

Глава 1

ГИАЛУРОНОВАЯ КИСЛОТА. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

В научной и популярной литературе гиалуроновую кислоту характеризуют как одно из чудесных изобретений эволюции. Подобного эпитета, конечно, достойны и такие биологические полимеры, как белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды. Полагают, что гиалуроновая кислота представляет собой наиболее раннюю эволюционную форму из родственных ей полисахаридов — гликозаминогликанов. В эволюционном плане гиалуронан считается весьма консервативным биополимером, поскольку его химическая структура оказалась полностью идентичной всем известным видам живых организмов, стоящих на разных уровнях эволюционной лестницы. Такой эволюционно-химический консерватизм макромолекулы является признаком важности ее биологических функций.

1.1. ХРОНОЛОГИЯ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ГИАЛУРОНАНА ОТ МОМЕНТА ОТКРЫТИЯ ДО НАШИХ ДНЕЙ

В данном разделе кратко изложим необычную и увлекательную историю гиалуроновой кислоты. Представим объяснения, почему она превратилась из рядового объекта исследований углеводов в один из краеугольных камней современного представления о функционировании многоклеточных организмов.

Первое упоминание о необычном составе стекловидного тела бычьего глаза встречается еще в работах 1852 г. классика патологической анатомии немца Рудольфа Вирхова [Virchow, 1852]. Через 30 лет француз Анри Борегар публикует первую обзорную статью об изучении соединительных тканей глаза [Beauregard, 1880]. В ней он ссылается на исследования французского химика и аптекаря Порте (Portes), который, как и ранее Вирхов, обнаружил в стекловидном теле три основных химических

компонента, один из которых осаждался слабой уксусной кислотой. Порте назвал его *hyalomucine* (от греч. *hyalos* — прозрачный), поскольку вещество обладало сходными с карбогидратом муцином свойствами. Порте, по-видимому, был также первым, кто обратил внимание на низкое содержание серы в этой фракции. С 1908 по 1920 г. две основные группы исследователей в Европе под руководством Шмидеберга (O. Schmiedeberg) и Левена (P. Levene) методически занимались очисткой муцинов из различных источников, включая растения. В лаборатории Левена выделили из стекловидного тела глаза и пуповины сложный полисахаридный комплекс, состоявший из глюкозамина, глюкуроновой кислоты и небольшого количества сульфат-ионов, получивший название мукоитин—серная кислота [Leven, 1925].

В статье американских ученых Карла Мейера и Джона Палмера речь уже шла о свойствах конкретного очищенного полисахарида с высокой молекулярной массой (ММ), выделенного из все того же стекловидного тела бычьего глаза [Meuer, Palmer, 1934]. Именно они предложили назвать новое вещество гиалуроновой кислотой (ГК) (*hyaluronic acid*: от *hyaloid* — стекловидный и *uronic acid* — уроновая кислота), и это название было сразу принято научной общественностью. Согласно их данным, выделенный полисахарид содержал шестиуглеродную уроновую кислоту и аминоксахар, а также пентозу и не был сульфатирован, а ММ повторяющегося остатка составляла примерно 450 Да. В действительности ГК, как было установлено гораздо позднее, не содержит сульфатных групп, так же как, впрочем, и пентоз, а ММ повторяющегося дисахаридного остатка равна 397 Да. То, что полисахарид был назван кислотой, объясняется тем, что в первых опытах по его выделению его комплекс с белками вел себя как слабая кислота. Из уважения к заслугам Карла Мейера, внесшего на протяжении своей научной карьеры огромный вклад в изучение этого углевода, название решили не менять (в соответствии с рекомендацией IUB-IUPAC Joint Commission on Biochemical Nomenclature 1982/3 был предложен термин «гиалуронан», который в настоящее время наиболее часто употребляется в биохимической и медицинской литературе).

Разновидности полисахаридов, которые составляют основную массу органического вещества на нашей планете, ко времени открытия ГК были уже достаточно хорошо известны. В частности, целый ряд мукополисахаридов (современное название — гликозаминогликаны, к этому классу соединений и относится ГК) были выделены из слизистых секретов, которым они придавали вязкие, смазочные свойства благо-

даря своей способности связывать большое количество воды. Большая заслуга в этой области принадлежала, в частности, шведскому биохимику Гуннару Бликсу (Gunnar Blix). Именно поэтому пионерская работа Мейера и Палмера могла бы остаться в ряду обычных, рутинных научных исследований, если бы в последующие несколько лет не обнаружили уникальные свойства нового биополимера, отличающие его от всех известных к настоящему времени родственных по строению гликозаминогликанов.

В течение следующих десяти лет после первой публикации о гиалуронане лаборатория Мейера и еще целый ряд европейских исследователей обнаружили этот полисахарид у различных животных и выделили в относительно чистом виде. Постепенно выяснилось, что он присутствует практически во всех тканях организма позвоночных, существенно преобладая в суставной жидкости, пуповине, стекловидном теле глаза. Прошло, однако, еще более полувека, пока выяснилось, что ГК в комплексе с протеогликаном агреканом является также основным составляющим межклеточного матрикса [Chandran, Horkay, 2012].

После перерыва в исследованиях во время Второй мировой войны, в 1948–1951-х гг. к работе по установлению структуры и изучению свойств полисахарида подключился целый ряд выдающихся биохимиков: Кей (M.A.G. Kay) и Огстон (A.G. Ogston) в Англии, Феллинг (J. Felling) в Швейцарии, Джинлоз (R. Jeanloz) в США, Сундблад (L. Sundblad) в Швеции. В 1953 г. Ларс Сундблад обобщил результаты многолетних работ своей лаборатории в 125-страничной статье о конформации макромолекулы ГК в водно-солевых растворах [Sundblad, 1953]. В том же году Огстон и его студент Станиер сообщили аналогичные данные, в частности, что зависимость вязкости от градиента давления возрастает с увеличением концентрации полисахарида [Ogston, Stanier, 1953]. Они предположили, что это свойство обусловлено сплетением соседних молекул, а не асимметрией отдельной макромолекулы, но только в 1994 г. беспорядочная винтовая конфигурация гиалуронана была подтверждена путем измерения светорассеяния. Говоря о том активном периоде изучения ГК в середине XX в., нельзя не упомянуть также о таких ученых, как Балаж (E.A. Balazs), Сильвен (B. Sylven) и Торвад (N. Torvad), которые внесли огромный вклад в физико-химические исследования нового биополимера. Именно с их работ начался этап фундаментальных исследований физико-химических свойств, который, как ни удивительно для такой сравнительно примитивной по химическому строению молекулы, продолжается до сих пор.

Гиалуронан был открыт как полисахарид животного происхождения, однако вскоре выяснилось, что этот биополимер встречается и среди бактерий. Еще в 1937 г. был выделен сложный полисахарид из капсул стрептококков группы А и С [Kendall et al., 1937]. Авторы предположили идентичность выделенного биополимера и ГК, что в дальнейшем полностью подтвердилось работами лаборатории Дорфмана [Roseman et al., 1953]. Это открытие на долгие годы осталось без особого внимания, пока к нему не обратились уже в начале XXI в. ввиду потребности производить биополимер в промышленных масштабах. Многочисленные исследователи десятилетиями безуспешно пытались выделить в чистом виде активный фермент у стрептококков или у эукариотических клеток. Как выяснилось гораздо позднее, связано это с тем, что ГК-синтетаза очень быстро теряет свою активность при переводе в растворимую форму, поэтому необходимо принимать особые меры предосторожности в таких экспериментах. Такими же тщетными на протяжении многих лет оказывались попытки клонировать ген гиалуронансинтетазы. Так, в 1993 г. коллектив американских ученых объявил о выделении гена *HAS* и его клонировании в *Escherichia coli*, что впоследствии оказалось научной ошибкой. В 1992 г. были опубликованы данные о выделении трех мембранных белков стрептококка, и авторы предположили, что белок с массой 33 кДа и есть ГК-синтетаза. Дальнейшие исследования показали, что это не так: стрептококковая ГК-синтетаза представляет собой белок с массой 42 кДа (по данным электрофоретических анализов). Изучение механизмов бактериального синтеза полисахарида на уровне клеток началось, когда из экстрактов стрептококков были выделены УДФ-глюкоза, УДФ-N-ацетилглюкозамин и УДФ-глюкуроновая кислота.

И все же прорыв в области изучения механизма биосинтеза ГК и ее регуляции произошел: в 1993 г. в статье из лаборатории Вейгеля (P. Weigel) сообщалось, что бактериальный оперон биосинтеза гиалуронана обнаружен, выделен, охарактеризован и клонирован [DeAngelis et al., 1993]. Это была первая успешно клонированная гликозаминогликансинтетаза, экспрессия которой была подтверждена образованием полисахарида у микроорганизма, в природе не синтезирующего данный биополимер. Вскоре гены ГК-синтетазы были обнаружены у нескольких видов грамположительных бактерий и одного вида грамотрицательных. Неожиданным оказалось обнаружение гиалуронана у простейших водорослей: специфичный для водорослей рода *Chlorella* вирус PBCV-1 кодирует синтетазу CvHas, заставляя инфицированные

клетки производить полисахарид на своей поверхности (DeAngelis et al., 1997).

Анализ структуры генов бактериальных ГК-синтетаз, получивших обозначение как HAS, послужил основой для выделения в начале XXI в. аналогичных генов у животных. У млекопитающих три изоформы (варианта) фермента HAS кодируются расположенными на разных хромосомах тремя изоформами (*HAS1*, *HAS2* и *HAS3*) одного и того же гена [Spicer et al., 1998; Monslow et al., 2003]. Их происхождение связано с процессом дупликации и последующей дивергенции в течение сотен миллионов лет эволюции исходного гена-предшественника *Has* [Faulkes et al., 2015]. Механизмы регуляции генов *HAS* серьезно нарушаются при отклонениях от нормальных условий жизнедеятельности, например при физико-химическом стрессе, воспалениях, патологиях или новообразованиях [Vigetti et al., 2014; Sherman et al., 2015]. Примером гормональной регуляции может служить наблюдение, свидетельствующее, что концентрация ГК в гребне кастрированных петухов существенно ниже ее высокого уровня у нормальных птиц. Клонирование генов ГК-синтетаз из бактерий, а также из различных организмов семейства хордовых позволило сравнить первичные химические структуры синтезируемых ими молекул ГК, которые оказались полностью идентичными, что указывает на важную роль этой молекулы в биологии. Проведенный уже в начале XXI в. эволюционный анализ гиалуронана показал, что макромолекула биополимера сформировалась, по-видимому, около 400 миллионов лет назад [Хабаров и др., 2012; Csoka, Stern, 2013]. У млекопитающих имеется три изоформы фермента для синтеза ГК — *HAS1*, *HAS2* и *HAS3*. Обладая примерно одинаковой массой около 63 кДа, они отличаются разной каталитической активностью и механизмами регуляции. Эти ферменты относятся к трансмембранным белкам, т.е. осуществляют синтез полисахарида внутри цитоплазматической мембраны клетки. Детальный молекулярный механизм инициации синтеза молекулы ГК выяснен совсем недавно [Weigel, 2015]. В результате клеткой синтезируются фракции молекул ГК разного размера — от нескольких сотен килодальтон до нескольких миллионов дальтон. Каждой молекулярной фракции предназначена своя функциональная роль.

В живом организме постоянно происходят синтез и деградация биомолекул. Упомянув выше о биосинтезе ГК, нельзя не сказать о природных ферментах, которые ее расщепляют. Дело в том, что теперь, в 2010-е годы, появляется все больше экспериментальных свидетельств,

что продукты расщепления ГК играют в организме не менее, если не более важную роль, чем она сама [Buhren et al., 2016]. Еще до открытия ГК Дюран-Рейналс (F. Duran-Reynals) обнаружил в семенниках животных некую биологически активную субстанцию, названный им «распространяющийся фактор». При его подкожном введении в смеси с тушью отмечалось очень быстрое распространение черного окрашивания. Похожим действием обладали яд пчел и экстракты из медицинских пиявок. Так было открыто вещество, которое позднее было идентифицировано как первый из ферментов, разрушающих ГК, и которое назвали гиалуронидазой (по другой терминологии, для бактериальных ферментов — гиалуронатлиазой). Первая работа об использовании гиалуронидазы в расщеплении ГК была опубликована в 1944 г. [Madinaveitia, Stacey, 1944]. Вскоре появилась серия статей на тему очистки и кинетики гиалуронидаз, наиболее информативной из которых оказалась работа Дорфмана [Dorfman, 1948].

Открытие ферментов, селективно разрушающих ГК, послужило началом прямого пути к установлению структуры полисахаридной молекулы. В те времена еще не были известны такие физические методы молекулярного анализа, как динамическое световое рассеяние, трансмиссионная электронная микроскопия или спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР), которые в настоящее время являются мощными инструментами анализа структуры белков и полисахаридов, позволяющие определять не только состав, места замещения и последовательность моносахаридных остатков биополимера, но и его пространственное строение (подробнее о методах изучения структур биомолекул см.: Сердюк И., Заккаи Н., Заккаи Дж. Методы в молекулярной биофизике. М.: КДУ, 2010).

В 1954 г. Вейсманн и Мейер опубликовали результаты нескольких лет исследования продуктов расщепления гиалуронана с помощью совместного энзиматического и кислотного гидролиза [Weissmann, Meuer, 1954]. В статье также впервые приводилась структурная формула отдельного звена полимера — дисахарида, являющегося продуктом расщепления биополимера стрептококковой гиалуронатлиазой (рис. 1.1).

Интересно, что перед этой публикацией в лаборатории Мейера были предприняты многолетние попытки определить структуру химической связи между двумя моносахаридами, но безуспешно. В этой статье Мейер признал авторство в решении данного вопроса за Джинлозом и Форчиелли, опубликовавшими свое исследование ранее [Jeanloz, Forchielli, 1951].

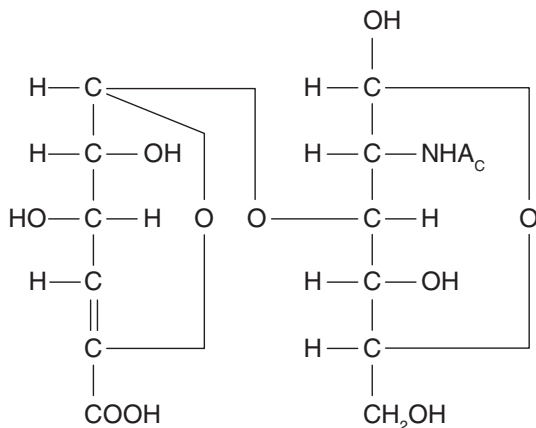


Рис. 1.1. Структура 4,5-ненасыщенного дисахарида, полученного при расщеплении ГК бактериальной гиалуронатлиазой

Гиалуронидазы, получившие обозначение Hya1A, были выделены и охарактеризованы у некоторых грамположительных бактерий (например, у *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Clostridium perfringens*) [Kreil, 1995]. Гены, которые кодируют или могут потенциально кодировать функционально активные гиалуронидазы, идентифицированы у множества организмов — от бактериофагов до человека [Fischer-Szafarz et al., 1990]. У человека идентифицированы гены *HYAL-1*, *HYAL-2*, *PH-20*, которые кодируют три функционально активных фермента. Эволюционный анализ показывает, что все они произошли от одного предшественника — гена хондротиназы (*chondroitinase*) червя *Caenorhabditis elegans* [Csoka, Stern, 2013]. Все ферменты HYAL расщепляют цепь гиалуронана в местах β -D-(GlcNAc)GalNAc-(1->4)- β -D-GlcA-связей (рис. 1.2).

Все три типа гиалуронидаз человека расщепляют полисахарид на фрагменты различной молекулярной массы. Наиболее мелкое расщепление осуществляют тестикулярные гиалуронидазы PH-20, гидролизуют гликозидную связь с образованием тетра-, гекса-, окта- (и т.д.) сахараиды. Время полураспада усредненной по массе молекулы ГК составляет от 1–30 недель в суставах до 1–2 дней в эпидермисе и дерме и всего 2–5 мин в кровотоке.

При нормальных физиологических условиях гиалуронидазы встречаются в тканях в крайне малых количествах и нестабильны при вы-

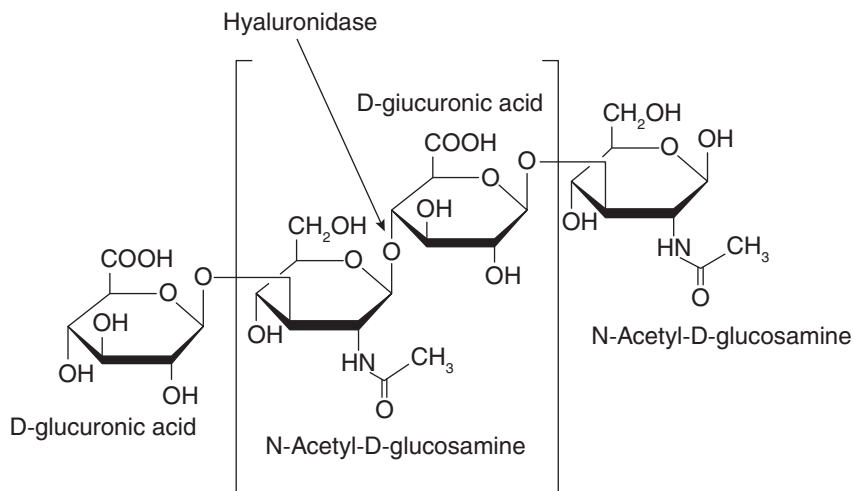


Рис. 1.2. Сайт расщепления ГК гиалуронидазами

делении, что затрудняет экспериментальную работу с ними. В крови и межклеточном пространстве тканей млекопитающих всегда присутствует некоторое количество гиалуронидаз HYAL-1 с ММ 57 кДа, но их активация происходит только при кислотных значениях pH. Гиалуронидаза HYAL-2 функционирует лишь на поверхности клеток. Следует отметить, что не все ферменты из набора имеющихся у человека ГК-синтетаз или гиалуронидаз жизненно необходимы для организма. При отклонениях от нормальных условий в клетке включаются механизмы компенсации потери активности одного фермента за счет увеличения активности аналогичного ему. Такие механизмы сложны и только начинают выясняться [Lv et al., 2015]. Изучение биологических эффектов, которые гиалуронан может оказывать в организме, традиционно проводили на культурах клеток млекопитающих. Параллельно шло изучение ряда сульфатированных полисахаридов, аналогичных ГК по строению, — гепарина, гепарансульфата (который раньше назывался гепарин-односерной кислотой). Выяснилось, что ГК, в отличие от сульфатированных полисахаридов, ускоряет рост клеток, и это было одно из первых описаний взаимодействия ГК с живыми клетками. Было также замечено, что некоторые типы клеток начинают агрегировать при добавлении гиалуронана. Это было первым указанием на специфическое связывание полисахарида с поверхностью клеток. Впо-

следствии действительно были идентифицированы белки-рецепторы на поверхности цитоплазматической мембраны клеток, которые связывают полисахарид: высокоаффинный рецептор CD44 [Screaton et al., 1992] и рецептор RHAMM (рецептор гиалуроновой кислоты, опосредующий подвижность клетки) [Hardwick et al., 1992]. В 2015 г. появилось сообщение, что функции этих рецепторов связаны [Veiseh et al., 2015]. Активность рецептора CD44 необходима для нормальной работы гиалуронидазы HYAL-2. Обнаружен также рецептор HARE, необходимый для эндоцитоза (поглощения клеткой) ГК, который принципиально отличается по своей структуре от других ГК-связывающих рецепторов [Pandey et al., 2015]. Начало изучения механизмов функционирования фрагментов ГК посредством взаимодействия со своим главным рецептором CD44 по сути ознаменовало наступление новой и главной эпохи в истории гиалуронана [Mattheolabakis et al., 2015]. В начале XXI в. произошла переоценка роли ГК как пассивного структурного компонента матрикса соединительной ткани к пониманию первостепенной роли этой макромолекулы во многих жизненно важных физиологических процессах — от клеточной коммуникации, миграции и дифференциации до регуляции процессов, протекающих в межклеточном матриксе, и активации метаболизма клеточных структур [Simpson et al., 2015]. В настоящее время считается твердо установленным, что гиалуронан — не просто пассивная макромолекула соединительной ткани, а метаболически высокоактивный биополимер в своей нативной высокомолекулярной форме, но еще более — в виде низкомолекулярных фрагментов [Cuphert et al., 2015].

Известно, что, когда какое-то новое вещество демонстрирует востребованные повседневной практикой характеристики, его внедрение и применение значительно опережают его обстоятельное научное изучение. Так произошло и с ГК. Мысль о ее применении в медицине возникла рано, однако ее реализация тормозилась отсутствием достаточно надежного способа стерилизации биомолекул, не приводящего к изменению их структуры. Еще в 1940-е годы попытки стерилизации ГК с помощью УФ-излучения приводили к полной потере вязкости раствора [Balazs, Laurent, 1951]. Аналогичный результат был получен при воздействии рентгеновских лучей на раствор полисахарида [Ragan et al., 1947]. В дальнейшем было установлено, что при воздействии гамма-излучения, потока электронов, даже при незначительных начальных уровнях поглощенных доз ионизирующего излучения гиалуронан подвергается деградации. Сейчас эти процессы радиолитического распада полисахарида, связанные

с протеканием реакций с участием свободных радикалов, продолжают интенсивно изучаться специалистами в области радиационной химии биомолекул [Хабаров, Бойков, 2016].

Начиная примерно с середины XX в. ГК постепенно стала находить свое применение в разнообразных клинических приложениях, из которых наиболее значимыми оказались глазная хирургия и лечение заболеваний суставов. Считается, что первый в мире опыт массового применения в медицине относится к 1943 г., когда Н.Ф. Гамалея использовал гиалуронан в комплексных повязках для обмороженных красноармейцев в военно-полевом госпитале № 1321. Экстракт из пуповины, названный им «фактор регенерации», был впоследствии утвержден Минздравом СССР в качестве препарата под названием «Регенератор». В 1969 г. появилось первое сообщение о применении ГК для предотвращения послеоперационных спаек. В 1950-е годы на Западе начали проводить опыты с ГК для возможного протезирования при лечении отслойки сетчатки глаза. В 1972 г. доктор Р. Миллер (R. Miller) в США начал использовать ГК в составе имплантируемых внутриглазных линз, и с этого времени она стала одним из самых применяемых компонентов в офтальмологии. В 1970-е годы шведская фирма *Pharmacia* разработала и вывела на мировой рынок первый коммерческий препарат на основе ГК под брендом Healon для применения при различных видах операций на глазах. Его эффективность и безопасность получили мировое признание и обусловили многолетнее использование этого препарата, вплоть до нашего времени. В 1970 г. ГК впервые была введена в суставы ног беговым лошадям, страдающим от артритов, и был получен положительный результат. С этого времени применение полисахарида в конном спорте стало повседневной практикой. В наши дни начинается активное использование биополимера в регенеративной медицине, при лечении артритов и артрозов [Gibbs et al., 2014]. Наиболее распространенными гидрогелями для инъекций в суставы служат производные гиалуронана под брендами Hyalograft C и Chondro-gide [Faleiro et al., 2016].

Чрезвычайно широкое применение ГК нашла в эстетической медицине, где на сегодняшний день препараты на ее основе являются «золотым стандартом» для инъекционной косметологии [Хабаров, Михайлова, 2012; Highley et al., 2016]. Это обусловлено свойством гиалуронана — способностью связывать большое количество воды, что выражается в формировании и поддержании объема содержащей его ткани. В коже полисахарид вырабатывается клетками фибробластов дермы и отчасти кератиноцитами эпидермиса, благодаря чему, в

частности, поддерживается постоянный лицевой тонус. С возрастом концентрация ГК в коже падает, что наряду с дефицитом коллагена приводит к появлению морщин, дряблости и другим последствиям. Курс инъекций ГК позволяет значительно компенсировать эти нежелательные проявления на достаточно продолжительный период. Широкий спектр практического применения в косметической дерматологии основан на ее способности оказывать противовоспалительное, дезинфицирующее и ранозаживляющее действие; ГК способствует регенерации эпителия, предотвращает образование грануляционных тканей, спаек, рубцов, снижает отечность, уменьшает кожный зуд, нормализует кровообращение, способствует рубцеванию трофических язв. Благодаря уникальному сочетанию биологических и физико-химических свойств [Cowman et al., 2015], гиалуронан находит все более широкое применение в биомедицине [Robert, 2015]. По современным оценкам, в настоящее время во всем мире на разных стадиях клинических испытаний находятся десятки препаратов, содержащих ГК как принципиально важный компонент. Одновременно идет поиск веществ, влияющих на физико-химические свойства полисахарида [Conrozier et al., 2016]. С ростом понимания роли ГК в организме изучаются возможности коррекции ее влияния при различных заболеваниях [Liang et al., 2016; Zhu et al., 2016; Chanmee et al., 2016].

В связи с растущим мировым спросом на гиалуронан, который продолжают, в основном, выделять традиционным методом экстракции из животного материала (обычно из петушиных гребней), идут постоянные поиски новых, более эффективных способов ее получения микробиологическим путем [Yoshimura et al., 2015; Cheng et al., 2016]. Если первоначально использовались в основном природные штаммы стрептококков, то впоследствии они были вытеснены из микробиологической индустрии рекомбинантными штаммами. Поскольку стрептококки относятся к патогенным или условно-патогенным бактериям, более перспективными считаются другие микроорганизмы, например бактерии *Bacillus subtilis* [Widner et al., 2005]. Преимущество этих бактерий в том, что они не вырабатывают эндотоксины и не содержат фермент гиалуронидазу.

Однако проблема более эффективного получения высококачественной ГК остается актуальной во всем мире, и в России в частности [Moscovici, 2015]. Это наглядно подтверждают мировые цены на очищенный полисахарид, которые доходят до 100 тысяч долларов за 1 кг продукта (для сравнения, 1 кг активно используемого в пищевой про-

мышленности полисахарида ксантана, продуцируемого бактериями *Xanthomonas campestris*, стоит, по данным на 2012 г., 11 долларов).

В настоящее время гиалуронан как объект исследования можно встретить в лабораториях биохимии, молекулярной биофизики, биоорганической и радиационной химии, химии высокомолекулярных соединений и др. С начала XXI в. во многих странах ведутся исследования в очень перспективном направлении, связанном с адресной (векторной) доставкой лекарственных средств к пораженному органу или ткани. Эти разработки вышли на качественно новый уровень с развитием нанотехнологий и реализации идеи доставки биологически активных соединений к конкретным типам клеток организма с помощью «наноконтейнеров». Структура и материалы таких носителей очень разнообразны, а размеры обычно находятся в диапазоне 15–300 нм. Использование ГК в качестве макромолекулярного носителя может представлять альтернативный подход [Хабаров и др., 2012, 2015; Dosio et al., 2016]. Действительно, макромолекула ГК способна связываться со своими рецепторами, расположенными на внешней стороне цитоплазматической мембраны клетки, и таким образом осуществлять адресную доставку биологически активных и лекарственных соединений, так или иначе связанных с ней как носителем [Kelkar et al., 2016; Rao et al., 2016; Martinez et al., 2016]. Здесь уместно подчеркнуть, что полисахарид не проявляет свойств антигена, т.е. является нейтральным веществом, которое не узнается иммунной системой животных, что впервые было отмечено еще в 1937 г. [Kendall et al., 1937]. Соответственно, попадание в человеческий организм достаточно хорошо очищенной ГК, выделенной из посторонних источников, не приводит к появлению в нем специфических антител и воспалительных процессов.

Важно упомянуть и другое направление исследований, связанное с химической модификацией полисахарида. Сейчас трудно сказать, когда впервые появились представители теперь широко представленной категории ученых, обеспокоенных улучшением и без того отлично зарекомендовавших себя творений природы. В случае с ГК это было, видимо, сделано в лаборатории Балаша [Balazs et al., 1951]. С тех пор эти попытки были спорадическими в течение десятилетий, но резко интенсифицировались в 2010-е годы [Choi et al., 2015; Tripodo et al., 2015; Nemshekhar et al., 2016]. Обусловлено это главным образом активизацией прикладных исследований в медицине (регенерация тканей и органов) с применением гидрогелей на основе гиалуронана. Потребовалась такая химическая модификация природного полисахарида, которая бы

препятствовала его преждевременной деградации гиалуронидазами после введения в организм. Кроме того, прилагаются усилия по внедрению в гиалуронановые гидрогели разнообразных биоактивных веществ, включая антираковые. Наконец, некоторые применения требуют улучшенных вязкоэластичных свойств полисахарида.

Прошло более 80 лет с момента выделения и идентификации ГК — срок в науке огромный для того, чтобы пройти путь от повышенного интереса к открытию нового вещества, изучения его свойств и установления роли в многоликом мире биоорганических молекул до вполне определенного уровня академического интереса со стороны достаточно узкого круга специалистов. Однако интерес к данному биополимеру в научном мире не только не ослабевает, но и непрерывно растет, о чем свидетельствует постоянный рост количества публикаций, посвященных структуре, синтезу, деградации, биологической роли ГК и ее применению в различных областях химии, медицины, биологии.

В заключение хотелось бы подчеркнуть, что в настоящее время во многих научных и медицинских центрах всего мира пишется новая, еще более увлекательная история гиалуронана. Эта история имеет свою тенденцию к улучшению свойств природной ГК для применения этого шедевра молекулярной эволюции в самых высокотехнологичных областях, к которым, безусловно, относится и современная медицина.

1.2. РОЛЬ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА

Биологическая роль ГК в организме человека чрезвычайно многогранна: в межклеточном матриксе от нее зависит миграция, размножение и дифференцировка клеток во время эмбриогенеза; с функционированием гиалуронана в соединительных тканях (табл. 1.1) связаны процессы обновления, ремоделирования, регенерации тканей и органов, а с его избытком или недостатком — многие заболевания, такие как остеоартрит, атеросклероз, воспаления, метастазирование опухолевых клеток, мукополисахаридозы и др. [Хабаров и др., 2014].

Наконец, старение клеток, тканей, органов организма также тесно связано с обменом гиалуронана и других гликозаминогликанов. Снижение концентрации полисахарида в процессе старения представляет клинический интерес. Во многих тканях организма снижается как количество, так и качество ГК, изменяется ее распределение между тканями организма. В научной литературе подтверждено, что зависимые

Таблица 1.1. Роль гиалуронана в функционировании соединительной ткани

| Функции соединительной ткани | Роль гиалуронана |
|-------------------------------------|--|
| Биомеханическая | Двигательная активность. ГК входит в состав хряща, покрывающего трущиеся поверхности суставов |
| Трофическая | Активный обмен веществ между кровью и тканями. Формируя межклеточные пространства, ГК облегчает поступление питательных веществ к клеткам и удаление продуктов метаболизма |
| Барьерная | Защита от внешних воздействий. ГК модулирует функциональное состояние фагоцитов и иммунокомпетентных клеток |
| Пластическая | Регенерация и замещение дефектов. Взаимодействуя с рецепторами клеточной поверхности, ГК стимулирует миграцию фибробластов и клеточную пролиферацию |
| Морфогенетическая | Формирование структуры органов и тканей в эмбриогенезе и постнатальном периоде |

от данного полисахарида эластичные свойства соединительных тканей, суставной жидкости уменьшаются с возрастом. Снижение содержания ГК в тканях глаза увеличивает частоту патологий сетчатки. Обнаружено, что возрастная глаукома связана с почти полным отсутствием гиалуронана в зоне зрительного нерва. У молодых людей и лиц пожилого возраста с нормальным зрением подобных изменений не отмечено. Данный полисахарид широко представлен в тканях, присутствуя в высоких концентрациях в синовиальной жидкости, стекловидном теле глаза и в составе соединительной ткани пуповины и дермы (табл. 1.2).

Таблица 1.2. Ткани с наибольшей концентрацией ГК [Хабаров, Михайлова, 2012]

| Ткань | Концентрация ГК |
|--|--------------------------|
| Амниотическая жидкость (16–20 недель беременности) | 20 мг/мл |
| Пупочный канатик | 4 мг/мл |
| Синовиальная жидкость | 3–4 мг/мл |
| Гиалиновый хрящ | 1 мг/г сырой ткани |
| Дерма | 0,5 мг/г сырой ткани |
| Стекловидное тело человеческого глаза | 0,1–0,4 мг/г сырой ткани |
| Эпидермис | 0,1 мг/г сырой ткани |

Почти половина всей ГК в организме человека сосредоточена в коже, где она располагается в соединительной ткани дермы между волокнами коллагена и эластина, а также в клетках рогового слоя. Старение кожи как частный случай старения всего организма можно рассматривать с

точки зрения изменения стационарного состояния, при котором сложные соединения (например, коллаген, эластин, гликозаминогликаны, в их числе ГК) непрерывно синтезируются в ходе одних процессов и распадаются в ходе других. Для поддержания здоровья кожи крайне важна координация процессов синтеза — распада. Так, например, существует четкое соответствие между интенсивностью обмена гиалуронана и коллагеновых белков дермы. От соотношения этих процессов зависит интенсивность старения кожи. С возрастом либо при воздействии неблагоприятных факторов внешней среды это соотношение меняется в результате уменьшения скорости образования и возрастания скорости распада подобных биомолекул. Общая закономерность состоит в том, что пролиферирующие клетки синтезируют значительно больше ГК по сравнению с дифференцированными клетками. Вот почему чем выше интенсивность физиологического самообновления ткани, тем больше в ней ГК. Другая закономерность — снижение активности пролиферации клеток и самообновления тканей по мере старения приводит к уменьшению содержания ГК в тканях. Вместе с тем в стареющей ткани накапливаются нефункциональные ковалентно связанные соединения гиалуронана с белками как результат реакции свободных радикалов, приводящих к ускорению гликозилирования белков, что и нарушает функционирование данных комплексов. В результате снижается вододерживающая способность полисахарида, что приводит к уменьшению содержания воды в дермальном слое, при этом кожные покровы становятся более сухими и морщинистыми. У младенцев лишь 7% гиалуронана имеет такие связи, а в стареющей коже это количество увеличивается до 23%. Поэтому вполне естественно, что наиболее наглядно роль ГК в процессах старения прослеживается в самом большом органе человека — коже (более подробно о процессах старения см. в главе 5). Содержание гиалуронана в организме человека суммарно оценивается в 15 г. Кожа составляет 16% веса тела, и в ней сосредоточена примерно половина гиалуронана от общего количества — около 5–7 г. За сутки в организме здорового человека распадается почти 7 г и столько же должно синтезироваться. Высокое содержание и высокая скорость обмена (турновера) ГК говорят о важности ее роли в функционировании кожи и других тканей. Для сравнения, биологическое время полураспада протеогликанов кожи занимает несколько дней, а зрелого коллагена — до нескольких месяцев. Кожа человека служит показателем его здоровья. И от того, как она защищает 75 триллионов клеток человеческого организма, зависит и внутреннее здоровье человека.

Продукция ГК обычно увеличивается во время таких процессов, как заживление ран, клеточная миграция и прорастание новых кровеносных сосудов. Считается, что во время заживления ран гиалуронан на ранних стадиях вызывает формирование временного фибринового матрикса, который необходим для того, чтобы новые клетки могли заполнить рану и remodelировать ткань. Эти же процессы протекают и в стареющем организме, но с некоторыми изменениями. Раны у пожилых лиц заживают медленнее, но у них повышается качество рубцов (редки гипертрофические и келоидные рубцы). Возможно, что в ранах у пожилых лиц появляются фибробласты фетального подтипа, которые синтезируют больше ГК и коллагены III и IV типов, а фибробласты взрослого организма — в основном коллаген I типа, много коллагеназы и мало гиалуронана. В хряще ГК связана с белком и участвует в образовании протеогликановых агрегатов; в некоторых органах (стекловидное тело глаза, пупочный канатик, суставная жидкость) встречается и в свободном виде.

С расширением знаний о ГК происходит постепенная переоценка ее роли как пассивного структурного компонента матрикса соединительной ткани к пониманию первостепенной роли этой макромолекулы во многих жизненно важных физиологических процессах от клеточной коммуникации, миграции и дифференциации до регуляции процессов, протекающих в межклеточном матриксе, и активации метаболизма клеточных структур (табл. 1.3).

Таблица 1.3. Биологическая активность гиалуронана [Марголина, Эрнандес, 2005]

| Активность | Механизмы действия |
|-----------------------|--|
| Ранозаживляющая | Усиливает миграцию фибробластов и пролиферацию эпителиальных клеток |
| Противовоспалительная | Улучшает микроциркуляцию |
| Противомикробная | Активирует бактерицидные факторы на поверхности кожи и на раневых поверхностях |
| Антитоксическая | Снижает показатели эндогенной интоксикации (при ожоговых поражениях и т.п.) |
| Иммуномодулирующая | Усиливает фагоцитоз, изменяет функциональную активность лимфоцитов |
| Антиоксидантная | Акцептирует активные формы кислорода, блокируя свободнорадикальное окисление липидов |
| Гемостатическая | Активирует компоненты гемостаза с образованием тромба |

В настоящее время считается установленным [Kuo, 2005; Garg, Nales, 2004], что ГК не просто пассивная макромолекула соединительной ткани, а метаболически высокоактивный биополимер. Время полужизни (периода полураспада) отдельной макромолекулы гиалуронана в организме человека зависит от ее локализации: в крови это 2–5 мин, 12 ч в эпидермисе и синовиальной жидкости, 20–24 ч в дерме и 2–3 нед в хрящах [Fraser et al., 1983]. Такое различие подразумевает наличие различных механизмов, контролирующих своевременное восполнение количества этого полисахарида. Механизмы эти неизвестны, но, например, причину быстрого оборота гиалуронана в крови объясняют его способностью быть «чистильщиком» от свободных радикалов и других активных продуктов окислительных реакций [Erickson, Stern, 2012], которые переходят в кровь из тканей.

Говоря о биологической активности, необходимо подчеркнуть одну уникальную особенность макромолекул ГК, а именно зависимость протекания биологических процессов от параметра ММ полисахарида. Контролируя такие процессы, как воспаление, репарация тканей, клеточная дифференцировка, морфогенез, ангиогенез, макромолекулы различной молекулярной массы оказывают разное действие на клеточное поведение (табл. 1.4). Продукты катаболизма гиалуроновой кислоты вовлечены в огромное количество физиологических процессов. Связываясь со своими рецепторами, фрагменты полисахаридных молекул запускают каскады реакций, конечные продукты которых позволяют клетке приспособиться к изменениям в ее жизнедеятельности или защите от «пришельцев». Их функции напрямую зависят от молекулярной массы и могут быть противоположными по своему биологическому эффекту. В этом феномене, по всей видимости, заключена главная и уникальная особенность биохимического поведения данного полисахарида. Так, относительно недавно, в 2013 г., в лаборатории В. Горбуновой в Рочестерском университете (США) в клеточных культурах и различных тканях организма подземного грызуна *Heterocephalus glaber* (naked mole-rat) обнаружен гиалуронан массой до 12 МДа, что в разы превышает этот параметр у человека. Анализ аминокислотной последовательности белка HAS2 (один из ферментов синтеза гиалуронана) у этих животных обнаружил две уникальные замены: аспарагины в положениях 178 и 301 заменены на серин в области, ответственной за каталитическую активность фермента, что приводит к синтезу экстрадлинных молекул полисахарида. Сенсационность этого открытия заключается в том, что это единственный лабораторный долгожитель

в распоряжении ученых, который практически не стареет. С возрастом у него не ухудшается двигательная активность, физиологические функции и активность белкового синтеза, не бывает злокачественных опухолей, минерализации костей и сердечно-сосудистых патологий. При этом средняя продолжительность жизни этих грызунов в несколько раз больше, чем у животных аналогичных видов. Ввиду очевидного научного и коммерческого интереса к этим работам вполне вероятно, что эти исследования получат продолжение и вскоре будут искусственно сконструированы HAS-ферменты, способные продуцировать *in vitro* еще более длинные полисахаридные цепи, так как именно высокомолекулярный гиалуронан, как свидетельствует все большее количество экспериментов, обеспечивает основные биопротекторные функции в организме.

По мере накопления информации о свойствах ГК расширяются представления о путях ее практического использования в составе разнообразных медицинских, косметических, ветеринарных, фитотерапевтических, гигиенических и других препаратов. Такой широкий спектр применения полисахарида основан на том, что гиалуронан оказывает противовоспалительное, дезинфицирующее и ранозаживляющее действие, способствует регенерации эпителия, предотвращает образование грануляционных тканей, спаек, рубцов, снижает отечность, уменьшает кожный зуд, нормализует кровообращение, способствует рубцеванию трофических язв, предохраняет внутренние ткани глаза. ГК также используется в прикладной биохимии и энзимологии в качестве субстрата для количественного определения ферментов гиалуронидазного действия [Радаева и др., 1997].

В последние 20–25 лет гидрогели на основе гиалуронана стали активно использовать в эстетической медицине в качестве препаратов для контурной пластики. Введение ГК — наиболее естественный способ устранения морщин, коррекции формы и объема губ, лечения кожных депрессий, так как она нетоксична и полностью биосовместима с тканями организма. Сегодня с полной уверенностью можно сказать, что препараты ГК являются лучшими в этой области косметической медицины. Если еще несколько лет назад на рынке препаратов для эстетической медицины присутствовало всего несколько разновидностей ГК, то в последнее время каждый год появляются все новые и новые торговые марки, и этот стремительный рост популярности инъекционного введения, по-видимому, будет продолжаться и далее.

