

УДК 579.66

ХАРАКТЕРИСТИКА РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ

Савоськин О. В., Семенова Е. Ф., Рашевская Е. Ю., Полякова А. А., Грибкова Е. А.,
Агабалаева К. О., Моисеева И. Я.

ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет», Пенза, e-mail: savoskin.oleg@yandex.ru

Дан краткий исторический очерк об открытии и комплексном изучении гиалуроновых кислот. В сравнительном плане проведена систематизация данных научной литературы по особенностям химического строения, физико-химических свойств, гистологической и цитологической принадлежности, функций и метаболизма гиалуроновых кислот у организмов различных таксономических групп. Выявлены особенности ферментного состава, обеспечивающие синтез и деградацию биополимера у микроорганизмов и в клетках тканей млекопитающих. Проанализированы традиционные технологии извлечения из животного сырья и способы его получения на основе культур *Streptococcus equi* subsp. *equi*, *S. equi* subsp. *zooepidemicus* и *Bacillus subtilis*. Обоснована научно-техническая разработка инновационных биотехнологий гиалуроновых кислот различной молекулярной массы и перспективы их производственной реализации. Представлены сведения о применении продукции на их основе в различных сферах современной жизни.

Ключевые слова: гиалуроновая кислота, технологии микробного синтеза, биотехнология, бактерии

A DESCRIPTION OF DIFFERENT METHODS USED TO OBTAIN HYALURONIC ACID

Savoskin O. V., Semyonova E. F., Rashevskaya E. Yu., Polyakova A. A., Grybkova E. A.,
Agabalaeva K. O., Moiseeva I. Ya.

Penza State University, Penza, e-mail: savoskin.oleg@yandex.ru

The article gives a brief historical outline of the discovery and comprehensive study of hyaluronic acids. We compare and systematize scientific papers focusing on the specific features of functions, metabolism, chemical constitution, physical, chemical, histological and cytological properties of hyaluronic acids in organisms belonging to different taxonomic groups. We also reveal the specific features of enzyme composition that ensure the synthesis and degradation of biopolymers in microorganisms and mammals' tissue cells. In addition, we analyze traditional extraction technologies used with animal-based raw materials and ways of obtaining them from *Streptococcus equi* subsp. *equi*, *S. equi* subsp. *zooepidemicus* and *Bacillus subtilis*. Furthermore, we present the grounds for the scientific and technical development of innovative biotechnologies related to hyaluronic acids with different molecular weight and their production prospects. Finally, we give information about how hyaluronic acid-based goods are used in different spheres of modern life.

Keywords: hyaluronic acid, technologies of microbial synthesis, biotechnology, bacteria

В последние годы медицина, фармацевтика и косметология далеко шагнули в вопросе использования высокомолекулярных соединений (ВМС), в качестве основных действующих, а также вспомогательных, корректирующих веществ и наполнителей. Одним из наиболее востребованных в медицине и косметологии ВМС на сегодняшний момент, является гиалуроновая кислота (ГК), которая нашла свое применения в хирургии, как заменитель синовиальной жидкости в суставах в качестве смазывающего и хондропротекторного компонента; дерматологии, в качестве ремоделирующего агента при коррекции возрастных деформаций кожи лица, особенно кожи вокруг глаз; гинекологии, в качестве противоспаечного средства при внутривлагалищных сращениях. Таким образом, спектр применения гиалуроновой кислоты весьма широк; он постоянно пополняется, что приводит к повышению спроса на данный вид биополи-

мера, а, следовательно, интересу к альтернативным источникам его получения.

1. История открытия гиалуроновой кислоты

В 1934 г. в журнале *Journal of Biological Chemistry* была опубликована статья Карла Маера и Джона Палмера, в которой упоминался необычный полисахарид, выделенный из стекловидного тела бычьего глаза (от греч. *hyalos* — стекловидный и англ. *uronic acid* - уроновая кислота), достаточно высокой молекулярной массы 450 г/моль и не содержащий сульфатных групп [27]. Дальнейшие исследования показали, что полисахарид представлен фрагментами дисахарида, который состоит из D-глюкуроновой кислоты и N-ацетилированного глюкозамина.

Данные о принадлежности биополимера только структурам организмов млекопитающих опровергли, когда в 1937 г. Кендал

и Хейдельбергер заявили о выделении полисахарида идентичного гиалуронану из культуральной жидкости гемолитического стрептококка. Идентичность выделенного биополимера подтвердилась ими же позже после установления структуры полисахарида в 60-е годы [20]. В 1954 г. в журнале *Nature* руководитель лаборатории Meyer опубликовал структурную формулу фрагмента дисахарида, продукта расщепления стрептококковой гиалуронатлиазой [23].

Научный интерес к гиалуроновой кислоте, ее получению, выделению и применению все больше увеличивался. К настоящему времени опубликовано более 15000 статей в зарубежных и отечественных журналах. Результатом исследований было получение достоверных данных о выделении гиалуронана из различных органов млекопитающих, а также из культур различных клеток (гемолитический стрептококк, стрептомицеты, коринебактерии). Некоторые данные имели промышленное значение, например, экстракция гиалуроновой кислоты из гребней кур используется и сейчас. За полвека увеличился и спектр применения гиалуронана (хирургия, косметология, травматология и ортопедия, дерматология и др.), а также были созданы новейшие лекарственные формы на основе его полимерной структуры [36]. Все это не было возможно без установления биологической роли биополимера, который, как оказалось, служил компонентом клеточного матрикса, необходимого для нормального осуществления метаболических процессов пролиферации и дифференциации тканей. Так был изучен процесс метаболизма гиалуронана в организме человека. Стало известно, что в день распадается и синтезируется около 5 г гиалуроновой кислоты, а ее содержание в теле человека составляет примерно 0,007%, что составляет около 15 г у женщины массой 70 кг [25].

В 1953 г. Роземан, Мозес и Дорфман опубликовали работы, где был указан способ получения гиалуронана, его осаждения и выделения в свободном виде на основе культур гемолитического стрептококка. В дальнейшем их методы выделения и осаждения были усовершенствованы Цифонелли и Маедо, что позволило повысить выход и чистоту продукта [31]. Механизм образования гиалуронана в бактериях, в том числе стрептококков, был выявлен позже, когда был исследован ферментный состав микроорганизмов, способных к синтезу гиалуроновой кислоты. В 1959 г. было доказано существование специфических пептидов гиалуронатсинтетаз, которые осуществляют синтез полисахарида в мембранах бактерий [22].

В 1992 г. американские ученые заявили о клонировании гена, отвечающего за синтез гиалуронатсинтетазы, и передаче его штамму кишечной палочки. Однако активного фермента получить не смогли. ДеАнгелис в 2002 г. сообщил об успешном выделении оперона гиалуронатсинтетазы и экспрессии его в микроорганизм. Это был первый случай клонирования глюкозаминогликансинтетаз в мировой практике [16].

В настоящее время в мире проводятся исследования механизмов действия гиалуроновых кислот, их роли в организме человека и альтернативных путей использования. Однако, особенно актуальными являются вопросы микробного синтеза гиалуронана, что подтверждает цена за килограмм очищенного продукта, составляющая около 700000 т. руб. (импортируемый продукт на основе животного сырья). Так, за последние 20 лет в мире было выдано более 50 патентов, что свидетельствует о высоком интересе к рассматриваемой проблеме.

2. Химическое строение и физические свойства гиалуроновой кислоты

Около 20 лет с момента первой публикации об открытии животного полисахарида гиалуроновой кислоты (1934 г.) понадобилось лаборатории Meyer, для установления точного химического строения гиалуроновой кислоты. Гиалуроновая кислота, гиалуронат или гиалуронан - ($C_{14}H_{21}NO_{11}$) n - органическое соединение, относящееся к группе несulfатированных глюкозаминогликанов (рис. 1). Наличие многочисленных sulfатированных групп у родственных глюкозаминогликанов является причиной многочисленной изомерии, чего не наблюдается у гиалуроновой кислоты, которая всегда химически идентична, в независимости от методов и источников получения. Молекула гиалуроновой кислоты построена из повторяющихся фрагментов D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина, соединенных β -(1-3)гликозидной связью. Основные фрагменты сахаров - это глюкопиранозное кольцо с различными заместителями (ацетамидная группа, гидроксильные и карбоксильные функциональные группы).

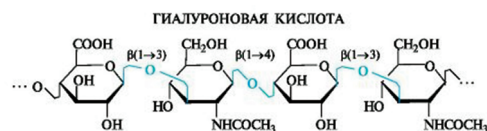


Рис. 1. Химическая формула гиалуроновой кислоты

Для молекулы гиалуроновой кислоты характерно образование большого количе-

ства водородных связей как внутри молекулы, так и между соседними углеводными остатками, находящимися на значительном друг от друга расстоянии, а в водном растворе даже между соседними молекулами через карбоксил и ацетамидную группу. Имеет кислую реакцию среды ввиду наличия непротонированной карбоксильной группы. Кислотные свойства гиалуроната позволяют получать растворимые в воде соли с щелочными металлами. Гиалуроновая кислота – это анионный линейный полисахарид с различной молекулярной массой 105-107 Да. Молекулярная масса зависит от способа получения, причем, ввиду отсутствия изомерии, получаемый гиалуронат всегда химически идентичен стандартному.

Растворы гиалуроновой кислоты 1-4% образуют псевдогели. В водной среде сила кислотности карбоксильной группы (рК) составляет порядка 3-4, поэтому, для сохранения электронейтральности в растворе, молекулу окружают положительно заряженные катионы металлов, Na^+ , K^+ , Mg^{2+} и Ca^{2+} , что приводит к формированию прочной гелевой структуры с большим содержанием воды. С тяжелыми металлами и красителями дает нерастворимые в воде комплексы. Кроме того, гиалуронат специфически реагирует с белками и в результате дает нам сложные гелеобразные комплексы, нередко выпадающие в осадок [8].

В водном растворе гиалуроновая кислота имеет достаточно большие значения продольного размера полисахаридной цепи – примерно 1 нм, поэтому, находясь в организме млекопитающих, гиалуроновая кислота принимает наиболее компактную форму. Посредством рентгеноструктурного анализа, выяснено, что гиалуронат может формировать левую ординарную и двойную спирали, различные многокитевые плоские структуры, а также сверхспирализованные структуры с вариациями концентраций в различных частях цепи, формирующие плотную молекулярную сетку, что и составляет вторичную структуру полисахарида. Это, в основном, обуславливается образованием водородных связей, связыванием с катионами щелочных металлов и гидрофобными взаимодействиями. Третичная структура гиалуроновой кислоты – это сетка, обладающая высокими реологическими свойствами (домены отталкиваются друг от друга), способная поглощать значительное количество воды и электролитов, а также большие молекулы белков, однако точно определенного размера пор третичная структура не образует. Сети имеют весьма четкую упорядоченность, ввиду наличия электронных эффектов по функциональным

группам и по заместителям. При этом молекула принимает наиболее энергетически выгодное положение, которое также зависит от ионного окружения [32].

3. Гиалуроновая кислота в природе, функции гиалуроната в зависимости от гистологической и цитологической принадлежности у различных организмов

Эволюционно сложилось, что способность к синтезу, а точнее, наличие оперона, кодирующего синтез гиалуронатсинтеза, свойственна и более просто устроенным формам жизни: нехордовым животным (простейшие, членистоногие-паразиты, иглокожие, черви), некоторым видам микроводорослей рода *Chlorella*, бактериям родов *Streptococcus*, *Pasteurella* и *Streptomyces*, а также вирусу PBCV-1 [14, 15, 18, 22].

Наличие гиалуронатсинтеза и гиалуроновых кислот в капсулах вирусов и бактерий родов *Streptococcus* можно объяснить, как адаптативное эволюционное приспособление, которое бактерии и вирусы позаимствовали у высших животных, тем самым увеличив свою способность преодолевать иммунный ответ хозяина.

3.1 Гиалуроновая кислота в тканях млекопитающих

Гиалуронат – основной компонент межклеточного матрикса различных тканей млекопитающих, однако распределен неравномерно. Так, например, максимальная концентрация содержания гиалуроновой кислоты в теле человека наблюдается в синовиальной жидкости, пупочном канатике, стекловидном теле глаза и коже [7].

В коже глюкозаминогликан содержится в интерстициальном пространстве и выполняет ряд функций: удерживает воду, тем самым поддерживает естественную эластичность и объем кожи, что так важно при воспалительных реакциях; участвует в процессах пролиферации и дифференциации кератиноцитов и иммунокомпетентных клеток, тем самым играет роль в поддержании нормального процесса роста и регенерации кожных покровов и осуществлении местного иммунитета, укрепляет волокна коллагена (рис. 2); служит естественным барьером, защищающим от действия свободных радикалов, болезнетворных агентов и химических веществ [34].

При недостатке естественной гиалуроновой кислоты, например, при старении или заболеваниях кожи, развиваются дегенеративные нарушения: снижается местный иммунитет, ранозаживляющая способность, эластичность кожи, что ведёт к

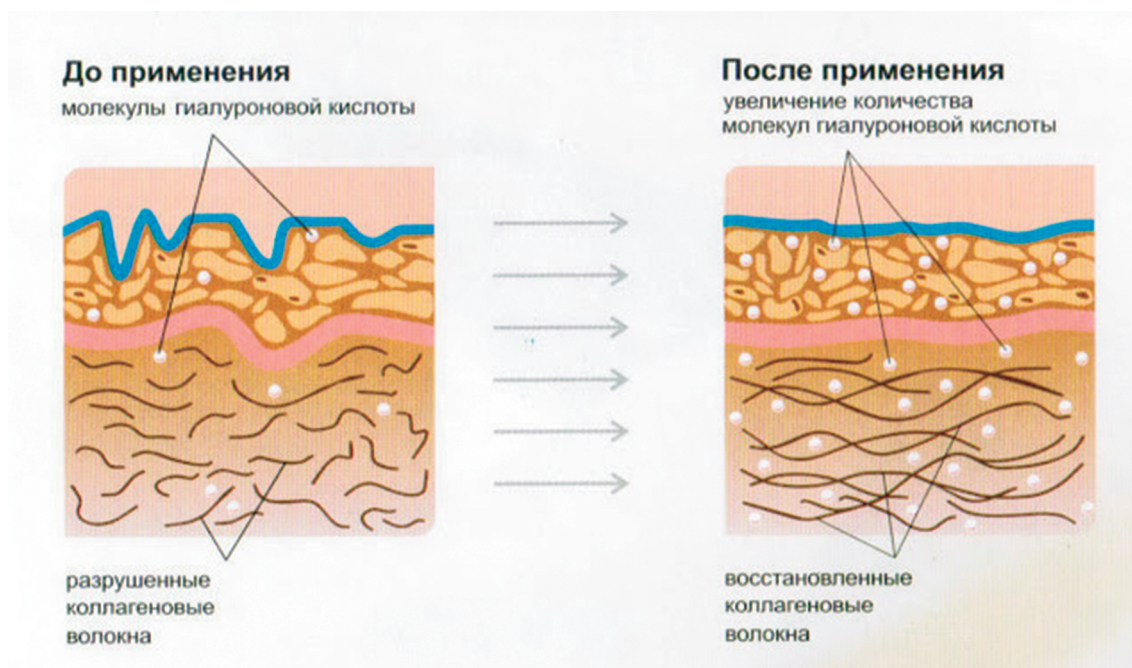


Рис. 2. Воздействие гиалуроновой кислоты на коллагеновые волокна.

возникновению морщин. В хрящевой ткани ГК выполняет функцию структурного элемента матрикса, необходимого для связывания и удержания хондроитинсульфатпротеогликана для укрепления коллагенового каркаса хряща [29]. В синовиальной жидкости гиалуронат обеспечивает смазку для подвижных частей сустава, уменьшая их износ. При воспалительных заболеваниях суставов (артритах), снижается количество гиалуроновой кислоты, уменьшается вязкость синовиальной жидкости, что ведет к ухудшению движения. Также гиалуроновая кислота играет важную роль в эмбриогенезе, является передатчиком сигналов клеточной подвижности.

Таким образом, функции гиалуроната весьма обширны, и по мере дальнейшего расширения сферы изучения ее свойств, будут открываться все новые факты о роли глюкозаминогликана в организме человека и млекопитающих [7].

3.2 Гиалуроновая кислота как компонент капсул бактерий

Исследования по изучению локализации ГК, позволили получить достоверные данные о вхождении глюкозаминогликана в состав капсул некоторых бактерий рода *Streptococcus* - возбудителей заболеваний животных и человека. Стрептококки - клеточные паразиты, колонизирующие слизистые оболочки верхних дыхательных путей, преимущественно носоглотку, вызывают ряд гнойных и негнойных инфекций (анги-

ны, пневмонии). В 1974 году гиалуроновая кислота была выявлена в капсулах грамотрицательной палочки, возбудителя птичьей холеры и атрофического ринита свиней *Pasteurella multocida* [14]. Является представителем оппортунистической микрофлоры ротовой полости у семейства кошачьих.

Ограниченное количество бактерий способно к синтезу гиалуроновой кислоты. Однако, исходя из данных об их экологической нише (клеточные паразиты позвоночных), стоит предположить, что приобретение способности к синтезу гиалуроновой кислоты и родственных мукополисахаридов являлось адаптацией, которую они позаимствовали у своих хозяев, что повысило их вирулентные свойства. Благодаря наличию капсулы с гиалуроновой кислотой бактерии способны легко инвазировать через кожные покровы и колонизировать мезоэпителиальные клетки кожи, а также преодолевать иммунный ответ хозяина и вызывать более серьезные воспалительные процессы, чем штаммы, не имеющие капсулы и специфичных ферментов для синтеза гиалуроната.

4. Метаболизм гиалуроновой кислоты

Синтез гиалуроновой кислоты достаточно хорошо изучен. Для млекопитающих и бактерий родов *Streptococcus* и *Pasteurella* биохимия процесса принципиально не отличается. Для синтеза гиалуроновой кислоты необходимы компоненты полимера: гиалуроновая кислота и N-ацетилглюкозамин.

Глюкуроновая кислота синтезируется посредством ряда ферментативных реакций из глюкозо-6-фосфата (рис. 3).

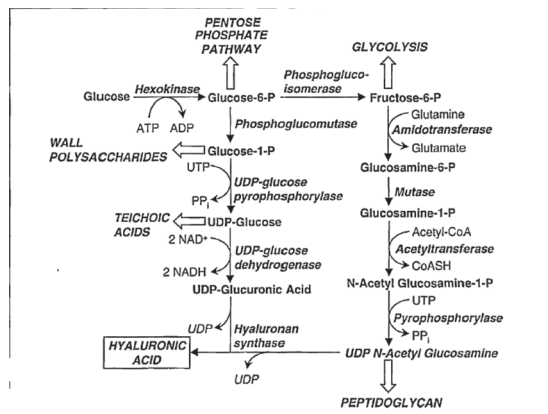


Рис. 3. Схема синтеза глюкозаминогликанов

Глюкозо-6-фосфат под действием фермента α -фосфоглюкомутазы изомеризуется в глюкозо-1-фосфат. Далее фермент УДФ-глюкозопирофосфорилазы катализирует образование УДФ-глюкозы из уридиндифосфата и глюкозы. После происходит ферментзависимое окисление гидрокси групп УДФ-глюкозы под действием фермента УДФ-глюкозодегидрогеназы. Результат - образование глюкуроновой кислоты.

N-ацетилглюкозамин синтезируется из фруктозо-6-фосфата. При биосинтезе аминосахара происходит перенос аминогруппы на фруктозо-6-фосфат. Донор аминогруппы - глютамин, фермент амидотрансферазы. Результат - образование глюкозамина-6-фосфата, который изомеризуется мутазой в глюкозамин-1-фосфат, который подвергается ацелированию при участии фермента ацетилтрансферазы в присутствии КоА до N-ацетилглюкозамин-1-фосфата, который необходимо активировать пирофосфорилазой до УДФ-N-ацетилглюкозамин-1-фосфата. Это энергетически затратный процесс.

Последней стадией синтеза гиалуроновой кислоты будет осуществление гликозидтрансферазной реакции при помощи единственного фермента гиалуронатсинтазы. Этот процесс также происходит с затратой энергии АТФ (на синтез 1 моля гиалуроната расходуется 2 моля АТФ) [24].

4.1. Гиалуронатсинтазы: строение, функции, локализация, кинетические характеристики и механизмы катализа

Гиалуронатсинтаза - металлопротеин молекулярной массы 49 кДа, фермент, требующий катионы металлов для координации с фосфатными группами (активации) и использующий гликозидфосфаты в качестве субстратов. Является единственным в

своем роде ферментом, катализирующим синтез гиалуроновой кислоты в организме млекопитающих и в клеточной стенке гемолитического стрептококка, а также у вируса РBCV-1 и бактерии *Pasteurella multocida* [14]. Исследования, проведенные в 50-е годы, в лаборатории Мейер позволили установить характерные особенности фермента гиалуронатсинтазы: функционирует при нейтральных значениях pH, для катализа требует активированные посредством конъюгации с уридиндифосфатом глюкуроновую кислоту и N-ацетилглюкозамин, а также присутствие катионов Mg^{2+} и Mn^{2+} для координирования фосфатных групп. Фермент проявляет высокую активность в присутствии кардиопина (находится в комплексе). Тип 1 был изучен в 1983-1998 г. Prehm и Asplund, характерен для гемолитического стрептококка млекопитающих: гиалуронатсинтаза синтезирует гиалуроновую кислоту посредством присоединения углеродных остатков к восстанавливающему концу гиалуроната, при этом чередуются $\beta(1-3)$ и $(1-4)$ гликозидные связи [35].

4.2. Ферменты, осуществляющие деполимеризацию гиалуроновой кислоты

Катаболические реакции гиалуроновой кислоты основаны на ферментативном катализе посредством гиалуронатлитических ферментов. Гиалуронатлиазы были классифицированы в 1971 году в лаборатории Мейер [26]. Концепция данной классификации предельно проста: фермент - катализируемая реакция - продукт реакции. В соответствии с данной классификацией выделяют три различных вида гиалуронидаз (гиалуронатлиаз):

Гиалуроноглюкозаминидазы (гиалуронидазы млекопитающих) - эндо- β -N-ацетилгексозаминидазы, расщепляют гиалуроновую кислоту до тетра- и гексасакхаридов.

Гиалуроноглюкозаминидазы не обладают субстратной специфичностью, а также способны формировать поперечные сшивки между молекулами гиалуроната и хондроитинсульфата. Одной из дополнительных функций гиалуронидаз в организме млекопитающих является расщепление гиалуроната до дисахаров для получения энергии [17].

Гиалуроноглюкуронидазы (гиалуронидазы секрета пиявки и некоторых паразитарных ракообразных) - это эндо- β -глюкуронидазы, гидролизующие гиалуронат до тетра- и гексасакхаридов. Гиалуронидазы пиявок и паразитических форм членистоногих - это своеобразный фактор адгезии [19].

Гиалуронатлиазы (гиалуронидазы бактерий) - это эндо- β -ацетилгексоаминоэлиминазы, гидролизующие гиалуронат до 4,5-ненасыщенных дисахаров. Обладают высокой специфичностью к субстрату. У бактерий гиалуронидазы являются фактором патогенности, необходимой для инвазии и адгезии бактерий (для проникновения в организм млекопитающего).

5. Получение гиалуроновой кислоты

Все известные способы получения гиалуроновой кислоты можно разделить на две группы: физико-химический метод, который заключается в экстрагировании гиалуроната из тканей животного сырья млекопитающих, других позвоночных животных и птиц; и микробный метод получения ГК на основе бактерий-продуцентов.

5.1. Физико-химический способ: экстракция из животного сырья

Как было сказано ранее, гиалуроновая кислота встречается во многих тканях млекопитающих и птиц, и, в зависимости от гистологической принадлежности, содержание гиалуроновой кислоты и ее молекулярная масса могут варьировать. Кроме того, в различных тканях гиалуронат может находиться в комплексах с белками и родственными полисахаридами, что затрудняет его очистку с последующим выделением. В настоящее время для промышленного получения используют пупочные канатики новорожденных и гребни кур. Однако, кроме вышеперечисленных методов, описаны разнообразные способы выделения гиалуроната на основе стекловидного тела глаз крупного рогатого скота, синовиальной жидкости, суставных сумок, свиной кожи, плазмы крови и хрящевой ткани [8]. При выделении биополимера прибегают к различным приемам выделения: гомогенизация, экстракция, фракционное осаждение и т.п.

Любая процедура выделения гиалуронана включает предварительное разрушение органов и тканей, содержащих биополимер, и белково-углеводных комплексов. Разрушение достигается посредством методов измельчения и гомогенизации [9]. После полученный гомогенат подвергают экстракции с использованием водно-органических растворителей. Ковалентно-связанные примеси пептидов удаляют методом ферментативного протеолиза, посредством обработки протеазами (папаином) или химической денатурацией (хлороформ, амилловый спирт с этанолом). Следующий этап — это адсорбция на активированном угле, посредством электродиализа. От примесей мукополисахаридов биополимер очищают

методом осаждения хлоридом цетирпиридиния или посредством ионообменной хроматографии.

Наибольшее распространение, в силу доступности сырья и высокого содержания биополимера, получил метод выделения гиалуроновой кислоты из петушиных гребней. Экстракция производится смесью ацетона с хлороформом (удаление белка), водой, либо водно-спиртовой смесью (пропионовый, трет-бутиловый спирты) с последующей сорбцией на активированном угле, посредством электрофореза или на ионообменной смоле [33].

5.2. Микробный синтез, продуценты гиалуроновой кислоты

Экономически более выгодным является метод микробного синтеза гиалуроновой кислоты на основе бактериальных штаммов-продуцентов. Такой синтез при введении его в масштабы производства, будет иметь меньше издержек, таких как затраты на животное сырье и зависимость от сезонных поставок. И, напротив, производство гиалуронана на основе микробного синтеза позволит масштабировать производство и получить продукт высокой степени очистки, не содержащий примесей, а, следовательно, имеющий низкую аллергенность [5]. С момента открытия способности бактерий к синтезу гиалуроновой кислоты, постоянно ведутся исследования возможности получения искомого полимера биотехнологическим путем, т. е. путем культивирования бактерий-продуцентов на питательных средах определенного состава в строго заданных условиях с последующим выделением целевого продукта. К продуцентам гиалуронана можно отнести капсулообразующие бактерии родов *Streptococcus* и *Pasteurella* [14-16]. К штаммам-продуцентам предъявляется ряд требований:

- отсутствие патогенности и, особенно, гемолитической активности;
- способность к синтезу высокомолекулярной гиалуроновой кислоты;
- большие размеры капсул с высоким содержанием биополимера (капсулы при этом должны легко отделяться, желательно при экстракции);
- отсутствие гиалуронидазной активности, чтобы исключить потери целевого продукта;
- высокая способность к росту, при этом наиболее полное использование субстрата;
- сохранение стабильности физиолого-биохимических свойств.

Исследования в области поиска штамма, способного удовлетворить потребности в биополимере и соответствующего всем

параметрам, привели к *Streptococcus equi* subsp. *equi*. и *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* [21].

Дикие типы стрептококков синтезируют внеклеточные белки, что снижает выход биополимера. Поэтому для получения воспроизводительных гиалуронидаз негативных, не гемолитических штаммов, проводили их модификацию посредством химического и УФ-индуцированного мутагенеза или направленного мутагенеза с последующей селекцией. Генно-инженерные штаммы кишечных палочек, полученные на основе методов экспрессии оперонов, кодирующих синтез гиалуронатсинтетазы стрептококков на матрицу бактерий, в настоящее время не применяются, ввиду низких показателей выхода биополимера. Исключением можно считать генно-инженерный штамм *Bacillus subtilis*, показывающий высокие результаты выхода биополимера, при росте на сложных ферментированных средах [37].

Биотехнология микробного синтеза гиалуроновой кислоты на основе штаммов *Streptococcus zooepidemicus*. Типичный состав синтетической питательной среды для бактерий рода *Streptococcus*, синтезирующих гиалуроновую кислоту, приведен ниже.

Источник углевода и энергии: глюкоза – 1000; аминокислоты: DL-аланин, L-аргинин, L-аспарагиновая кислота, L-цистин, L-цистеин, L-глутаминовая кислота, L-глутамин, L-глицин, L-гистидин, L-изолейцин, L-лейцин, L-лизин, L-метионин, L-фенилаланин, гидрокси-L-пролин, L-серин, L-треонин, L-триптофан, L-тирозин, L-валин по 100; витамины: биотин – 0,2, фолиевая кислота – 0,8, никотинамид – 1, никотинамидадениндинуклеотид – 2,5, пантотенат кальция – 2, пиридоксаль – 1, пиридоксамин гидрохлорид – 1, рибофлавин – 2, тиамин гидрохлорид – 1; нуклеотиды: аденин – 20, гуанин гидрохлорид – 20, урацил – 20; соли органических и неорганических кислот: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 5, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ – 1, K_2HPO_4 – 200, KH_2PO_4 – 1000, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 700, MnSO_4 – 5, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 10, $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 4500, NaHCO_3 – 2500, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 3195, Na_2HPO_4 – 7350.

Культивирование бактерий рода *Streptococcus* с целью получения ГК осуществляется, как правило, в периодических условиях. Питательную среду готовят однократно, растворяя необходимые компоненты среды в воде, после чего среду стерилизуют. Источник углерода стерилизуется отдельно. После засева за ходом ферментации следят по потреблению субстрата, росту концентрации клеток, образованию продукта (ГК), продуктов метаболизма, из-

менению pH среды. Максимальная концентрация ГК составляет приблизительно 5 г/л. Дальнейший рост содержания в среде ГК ведет к многократному возрастанию вязкости КЖ, резкому ухудшению массообменных характеристик процесса ферментации, трудностям при аэрировании и перемешивании. Концентрация ГК при периодической или периодической с подпитками по субстрату ферментации достигает заданного значения за 6 – 26 часа. Как правило, после выхода культуры в стационарную фазу процесс завершают. Клетки микроорганизмов инактивируют прогреванием при 60 – 80 °С. Биомассу отделяют одним из хорошо известных способов – флокуляцией, сепарированием, центрифугированием, фильтрованием. ГК из КЖ осаждают органическими растворителями или катионными ПАВ. Очистку проводят с помощью ультрафильтрационных методов, переосаждения или хроматографией.

Данные методы принципиально не отличаются от методов выделения ГК из животного сырья, описанных ранее. Например, в патенте на метод получения ГК описан следующий способ культивирования штамма-продуцента и выделения ГК. Ферментацию осуществляли в биореакторе на 3 л (коэффициент заполнения ферментера 0,5) на среде состава: 2,0 % глюкозы, 0,5 % ДЭ, 1,5 % пептона, 0,3 % KH_2PO_4 , 0,2 % K_2HPO_4 , 0,011 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0,01 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,002 % Na_2SO_3 , 0,001 % CoCl_2 , 0,001 % MnCl_2 и 0,5 % соевого масла; pH среды 7,0. Стерилизация среды осуществлялась глухим паром 120 °С в течение 15 мин. После охлаждения до комнатной температуры вносился инокулят культуры *S. zooepidemicus* штамм Ferm BP-878 в количестве 0,1 л. Аэробное культивирование (расход воздуха 0,7 л/(л*мин)) длилось 26 часов при постоянном термостатировании (35 °С) и перемешивании среды (300 об/мин). pH среды поддерживался постоянным на уровне 7,0. На 24-ом часу культивирования в асептических условиях вносилась подпитка по субстрату – 100 мл 50 % раствора глюкозы. Процесс завершали по прошествии 26 часов культивирования.

Для выделения ГК проводили следующие процедуры. К бактериальной культуре добавляли 3,2 л дистиллированной воды. После тщательного и длительного перемешивания биомассу отделяли центрифугированием. Супернатант концентрировали до 1,6 л на ультрафильтрационном волоконном аппарате и проводили диализ против дистиллированной воды. В образовавшийся раствор вносили ацетат натрия до конечной концентрации 0,5 % и проводили

осаждение 5 л этилового спирта. Осадок полисахаридов отделяли центрифугированием. Очистку ГК проводили, растворяя полученный осадок в дистиллированной воде (0,5 л) и добавляя 4 % водный раствор бромида цетилпиридиния. Осадок связанной с катионным ПАВ ГК отделяли и растворяли в 40 мл 0,3 М раствора хлорида натрия. Нерастворенную часть осадка отбраковывали. К раствору добавляли 120 мл этанола для осаждения ГК. Осадок отделяли и растворяли в дистиллированной воде, после чего проводили очистку на ионообменной смоле и повторное спиртоосаждение. Выход очищенного гиалуроната натрия с одной ферментации составлял 7,8 г. Содержание белка в препарате составляло менее 0,05 %. Молекулярная масса ГК равнялась 1,005 МДа [1].

Другие способы биотехнологического получения ГК, описанные в патентах, незначительно отличаются составом сред.

Биотехнология микробного синтеза гиалуроновой кислоты на основе штаммов бактерий *Bacillus subtilis*. К способам получения гиалуроновой кислоты, относится метод биосинтеза ГК на основе генно-модифицированного штамма *Bacillus subtilis*, содержащий генетическую конструкцию, включающую промотор, функционально активный в указанной клетке, и кодирующую область, состоящую из нуклеотидной последовательности, кодирующей стрептококковую гиалуронансинтазу (*hasA*); последовательности, кодирующей UDP-глюкозо-6-дегидрогеназу *Bacillus* (*tuaD*) или аналогичный фермент стрептококкового происхождения (*hasB*), и последовательность, кодирующую бактериальную или стрептококковую UDP-глюкозопирофосфорилазу.

Метод включает культивирование клетки-хозяина *Bacillus* в условиях, подходящих для продуцирования гиалуроновой кислоты, при этом клетка-хозяин *Bacillus* содержит конструкцию нуклеиновой кислоты, включающую последовательность, кодирующую гиалуронансинтазу, функционально связанную с промоторной последовательностью, чужеродной в отношении последовательности, кодирующей гиалуронансинтазу; и извлечения гиалуроновой кислоты из среды культивирования [37].

6. Применение гиалуроновой кислоты

Гиалуроновая кислота — вещество с огромным спектром действия, и поистине удивительными свойствами. Спустя несколько лет после открытия гиалуроновой кислоты начинается разработка препаратов на основе глюкозаминоликана для на-

ружного применения в качестве средства, повышающего регенеративные и барьерные функции кожи. Однако, как известно, субстанция, изготовленная из животного сырья, требует тщательной очистки от примесей, что накладывает дополнительные издержки производства и отражается на цене конечного продукта [10]. Действительно высокая себестоимость гиалуроновой кислоты долгое время препятствовала расширению спектра применения биополимера, однако постепенное увеличение знаний о свойствах полимера и внедрение биотехнологических методов на основе микробного синтеза, позволило существенно снизить себестоимость субстанции, подталкивает развитие разнообразных приложений, в которых находит применение гиалуроновой кислоты в областях медицины, пищевой, фармацевтической, косметической промышленности. Ведутся исследования по созданию лекарственных препаратов и БАД на основе гиалуроната с противовоспалительным, иммуномодулирующим и пролонгирующим действием, которые, возможно, в будущем можно будет применять в качестве основы терапии заболеваний в онкологии, оториноларингологии, хирургии, эндокринологии и многих других сферах человеческой деятельности [4].

6.1. Гиалуроновая кислота в медицине

Гиалуроновая кислота обладает антимикробным и регенерирующим действиями, поэтому на основе ее разработаны препараты для эффективной терапии поражений кожи. Созданные изначально как препараты против ожогов, данная группа активно применяется при терапии трофических нарушений кожного эпителия посттромботического генеза. Доказано, что низкомолекулярная гиалуроновая кислота (менее 10 кДа) оказывает ангиогенное действие, тем самым снижая образование спаек и разрастание соединительной ткани, так же улучшает микроциркуляцию и снижает эффекты воспаления [8].

Гиалуронат имеет свойства повышать активность интерферона, тем самым проявляя выраженное противовирусное действие. Была доказана высокая активность препаратов на основе гиалуроновой кислоты в отношении вируса герпеса и некоторых других. По данным некоторых источников высокомолекулярная гиалуроновая кислота является пролонгатором действия других БАВ, растворенных в ней. Лекарственные вещества, за счет высокой вязкости гиалуроната, выделяются в ткани в течение длительного времени. Создается так называемое депо, из которого БАВ постепенно диффундирует в

среду организма. Это позволяет увеличить терапевтическую широту, потенцировать в некоторых случаях фармакологический эффект, снизить побочные эффекты, а также расширить возможности применения других лекарственных веществ (стероидных препаратов, антибиотиков, пептидов, НПВС и т.д.) в комбинации с гиалуроновой кислотой. Широко применение гиалуроната в хирургии:

1. Офтальмологическая хирургия - гиалуронат натрия используется в качестве репаративного средства при оперативных вмешательствах на эндотелиальном слое роговицы (удаление катаракты).

2. Хирургическая травматология - при хирургических операциях с обширным сечением хрящевой ткани и осложненных артритах используется в качестве регенерирующего, смазывающего, противовоспалительного и анальгезирующего средства [12].

6.2. Гиалуроновая кислота в косметологии

Применение гиалуроната и его солей в косметологии основывается на способности гиалуронатсодержащих препаратов оказывать местное противовоспалительное, ранозаживляющее и иммуномодулирующее действие. Способность задерживать в межклеточном пространстве воду является основой механизма коррекции возрастных деформаций кожи. На данный момент в косметологической практике стали весьма популярны инъекции 1-3% водного раствора гиалуроновой кислоты для внутри- или подкожного введения. Введение гиалуроновой кислоты в эпителий в виде водного геля повышает эластичность и упругость тканей, тем самым придавая коже прежние качества и красоту [3]. Однако широчайшее применение высокомолекулярный гиалуронат получил при изготовлении различных комбинированных кремов и гелей для наружного применения. Данный вид продукции имеет ту же направленность, что и инъекции - восстановить реологические свойства кожи, тем самым предотвратить образование морщин, прыщей и т.д. [10].

Гиалуроновая кислота обладает свойствами, которые делают ее крайне подходящей для использования в качестве дермального филлера: она способна связывать большое количество воды, присутствует в коже в естественных условиях и не склонна вызывать нежелательные реакции. Филлеры (Fill — от англ. — наполнять) — это инъекционные кожные наполнители, которые используются в косметологии для уменьшения глубины морщин, носогубных складок и складок в уголках рта [11]. Фил-

леры также используются для придания дополнительного объема лицу в области скул, щек и губ. В настоящее время широкое распространение получила группа ГК- филлеров семейства Surgiderm и Juvederm Ultra A. Surgiderm и Juvederm Ultra представляют собой однородные монофазные гели гиалуроновой кислоты неживотного происхождения. Они являются одними из наиболее пластичных материалов для инъекционной контурной пластики, что определяет не только легкость их введения, но и равномерное распределение в тканях, позволяет полностью исключить контурирование материала [3].

Современная серия препаратов на основе гиалуроновой кислоты PRINCESS®. «PRINCESS® Filler» представляет собой стерильный, биodeградируемый, вязкоэластичный, прозрачный, бесцветный, изотонический и гомогенизированный гелевый имплантат для интрадермальных инъекций. Содержащаяся в «PRINCESS® Filler» гиалуроновая кислота с поперечно-сшитой структурой продуцируется бактериями *Streptococcus equi*, представлена в виде раствора с концентрацией 23 мг/мл в физиологическом буфере [6].

Заключение

Гиалуроновая кислота — продукт животного происхождения, имеющий поистине удивительные свойства и высочайший спектр применения как сейчас, так и в перспективе дальнейшего ее использования. Поэтому совсем не удивительно, что ее свойства изучаются во всем мире.

В настоящее время исследуются процессы и механизмы действия гиалуроновой кислоты на ткани организма. Выдвигаются гипотезы относительно роли гиалуроната и родственных глюкозаминогликанов в процессах пролиферации, дифференциации, миграции животных клеток в процессах иммунного ответа и эмбриогенеза, а также делаются попытки по установлению связи между молекулярной массой, степенью очистки и эффективностью препаратов.

Физико-химический способ, в виду своей экономической нерентабельности, постепенно уступает место биотехнологическому методу синтеза биополимера. Были проведены поиски продуцентов, соответствующих всем параметрам, а также различного рода испытания на предмет изучения метаболизма гиалуроновых кислот. Результатом исследования служило выявление прямая связи между способностью синтеза гиалуроновых кислот и наличием специфических ферментов гиалуронатсинтеаз.

В последние 20 лет оперон, кодирующий синтез гиалуронатсинтетаз, был выделен в чистом виде и неоднократно экспрессировался различным видам микроорганизмов с целью получения генно-модифицированных штаммов-продуцентов гиалуроновых кислот. Однако результата не могли добиться очень долгое время. Генно-модифицированные штаммы производили неактивную форму фермента, следовательно, способностью к продукции гиалуроновых кислот не обладали. Но недавно проведенные исследования по созданию генно-модифицированного штамма на основе бактерий *Bacillus subtilis* показали хорошие результаты. Штаммы бактерий активно синтезировали гиалуронат высокой молекулярной массы, лишенной пептидных включений и связей с родственными мукополисахаридами.

Однако поиск штаммов-продуцентов сейчас продолжается. Проверяются возможности синтеза гиалуроната бактериями рода *Streptomyces*, и ведется разработка биотехнологии на их основе; кроме того, изучаются пути использования и внедрения гиалуроната во все сферы жизнедеятельности общества.

Список литературы

1. Белодед А. В. Микробиологический синтез и деградация гиалуроновой кислоты бактериями р. *Streptococcus*: Автореф. дис. канд. биол. наук: МГУПБ — М., 2008. — 23 с.
2. Бычков С.М., Колесников М.Ф. Способ получения гиалуроновой кислоты // А. с. № 219752 СССР, 1968. — Бюл. № 19. — С. 90.
3. Забненкова О.В. Внутридермальные филлеры на основе гиалуроновой кислоты. Показания к применению, возможные комбинации // Пластическая хирургия и косметология: научно-практический журнал, 2010. - № 1 - С. 101-115. URL: <http://www.pscj.ru/upload/iblock/569/11.pdf> (дата обращения: 24.11.2016)
4. Костина Г., Радаева И. Использование гиалуроновой кислоты в медицине и косметологии // Косметика и медицина, 1999. — № 2-3. — С. 53-57.
5. Лупына Т. П., Волошина Е. С. Микробиологический способ получения гиалуроновой кислоты и перспективы её использования в фармацевтике. Национальный университет пищевых технологий, Украина. — 2014. — С. 4.
6. Препараты Princess filler и Princess volume в коррекции возрастных изменений лица и атрофических рубцов // Инъекционные методы в косметологии, 2013. — №2 /<http://corneal.ru/events/publications/43/> (дата обращения: 24.11.2016)
7. Португалова В.В., Ерзякин К.Л. Гиалуроновая кислота и ее роль в жизнедеятельности организмов // Успехи соврем. биол., 1986. — Т. 101, № 3. — С. 344-358.
8. Радаева И.Ф., Костина Г.А., Змиевский А.В. Гиалуроновая кислота: биологическая роль, строение, синтез, выделение, очистка и применение // Прикл. биохим. микробиол., 1997. — Т. 33, №2. — С. 133-137.
9. Ряшенцев В.Ю., Никольский С.Ф., Вайнермен Е.С. и др. Способ получения гиалуроновой кислоты // Патент № 2017751 РФ, 1994. — Бюл. № 15. — С. 75-76.
10. Толстых П.И., Стекольников Л.И., Рыльцев В.В. и др. Лекарственные препараты животного происхождения для наружного применения // Хим.-фарм. журн., 1991. — Т. 25, № 4. — С. 83-87.
11. Филлеры: что это такое [Электронный ресурс] // Стоматология & косметология <http://24stoma.ru/filleri.html> (дата обращения: 24.11.2016 г.)
12. Abatangelo G., Martinelli M., Vecchia P. Healing of hyaluronic acid-enriched wounds: histological observations // J. Surg. Res., 1983. — V. 35, № 5. — P. 410-416.
13. Ahmet Tezel & Clenn H. Fredrickon Дermalные филлеры на основе гиалуроновой кислоты: взгляд с позиции науки [Калифорнийский университет, Санта-Барбара, США] [Электронный ресурс] // SKIN AESTHETIC <http://estetika.uz/upload/files/da25b536d87b2edf853c5bc5d10f2968.pdf> (дата обращения: 24.11.2016)
14. Carter G.R. Pasteurellosis: *Pasteurella multocida* and *Pasteurella hemolytica*. // Adv. Vet. Sci., 1967. — V. 11. — P. 321-379.
15. DeAngelis P.L., Jing W., Graves M.V., Burbank D.E., van Etten J.L. Hyaluronan synthase of *Chlorella virus PBCV-1* // Science, 1997. — V. 278. — P. 1800-1803.
16. DeAngelis P.L., Papaconstantinou J., Weigel P.H. Isolation of a *Streptococcus pyogenes* gene locus that directs hyaluronan biosynthesis in acapsular mutants and in heterologous bacteria // J. Biol. Chem., 1993. — V. 268. — P. 14568-14571.
17. Frost G.I., Csoka T., Stern R. The hyaluronidases: a chemical, biological and clinical overview // Trends Glycosci. Glycotech., 1996. — V. 8. — P. 419-434.
18. Graves M.V., Burbank D.E., Roth R., Heuser J., DeAngelis P.L., van Etten J.L. Hyaluronan synthesis in virus PBCV-1-infected *Chlorella*-like green algae // Virology, 1999. — V. 257. — P. 15-23.
19. Karlstam B., Vincent J., Johansson B., Brynne C. A simple purification method of squeezed krill for obtaining high levels of hydrolytic enzymes // Prep. Biochem., 1991. — V. 21. — P. 237-256.
20. Kendall F.E., Heidelberger M., Dawson M.H. A serologically inactive polysaccharide elaborated by mucoid strains of group A hemolytic *Streptococcus*. // J. Biol. Chem., 1937. — V. 118. — P. 61-69.
21. Kim J.H., Yoo S.J., Oh D.K., Kweon Y.G. et al. Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. // Enzyme Microb. Technol., 1996. — V. 19. — P. 440-445.
22. Lansing M., Lellig S., Mausolf A., Martini I., Crescenzi F., Oregon M., Prehm P. Hyaluronate synthase: cloning and sequencing of the gene from *Streptococcus* sp. // Biochem. J., 1993. — V. 289. — P. 179-184.
23. Linker A., Meyer K. Production of Unsaturated Uronides by Bacterial Hyaluronidases // Nature, 1954. — V. 174. — P. 1192-1194.
24. Matsubara C., Kajiwara M., Akasaka H., Haze S. Carbon-13 nuclear magnetic resonance studies on the biosynthesis of hyaluronic acid // Chem. Pharm. Bull., 1991. — V. 39. — P. 2446-2448.
25. Meyer K. Highly viscous sodium hyaluronate // J. Biol. Chem., 1948. — V. 176. — № 2. — P. 993-997.
26. Meyer K. Hyaluronidases // The Enzymes. - V. 5. / ed. Boyer P.D. - New York: Academic Press, 1971. - P. 307-320.
27. Meyer K., Palmer J. The polysaccharide of the vitreous humor // J. Biol. Chem., 1934. — V. 107. — P. 629-634.
28. Mortimer E.A., Vastine E.L. Production of Capsular Polysaccharide (Hyaluronic Acid) by L Colonies of Group A *Streptococci*. // J. Bacteriol., 1967. — V. 94, № 1. — P. 268-271.
29. Prehm P. Hyaluronan. // Biopolymers: biology, chemistry, biotechnology, applications. -V. 5: Polysaccharides I. Polysaccharides from prokaryotes. / eds. Vandamme E.J., DeBaets S., Steinbuechel A. - Weinheim: Wiley-VCH, 2000. — P. 379-404.
30. Prehm P. Synthesis of hyaluronate in differentiated teratocarcinoma cells: characterization of the synthase. // Biochem. J., 1983. — V. 211. — P. 181-189.

-
31. Roseman S., Moses F.E., Ludowieg J., Dorfman A. The biosynthesis of hyaluronic acid by group A *Streptococcus*. Utilization of l-C14-glucose // *J. Biol. Chem.*, 1953. — V. 203. — P.213-225.
32. Scott J.E., Cummings C, Brass A., Chen Y. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. Hyaluronan is a very efficient network-forming polymer // *Biochem. J.*, 1991. — V.274. — P. 699-705.
33. Shimada E., Matsumura G.J. Molecular Weight of Hyaluronic Acid from Rabbit Skin // *J. Biochem.*, 1977. — V. 81. — № 1. — P. 79-91.
34. Stern R., Asari A.A., Sugahara K.N. Hyaluronan fragments: an information-rich system // *Eur. J. Cell Biol.*, 2006. — V. 85. — P. 699-715.
35. Sugahara K., Schwartz N.B., Dorfman A. Biosynthesis of Hyaluronic Acid by *Streptococcus* // *J. Biol. Chem.*, 1979. — V. 254, № 14. — P. 6252-6261.
36. Weigel P.H., Hascall V.C., Tammi M. Hyaluronan Synthases // *J. Biol. Chem.*, 1997. — V. 272, № 22. — P. 13997-14000.
37. Widner B., Behr R., Von Dollen S., Tang M., Ней Т., Sloma A., Sternberg D., DeAngelis P.L., Weigel P.H., Brown S. Hyaluronic Acid Production in *Bacillus subtilis* // *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005. — V. 71, № 7. — P. 3747-3752.
-