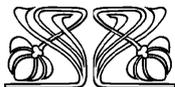
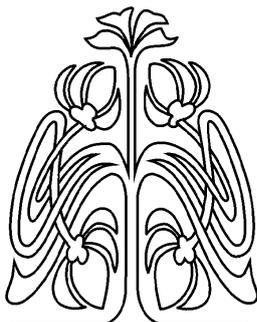




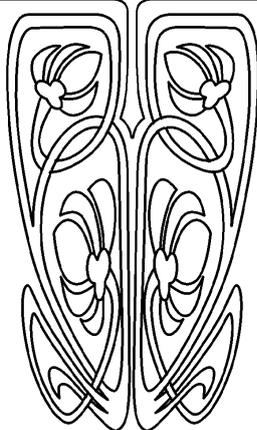
ОПТИКА И СПЕКТРОСКОПИЯ. ЛАЗЕРНАЯ ФИЗИКА

Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. 2024. Т. 24, вып. 2. С. 126–137
Izvestiya of Saratov University. Physics, 2024, vol. 24, iss. 2. P. 126–137
<https://fizika.sgu.ru> <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2024-24-2-126-137>, EDN: DRKPRT

Научная статья
УДК 539.194:539.196.3:544.174.3



НАУЧНЫЙ
ОТДЕЛ



Спектральные проявления межмолекулярного взаимодействия гиалуроновой кислоты с азотсодержащими аминокислотами

И. Л. Пластун¹✉, К. А. Брыксин¹, О. А. Майорова², Л. М. Бабков²

¹Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю. А., Россия, 410054, г. Саратов, ул. Политехническая, д. 77

²Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83

Пластун Инна Львовна, доктор физико-математических наук, профессор кафедры информационной безопасности автоматизированных систем, inna_pls@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1246-8896>, AuthorID: 113628

Брыксин Кирилл Александрович, аспирант кафедры информационной безопасности автоматизированных систем, kir.bryksin@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0008-3743-188X>

Майорова Оксана Александровна, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории биомедицинской фотоакустики Научного медицинского центра, oksanaamayorova@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-6440-3947>, AuthorID: 1001358

Бабков Лев Михайлович, доктор физико-математических наук, профессор, профессор кафедры общей, теоретической и компьютерной физики, lbabkov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-3403-3786>, AuthorID: 44780

Аннотация. Методами экспериментальной и теоретической ИК спектроскопии исследованы проявления межмолекулярного взаимодействия, основанного на водородном связывании, в ИК спектрах гиалуроновой кислоты и в мультикомпонентных смесях гиалуроновой кислоты с азотсодержащими аминокислотами, входящими в состав муцина слизистой оболочки мочевого пузыря и белковых микрогелей-носителей. Проведено сравнение измеренного и рассчитанных в гармоническом приближении ИК спектров гиалуроновой кислоты. На основе расчёта структуры молекулярных комплексов и соответствующих им ИК спектров с последующим анализом параметров образующихся водородных связей были даны оценки силы комплексообразования гиалуроновой кислоты с аминокислотами, входящими в состав белковых микрогелей, используемых в таргетной терапии, и в состав белков клеток-мишеней.

Ключевые слова: гиалуроновая кислота, ИК спектр, экспериментальные измерения, молекулярное моделирование, аминокислоты, теория функционала плотности, водородные связи

Благодарности: Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-75-10042, <https://rscf.ru/project/21-75-10042/>).

Для цитирования: Пластун И. Л., Брыксин К. А., Майорова О. А., Бабков Л. М. Спектральные проявления межмолекулярного взаимодействия гиалуроновой кислоты с азотсодержащими аминокислотами // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. 2024. Т. 24, вып. 2. С. 126–137. <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2024-24-2-126-137>, EDN: DRKPRT
Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)



Article

Spectral manifestations of hyaluronic acid intermolecular interaction with nitrogen-containing amino acids

I. L. Plastun¹✉, K. A. Bryksin¹, O. A. Mayorova², L. M. Babkov²¹Yuri Gagarin State Technical University of Saratov, 77 Politechnicheskaya St., Saratov 410054, Russia²Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, RussiaInna L. Plastun, inna_pls@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1246-8896>, AuthorID: 113628Kirill A. Bryksin, kir.bryksin@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0008-3743-188X>Oksana A. Mayorova, oksanaamayorova@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-6440-3947>, AuthorID: 1001358Lev M. Babkov, lmbabkov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-3403-3786>, AuthorID: 44780

Abstract. Background and Objectives: Manifestations of intermolecular interaction based on hydrogen bonding in hyaluronic acid IR spectra and in multicomponent mixtures of hyaluronic acid with nitrogen-containing amino acids, which are part of mucin of the mucous membrane of the bladder and protein carrier microgels, have been studied using experimental and theoretical IR spectroscopy. **Materials and Methods:** Comparison of measured and calculated hyaluronic acid IR spectra in harmonic approximation is performed. Calculations of molecular complex structure and their corresponding IR spectra were carried out, followed by an analysis of the parameters of the hydrogen bonds formed. **Results:** Estimates of hyaluronic acid complexation with amino acids strength, which are part of protein microgels used in targeted therapy, and in target cells proteins were given. **Conclusion:** It has been found that the presence of an additional protein structure significantly increases the hyaluronic acid interaction with mucous membrane mucin protein due to intermolecular complexation based on polar basic amino acids.

Keywords: hyaluronic acid, IR spectrum, experimental measurements, molecular modeling, amino acids, density functional theory, hydrogen bonds

Acknowledgements: The research was supported by the Russian Science Foundation (project No. 21-75-10042, <https://rscf.ru/project/21-75-10042/>).

For citation: Plastun I. L., Bryksin K. A., Mayorova O. A., Babkov L. M. Spectral manifestations of hyaluronic acid intermolecular interaction with nitrogen-containing amino acids. *Izvestiya of Saratov University. Physics*, 2024, vol. 24, iss. 2, pp. 126–137 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2024-24-2-126-137>, EDN: DRKPRT

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

Введение

В настоящее время существенно возрос интерес к исследованиям структуры и физико-химических свойств гиалуроновой кислоты [1], что находит своё отражение в многочисленных публикациях (см., например, обзоры [2–4]). Это объясняется тем, что гиалуроновая кислота обладает уникальными биологическими, физическими и механическими свойствами [5], находящими широкое применение в современной биологии и медицине. Как известно, гиалуроновая кислота представляет собой линейный полисахарид, состоящий из повторяющихся звеньев D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина,

связанных между собой гликозидными связями β (1, 4) и β (1, 3) соответственно (рис. 1) [1].

Простой по строению полисахарид экспрессируется во внеклеточном матриксе, взаимодействует с различными рецепторами на поверхности внутри клеток [6]. Благодаря своему химическому строению, в частности, содержанию большого числа карбоксильных групп (-COOH), гиалуроновая кислота хорошо диссоциирует, усиливая свою полианионную природу, что, в свою очередь, приводит к гидратированию молекулы, в результате чего образуется ее гидратированная форма, значительно большая по объему [4]. Это физико-химическое свойство гиалуроновой

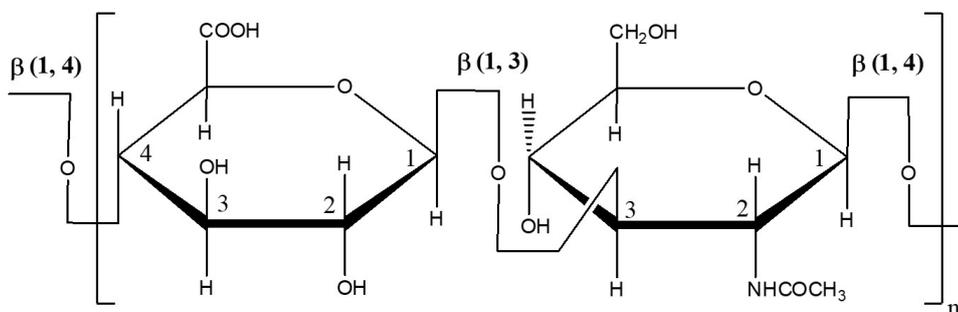


Рис. 1. Фрагмент гиалуроновой кислоты

Fig. 1. Hyaluronic acid fragment



кислоты лежит в основе физиологических функций, таких как заживление ран и гидратация клеток. Образование гидратированной формы гиалуроновой кислоты определяет ее вязкоупругие свойства за счет образования большого числа водородных связей с последующим формированием трехмерных матриц [2, 4, 7]. Увеличение концентрации гиалуроновой кислоты закономерно приводит к увеличению вязкости раствора. Уникальное свойство гелеобразования гиалуроновой кислоты нашло широкое применение в медицине и косметологии [2, 3, 8].

Гиалуроновая кислота является одним из основных компонентов гликозаминогликанового (ГАГ) слоя на поверхности уротелия мочевого пузыря. Нарушение ГАГ слоя и подавление пролиферации уротелиальных клеток приводит к образованию хронического или интерстициального цистита (ИЦ) [9]. Одним из общепринятых протоколов терапии ИЦ является внутривезикулярная инстилляция гиалуроновой кислоты с помощью катетера в полость мочевого пузыря [10]. Благодаря своей способности удерживать большое количество влаги гиалуроновая кислота способна встраиваться в поврежденные участки муцинового слоя мочевого пузыря, проникая в более глубокие слизистые слои, постепенно восстанавливая ГАГ слой. Механизм мукоадсорбции гиалуроновой кислоты на слизистой оболочке мочевого пузыря основан на взаимодействии гиалуроновой кислоты и белковой молекулы муцина с образованием межмолекулярных водородных связей [11].

Представляет интерес выявление спектральных проявлений механизмов межмолекулярного взаимодействия гиалуроновой кислоты с составляющими белковую структуру муцина аминокислотами [12]. Предполагается, что водородное связывание происходит за счет взаимодействия -COOH-групп гиалуроновой кислоты и свободных -NH₂ и -OH групп аминокислотных остатков белковых молекул. Необходимо отметить, что существуют экспериментально подтвержденные факты повышения степени эффективности действия гиалуроновой кислоты в смеси с белковым микрогелем, основанным на изоляте сывороточного белка [13]. Данный экспериментальный факт свидетельствует о том, что наличие дополнительной белковой структуры может усиливать водородное связывание между гиалуроновой кислотой и муцином слизистой оболочки.

С целью изучения спектральных проявлений взаимодействия аминокислот из состава муци-

на с гиалуроновой кислотой и влияния на это взаимодействие белкового микрогеля в качестве носителя был измерен ИК спектр гиалуроновой кислоты и на основе рассчитанных ИК спектров мономера и димера гиалуроновой кислоты дана его интерпретация. Кроме того, были рассчитаны молекулярные структуры двух- и трёхкомпонентных смесей аминокислот с гиалуроновой кислотой и соответствующие им ИК спектры с последующим анализом параметров образующихся водородных связей. На основе этих данных были сделаны выводы о степени комплексообразования и влиянии микрогеля – носителя на взаимодействие гиалуроновой кислоты с муцином.

1. Эксперимент и молекулярное моделирование

Измерения ИК спектра гиалуроновой кислоты проведены в лаборатории биомедицинской фотоакустики Научного медицинского центра СГУ имени Н. Г. Чернышевского на ИК Фурье спектрометре ФТ-801 Simex (ООО НПФ «СИ-МЕКС», Россия). Использовалась универсальная приставка для подавления полного внутреннего отражения. Каждый спектр записывался как среднее по 26 сканов с разрешением 4 см⁻¹ в области 550–4000 см⁻¹. Для анализа спектров использовалось программное обеспечение «Программа ZaiR 3.5 для получения, обработки и поиска инфракрасных спектров».

Моделирование структуры и расчёт ИК спектров молекул и их комплексов осуществлялись на основе метода теории функционала плотности (ТФП) [14] с использованием функционала B3LYP и базисного набора 6-31G(d) [15]. Процедуры молекулярного моделирования, включая оптимизацию молекулярных структур и расчёт ИК спектров, были проведены на основе программного комплекса Gaussian [16], широко применяемого для анализа межмолекулярного взаимодействия в различных задачах квантовой физики и химии. Для визуализации молекулярных структур и ИК спектров были использованы программный редактор Avogadro [17] и авторская программа визуализации ИК спектров [18], строящая ИК спектр по числовым значениям, полученным в Gaussian [16].

Моделирование ИК спектров проводилось на основе гауссовского типа контура с соотношением полуширины контура к полувысоте, равным 4. Эти параметры являются задаваемыми по умолчанию в программе Gaussian [16].

Были рассчитаны структуры и ИК спектры мономера и димера гиалуроновой кислоты,



а также структуры и ИК спектры двух- и трёхкомпонентных смесей азотсодержащих аминокислот и гиалуроновой кислоты. Дан анализ рассчитанных параметров водородных связей в образующихся молекулярных комплексах.

С целью минимизации расхождения измеренных и рассчитанных в гармоническом приближении частот проведено их масштабирование, широко используемое в мировой практике в подобных задачах. Масштабирующие множители составили следующие значения: 0.94 для диапазона частот 0–1000 см^{-1} , 0.95 для диапазона 1000–2500 см^{-1} и 0.96 для диапазона частот 2500–4000 см^{-1} .

2. Обсуждение результатов

Рассчитанные структуры мономера и димера гиалуроновой кислоты представлены на рис. 2. Цифрами показаны молекулярные группы, колебания которых находят свое отражение в ИК спектре. Цифрой 1 отмечены валентные колебания С-О группы, цифра 2 отмечает С-О и С-С связи группы кольца, цифра 3 обозначает валентную связь С=О карбоксильной группы, цифрами 4 и 5 отмечены валентные колебания С-Н группы и аминогруппы N-H соответственно, цифра 6 обозначает валентные колебания О-Н группы, атом водорода которой обобществляется в димере гиалуроновой кислоты с образованием межмолекулярной водородной связи.

На рис. 3 представлены измеренный и рассчитанные ИК спектры гиалуроновой кислоты (ГК). Цифрой I отмечен измеренный спектр, цифрой II –

ИК спектр мономера гиалуроновой кислоты, цифрой III – ИК спектр димера гиалуроновой кислоты. На всех спектрах хорошо видны пики полос, соответствующих валентным колебаниям связи С-О на частоте 1200 см^{-1} (цифра 1), валентным колебаниям связей С-О и С-С в кольце (цифра 2), валентным колебаниям связи С=О карбоксильной группы на частоте 1600 см^{-1} (цифра 3), валентным колебаниям связей С-Н (цифра 4), валентным колебаниям связей N-H (цифра 5) и валентным колебаниям связей О-Н (цифра 6), одна из которых принадлежит карбоксильной группе и участвует в образовании димерного кольца.

Наличие широкой и аномально интенсивной полосы в области 3000–3650 см^{-1} свидетельствует об образовании водородной связи.

Сравнение частот колебаний экспериментального и рассчитанных спектров мономера и димера приведены в табл. 1. Эти частоты соответствуют пикам полос, являющихся спектрально-структурными признаками гиалуроновой кислоты в ИК спектре.

Расчёты ИК спектров мономера и димера гиалуроновой кислоты демонстрируют уменьшение интенсивности валентных колебаний связей С=О, проявляющихся в диапазоне 1600–1640 см^{-1} (см. рис. 3, б цифра 3) при образовании димера. Валентные колебания связи группы О-Н, проявляющиеся в диапазоне 3600–3700 см^{-1} в мономере, при обобществлении протона карбоксильной группы сдвигаются по частоте на $\sim 240 \text{ см}^{-1}$ и аномально возрастают по интенсивности.

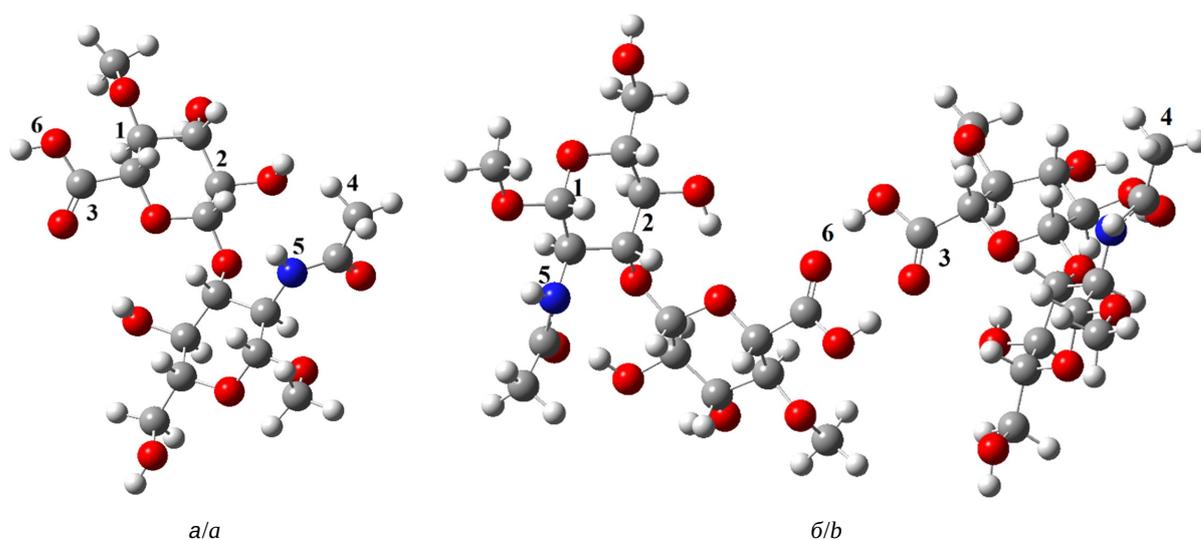


Рис. 2. Рассчитанные структуры мономера (а) и димера (б) гиалуроновой кислоты (цвет онлайн)

Fig. 2. Calculated structures of monomer (a) and dimer (b) of hyaluronic acid (color online)

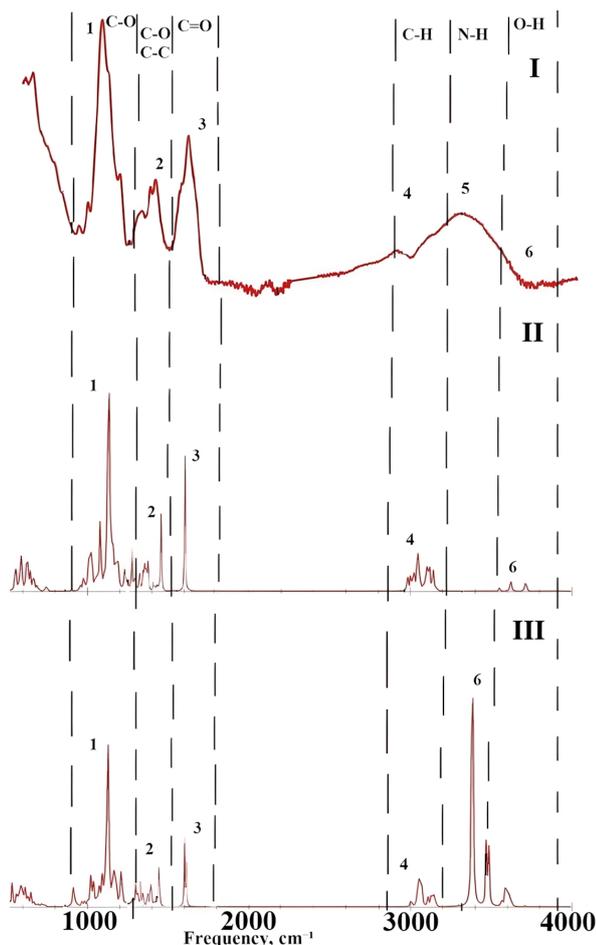


Рис. 3. Измеренный (I) и рассчитанные (II) ИК спектры мономера и димера (III) гиалуроновой кислоты (цвет онлайн)
 Fig. 3. Measured (I) and calculated (II) IR spectra of the monomer and dimer (III) of hyaluronic acid (color online)

Валентные колебания связей N-H, проявляющиеся в диапазоне 3300–3450 см⁻¹, оказываются в зоне проявления водородной связи и на экспериментально измеренном спектре не видны.

Параметры водородной связи, образовавшейся в димере гиалуроновой кислоты, приведены в табл. 2.

Рассчитанные значения энергии с целью верификации результатов сверялись со значениями, полученными по эмпирической формуле Иогансена [19, 20]:

$$-\Delta H = 0.3 \cdot \sqrt{\Delta\nu - 40}, \quad (1)$$

где $-\Delta H$ – приращение энтальпии, являющееся термодинамической мерой энергии связи, $\Delta\nu$ – величина частотного сдвига валентных колебаний водородных связей (ΔH , ккал/моль, $\Delta\nu$, см⁻¹).

В табл. 2, 3 приводятся значения энергии связей для двойных комплексов – как полученные по формуле (1), так и рассчитанные в Gaussian [16] (в скобках). Видно, что различия в значениях энергии незначительны, порядка 10%, и для проводимой оценки степени комплексообразования неприципиальны.

В оценке силы образовавшихся водородных связей играют роль три параметра: энергия связи, длина связи и длина водородного мостика, а также сдвиг частоты колебаний в ИК спектре. В соответствии с классификацией, приведённой в [21], сильным водородным связям соответствует энергия 14.34–28.65 ккал/моль, длина связи 1.2–1.5 Å и длина водородного мостика 2.2–2.5 Å, средние связи характеризуются энергией 3.82–14.43 ккал/моль, длиной связи 1.5–2.2 Å и длиной водородного мостика – 2.5–3.2 Å, слабым связям соответствует энергия менее 2.87 ккал/моль, длина связи 2.2–3.2 Å и длина водородного мостика – 3.2–4.0 Å.

На основании результатов построения структурно-динамических моделей мономера и димера

Таблица 1 / Table 1

Измеренные и рассчитанные частоты валентных колебаний связей гиалуроновой кислоты
 Measured and calculated bond stretching oscillation frequencies of hyaluronic acid

Номер колебания / Oscillation number	Тип связи / Bond type	Частоты колебаний в ИК спектрах гиалуроновой кислоты / Oscillation frequencies in hyaluronic acid IR spectra		
		Экспериментальный спектр / Experimental spectrum, $\nu_{\text{э}}$, см ⁻¹	Рассчитанный спектр мономера / Calculated monomer spectrum, $\nu_{\text{м}}$, см ⁻¹	Рассчитанный спектр димера / Calculated dimer spectrum, $\nu_{\text{д}}$, см ⁻¹
1	C-O	1125	1127	1129
2	C-C	1400	1410	1409
3	C=O	1600	1602	1605
4	C-H	2920	3065	3075
5	N-H	~3400	3400	3400
6	O-H	2960–3620	3621	3383



Таблица 2 / Table 2

Параметры водородной связи в димере гиалуроновой кислоты
Hydrogen bond parameters of hyaluronic acid dimer

Фрагмент димерного кольца / Dimer ring fragment	Длина связи / Bond length H...O, Å	Длина водородного мостика / Hydrogen bridge length O-H...O, Å	Частота / Frequency ν , cm^{-1}	Частотный сдвиг / Frequency shift $\Delta\nu$, cm^{-1}	Энергия связи / Bond energy $-\Delta H$, kkal/mol	Интенсивность / Intensity I_{IR} , km/mol
О-Н...О	1.72	2.75	3383	238	4.2 (4.0)	3259

Таблица 3 / Table 3

Рассчитанные параметры водородных связей комплексов гиалуроновой кислоты (ГК) и аминокислот
Calculated hydrogen bonds parameters of hyaluronic acid and amino acids complex

Тип комплекса / Complex type	Тип связи / Bond type	Длина Н-связи / H-bond length R, Å	Длина водородного мостика / Hydrogen bridge length R _b , Å	Частота / Frequency ν , cm^{-1}	Частотный сдвиг / Frequency shift $\Delta\nu$, cm^{-1}	Энергия связи / Bond energy $-\Delta H$, kkal/mol	Интенсивность / Intensity I_{IR} , km/mol
ГК-серин (Ser)	О-Н...О	1.69	2.67	3535	211	3.9 (3.6)	1283
ГК-тирозин (Tyr)	О-Н...О	1.63	2.61	3507	183	3.6 (3.3)	2170
ГК-триптофан (Trypt)	Н-Н...О	1.9	2.89	3565	241	4.2 (3.7)	727
ГК-лизин (Lys)	Н-Н...О	1.54	2.5	3127	197	3.8 (3.2)	1318
ГК-аргинин (Arg)	Н-Н...О	1.7	2.67	3220	104	2.4 (2.9)	150

гиалуроновой кислоты можно сделать следующие выводы: при образовании димера частота валентного колебания связи ОН (3621 cm^{-1}) уменьшилась до 3383 cm^{-1} , частотный сдвиг составляет 238 cm^{-1} . Энергия связи и интенсивность спектрального пика равны 4.2 ккал/моль и 3259 км/моль соответственно. Длина Н-связи равна 1.72 Å , и длина водородного мостика – 2.75 Å , что соответствует энергии водородной связи средней силы в соответствии с классификацией водородных связей, приведённой в [21]. Указанные параметры свидетельствуют об устойчивом комплексобразовании на основе водородного связывания.

Рассмотрим межмолекулярное взаимодействие гиалуроновой кислоты с белковыми структурами. Наш анализ будет строиться на основе моделирования межмолекулярного взаимодействия гиалуроновой кислоты с аминокислотами из состава белков муцина и изолята сывороточного белка. В качестве рассматриваемых объектов были выбраны протеиногенные полярные незаряженные аминокислоты, содержащиеся в составе боковых цепей (радикала) функциональные группы ОН- и NH₂- (гидроксильные и аминогруппы), что обуславливает их высокую способность к комплексобразова-

нию на основе водородных связей: аргинин, лизин и серин.

Предполагается, что взаимодействие протекает с образованием межмолекулярных водородных связей между -СООН группой гиалуроновой кислоты и функциональными группами (ОН-, NH₂-) аминокислотного остатка. В качестве сравнения были также проведены расчеты для ароматических аминокислот тирозина и триптофана, имеющие более жесткую структуру за счет наличия ароматических колец и, как следствие, отсутствия пространственной трансформации.

Структура рассматриваемых аминокислот показана на рис. 4. Красным цветом выделены радикалы, через которые может происходить межмолекулярное комплексобразование.

Ароматические аминокислоты тирозин и триптофан относятся к умеренно полярным молекулам, содержащим резонансно стабилизированные кольцевые структуры – фенольное кольцо у тирозина и индольное кольцо у триптофана. Серин относится к нейтральным аминокислотам, имеющим в боковой цепи гидроксильную группу. Лизин и аргинин относятся к основным аминокислотам, в которых функциональные группы в боковых цепях полностью протонированы при нейтральных значениях рН. Эти аминокислоты имеют наивысшие показатели

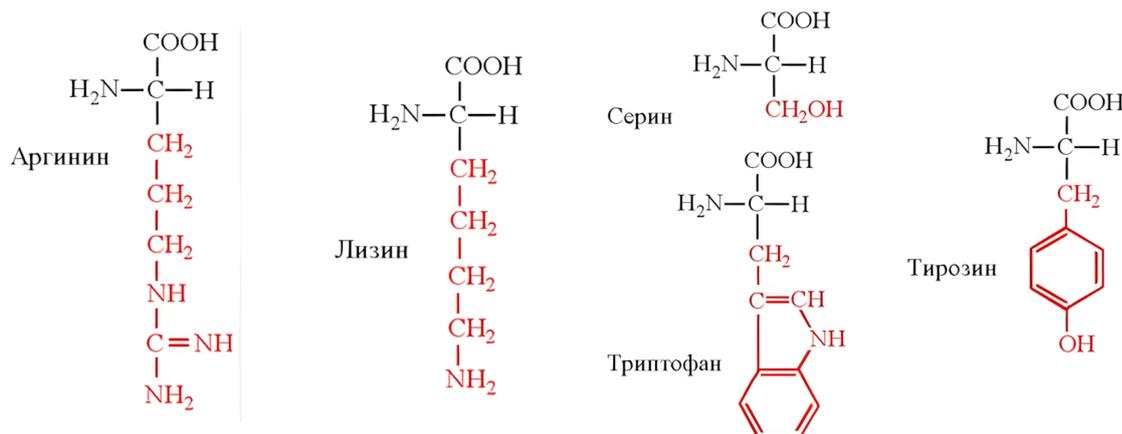


Рис. 4. Молекулярные структуры исследуемых аминокислот (цвет онлайн)

Fig. 4. Molecular structures of investigated amino acids (color online)

кислотности функциональных групп: 10.8 у лизина и 12.5 у аргинина, что может обуславливать их высокую способность к комплексообразованию на основе водородного связывания.

Рассчитанные структуры и ИК спектры молекулярных комплексов гиалуроновая кислота – аргинин (Arg), гиалуроновая кислота – лизин (Lys), гиалуроновая кислота – серин (Ser), гиалуроновая кислота – тирозин (Tyr) и гиалуроновая кислота – триптофан (Trp) представлены на рис. 5.

При анализе комплексообразования с гиалуроновой кислотой будем рассматривать возможности водородного связывания на основе amino- и гидроксильных (у серина и тирозина) групп радикалов аминокислот, поскольку α -карбоксовые ($-\text{COOH}$) и α -аминогруппы ($-\text{NH}_2$) аминокислот участвуют в образовании пептидных связей в белковых структурах.

Параметры образующихся водородных связей для рассчитанных молекулярных комплексов приведены в табл. 3.

Как видно из табл. 3, все аминокислоты, за исключением аргинина, образуют с гиалуроновой кислотой водородные связи средней силы. Необходимо отметить, что водородное связывание через гидроксильную группу даёт более значительную интенсивность спектрального пика по сравнению со связыванием через аминогруппу, при этом энергия водородной связи и длина водородного мостика во всех случаях примерно одинаковы.

С целью выявления влияния микрогеля – носителя на водородное связывание гиалуроновой кислоты с муцином – были проанализированы возможности комплексообразования гиалуроновой кислоты с двумя аминокислотами, одна из которых принадлежит муцину, а другая –

белковому микрогелю-носителю, с которым смешивается гиалуроновая кислота перед введением в мочевого пузыря. Были рассмотрены параметры водородного связывания гиалуроновой кислоты с триптофаном и тирозином, с серином и тирозином, с лизином и аргинином, а также с лизином и серином.

Рассчитанные ИК спектры молекулярных комплексов гиалуроновая кислота – триптофан (Trp) – тирозин (Tyr), гиалуроновая кислота – серин (Ser) – тирозин (Tyr), гиалуроновая кислота – лизин (Lys)-аргинин (Arg) и гиалуроновая кислота – лизин (Lys) – серин (Ser) представлены на рис. 6. На основании выполненных расчетов была составлена табл. 4, в которой приведены параметры водородных связей для рассчитанных молекулярных комплексов.

Видно, что во всех случаях происходит комплексообразование на основе водородного связывания, однако сила водородных связей для каждой из исследуемых трёхкомпонентных смесей существенно отличается. Наиболее сильное водородное связывание показывает комплекс гиалуроновой кислоты с аргинин и лизином: из табл. 4 видно, что частотный сдвиг составляет 487 см^{-1} , длина водородного мостика – 2.6 \AA , а интенсивность спектрального пика достигает значения 2358 км/моль . Энергия водородной связи, таким образом, будет составлять 6.3 ккал/моль , что говорит об этой связи как о средней. При соединении гиалуроновой кислоты с лизином и серином также образуется связь средней силы: энергия 3.8 ккал/моль , интенсивность спектрального пика 1527 км/моль , длина водородного мостика 2.52 \AA . В случае объединения двух ароматических аминокислот с гиалуроновой кислотой

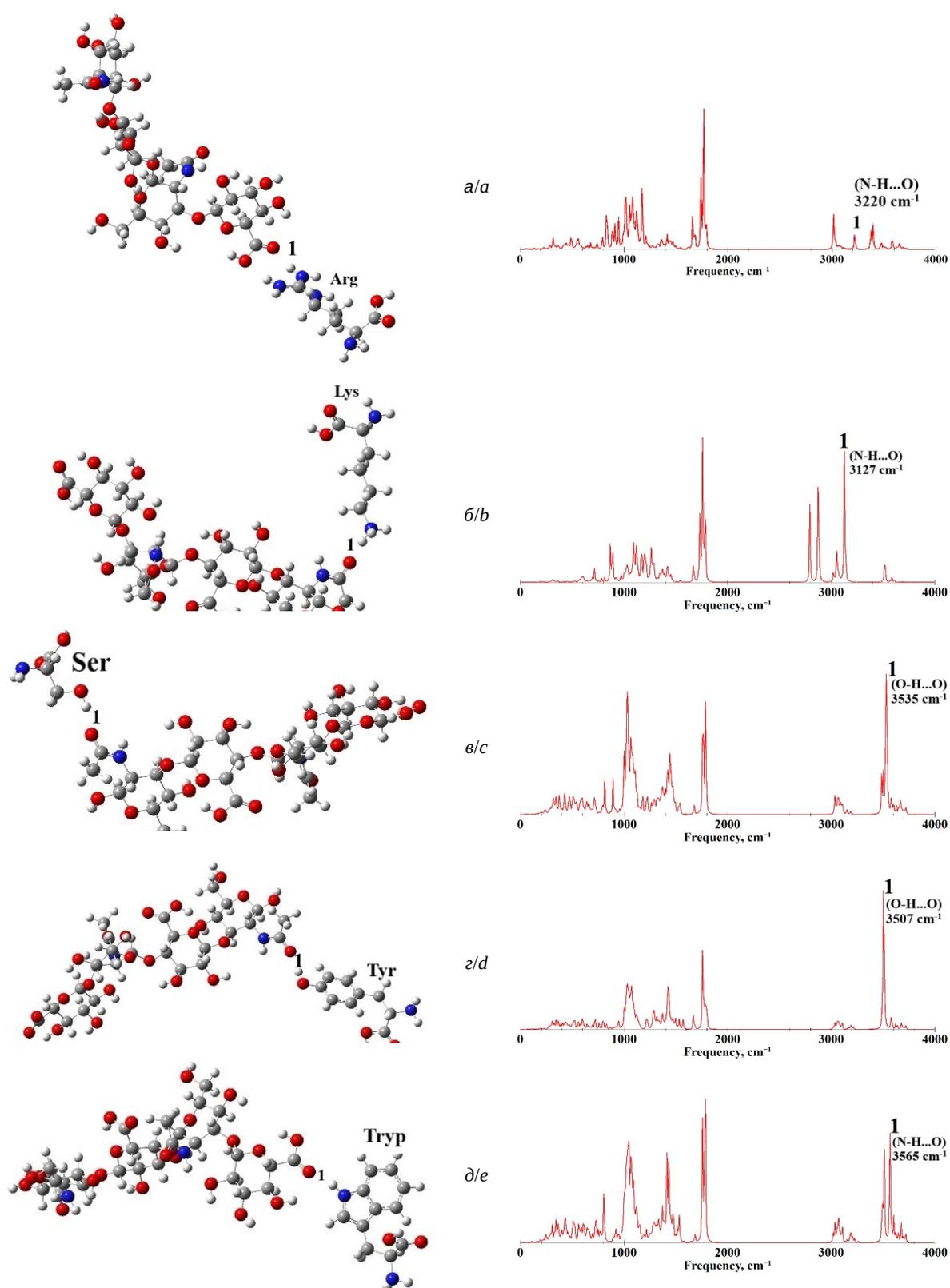


Рис. 5. Рассчитанные структуры и ИК спектры молекулярных комплексов гиалуроновой кислоты с аргинином (Arg) (а), лизином (Lys) (б), серином (Ser) (в), тирозином (Tyr) (г) и триптофаном (Tryp) (д) (цвет онлайн)

Fig. 5. Calculated structures and IR spectra of molecular complexes of hyaluronic acid with arginine (Arg) (a), with lysine (Lys) (b), with serine (Ser) (c), with tyrosine (Tyr) (d) and with tryptophan (Tryp) (e) (color online)

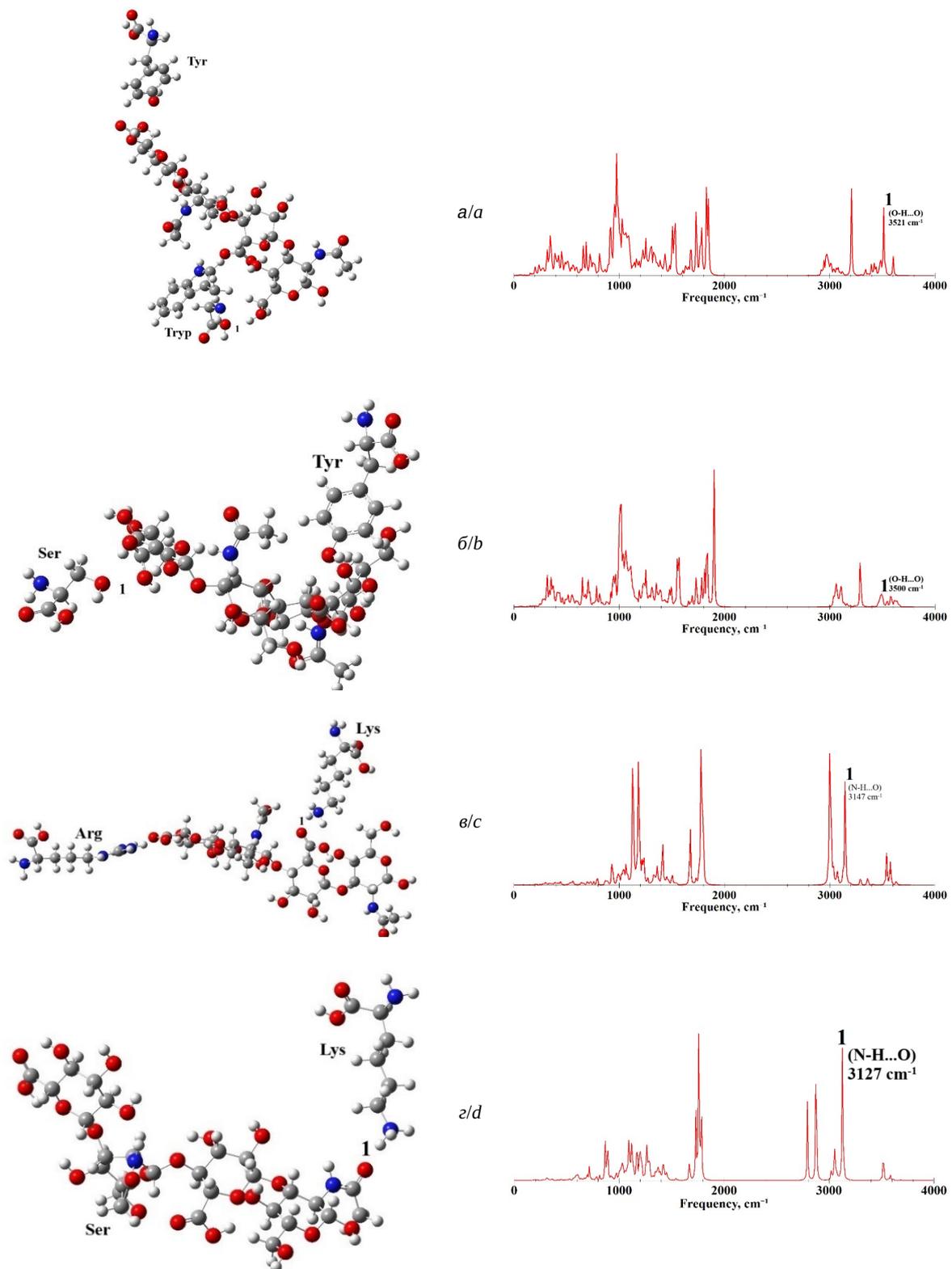


Рис. 6. Рассчитанные структуры и ИК спектры молекулярных комплексов гиалуроновая кислота – триптофан (Труп) – тирозин (Тур) (а), гиалуроновая кислота – серин (Ser) – тирозин (Тур) (б), гиалуроновая кислота – лизин (Lys) – аргинин (Arg) (в), гиалуроновая кислота – лизин (Lys) – серин (Ser) (г) (цвет онлайн)

Fig. 6. Calculated structures and IR spectra of molecular complexes hyaluronic acid – tryptophan (Tryp) – tyrosine (Tyr) (a), hyaluronic acid-serine (Ser) – tyrosine (Tyr) (b), hyaluronic acid – lysine (Lys) – arginine (Arg) (c) and hyaluronic acid – lysine (Lys) – serine (Ser) (d) (color online)



Таблица 4 / Table 4

Рассчитанные параметры водородных связей молекулярных комплексов гиалуроновой кислоты и двух аминокислот

Calculated hydrogen bonds parameters of hyaluronic acid and two amino acids molecular complexes

Тип комплекса / Complex type	Тип связи / Bond type	Длина Н-связи / H-bond length R, Å	Длина водородного мостика / Hydrogen bridge length R _b , Å	Частота / Frequency ν , cm ⁻¹	Частотный сдвиг / Frequency shift $\Delta\nu$, cm ⁻¹	Энергия связи / Bond energy $-\Delta H$, kkal/mol	Интенсивность / Intensity I_{IR} , km/mol
ГК – тирозин (Tyr) – триптофан (Trp)	O-H...O	2.31	3.29	3521	113	2.6	339
ГК – серин (Ser) – тирозин (Tyr)	O-H...O	2.7	3.0	3500	134	2.9	136
ГК – аргинин (Arg) – лизин (Lys)	N-H...O	1.7	2.6	3147	487	6.3	2358
ГК – лизин (Lys) – серин (Ser)	N-H...O	1.53	2.52	3127	197	3.8	1527

сила водородного связывания в тройном комплексе существенно уменьшается: энергия связи в комплексе гиалуроновая кислота- триптофан – тирозин становится всего 2.6 ккал/моль, а при объединении ароматической и нейтральной аминокислот (комплекс гиалуроновая кислота- серин-тирозин) энергия водородного связывания остаётся такой же, как и для двойных комплексов: 2.9 ккал/моль. Интенсивность спектральных пиков и в том, и в другом случае невысока: 339 и 136 км/моль, а длина водородного мостика соответствует слабым связям: 3.29 и 3.0 Å соответственно (см. табл. 4).

Из сравнения результатов, приведённых в табл. 3, 4, видно, что при объединении двух полярных аминокислот с гиалуроновой кислотой происходит существенное увеличение силы водородных связей, в то время как объединение двух ароматических аминокислот приводит к существенному ослаблению водородного связывания. Наличие нейтральной аминокислоты (серин) не изменяет силу водородного связывания в тройном молекулярном комплексе. Вышесказанное даёт возможность сделать предположение о том, что образование молекулярных комплексов гиалуроновой кислоты с белковыми структурами происходит, скорее всего, через более активные полярные аминокислоты, в то время как ароматические и нейтральные аминокислоты практически не принимают участия в этом взаимодействии.

Выводы

В результате анализа полученных результатов было сформулировано следующее заключение: образование достаточно устойчивых мо-

лекулярных комплексов гиалуроновой кислоты с белковыми структурами происходит за счёт водородного связывания полярных аминокислот – аргинина и лизина. В этом случае присоединение дополнительной аминокислоты к молекулярным комплексам усиливает водородные связи, которые становятся средними, близкими к сильным. Этот вывод подтверждает экспериментально зафиксированное существенное повышение эффективности действия гиалуроновой кислоты в присутствии белкового микрогеля, используемого в качестве носителя [13]. В то же время необходимо отметить, что создание тройного молекулярного комплекса гиалуроновой кислоты с двумя ароматическими аминокислотами практически невозможно в силу слабого межмолекулярного взаимодействия.

Таким образом, установлено, что наличие дополнительной белковой структуры существенно повышает взаимодействие гиалуроновой кислоты с белком муцина слизистой оболочки за счёт межмолекулярного комплексообразования на основе полярных основных аминокислот. Этот результат позволяет оценить и обосновать механизмы межмолекулярного взаимодействия микрогелей, основанных на изоляте сывороточного белка, с белками слизистой оболочки и подтвердить эффективность использования микрогелей в таргетной терапии, связанной с восстановлением муцина при помощи гиалуроновой кислоты.

Список литературы

1. Meyer K. Chemical structure of hyaluronic acid // Federation Proceedings. 1958. Vol. 17, № 4. С. 1075–1077.



2. Iaconisi G. N., Lunetti P., Gallo N., Cappello A. R., Fiermonte G., Vincenza Dolce V., Capobianco L. Hyaluronic Acid: A Powerful Biomolecule with Wide-Ranging Applications – A Comprehensive Review // *International Journal of Molecular Science*. 2023. Vol. 24, iss. 12. Article number 10296. <https://doi.org/10.3390/ijms241210296>
3. Цепилов Р. Н., Белодед А. В. Гиалуриновая кислота – «старая» молекула с «новыми» функциями: биосинтез и деполимеризация гиалуриновой кислоты у бактерий и в тканях позвоночных, в том числе в процессах канцерогенеза // *Биохимия*. 2015. Т. 80, вып. 9. С. 1315–1333.
4. Snetkov P., Zakharova K., Morozkina S., Olekhnovich R., Uspenskaya M. Hyaluronic acid: The influence of molecular weight on structural, physical, physicochemical, and degradable properties of biopolymer // *Polymers*. 2020. Vol. 12, iss. 8. Article number 1800. <https://doi.org/10.3390/polym12081800>
5. Chemistry and biology of hyaluronan / eds. H. G. Garg, C. A. Hales. Amsterdam ; Boston : Elsevier, 2004. 605 p.
6. Vasvani S., Kulkarni P., Rawtani D. Hyaluronic acid: A review on its biology, aspects of drug delivery, route of administrations and a special emphasis on its approved marketed products and recent clinical studies // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020. Vol. 151. P. 1012–1029.
7. Khabarov V. N., Boykov P. Y., Selyanin M. A. Hyaluronic acid: Production, properties, application in biology and medicine. Hoboken : John Wiley & Sons, 2015. 224 p.
8. Dovedytis M., Liu Z. J., Bartlett S. Hyaluronic acid and its biomedical applications: A review // *Engineered Regeneration*. 2020. Vol. 1. P. 102–113.
9. Pyo J. S., Cho W. J. Systematic review and meta-analysis of intravesical hyaluronic acid and hyaluronic acid / chondroitin sulfate instillation for interstitial cystitis / painful bladder syndrome // *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2016. Vol. 39, № 4. P. 1618–1625.
10. Matsuoka P. K., Haddad J. M., Pacetta A. M., Baracat E. C. Intravesical treatment of painful bladder syndrome: A systematic review and meta-analysis // *International Urogynecology Journal*. 2012. Vol. 23. P. 1147–1153.
11. Boddupalli B. M., Mohammed Zulkar N. K., Ravinder Nath A., Banji D. Mucoadhesive drug delivery system: An overview // *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*. 2010. Vol. 1, № 4. P. 381.
12. Rose M. C. Mucins: Structure, function, and role in pulmonary diseases // *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 1992. Vol. 263, № 4. P. L413–L429.
13. Saveleva M. S., Lobanov M. E., Gusliakova O. I., Plastun V. O., Prikhozhdenko E. S., Sindeeva O. A., Gorin D. A., Mayorova O. A. Mucoadhesive Emulsion Microgels for Intravesical Drug Delivery: Preparation, Retention at Urothelium, and Biodistribution Study // *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2023. Vol. 15, № 21. P. 25354–25368. <https://doi.org/10.1021/acsami.3c02741>
14. Кон В. Электронная структура вещества – волновые функции и функционалы плотности // *Успехи физических наук*. 2002. Т. 172, № 3. С. 336–348.
15. Becke A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange // *Journal of Chemical Physics*. 1993. Vol. 98, № 7. P. 5648–5652. <https://www.doi.org/10.1063/1.464913>
16. Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Scuseria G. E., Robb M. A., Cheeseman J. R., Montgomery J. A., Vreven Jr. T., Kudin K. N., Burant J. C., Millam J. M., Iyengar S. S., Tomasi J., Barone V., Mennucci B., Cossi M., Scalmani G., Rega N., Petersson G. A., Nakatsuji H., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Klene M., Li X., Knox J. E., Hratchian H. P., Cross J. B., Adamo C., Jaramillo J., Gomperts R., Stratmann R. E., Yazyev O., Austin A. J., Cammi R., Pomelli C., Ochterski J. W., Ayala P. Y., Morokuma K., Voth G. A., Salvador P., Dannenberg J. J., Zakrzewski V. G., Dapprich S., Daniels A. D., Strain M. C., Farkas O., Malick D. K., Rabuck A. D., Raghavachari K., Foresman J. B., Ortiz J. V., Cui Q., Baboul A. G., Clifford S., Cioslowski J., Stefanov B. B., Liu G., Liashenko A., Piskorz P., Komaromi I., Martin R. L., Fox D. J., Keith T., Al-Laham M. A., Peng C. Y., Nanayakkara A., Challacombe M., Gill P. M. W., Johnson B., Chen W., Wong W., Gonzalez C., Pople J. A. Gaussian 03, Revision B.03. Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 2003. 302 p.
17. Avogadro – Free cross-platform molecular editor – Avogadro. Funding for the Avogadro manual was provided by the University of Pittsburgh Department of Chemistry. Pittsburgh, Pennsylvania, 2015. URL: <https://avogadro.cc/> (дата обращения: 15.03.2024).
18. Программа графической визуализации результатов численного моделирования на основе методов квантовой механики : св-во о гос. регистрации программы для ЭВМ 2015616290 Рос. Федерация / А. Н. Бокарев, И. Л. Пластун ; правообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю. А.». № 2015612953 ; заявл. 13.04.15 ; зарегистр. 05.06.15, Бюл. № 1. 1 с.
19. Иогансен А. В. Инфракрасная спектроскопия и спектральное определение энергии водородной связи // *Водородная связь / отв. ред. Н. Д. Соколов. М. : Наука, 1981. С. 112–155.*
20. Бабков Л. М., Пучковская Г. А., Макаренко С. П., Гаврилко Т. А. ИК спектроскопия молекулярных кристаллов с водородными связями. Киев : Наукова думка, 1989. 160 с.
21. Стил Дж. В., Этвуд Дж. Л. Супрамолекулярная химия : в 2 т. М. : Академкнига, 2007. Т. 1. 479 с.

References

1. Meyer K. Chemical structure of hyaluronic acid. *Federation Proceedings*, 1958, vol. 17, no. 4, pp. 1075–1077.
2. Iaconisi G. N., Lunetti P., Gallo N., Cappello A. R., Fiermonte G., Vincenza Dolce V., Capobianco L. Hyaluronic



- Acid: A Powerful Biomolecule with Wide-Ranging Applications – A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Science*, 2023, vol. 24, iss. 12, article no. 10296. <https://doi.org/10.3390/ijms241210296>
3. Tsepilov R. N., Beloded A. V. Hyaluronic acid is an “old” molecule with “new” functions: Biosynthesis and depolymerization of hyaluronic acid by bacteria and vertebrates – especially in cancerogenesis. *Biochemistry*, 2015, vol. 80, iss. 9, pp. 1315–1333 (in Russian).
 4. Snetkov P., Zakharova K., Morozkina S., Olekhovich R., Uspenskaya M. Hyaluronic acid: The influence of molecular weight on structural, physical, physicochemical, and degradable properties of biopolymer. *Polymers*, 2020, vol. 12, iss. 8, article no. 1800. <https://doi.org/10.3390/polym12081800>
 5. Garg H. G., Hales C. A., eds. *Chemistry and biology of hyaluronan*. Amsterdam, Boston, Elsevier, 2004. 605 p.
 6. Vasvani S., Kulkarni P., Rawtani D. Hyaluronic acid: A review on its biology, aspects of drug delivery, route of administrations and a special emphasis on its approved marketed products and recent clinical studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, vol. 151, pp. 1012–1029.
 7. Khabarov V. N., Boykov P. Y., Selyanin M. A. *Hyaluronic acid: Production, properties, application in biology and medicine*. Hoboken, John Wiley & Sons, 2015. 224 p.
 8. Dovedytis M., Liu Z. J., Bartlett S. Hyaluronic acid and its biomedical applications: A review. *Engineered Regeneration*, 2020, vol. 1, pp. 102–113.
 9. Pyo J. S., Cho W. J. Systematic review and meta-analysis of intravesical hyaluronic acid and hyaluronic acid / chondroitin sulfate instillation for interstitial cystitis / painful bladder syndrome. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2016, vol. 39, no. 4, pp. 1618–1625.
 10. Matsuoka P. K., Haddad J. M., Pacetta A. M., Baracat E. C. Intravesical treatment of painful bladder syndrome: A systematic review and meta-analysis. *International Urogynecology Journal*, 2012, vol. 23, pp. 1147–1153.
 11. Boddupalli B. M., Mohammed Zulkar N. K., Ravinder Nath A., Banji D. Mucoadhesive drug delivery system: An overview. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2010, vol. 1, no. 4, pp. 381.
 12. Rose M. C. Mucins: Structure, function, and role in pulmonary diseases. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 1992, vol. 263, no. 4, pp. L413–L429.
 13. Saveleva M. S., Lobanov M. E., Gusliakova O. I., Plastun V. O., Prikhozhdenko E. S., Sindeeva O. A., Gorin D. A., Mayorova O. A. Mucoadhesive Emulsion Microgels for Intravesical Drug Delivery: Preparation, Retention at Urothelium, and Biodistribution Study. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2023, vol. 15, no. 21, pp. 25354–25368. <https://doi.org/10.1021/acsami.3c02741>
 14. Kohn W. Nobel Lecture : Electronic structure of matter – wave functions and density functionals. *Rev. Mod. Phys.*, 1999, vol. 71, no. 5, pp. 1253–1265. <https://www.doi.org/10.1103/RevModPhys.71.1253>
 15. Becke A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *Journal of Chemical Physics*, 1993, vol. 98, no. 7, pp. 5648–5652. <https://www.doi.org/10.1063/1.464913>
 16. Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Scuseria G. E., Robb M. A., Cheeseman J. R., Montgomery J. A., Vreven Jr. T., Kudin K. N., Burant J. C., Millam J. M., Iyengar S. S., Tomasi J., Barone V., Mennucci B., Cossi M., Scalmani G., Rega N., Petersson G. A., Nakatsuji H., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Klene M., Li X., Knox J. E., Hratchian H. P., Cross J. B., Adamo C., Jaramillo J., Gomperts R., Stratmann R. E., Yazyev O., Austin A. J., Cammi R., Pomelli C., Ochterski J. W., Ayala P. Y., Morokuma K., Voth G. A., Salvador P., Dannenberg J. J., Zakrzewski V. G., Dapprich S., Daniels A. D., Strain M. C., Farkas O., Malick D. K., Rabuck A. D., Raghavachari K., Foresman J. B., Ortiz J. V., Cui Q., Baboul A. G., Clifford S., Cioslowski J., Stefanov B. B., Liu G., Liashenko A., Piskorz P., Komaromi I., Martin R. L., Fox D. J., Keith T., Al-Laham M. A., Peng C. Y., Nanayakkara A., Challacombe M., Gill P. M. W., Johnson B., Chen W., Wong W., Gonzalez C., Pople J. A. *Gaussian 03, Revision B.03*. Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 2003. 302 p.
 17. *Avogadro – Free cross-platform molecular editor – Avogadro*. Funding for the Avogadro manual was provided by the University of Pittsburgh Department of Chemistry. Pittsburgh, Pennsylvania, 2015. Available at: <https://avogadro.cc/> (accessed March 15, 2024).
 18. Bokarev A. N., Plastun I. L. *Program for graphical visualization of numerical simulation results based on quantum mechanics methods*. Certificate of state registration of a computer program 2015616290 Russian Federation; copyright holder Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education “Yuri Gagarin State Technical University of Saratov”. No. 2015612953; declared. 13 April 2015; registered 05 June 2015, Bull. no. 1. 1 p. (in Russian).
 19. Iogansen A. V. Infrared Spectroscopy and Spectral Determination of Hydrogen Bond Energy. In: Sokolov N. D., ed. *Vodorodnaia svyaz'* [Hydrogen Bond]. Moscow, Nauka, 1981, pp. 112–155 (in Russian).
 20. Babkov L. M., Puchkovskaya G. A., Makarenko S. P., Gavrilko T. A. *IK spektroskopiia molekuliarnukh kristallov s vodorodnymi svyaziyami* [IR Spectroscopy of Molecular Crystals with Hydrogen Bonds]. Kiev, Naukova dumka, 1989. 169 p. (in Russian).
 21. Steed J. W., Atwood J. L. *Supramolecular Chemistry*. 2nd ed. New York, John Wiley & Sons, 2009. 1002 p. (Russ. ed.: Moscow, Akademkniga, 2007, vol. 1. 479 p.).

Поступила в редакцию 18.02.2024; одобрена после рецензирования 03.04.2024; принята к публикации 15.04.2024

The article was submitted 18.02.2024; approved after reviewing 03.04.2024; accepted for publication 15.04.2024