

ГИАЛУРОНАН: СВОЙСТВА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ

О. Капулер, доктор медицинских наук,
А. Галева,
Б. Сельская, Ф. Камилов
ЗАО «Косметологическая лечебница», Уфа
E-mail: olgakapuler@rambler.ru

Большинство используемых в косметологии инъекционных препаратов включают средства на основе углеводного биополимера гиалуронана. Последний участвует в формировании внеклеточного матрикса, имеющего важное значение для многих физиологических функций клеток (передачи регуляторных сигналов, поддержания формы, адгезии, дифференциации, миграции и роста клеток).

Ключевые слова: гиалуронан, внеклеточный матрикс, кожа, биологические функции.

Арсенал инъекционных средств, применяемых в косметологии, постоянно пополняется. Основную долю используемых врачами-косметологами в ежедневной практике препаратов составляют средства на основе углеводного биополимера — гиалуронана (гиалуриновой кислоты — ГК), что объясняется особенностями структуры, свойств и биологической функции данной макромолекулы. Так, в отличие от других гликозаминогликанов, обнаруживаемых в животных тканях, гиалуронан — единственный структурный углевод, который существует как свободная, не связанная ковалентно ни с белками, ни с иными биополимерами, молекула. Во-вторых, применяемый в виде инъекционного препарата гиалуронан химически идентичен гиалурону дермы, и отличается лишь количеством дисахаридных звеньев, а стабилизированные его формы — дополнительным присутствием кросслинкующего агента, который в последнем подвергается полной деградации. В-третьих, гиалуронан является одним из основных компонентов межклеточного вещества дермы и участвует в разнообразных вне- и внутриклеточных процессах. И, наконец, используя для косметических целей те или иные инъекционные формы гиалуронана и действуя по принципу «Не навреди!», косметологи имеют надежный «антидот» — препараты, способные осуществить эстетическую коррекцию результатов применения.

Структура и свойства гиалуронана. Гиалуронан, как и остальные гликозаминогликаны (ГАГ), представляет собой линейный неразветвленный полимер, построенный из повторяющегося дисахаридного фрагмента гиалобиурононовой кислоты, состоящей из D-глюкуроида-β-(1,3)-(N-ацетил)-глюкозамина и соединенной β (1-4)-гликозидной связью. Карбоксильные, гидроксильные и ацетоамидные группы придают молекуле этого анионного гетерополисахарида гидрофильные свойства. От других ГАГ гиалуронан отличается тем, что он не сульфатирован, не подвергается химической модификации после биосинтеза, имеет высокую молекулярную массу, в межклеточном веществе соединительной ткани находится и в свободном состоянии [4].

Молекулярная масса ГК колеблется от 10^5 до 10^7 Дальтон (Да) в то время как другие ГАГ имеют гораздо более низкую молекулярную массу и представлены, как правило, многочисленными изомерами (из-за наличия сульфатированных групп и других особенностей структуры). Гиалуронан, не смотря на разные источники происхождения, всегда химически одинаков и различается только молекулярной массой. Средний продольный размер макромолекулы гиалуронана с молекулярной массой 2 500 000 Да в растворе составляет >10 мкм, что приблизительно равно диаметру эритроцита человека и существенно превышает средний размер бактериальной клетки.

Конформационные превращения макромолекул сопровождаются изменением ряда физико-химических и биологических свойств тканей [2]. Так, длина и гибкость молекулы гиалуронана изменчивы. Гибкость полимера — одна из характеристик, определяющих его макроскопические свойства [3], в частности, амортизации ударных нагрузок в хрящах, сокращение поперечнополосатых мышц, упругость кожи и др. [4, 5]. Помимо конформационных особенностей, на образование гиалуронаном сетчатой структуры и в целом на характеристики вязкоэластических свойств межклеточного матрикса влияют размер молекулы и его концентрация. Не только высокомолекулярный, но и низкомолекулярный гиалуронан образует сетку, однако такая структура имеет отдельные сетчатые островки, находящиеся на определенном расстоянии друг от друга. Такие изменения структуры в результате уменьшения размеров макромолекулы особенно опасны для тканей, выполняющих оптические и механические функции (стекловидное тело, дерма, синовиальная жидкость) [6].

Особенности обмена гиалуронана. Гиалуронан присутствует в соединительной ткани всех позвоночных, в наибольшей степени — в рыхлой волокнистой соединительной ткани. Биосинтез гиалуронана (в отличие от других ГАГ, сборка которых осуществляется на мембране гранулярного эндоплазматического ретикулума на стержневом белке), протекает на внутренней поверхности клеточной мембраны клеток фибробластического дифферона [7] с участием гиалуронансинтазы (HAS). Это — небольшой фрагмент, несколько раз пронизывающий плазматическую мембрану и образующий канал, через который вновь образованная молекула гиалуронана выводится из клетки в экстрацеллюлярный матрикс [8]. Фермент осуществляет поочередный перенос остатков глюкоуроновой кислоты и (N-ацетил)-глюкозамина в активированных формах с участием абсорбционного и каталитического центров для каждого из этих субстратов. Специальная зона фиксации синтезируемой *de novo* цепи полисахарида обеспечивает перемещение молекулы глюкоуронана на 1 звено по мере присоединения последующего мономера. Перенос очередного моносахаридного звена сопровождается расходом энергии с отщеплением молекулы уридиндифосфата. Длина синтезируемой макромолекулы гиалуронана зависит от вида HAS, катализирующей ее производство. У человека известны 3 изоформы HAS [9]: 1-я — HAS1 — осуществляет медленный синтез высокомолекулярного гиалуронана (>2 млн Да), 2-я — HAS2 — синтезирует полисахарид с меньшей молекулярной массой (до 2 млн Да), 3-я — HAS3 — самая активная, синтезирует короткие цепи гиалуронана ($3 \cdot 10^5$ Да). Эти типы изоформы HAS являются продуктами 3 разных генов. Экспериментально на мышах с нокаутированными генами HAS показано, что выключение гена HAS2 проявляется тяжелыми

нарушениями эмбриогенеза [10]. Экспрессия гиалуронансинтаз HAS1 и HAS2 осуществляется под влиянием трансформирующего фактора роста – $\beta 1$ [11].

Максимальная длина макромолекулы гиалуронана, продуцируемого гиалуронансинтазой, достигает 8 млн Да. Преваляющее в биосинтезе той или иной длины молекулы зависит от изоформы HAS, активность которых, в свою очередь, зависит от этапа жизнедеятельности клетки-продуцента. Так, если клетка в состоянии дифференцировки, экспериментально показано, что преимущественно вырабатывается полисахарид с молекулярной массой не более 105 Да, а при переходе в зрелое состояние клетки возрастает продукция гиалуронана с молекулярной массой до $2 \cdot 10^6$ Да [12].

Скорость обмена гиалуронана высокая, период его полураспада в коже составляет 24–48 ч. За этот период расщепляется и вновь синтезируется до 50% данного полисахарида [13]. Гиалуронан не вступает в ковалентные связи с белками и не участвует в образовании протеогликанов, но *in vivo* связывается устойчивыми электростатическими (ионными) связями с различными белками, которые объединяются в семейство гиаладгеринов [14]. Существуют гиаладгерини внеклеточного матрикса, цитоплазматической мембраны и интрацеллюлярные гиалуронансвязующие белки. В экстрацеллюлярном матриксе, таким образом, имеются 3 метаболитических пула гиалуронана: 1) связанный гиаладгеринами матрикса; 2) связанный гиаладгеринами клеточной мембраны, 3) свободный. Эти пулы мало отличаются по периоду полураспада. Основная масса (99%) гиалуронана межклеточного матрикса находится в свободном состоянии. Роль гиаладгеринов в экстрацеллюлярном матриксе выполняют в основном стержневые белки протеогликанов, а гиаладгерини клеточных мембран являются трансмембранными рецепторными протеинами – RHAMM, BRAL1, SPACRAN, LYVE-1 [14], однако наибольшее распространение и значение в качестве гиаладгерина имеет рецептор CD44, являющийся гепарансульфатным протеогликаном.

Рецептору CD44 принадлежит решающая роль в катаболизме гиалуронана. Расщепление гиалуронана осуществляют ферменты, активные в кислой среде, расположенные внутриклеточно, и деградации гиалуронана предшествует эндоцитоз трансмембранных рецепторов, преимущественно CD44 [15]. Эта функция принадлежит наиболее распространенной изоформе – CD44H. Молекулы CD44 связываются с длинной макромолекулой гиалуронана, собираются в кластер на стенках клеточной мембраны, вовлекая в кавеолу гиалуронана. Образуется эндосома, которая сливается с лизосомой. В эндосоме и в основном в лизосоме гиалуронан подвергается воздействию гиалуронидаз, а затем β -глюкуронидазы и β -(N-ацетил)-глюкозаминидазы. Конечные продукты деградации, состоящие из 4 дисахаридов и моносахаридов, попадают в кровь и частично выводятся с мочой [16].

Биологические функции гиалуронана. Гиалуронан совместно со специализированными гликопротеинами и протеогликанами формирует основное вещество внеклеточного матрикса. Структурная организация растворов гиалуронана придает им вязкоупругие свойства и обеспечивает такие биомеханические функции гиалуронана в матриксе, как заполнение, фильтрация, смазочная [17]. Непосредственно гиалуронан определяет такие физиологические функции межклеточного вещества, как водоудерживающая способность, ионный обмен, избирательная по молекулярной массе скорость транспорта веществ. Так,

небольшие молекулы (в частности, молекулы воды, электролитов, питательных веществ, конечных продуктов метаболизма клеток) свободно диффундируют в толще малоплотного домена макромолекулы гиалуронана, а большие молекулы (например, белков) при этом задерживаются. По этой же причине внеклеточный матрикс непроницаем для микробных инвазий и высокомолекулярных токсинов. Таким образом, коллоидный матрикс и водная фаза формируют основной компонент аморфного вещества. Водная фаза, с одной стороны, разобщает структурные элементы межклеточного вещества, поддерживая их пространственное положение, а с другой – является интегрирующей средой, обеспечивающей процессы диффузии и активного транспорта различных молекул. Гиалуронан при этом остается важнейшим компонентом, способствующим поддержанию водного гомеостаза тканей, необходимого для их нормальной жизнедеятельности.

Гиалуронан является элементом в сети коллагеновых волокон 1-го, 4-го, 7-го типов. В комплексе с протеогликанами он участвует в реализации физиологических функций таких важнейших молекул межклеточного матрикса, как фибронектин, витронектин, ламинин, агрекан, версикан и др., в поддержании структурной целостности различных тканей, включая хрящевую, нервную, стенку кровеносных сосудов и т.д. Адгезивные свойства гиалуронана проявляются и тем, что богатый им тонкий слой перичеллюлярного вещества, обволакивающий клетку, обеспечивает первоначальную адгезию фибробласта и матрикса; позднее она сменяется более прочной адгезией, опосредованной интегринами и формирующимися фокальными контактами [18].

Внеклеточный матрикс – не просто инертная среда, обеспечивающая опору клеток. Он имеет важное значение для многих физиологических функций клеток: передачи регуляторных сигналов, поддержания формы, адгезии, дифференциации, миграции и роста клеток. Во всех этих процессах принимает непосредственное участие гиалуронан [19].

Вероятно, гиалуронану присуща роль сигнальной молекулы, оказывающей воздействие через специализированные рецепторы цитоплазматической мембраны и некоторые интрацеллюлярные пути распространения сигналов на различные функции клеток [8]. Во время дифференцировки клеточного пула происходит накопление гиалуронана, что совпадает с процессом миграции клеток во внеклеточном матриксе [20]. Будучи главным компонентом перичеллюлярного слоя, который формируется на поверхности пролиферирующих и мигрирующих клеток, гиалуронан облегчает разделение клетки, а также формирует каналы разной степени гидратированности, способствующие миграции клетки. Возможно, участие в процессе клеточной миграции реализуется гиалуронаном и за счет специфических трансмембранных рецепторов CD44. Доказано, что если к очень подвижным трансформированным фибробластам добавить экзогенную высокомолекулярную ГК, то двигательная активность клеток резко уменьшается за счет связывания полисахарида с рецептором CD44. Данный механизм регулируется при непосредственном участии металлопротеиназ [21]. Последние способны отщеплять домен связывания гиалуронана CD44, при этом миграция клеток облегчается. Ингибиторы мембранно-связанных металлопротеиназ блокируют эту регуляторную систему [22]. Через этот же рецептор гиалуронан влияет на апоптоз клеток и воспалительные реакции. На подвижность клеток гиалуронан влияет и через другой специфический рецептор – RHAMM.

Для участия в сигнальных путях, регулирующих активацию, пролиферацию, миграцию, адгезию, дифференцировку и апоптоз клеток, ГК кооперируется с группой белков – гиаладгеринами, к которым, как уже отмечалось, относятся и рецепторы CD44 и RНАММ. Если рецептор CD44 локализован на клеточной мембране, то рецептор RНАММ обнаружен как на клеточной мембране, так и в цитозоле и ядре клетки, что свидетельствует о возможном его участии во внутриклеточном транспорте гиалуронана [15]. Предполагается, что интрацеллюлярный гиалуронан участвует в процессинге РНК и перегруппировке хромосом [8].

ГК обладает противовоспалительными свойствами и участвует в обеспечении защиты клеток и внеклеточных структур от окислительной деградации. Гиалуронан оказывает регулирующее влияние на функции клеток, участвующих в иммунных реакциях [11]. В процессах ранозаживления ведущая роль принадлежит фрагментам гиалуронана с различной молекулярной массой, однако в репарации задействованы и длинноцепочечные молекулы [23].

Особенности строения, свойств, метаболизма и биологических функций способствовали созданию на основе гиалуронана группы препаратов, которые нашли широкое применение в эстетической медицине. Использование биополимеров на основе ГК в косметологии насчитывает более 15 лет. За это время изменились источники сырья (от животного происхождения до биоинженерного производства), концепции состава филлеров (от 2-фазных к монофазным), расширился потенциальный спектр показаний к применению, появились продукты, содержащие преимущественно стабилизированную низкомолекулярную ГК. Накоплен огромный практический опыт, основанный прежде всего на констатации значимых визуализируемых клинических данных. При этом научно-исследовательская база, объясняющая формирование тех или иных клинических результатов, зачастую отсутствует либо недостаточна для понимания процессов, формирующихся на фоне инъекирования ГК различного физико-химического строения. Необходимы дальнейшие исследования в этой области, которые позволят охарактеризовать процессы, протекающие в коже и индуцированные применением биополимеров гиалуронана.

Литература

1. Lippendinger G., Fehre C., Reitingner S. In: Chemistry and biology of hyaluronan. Ed. by H. Gard / Oxford: Elsevier, 2004; p. 343.
2. Katsuyoshi Nishinari, Rheo Takahashi. Interaction in polysaccharide solutions and gels // Curr. Opin. Colloid Int. Sci. – 2003; 8 (4–5): 396–400.

3. Фаллер Дж., Шилд Д. Молекулярная биология клетки / М., 2006.
4. McKee C., Penno M., Cowman M. HA fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages the role of HA size and CD-44 // J. Clin. Invest. – 2006; 98: 2403–13.
5. Швайчак Э. Зависимость вязкости водного раствора гиалуроновой кислоты от внешних полей. Ч. 2 // Рос. журн. биомех. – 2004; 8 (1): 98–104.
6. Fischer E., Callaghan P., Heatley F. Shear flow affects secondary and tertiary structures in hyaluronan solution as shown by rheo-NMR // J. Molec. Struct. – 2002; 603: 303–11.
7. Scott J., Heatley F. Hyaluronan forms specific tertiary structures in aqueous solutions: a 13CNMR study // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1999; 96 (9): 4850–5.
8. Lee J., Spicer P. Hyaluronan: a multifunctional megaDalton, stealth molecule // Curr. Opin. Cell. Biol. – 2000; 12: 582–6.
9. Stern R., Asari A., Sugahara K. Hyaluronan fragments: an information rich system // Eur. J. Cell. Biol. – 2006; 85: 699–715.
10. Gard H., Hales C. Chemistry of Hyaluronan / Oxford, 2004.
11. Meran S., Thomas D., Stephens P. et al. Involvement of hyaluronan in regulation of fibroblast phenotype // J. Biol. Chem. – 2007; 282 (35): 25687–97.
12. Биология. Под ред. В.Н. Ярыгина / М.: Высшая школа, 2000; с. 332.
13. Кошевенко Ю.Н. Кожа человека / М., 2006.
14. Day A., Prestwich G. Hyaluronanbinding proteins: tying up the giant // J. Biol. Chem. – 2002; 277: 4385–8.
15. Панасюк А.Ф. Хондроитинсульфаты и их роль в обмене хондроцитов и межклеточного матрикса хрящевой ткани // Ревматология. – 2009; 3: 28–36.
16. Stern R. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway // Eur. J. Cell. Biol. – 2004; 83 (7): 317–25.
17. Tammi M., Day A., Turley E. Hyaluronan and homeostasis: a balancing act // J. Biol. Chem. – 2007; 277 (7): 4581–4.
18. Zaidel-Bar R., Cijhen M., Addati L. et al. Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes // Bioche. Soc. Trans. – 2004; 32 (3): 416–20.
19. Северин Е.С., Алейников Т.Л., Осипов Е.В. Биологическая химия / М.: МИА, 2008; с. 541.
20. Хабаров В.Н., Бойков П.Я., Селянин М.А. Гиалуроновая кислота / М., 2012; с. 132.
21. Онищенко К. Внеклеточный матрикс // Эстет. мед. – 2008; 7 (4): 449–56.
22. Kogan G., Soltes L., Stern R. Hyaluronic acid: its function and degradation in vivo systems. Bioactive natural products, Part D / Amsterdam: Elsevier, 2008; p. 131–43.
23. Чайковская Е.А., Шарова А.А. Гиалуроновая кислота и ее фрагменты. Биологические функции в ракурсе фармакотерапии // Инъекционные методы в косметологии. – 2012; 1: 60–73.

HYALURONAN: PROPERTIES AND BIOLOGICAL ROLE

O. Kapuler, A. Galeeva, B. Selskaya, F. Kamilov
Cosmetology Clinic, Ufa

Most cosmetologically used injectable drugs include agents based on the carbohydrate copolymer hyaluronan. The latter is involved in the formation of the extracellular matrix that is of great importance for many cellular physiological functions (regulatory signal transmission, maintenance of cell shape, adhesion, differentiation, migration, and growth).

Key words: hyaluronan, extracellular matrix, skin, biological functions.