

Общество с ограниченной ответственностью «Химвэй Лимитед»

УДК 547.995.15

Бреева Н.В.

Обзор основных методов получения и применения гиалуроновой кислоты и препаратов на ее основе.

Москва, 2020

Организация-депонент: Общество с ограниченной ответственностью «Химвэй Лимитед»

Название работы: Обзор основных методов получения и применения гиалуроновой кислоты и препаратов на ее основе.

Авторы:

Бреева Н.В. (07.10.1977), ООО «Химвэй Лимитед» г. Москва, Российская Федерация

Реферат: В обзоре дан краткий исторический очерк об открытии и комплексном изучении гиалуроновой кислоты. В сравнительном плане проведена систематизация данных научной литературы по особенностям химического строения, физико-химических свойств, применения гиалуроновой кислоты различной молекулярной массы и препаратов на ее основе. Проанализированы традиционные технологии извлечения гиалуроновой кислоты из животного сырья и способы ее получения на основе инновационных биотехнологий. Представлены сведения о применении продукции на основе гиалуроновой кислоты в медицине и косметологии.

Ключевые слова: гиалуроновая кислота, технологии микробного синтеза, биотехнология

Язык: рус.

Страниц: 30

Ил.: да

Библ.: 36

Title: Review of basic methods of production and use of hyaluronic acid and its based preparations.

Authors: Breeva N.V. *Chemway Limited Go LTD*, Moscow, Russian Federation

Abstract: The review provides a brief historical essay on the discovery and integrated study of hyaluronic acid. In comparative terms, the data of scientific literature on the peculiarities of chemical structure, physical and chemical properties, use of hyaluronic acid of different molecular weight and preparations based on it were systematized. Traditional technologies of hyaluronic acid extraction from animal raw materials and methods of its production based on innovative biotechnologies are analyzed. Information on the use of hyaluronic acid products in medicine and cosmetology is presented.

Key Words: hyaluronic acid, technologies of microbial synthesis, biotechnology

Содержание

Введение	4
1 .Получение гиалуроновой кислоты	5
1.1. Физико-химический способ: экстракция из животного сырья.	5
1.2.Микробный синтез, продуценты гиалуроновой кислоты.	6
2.Физико-химические свойства гиалуроновой кислоты.	9
3.Физиологические функции ГК на клеточном, тканевом и органном уровнях.	10
4.Значение степени очистки гиалуроновой кислоты.	13
5.Применение гиалуроновой кислоты в медицине и косметологии, зависимость терапевтических эффектов от молекулярной массы гиалуроновой кислоты.	19
6. Заключение.	25
Список литературы	26

Введение

Гиалуроновая кислота (ГК), гиалуронат или гиалуронан – органическое соединение, относящееся к группе несulfатированных глюкозаминогликанов. Данное соединение представляет собой анионный линейный полисахарид с молекулярной массой от 10^5 до 10^7 дальтон, зависящей от способа её получения. ГК является важным компонентом в организме человека. К её биологически активным функциям относят участие в процессах миграции, пролиферации и дифференцировке клеток; регенерации и поддержании водного баланса тканей; участие в ряде взаимодействий с поверхностными рецепторами клеток; обеспечение необходимой вязкости синовиальной жидкости, упругости суставных хрящей.

История ГК начинается с 1934 года, когда появились первые упоминания о полисахариде с очень высокой молекулярной массой. Впервые её выделили из стекловидного тела бычьего глаза. Позже стало известно, что ГК присутствует практически во всех видах тканей живых организмов, а также в сердце и мышцах. В среднем в теле человека весом 70 кг содержится около 15 грамм ГК, при этом 1/3 этого количества преобразуется (расщепляется или синтезируется) каждый день.

Первый в мире лечебный препарат на основе гиалуроновой кислоты был создан и применен в России в 1943 году Н.Ф.Гамалея. [1]. К настоящему времени получены очищенные препараты гиалуроновой кислоты (ГК), которые нашли широкое применение в медицине, косметике, гигиене, фитотерапии, ветеринарии. Создана убедительная исследовательская база, показавшая, что ГК обладает ранозаживляющим, дезинфицирующим, противовоспалительным, восстанавливающим действием.[1-4] Такой широкий спектр терапевтических эффектов основан на физико-химических свойствах молекулы ГК.

В данном обзоре дан краткий исторический очерк об открытии и комплексном изучении гиалуроновой кислоты. В сравнительном плане

проведена систематизация данных научной литературы по особенностям химического строения, физико-химических свойств, применения гиалуроновой кислоты различной молекулярной массы и препаратов на ее основе. Проанализированы традиционные технологии извлечения гиалуроновой кислоты из животного сырья и способы ее получения на основе инновационных биотехнологий.

Представлены сведения о применении продукции на основе гиалуроновой кислоты в различных сферах современной жизни.

1. Получение Гиалуроновой кислоты.

Все известные способы получения гиалуроновой кислоты можно разделить на две основные группы: физико-химический способ, который заключается в экстрагировании гиалуроната из тканей животного сырья млекопитающих, других позвоночных животных и птиц; и микробный метод получения ГК на основе бактерий-продуцентов. Ниже будет рассмотрен каждый из них.

1.1. Физико-химический способ: экстракция из животного сырья.

Гиалуроновая кислота встречается во многих тканях млекопитающих и птиц, и, в зависимости от гистологической принадлежности, содержание гиалуроновой кислоты и ее молекулярная масса могут варьировать. Кроме того, в различных тканях гиалуронат может находиться в комплексах с белками и родственными полисахаридами, что затрудняет его очистку с последующим выделением.

В настоящее время для промышленного получения используют петушиные гребни из-за доступности сырья и высокого содержания биополимера. [5] Однако, в литературе так же широко, описаны разнообразные способы выделения гиалуроната на основе стекловидного тела глаз крупного рогатого скота, синовиальной жидкости, суставных сумок, свиной кожи, плазмы крови и хрящевой ткани [6]. При выделении

биополимера прибегают к различным приёмам выделения: гомогенизация, экстракция, фракционное осаждение и т.п. Любая процедура выделения гиалуронана включает предварительное разрушение органов и тканей, содержащих биополимер, и белково-углеводных комплексов. Разрушение достигается посредством применения методов измельчения и гомогенизации [7]. После, полученную гомогенизированную жидкость подвергают экстракции с использованием водно-органических растворителей. Экстракция производится смесью ацетона с хлороформом (удаление белка), водой, либо водно-спиртовой смесью (пропионовый, трет-бутиловый спирты, амиловый спирт с этанолом) с последующей сорбцией на активированном угле, посредством электрофореза или на ионообменной смоле. От примесей мукополисахаридов биополимер очищают методом осаждения хлоридом цетирпиридиния или посредством ионообменной хроматографии. Экстракция производится смесью ацетона с хлороформом (удаление белка), водой, либо водно-спиртовой смесью (пропионовый, трет-бутиловый спирты) с последующей сорбцией на активированном угле, посредством электрофореза или на ионообменной смоле .

1.2. Микробный синтез, продуценты гиалурононовой кислоты.

Экономически более выгодным по сравнению с физико-химическим способом является метод микробного синтеза гиалурононовой кислоты на основе бактериальных штаммов-продуцентов. Такой синтез при введении его в масштабы производства, будет иметь меньше издержек, таких как затраты на животное сырье и зависимость от сезонных поставок. И, напротив, производство гиалуронана на основе микробного синтеза позволит масштабировать производство и получить продукт высокой степени очистки, не содержащий примесей, а, следовательно, имеющий низкую аллергенность. С момента открытия способности бактерий к синтезу гиалурононовой кислоты, постоянно ведутся исследования возможности получения искомого полимера биотехнологическим путем, т. е. путем культивирования бактерий-

продуцентов на питательных средах определенного состава в строго заданных условиях с последующим выделением целевого продукта. К продуцентам гиалуронана можно отнести капсулообразующие бактерии родов *Streptococcus* и *Pasteurella* [8,9].

К штаммам-продуцентам предъявляется ряд требований:

- отсутствие патогенности и, особенно, гемолитической активности;
- способность к синтезу высокомолекулярной гиалуроновой кислоты;
- большие размеры капсул с высоким содержанием биополимера (капсулы при этом должны легко отделяться, желательно при экстракции);
- отсутствие гиалуронидазной активности, чтобы исключить потери целевого продукта;
- высокая способность к росту, при этом наиболее полное использование субстрата;
- сохранение стабильности физиолого-биохимических свойств.

Исследования в области поиска штамма, способного удовлетворить потребности в биополимере и соответствующего всем параметрам, привели к *Streptococcus equi* subsp. *equi*. и *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*[10]. Дикие типы стрептококков синтезируют внеклеточные белки, что снижает выход биополимера. Поэтому для получения воспроизводительных гиалуронидазанегативных, не гемолитических штаммов, проводили их модификацию посредством химического и УФ-индуцированного мутагенеза или ненаправленного мутагенеза с последующей селекцией.

Культивирование бактерий рода *Streptococcus* с целью получения ГК осуществляется, как правило, в периодических условиях. Питательную среду готовят однократно, растворяя необходимые компоненты среды в воде, после чего среду стерилизуют. Источник углерода стерилизуется отдельно. После засева за ходом ферментации следят по потреблению субстрата, росту концентрации клеток, образованию продукта (ГК), продуктов метаболизма, изменению pH среды. Максимальная концентрация ГК составляет

приблизительно 5 г/л. Дальнейший рост содержания в среде ГК ведет к многократному возрастанию вязкости КЖ, резкому ухудшению массообменных характеристик процесса ферментации, трудностям при аэрировании и перемешивании. Концентрация ГК при периодической или периодической с подпитками по субстрату ферментации достигает заданного значения за 6 - 26 часа. Как правило, после выхода культуры в стационарную фазу процесс завершают. Клетки микроорганизмов инактивируют прогреванием при 60 -80 °С. Биомассу отделяют одним из хорошо известных способов - флокуляцией, сепарированием, центрифугированием, фильтрованием. ГК из КЖ осаждают органическими растворителями или катионными ПАВ. Очистку проводят с помощью ультрафильтрационных методов, пересадки или хроматографией.

Генно-инженерные штаммы кишечных палочек, полученные на основе методов экспрессии оперонов, кодирующих синтез гиалуронатсинтазы стрептококков на матрицу бактерий, в настоящее время не применяются, ввиду низких показателей выхода биополимера. Исключением можно считать генно-инженерный штамм *Bacillus subtilis*, показывающий высокие результаты выхода биополимера, при росте на сложных ферментированных средах. Метод включает культивирование клетки-хозяина *Bacillus* в условиях, подходящих для продуцирования гиалуроновой кислоты, при этом клетка-хозяин *Bacillus* содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, включающую последовательность, кодирующую гиалуронансинтазу, функционально связанную с промоторной последовательностью, чужеродной в отношении последовательности, кодирующей гиалуронансинтазу; и извлечения гиалуроновой кислоты из среды культивирования [11].

2. Физико-химические свойства гиалуроновой кислоты.

ГК состоит из глюкуроновой кислоты и глюкозамина, у которого один из атомов водорода аминогруппы замещен на остаток уксусной кислоты. Повторяющейся единицей ГК служит дисахарид, состоящий из остатков D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина, соединенных β -(1 — 3)-связью. Дисахаридные единицы соединены β -(1—4) связью линейно. (Рис.1). Это полисахарид из класса гликозаминогликанов. Карбоксильная группа при физиологических значениях pH диссоциирована и несет отрицательный заряд - является полианионом. Высокая плотность отрицательных зарядов обеспечивает взаимодействие ГК с катионами (Na^+ , K^+ , Zn^{++} , Se^{++} и др), которые являются осмотически активными. Поэтому ГК несет большое количество связанной и свободной воды [12], гипергидратирована.

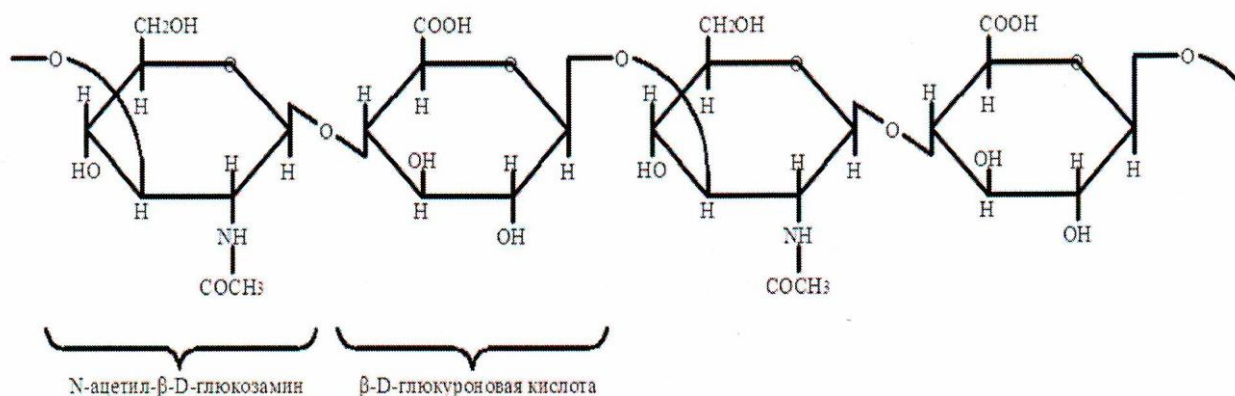


Рисунок 1. Фрагмент молекулы гиалуроновой кислоты

Молекула ГК имеет линейную неразветвленную структуру средней длины $\sim 2,4$ микрометра [13], молекулярную массу $1 \div 9 \cdot 10^6$ дальтон. В водных растворах молекулы ГК имеют беспорядочную винтовую конфигурацию, сильно выраженное межмолекулярное взаимодействие и сплетение соседних молекул [14]. Каждая молекула ГК удерживает до 200-500 молекул воды. Отсюда создается исключительно высокий гидродинамический объем, который в 10 раз больше, чем в негидратированном полисахариде. В результате уже при низких

концентрациях (~ 1%) в водных растворах ГК формирует трехмерную сетку, которая хотя и не является истинным гелем, но во многих отношениях ведет себя как гель. Она обладает очень высокой вязкостью, эластичностью, избирательной проницаемостью (является «молекулярным ситом»). Все эти вытекающие из физико-химических свойств молекул макрохарактеристики растворов ГК определяют молекулярно-биологические, терапевтические и физиологические функции ГК и пути ее практического использования.

3. Физиологические функции ГК на клеточном, тканевом и органном уровнях.

ГК локализована на поверхности клеточных мембран (экстрацеллюлярный матрикс), в «межклеточном цементе» - гелеобразном основном веществе, заполняющим пространство между клетками в тканях позвоночных животных. Поэтому она вовлечена в процессы размножения, дифференцировки и миграции клеток. Кроме того, ГК в больших количествах содержится в коже, синовиальной жидкости суставных сумок, глазном яблоке, хрящах, сухожилиях, где выполняет биомеханические, биореологические, защитные функции, функции смазки, «молекулярного сита» и во многом определяет структуру, свойства и функционирование органов. Таким образом, локализация ГК на молекулярном, клеточном, тканевом и органном уровнях, да еще в разных концентрациях, а так же в различных молекулярных параметрах, разной скоростью синтеза и деполимеризации (соотношений скоростей синтеза и распада) создают широкий спектр физиологических функций ГК от регуляторных, регенераторных, защитных, биостимулирующих до биомеханических.

Регуляторные функции ГК следует обсудить подробнее, т.к. это новое направление исследований, которое становится «точкой роста» молекулярной и клеточной инженерии и, возможно, технологий лечения раковых опухолей и их метастазов. В общих терминах это направление можно описать следующим образом. На поверхности клетки ГК связывается

специфическими белками (рецепторами). К настоящему времени выявлено несколько таких специфических рецепторных белков, которые являются трансмембранными (проходят через мембрану клетки) белками и имеют в своей структуре три характерных фрагмента (сайта). Первый фрагмент расположен на поверхности клетки и обеспечивает специфическое связывание с ГК. Второй фрагмент проходит через мембрану клетки. Третий локализован внутри клетки. Последний обладает каталитической функцией (ферментативной активностью) и влияет на биохимические процессы в клетке вплоть до активации - ингибирования матричных биосинтезов в ядре (синтез ДНК, РНК и в конечном счете синтез белков) и метаболизм в целом. Таким образом, имеется прямой путь передачи регуляторных сигналов с поверхности клетки в ядро. В начале этого пути «вмонтирована» ГК. Через такую сигнальную цепь происходит активация или торможение пролиферации (размножения), миграции клеток, процессов заживления ран. Конкретный пример того как «работает» эта сигнальная система. Трансформированные канцерогенные клетки с высокой двигательной активностью снижали ее при добавлении гиалуроната (натриевая соль гиалуроновой кислоты) в концентрации 0,001-0,1 микрограмм на мл. [15]. В этой же работе показано, что гиалуронан регулирует активность чазгена, который участвует в запуске размножения клеток (он активен в размножающихся клетках и неактивен в покоящихся). Эффект гиалуроната подавляется белком (CD44), который специфически связывается с гиалуронатом.

В другой работе [16] отчасти расшифровывается механизм описанных феноменов. Оказалось, что фрагмент белка, который локализован на внешней поверхности клетки и специфически связывается с ГК, может отщепляться с помощью мембраносвязанной протеазы. Именно этот разрыв сигнальной цепи регулирует функцию клеточной миграции. Этот же белок играет важную роль в иницировании воспалительных реакций [17]. Повышенное сродство этого белка к гиалуронату свидетельствует о том, что

именно взаимодействия белка с ГК участвуют в регенерации гиалуронан-зависимой клеточной адгезии (соединении клеток), подвижности мембраны клетки, клеточной миграции и метастазировании раковых клеток. Предполагается, что связывание гиалуронана белком CD44 препятствует апоптозу(разрушению опухолевых клеток) [17].

Анализ достаточно обширной, но пока противоречивой научной литературы по молекулярным и клеточным механизмам физиологического действия ГК и связываемых ею белков говорит о том, что ГК задействована в фундаментальных процессах клеточной пролиферации, дифференцировки, канцерогенеза и метастазирования. Замечательно то, что с помощью различных фракций ГК можно влиять (или можно будет влиять) на эти процессы с поверхности клетки, не «залезая внутрь». Это научное направление, бесспорно, будет развиваться и приносить новые технологии лечения с помощью ГК.

Другое важное направление исследований, связанное с функционированием ГК в живых клетках - ангиогенез (рост кровеносных и лимфатических сосудов). Феномен индукции (стимуляции) ангиогенеза продуктами разрушения ГК (низкомолекулярной ГК) описан в 1985 году в работе [18]. Однако научные публикации в этом направлении малочисленны. Прорастание кровеносных сосудов в опухоли представляет важную проблему в онкологии. Подавление этого процесса может иметь выход в технологии лечения опухолевых заболеваний.

В учении о регенерации (восстановлении) тканей составной частью входит концепция о стволовых клетках. Прямых работ о причастности ГК в дифференцировке и функционировании стволовых клеток нами не найдены.

4.Значение степени очистки гиалуроновой кислоты.

Выше было уже отмечено, что комплексы ГК с белками инициируют воспалительные реакции, обладают аллергенным действием. Чистая ГК из любых источников не является антигеном и аллергеном, биосовместима с разными тканями, т.к. в процессе эволюции животных она не претерпела никаких изменений. Антигенным действием обладают главным образом белковые примеси, которые присутствуют в препаратах ГК. Сверхчистая ГК содержит не более 0,2% примесей белков.

Существует множество методов очистки, однако наилучшая очистка ГК достигается комбинацией ряда методов, которые фирмы, как правило, не расшифровывают. Стоимость ГК фармакопейной чистоты иногда в несколько десятков раз выше стоимости неочищенных коммерческих препаратов. Идентификационные характеристики гиалуроновой кислоты можно установить несколькими способами, некоторые из которых описаны в [19].

Одним из них является инфракрасная спектроскопия с использованием преобразования Фурье (FT-IR). Почти все органические химические соединения поглощают инфракрасное излучение на частотах, которые характерны для функциональных групп в соединении. Анализ гиалуронового порошка с помощью спектроскопии Фурье является наиболее простым способом. Типичные частоты, см^{-1} для натриевой соли гиалуроновой кислоты: 3275—3390; 1615; 1405; 1377; 1150; 1077; 1045; 946; 893. Типичный спектр Фурье представлен на рисунке 2.

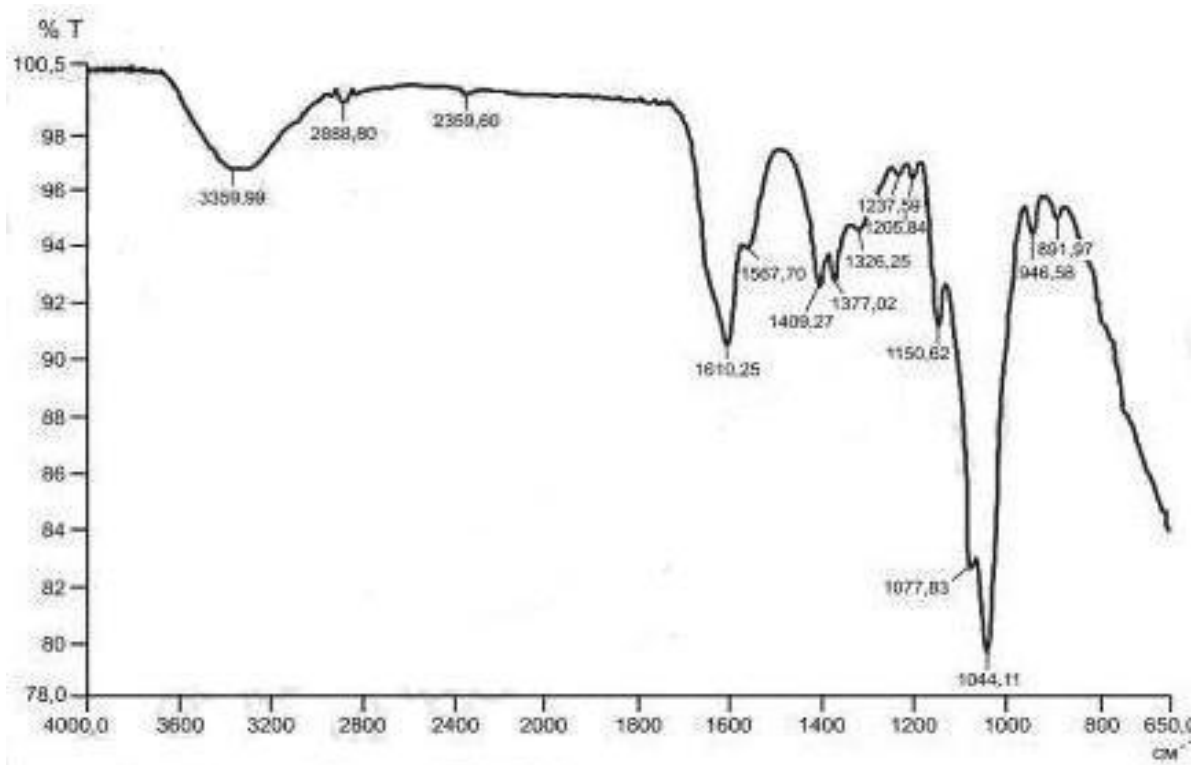


Рисунок 2-ИК-спектр гиалуроновой кислоты с преобразованием Фурье, натриевая соль с использованием нарушенного полного внутреннего отражения.

Так же состав и последовательность структуры гиалуроновой кислоты можно определить при помощи ядерной магнитно-резонансной (ЯМР) спектроскопии с высоким разрешением ^1H и ^{13}C . На рисунке 3 представлен типичный ЯМР-спектр с разрешением ^1H . Литературные ссылки, касающиеся определения состава и структуры гиалуронатов, приведены в [20]—[23].

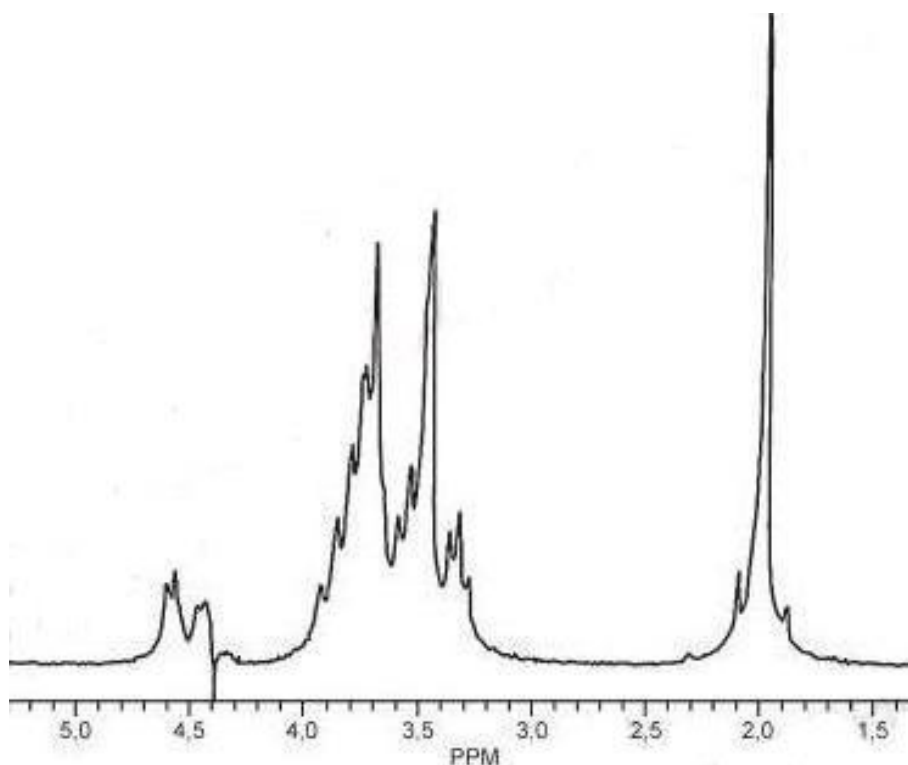


Рисунок 3.- ¹H ЯМР-спектр гиалуроната из петушиного гребня.

Молекулярная масса (молекулярный вес) ГК будет определять эксплуатационные характеристики, такие как вязкость и/или прочность геля. Молекулярная масса может быть определена по характеристической вязкости. Характеристическая вязкость описывает способность гиалуроновой кислоты образовывать водные растворы и является прямопропорциональной величине средней молекулярной массы полимера (M), не зависит от концентрации полимера и вычисляется в капиллярном вискозиметре по уравнению Марка-Куна-Хаувинка:

$$[\eta] = KM^{\alpha} \quad (1)$$

Для натриевой соли гиалуроновой кислоты константа K составляет 0.00057, показатель α — 0.75 при следующих условиях: 0,15M NaCl в фосфатном буфере, pH 7,5. температура 20 °C .

Молекулярная масса так же может быть определена по закону капиллярного течения Пуазейля.

Перепад давления ΔP жидкости, протекающей через капилляр, измеренный датчиком перепада давления, прямо пропорционален вязкости и вычисляется по соотношению:

$$\Delta P = \eta \cdot Q \cdot R. \quad (2)$$

где η — вязкость:

Q — скорость течения жидкости:

R — радиус капилляра.

Удельная вязкость $\eta_{уд}$ взаимосвязана с относительной вязкостью $\eta_{отн}$ и вычисляется по соотношению:

$$\eta_{уд} = \eta_{отн} - 1$$

Характеристическую вязкость η_x вычисляют по соотношению:

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_{уд}}{C} \right)$$

где C — концентрация раствора.

По значениям характеристической вязкости можно рассчитать молекулярный вес с использованием уравнения Марка-Куна-Хаувинка.

Определение молекулярной массы и полидисперсности разделением гиалуроновой кислоты на молекулярно-массовые фракции можно осуществить с помощью размерной эксклюзивной хроматографии с детектированием рассеяния угловых лазерных лучей [24].

Оценку качества гиалуроновой кислоты так же можно проводить по следующим показателям:

Вязкость водного раствора

Величина измеряемой вязкости будет зависеть от условий проведения испытаний, зависящих:

- от молекулярной массы.
- температуры, при которой выполняется измерение. Повышение температуры в большинстве случаев, если полимер не сильно поперечно сшит, приводит к уменьшению вязкости. Рекомендуемые температуры — 20 °С, 25 °С или 37 °С;
- концентрации гиалуроновой кислоты;
- ионной силы.

Вязкость раствора гиалуроновой кислоты чувствительна к среде, в

которой производят измерение. Как правило, измерения вязкости должны проводить в среде с заранее установленной ионной силой;

- скорости сдвига. Следует проводить измерение вязкости при нескольких значениях скорости сдвига или путем снятия вязко-скоростных кривых течения.

Возможно использование различного оборудования; ротационных вискозиметров, реометров «конус—пластина».

Водородный показатель pH

Гиалуроновая кислота, как правило, менее устойчива при pH менее 7. Раствор гиалуроновой кислоты при ее концентрации 0.5 % должен быть нейтральным.

Состав примесей

Основными видами примесей ГК являются.

- эндотоксины. Так как эндотоксины являются повсеместно распространенными в природе, стабильными веществами, имеют небольшие размеры, свободно проходя через стерилизационные фильтры. загрязнение эндотоксинами трудно предотвратить. Наиболее простой и легкий метод испытаний — это качественный и количественный гел-тромб-тест (ЛАЛ-тест);

- нуклеиновые кислоты. Возможно содержание нуклеиновых кислот или нуклеотидов. Появление этих примесей обнаруживают спектрофотометрическим путем оценки спектров поглощения при длине волны 260 нм:

- белки. Для определения концентрации белков применяют оптические, колориметрические и азотометрические методы:

- сульфатированные гликозаминогликаны. Возможно содержание сульфатированных гликозаминогликанов. таких как хондроитинсульфат. другие мукополисахаридные сульфаты, определяемые спектрометрическим путем.

- металлы, содержание которых можно определить аналитическим

методом, позволяющим установить их присутствие на уровне 80 ppm. а именно;

- железо.
- тяжелые металлы: свинец, ртуть, висмут, мышьяк, сурьма, олово, кадмий, серебро, медь и молибден.

Суммарная концентрация всех растворенных частиц определена таким показателем, как осмоляльность.

Биобезопасность

При рассмотрении новых препаратов на основе ГК или изменении свойств существующих форм в биомедицинских, фармацевтических, тканеинженерных применениях следует подтвердить их биобезопасность в соответствии с действующей нормативной документацией, например ГОСТ ISO 10993-1; ГОСТ ISO 10993-9; ГОСТ ISO 10993-17; ГОСТ Р ИСО 22442-1; ГОСТ Р ИСО 22442-3, уделив особое внимание следующим характеристикам:

- микробиологическая безопасность, проведение микробиологических испытаний которой описано в действующих стандартах, например: ГОСТ ISO 11737-1; ГОСТ ISO 11737-2; ГОСТ Р ИСО 13408-1;
- стерильность: стерилизация может быть осуществлена различными альтернативными методами. Метод стерилизации может влиять на физические, химические и функциональные свойства, поэтому следует обратиться к соответствующим стандартам относительно стерилизации медицинских изделий, например ГОСТ Р ИСО 10993-7; ГОСТ ISO 14160;
- стабильность свойств изделий, которая при хранении должна быть подтверждена, так как условия хранения могут влиять на эксплуатационные свойства .

5. Применение гиалуроновой кислоты в медицине и косметологии, зависимость терапевтических эффектов от молекулярной массы гиалуроновой кислоты.

Многочисленные исследования ГК показали, что молекулы полисахарида с разной длиной цепи оказывают разные эффекты на молекулярном, клеточном, тканевом и органном уровнях. Так, ГК с молекулярной массой менее 30000 дальтон способствует развитию воспалительных реакций, а так же стимулирует рост кровеносных сосудов (ангиогенез).

Фракция с молекулярной массой 50000 - 100000 дальтон наиболее активно стимулирует размножение и миграцию клеток - необходимое свойство для заживления ран. Высокомолекулярная фракция (более 500000 дальтон) подавляет размножение клеток, их миграцию и ангиогенез, на молекулярном уровне ингибирует синтез интерлейкина 1В и простагландина Е2, медиаторов воспаления. Именно поэтому высокомолекулярная фракция ГК широко применяется в офтальмологии, в лечении артритов, псориаза и др. заболеваний

Внедрение в клиническую практику препаратов ГК рассматривается как качественный скачок в лечении остеоартрозов коленных суставов. Показано, что гиалуронат с молекулярной массой 6000000 дальтон более эффективен по сравнению с препаратом молекулярной массы 500000 - 730000 дальтон в лечение остеоартрозов(ОА).

Остеоартроз (ОА) относится к числу наиболее распространенных заболеваний опорно-двигательного аппарата. По данным российской статистики, в стране в 2013 г. наблюдалось с диагнозом «остеоартроз» более 4,1 млн человек, показатель общей заболеваемости составлял 3532,0 на 100 тыс. населения [25], а в 2014 г. – 3618,2 на 100 тыс. населения [26]. Высок удельный вес временной нетрудоспособности и инвалидности при ОА. Остеоартроз понимается как клинический синдром, объединяющий гетерогенную группу заболеваний различной этиологии, но со сходными

биологическими, морфологическими и клиническими проявлениями и исходом, в основе которых лежит поражение всех компонентов сустава, в первую очередь – хряща, а также субхондральной кости, синовиальной оболочки, связок, капсулы и периартикулярных мышц . Факторы, определяющие возникновение и прогрессирование данного заболевания, разнообразны, к их числу относятся условия жизни .

Значимость проблемы ОА подкрепляется тем, что существенная часть больных данным заболеванием имеют коморбидную патологию, к числу наиболее часто встречающихся сопутствующих заболеваний отнесены сердечно-сосудистые (ишемическая болезнь сердца, артериальная гипертензия, хроническая сердечная недостаточность), сахарный диабет и ряд других .Все они способствуют уменьшению физической активности пациента и нарушению питания хряща, а также запускают каскады провоспалительных цитокинов .

Воздействие на функцию клеток гиалуроновой кислотой происходит за счет взаимодействия с CD44-клеточным рецептором; это взаимодействие ингибирует деградацию протеогликанов, апоптоз хондроцитов, а также образование матричных металлопротеиназ. В результате гиалуроновая кислота препятствует разрушению хряща и способствует регенерации хондроцитов .

Внутрисуставное введение ГК является лидером в терапии ОА различных локализаций. Стимулирование эндогенного синтеза ГК синовиоцитами может быть осуществлено введением факторов роста (PDGF, IGF, TGF) или активированной кондиционированной сыворотки (ACS), содержащей дополнительно высокие концентрации IL-1ra Таким образом, локальная терапия ACS является эффективным методом лечения ОА коленных суставов. Внутрисуставное введение ACS способствует значительному уменьшению клинических проявлений ОА коленных суставов по сравнению с терапией ГК. Стимуляция синтеза эндогенной ГК методами биологической терапии, отдельными цитокинами или их комбинациями

может стать перспективным методом локальной терапии ОА.[27]

Наиболее широкое применение в клинической практике получил препарат «Стимфорте». Согласно экспериментальным данным, основным индуктором продукции провоспалительных цитокинов в препарате «Стимфорте» являются нейтральный и кислый гиалуронаны с молекулярной массой от 3 до 20 кДа. Они обеспечивают 60–80% индукции противоопухолевого иммунитета. Стимфорте – иммуномодулирующий препарат, полученный из тканей животных и обладающий противовирусной и противоопухолевой активностью. По данным, полученным в результате гель-фильтрации на колонке Silica, основное вещество, определяющее активность препарата, имеет молекулярную массу не менее 3 кДа. Механизм действия стимфорте во многом сходен с искусственно синтезированными производными бактериальных стенок – липопептидом, мурабутидом и ромбутидом.[28]

Целесообразность и клиническая эффективность использования препаратов гиалуроновой кислоты остаются предметом дискуссий. В частности, обсуждается метаанализ, который показывает эффективность всего на уровне 0,34 (0,22–0,46), однако подкупает продолжительность позитивного действия на протяжении 6 мес, что делает возможность использования данного вида терапии чрезвычайно перспективной. Значительный эффект, по данным разных авторов, определяется между 5-й и 13-й неделями после введения, но клиническое улучшение определяется также через 14–26 нед, а у некоторых пациентов и дольше. Применение препаратов гиалуроновой кислоты обеспечивает отсрочку потребности в эндопротезировании сустава, они оказывают анальгетический эффект, сходный с таковым нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП); все это делает данную группу препаратов уникальной. По мнению авторитетных экспертов наибольший эффект препаратов гиалуроновой кислоты отмечается при назначении их в ранней стадии ОА, но он присутствует и в поздней стадии заболевания, когда невозможно провести

хирургическое вмешательство .В последнее время в Российской Федерации проводится государственная политика, направленная на импортозамещение лекарственных препаратов .

Учитывая широкую распространенность ОА, возникает обоснованная необходимость обеспечения пациентов отечественными лекарствами. К числу отечественных препаратов гиалуроновой кислоты относится ИНТРАДЖЕКТ®, который производится путем бактериальной ферментации в соответствии со стандартами качества MDD, ISO и GMP, не содержит животных белков и за счет этого обеспечивает низкую опасность аллергических реакций. Молекулярная масса препарата составляет 2,2 мДа, что соответствует классу препаратов со средней молекулярной массой. Выпускается в предзаполненных шприцах в виде 1% раствора натриевой соли гиалуроновой кислоты по 2 мл.[29]

Применение гиалуроната и его солей в косметологии основывается на способности гиалуронатсодержащих препаратов оказывать местное противовоспалительное, ранозаживляющее и иммуномодулирующее действие. Способность задерживать в межклеточном пространстве воду является основой механизма коррекции возрастных деформаций кожи. На данный момент в косметологической практике стали весьма популярны инъекции 1-3% водного раствора гиалуроновой кислоты для внутри- или подкожного введения. Введение гиалуроновой кислоты в эпителий в виде водного геля повышает эластичность и упругость тканей, тем самым придавая коже прежние качества и красоту . Однако широчайшее применение высокомолекулярный гиалуронат получил при изготовлении различных комбинированных кремов и гелей для наружного применения. Данный вид продукции имеет ту же направленность, что и инъекции - восстановить реологические свойства кожи, тем самым предотвратить образование морщин, прыщей и т.д. Гиалуроновая кислота обладает свойствами, которые делают ее крайне подходящей для использования в качестве дермального филлера: она способна связывать большое количество

воды, присутствует в коже в естественных условиях и не склонна вызывать нежелательные реакции. Филлеры (Fill — от англ. — наполнять) — это инъекционные кожные наполнители, которые используются в косметологии для уменьшения глубины морщин, носогубных складок и складок в уголках рта .

Филлеры также используются для придания дополнительного объема лицу в области скул, щек и губ В настоящее время широкое распространение получила группа ГК– филлеров семейства Surgiderm и Juvederm Ultra A. Surgiderm и Juvederm Ultra представляют собой однородные монофазные гели гиалуроновой кислоты неживотного происхождения. Они являются одними из наиболее пластичных материалов для инъекционной контурной пластики, что определяет не только легкость их введения, но и равномерное распределение в тканях, позволяет полностью исключить контурирование материала .[30]

Современная серия препаратов на основе гиалуроновой кислоты «PRINCESS® Filler» представляет собой стерильный, биodeградируемый, вязкоэластичный, прозрачный, бесцветный, изотонический и гомогенизированный гелевый имплантат для интрадермальных инъекций. Содержащаяся в «PRINCESS® Filler» гиалуроновая кислота с поперечно-сшитой структурой продуцируется бактериями *Streptococcus equi*, представлена в виде раствора с концентрацией 23 мг/мл в физиологическом буфере .[31]

В лекарственные препараты на основе ГК часто включают анестетики, антисептики, антиоксиданты и др. лекарственные вещества. Например, «Гиалплюс» [32] , кроме ГК включают антиоксидант, антисептик и анестетик для купирования боли, усиления антимикробного действия ГК и торможения распада ГК по свободнорадикальному механизму.

Другое направление создания композиций - включение ГК в биосовместимые полимеры, например, в полиакриамидные гели. Трехмерная сеть полиакриламидного гидрогеля увеличивает время жизни и

функционирования ГК.

Новые качества и механизмы лечебного действия ГК достигаются также переводом ГК в ее соли (гиалуронаны) с цинком, селеном, натрием, калием и др.

В направлении создания композиций ГК с различными биологически активными веществами и биосовместимыми полимерами открыто широкое поле для творчества (создания новых лекарственных препаратов).

В каждом виде клеток, тканей и органов человека нормальный физиологический уровень концентраций веществ создается и поддерживается равновесием скоростей процессов синтеза и распада. Это общебиологическое правило справедливо и для ГК. В эпидермисе кожи время жизни ГК (период полураспада, расщепление 50% ГК) составляет менее 1 дня. Следовательно, за это время должно синтезироваться до 50% всей ГК. Период полувыведения (удаления, распада 50%) препарата ГК молекулярной массой 500000-730000 путем периодического введения ГК, но и снижением скорости ее распада. Управление процессами синтеза-распада ГК уже становится новым подходом к лечению заболеваний. Один из путей снижения скорости распада ГК - сшивание молекул межмолекулярными ковалентными связями и увеличение таким образом молекулярной массы ГК. Этот путь реализован в препарате СИНВИСК (Sinvisc, Hylan - синонимы) , который используется для лечения деформирующего артроза коленного сустава. Введение ковалентных межмолекулярных связей в Гиалган (молекулярная масса 500000 - 730000 дальтон) позволило увеличить молекулярную массу до 6000000 - 7000000 дальтон. В результате время жизни СИНВИСКА в коленном суставе увеличилось по сравнению с Гиалганом с 2 дней до 7 дней, а эластичность с 1-15% до 78%. Специалисты считают метод лечения остеоартроза СИНВИСКом шагом вперед и даже новым методом лечения.

Другой способ увеличения времени жизни ГК комбинированные гели ГК с полимерами, например, с полиакридными, винилацетатными и др.

Возможно и связывание молекулы ГК с различными биологически-активными компонентами, например, витаминами, аминокислотами и пептидами [33–35]. В строении молекул так называемых низкомолекулярных биорегуляторов присутствуют функциональные группы –ОН, –СООН, –NH₂, –SH, что позволяет произвести их «прививку» к молекуле гиалуроновой кислоты.

Третий способ - подавление свободнорадикальных, окислительных, световых и др. путей химического разрушения ГК [36]. В списке медикаментов имеются малотоксичные гасители свободнорадикальных реакций в организме (динозан, полифенолы и др.). И здесь открывается значительная степень свободы для комбинации ГК с такими активными соединениями.

Наиболее естественный и эффективный путь - введение ингибиторов гиалуронидазы вместе с ГК или как самостоятельный метод восстановления баланса синтез-распада ГК. Однако применение модифицированных препаратов требует проведения тщательных доклинических исследований, так как влияние продуктов распада модифицированной ГК на организм человека недостаточно изучено. Для дальнейшего успешного применения ГК медицине необходимы новые способы модификации, в том числе создание взаимопроникающих полимерных сеток и препаратов с адресной доставкой активных компонентов.

Заключение.

Из краткого обзора, где достижения, проблемы и перспективы работ по использованию ГК лишь обозначены, очевиден вывод о том, что потребности в очищенной ГК будут непрерывно возрастать. Особым спросом будут пользоваться фракции ГК с различной молекулярной массой. В настоящее время исследуются процессы и механизмы действия гиалуроновой кислоты

на ткани организма. Выдвигаются гипотезы относительно роли гиалуроната и родственных глюкозаминогликанов в процессах пролиферации, дифференциации, миграции животных клеток в процессах иммунного ответа и эмбриогенеза, а также делаются попытки по установлению связи между молекулярной массой, степенью очистки и эффективностью препаратов.

Физико-химический способ получения гиалуроновой кислоты, в виду своей экономической нерентабельности, постепенно уступает место биотехнологическому методу синтеза биополимера с использованием различных штаммов бактерий рода *Streptomyces*, *Bacillus subtilis*.

Так же перспективным направлением сегодня является создание лекарственных препаратов и БАД на основе гиалуроната с противовоспалительным, иммуномодулирующим и пролонгирующим действием, которые, возможно, в будущем можно будет применять в качестве основы терапии заболеваний в онкологии, оториноларингологии, хирургии, эндокринологии и многих других сферах человеческой деятельности .

Список литературы.

1. Гамалея Н.Ф. Фактор регенерации и специфическая терапия.// Госпит. Дело. 1946, № 1-2, С. 22-25.
2. Николаева С.С. и др. Биохимические и влагообменные характеристики поверхностного слоя суставного хряща.// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2002, № 10, с. 390-394.
3. Fessler J.H. et. al. Proc. Nat. Acad. Sci. 1966 ,v.56, № 1, P. 141-147.
4. Радеева И.Ф. и др. Гиалуроновая кислота: биологическая роль, строение, синтез, выделение, очистка и применение.// Прикладная биохимия и микробиология. 1997, т. 33, № 2, С. 133-137.

5. Shimada E., Matsumura G.J. Molecular Weight of Hyaluronic Acid from Rabbit Skin //J. Biochem., 1977, V.81. ,№ 1, P. 79-91.
6. Савоськин О. В., Семенова Е. Ф., Рашевская Е. Ю. Характеристика различных методов получения гиалуроновой кислоты. //Научное обозрение. Биологические науки. №2, С. 125-135
7. Ряшенцев В.Ю., Никольский С.Ф., Вайнермен Е.С. и др. Способ получения гиалуроновой кислоты // Патент № 2017751 РФ, 1994 Бюл. № 15, С. 75-76
8. DeAngelis P.L., Jing W., Graves M.V., Burbank D.E., van Etten J.L. Hyaluronan synthase of chlorella virus PBCV-1 //Science, 1997, V. 278, P. 1800-1803.
9. DeAngelis P.L., Papaconstantinou J., Weigel P.H. Isolation of a Streptococcus pyogenes gene locus that directs hyaluronan biosynthesis in acapsular mutants and in heterologous bacteria // J. Biol. Chem, 1993, V. 268, P. 14568-14571
10. Kim J.H., Yoo S.J., Oh D.K., Kweon Y.G. et al. Selection of a Streptococcus equi mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. // Enzyme Microb. Technol., 1996, V. 19, P. 440-445.
11. Widner B., Behr R., Von Dollen S., Tang M., Ней Т., Sloma A., Sternberg D., DeAngelis P.L., Weigel P.H., Brown S. Hyaluronic Acid Production in Bacillus subtilis // Appl. Environ. Microbiol., 2005, V. 71, № 7, P. 3747-3752
12. Николаева С.С. и др. Биохимические и влагообменные характеристики поверхностного слоя суставного хряща. //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2002, № 10, С. 390-394.
13. Fessler J.H. et. al. Proc. Nat. Acad. Sci. 1966 ,v.56, № 1, p. 141-147.
14. Радеева И.Ф. и др. Гиалуроновая кислота: биологическая роль, строение, синтез, выделение, очистка и применение. //Прикладная биохимия и микробиология. 1997, т. 33, № 2, С. 133-137.
15. Auste Lefal. Hyaluronan and cell-associated hyaluronan binding protein regulate the locomotion of ras-transformed cell. J.Cell Biol., 1991, v. 112 (5), P. 1041 -1047.
16. Okamoto J. et al. Proteolytic release of CD 44 intracellular domain and its role

- the CD 44 signaling pathway. *J. Cell Biol.* 2001, №155, P.755-762.
17. Pure E. et. al. A crucial for CD 44 in inflammation. *Trends Mol. Med.* 2001,
18. West D.C. et. al. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronan acid. S9. Scott J.E. et. al. Hyaluronan-mediated protective effect against cell damage caused by enzymatically produced hydroxyl radicals is dependent on hyaluronic molecular mass. *Cell Biochemistry and Function.* 1994, V. 12, p. 281-288.
19. ГОСТ Р 58484-2019 Имплантаты хирургические неактивные. Имплантаты на основе гиалуроновой кислоты. Стандартное руководство по определению характеристик.
20. Агабалаева К. О., Полякова А. А., Грибкова Е. А. и др. Сравнительное исследование влияния питательных сред на рост и развитие продуцента гиалуроновой кислоты // Актуальные проблемы медицинской науки и образования: сб. ст. VI Междунар. науч. конф. (г. Пенза, 14–15 сентября 2017 г.) / под ред. А. Н. Митрошина, С. М. Геращенко. –Пенза: Изд-во ПГУ, 2017. С. 118.
21. Белоусова О. В., Белоусов Е. А., Королькова А. И. Исследование ассортимента косметических средств, содержащих гиалуроновую кислоту, в аптечных организациях г. Белгорода // Научные ведомости БелГУ. Сер. Медицина. Фармация. 2017. № 12 (261). Вып. 38. С. 98–111.
22. Ушаков Р. В., Ушаков А. Р., Дьяконова М. С. Применение препаратов гиалуроновой кислоты Ревидент в хирургической стоматологии // Медицинский алфавит. 2017. № 24. Т. № 3. Стоматология. С. 41–44.
23. Петров И. Ю., Ларионов Е. В., Ипполитов Ю. А., Бут Л. В., Петров А. И. Морфогистохимические исследования остеопластического материала на основе гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфата и недеминерализованного костного коллагена для восстановления костных дефектов в эксперимент // Вестник новых медицинских технологий. Электронный журнал. 2018. № 3. С. 41–46.

24. Химические, биологические и медицинские аспекты применения гиалуроната и его производных // Т. С. Laurent, ed. — Колчестер: Portland Press. 1998 г.
25. Балабанова РМ, Эрдес ШФ. Распространенность ревматических заболеваний в России в 2012–2013 гг. // Научно-практическая ревматология. 2015;53(2)
26. Балабанова РМ, Дубинина ТВ, Эрдес ШФ. Динамика заболеваемости ревматическими заболеваниями взрослого населения России за 2010–2014 гг. // Научно-практическая ревматология. 2016;54(3).
27. Майорова С.М., Широкова Л.Ю., и др. Гиалуроновая кислота при остеоартрозе: внутрисуставное введение или стимуляция синтеза? // Вестник РУДН, серия Медицина, 2009, № 4
28. Мальдов Д.Г., А.В. Ильичев А.В., Чубарова Г.Д., и др. Гиалуроновая кислота в составе «Стимфорте». // Фармация №4, 2013, С.40-43
29. Калягин А.Н. Аношенкова О.Н., Антипова О.В. Препараты гиалуроновой кислоты при остеоартрозе: возможности импортозамещения. // Научно-практическая ревматология. 2016(54)5, С. 601-606
30. Забненкова О.В. Внутридермальные филлеры на основе гиалуроновой кислоты. Показания к применению, возможные комбинации // Пластическая хирургия и косметология: научно-практический журнал, 2010, № 1, С. 101-115.
31. Препараты Princess filler и Princess volume в коррекции возрастных изменений лица и атрофических рубцов // Инъекционные методы в косметологии, 2013, №2
32. Волков В.Г., Строителей В.В., Федорищев И.А. Применение искусственного покрытия «Гиаплюс» в лечении трофических язв нижних конечностей. Вестник новых медицинских технологий. 2000, т.7, №1, С.101
33. Патент РФ № 2386640. Способ получения модифицированной рибофлавином сшитой соли гиалуроновой кислоты // Волков В.П., Зеленецкий

А.Н., Хабаров В.Н., Селянин М.А. Заявл. 25.06.2008. Оpubл. 20.04.2010. Бюл. № 11.

34 Патент РФ № 2386641. Способ получения модифицированной ретинолом сшитой соли гиалуроновой кислоты // Волков В.П., Зеленецкий А.Н., Хабаров В.Н., Селянин М.А. Заявл. 09.07.2008. Оpubл. 20.04.2010. Бюл. № 11.

35.Патент РФ № 2387671. Способ получения модифицированной витаминами сшитой соли гиалуроновой кислоты //Волков В.П., Зеленецкий А.Н.,Хабаров В.Н., Селянин М.А. Заявл. 30.07.2008. Оpubл. 27.04.2010. Бюл. № 12.

36. Scott J.E. et. al. Hyaluronan-mediated protective effect against cell damage caused by enzymatically produced hydroxyl radicals is dependent on hyaluronic molecular mass. Cell Biochemistry and Function. 1994, V. 12, P. 281-288.