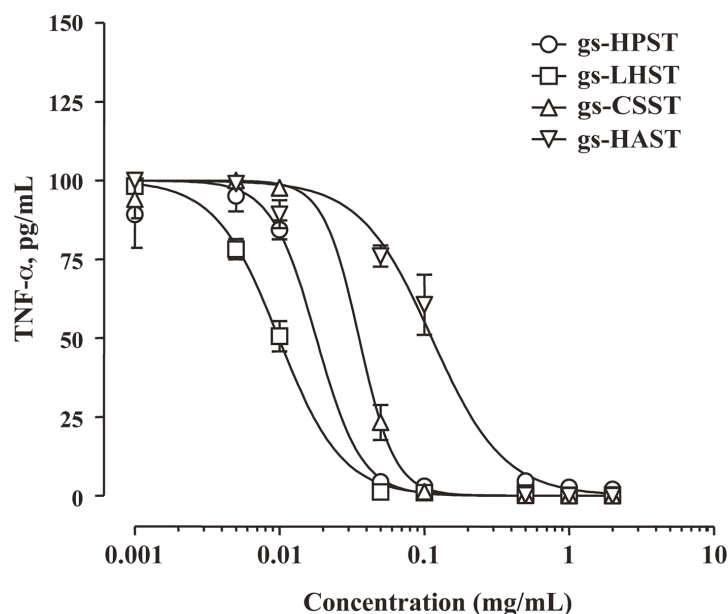


Figure 1 Concentration-dependent effect of glycol-split glycosaminoglycan (GAG)-stearylamine conjugates on TNF- α production from lipopolysaccharide (LPS)-stimulated mouse peritoneal macrophages.

順となった (Figure 1)。

3. 3. 各種 Toll 様受容体リガンド刺激によるサイトカイン産生に対する抑制効果

グリコサミノグリカン-ステアリアルアミン結合体の抗炎症効果が LPS 特異的かどうかを確認するために、TLR2 のリガンドである Pam2CSK4 と TLR3 のリガンドである Poly (I:C) を用いて、前項と同様の実験を行った。Pam2CSK4 の刺激に対しては、LPS の場合とは異なり、いずれのグリコサミノグリカン-ステアリアルアミン結合体も TNF- α 産生抑制効果を示さなかった。一方、Poly (I:C) の刺激に対しては gs-HAST を除くすべてにおいて、LPS に比べ弱いものの TNF- α 産生が抑制される傾向にあった。ただし、Poly (I:C) の添加により細胞毒性が認められたことから、この TNF- α 産生抑制は Poly (I:C) の細胞傷害性と関連する可能性もあり、TLR3 経路に対する効果については結論できなかった。

3. 4. DNFB 誘発接触性皮膚炎モデルにおける耳介肥厚抑制効果

先の検討において、低分子量ヘパリンの誘導体すなわち gs-LHST からなるナノ粒子ミセルが最も強力な抗炎症作用を示すことが明らかになった。そこで、gs-LHST を含有する水性軟膏を調製し、DNFB 刺激により誘発されるマウス耳介肥厚に対する抑制効果を検討した (Figure 2)。DNFB を含まないアセトン：オリーブ油 (4：1) 溶液で再感作しても、マウスの耳介厚はほとんど変化しなかった

が、0.3% DNFB 溶液で再感作すると経日的にマウス耳介の肥厚が生じた。一方、0.3% DNFB 溶液で再感作する 2 時間前に 0.2% gs-LHST 軟膏を耳介部に塗布したマウスにおいては、0.5% プレドニゾロン軟膏と同程度に、耳介の肥厚が有意に軽減された。軟膏中の gs-LHST 濃度を 0.5% に増加させたところ、0.2% に比べやや増強傾向にあったが、有意な差は認められなかった (Figure 2)。

8 日目にマウス耳介を摘出し、マウス耳介の組織学的評価を行った。DNFB で感作することによって、表皮・真皮の厚みが増し、細胞の浸潤が認められた。一方、0.2% gs-LHST 含有軟膏を前投与した群では、0.5% プレドニゾロン軟膏塗布群と同様、DNFB による組織学的異常が軽減されることが確認された (Figure 3)。

DNFB 誘発接触性皮膚炎モデルにおける gs-LHST の治療的効果が TLR4 を介するか否かを検討するために、TLR4 遺伝子に変異のある C3H/HeJ マウスを用いて同様の検討を行った。その結果、C3H/HeJ マウスでも DNFB 感作による耳介肥厚は観察されたが、gs-LHST による抑制作用は認められなかったのに対し、野生型の TLR4 が発現している C3H/HeN マウスでは、BALB/c マウスの場合と同様、0.5% gs-LHST 軟膏による耳介肥厚の抑制効果が認められた (Figure 4)。

3. 5. DNFB 誘発接触性皮膚炎モデルでの炎症性遺伝子マーカー発現に対する影響

炎症性サイトカインおよび酸化ストレスマーカー遺伝子の発現に対する gs-LHST 含有軟膏塗布の影響について、リ

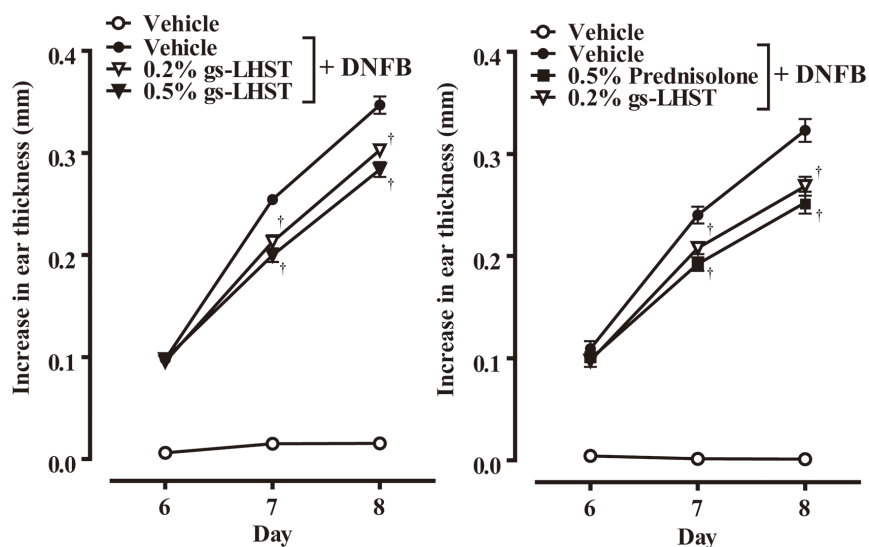


Figure 2 Inhibitory effect of glycol-split low molecular weight heparin conjugate (gs-LHST)-containing ointment on 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB)-induced ear thickening in BALB/c mice.

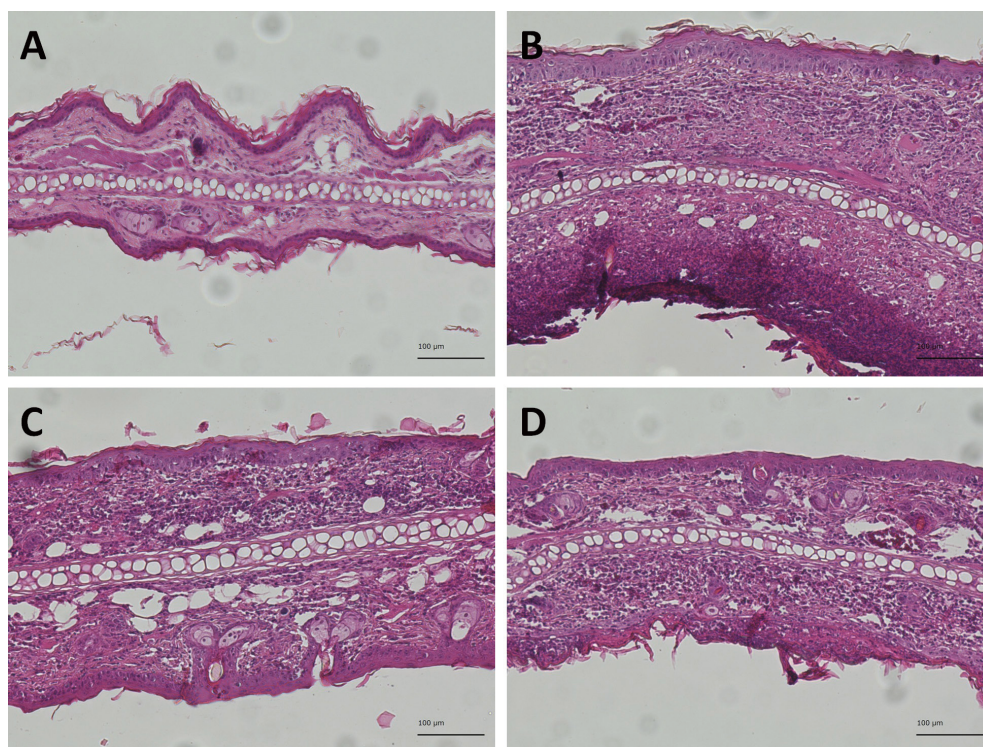


Figure 3 Histological assessment in a 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB)-induced mouse contact dermatitis model.

At 24 h post the last DNFB stimulation (day 8), mouse pinnae were excised and fixed with 10 % formalin neutral buffer solution and embedded in paraffin. Paraffin-embedded pinnae were sectioned at 5 µm and stained with hematoxylin and eosin. (A) Non-treatment, (B) DNFB plus drug-free ointment base, (C) DNFB plus 0.5% prednisolone, and (D) DNFB plus 0.2% gs-LHST.

アルタイムPCR法によって検討した。DNFBの感作により上昇した炎症性サイトカインTNF- α およびIL-1 β の発現はgs-LHST含有軟膏塗布によって有意に抑制されたの

に対し、IL-12の発現上昇に対しては影響が認められなかった (Figure 5)。また、接触性皮膚炎において、ハプテン刺激によって産生される活性酸素種が炎症を進行させるこ

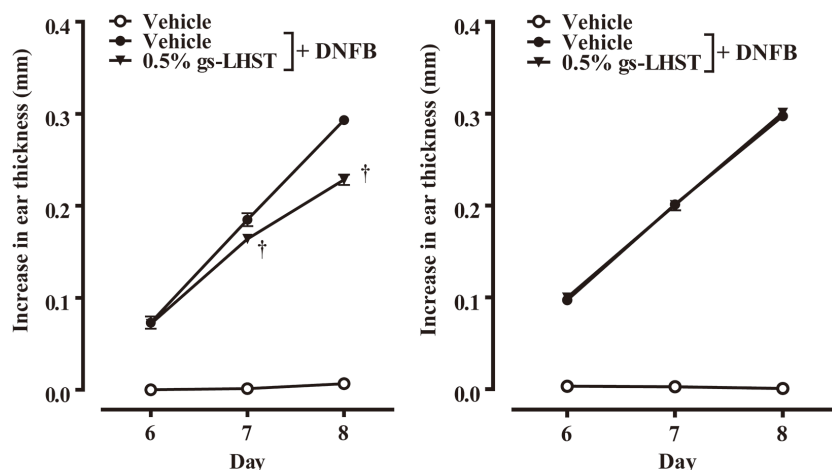


Figure 4 Inhibitory effect of glycol-split low molecular weight heparin conjugate (gs-LHST)-containing ointment on 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB)-induced ear thickening in C3H/HeN (left) and C3H/HeJ (right) mice.

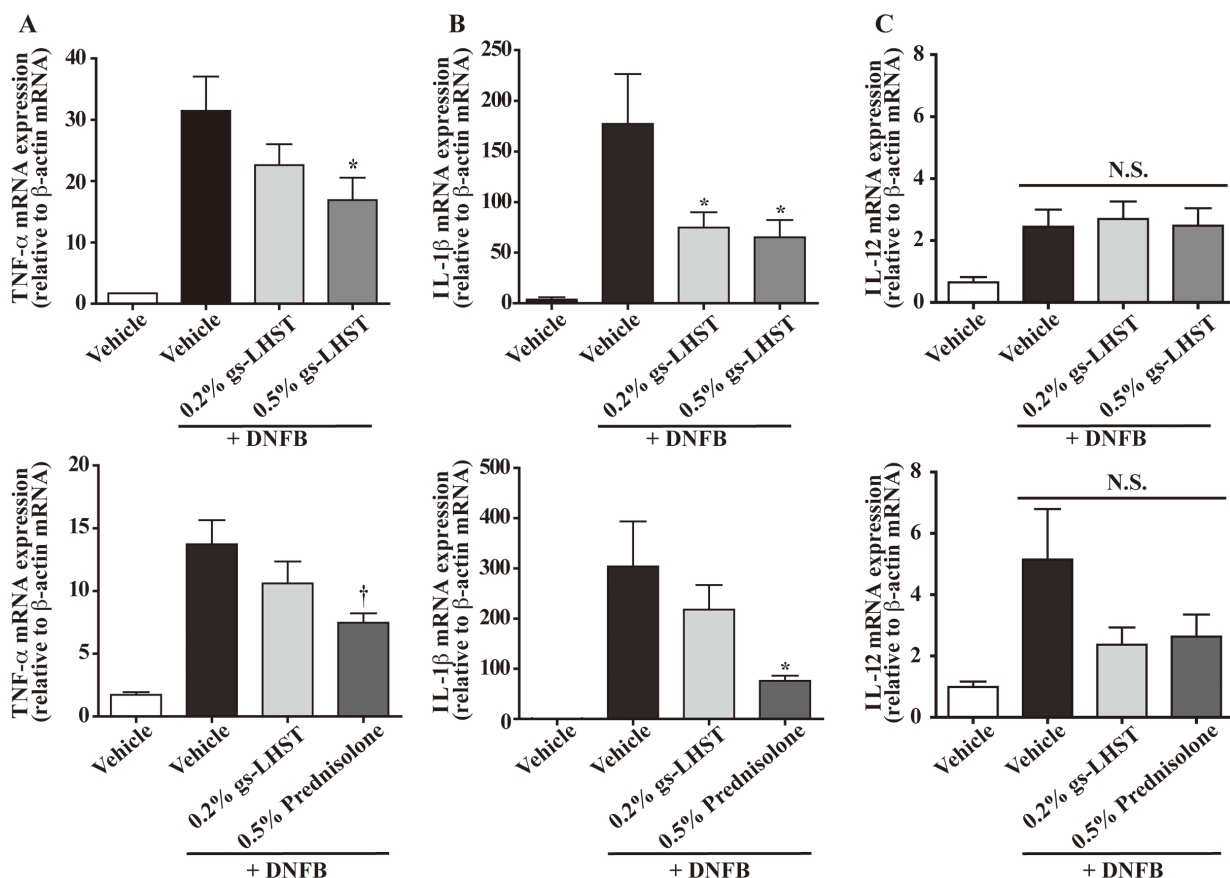


Figure 5 Effect of glycol-split low molecular weight heparin conjugate (gs-LHST) on (A) TNF- α , (B) IL-1 β , and (C) IL-12 mRNA expression in a 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB)-induced mouse contact dermatitis model.

Mouse pinnae were treated for three consecutive days with (upper) 0.2% or 0.5% gs-LHST ointment, (lower) 0.2% gs-LHST or 0.5% prednisolone ointment. The vehicle group was treated with the drug-free ointment base. After 2 h mouse pinnae were stimulated with solution containing 0.3 % DNFB. At 24 h post the last stimulation with DNFB, mRNA was extracted from pinnae and analyzed by real-time PCR. Each value represents the mean $\pm$ S.E. (n = 7-8). *P < 0.05. †P < 0.01.

とから^{1,4)}、酸化ストレス応答性転写因子Nrf-2によって転写活性化されるヘム酸化酵素 (HO-1) およびNAD (P) Hキノン還元酵素 (NQO-1) の発現を測定したところ、gs-

LHST 含有軟膏塗布することによって軽微ではあるもののHO-1 のmRNA 発現が有意に減少した。

4. 考 察

我々の過去の検討では、グリコール開裂ヘパリンにD-エリスロスフィンゴシンを結合させた誘導体で、LPS刺激マクロファージにおける抗炎症反応の抑制効果が観察された^{9, 10)}。しかし、本研究においてD-エリスロスフィンゴシンをステアリルアミンに変更しても有効であり、より安価にヘパリンナノ粒子による抗炎症効果が期待できることが示された。また、多くのグリコサミノグリカンが抗炎症作用をもつということから¹⁴⁻¹⁶⁾、本研究では各種グリコサミノグリカンを用いて検討を行ったところ、脂肪族アミンの修飾によるナノ粒子化による抗炎症効果の増大は、ヘパリンに限らずコンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸においても認められ、普遍性をもつことが明らかとなった。ただし、抗炎症効果の強さはグリコサミノグリカンの種類によって異なり、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸の順であった。その原因の一つとして、グリコサミノグリカンの硫酸化度の違いが考えられる。ヘパリンは高度に硫酸化されたグリコサミノグリカンであり2糖繰り返し構造あたり平均2～3分子硫酸化されている。これに対し、コンドロイチン硫酸はヘパリンに比べて硫酸化度が低く2糖繰り返し構造あたり平均0～2分子しか硫酸化されておらず、ヒアルロン酸では全く硫酸化されていない¹⁴⁾。グリコサミノグリカンの硫酸化度はタンパクとの相互作用に影響することが示されており、例えばTGF- β に対する結合力はグリコサミノグリカンの硫酸化度が上昇するにつれて増大する¹⁷⁾。今回の検討でも、LPS刺激に対するTNF- α 産生抑制効果は、グリコサミノグリカンの硫酸化度とよく対応していた。また、我々の過去の研究では、ヘパリン骨格中の6位の硫酸基を脱硫酸化した際には抗炎症効果が減弱することを明らかにしている⁹⁾。6位の硫酸基を持たないヒアルロン酸においてTNF- α 産生抑制効果が著しく低かったのは極めて合理的な結果である。

接触性皮膚炎の惹起相では、ハプテンによる再感作によりT細胞や顆粒球の浸潤、角化細胞の増殖が起こり、ハプテンが接触した部位で肥厚が生じる⁸⁾。本研究では、グリコール開裂低分子量ヘパリン-ステアリルアミン結合体gs-LHSTを含有するポリエチレングリコール水性軟膏を投与すると、DNFBで誘発される接触性皮膚炎による肥厚が有意に抑制された。しかし、TLR4遺伝子に変異のあるC3H/HeJマウスではDNFBによる耳介肥厚が起こるものの、gs-LHST含有軟膏の効果は観察されなかった。in vitroにおいてgs-LHSTの抗炎症反応抑制効果はLPSに特異的であり、他のTLRアゴニストでは認められないことを併せて考えると、DNFB誘発接触性皮膚炎に対する抗炎症効果はTLR4を介していることが示唆される。一般に、ハプテンによる接触性皮膚炎において活性酸素種が発生す

ることが知られており^{1, 4)}、酸化ストレスにより熱ショックタンパク質や酸化脂質などのダメージ関連分子パターン(DAMPs)が産生され、DAMPsがTLR4を刺激し再び活性酸素種が産生するという炎症サイクルが提唱されている^{4, 18)}。本研究においてもDNFB処理によって酸化ストレスマーカー遺伝子であるHO-1やNQO-1の発現上昇が認められており、活性酸素種の産生が起こっていることは確実である。gs-LHST含有軟膏を投与した際には、NQO-1では無効であったものの、代表的な酸化ストレス因子であるHO-1のmRNA発現は有意に抑制されており、gs-LHSTによるTLR4シグナル経路の抑制が酸化ストレスを介した炎症サイクルの活性化抑制に関与している可能性が示唆された。

5. 総 括

本研究では、各種グリコサミノグリカン-ステアリルアミン結合体を合成し、グリコール開裂低分子量ヘパリン-ステアリルアミン結合体gs-LHSTがLPSによる炎症反応の抑制に最も有効であることを明らかにした。さらに、DNFB誘発接触性皮膚炎モデルに対して、gs-LHST含有水性軟膏を適用したところ、マウス耳介の肥厚および炎症性サイトカインや酸化ストレスマーカー遺伝子の発現を有意に抑制することを見出した。その効果にはgs-LHSTによるTLR4シグナル経路の遮断が一部関与することが示唆された。これらの結果は、ハプテンによる接触性皮膚炎に対する治療や予防に有用な知見を提供するものと期待される。

(引用文献)

- 1) Kaplan, D. H., Igyártó, B. Z., Gaspari, A. A., Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nat. Rev. Immunol.*, **12**, 114-124 (2012).
- 2) Ptak, W., Bryniarski, K., Ptak, M., Majewska, M., Gamian, A., Lobo, F. M., Szczepanik, M., Toll-like receptor ligands reverse suppression of contact hypersensitivity reactions induced by epicutaneous immunization with protein antigen. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **139**, 188-200 (2006).
- 3) Nakamura, N., Tamagawa-Mineoka, R., Ueta, M., Kinoshita, S., Katoh, N., Toll-like receptor 3 increases allergic and irritant contact dermatitis. *J. Invest. Dermatol.*, **135**, 411-417 (2015).
- 4) Martin, S., Esser, P., Weber, F., Jakob, T., Freudenberg, M., Schmidt, M., Goebeler, M., Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis. *Allergy*, **66**, 1152-1163 (2011).
- 5) Yusuf, N., Nasti, T. H., Huang, C. M., Huber, B.

- S., Jaleel, T., Lin, H. Y., Xu, H., Elmets, C. A., Heat shock proteins HSP27 and HSP70 are present in the skin and are important mediators of allergic contact hypersensitivity. *J. Immunol.*, **182**, 675-683 (2009).
- 6) Yokoi, S., Nüzeki, H., Iida, H., Asada, H., Miyagawa, S., Adjuvant effect of lipopolysaccharide on the induction of contact hypersensitivity to haptens in mice. *J. Dermatol. Sci.*, **53**, 120-128 (2009).
- 7) Schmidt, M., Raghavan, B., Müller, V., Vogl, T., Fejer, G., Tchaptchet, S., Keck, S., Kalis, C., Nielsen, P. J., Galanos, C., Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nat. Immunol.*, **11**, 814-819 (2010).
- 8) Grabbe, S., Schwarz, T., Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Immunol. Today*, **19**, 37-44 (1998).
- 9) Babazada, H., Yamashita, F., Yanamoto, S., Hashida, M., Self-assembling lipid modified glycol-split heparin nanoparticles suppress lipopolysaccharide-induced inflammation through TLR4-NF- κ B signaling. *J. Controlled Release*, **194**, 332-340 (2014).
- 10) Babazada, H., Yamashita, F., Hashida, M., Suppression of experimental arthritis with self-assembling glycol-split heparin nanoparticles via inhibition of TLR4-NF- κ B signaling. *J. Controlled Release*, **194**, 295-300 (2014).
- 11) Campo, G. M., Avenoso, A., Campo, S., D'Ascola, A., Traina, P., Samà, D., Calatroni, A., Glycosaminoglycans modulate inflammation and apoptosis in LPS-treated chondrocytes. *J. Cell. Biochem.*, **106**, 83-92 (2009).
- 12) Campo, G. M., Avenoso, A., Campo, S., Traina, P., D' Ascola, A., Calatroni, A., Glycosaminoglycans reduced inflammatory response by modulating toll-like receptor-4 in LPS-stimulated chondrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **491**, 7-15 (2009).
- 13) Aguiar, J., Carpena, P., Molina-Bolivar, J., Ruiz, C. C., On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1: 3 ratio method. *J. Colloid Interface Sci.*, **258**, 116-122 (2003).
- 14) Page, C., Heparin and related drugs: Beyond anticoagulant activity. *ISRN pharmacology*, **2013**, 910743, (2013).
- 15) Mazieres, B., Combe, B., Phan Van, A., Tondut, J., Grynfeldt, M., Chondroitin sulfate in osteoarthritis of the knee: a prospective, double blind, placebo controlled multicenter clinical study. *J. Rheumatol.*, **28**, 173-181 (2001).
- 16) King, S. R., Hickerson, W. L., Proctor, K. G., Beneficial actions of exogenous hyaluronic acid on wound healing. *Surgery*, **109**, 76-84 (1991).
- 17) Hintze, V., Miron, A., Moeller, S., Schnabelrauch, M., Wiesmann, H., Worch, H., Scharnweber, D., Sulfated hyaluronan and chondroitin sulfate derivatives interact differently with human transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1). *Acta Biomaterialia*, **8**, 2144-2152 (2012).
- 18) Lucas, K., Maes, M., Role of the Toll Like receptor (TLR) radical cycle in chronic inflammation: possible treatments targeting the TLR4 pathway. *Mol. Neurobiol.*, **48**, 190-204 (2013).