

ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ В МЕДИЦИНЕ

© Н. Н. Сигаева¹, С. В. Колесов², П. В. Назаров³, Р. Р. Вильданова¹

¹Институт органической химии УНЦ РАН
Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, пр. Октября, 71.
Тел./факс: +7 (347) 235 55 60, +7 (347) 235 60 66.

E-mail: gip@anrb.ru

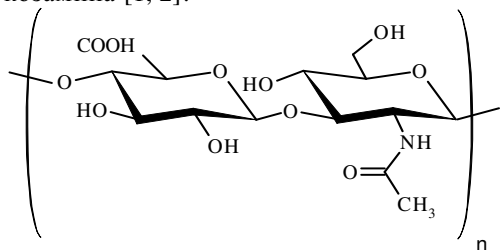
²Башкирский государственный университет
Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32.
Тел./факс: +7 (347) 273 67 78.

³Уфимский НИИ глазных болезней АН РБ
Россия, Республика Башкортостан, 450077 г. Уфа, ул. Пушкина, 90.
Тел./факс: +7 (347) 272 37 75.

Гиалуроновая кислота (ГК) является важным компонентом в организме человека, выполняя защитные и другие биологически активные функции. Ее уникальные физико-химические и биологические свойства, в том числе биосовместимость и высокая гидрофильность, позволяют использовать ГК в различных областях медицины в виде гелей и пленок. Растворы ГК обладают уникальными реологическими свойствами, которые позволяют этому полимеру вести себя подобно вязкоупругому гелю даже при низких концентрациях. Регулярно повторяющиеся гидрофобные области в макромолекулах ГК способствуют взаимодействию с клеточными мембранами и белками гидрофобного типа. Это свойство растворов ГК имеет большое значение для обеспечения подвижности клеток. ГК участвует в контроле таких процессов, как репаративная регенерация тканей, клеточная дифференцировка, морфогенез, ангиогенез и воспаление. Нативная ГК или лекарственные системы с ГК применяются в хирургии, офтальмологии, дерматологии и косметологии. ГК входит в состав противоспаечных и раневых пленок, заменителей синовиальной жидкости суставов, в качестве среды при проведении глазных операций, сохранении и транспортировке клеток. Для дальнейшего успешного применения ГК в медицине необходимы новые методы ее модификации, в том числе образование поперечно-сшитых гелей. В отличие от нативной, химически модифицированная ГК обладает меньшей скоростью деградации ферментами в организме, в то же время сохраняется ее биосовместимость. В обзоре описаны имеющиеся в литературе сведения о существующих методах выделения гликозаминогликанов и гиалуроновой кислоты, ее применении в медицине, способах модификации, в том числе способах получения физически и химически сшитых гелей на ее основе. Сделан вывод о том, что для успешного применения ГК в качестве лекарственного средства или в составе лекарственного препарата необходимо проведение дальнейших работ по разработке композиций, в которых достоинства ГК сочетались бы с другими необходимыми лечебными свойствами, например, антисептическим или длительным гипотензивным эффектом.

Ключевые слова: гликозаминогликаны, протеогликаны, гиалуроновая кислота, репаративные свойства, пролиферация клеток.

Гиалуроновая кислота (ГК) – единственный гликозаминогликан (ГАГ), у которого не обнаружено ковалентной связи с белковым кором, то есть не существует протеогликана (ПГ) гиалуроновой кислоты. Молекула ГК состоит из повторяющихся единиц *D*-глюкуроновой кислоты и *N*-ацетил-*D*-глюкозамина [1, 2].



Молекулярная масса ГК варьируется в широких пределах в зависимости от источника выделения. Гиалуроновая кислота, полученная из природных объектов, имеет молекулярную массу (ММ) от 5 000 до 20 000 000. Средняя ММ макромолекул ГК, содержащихся в синовиальной жидкости человека, составляет 3 140 000 [3].

Растворы ГК обладают уникальными реологическими свойствами, которые позволяют этому полимеру вести себя подобно вязкоупругому гелю даже при низких концентрациях. Методом светорассеяния было показано, что в растворе макромолекула ведет себя как свернутая, достаточно плотно упакованная цепь с радиусом изгиба порядка 200 нм. Малая подвижность цепей ГК обусловлена наличием внутрицепочечных водородных связей. Молекула ГК является энергетически стабильной, в частности благодаря стереохимии составляющих ее дисахаридов. Объемные заместители пиранозного кольца находятся в стерически выгодных положениях, в то время как меньшие по размеру атомы водорода занимают менее выгодные аксиальные позиции [4, 5].

За счет межмолекулярного взаимодействия длинные гибкие молекулы ГК в водных растворах способны образовывать трехмерную структуру, которая может играть роль плотного молекулярного «сита». Дисперсный матрикс образует каналы для селективной диффузии водорастворимых моле-

кул. В макромолекуле регулярно повторяются гидрофобные области, способствующие взаимодействию с клеточными мембранами и белками гидрофобного типа. Это свойство растворов ГК имеет большое значение для обеспечения подвижности клеток. Гидрофильная молекулярная сетка обеспечивает условия протекания диффузионных процессов, необходимых для клеточного дыхания [6].

В настоящее время известно, что ГК участвует в контроле таких процессов, как репаративная регенерация тканей, клеточная дифференцировка, морфогенез, ангиогенез и воспаление [7].

Одной из важных функций ГК в соединительной ткани является связывание воды. В результате этого межклеточное вещество приобретает характер желеобразного матрикса, поддерживающего клетки. Связывание воды и обусловленное им набухание, определяет биологическую роль ГК в регуляции проницаемости тканей. ГК является основным структурообразующим ГАГом, так как имеет способность концентрировать вокруг себя другие ГАГи и образовывать агрегаты ПГ, которые обладают большой гидрофильностью и эластичностью по сравнению со свободными ПГ. Связывая коллагеновые волокна, другие белки и компоненты межклеточного вещества и даже клетки в единую систему, ГК создает «буферный объем», который определяет прочность и упругость механических тканей, помогает им преодолевать временное воздействие [8–10].

Применение ГК в медицине

Характерные свойства ГК – ее выраженная биологическая активность, прекрасная биосовместимость, отсутствие антигенности, раздражающего и других побочных эффектов – обратили на себя внимание ученых. Благодаря своим уникальным физико-химическим свойствам ГК нашла применение в различных областях медицины, косметологии и ветеринарии. Тот факт, что ГК входит в состав многих тканей (кожа, хрящи, стекловидное тело) и является органоспецифичной и видонеспецифичной, обуславливает ее применение в лечении заболеваний, связанных с этими тканями [11, 12].

Собрано и опубликовано достаточное количество материала, который показывает, что локальное введение экзогенной ГК имеет явные терапевтические и защитные преимущества при различных патологических состояниях соединительных и эпителиальных тканей. ГК используют в офтальмологии, при лечении суставных болезней, заживлении ран, в качестве эндопротезов синовиальной жидкости, препаратов для мягкого увеличения тканей и заполнения морщин в косметической хирургии [13].

Биологические функции ГК можно разделить на «пассивные» и «активные». Как инертный материал, ГК участвует в гомеостазе тканей, в стерическом регулировании (осмосе) проникновения каких-либо субстанций, выполняет роль «смазки», улучшающей подвижность суставов и т.д. «Активные» функции ГК заключаются в специфическом связывании с

белками в межклеточном матриксе и на поверхности клетки. Такое взаимодействие играет важную роль в образовании хрящевой ткани, в процессах клеточной пролиферации, в морфогенезе и эмбриональном развитии животных, а также в механизмах воспаления и возникновения рака. Высокометаболические меланомы продуцируют больше ГК, чем неметаболические [8].

Особенно ценным является способность ГК за счет ее вязкоупругих свойств покрывать ткани, подверженные риску повреждения при хирургических операциях. Присутствие вязкого слоя экзогенной ГК на тканях, наиболее сильно подверженных травматическим воздействиям, оказывает защитное действие, которое в значительной мере способствует успешному осуществлению операции. Вязкоэластичные растворы ГК и ее гели используются в качестве твердых биосовместимых «барьерных веществ» для предотвращения постхирургической адгезии и чрезмерного образования рубцов [14].

Вследствие биомукоадгезивных свойств и совместимости с тканью ГК и ее соли (в особенности, соли натрия, калия, магния и кальция, подходящим образом дериватизированные), предложены в качестве системы для регулируемого высвобождения агентов, а также и для изготовления медицинских устройств, таких как протезы. ГК используют при приготовлении фармацевтических композиций в качестве загустителей, смазывающих веществ, агентов для пленочных покрытий, устойчивых в желудке, в частности при получении капсул, гелей, коллоидов и различных устройств (например, контактных линз, предметов из марли и т.д.) [15–17].

Вероятно, в основе механизма накопления в соединительно-тканых структурах ряда лекарственных веществ и антибиотиков лежит связывание их с протеогликанами тканей. То же можно утверждать и о механизмах отложения в тканях, особенно в матриксе соединительной ткани, различных патологических продуктов [8].

В норме в первые сутки заживления ран в них отмечается повышение концентрации ГК, которая связываясь с фибриновой сетью, образует переходный матрикс, стимулирующий активацию и миграцию гранулоцитов, макрофагов и фибробластов, пролиферацию эпителиальных клеток. Кроме того, ГК посредством усиления фагоцитоза способствует более полному очищению раны от некротических элементов. Вследствие усиления активности макрофагов увеличивается образование трофического фактора, который привлекает фибробласты и эндотелиальные клетки в пораженную область [4]. Молекулы ГК небольшой ММ, образующиеся при распаде дисперсионного матрикса (ГК-фибрин), способствуют активации ангиогенеза. При этом усиливается образование новых капилляров, улучшается местная циркуляция и снабжение тканей кислородом [18].

Согласно литературным данным, снижение содержания ГК с возрастом уменьшает устойчи-

вость зрительного нерва к повышению офтальмотонуса и играет важную роль в патогенезе глаукоматозной атрофии зрительного нерва. Изменение фракционного состава ГАГов в стенках сосудов за счет уменьшения ГК ведет к повышению их проницаемости [18–20].

Установлено, что молекулы ГК разной ММ оказывают различное действие на клеточное поведение. Короткие цепи ГК стимулируют ангиогенез (ММ 400–10 000), миграцию клеток и их пролиферацию (ММ 50 000–100 000), тогда как высокомолекулярная ГК (ММ > 500 000) вызывает противоположный эффект, подавляя ангиогенез, ингибируя клеточную миграцию и пролиферацию. Поэтому для достижения различных целей используются фракции ГК со строго определенной молекулярной массой [8, 17].

Композиции гиалуроната натрия, имеющего различные молекулярные массы (в форме растворов, гелей, тампонов, пленок или мембран), используются в гуманной медицине и хирургии, например, в качестве заменителей синовиальной жидкости, противосклеивающих агентов для тканей, заменителей жидкой части стекловидного тела, искусственных слез, агентов для воспроизведения тканей *in vivo* (например, в качестве внеклеточных матриц для образования костных сегментов, с последующим заселением остеобластами; соединительно-кожных тканей с последующим заселением фибробластами), материалов для получения искусственной кожи, пригодной для лечения ожогов или в пластической хирургии; агентов для покрытия биосовместимого протеза сосудов, носителей фармакологически активных ингредиентов в композициях с контролируемым высвобождением и т.д. В дерматологии и косметологии с учетом вязкоупругих и увлажняющих свойств и высокой биосовместимости указанные композиции используются как в качестве основы для увлажняющих наружных композиций, так и в качестве инвазивных медико-хирургических устройств («наполняющие агенты») [20–23].

Разрушение связей в ГК происходит под действием различных гиалуронидаз, присутствующих в оболочках болезнетворных бактерий, яде змей, пауков, пчел, слюнных выделениях пиявок, быстрорастущих опухолях [24].

В литературе была показана эффективность использования ГК против рака. Доказано, что она способна вызывать регрессию 30% опухолей. Известно, что при помощи рецептора CD44-мембраны ГК опосредует многие различные процессы, относящиеся к клеточной физиологии и биологии, такие как пролиферация, дифференциация и локомация раковых и других клеток [25].

В основе применения ГК для заживления ран лежит ее роль в тканевой реконструкции. В течение первых дней заживления тканевой эндогенная ГК является преобладающим ГАГом, присутствующим в ране. Регенерация барабанных мембран при помощи ежедневной локальной инстилляции рас-

творов ГК в ухо способствовало заживлению раны. Однако, как и в случае внутрисуставных инъекций ГК, влияние ее на заживление барабанных мембран и других ран еще стоит подтвердить [7].

Гиалуронат натрия является эндогенным для глаза, за счет чего играет определенную роль в ускорении заживления ран роговицы [27]. Основные физико-химические особенности, которые способствуют успеху ГК в офтальмологии, являются эластичные свойства биосовместимых высокомолекулярных цепей ГК и взаимодействия между ними. При стационарном применении высокая вязкость ГК позволяет поддерживать глубину и форму передней камеры. Низкая вязкость при высоких скоростях сдвига (при выдавливании через канюлю) способствует ее инъекционному и удалению. Эластичность растворов ГК защищает глазные клетки от повреждений, вызванных контактами с хирургическими инструментами и имплантатами. Благодаря своим свойствам ГК ингибирует миграцию гранулоцитов, макрофагов, лимфоцитов периферической крови, не влияет на систему свертывания крови, не снижает активность фибробластов и эпителиальных клеток, не токсична для роговицы. При экзогенном введении нормализует структуру соединительной ткани, стимулирует метаболизм, пролиферацию, специализацию и дифференциацию клеток, интенсифицирует процессы репаративной регенерации и детоксикации, ускоряет заживление ран, рассасывание гематом, способствует прозрачному приживлению трансплантатов после сквозной кератопластики [28, 29]. Механизмы защитного действия эндотелия роговицы осуществляются тремя путями: механическая защита от повреждений, усиление эндогенной защиты, удаление свободных радикалов. Способность гиалуроната натрия связываться с эндотелием роговицы зависит от ММ: чем выше молекулярная масса, тем сильнее он связывается с рецепторами [31]. Так, после офтальмологических операций с применением ГК роговицы остаются прозрачными и наблюдается меньше послеоперационных осложнений.

Клиническая апробация защитной эффективности ГК для эндотелия роговицы у человека была подтверждена Stegmann R. И другими авторами при пересадке роговицы, экстракции катаракты [31, 32]. Препарат ГК применялся для замещения стекловидного тела [21], а затем и в хирургии передней камеры глаза [32]. ГК применяется для лечения атрофии зрительного нерва, злокачественной близорукости, пигментного ретинита, нейроретинита, ирита, увеита, язв и ожогов роговицы, рубцовых изменений век [20]. В антиглаукоматозных операциях, главным образом при непроникающих операциях, нашли применение дренажи на основе ГК [34].

Выбор вида вископротектора, применяемого в офтальмохирургии, зависит от характера операции, при этом определяющим критерием является степень выраженности таких свойств, как вязкость, псевдопластичность, адгезивность [35].

На сегодняшний день рынок препаратов на основе ГК представлен в основном растворами гиалуроната натрия в концентрации от 0.7 до 3.4%: 0.7% – Vitrax («Allergan», США); 1% – Provisc («Alcon», США); Opegan («Santen», Япония); Hialoid («Pharmacia, Fr», Франция); Amvisc HY («Yolab», США); Biolon («Allergan Inc.», США); Healon («Pharmacia», Швеция); 1.2% – Amvisc («Bausch & Lomb Surgical», США); Amvisc («Yolab», США); 1.4% – Healon GV («Kabi-Pharmacia», Швеция); Healon GV («Pharmacia & Upjohn», США); Amvisc HY («Yolab», США); 1.6% Amvisc Plus («Yolab», США); Amvisc Plus («Bausch & Lomb Surgical», США); 3% – AMO Vitrax («Allergan Inc.», США); 3.4% – Healon Phaco («Kabi-Pharmacia», Швеция) [33].

Применение ГК ограничено ее быстрой деградации *in vivo* под действием ферментных систем, таких как гиалуронидаза, глюкозидаза и глюкуроксидаза, с последующим уменьшением ММ и прогрессирующим нарушением вязкоупругих свойств и в целом физических свойств конечных композиций и устройств (механической прочности, эластичности, размера пор) и т.д. [36]. Для преодоления этих проблем проводится модифицирование гиалуроновой кислоты.

Модификация гиалуроновой кислоты

Получаемые химической модификацией полимеры должны отвечать ряду требований технического или регламентного типа [35].

Технические требования включают:

- 1) высокую биосовместимость;
- 2) устойчивость к ферментным системам, как тканевым, так и плазматическим (для инъекцируемых композиций) и желудочно-кишечным (для пероральных композиций).

В некоторых случаях может быть желательна постепенная деградация, например, для контролируемого высвобождения лекарственного препарата. Данная устойчивость особенно важна, когда макромолекула находится в композициях/изделиях, которые должны существовать в течение длительного периода времени, например, заменители синовиальной жидкости, пленки, тампоны или гели в качестве средств против слипания тканей при операциях различных видов; в тканевой инженерии (искусственные органы); искусственная кожа при лечении ожогов и широко в эстетической хирургии;

3) способность формироваться в различные формы (гели, пленки, тампоны и т.д.);

4) возможность стерилизоваться химически или физически без изменения структуры продукта.

Согласно регламентным требованиям состав различных производственных партий должен поддерживаться постоянным внутри узких пределов; это предполагает, что способы производства стандартизируются и что основные компоненты имеют очень низкую внутреннюю вариабельность.

На основе ГК, модифицированной карбоксиметилцеллюлозой, получен новый тип мембраны

против спаек «Septrafilm» [37, 38]. Сложные эфиры ГК, в особенности ее бензиловый эфир «Hyaff®-11», оказались эффективными для предотвращения послеоперационных спаек, а также особенно подходящими при применении для изготовления твердых структур, таких как войлоки [39, 40]. Эффективным препаратом для предотвращения абдоминальных и тазовых спаек является «Hyalobarrier® gel на основе АСР@gel» на основе модифицированной ГК, содержащей сложноэфирные связи [40].

Для местной стимуляции репаративных процессов (рост грануляций) при лечении гнойных ран, трофических язв голени, пролежнях создан препарат «Куриозин», содержащий комплекс гиалуроната цинка в физиологическом растворе. Одновременное наличие ионных и ковалентных связей цинка обеспечивает большую стабильность комплекса. По сравнению с гиалуронатом натрия данный комплекс обладает более выраженным антимикробным действием против штаммов золотистого стафилококка, стрептококка, кишечной и синегнойной палочек, создает физиологические условия для заживления ран во всех трех фазах процесса за счет создания оптимальных условий для активации, миграции и деления клеток, участвующих в регенерации тканей. В результате усиления фагоцитарной способности гранулоцитов и макрофагов, пролиферации фибробластов и стимуляции ангиогенеза становится возможным образование рубцовой ткани с реэпителизацией. Заживление ран ускоряется, и благодаря антисептическому эффекту уменьшается частота бактериальных суперинфекций. Гиалуронат цинка образует дисперсный матрикс ГК-фибрин, обеспечивающий диффузию кислорода, активацию ангиогенеза, а также и антимикробный эффект [41].

Кроме того, известно, что ГК с низкой ММ и/или ее липидные производные могут быть использованы в качестве наполнителя для противораковых лекарственных средств в фармацевтических композициях, где ГК ассоциирована с химиотерапевтическими лекарственными средствами, такими как паклитаксел, для повышения их терапевтической эффективности благодаря феномену “прицеливания” и получения возможности снизить дозы, указываемые в обычных химиотерапевтических протоколах [23, 42]. На основе модифицированной ГК синтезирована новая система доставки противоопухолевого лекарства паклитаксела, которая позволяет лекарственному средству дойти непосредственно до поверхности мембраны являющейся мишенью раковой клетки, характеризующейся сверхэкспрессией рецептора для ГК, CD44 [43, 44].

Гидрогели гиалуроновой кислоты

Использование ГК как основы для производства биоматериалов имеет много преимуществ. Однако нативная форма ГК быстро разрушается в естественных условиях *in vivo* свободными радикалами и ферментами, например, гиалуронидазой, к тому же обладает очень высокой растворимостью.

Это ограничивает ее использование в некоторых медицинских целях, которые требуют длительного лечебного эффекта. Поэтому были предложены различные методы для изменения физико-химических свойств ГК при сохранении ее биосовместимости, таким образом, расширив спектр ее терапевтических действий.

Для увеличения химической, ферментативной и механической устойчивости используется сшивание макромолекул ГК. Так, гидрогели ГК являются гидрофильными сшитыми полимерами, которые способны набухать в воде и формировать нерастворимую объемную структуру. Функции гидрогелей зависят от их структуры [45]. Степень сшивки определяется природой полимера и средней массой полимерной цепи между узлами сшивки [46]. Плотность сшивок напрямую влияет на другие фундаментальные свойства гидрогелей, такие как степень набухания, механическую прочность и эластичность, проницаемость и диффузию [47].

Большое внимание сфокусировано на изучении гидрогелей на основе ГК для локального или контролируемого высвобождения субстанций в органах-мишенях [48]. В зависимости от концентрации ГК, pH раствора, типа буфера, природы и количества препарата, а также сшивающего агента может быть получен широкий спектр материалов ГК [49].

В организме химически модифицированная ГК подвергается деградации с меньшей скоростью в отличие от нативной ГК, а сшитые молекулы ГК образуют плотные гидрогели, поддерживающие заданный объем и форму. В то же время гидрогели сохраняют биосовместимость природной ГК, обладают минимальной токсичностью и иммуногенным потенциалом, или же вообще нетоксичны и неиммуногенны.

ГК имеет четыре активных центра – ацетамидные, карбоксильные, гидроксильные группы и восстановленные концевые группы, доступные для сшивки между молекулами самой ГК или ГК и другими полимерами.

Большинство методов получения сшитых материалов ГК относятся к одностадийному процессу взаимодействия ГК с кросс-линкером, либо двухстадийному процессу, при котором вначале синтезируются активные производные ГК, а на следующей стадии происходит образование поперечных мостиков.

В ранних исследованиях для модификации ГК использовали 1,2,3,4-дизпоксидбутан в щелочной среде [50], в которой высокомолекулярная ГК деградирует на олигомерные фрагменты (рис. 1). Данный кросс-линкер применяется в производстве «Пурагена».

Другим кросс-линкером ГК является дивинил сульфид (ДВС) [51–53]. ДВС реагирует с ГК в водных щелочных растворах при комнатной температуре, образуя сульфонил-диэфирные сшивки между гидроксильными группами ГК (рис. 2). Реакция протекает очень быстро, и прочные гели образуются в течение нескольких минут. ДВС используется для промышленного производства «Гиалоформа».

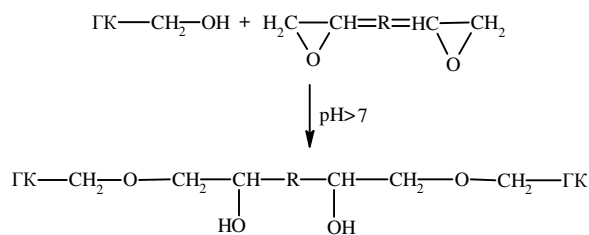


Рис. 1. Схема сшивки гиалуроновой кислоты дизпоксидами.

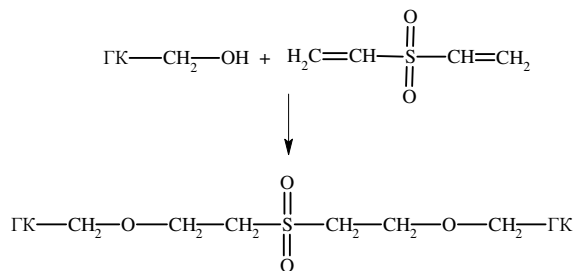


Рис. 2. Схема сшивки гиалуроновой кислоты дивинилсульфоном.

Также при использовании ДВС получены микропористые гидрогели на основе химически стабилизированной ГК и производных целлюлозы, гидроксипропилцеллюлозы (ГЭЦ) и карбоксиметилцеллюлозы (КМЦNa) [53].

О методе сшивания ГК основанном на реакции с альдегидами сообщается в работах [55, 56]. Реакция формальдегида и ГК при нейтральном pH затрагивает гидроксильные группы полисахарида, амино- и имино-группы протеина [55, 56]. Поперечное сшивание глутаральдегидом использовали с целью получения материалов с высокой устойчивостью к расщеплению. Такие материалы представляют собой растворимый вариант ГК с поперечными мостиками, который в то же время более вязкий и эластичный, чем нативная ГК. Реакция проходит в подкисленном водном растворе ацетона. При сравнении реакций с глутаральдегидом и карбодимидных реакций, обнаружено, что при использовании глутаральдегида образуются продукты с большим количеством поперечных связей [57]. Получены гидрогели на основе деацетилированной ГК реакцией с глутаральдегидом в водной среде [58, 59]. Производные ГК были синтезированы путем добавления диамина (1,5-диаминопентановой соли дихлорида) и лизин-этилэфирной соли дигидрохлорида к раствору ГК, затем введения N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодимид гидрохлорида (КДИ) и N-гидроксисукцинимид. Для активации реакции необходимы кислая среда, использование большого избытка амина для предотвращения саморетикуляции полисахаридных цепей. КДИ активирует карбоксилы, затем реагирует с амино-группами, образуя амидные связи. Для предотвращения образования неактивных мочевинок добавляют N-гидроксисукцинимид. Аналогичную процедуру проводили с дипептидом глициллизиндигидрохлоридом (рис. 3) [60].

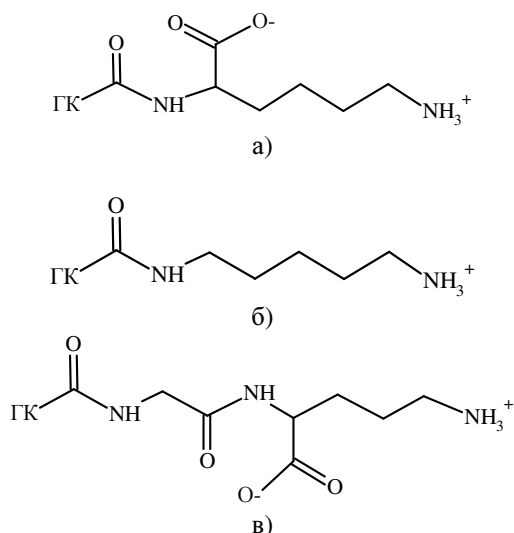


Рис. 3. Структура повторяющегося звена производных ГК: ГК-лизин (а), ГК-диаминопентан (б), ГК-глицил-лизин (в).

В качестве сшивающих агентов также используют диметилмочевину, диметилэтиленмочевину, оксид этилена, полиазиридин или полиизоционат, реакция протекает при нейтральном pH [56]. В работах [61, 62] в качестве сшивающих агентов использовали бисгалиды и водорастворимые карбодимиды [62].

Диглицидиловые эфиры алкандиолов являются малотоксичными сшивающими агентами. Впервые гидрогели ГК с поперечными сшивками из диэпоксидов были получены, используя диглицидиловый эфир полиэтиленгликоля. Позже исследователи расширили возможности диэпоксидной химии другими кросс-линкерами, включая диглицидиловый эфир этиленгликоля (бифункциональный кросс-линкер) и полиглицидиловый эфир полиглицерина (трифункциональный кросс-линкер). Примечательно, что детальное изучение химии этих реакций по-

казало, что при низком pH диэпоксиды формируют эфирные связи между карбоксильными группами, в то время как при высоком pH они формируют эфирные связи между гидроксильными группами [55]. Причем реагировать способна как первичная гидроксильная группа -CH₂OH, так и вторичная гидроксильная группа -CHOH каждого мономерного звена ГК (рис. 4). 1,4-Бутандиолдиглицидиловый эфир используется в качестве кросс-линкера для получения препарата «Рестилайн».

При использовании диглицидиловых эфиров получены шитые соли ГК, модифицированной аскорбиновой кислотой либо токоферолом, в неводной среде при одновременном воздействии давления в пределах от 5 до 1000 МПа и деформации сдвига в механохимическом реакторе при температуре от 20 до 50 °C [63, 64].

Большую роль в получении гидрогелей ГК сыграла химия гидразидов.

Предложена химическая модификация ГК дигидразидом через карбодимид-опосредованную реакцию (рис. 5) при взаимодействии карбоксилатов ГК с дигидразидами адипиновой кислоты, во время которой происходит связывание пendants гидразидных групп с глюкуроновым фрагментом ГК (рис. 6). Реакция протекает в водной среде в мягких условиях (комнатная температура, pH 4.75), что позволяет уменьшить деградацию природного полимера. Адипиновый дигидразид использовали как бифункциональный реагент в реакциях нуклеофильного замещения для последующего проведения поперечной сшивки. Модифицированную ГК растворяли в буфере и добавляли гомобифункциональные кросс-линкеры: бис-сульфосукцинимидил суберат, 3,3'-дитиобис-сульфосукцинимидил пропонат, дигидрохлорид диметилсуберимидата, и этиленгликоль бис-сульфосукцинимидилсукцинат (рис. 7, 8). Гелеобразование наблюдалось в течение 30–90 с [65].

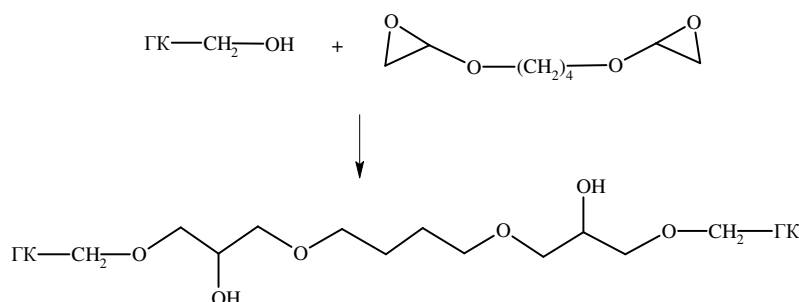


Рис. 4. Схема сшивки гиалуроновой кислоты 1,4-бутандиолдиглицидиловым эфиром.

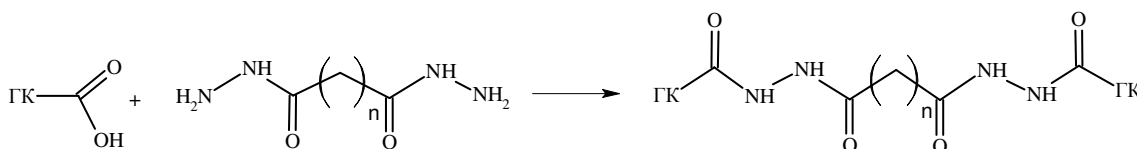


Рис. 5. Схема сшивки гиалуроновой кислоты карбодимидами.

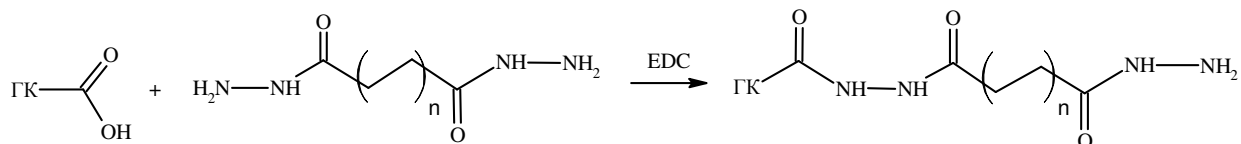


Рис. 6. Схема сшивки гиалуроновой кислоты дигидразидами (EDC – 1-этил-3-[3-(диметиламино)пропил]карбодиимид; дигидразиды – янтарной ($n = 1$), адипиновой ($n = 2$) и субериновой кислот ($n = 3$).

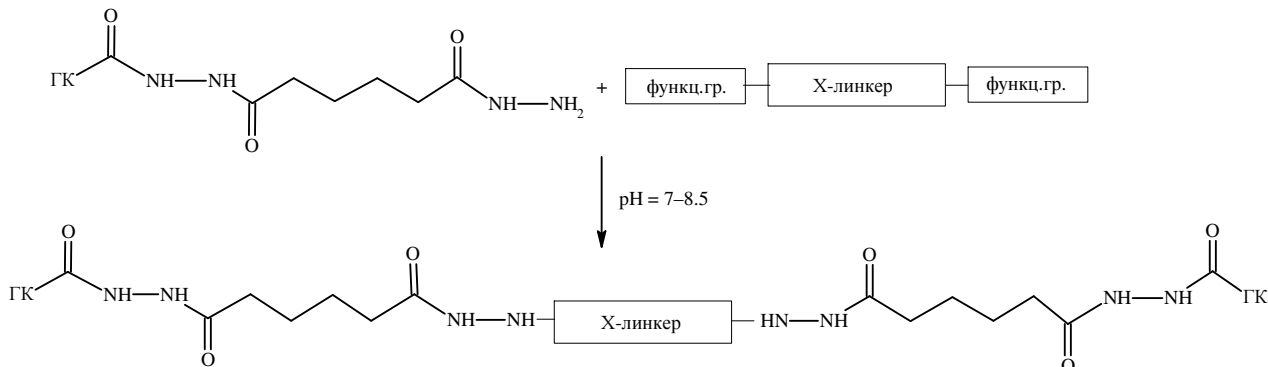


Рис. 7. Основная стратегия образования сшитых производных ГК, модифицированных дигидразидами, при помощи гомобифункциональных кросс-линкеров (X-линкер).

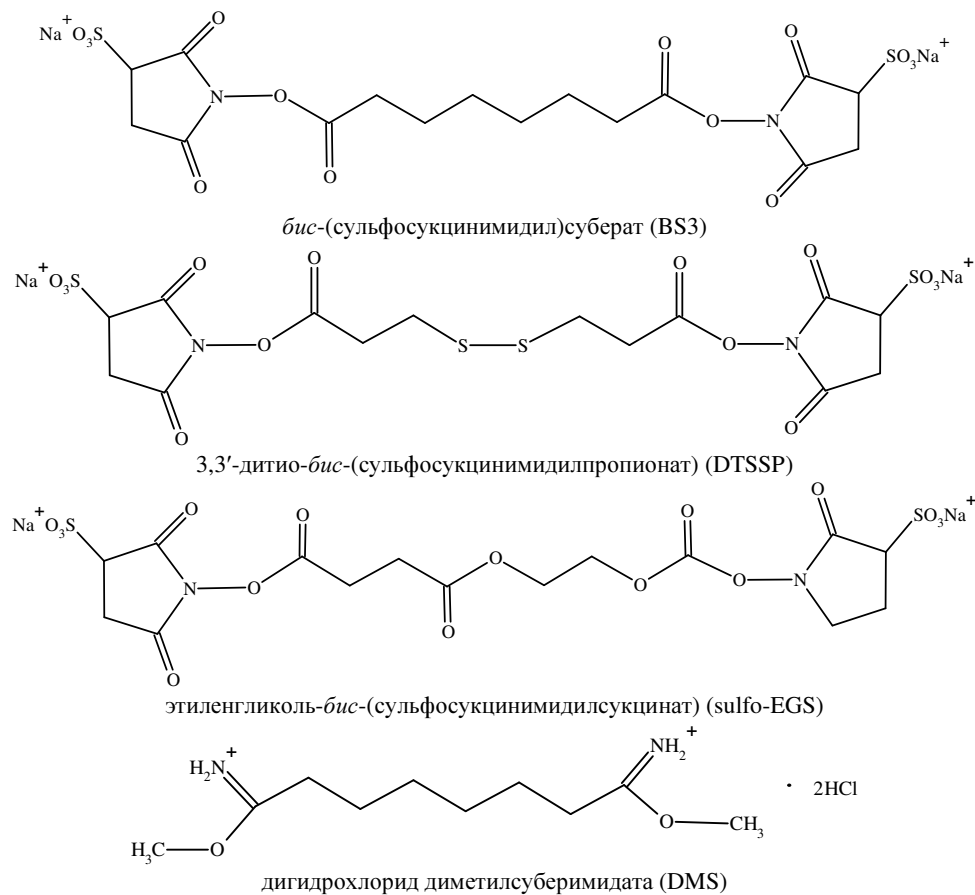


Рис. 8. Гомобифункциональные сшивающие агенты.

Получены поливалентные гидразид-сшитые гидрогели ГК. Синтезировали ди-, три-, тетра-, пента-, гекса- и полигидразидами (рис. 9), а затем в различных условиях получали гидрогели, различающиеся по свойствам. Обнаружено, что при использовании HCl в качестве инициатора реак-

ции гели образуются очень быстро (20–40 с), но затвердевают за 5–30 мин. Гели остаются устойчивыми в кислых условиях, но постепенно разрушаются при pH больше 7.0. Обнаружено, что гидрофобные сшивающие агенты дают наиболее устойчивые гели [66].

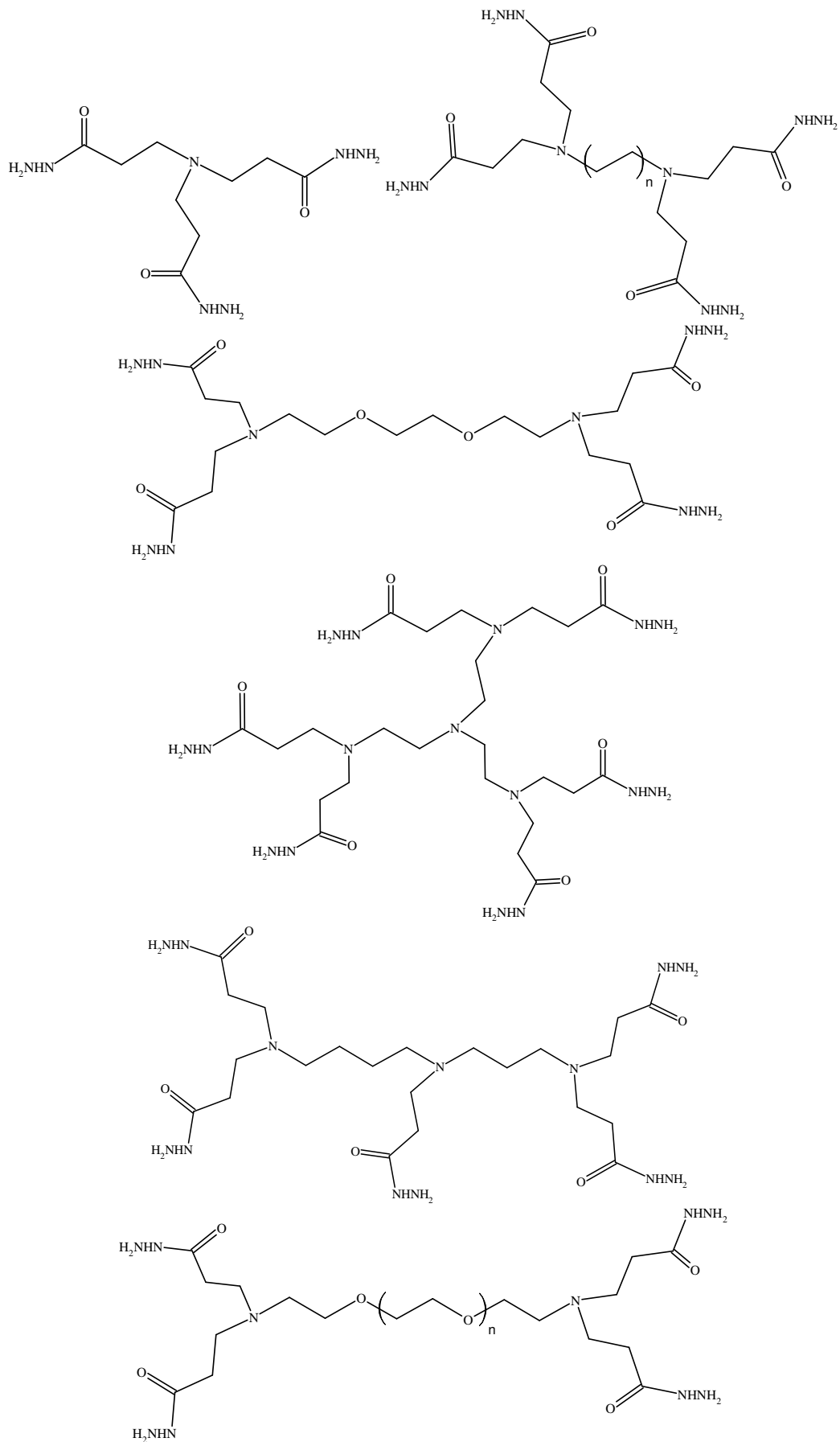


Рис. 9. Строение модифицирующих полигидразидов.

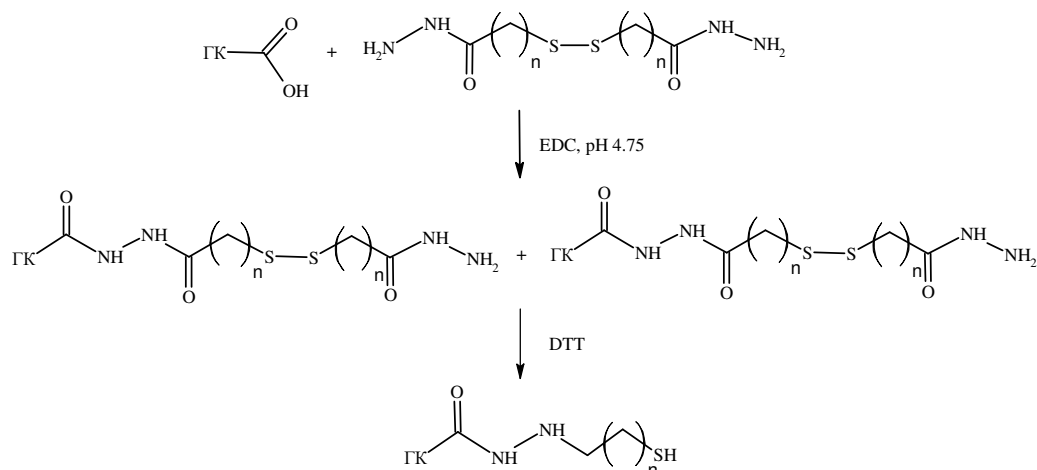


Рис. 10. Получение тиол-модифицированной гиалуроновой кислоты (DTT-дигиотреитол).

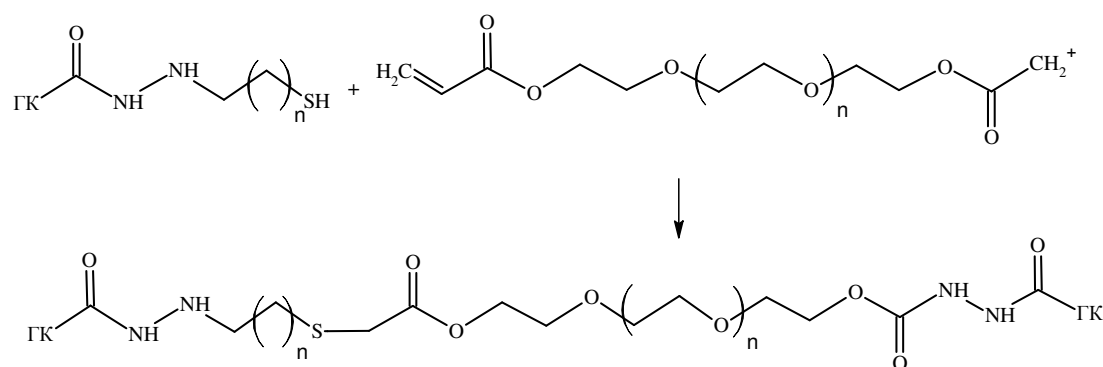


Рис. 11. Схема шивки тиол-модифицированной гиалуроновой кислоты, опосредованной полиэтиленгликоль диакрилатом.

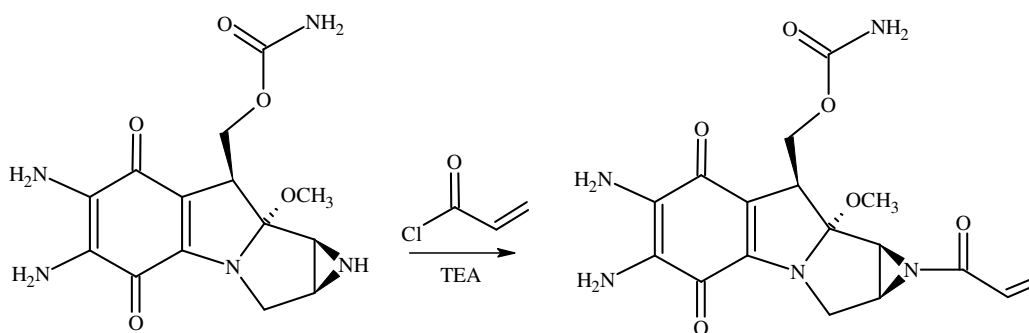


Рис. 12. Модификация митомцина С триэтиламинем (TEA).

Создан новый класс гидрогелевых материалов на основе ГК, содержащих гидрогелевые частицы ГК, ковалентно связанные со вторичной сетью. Гидрогелевые частицы синтезировали методом мицеллярной полимеризации. Окисление периодатом натрия не только вводило альдегидные группы, но и уменьшало средний размер частиц. Альдегидные группы использовались в качестве активных групп для дальнейшего шивания с производными ГК, содержащими гидразидные группы. В результате полученные макроскопические гидрогели содержали две сети: одну – без индивидуальных частиц, другую – со вставленными отдельными частицами (рис. 15).

Первый гель получен путем прямого смешивания производных ГК. Основная сеть находится между прочно сшитыми частицами ГК, а вторичная сеть формируется на поверхности частиц ГК, образующих устойчивые гидразоновые связи между альдегидными группами на поверхности частиц и производным ГК, несущими дигидразидную группу [71].

Дисульфид-сшитые гидрогели ГК получены из тиол-модифицированной ГК. Сначала синтезировали дитиобис-пропановый дигидразид и дитиобис-масляный дигидразид и связывали с ГК посредством реакции с карбодиимидом. Затем дисульфидные связи образованного гидрогеля были редуцированы

дитиотреитолом, давая соответствующие тиол-

модифицированные производные ГК (рис. 10) [67].

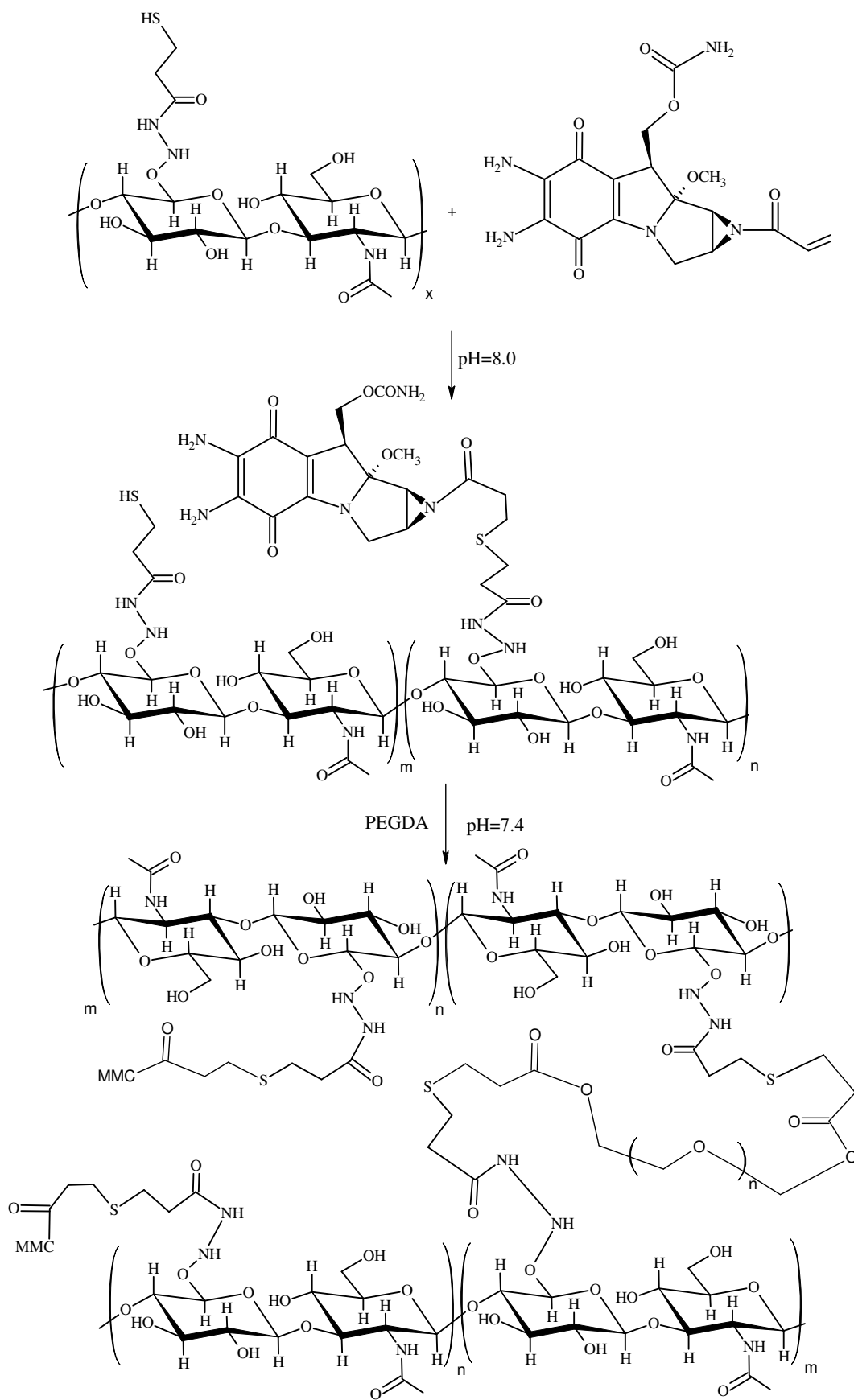


Рис. 13. Получение гидрогелей на основе тиол-модифицированной гиалуроновой кислоты, митомицина С, модифицированного акриламидом, и полиэтиленгликоль диакрилата (PEGDA).

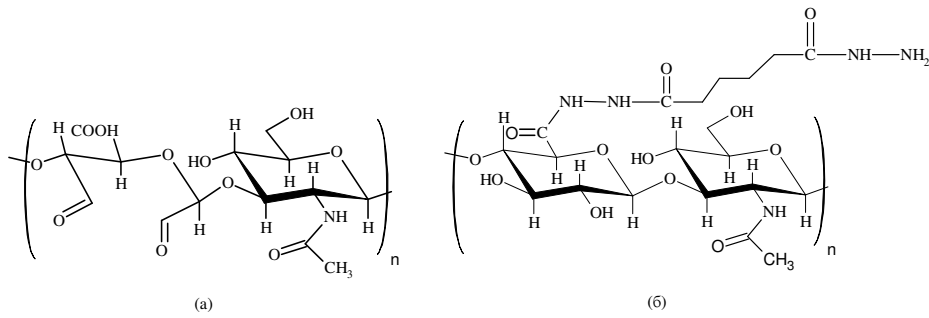


Рис. 14. Химические структуры окисленной ГК с альдегидными группами и ГК, модифицированной дигидразидом адипиновой кислоты.

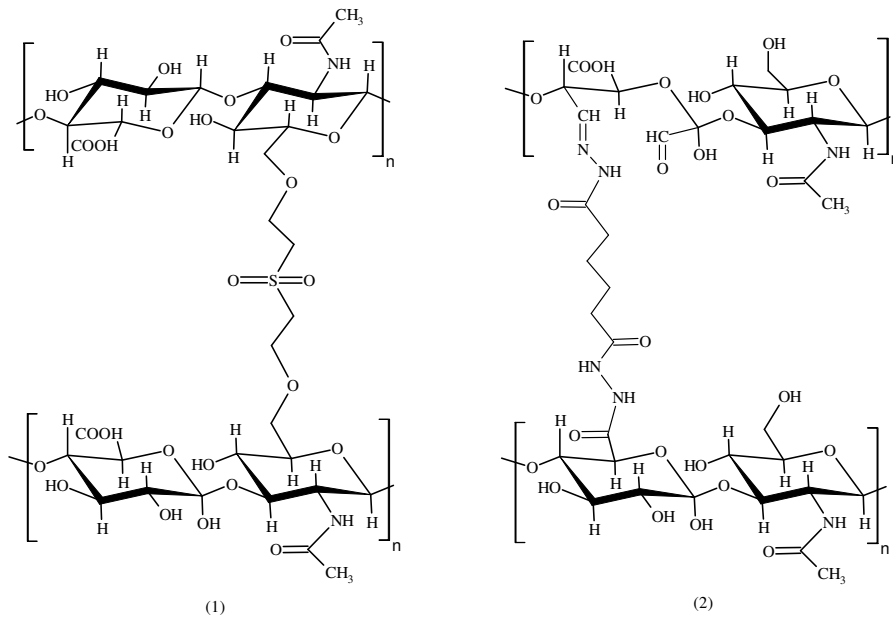
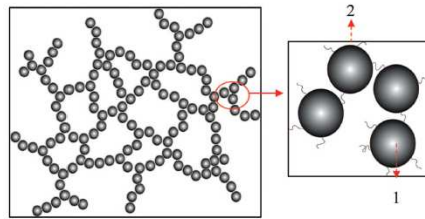


Рис. 15. Схема дважды сшитых гелей с (1) внутренней сшивкой и (2) внешней сшивкой.

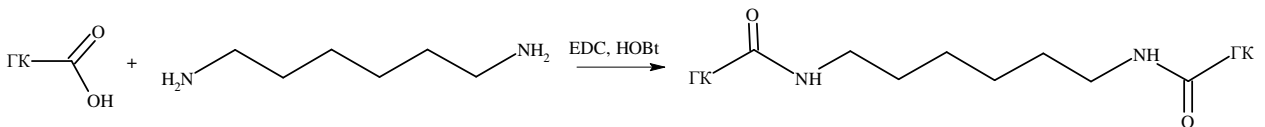


Рис. 16. Схема сшивания ГК и гексаметилендиамина (HMDA) после активации 1-этил-3-[3-(диметиламино)пропил] карбодимидом и 1-гидроксибензотриазол моногидратом (HOBT).

В работе [68] сообщается о получении сшитых гидрогелей тиол-модифицированной ГК и полиэтиленгликоль диакрилата (рис. 11).

Синтезирован гидрогель ГК, содержащий ковалентно связанное производное антипролиферативного препарата митомицина С (ММС). Предва-

рительно проводили активацию митомицина (рис. 12), а затем его связывание с ГК. На рис. 13 приведены схемы реакции связывания ММС-азиридинил-N-акрилата с тиол-модифицированной ГК, за которой следовала сшивка диакрилатом полиэтиленгликоля (ПЭГДА) [69].

Получены микрогели на основе ГК, модифицированной дигидразидными, альдегидными группами методом обратной эмульсии (рис. 14). Микрогели на основе ГК с дигидразидными и альдегидными груп-

пами более устойчивы к энзимной деградации и практически не токсичны в отличие от гелей на основе гиалуроновой кислоты с дигидразидными группами и полиэтиленгликольдиальдегида [70].

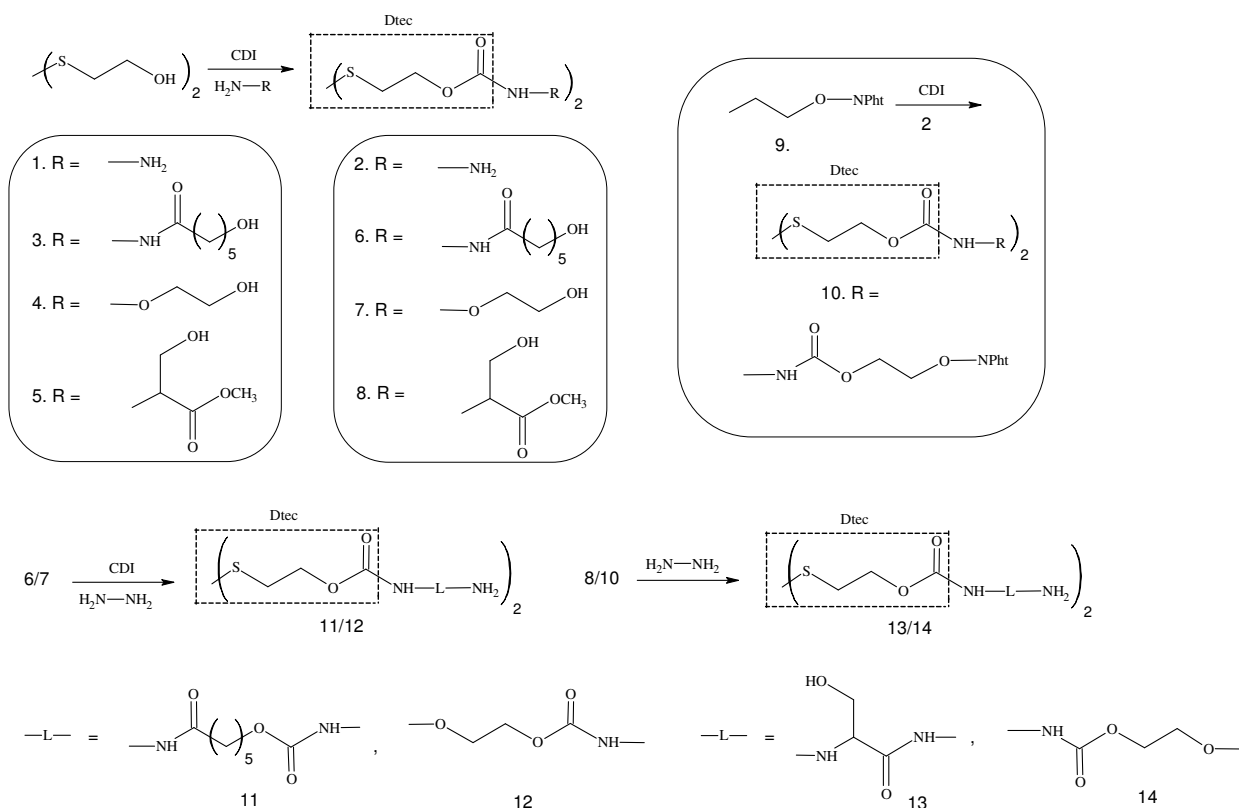


Рис. 17. Бифункциональные симметричные реагенты, защищенные 2,2'-дитио-бис-(этоксикарбонильной) группой (CDI – 1,1'-карбонилдиимдазол, Dtec – защитная группа).

Физические биосовместимые гидрогели получены на основе ГК и шелкового фиброина. Гидрогели шелкового фиброина подвергались разрушению ультразвуком для захвата нешитой ГК. При этом ГК образует смешанные гидрогели шелк/ГК, в результате формируется гомогенный материал с устойчивым набуханием при содержании ГК менее 40%. Было обнаружено, что такие гидрогели образуются без макрофазного разделения [72].

Новые биосовместимые нетоксичные дермальные филлеры получены на основе гидрогелей ГК при взаимодействии карбоксильных групп ГК и гексаметилендиамина, результатом которого является образование амидной связи (рис. 16) [73].

Разработана новая стратегия защиты групп на основе мягкого разложения дисульфидной связи, за которым следует элиминирование образованного 2-тиэтоксикарбонила, в итоге дающее свободные функциональные аминогруппы, такие как гидразид, аминокси и карбазат [74]. Синтезированы новые модифицирующие гомобифункциональные реагенты, содержащие бивалентную защитную группу на основе дисульфида (рис. 17). Амидация ГК этими реагентами дает толчок либо к связыванию продукта на конце, либо к меж/внутримолекулярной сшивке

ГК цепей. Дальнейшая обработка такой смеси дитиотреитолом снимает защиту. Подобная методология применялась для прививки остатков серина к скелету ГК, за которой следовало окисление до альдегидных групп. Таким образом, данная стратегия включает новый подход для мягкой и контролируемой модификации ГК нуклеофильными и электрофильными хемоспецифичными функциональными группами, в том числе для дальнейшей конъюгации и сшивания *in situ* (рис. 18). Серии новых гидрогелевых материалов были приготовлены путем смешения нового альдегид-производного ГК с различными ее нуклеофильными производными. Данный подход не требует избытка реагентов, очистки от интермедиатов, реакционные выходы количественны, без побочных реакций, значения молекулярной массы ГК при этом сохраняется [74].

Термообратимые ГК-поли-N-изопропилакриламидные гидрогели с определенной молекулярной структурой и свойствами синтезированы путем клик реакций и полимеризации RAFT (рис. 19) [75].

Получен физически и химически сшитый гидрогель на основе метакрилат-несущих АВА-триблок сополимеров, состоящих из ПЭГ-среднего блока (В), фланкированного термочувствительными блоками

(А) случайного N-изопропилакриламид-2-гидрокси-пропилметакриламиддиакрилата, и тиолированной ГК путем тандемного термального гелеобразования и реакции присоединения Михаэля (рис. 20) [76].

Используя реакцию Дильса–Альдера в водных растворах синтезированы гидрогели ГК. Фуран-модифицированные производные ГК сшивали ди-малеимид полиэтиленгликолем (рис. 21, 22) [77].

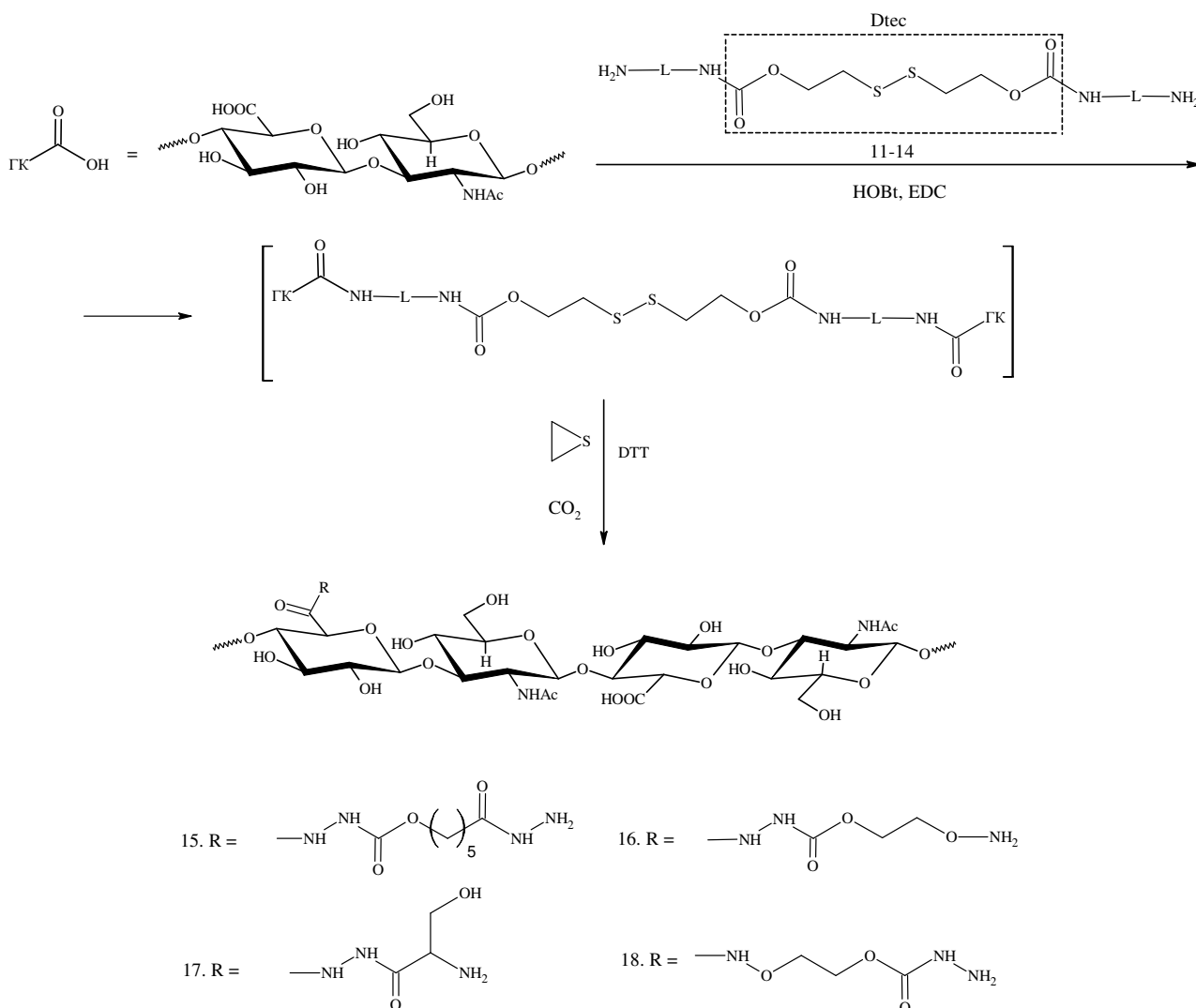


Рис. 18. Модификация ГК нуклеофильными хемоспецифичными группами.

Получены гидрогели на основе метакрилатированной ГК (рис. 23), которые сохраняют толщину стенки миокарда более эффективно, чем гидролитически разрушающиеся гидрогели (на основе ГК и гидроксиэтил метакрилата ГЭМА) [78].

Используя тиол-дисульфидную реакцию обмена, синтезированы инъеклируемые гидрогели ГК с дисульфидными связями (рис. 24). Реологические тесты показали, что гидрогели формируются в течение минуты при 37 °С. Сначала синтезировали производное ГК, содержащее пиридилитиол, которое реагировало с дитиоловым кросс-линкером, образуя гидрогели [79].

Синтез «внутренних эфиров» ГК – перспективное направление химической модификации, позволяющее получить производные, в которых отсутствуют дополнительно введенные в структуру «связывающие мостики», являющиеся при попада-

нии в организм своеобразным фактором риска появления аллергических и других негативных реакций организма. Авто поперечно-сшитые ГК являются меж- и внутримолекулярными сложными эфирами ГК, в которых часть карбоксильных групп этерифицирована гидроксильными группами одинаковыми и/или разными молекулами ГК.

Химическую модификацию ГК проводили в неводной среде под действием четвертичных солей – производных пиридина (реактив Мукаямы). Полученные образцы модифицированной ГК в воде ограниченно набухали, образуя прозрачные гидрогели [80].

Для получения промежуточного звена сшивающего агента был приготовлен раствор ГК в NaOH, к которому был добавлен сшивающий агент эпихлоргидрин или 1,2,7,8-диэпоксиоктан в чашке Петри [81]. Вначале ГК реагирует с диэпоксиокта-

ном при низком рН, при этом формируются эфирные связи между карбоксильными группами ГК цепей. Вторая реакция с диэпоксидом проводится при высоком рН, при этом формируются

эфирные поперечные шивки между гидроксильными группами ГК. После сушки в вытяжном шкафу при комнатной температуре был получен сухой листообразный материал.

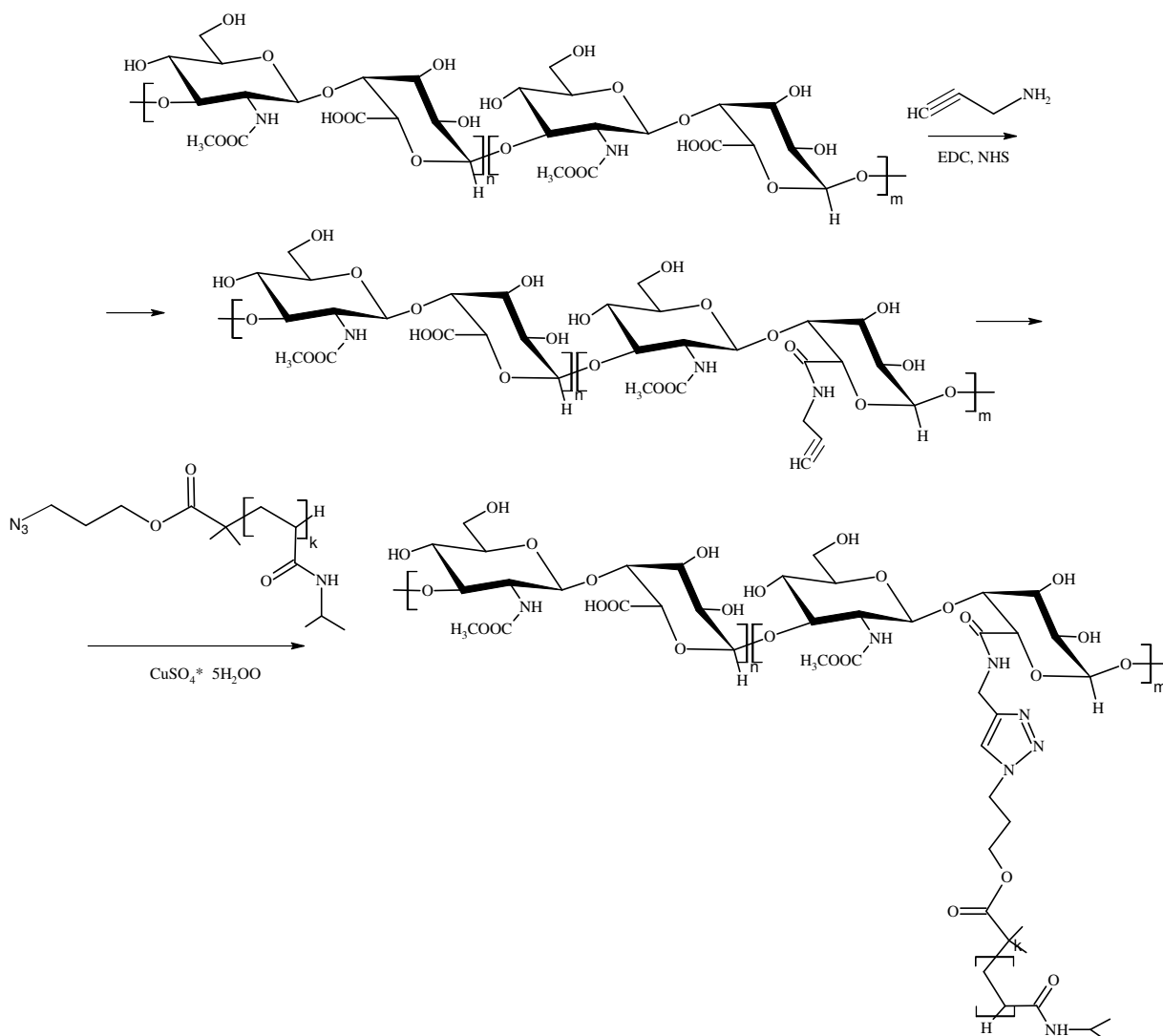


Рис. 19. Синтез ГК, модифицированной пропаргиламидом.

Испытания устойчивости на сдвиг показали псевдопластичное поведение сшитых образцов ГК [82].

Фотополимеризация ГК

Необходимость удалять непрореагировавшие реагенты из сшитых гелей при медицинском применении послужила толчком в исследовании ее фотохимического сшивания. Фотополимеризация является идеальным методом для клинической имплантации, так как повышает пространственно-временной контроль (объемная сеть и быстрое включение/выключение, соответственно). Гидрогели могут быть инъецированы, им придается форма и происходит их затвердевание *in situ*.

Фотополимеризация представляет собой преобразование жидкого раствора полимера в гель под воздействием фотосенсибилизирующих катализаторов и света. Фотополимеризация – реакция, которая происходит только при экспозиции светом нужной длины волны. Таким образом, реагенты

могут быть полностью смешаны до начала проведения реакции. Более того, реакции фотополимеризации можно проводить при физиологических условиях без неблагоприятных эффектов на участвующие в реакции биоактивные молекулы или инкапсулированные клетки [83, 84].

Для этих целей проведена фотополимеризация ГК с несколькими группами веществ, в том числе с циннамоилом, кумарином, тиминном; метакриловым ангидридом; глицидилметакрилатом и стиролом. Кроме того, возможна дальнейшая модификация сульфатированной ГК 4-азидоанилином, что позволяет получить производное ГК, формируемое в объектах размером всего 100 мкм [8].

Светоотверждающаяся ГК была синтезирована, используя различные подходы [85]. Гидроксильные или карбоксильные группы полимера этерифицировались фотоактивным соединением. Затем светоотверждающаяся ГК облучалась УФ светом при использовании длин

волн 260–400 нм. Фотоактивными хромофорами, которые реагируют с гидроксилами ГК, являются коричневые кислоты, 1-карбоксиалкиловые замещенные урацилы и 7-карбоксиалкоксил замещенные

кумарины. К фотоактивным хромофорам, реагирующим с карбоксилатами ГК, относятся 1,2-О-этанотимин и производные 1,2-О-этанораурила.

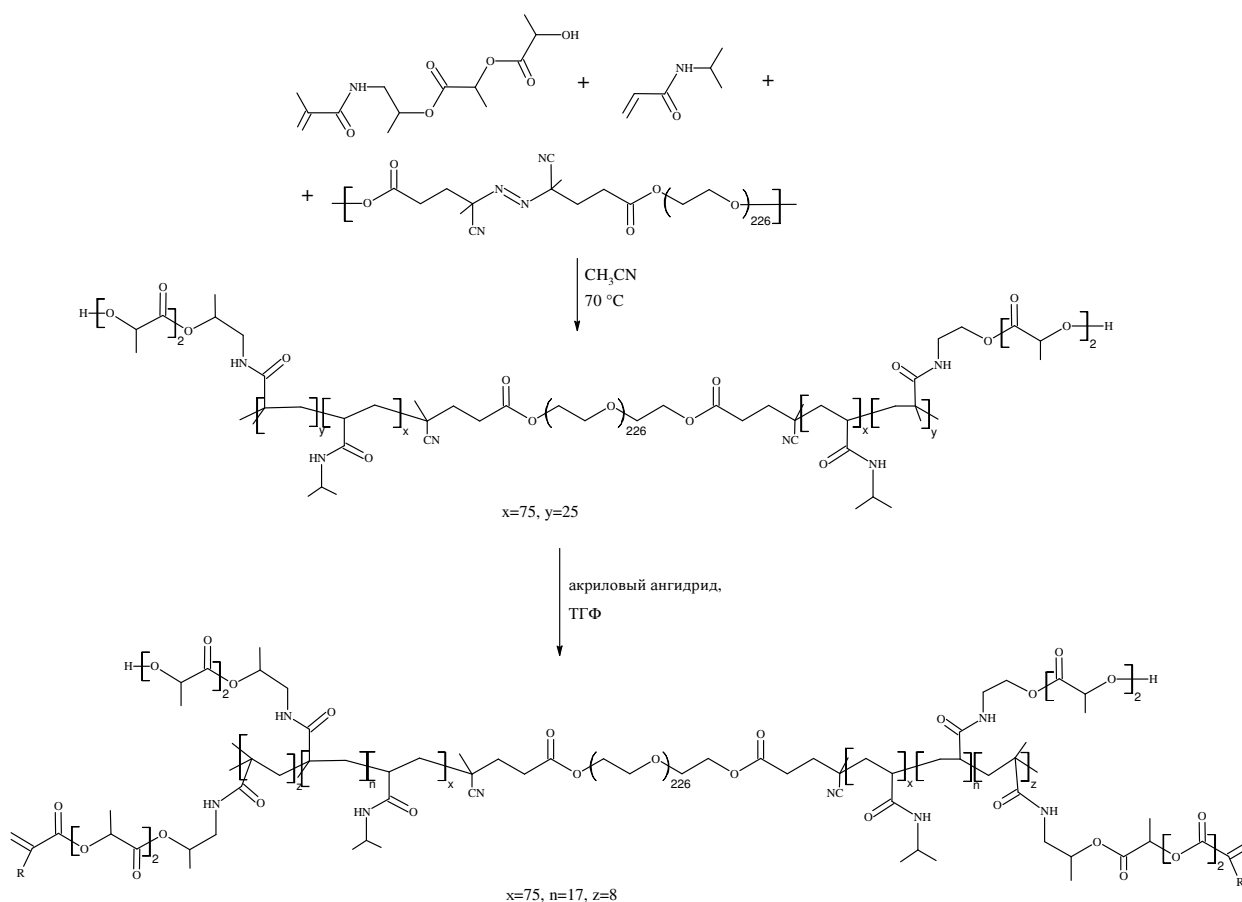


Рис. 20. Синтез АВА-триблочных сополимеров (ТГФ – тетрагидрофуран).

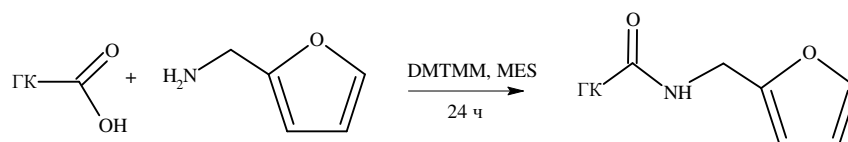


Рис. 21. Синтез фуран-модифицированной ГК при помощи 4-(4,6-диметокси-1,3,5-триазин-2-ил)-4-метилморфолинхлорида (DMTMM) в 2-(N-морфолино)-этансульфонкислотном буфере (MES).

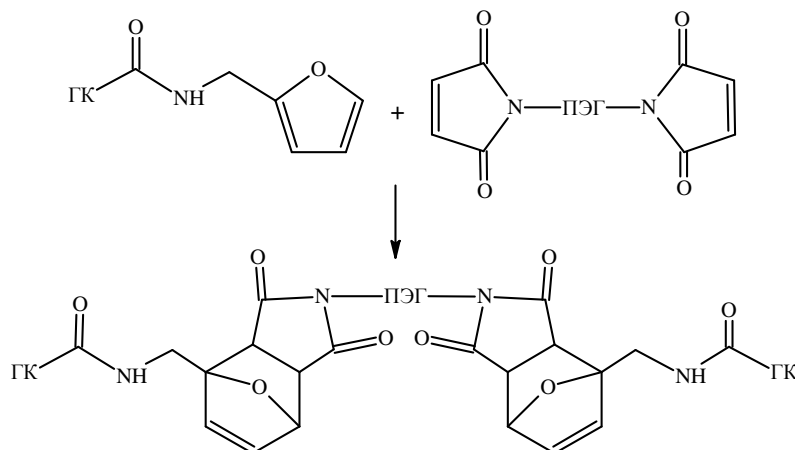


Рис. 22. Реакция Дильса–Альдера между фуран-модифицированной гиалуроновой кислотой и дималеимида полиэтиленгликолем (ПЭГ – полиэтиленгликоль).

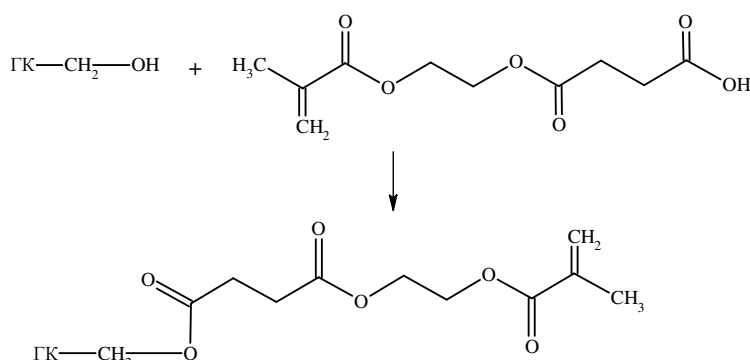


Рис. 23. Синтез гиалуроновой кислоты, модифицированной гидроксиэтилметакрилатом.

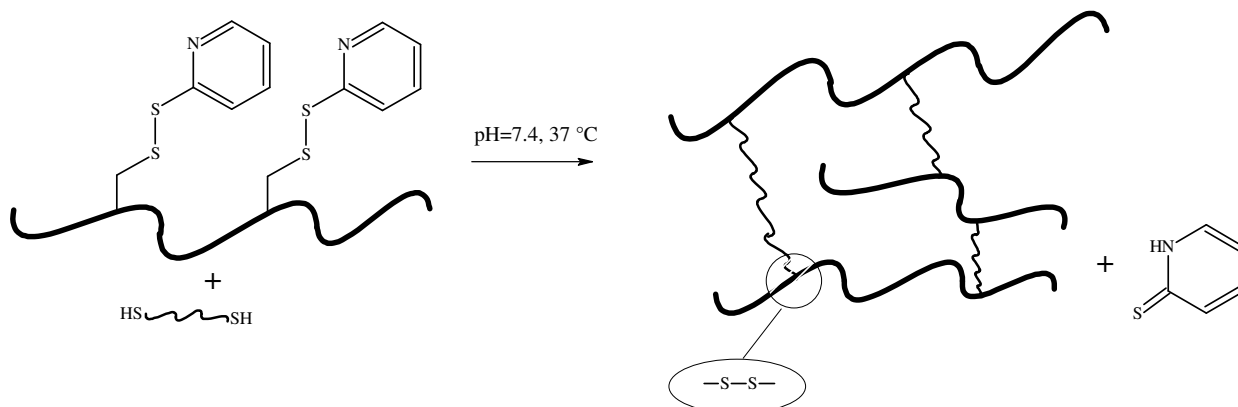


Рис. 24. Синтез дисульфид-сшитых гидрогелей ГК путем тиол-дисульфидной реакции обмена между ГК, модифицированным пиридилдисульфидом, и дитиолом полиэтиленгликоля, с выделением хромогенной молекулы пиридин-2-тиона.

Известны комбинации полиэтиленгликолевых (ПЭГ) олигогликолякрилатов и ГК. Карбонил диимидазол (КДИ)-активированный ПЭГ моноакрилатом применили для синтеза ПЭГ-акрилат-ГК. Акрилированная ГК фотополимеризовалась под действием УФ облучения при использовании в качестве инициатора 2,2-диметокси-2-фенилацетофенон [86].

Сшитые гелевые матрицы на основе ГК и полиглицерол полиглицедилового эфира (ППГЭ) получены под действием видимого света [87]. Реакция сшивания протекает при щелочном pH и температуре 60 °С, мгновенно после смешивания ГК с ППГЭ образуются непрозрачные гели с содержанием воды 99.5%.

Фотосшитые гидрогели на основе ГК получены *in situ*. Для чего использовались гидрогелевые прекурсоры: ГК, модифицированная глицерил метакрилатом, (НА/GMA), ГК, частично окисленная периодатом натрия (ГК_{ox}), за которой следовала конъюгация GMA (Наох/GMA), и ГК, сшитая с синтетическим полимером перед введением GMA, кроме того, олигомерный поли(2-гидроксиэтил метакрилат) (P(HEMA)) с 31 % поли(N,N-диметил-акриламид) (P(DMAM)) (рис. 25).

Гидрогели были получены путем воздействия на водные растворы УФ-облучения в присутствии фотоинициатора [88].

ГК модифицировали метакриловым ангидридом (рис. 26), затем фотополимеризовали с образованием гидрогеля с различной степенью сшивки [89]. Этот процесс включает образование радикалов при воздействии света на инициатор и рост цепи по виниловым группам модифицированной ГК.

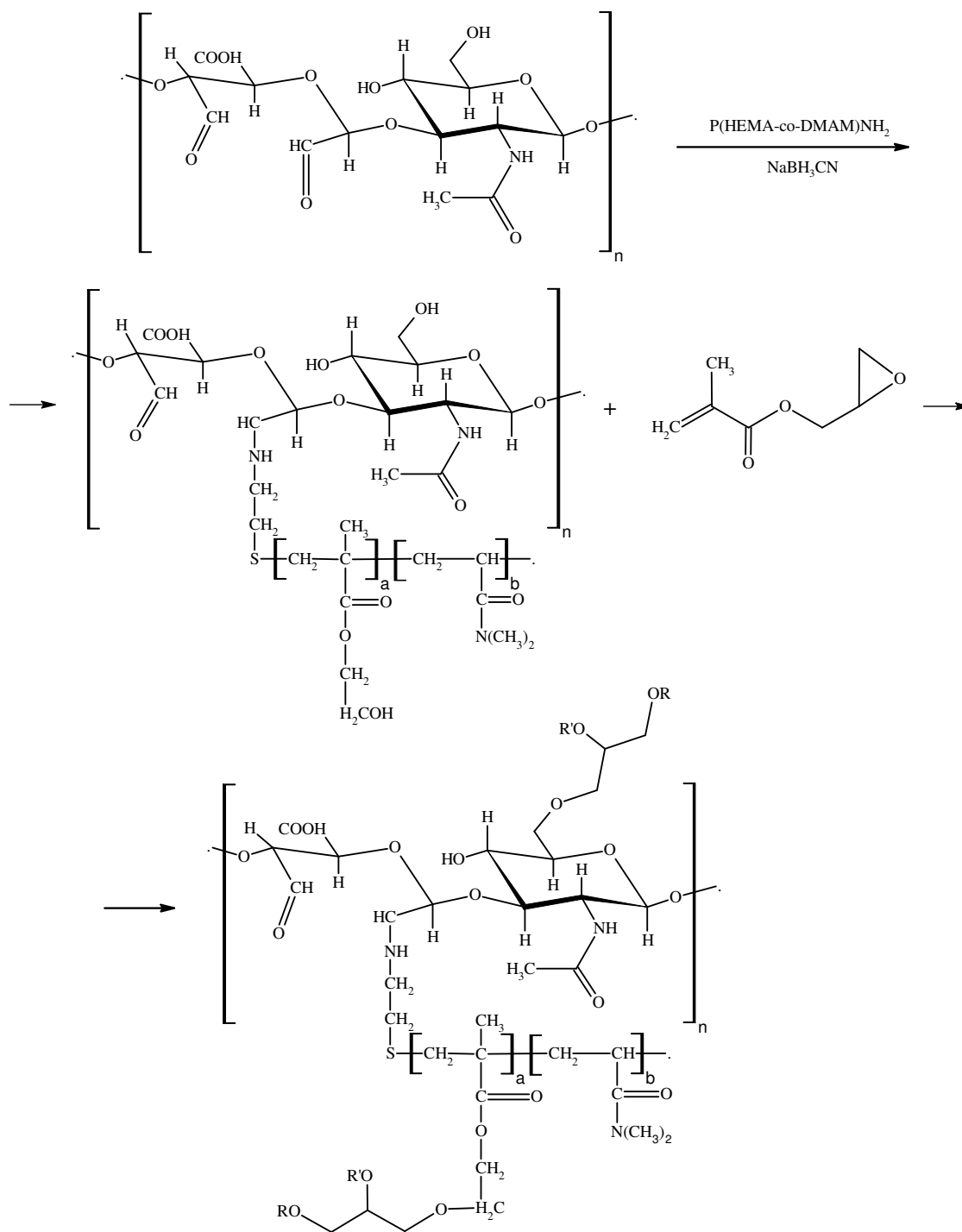
Синтезирован макромер ГК-молочная кислота-метакрилат (рис. 27), фотополимеризация которого дает новый класс гидрогелей [90].

Для контроля микроструктуры и межцепочечных взаимодействий использовали три направления синтеза гидрогелей ГК, модифицированных метакрилатными группами. Показано, что эти направления позволяют регулировать реологические свойства от вязкоэластичного, наблюдаемого в слегка сшитых гелях и концентрированных растворах микросфер, до эластичного поведения в эластичных микрогелях, которые ведут себя как псевдопластичные жидкости, имеющие определенный более высокий предел текучести. Сначала синтезировали ГК-глицерил метакрилатные конъюгаты (рис. 28). Слегка сшитые гидрогели получали растворением конъюгатов в буфере, добавлением фотоинициатора и УФ облучения. Микросферы получали приготовлением эмульсий на основе конъюгатов. Эластичный микрогель получали при центрифугировании микросфер [91].

Получен полупроницаемый 3D гидрогель на основе ГК и гидроксиэтил-метакрилат-производного декстрана, сшитого фотополимеризацией (рис. 29) [91].

Для офтальмологии предложены фотогели ГК, совместимые с эпителиальными клетками пигмента

сетчатки глаза, для пролонгированной доставки лекарств. Предложена прививка антрацена, модифицированного ПЭГ, вдоль скелета ГК (рис. 30).



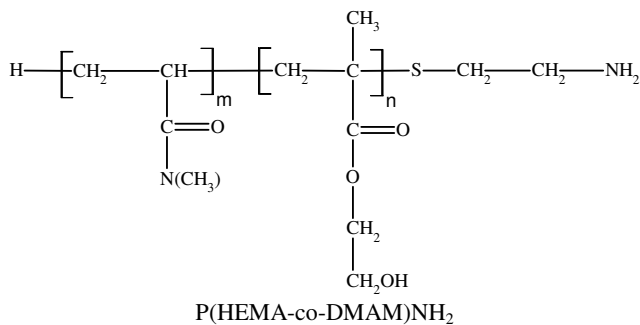


Рис. 25. Синтез конъюгата (Наох-g-Рy)/GMA при помощи P(HEMA-co-DMAM)NH₂ (R, R' – метакрил или H).

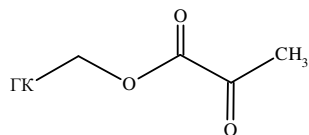


Рис. 26. Метакрирированная гиалуроновая кислота.

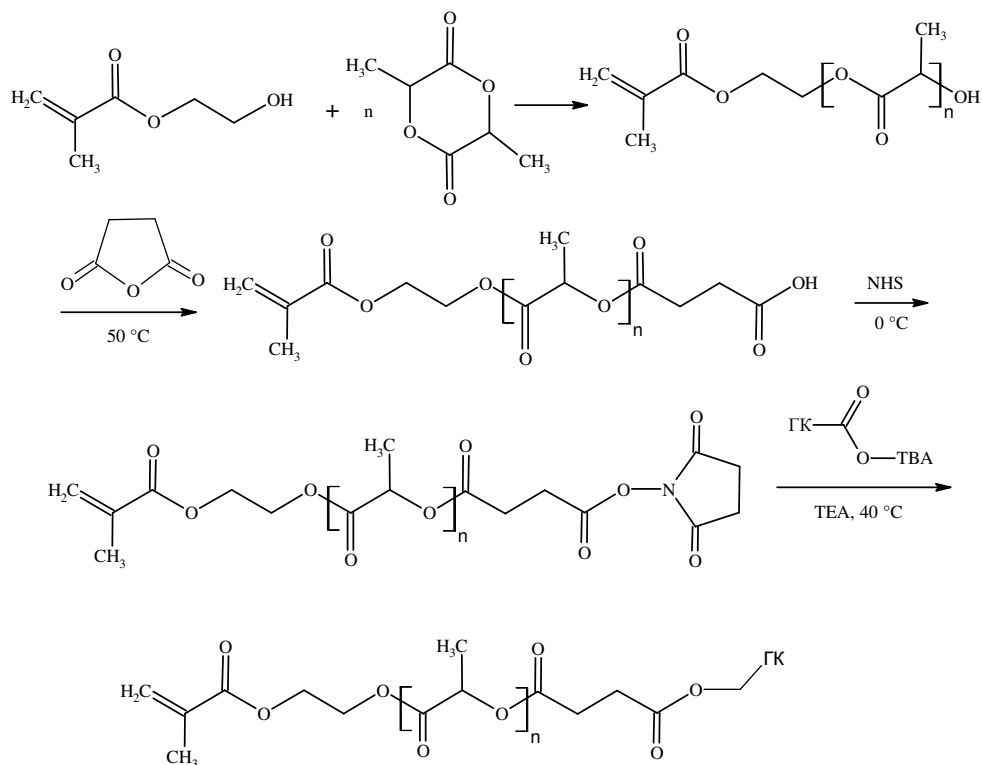


Рис. 27. Синтез макромера метакрилат–молочная кислота–ГК (ТВА – тетрабутиламмоний, ТЕА – триэтиламин, NHS – N-гидрохисукцинимид).

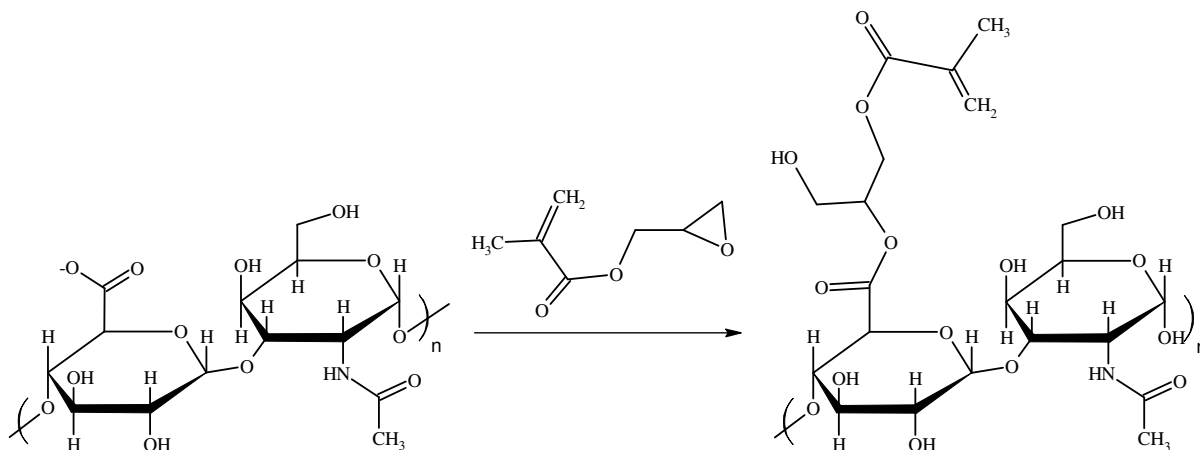


Рис. 28. Метакриляция ГК через реакцию с глицидилметакрилатом.

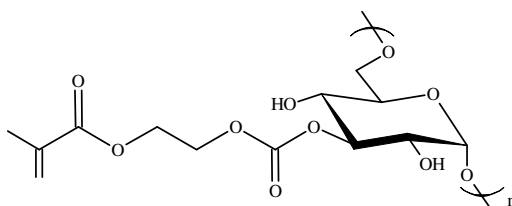


Рис. 29. Химическая структура декстрана, модифицированного гидроксиэтилметакрилатом.

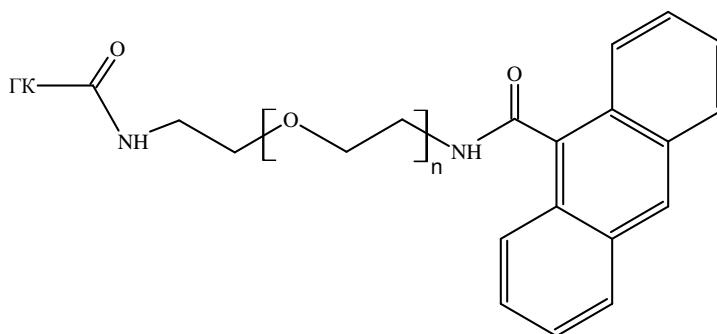


Рис. 30. ПЭГ-антрацен, привитый на ГК.

Амино-терминированные ПЭГ-антраценовые молекулы синтезированы, используя карбодимидную реакцию между Вос-ПЭГ-амином и антрацен-9-карбоксильной кислотой. Далее Вос-защитную группу снимали [93].

Способы выделения гликозаминогликанов, очистка и анализ

ГК присутствует в организме в виде гиалуроната натрия, она была открыта Мейром и Палмером в 1934 г. в стекловидном теле глаз крупного рогатого скота [94]. Кроме стекловидного тела, ГК в свободном виде входит в состав разных живых субстратов, таких как, межклеточная матрица, синовиальная жидкость, пупочные канатики [95–98]. В хряще она связана с белком и участвует в образовании протеогликановых агрегатов.

Выделение, очистка, и идентификация ГК представляют большой научный интерес. Обработка сырья в различных условиях позволяет целена-

правленно регулировать ММ и молекулярно-массовое распределение ГК.

В настоящее время в медицине используется ГК, получаемая из различных источников, с различной степенью чистоты и ММ. Основными «загрязняющими» веществами, содержание которых зависит от источника выделения и метода очистки, являются бактериальные эндотоксины, хондроитин сульфаты, протеины, нуклеиновые кислоты, тяжелые металлы, также обычно присутствует 5–10% воды [5].

До недавнего времени ГК получали в основном из петушиных гребней, человеческих пуповин и глаз крупного рогатого скота. Этапы получения, выделения и очистки ГК включают ферментативное расщепление соединительной ткани, специфическое фракционирование с удалением белков и липидов. Далее идут еще несколько этапов очистки, осаждение и сушка [98–101].

Использование активных реагентов при экстракции из живой ткани приводит к значительной пигментации основного продукта и деструкции полимерной цепи. Поэтому предпочтительно экстракцию проводить в мягких условиях в воде или водном растворе NaCl.

С целью увеличения продолжительности сроков хранения и удобства применения ГК подвергают вакуумной или сублимационной сушке. При стерилизации ГК с помощью УФ-излучения последнее оказывает значительное влияние на вязкость ее растворов, поэтому для стерилизации чаще всего применяют метод автоклавирования [99].

Впервые методику выделения ГК и ее очистки для фармацевтического применения разработал Балаж [100]. Обескровленные петушиные гребни замораживались для разрушения клеточных мембран, ГК экстрагировалась водой и осаждалась в этаноле, содержащем хлороформ, который является бактериостатиком, и т.д. После очистки экстракта, оставался белок 0.5%. Выход ГК составил 0.9 г на 1 кг органического материала.

Известен способ получения препарата «Геалон», представляющий собой 1%-ный раствор натриевой соли ГК. Способ получения заключается в следующем: ткань петушиных гребешков измельчают, осушают ацетоном, экстрагируют водой, центрифугируют, проводят солевую обработку, осаждают этанолом, очищают хлороформом, хроматографией и цитилпиридинхлоридом [101].

Многочисленные методы выделения и очистки описаны в патентах и литературе [102–101].

При исследовании методов преципитации с катионным детергентом цетилпиридин хлоридом обнаружено разделение разнозаряженных полисахаридов, что позволяет с высокой эффективностью отделять ГК от сульфатированных полисахаридов. Этим методом также можно пользоваться для ее фракционирования по молекулярной массе [104]. По своей сути, схожие результаты могут быть получены при использовании метода ионно-обменной хроматографии.

По сравнению с экстракционными методиками больший выход дает получение ГК с помощью бактерий стрептококков *equi* [105] и стрептококков *zooepidemicus* [106]. Молекулярная масса ГК, полученной стрептококками *equi*, меньше, чем ГК, полученной стрептококками *zooepidemicus*, которая составляет от $(1.8-2.0) \times 10^6$ Да с выходом ~4 г ГК на 1 л культивированного раствора.

Процесс получения ГК биотехнологическим путем (технология АМИ), используя клетки бактериального штамма *Streptococcus zooepidemicus*, выращенные на пшеничном субстрате, включает следующие этапы [106]: строго контролируемый биосинтез ГК бактериальными клетками; выделение наработанной ГК из бактерий и ее дальнейшая очистка; осаждение и высушивание.

В последнее время исследуют возможность получения ГК из нетрадиционного сырья – шкур пресноводных рыб, с помощью ферментного препарата Протосубтилин Г3х [108].

Чаще всего для количественного исследования ГК проводят измерение содержания в ней урановой кислоты и/или N-ацетилглюкозамина. Для определения содержания D-глюкуроновой кислоты обычно используют карбазольную реакцию Дише. В результате реакции гексуроновых кислот с карбазолом и серной кислотой образуется 5-карбоксихлороформурол, который с концентрированной серной кислотой дает окрашенное соединение с максимумом поглощения при 535 нм [109]. Определение гексоз обычно проводят по реакции с антроновым реактивом, после которой развивается голубое окрашивание при 620 нм [110].

Полноту очистки от белков проверяют цветной количественной реакцией на белки по методу Лоури. Метод сочетает в себе биуретовую реакцию (т.е. реакцию на пептидные связи) и реакцию Форлина (на тирозин и триптофан) [111].

Другими методами обнаружения ГК являются ферментативные методы. Гиалуронидаза грибов *Streptomyces* действует только на ГК в среде других полисахаридов и примесей, при этом образуются ненасыщенные гекса- и тетрасахариды. Ненасыщенная форма ГК может использоваться для снижения лимита обнаружения продукта. Известно использование аффинных белков, специфично связывающихся с гиалуронатом: из хрящей [112], гиалуронектин, выделенный из головного мозга [113]. Эти белки могут использоваться при анализе по аналогии с иммунологическими методами, а после разработки этого метода точность количественного определения гиалуроната растет до уровня наногаммов, что позволяет определять содержание ГК в образцах тканей и физиологических жидкостях.

Выводы

Таким образом, в литературе имеется достаточное число публикаций, в которых подробно описаны уникальные физико-химические и биологические свойства ГК, в том числе биосовместимость и высокая гидрофильность, которые позволяют использовать ГК в различных областях медицины в виде гелей, пленок. Растворы ГК обладают уникальными реологическими свойствами, позволяющими этому полимеру вести себя подобно вязкоупругому гелю даже при низких концентрациях. Регулярно повторяющиеся гидрофобные области в макромолекулах ГК, способствуют взаимодействию с клеточными мембранами и белками гидрофобного типа. Это свойство растворов ГК имеет большое значение для обеспечения подвижности клеток. ГК участвует в контроле таких процессов, как репаративная регенерация тканей, клеточная дифференцировка, морфогенез, ангиогенез и воспаление. Нативная ГК или лекарственные системы с ГК применяются в хирургии, офтальмологии, дер-

матологии и косметологии. ГК входит в состав противоспаечных и раневых пленок, заменителей синовиальной жидкости суставов, в качестве среды при проведении глазных операций, сохранении и транспортировке клеток. Для дальнейшего успешного применения ГК в медицине необходимы новые методы ее модификации, в том числе образование поперечно-сшитых гелей. Гиалуроновая кислота является исключительно важным и интересным объектом исследования с целью получения лекарственных препаратов, лекарственных средств нового поколения, позволяющих управлять локализацией и пролонгированием действия. В частности необходимо проведение дальнейших исследований в области разработки лекарственных систем на основе гликозаминогликанов (гиалуроновая кислота, гепарин, кератансульфаты, хондроитинсульфаты), и лекарственных форм (жгуты, гели, пленки и др.), обеспечивающих локализацию на раневой поверхности и пролонгирование действия лекарственных средств, например, в микрохирургии глаза и сердечнососудистой хирургии.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (мероприятие 1.1, проект 2012-1.1-12-000-1015-027).

ЛИТЕРАТУРА

1. Бычков С. М. // Вопросы медицинской химии. 1986. №1. С. 19–32.
2. Понеделькина И. Ю., Лукина Е. С., Финоков В. Н. Кислые гликозаминогликаны и их химическая модификация. // Биоорг. хим. 2008. Т. 34. №1. С. 5–28.
3. Понеделькина И. Ю., Хасанов А. Г., Кунафин М. С., Мрих О. В., Башкатов С. А., Джемилев У. М., Тимербулатов В. М., Парфенова Т. И., Суфиярова Р. Ш., Каюмов Ф. А., Фаязов Р. Р., Суфияров И. Ф. Патент РФ №2191782. Способ получения модифицированной гиалуроновой кислоты. Goa K. L., Benfield P. // Drugs. 1994. V. 47. №3. P. 536–566.
4. Lapsik L. Jr., Lapsik L. // Chem. Rev. 1998. V. 98. №8. P. 2663–2684.
5. Scott J. // Ciba Found. Symp. 143. 1989. P. 6–20.
6. West D. C. // Science. 1985. V. 228. P. 1324–1326.
7. Хасанов А. Г. и др. Разработка и применение имплантантов на основе гликозаминогликанов и комплексов метиленового синего в хирургии. Уфа: 2005, 213 с.
8. Калюжная Л. Д., Шармазан С. И., Моисеева Е. В., Бондаренко И. Н. // Эстетична медицина. 2009. Т. 10. №4. С. 44–46.
9. Gailit J., Clark R. A. F. // Current Opinion in Cell Biology. 1994. V. 6. P. 717–725.
10. Fraser J. R. // J. Intern. Med. 1997. V. 242. P. 27–28.
11. Оганесян О. В., Семенова Л. А., Хапилин А.П., Косов И.С., Салтыкова В.Г. // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. 2007. №2. С. 41–46.
12. Забненкова О. В., Пирогова А. С. // Экспериментальная и клиническая дерматокосметология. 2008. №3. С. 34–37.
13. Жукова О.В. и др. // Клиническая дерматология и венерология. 2009. №3. С. 1–9.
14. Волков В.Г. // Вестник новых медицинских технологий. 2001. Т.8. №1. С. 67–70.
15. Wade A. and Wellers P.J. Handbook of Pharmaceutical Excipients. The Pharmaceutical Press. 1994.
16. Барбуччи Р., Спортолетти Дж. Патент РФ №2230073. Способ поперечного сшивания карбоксилированных полисахаридов.
17. Hansch C. et al. Comprehensive Medicinal Chemistry. Oxford: Pergamon Press, 1990. V. 1–6.
18. Kielty C.M., Whittaker S.P., Grant M.E., Shuttleworth C.A. // J. Cell Biol. 1992. V. 118. №4. P. 979–990.
19. Wielson R.P., Lloyd J. // Ophthalmic Surg. 1986. V. 17. №1. P. 30–33.
20. Самойленко А.В. // Глаукома. 2004. №4. С. 22–26.
21. Аурулио Р., Силвана Л. Патент РФ №2128666. Фракция гиалуроновой кислоты или ее соли, способ очистки этой фракции, способы получения этой фракции, фармацевтический препарат и средства, используемые в офтальмологии.
22. Понеделькина И.Ю., Сибгатуллин Н.Г., Башкатов С.А., Джемилев У.М., Плечев В.В., Гагауллин Н.Г., Абу Хашум Маджид Махмуд, Суфиярова Р.Ш., Парфенова Т.И. Патент РФ №2241414. Способ получения протезов кровеносных сосудов.
23. Матчин Е. Н., Потапов В.Л., Стронтелев В.В., Федорищев И.А. // Комбустиология. 2002. №11. С. 38–39.
24. Gailit J., Clark R. A.F. // Current Opinion in Cell Biology. 1994. №6. P. 717–725.
25. Herrera-Gayol A. et al. // Experimental and Molecular Pathology. 2002. V. 72. P. 179–185.
26. Fillion M. C., Phillips N.C. Патент США №7125858. Hyaluronic acid in the treatment of cancer
27. Сидоренко Л. Н., Андрюкова Л. Н. // Фармаком. 2004. №2. С. 1–7.
28. Stenevi U., Gwin T., Harfstrand A., Apple D. // Eur. J. Implant. Refract. Surg. 1993. V. 5. P. 228–232.
29. Madsen K., Stenevi U., Apple D., Harfstrand A. // J. Ophthalmol. Pract. 1989. V. 7. P. 2–8.
30. Harfstrand A., Stenevi U., Schenholm M. et al. // Impl. in Ophthalmol. 1990. V. 4. P. 83–87.
31. Гундорова Р. А. // Вестн. офтальмологии. 1984. №5. С. 34–38.
32. Graue E. L., Polack F. M., Balazs E. A. // Exp. Eye Res. 1980. №31. P. 119.
33. Патент РФ №2288702. Ирригационный раствор для офтальмологии.
34. Гусев Ю. А., Трубилин В. И. // Глаукома. 2004. №3. С. 37–41.
35. Азнабаев Б. М., Семеско С. Г., Кидралеева С. Р. Применение вископротекторов в офтальмологии: Методические рекомендации. Уфа, 2000. 24 с.
36. Белодед А. В., Марквичев Н. С., Самойленко И. И., Цепилов Р. Н. // Биотехнология. 2007. №5. С. 80–87.
37. Патент США №5017229. Water insoluble derivatives of hyaluronic acid.
38. Beck D. E. // Eur.Surg.Suppl. 1997. V. 577. P. 49–55.
39. Беллини Д., Лонджинотти К., Крешенци В., Тальенти А. Патент РФ №2383336. Биоматериалы, состоящие из сульфатированной гиалуроновой кислоты и желлана, применяемые для предотвращения спаек в позвоночнике
40. Эрмит Л., Бенуа О. Патент РФ №2360928. Комплексная матрица для медико-биологического применения. <http://www.practica.ru/DrugBook/Drugs/Ads/Gedeon/curiosin-advantages.htm>
41. Де Лука Дж., Марини Б.Р., Минько Л.М. Патент РФ №2384593. Таксаны, ковалентно связанные с гиалуроновой кислотой или производными гиалуроновой кислоты
42. Luo Y., Ziebell M.R., Prestwich G.D. // Biomacromolecules. 2000. V. 2. №1. P. 208–218.
43. Prestwich G.D., Marecak D.M. Патент США №5874417. Functionalized derivatives of hyaluronic acid.
44. Harrison K. Biopolymers. GlaxoSmithKline R&D, UK, 2007.
45. Shenoy V., Rosenblatt J. // Macromolecules. 1995. V. 28. №26. P. 8751–8758.
46. Lowman A. M., Peppas N.A. // Intelligent Materials for Controlled Release, Chapter 3. 1999. P. 30–42.
47. Shah C. B., Barnett S. M. // Journal of Applied Polymer Science. V. 45. №2. P. 293–298.
48. Shah C. B., Barnett S.M. // Polyelectrolyte Gels. 1992. №7. P. 116–130.
49. Drobni J. // Advanced Drug Delivery reviews. 1991. V. 7. P. 295–308.
50. Balazs E.A., Leshchiner A. Патент США №4500676. Hyaluronate modified polymeric articles.

53. Balazs E.A., Leshchiner A. Патент США №4582865. Cross-linked gels of hyaluronic acid and products containing such gels.
54. Balazs E.A., Leshchiner A. Патент США №4636524. Cross-linked gels of hyaluronic acid and products containing such gels.
55. Sannino A. et al. // *Biomacromolecules*. 2004. V. 5. P. 92–96.
56. De Belder A.N., Malson T. Патент EP №0190215. Gel for preventing adhesion between body tissues and process for its production.
57. Balazs E.A., Leshchiner A., Leshchiner A., Band P. Патент США №4713448. Chemically modified hyaluronic acid preparation and method of recovery thereof from animal tissues.
58. Tomihata K., Ikada Y. // *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 1997. V. 35. P. 3553–3559.
59. Crescenzi V., Francescangeli A., Segre A. L., Capitani D., Mannina L., Renier D., Bellini D. // *Macromol. Biosci.* 2002. V. 2. P. 272–279.
60. Jayakrishnan A., Jameela S. R. // *Biomaterials*. 1996. V. 17. P. 471–484.
61. Crescenzi V., Francescangeli A., Taglienti A., Capitani D., Mannina L. // *Biomacromolecules*. 2003. V. 4. №4. 3. 1045–1054.
62. Патент США №7020230. Use of Hyaluronic Acid Derivatives in the Preparation of Biomaterials with a Physical Haemostatic and Plugging Activity.
63. Tomihata K., Ikada Y. J. Cross-linking of hyaluronic acid with water-soluble carbodiimide. // *Biomed. Mater. Res.* 1997. V. 37. P. 243–251.
64. Волков В.П., Зеленецкий А.Н., Хабаров В.Н., Селянин М.А. Патент РФ №2382052. Способ получения модифицированной токоферолом сшитой соли гиалуроновой кислоты и биоактивная композиция на ее основе.
65. Волков В.П., Зеленецкий А.Н., Хабаров В.Н., Селянин М.А. Патент РФ №2382050. Способ получения модифицированной аскорбиновой кислотой сшитой соли гиалуроновой кислоты и биоактивная композиция на ее основе.
66. Pouyani T., Harbison G.S., Prestwich G.D. // *J. Am. Chem. Soc.* 1994. V. 116. P. 7515–7522.
67. Vercruyse K.P., Marecak D.M., Marecek J.F., Prestwich G.D. // *Bioconjugate Chem.* 1997. V. 8. P. 686–694.
68. Shu X.Z., Liu Y., Luo Y., Roberts M.C., Prestwich G.D. // *Biomacromolecules*. 2002. V. 3. P. 1304–1311.
69. Li H, Liu Y., Shu X.Z., Gray S.D., Prestwich G.D. // *Biomacromolecules*. 2004. V. 5. P. 895–902.
70. Jia X. et al. // *Biomacromolecules*. 2006. V. 7. P. 3336–3344.
71. Jha A.K. et al. // *Macromolecules*. 2009. V. 42. P. 537–546.
72. Hu X. et al. // *Biomacromolecules*. 2010. V. 11. №11. P. 3178–3188.
73. Yeom J. et al. // *Bioconjugate Chem.* 2010. V. 21. P. 240–247.
74. Ossipov D.A., Piskounova S., Varghese O.P., Hilborn J. // *Biomacromolecules*. 2010. V. 11. P. 2247–2254.
75. Mortisen D., Peroglio M., Alini M., Eglin D. // *Biomacromolecules*. 2010. V. 11. P. 1261–1272.
76. Censi R., Fieten P.J., Martino P., Hennink W.E., Vermonden T. // *Macromolecules*. 2010. V. 43. P. 5771–5778.
77. Nimmo C.M., Owen S.C., Shoichet M.S. // *Biomacromolecules*. 2011. V. 12. P. 824–830.
78. Tous E. et al. // *Biomacromolecules*. 2011. V. 12. P. 4127–4135.
79. Choh S., Cross D., Wang C. // *Biomacromolecules*. 2011. V. 12. P. 1126–1136.
80. Зараева Г.А. // *International Conference on Biomolecular Science in honor of the 75th anniversary of the birth of Professor Yuri Ovchonnikov*. September 28 – October 2, 2009. Abstracts. V. 2. C. 77–80.
81. Zhao X., Fraser J., Alexander C. // *Hyaluronan*. 2002. P. 277–284.
82. Mensitieri M., Ambrosio L., Nicolais L. // *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, 7, 1996. P. 695–698.
83. Рахматуллин Р. Р., Бурлуцкая О. И., Адельшина Л. Р., Бурцева Т. И. // *Врач*. 2011. №5. С. 22–24.
84. Мадсен Ф., Мадсен Н. Й. Патент РФ №2341539. Гидрогель.
85. Matsuda T., Moghaddam M.J., Sakurai K. Патент США №5462976. Photocurable glycosaminoglycan derivatives, crosslinked glycosaminoglycans and method of production thereof.
86. Desai N. P., Hill-West J. L., Hubbell J.A., Pathak C. P., Sawhney A. S. Патент США №5567435. Photopolymerizable biodegradable hydrogels as tissue contacting materials and controlled-release carriers.
87. Yui N., Okano T., Sakurai Y. // *J. Controlled Release*. 1993. V. 25. P. 133–143.
88. Jia X. et al. // *Macromolecules*. 2004. V. 37. P. 3239–3248.
89. Burdick J.A. et al. // *Biomacromolecules*. 2005. V. 6. P. 386–391.
90. Sahoo S., Chung C., Khetan S., Burdick J. A. // *Biomacromolecules*. 2008. V. 9. P. 1088–1092.
91. Prata J. E., Barth T. A., Bencherif S. A., Washburn N. R. // *Biomacromolecules*. 2010. V. 11. P. 769–775.
92. Pescosolido L. et al. // *Biomacromolecules*. 2011. V. 12. №5. P. 1831–1838.
93. Wells L.A., Furukawa S., Sheardown H. // *Biomacromolecules*. 2011. V. 12. P. 923–932.
94. Meyer K., Palmer J.W. // *J. Biol. Chem.* 1934. V. 107. P. 629–634.
95. Laurent T. C., Fraser J. R. E. // *FASEB J.* 1992. V. 6. P. 2397–2404.
96. McDonald J. A. // *Annu. Rev. Cell Biol.* 1988. V. 4. P. 183–207.
97. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. // *Molecular Biology of the cell*. 3rd edition, New York, Garland Publishing, 1994.
98. Костина Г., Радаева И. // *Косметика&медицина*. 1999. №2–3. С. 53–57.
99. Парамонов Б. А. и др. // *Военно-медицинский журнал*. 2002. №4. С. 70–73
100. Balazs E. A. Патент США №4141973. Ultrapure hyaluronic acid and the use thereof.
101. Башкатов С. А., Лобанов С. А., Сперанский В. В. Патент РФ №2066996. Способ изготовления пленочного материала для офтальмохирургии.
102. Морра М., Кассинелли К., Бенедетти Л., Каллегаро Л. Патент РФ №2173563. Способо нанесения на поверхность предметов покрытия на основе гиалуроновой кислоты, ее производных и полусинтетических полимеров.
103. Galatik A., Kubena K., Blazek A. C. S. Patent №264719. Pharmacological preparation on the basis of hyaluronic acid
104. Hopwood J. J., Robinson H. C. // *Biochem J.* 1973. V. 135. P. 631–637.
105. Bryan K. S., Yeung, Pek Y. C. Chong, and Peter A. Petillo. Chapter 12. Synthesis of Glycosaminoglycans. // *Glycochemistry Principles: Synthesis, and Applications* Carolyn R. Bertozzi and Peng George Wang CRC Press. 2001. P. 425–492.
106. Akasaka H., Seto S., Yanagi M., Fukushima S., Mitsui T. // *J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn.* 1988. V. 22. P. 35–42.
107. Sutherland I.W. // *Trends Biotechnol.* 1998. V. 16. P. 41–46.
108. Воронина И.С., Антипова Л.В., Хаустова Г.А., Данышев М.М. // *Успехи современного естествознания*. 2011. №7. С. 88.
109. Bitter T., Muir H.M. // *Anal. Biochem.* 1962. V. 4. №4. P. 330–334.
110. Roe J.H., Dailey R.E. // *Anal. Biochem.* 1966. V. 15. №2. P. 245–250.
111. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. №1. P. 265–275.
112. Tengblad A. // *Biochem. J.* 1981. V. 199. P. 297–305.
113. Delpech A., Delpech B. // *Developmental Biology*. 1984. V. 101. №2. P. 391–400.

*Поступила в редакцию 07.04.2012 г.
После доработки – 27.04.2012 г.*