

ФАРМАКОЛОГИЯ, КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

УДК 547.995.15:544.122.4

DOI: <https://doi.org/10.52540/2074-9457.2024.3.45>

А. В. Людчик¹, Т. В. Абакумова², О. А. Квятковская¹,
В. А. Лапицкая³, Н. С. Сердюченко⁴

СТРУКТУРИРОВАНИЕ МОЛЕКУЛЫ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ КАК НОВЫЙ МЕТОД УВЕЛИЧЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЕЕ ПРИМЕНЕНИЯ ПУТЕМ ИЗМЕНЕНИЯ КОНФОРМАЦИОННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК

¹ООО «ГиалСин Технолоджи», г. Минск, Республика Беларусь

²Белорусский государственный медицинский университет
г. Минск, Республика Беларусь

³Институт тепло- и массообмена имени А. В. Лыкова Национальной академии наук
Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь

⁴Национальная академия наук Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь

При оценке и описании действия экзогенной (изделия медицинского назначения, лекарственные средства) гиалуроновой кислоты (ГК) основное внимание уделяется ее химическим характеристикам, хотя с химической точки зрения все растворы ГК идентичны. Не принимаются во внимание физические свойства раствора, которые определяют характер взаимодействия ГК с рецепторами и клиническую эффективность. При помощи атомно-силовой микроскопии были изучены нативные и структурированные растворы (Н-in технология) гиалуроновой кислоты, изучены их морфологические характеристики.

Структурированная ГК матричного типа соответствует физиологическим требованиям взаимодействия ГК с рецепторами клеточной поверхности по типу «ключ-замок». Данный факт определяет уровень активности контакта ГК с клеточными рецепторами, влияет на протекание регенераторно-репаративных процессов и восстановление локального гомеостаза. Данный аспект подтверждается эффективностью применения, структурированной ГК в малоинвазивной терапии дегенеративно-дистрофической патологии различной локализации, имеющей в своей основе схожие патогенетические механизмы.

Ключевые слова: гиалуроновая кислота, связывание, конформация, адгезионные силы, структурирование, морфология раствора, Н-in технология.

ВВЕДЕНИЕ

Гиалуроновая кислота (ГК), гиалуронан, является природным, биосовместимым, биоразлагаемым гликозаминогликаном, который встречается практически во всех тканях организма как основной компонент внеклеточного матрикса. В отличие от других гликозаминогликанов (хондроитинсульфата, дерматансульфата, гепарансульфата, кератансульфата и др.) ГК не подвергается сульфатированию либо другим модификациям. Более того, ГК не синтезируется в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи, а вырабатывается на цитоплаз-

матической поверхности плазматической мембраны ферментами гиалуронансинтазами (HAS) [1]. Длина синтезируемой макромолекулы ГК зависит от вида HAS: HAS1 – осуществляет медленный синтез высокомолекулярного гиалуронана (> 2 млн Да), HAS2 – синтезирует полисахарид с меньшей молекулярной массой (средне- и низкомолекулярные) (до 2 млн Да), HAS3 – самая активная, синтезирует короткие цепи гиалуронана. Также было экспериментально доказано, что в клетке, находящейся в состоянии дифференцировки, преимущественно вырабатывается полисахарид с молекулярной массой не более 10⁶ Да, а при переходе в зрелое со-

стояние в клетке возрастает продукция ГК с большей молекулярной массой [2].

Внеклеточный матрикс, основным компонентом которого является ГК, представляет собой особую среду, обеспечивающую микроокружение для клеток. Внеклеточный матрикс участвует в передаче регуляторных клеточных сигналов, влияет на адгезию, пролиферацию, дифференцировку, миграцию и рост клеток [3]. Таким образом, ГК можно рассматривать как сигнальную молекулу, оказывающую воздействие на клетки через специализированные рецепторы цитоплазматической мембраны и некоторые интрацеллюлярные пути распространения сигналов [4].

Существует множество белковых рецепторов как на поверхности, так и внутри клетки для связывания с ГК и последующего «сигналинга». Наиболее распространенным и активным рецептором для контакта с ГК является CD44 [5]. CD44 обнаружен практически на всех клетках [6] и представляет собой одноцепочечный однопроходный трансмембранный гликопротеин, который очень широко экспрессируется в физиологических и патологических системах и кодируется одним консервативным геном, а имеющаяся гетерогенность белкового продукта объясняется посттрансляционными модификациями, которые различаются в зависимости от типа клеток и условий их роста. В частности, аминоконцевой домен глобулярного белка CD44 является связующим при взаимодействии как с ГК, так и другими гликозаминогликанами. CD44, связываясь с ГК, активируется и участвует в последующей сигнализации [7], в том числе внутриклеточной, которая приводит к гомогенизации, то есть сближению молекул CD44. При взаимодействии ГК с двумя белками CD44, находящимися относительно близко друг к другу, происходит сближение рецепторов, связывание их с ГК и формирование множества стабильных комплексов ГК и CD44, при этом количество комплексов зависит от структурных характеристик ГК и ее сродства к CD44 [8, 9].

Гомогенизация CD44 создает прочные взаимосвязи рецепторов с ГК на поверхности клетки. При этом стабильность и прочность связи ГК с CD44 определяется структурными физическими характеристиками биополимера [10] и не зависит от молекулярной массы ГК. Основным разли-

чием ГК с низкой и высокой молекулярной массой является более высокое соотношение концевых групп в образцах с низкой молекулярной массой при одинаковой общей массе [11]. Таким образом, можно предполагать, что эффекты ГК, обусловленные взаимодействием с CD44, зависят не столько от молекулярной массы молекул ГК, сколько от конформационного расположения самой молекулы [12, 13].

Так, при оценке и описании действия экзогенной (изделия медицинского назначения, лекарственные средства), а не эндогенной ГК основное внимание уделяется ее химическим характеристикам, хотя с химической точки зрения все растворы ГК идентичны. Не принимается во внимание физические свойства раствора, которые определяют эффективность и характер взаимодействия ГК с рецепторами. Таким образом, значительный интерес представляют не только свойства отдельных молекул ГК, но и порядок, в котором они располагаются в растворе. ГК способна приобретать новые свойства при различных ее физических модификациях, поэтому исследование по изменению конформационных характеристик молекул ГК в растворе является актуальным.

Цель – изменить конформационные характеристики гиалуроновой кислоты путем структурирования молекул.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве образцов ГК использовали отечественный раствор натрия гиалуроната «ГИАЛ-ИН» производства ООО «ГиалСин Технолоджи». При помощи оптической и атомно-силовой микроскопии (АСМ) были исследованы образцы ГК в исходном состоянии и после структурирования раствора (H-in технология).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

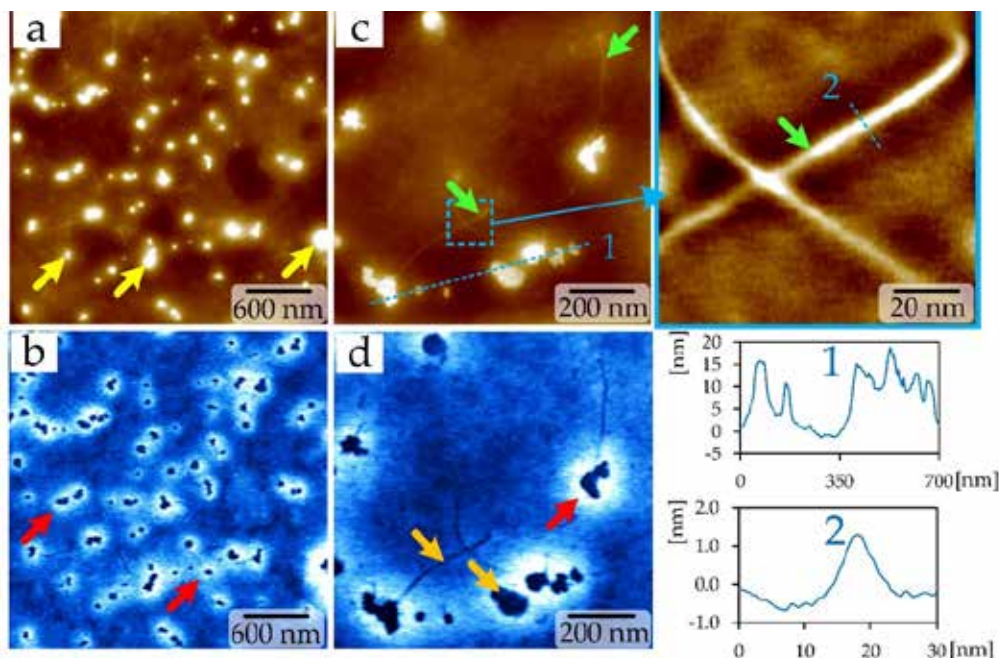
В ходе исследования мы изучили пространственное расположение и основные структурные характеристики молекул в растворе ГК.

Для визуализации был выбран метод АСМ, который максимально информативно может продемонстрировать структуру раствора ГК, формы присутствующих молекул биополимера, конформационные характеристики ГК.

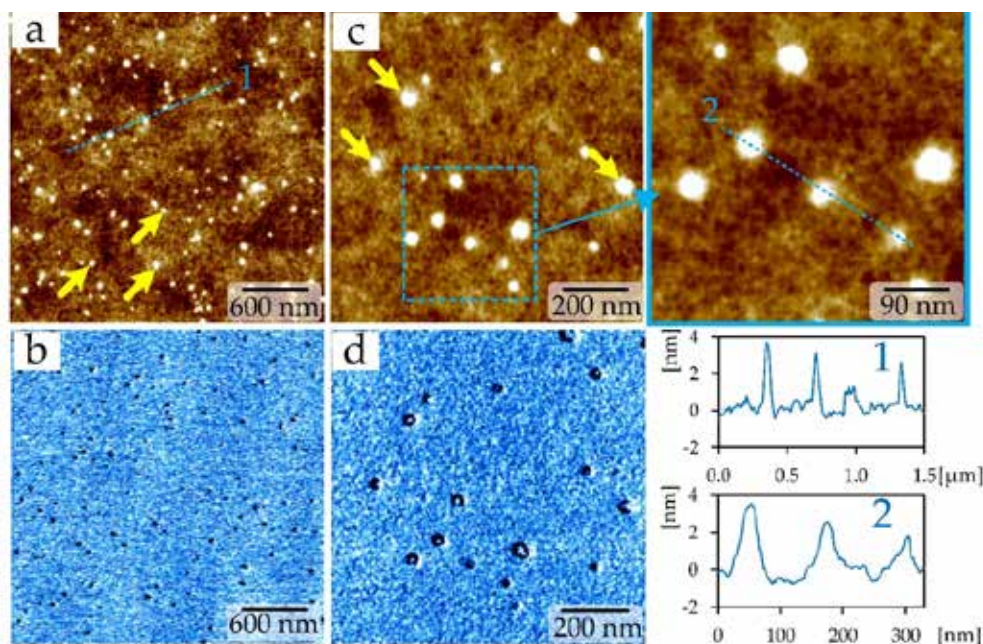
Исследование исходной ГК в тонком слое образца с помощью АСМ продемонстрировало наличие округлых образований размером от 25 до 280 нм и высотой от 10 до 50 нм (рисунок 1а, желтые стрелки) и отдельные цепочки ГК (рисунок 1с, зеле-

ные стрелки) длиной до 370 нм.

После структурирования (Н-in технология) раствор ГК в тонком слое образца представлен в виде правильных округлых образований диаметром 20–60 нм и высотой 2–4 нм, равномерно распределенных



а, с – режим топографии, b, d – режим адгезионных сил;
а, b – размер поля сканирования 3×3 мкм; с, d – размер поля сканирования 1×1 мкм
Рисунок 1. – Исходная гиалуроновая кислота в тонком слое пробы

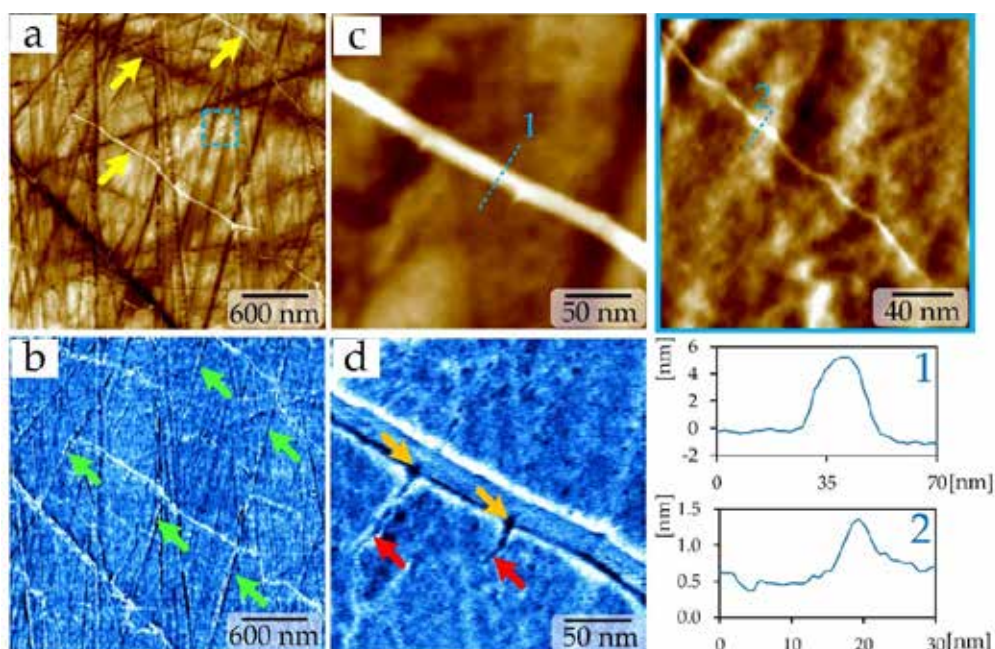


а, с – режим топографии; b, d – режим адгезионных сил;
а, b – размер поля сканирования 3×3 мкм; с, d – размер поля 1×1 мкм
Рисунок 2. – Гиалуроновая кислота после структурирования раствора (Н-in технология) в тонком слое пробы

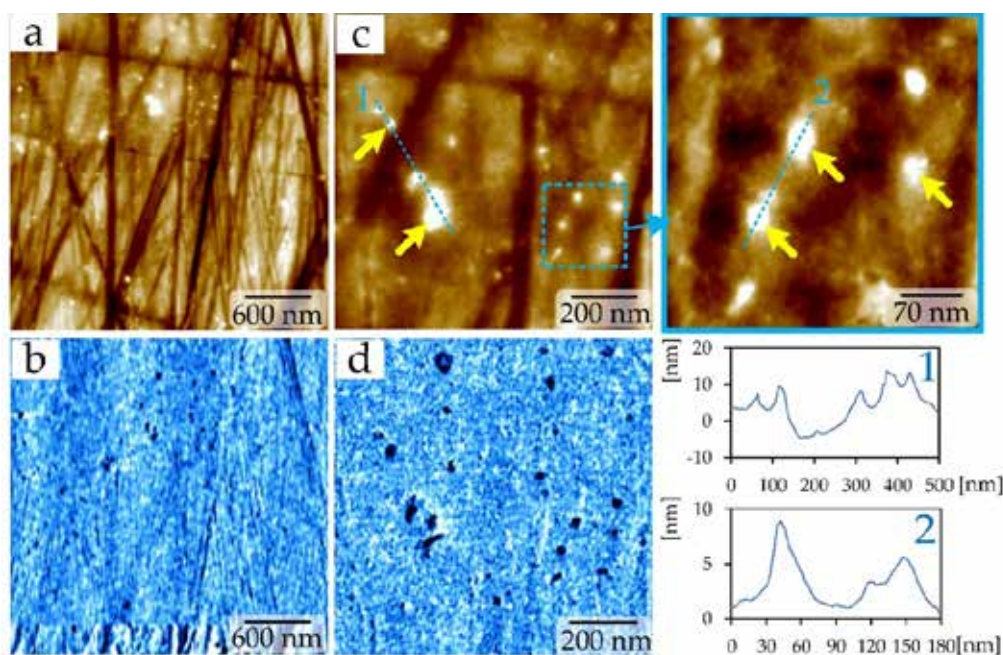
на фоне матрикса (рисунок 2а, с, желтые стрелки). Их высота соответствует высоте цепочек ГК. В режиме адгезионных сил эти образования имеют субъединицы того же размера, что и матрикс – около 10–15 нм. При максимальном увеличении их форма – правильная округлая.

Дополнительные возможности для изучения раствора ГК на уровне отдельных молекул дают исследования ГК на кремнии, раствор фиксирован силами адгезии после высыхания и полного удаления части капли (рисунки 3–4).

Так, в матриксе исходной ГК содер-



а, с – режим топографии; b, d – режим адгезионных сил;
а, b – размер поля сканирования 3×3 мкм; с, d – размер поля 250×250 нм
Рисунок 3. – Исходная гиалуроновая кислота на кремнии



(H-in технология) на кремнии: а, с – режим топографии; b, d – режим адгезионных сил;
а, b – размер поля сканирования 1×1 мкм; с, d – размер поля 250×250 нм
Рисунок 4. – Гиалуроновая кислота после структурирования раствора

жаты линейные молекулы длиной 2–3 мкм и высотой 0,5–6 нм. Ширина цепочек ГК колеблется от 10 до 30 нм [14]. В адгезионном контрасте линейные молекулы образуют сеть с прямоугольными ячейками (рисунок 3).

Матрикс ГК после структурирования (H-in технология) не содержит фрагментов линейных молекул (рисунок 4), представлен равномерно распределенными и равноосно ориентированными субъединицами диаметром 2–10 нм и округлыми образованиями соединенных субъединиц ГК диаметром не более 35 нм. Их высота

изменяется от 1 нм до 6 нм (рисунок 4с, желтые стрелки).

Разработанный нами способ структурирования (H-in технология) вызывает изменения расположения молекул ГК в растворе, формируя из протяженных цепочек (высокомолекулярный раствор) и глобулярных единиц (низкомолекулярный раствор) однородный фракционный состав – организованный матрикс (рисунок 5). Таким образом, структурирование раствора ГК позволило получить раствор матричного типа для более прочной связи ГК с рецепторами по типу «ключ-замок».

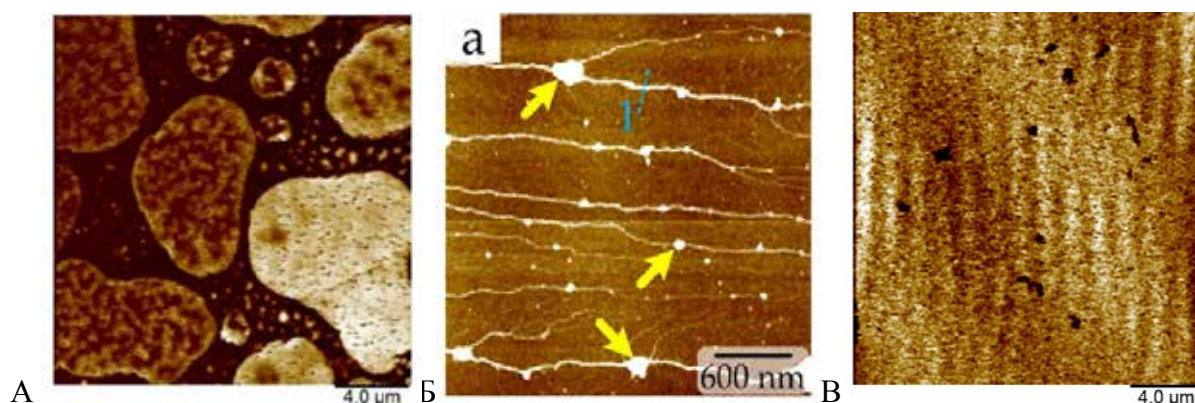


Рисунок 5. – Расположение молекул в нативном низкомолекулярном растворе гиалуроновой кислоты (А), в нативном высокомолекулярном растворе гиалуроновой кислоты (Б) и после структурирования раствора (H-in технология) (В)

На сегодняшний день структурированный раствор ГК активно используется в офтальмологии при хронической дистрофической патологии глаза, в общей хирургии для лечения хронических длительно незаживающих ран, в челюстно-лицевой хирургии при гнойных лимфаденитах и некрозе челюсти, в стоматологии при остеоартрозе височно-нижнечелюстного сустава, в гинекологии и урологии при дегенеративно-дистрофической патологии мочеполовой системы, в неврологии для лечения мононейропатий, а также в травматологии и ортопедии для лечения дегенеративно-дистрофической патологии, так и с целью активации хондро- и остеогенеза.

ВЫВОДЫ

Механизм и характер действия экзогенной ГК (коммерческие препараты) зачастую рассматриваются по аналогии с

действием эндогенной ГК в тканях. Экзогенная ГК, представленная коммерческими препаратами, имеет идентичные химические характеристики. При применении препаратов на основе ГК важно учитывать ее физические свойства, то есть конформационные характеристики.

Структурированная ГК матричного типа соответствует физиологическим требованиям взаимодействия ГК с рецепторами клеточной поверхности по типу «ключ-замок». Данный факт определяет уровень активности контакта ГК с клеточными рецепторами, влияет на протекание регенераторно-репаративных процессов и восстановление локального гомеостаза. Данный аспект подтверждается эффективностью применения структурированной ГК в малоинвазивной терапии дегенеративно-дистрофической патологии различной локализации, имеющей в своей основе схожие патогенетические механизмы.

SUMMARY

A. V. Lyudchik, T. V. Abakumava,
O. A. Kvyatkovskaya, V. A. Lapitskaya,
N. S. Serdyuchenko

**STRUCTURING HYALURONIC ACID
MOLECULE AS A NEW METHOD
INCREASING THE EFFECTIVENESS
OF ITS APPLICATION
BY CHANGING CONFORMATIONAL
CHARACTERISTICS**

When evaluating and describing the effect of exogenous (medical devices, medicines) hyaluronic acid the main attention is paid to its chemical characteristics though from a chemical point of view all solutions of HA are identical. Physical properties of the solution determining the nature of HA interaction with receptors and clinical efficacy are not taken into account. Using atomic-force microscopy native and structured solutions (H-in technology) of hyaluronic acid were studied, their morphological characteristics were analyzed.

The structured matrix-type HA corresponds to the physiological requirements of HA interaction with the receptors of the cell surface according to the "key-lock" type. This fact determines the level of HA contact activity with cellular receptors, effects the course of regenerative and reparative processes and the restoration of local homeostasis. This aspect is confirmed by the effectiveness of the structured HA application in minimally invasive therapy of degenerative-dystrophic pathology of various localization basically having similar pathogenetic mechanisms.

Keywords: hyaluronic acid, binding, conformation, adhesive forces, structured solution, morphology of the solution, H-in technology.

ЛИТЕРАТУРА

1. Scott, J. Hyaluronan forms specific tertiary structures in aqueous solutions: a ¹³C NMR study / J. Scott, F. Heatley // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1999. – Vol. 96, N 9. – P. 4850–4855.
2. Ярыгина, В. Н. Биология: учеб. пособие / В. Н. Ярыгина. – Москва: Высш. школа, 2000. – 332 с.
3. Северин, Е. С. Биологическая химия / Е. С. Северин, Т. Л. Алейников, Е. В. Осипов. – Москва: Мед. информ. агенство, 2008. – 541 с.
4. Lee, J. Hyaluronan: a multifunctional megaDalton, stealth molecule / J. Lee, P. Spicer // *Current opinion in cell biology*. – 2000. – Vol. 12,

N 5. – P. 581–586.

5. Jiang, D. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases / D. Jiang, J. Liang, P. W. Nobel // *Physiological reviews*. – 2011. – Vol. 91, N 1. – P. 221–264.

6. Toole, B. P. Hyaluronan and its binding proteins, the hyaladherins / B. P. Toole // *Current opinion in cell biology*. – 1990. – Vol. 2, N 5. – P. 839–844.

7. Toole, B. P. Hyaluronan-CD44 Interactions in Cancer: Paradoxes and Possibilities / B. P. Toole // *Clinical cancer research*. – 2009. – Vol. 15, N 24. – P. 7462–7468.

8. Hyaluronan binding by cell surface CD44 / J. Lesley, V. C. Hascall, M. Tammi, R. Hyman // *The Journal of biological chemistry*. – 2000. – Vol. 275, N 35. – P. 26967–26975.

9. Analysis of CD44-hyaluronan interactions in an artificial membrane system: insights into the distinct binding properties of high and low molecular weight hyaluronan / P. M. Wolny, S. Banerji, C. Gounou [et al.] // *The Journal of biological chemistry*. – 2010. – Vol. 285, N 39. – P. 30170–30180.

10. Characterizing the micro-scale elastic modulus of hydrogels for use in regenerative medicine / C. D. Markert, X. Guo, A. Skardal [et al.] // *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. – 2013. – Vol. 27. – P. 115–127.

11. Regulated clustering of variant CD44 proteins increases their hyaluronate binding capacity / J. Sleeman, W. Rudy, M. Hofmann [et al.] // *The Journal of cell biology*. – 1996. – Vol. 135, N 4. – P. 1139–1150.

12. Injectable hydrogels prepared from partially oxidized hyaluronate and glycol chitosan for chondrocyte encapsulation / D. Y. Kim, H. Park, S. W. Kim [et al.] // *Carbohydrate polymers*. – 2017. – Vol. 157. – P. 1281–1287.

13. Kwon, Induction of osteogenic differentiation in a rat calvarial bone defect model using an In situ forming graphene oxide incorporated glycol chitosan/oxidized hyaluronic acid injectable hydrogel / S. J. Lee, H. Nah, D. N. Heo [et al.] // *Carbon*. – 2020. – Vol. 168. – P. 264–277.

14. Evaluation of morphology, physical and mechanical properties of hyaluronic acid matrices of various molecular weights by atomic force microscopy / T. Kuznetsova, V. Lapitskaya, S. Chizhik [et al.] // *Journal of molecular liquids*. – 2024. – Vol. 412. – P. 221–231.

REFERENCES

1. Scott J, Heatley F. Hyaluronan forms specific tertiary structures in aqueous solutions: a ¹³C NMR study. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(9):4850–5. doi: 10.1073/pnas.96.9.4850
2. Iarygina VN. Biology: ucheb posobie. Moskva, RF: Vyssh shkola; 2000. 332 s. (In Russ.)
3. Severin ES, Aleinikov TL, Osipov EV.

Biological chemistry. Moskva, RF: Med inform agentstvo; 2008. 541 s. (In Russ.)

4. Lee J, Spicer P. Hyaluronan: a multifunctional megaDalton, stealth molecule. *Curr Opin Cell Biol.* 2000;12(5):581–6. doi: 10.1016/s0955-0674(00)00135-6

5. Jiang D, Liang J, Nobel PW. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiol Rev.* 2011;91(1):221–64. doi: 10.1152/physrev.00052.2009

6. Toole BP. Hyaluronan and its binding proteins, the hyaladherins. *Curr Opin Cell Biol.* 1990;2(5):839–44. doi: 10.1016/0955-0674(90)90081-o

7. Toole BP. Hyaluronan-CD44 Interactions in Cancer: Paradoxes and Possibilities. *Clin Cancer Res.* 2009;15(24):7462–8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0479

8. Lesley J, Hascall VC, Tammi M, Hyman R. Hyaluronan binding by cell surface CD44. *J Biol Chem.* 2000;275(35):26967–75. doi: 10.1074/jbc.M002527200

9. Wolny PM, Banerji S, Gounou C, Brisson AR, Day AJ, Jackson DG et al. Analysis of CD44-hyaluronan interactions in an artificial membrane system: insights into the distinct binding properties of high and low molecular weight hyaluronan. *J Biol Chem.* 2010;285(39):30170–80. doi: 10.1074/jbc.M110.137562

10. Markert CD, Guo X, Skardal A, Wang Z, Bharadwaj S, Zhang Y et al. Characterizing the micro-scale elastic modulus of hydrogels for use in regenerative medicine. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2013;27: 115–27. doi: 10.1016/j.jmbbm.2013.07.008

11. Sleeman J, Rudy W, Hofmann M, Moll J, Herrlich P, Ponta H. Regulated clustering of variant CD44 proteins increases their hyaluronate binding capacity. *J Cell Biol.* 1996;135(4):1139–50. doi: 10.1083/jcb.135.4.1139

12. Kim DY, Park H, Kim SW, Lee JW, Lee KY. Injectable hydrogels prepared from partially oxidized hyaluronate and glycol chitosan for chondrocyte encapsulation. *Carbohydr Polym.* 2017;157:1281–7. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.11.002

13. Lee SJ, Nah H, Heo DN, Kim KH, Seok JM, Heo M et al. Kwon, Induction of osteogenic differentiation in a rat calvarial bone defect model using an In situ forming graphene oxide incorporated glycol chitosan/oxidized hyaluronic acid injectable hydrogel. *Carbon.* 2020;168:264–77. doi: 10.1016/j.carbon.2020.05.022

14. Kuznetsova T, Lapitskaya V, Chizhik S, Aizikovich S, Nikolaev A, Sadyrin E et al. Evaluation of morphology, physical and mechanical properties of hyaluronic acid matrices of various molecular weights by atomic force microscopy. *J Mol Liq.* 2024;412:221–31. doi: 10.1016/j.molliq.2024.125833

Адрес для корреспонденции:

220083, Республика Беларусь,
г. Минск, пр. Держинского, 83,
УО «Белорусский государственный
медицинский университет»,
кафедра патологической физиологии,
тел. +375295694944,
e-mail: abakumavavt@bsmu.by,
Абакумова Т. В.

Поступила 20.09.2024 г.