

Гиалуроновая кислота: молекулярная масса определяет все!

1 ВМЕСТО ВВЕДЕНИЯ. НАТИВНАЯ ГИАЛУРОНОВАЯ КИСЛОТА: ЕЕ МОЛЕКУЛЫ И ИХ ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ КОЖИ

A. Капиллярактивирующие компоненты

По своей химической структуре гиалуроновая кислота (ГК) представляет собой линейный полисахарид, состоящий из чередующихся дисахаридов, которые включают D-гиалуроновую кислоту и D-N-ацетилглюкозамин, соединенные β -1,4- и β -1,3-гликозидными связями (рис. 1).

Гиалуроновая кислота – основной небелковый компонент внеклеточного матрикса соединительной ткани. Полианионная молекула ГК обладает высочайшей гигроскопичностью – свойством притягивать и удерживать воду. За счет этого обеспечивается оптимальный уровень гидратации тканей, что способствует не только поддержанию внутреннего объема и повышению устойчивости кожи к внешней механической нагрузке (тургора), но и обеспечивает оптимальную «организацию» белкового каркаса дермы, включающего волокна коллагена и эластина. Таким образом, гиалуроновая кислота представляет собой базовую структуру для организации гелеобразного компонента внеклеточной среды, в

состав которого входят гликозаминогликаны, протеогликаны и другие необходимые составляющие (рис. 2).

Гиалуроновая кислота в большой концентрации присутствует в коже эмбриона человека, достаточно высокий ее уровень сохраняется и до зрелого возраста. Однако при старении (кожи и организма в целом) ситуация драматически меняется: большая часть ГК оказывается связанной с белками, из-за

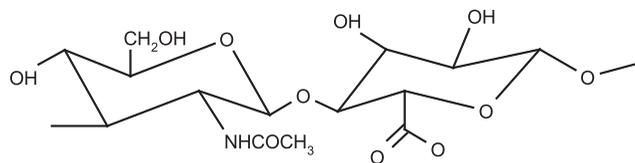


Рис. 1. Дисахаридный фрагмент полимерной цепи ГК

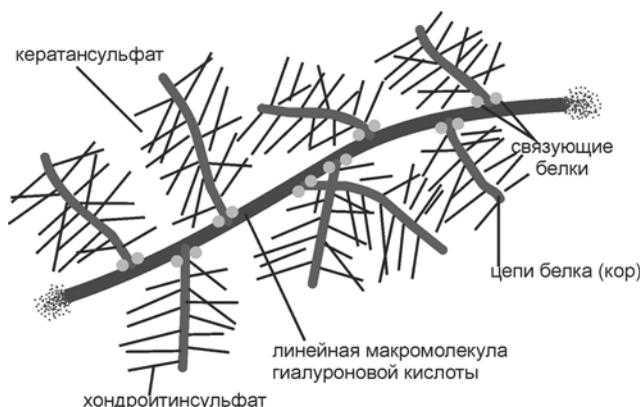


Рис. 2. Цепи коровьего белка, наглядно демонстрирующие структурообразующую роль ГК в организации гелеобразного компонента внеклеточного матрикса дермы [1]

Carlo Soranzo (Карло Соранцо), MD, отделение клинического инжиниринга Ливерпульского университета, отделение экспериментальной дерматологии Лондонской королевской больницы (Италия–Великобритания)

чего снижаются ее гидрофильность и гигроскопичность. При этом изменяются вязкость внеклеточного матрикса, уровень его гидратации. Все это сказывается на структуре и метаболизме белковых молекул. В целом же можно сказать, что после 50 лет гомеостаз тканей кожного покрова значительно трансформируется.

А. «Гиалуроновая кислота» – комплекс молекул с разной биологической активностью

В последнее время значительно возрос интерес к биологической роли гиалуроновой кислоты, в частности к ее взаимодействию с рецепторами на мембране клеток. В этом аспекте очень важно понять, какую роль играет молекулярная масса ГК, поскольку термином «гиалуроновая кислота» мы обозначаем целое семейство молекул, биологическая активность и функции которых зависят от молекулярной массы.

Основной единицей молекулы ГК считается мономерный фрагмент – дисахарид с молекулярной массой около 450 Да. Показано [2], что олигосахариды, включающие около 10 мономерных единиц, обладают проангиогенной активностью, т.е. способствуют пролиферации клеток эндотелия сосудов и росту новых капилляров. К тому же олигосахариды обладают провоспалительным действием.

Молекулы ГК, состоящие из 150–500 дисахаридных единиц, в значительной степени ускоряют пролиферацию фибробластов и кератиноцитов. На фоне обновления клеточного пула происходит активация синтетических процессов. В дерме накапливаются волокнистые белки, в эпидермисе синтезируются пептиды антимикробной защиты. Все это происходит при взаимодействии той или иной формы ГК с рецепторами на клеточной мембране, а в результате активируются внутриклеточные сигнальные процессы и возрастает экспрессия соответствующих генов.

Молекулы, включающие до 1500 мономерных единиц, обладают противовоспалительными свойствами, образуют растворы большой вязкости, а потому принимают активное участие в построении внеклеточного матрикса дермы, в частности – в структурной организации коллагеновой сети.

При увеличении размера молекулы до 2000 мономерных единиц и более возрастает роль ГК в поддержании гидробаланса (оптимального уровня влаги) дермы и вязкости среды. Высокомолекулярные

формы ГК проявляют максимальную антиоксидантную активность [3].

Даже краткий обзор биологической активности разных форм ГК показывает, что об этом соединении нельзя говорить «в единственном числе»: при обсуждении предполагаемых и реальных эффектов от косметологических процедур с ее использованием следует сразу же уточнять молекулярную массу соединения. А при рассмотрении конкретного препарата учитывать не только размер молекулы и чистоту субстанции в плане примесей белка, нуклеиновых кислот, эндотоксина, растворителей, но и «молекулярную чистоту», т.е. отсутствие фракций с другой молекулярной массой и другим (часто противоположным) биологическим действием.

2 ФОРМЫ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ В СОСТАВЕ ИНЪЕКЦИОННЫХ ПРЕПАРАТОВ, ВЫПУСКАЕМЫХ КОМПАНИЕЙ FIDIA FARMACEUTICI S.P.A.

Компания Fidia Farmaceutici S.p.A. (Италия) – один из мировых лидеров в научных исследованиях, технологических инновациях и производстве медицинских препаратов на основе ГК [4–8]. Предмет заслуженной гордости компании – фармацевтическая субстанция ГК высочайшей степени чистоты, что достигается проведением тщательной гель-фильтрации. Эта субстанция используется при производстве различных материалов медицинского назначения, а также инъекционных препаратов для эстетической медицины – Ial-System, Ial-System ACP и Ial-System DUO.

А. | Препарат Ial-System

В состав препарата Ial-System, предназначенного для базовой биоревитализации кожи, входит высокомолекулярная (с молекулярной массой от 1000 кДа) ГК с нативной структурой, т.е. не модифицированная и не стабилизированная. Фундаментальное действие высокомолекулярной ГК заключается в обеспечении гидратации тканей, водного обмена между клетками и внеклеточным матриксом, а также поддержании вязко-эластичных свойств тканей (табл. 1).

ТАБЛ. 1. Биологическое действие высокомолекулярной ГК препарата Ial-System

ЗАЩИТА	<p>Антиоксидантное действие:</p> <ul style="list-style-type: none"> • на уровне клеток – характерно именно для высокомолекулярной ГК – механическая защита клеток от активных форм кислорода путем формирования высоковязкого периклеточного окружения); • на уровне тканей в целом – типично для всех форм ГК – нейтрализация свободных радикалов
ГИДРАТАЦИЯ	<p>Длительная гидратация кожи:</p> <ul style="list-style-type: none"> • восстановление гидробаланса; • создание запасов воды для клеток
ДЕТОКСИКАЦИЯ	Разбавление, демобилизация и выведение из клетки токсических соединений

При ферментативной деградации высокомолекулярной ГК образуются ее низкомолекулярные фрагменты, и высвобождается большое количество свободной воды, которая поступает в клетки. В условиях окислительного стресса также происходит деполимеризация ГК, при этом свободные радикалы нейтрализуются.

При внутрикожном введении препарата Ial-System (1,8% ГК) ГК поступает в дерму в количестве, в 50–60 раз превышающем физиологический уровень ее содержания, что и обеспечивает достаточно длительную гидратацию кожи. Именно поэтому препарат можно рассматривать как систему восстановления гидробаланса и обеспечения запаса воды для клеток.

Кроме того, насыщение водой внеклеточного матрикса способствует демобилизации токсинов и продуктов жизнедеятельности клеток и их выведению через лимфатическую систему. Поэтому био-ревитализация считается одним из основных спо-

собов защиты кожи от экзогенной и эндогенной интоксикации.

Б. | Препарат Ial-System ACP

Гиалуроновая кислота с молекулярной массой около 200 кДа (до 500 дисахаридных единиц), как уже было сказано, обладает иными свойствами. Действие таких молекул реализуется не только за счет изменения физико-химических свойств внеклеточного матрикса в месте инъекции, но и через взаимодействие с рецепторами на поверхности клеток, в том числе с рецепторами CD44. Следствием такого взаимодействия становится активация пролиферации фибробластов. Причем, если сравнивать разные фракции ГК (с молекулярной массой от 50 до 1200 кДа), то, по данным лабораторных исследований, наиболее выраженная активация пролиферации фибробластов и кератиноцитов кожи человека достигается при использовании молекул с массой именно 200 кДа.

Группа швейцарских специалистов установила, что возрастная атрофия эпидермиса кожи во многом связана с уменьшением содержания в коже свободной ГК и снижением экспрессии CD44 [9]. Возрастное истончение эпидермиса обуславливает ослабление защитных функций кожи и способствует развитию ряда патологических процессов. Топическое нанесение препарата с фрагментами ГК с молекулярной массой 50–400 кДа приводило к гиперплазии эпидермиса у мышей и значительному увеличению толщины кожи у пациентов с возрастной или индуцированной глюкокортикоидами атрофией кожи (рис. 3).

Интересно, что ГК с молекулярной массой менее 50 или более 400 кДа такого действия не оказывала. При добавлении данной фракции (50–400 кДа)

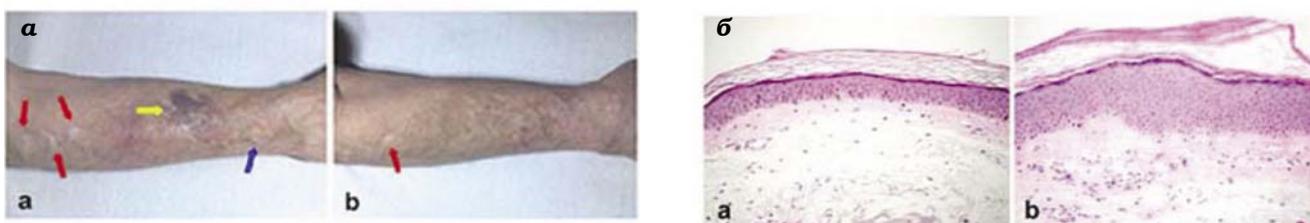


Рис. 3. Влияние топического препарата с фрагментами ГК с молекулярной массой 50–400 кДа на толщину эпидермиса кожи пациентов с возрастной или стероид-индуцированной атрофией кожи [9]. А. Пациенты с атрофией кожи в течение месяца наносили препарат с ГК или плацебо. После использования плацебо клиническая картина не изменилась (а); после нанесения препарата ГК рельеф кожи выровнялся, исчезли кровоизлияния (желтая стрелка), псевдорубы (красные стрелки), стала менее заметна сеть поверхностных сосудов (голубая стрелка) (б). В. Гистологическая картина кожи пациентов с атрофией после месяца нанесения плацебо (а) и препарата ГК (б). На снимке б наблюдается заметное увеличение толщины эпидермиса и его складчатости

к культуре клеток наблюдалась активация пролиферации кератиноцитов, однако данный эффект отсутствовал при использовании клеток, не экспрессирующих рецептор CD44 [9]. Таким образом было установлено, что стимулирующий эффект опосредован взаимодействием ГК с рецепторами. Аналогичные результаты были получены в экспериментах на животных (рис. 4). Экспериментальные животные были разделены на 4 группы. Группы А и С являлись контрольными, причем в группу А были отобраны животные дикого фенотипа (обычные мыши), а в группу С – животные с нокаутом гена CD44. Животным контрольных групп в течение месяца наносили на кожу препарат плацебо. Толщина эпидермиса после нанесения плацебо у животных обеих групп не изменилась. В группы В и D были экспериментальными, при этом в группу В отобрали животных дикого фенотипа, а в группу D – животных с нокаутом гена CD44. Животным экспериментальных групп в течение месяца наносили препарат с фрагментами ГК. В конце эксперимента толщина эпидермиса атрофичной кожи у мышей с нормальной экспрессией рецептора CD44 (в группе В) значительно увеличилась, в то время как у животных с отсутствием рецептора CD44 (в группе D) толщина эпидермиса не изменилась.

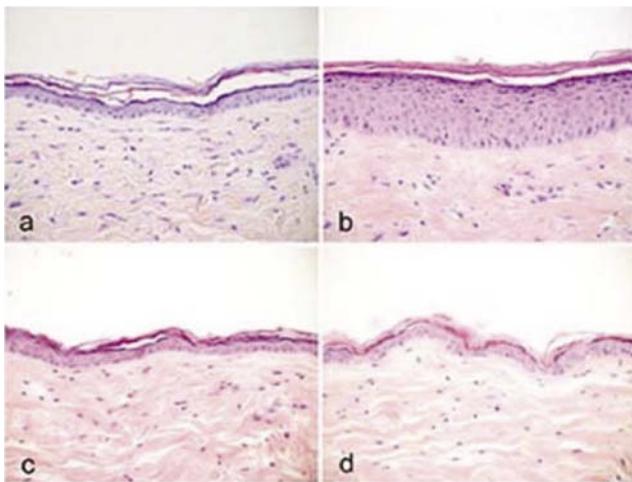


Рис. 4. Влияние фрагментов ГК с молекулярной массой 50–40 кДа на толщину эпидермиса на модели атрофии кожи мышей [9]. Кожа животных контрольных групп А и С после месяца нанесения препарата плацебо (а, с). Толщина эпидермиса после нанесения плацебо не изменилась. Кожа животных экспериментальных групп В и D после месяца нанесения препарата с фрагментами ГК (b, d). Толщина эпидермиса у мышей с нормальной экспрессией рецептора CD44 значительно увеличилась, а у животных с отсутствием рецептора CD44 (D) не изменилась

Похожие исследования с использованием ГК с молекулярной массой 200 кДа были проведены в компании Fidia Farmaceutici S.p.A. Обнадеживающие результаты исследования подсказали, что найден «ключ» к решению проблемы старения кожи. Однако оказалось, что относительно короткие молекулы ГК подвергаются быстрой деградации и выведению из кожи, а потому при интрадермальном введении обеспечить длительное поддержание стимулирующего сигнала с их помощью практически невозможно, даже если инъекировать препарат постоянно. Проблема была решена при разработке технологии АСР [10].

С помощью этой технологии удалось стабилизировать короткие молекулы ГК с массой 200 кДа с помощью сшивки за счет внутренних сложноэфирных связей между отдельными полисахаридными цепочками (аутокросслинкинга). Важно, что в формирующихся связях нет молекул инородного стабилизатора, как в субстанции ГК, которая входит в состав филеров. А потому при биодеградации АСР-препаратов, проходящей с участием тканевых эстераз, происходит высвобождение молекул с заданной молекулярной массой и нативной структурой, что обеспечивает их полноценное взаимодействие с рецепторами. Так был создан препарат Ial-System АСР.

Экспериментальные и клинические исследования показали, что высоковязкий гель на основе эфира АСР (с содержанием ГК 2%) в дерме подвергается постепенной биодеградации с высвобождением активных фрагментов ГК, которые стимулируют пролиферативную активность фибробластов и обеспечивают реконструкцию внеклеточного матрикса дермы за счет синтеза коллагена, эластина и гиалуроновой кислоты (табл. 2). Таким образом, гидратация кожи при использовании препарата Ial-System АСР связана не столько с присутствием в коже экзогенных молекул, сколько с синтезом в ней собственной высокомолекулярной ГК.

ТАБЛ. 2. Биологическое действие ГК с молекулярной массой 200 кДа, входящей в состав препарата Ial-System АСР

ПРОЛИФЕРАЦИЯ КЛЕТОК	ГК с молекулярной массой 200 кДа стимулирует пролиферативную активность фибробластов и кератиноцитов
ВОССТАНОВЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ И СВОЙСТВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ДЕРМЫ	Новая популяция активных клеток включается в процессы синтеза основных компонентов внеклеточного матрикса

В. | Препарат Ial-System DUO

Еще одна задача, поставленная и решенная специалистами компании Fidia Farmaceutici S.p.A., – создание препарата, сочетающего в себе свойства филера и биоревитализанта. Идеология создания и поддержания внутреннего объема мягких тканей не только за счет длительного присутствия гидрофильного материала, но и путем активации регенераторных процессов, получила название «биореволюметрии». Для этого ими была разработана технология «MU.C.H» [11] – мультикросслинкинга.

Для производства препарата Ial-System DUO используются две фракции ГК – с молекулярной массой 700 и 200 кДа. Среднемолекулярная ГК подвергается стандартному процессу стабилизации с участием BDDE. Гиалуоновая кислота с молекулярной массой 200 кДа подвергается процессу аутокросслинкирования с образованием эфира АСР. Этот компонент имеет меньшую вязкость и более гибкую структуру. С помощью особого процесса совмещения двух материалов достигается равномерное распределение частиц АСР в ячейках стабилизированной ГК (рис. 5). Так формируется защитный каркас для молекул АСР, которые подвергаются постепенной биodeградации (деэтерификации) с высвобождением активной формы ГК, стимулирующей клеточную пролиферацию.

Что же происходит в коже при инъекции этого препарата? По мере биodeградации стабилизированной ГК и уменьшения объема введенного геля накапливается эффект увеличения объема тканей за счет активации регенераторных процессов. Это и есть суть дуализма биологической активности препаратов-биореволюметриков. Дополнительный

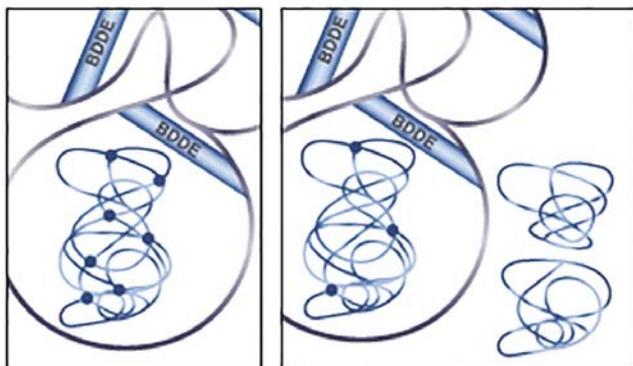


Рис. 5. Схематическое изображение структуры двух фракций ГК в составе препарата Ial-System DUO, полученного по технологии MU.C.H. А – исходная структура препарата, Б – высвобождение в ткани молекул ГК с массой 200 кДа после деэтерификации

«плюс» – активная пролиферация клеток кожи обеспечивает улучшение ее внешнего вида. Очень важно, что стимуляция клеток происходит на протяжении длительного времени, имитируя естественный процесс коммуникации матрикса и клеток в молодой коже. И обеспечивается это созданием пространственной защиты фрагментов АСР от деэтерификации и биodeградации включением в структуру препарата стабилизированной ГК.

Лабораторные исследования подтвердили реализацию этого механизма. В пробирках к гелю АСР, смешанному с ГК с молекулярной массой 700 кДа, и этому же гелю, инкорпорированному в структуру стабилизированной ГК, добавляли фермент эстеразу. В течение 4 часов наблюдалось практически полное разрушение эфирных связей в первом образце (препарат Ial-System АСР), что сопровождалось значительным изменением вязкости, которая достигла уровня немодифицированной субстанции. В том же образце, где присутствовали две формы ГК – стабилизированная с мощностью BDDE и эфир АСР – (препарат Ial-System DUO), уменьшение вязкости было значительно меньше. Расчеты показали, что деэтерификации в этом случае подверглись лишь 20% эфира (рис. 6).

Таким образом, волумизирующий эффект препарата Ial-System DUO реализуется с участием трех механизмов: присутствия вязкого геля стабилизированной ГК, дополнительного привлечения воды при высвобождении эфира АСР и повышения числен-

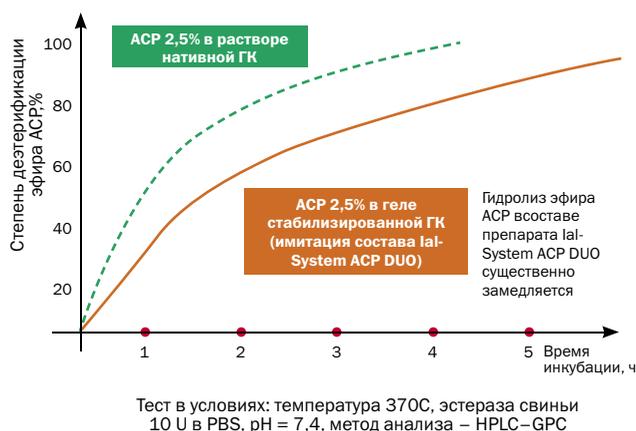


Рис. 6. Эфир АСР защищен от деэтерификации благодаря включению в ячеистую структуру геля стабилизированной ГК. Тест был проведен в условиях *in vitro* с использованием свиной эстеразы (10 ЕД), pH среды 7,4, температура 370С. Метод анализа – высокоэффективная жидкостная хроматография и гельпроникающая хроматография

ности активных фибробластов под действием фракции ГК с молекулярной массой 200 кДа. Все это существенно отличает данный препарат от традиционных филеров на основе стабилизированной ГК. Терапевтические возможности биореволюметрика Ial-System DUO представлены в таблице 3.

ТАБЛ. 3. Механизмы корректирующего действия препарата Ial-System DUO

УЛУЧШЕНИЕ СОСТОЯНИЯ КОЖИ	Повышение уровня гидратации кожи за счет пролонгированного высвобождения нативной ГК; Выравнивание морщин путем локального возмещения объема мягких тканей
ЭФФЕКТ ОБЪЕМНОЙ КОРРЕКЦИИ	Увеличение объема мягких тканей за счет присутствия вязкоупругого геля на основе стабилизированной ГК
УПЛОТНЕНИЕ КОЖИ	Восстановление клеточного пула и структуры внеклеточного матрикса за счет действия ГК с молекулярной массой 200 кДа

3 | ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день линия Ial-System состоит из трех препаратов со специфическим действием. Технология их изготовления и способ применения защищены патентами.

Препарат Ial-System содержит очищенную высокомолекулярную гиалуроновую кислоту (с молекулярной массой 1000 кДа) и предназначен для защиты, гидратации и детоксикации кожи.

Препарат Ial-System ACP производится по технологии аутокросслинкинга гиалуроновой кислоты с молекулярной массой 200 кДа и служит для реактивации клеточной пролиферации и синтеза компонентов межклеточного матрикса.

С помощью технологии мультикросслинкинга получают препарат Ial-System DUO, объединяющий в себе свойства филера и пролонгированного био-

ревитализанта. Этот препарат позволяет проводить непосредственную механическую коррекцию морщин, восстанавливать объем мягких тканей на уровне дермы и гиподермы и (с помощью эфира АСР) обеспечивать регенерацию тканей.

ЛИТЕРАТУРА

1. <http://www.studfiles.ru/preview/4590350>
2. Montagner IM, Merlo A, Carpanese D, et al. Drug conjugation to hyaluronan widens therapeutic indications for ovarian cancer. *Oncoscience*, 2015;2(4):373–381.
3. Pavan M, Galesso D, Menon G., et al. Hyaluronan derivatives: Alkyl chain length boosts viscoelastic behavior to depolymerization. *Carbohydr Polym*, 2013;97(2):321–326.
4. Finelli I, Chiessi E, Galesso D, et al. Gel-like structure of a hexadecyl derivative of hyaluronic acid for the treatment of osteoarthritis. *Macromol Biosci*, 2009;9(7):646–653.
5. Myers SR, Partha VN, Soranzo C, et al. Hyalomatrix: a temporary epidermal barrier, hyaluronan delivery, and neodermis induction system for keratinocyte stem cell therapy. *Tissue Eng*, 2007;13(11):2733–2741.
6. Soranzo C, Renier D, Pavesio A. Synthesis and characterization of hyaluronan-based polymers for tissue engineering. *Methods Mol Biol*, 2004;238:25–40.
7. Sokolowska M, Chen LY, Eberlein M, et al. Low molecular weight hyaluronan activates cytosolic phospholipase A2 and eicosanoid production in monocytes and macrophages. *J Biol Chem*, 2014;289(7):4470–4488.
8. Foschi D, Castoldi L, Radaelli E, et al. Hyaluronic acid prevents oxygen free-radical damage to granulation tissue: a study in rats. *Int J Tissue React*, 1990;12(6):333–339.
9. Kaya G, Tran C, Sorg O, et al. Hyaluronate fragments reverse skin atrophy by a CD44-dependent mechanism. *PLoS Med*, 2006;3(12):e493.
10. Crosslinked carboxy polysaccharides. Европейский патент № 0341745B1.
11. Viscoelastic gels as a novel fillers. Патент № 20120190644.