

На правах рукописи

**Галеева Айгуль Гафуровна**

**Локальные изменения метаболизма кожи при внутридермальном введении  
нестабилизированной высокомолекулярной гиалуроновой кислоты  
в эксперименте**

03.01.04 – Биохимия (медицинские науки)

Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Уфа - 2017



## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность темы исследования и степень ее разработанности**

Среди различных воздействий, используемых для омоложения кожи в косметологии и эстетической медицине, наиболее широкое применение из нехирургических подходов находят инъекционные методы. Спектр инъекционных средств, предназначенных для коррекции эстетических недостатков внешности, достаточно велик и постоянно пополняется.

Одним из наиболее физиологичных и безопасных методов в инъекционной косметологии с этих позиций является введение препаратов нативной и частично стабилизированной гиалуроновой кислоты (ГК), которые нашли повсеместное распространение, что, вероятно, объясняется рядом причин, связанных с особенностями структуры, свойств и биологических функций гиалуронана (Хабаров В.Н. и др., 2012; Михайлова Н.П., 2015; Monteiro E.D., 2011; Kestemont P. et al., 2012; Tedeschi A. et al., 2015). Во-первых, это единственный глюкозаминогликан, который в животном организме существует в свободном, ковалентно не связанном с другими биополимерами состоянии; во-вторых, применяемый в виде инъекционных препаратов гиалуронан химически идентичен с ГК дермы; в-третьих, гиалуронан – один из основных компонентов межклеточного матрикса дермы и участвует в различных внеклеточных и внутриклеточных метаболических процессах (Чайковская Е.А., 2012; Бадюкин В.В., Михайлова Н.П., 2016; Kavasi R.M. et al., 2017).

В России одобрена и разрешена к применению большая группа препаратов на основе ГК. Накоплен определенный положительный опыт их использования для коррекции инволюционных изменений кожи. Однако, эффективность их применения преимущественно обосновывается констатацией визуализируемых клинических результатов, а данные, характеризующие формирование терапевтических эффектов на метаболическом уровне, единичны и недостаточны для понимания тех процессов, которые лежат в основе действия этой группы препаратов (Чайковская Е.А. и др., 2011; 2012; Amin S.P. et al., 2006; Yasuda T., 2007; Atiyeh B.S. et al., 2008; Ferguson ; E.L. et al., 2011; Oh J.H. et al., 2011; El-

Domyanti M. et al., 2012; Tedeschi A. et al., 2015; Belverde R. et al., 2017; Koehler L. et al., 2017). В то же время, очевидно, что сбалансированность процессов синтеза и деградации гиалуронана, направленных на поддержание оптимального соотношения его высоко- и низкомолекулярных форм, является одним из важных факторов обеспечения физиологического гомеостаза кожи, который смещается по мере развития инволюционных процессов.

**Цель исследования.** Охарактеризовать изменения метаболизма кожи экспериментальных животных зрелого возраста в области внутридермального введения нативного высокомолекулярного гиалуронана.

**Задачи исследования.** У самок крыс зрелого возраста при курсовом внутридермальном введении методом мезотерапии нестабилизированного высокомолекулярного гиалуронана:

1) В коже в области введения гиалуронана изучить состояние углеводного обмена и оценить динамику изменений содержания гликогена, гликозаминогликанов (ГАГ) и гиалуроновой кислоты.

2) Изучить в коже в зоне инъекций интенсивность перекисного окисления липидов и уровень окислительной модификации белков.

3) Определить в коже в области введения гиалуронана уровень общего и нейтрально-соле-растворимого коллагена, свободного гидроксипролина.

4) Определить содержание в сыворотке крови некоторых цитокинов (IGF-1, TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ).

5) Оценить в области введения полисахарида гистоморфологические изменения кожи.

**Методология и методы исследования.** Работа является экспериментальным исследованием, выполненным на беспородных лабораторных крысах – самках разных возрастных групп – 30 животных молодого (4-5 месяцев, массой 160-170 г) и 160 зрелого возраста (11-12 месяцев, массой 280-320 г) (Юшков Б.Г., Черешнев В.А., 2016). Для достижения цели и решения поставленных задач использовались биохимические, гистологические, гистохимические, иммуногистохимические и статистические методы

исследования. При проведении экспериментов соблюдали этические нормы и рекомендации по гуманному отношению к лабораторным животным, которые введены Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, а также приказ Минздравсоцразвития Российской Федерации от 23.08.2010 г. №708н «Об утверждении правил лабораторной практики».

**Научная новизна.** Впервые в зоне интрадермального введения высокомолекулярной нативной ГК охарактеризовано состояние углеводного обмена кожи. Показано усиление анаэробного окисления углеводов с мобилизацией гликогена в течение первой недели после начала введения гиалуронана, интенсификация аэробного окисления с активацией гексозодифосфатного и гексозомонофосфатного путей в последующие более поздние сроки.

Показана выраженность и динамика сдвигов в содержании основных компонентов внеклеточного матрикса дермы – коллагена, гиалуронана и суммарных гликозаминогликанов (ГАГ). Выявлено увеличение гиалуронана и ГАГ при введении нативного гетерополисахарида методом мезотерапии, активное его поглощение и резорбция макрофагами в течение первой недели, а через 3-5 недель повторное увеличение ГАГ и гиалуронана, а также нейтральносолеорастворимого и суммарного коллагена, отражающее активацию функционального состояния фибробластов с усилением биосинтетических процессов.

Подтверждено, что внутридермальное введение немодифицированной ГК проявляет антиоксидантное действие.

Установлено, что при внутридермальном введении гиалуронана методом мезотерапии в ткани кожи экспериментальных животных в течение недели наблюдаются признаки асептической воспалительной реакции (отек тканей, разрушение структуры внеклеточного матрикса, незначительная диффузная инфильтрация макрофагами и в меньшей степени лимфоцитами), повышение содержания в сыворотке крови провоспалительных цитокинов – интерлейкина-1

бета ( $IL-1\beta$ ), фактора некроза опухоли – альфа ( $TNF-\alpha$ ). В более поздние сроки выявлено усиление регенеративных процессов с пролиферацией клеточных элементов кожи и повышение биосинтетической активности фибробластов. При этом в сыворотке крови определяется увеличение содержания инсулиноподобного ростового фактора-1 (IGF1) и трансформирующего фактора роста – бета 1 ( $TGF-\beta 1$ ), иммуногистохимически в коже обнаруживается возрастание количества клеток, экспрессирующих белок Ki-67 и фактор роста фибробластов – 1 (FGF-1), гистохимически – повышение содержания ГАГ и новообразованной тонковолокнистой соединительной ткани.

**Теоретическая и практическая значимость.** Установлено, что высокомолекулярная нативная гиалуроновая кислота после внутридермального введения, в коже вызывает невыраженный асептический воспалительный ответ ткани. При этом в коже происходят: усиление анаэробного окисления углеводов с мобилизацией гликогена, активация процессов свободнорадикального окисления липидов и белков кожи, интенсификация продукции цитокинов провоспалительного ( $IL-1\beta$ ,  $TNF-\alpha$ ) и противовоспалительного ( $TGF-\beta 1$ ) характера действия.

Показано также, что гиалуронан проявляет антиоксидантный эффект.

Выявлено, что внутридермальное введение высокомолекулярной ГК в более отдаленные сроки (через 3-5 недель) способствует интенсификации процессов пролиферации и дифференцировки фибробластов с активацией биосинтетической функции, приводящей к увеличению содержания коллагена, суммарных гликозаминогликанов и гиалуронана кожи. Установлена важная роль в развитии этих изменений активных макрофагов и экспрессия ростовых факторов – IGF1,  $TGF-\beta 1$ , FGF-1. Усиление аэробного окисления углеводов по дихотомическому и апопомическому путям при этом, способствует образованию компонентов, необходимых для течения биосинтетических и пролиферативных процессов в коже. Результаты проведенных исследований экспериментально подтверждают необходимость разработки определенных схем использования препаратов ГК при биоревитализации участков кожи, подверженных возрастным и другим

изменениям, с учетом не только воспалительных, хотя и слабо выраженных реакций ткани, но и активации сроков пролиферации фибробластов, стимуляции синтеза собственных биополимеров внеклеточного матрикса кожи – гиалуронана, коллагеновых белков, протеогликанов.

Проведенные исследования позволили оформить патент на изобретение Российской Федерации № 257168 от 25.11.2015г. «Способы омоложения лица у пациентов с анатомо-физиологическими особенностями лицевой части черепа» и патент на промышленный образец № 101551 от 27.12.2016г. «Схема алгоритма коррекции возрастных изменений верхней трети лица».

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. При внутридермальном введении высокомолекулярного нативного гиалуронана методом мезотерапии характер изменений обмена углеводов в коже зависит от срока, прошедшего после инъекций.

2. Процедура внутридермального введения ГК методом мезотерапии сопровождается активацией процессов свободнорадикального окисления липидов и белков кожи. ГК при этом оказывает антиоксидантный эффект.

3. Высокомолекулярная нативная ГК при внутридермальном введении стимулирует процессы пролиферации фибробластов и активацию их биосинтетических функций.

4. В механизмах действия на кожу внутридермально введенной экзогенной ГК важную роль играют активация макрофагов с экспрессией цитокинов и факторов роста.

### **Степень достоверности, апробация результатов, личное участие автора**

Достоверность результатов и обоснованность выводов базируется на адекватности экспериментальной модели, достаточном объеме исследований, использовании сертифицированного оборудования и современных методов, математической обработке результатов с применением пакета программ Statistica 6,0 for Windows. Содержащиеся в работе данные получены лично автором или при его непосредственном участии на всех этапах выполняемой работы: постановка задач, выбор методов исследования, проведение экспериментальных

исследований, статистическая обработка, оценка и анализ полученных результатов, написание статей, оформление диссертации.

Основные результаты диссертации доложены и обсуждены на: VII Международной научно-практической конференции «Медицина: актуальные вопросы и тенденции развития» (Краснодар, 2016); 81-й и 82-й Всероссийских итоговых молодежных научных конференциях с Международным участием «Вопросы теоретической и практической медицины» (Уфа, 2016, 2017); Всероссийской образовательно-научно-практической конференции студентов и молодых специалистов с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А.Строева» (Рязань, 2016); на совместном заседании проблемной комиссии «Морфология и общая патология» и кафедры биологической химии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России 07.07.2017 г.

**Внедрение результатов исследования в практику.** Основные результаты диссертационного исследования используются в практической деятельности: ЗАО «Косметологическая лечебница» г. Уфа (акт от 01.06.2017г.); включены в лекционный курс кафедры биологической химии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России (акт от 02.06.2017г.); и учебный процесс кафедры биологической химии ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России (акт от 10.02.2017г.).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 11 научных работ, в том числе 7 статей в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертации. Получен патент на изобретение и патент на промышленный образец.

**Объем и структура работы.** Диссертация изложена на 174 страницах машинописного текста, содержит 12 таблиц, 38 рисунков. Работа состоит из введения, обзора литературы, главы описания материалов и методов исследования, главы результатов исследования, заключения, выводов и списка



литературы, включающих 275 источников, из которых 112 – отечественных, 163 иностранных.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Материалы и методы исследования.** Исследования проведены на 160 самках белых беспородных крыс зрелого возраста и 30 – молодого возраста, содержащиеся в условиях вивария при сбалансированном питании и естественном освещении. Крысам контрольной группы вводили стерильный физиологический раствор хлористого натрия, а крысам опытной группы - препарат нестабилизированной ГК «Juvederm hydrate™» (Франция), содержащий 13,5 мг геля гиалуронана с молекулярной массой 1 млн. дальтон и 9 мг маннитола в 1 мл фосфатного буфера pH 7,2. Инъекции препарата и физиологического раствора производили внутридермально под легким эфирным наркозом техникой мезотерапии на боковые поверхности туловища животных (площадь 3x3 см) после предварительного удаления шерстяного покрова из расчета 0,06мл/100г массы животного. Препарат вводили трижды на 1–е, 3–и и 6–е сутки эксперимента. Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом путём мгновенной декапитации на 2-е, 4-е, 7-е, 21-е и 37-е сутки после первой инъекции гиалуронана

В сыворотке крови изучали содержание общего белка, креатинина, мочевины, билирубина, холестерина, триглицеридов, активность щелочной фосфатазы (ЩФ), аланиновой (АЛТ) и аспарагиновой (АСТ) трансаминаз, используя реагенты рекомендованных наборов и соблюдая соответствующие инструкции по применению, на биохимическом анализаторе «А–25» (США). Указанные биохимические константы позволяли контролировать общее состояние метаболизма экспериментальных животных в динамике проведения экспериментов. В сыворотке крови также было проведено определение содержания IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  (реагенты ИФА-ИЛ-1 $\beta$ , ИФА-ФНО-альфа ТОО «Цитокиновый контур»), IGF1 (реагенты IGF 1 ELISA, Mediagnost) и TGF – 1  $\beta$  (реагенты TGF- $\beta$ 1 ELISA, Affymetrix Bioscience) методом твёрдофазного ИФА на анализаторе Stat Fox 2100 согласно протоколу производителей.

В коже животных изучали состояние углеводного обмена по содержанию лактата, пирувата, активности гексокиназы, лактатдегидрогеназы (ЛДГ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-фДГ), уровней гликогена, ГК и гликозаминогликанов (ГАГ). Определение лактата проводили набором реагентов «Молочная кислота» ООО «Ольвекс Диагностикум», пирувата – по методу Н. Gloster, Н. Harris (1969), гликогена – по методу G. Good, Н. Cramer, М. Somogyi (1933), ГК – по методу М.Ф. Chaplin, У.Ф. Kennedy (1986), суммарного содержания ГАГ – по методу, описанному П.Н. Шараевым и соавт. (1990), активность гексокиназы – по Н.В.Алексахиной и др. (1973), Г-6-фДГ – по G. Gloster, Р. McLean в модификации (Карпищенко А.И., 1999), ЛДГ – набором реагентов ООО «Ольвекс Диагностикум».

Выраженность процессов свободнорадикального окисления в коже оценивали по содержанию первичных, вторичных ( Волчегорский И.А. и др., 2000) и конечных продуктов ( Львовская Е.И. и др., 1991) перекисного окисления липидов (ПОЛ), окислительной модификации белков по методу R.L. Levine в модификации Е.Е.Дубининой (1995), а состояние антиоксидантной защиты по активности. Супероксиддисмутазы (СОД) - наборы реагентов RANCOD фирмы «Randox Labor Ltd», глутатионпероксидазы (ГПО) – реагенты GLUTATION PEROXIDASE той же фирмы, каталазы – по методу, описанному М.А. Королук и др. (1988).

В коже экспериментальных животных изучали содержание суммарного коллагена (Шараев П.Н. и др. 1990), его нейтральносолеорастворимой фракции (Прошина Л.Я., Приваленко М.Н., 1989) и свободного гидроксипролина (Шараев П.Н. и др., 1990).

Ткани кожи в области внутридермального введения препарата ГК и физиологического раствора были подвергнуты гистологическому и иммуногистохимическому изучению. Для этого осуществляли стандартную проводку кусочков кожи, гистологические срезы готовили на микротоме LEICA 4 RM 2145, окрашивали гематоксилином и эозином, по методам Ван-Гизона и Маллори, для выявления аргирофильных волокон импрегнировали солями

серебра по Футу (Волкова О.В., Елецкий Ю.К., 1982). Суммарную фракцию ГАГ на срезах оценивали по Хейлу (Кононский А.И., 1976). Интенсивность пролиферативных процессов характеризовали путем иммуногистохимического выявления антигена Ki-67 с использованием мышинных поликлональных антител (реагент «Santa Cruz Biotechnology») и универсальной системы детекции LEICA BOND («Novocastra™») в гистостейнере LEICA BOND MAX («LEICA») с докраской гематоксилином. Подсчет клеток, экспрессирующих FGF-1, и визуализацию препаратов осуществляли с помощью микроскопа LEICA DM – 5000B в 20 полях зрения при увеличении в 400 раз.

Математическую обработку результатов исследования проводили с помощью пакета программ Statistica 6,0 фирмы Stat Soft. В группах выборки при нормальном распределении параметров оценивали следующие показатели: выборочную среднеарифметическую ( $\bar{X}$ ) и выборочную стандартную ошибку средней ( $s_x$ ), при асимметрическом распределении результатов применяли критерии непараметрической статистики с выявлением медианы (Me), верхнего и нижнего квартилей ( $Q_1$ - $Q_3$ ). Статистическую значимость межгрупповых различий проводили с использованием t-теста Стьюдента (при параметрическом распределении) и U-критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферони (при асимметричном распределении). Критический уровень значимости принимали  $P=0,05$ .

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Курсовое внутридермальное введение препарата нативной высокомолекулярной ГК не вызывает существенных изменений биохимического статуса экспериментальных животных. Об этом свидетельствуют результаты определения содержания в сыворотке крови белка, мочевины, креатинина, билирубина, триацилглицеролов, холестерина, активности АЛТ, АСТ, щелочной фосфатазы, показатели которых не выходили за пределы физиологических норм (Кигель Т.Б., 1982; Юшков Б.Г., Черешнев В.А., 2016). В коже в области введения препарата ГК наблюдаются изменения показателей углеводного обмена (таблица 1).

**Таблица 1** – Изменение показателей обмена углеводов в коже животных в области введения препарата гиалуроновой кислоты, Me[Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>]

Показатели	Группы животных					
	Контроль n=24	1-я (2-е сутки), n=10	2-я (4-е сутки), n=16	3-я (7-е сутки), n=14	4-я (21-е сутки), n=14	5-я (37-есутки) n=16
Пируват, мкмоль/г ткани	0,059 [0,052- 0,07]	0,056 [0,05- 0,064] P=0,473	0,049 [0,04- 0,056] P=0,052	0,054 [0,05- 0,058] P=0,238	0,049 [0,048- 0,06] P=0,203	0,065 [0,061-0,07] P=0,213
Лактат, мкмоль/г ткани	0,96 [0,76- 1,13]	1,16 [0,97- 1,43] P=0,069	1,39 [1,3-1,42] P<0,001	1,34 [1,3-1,40] P<0,001	0,80 [0,75- 0,84] P=0,123	0,92 [0,83-1,04] P=0,759
Лактат/пируват	17,6 [14,2- 18,8]	20,8 [19,2- 22,5] P=0,002	26,8 [25,2- 28,7] P<0,001	25,8 [23,6- 27,0] P<0,001	15,3 [13,3- 17,1] P=0,053	14,2 [13,2-15,6] P=0,943
ЛДГ, Е/мг белка	0,18 [0,16- 0,21]	0,25 [0,21- 0,29] P=0,031	0,24 [0,18- 0,29] 0,028	0,25 [0,17- 0,28] 0,041	0,21 [0,18- 0,30] P=0,242	0,20 [0,14-0,24] P=0,301
Г-6-фДГ, мкмоль/с.мг белка	1,03 [0,99- 1,21]	0,78 [0,72- 0,84] P=0,031	0,75 [0,7-0,84] P=0,004	0,80 [0,73- 0,84] P=0,026	1,44 [1,21- 1,44] P<0,001	1,69 [1,41-1,80] P=0,001
Гексокиназа, нмоль НАДФН/мг белка за 1 мин.	4,2 [3,1-4,8]	4,6 [4,0-4,9] P=0,218	3,8 [3,1- 3,8] P=0,118	3,9 [3,3-4,6] P=0,433	5,3 [4,1-5,8] P=0,024	5,6 [4,4-6,0] P=0,031
Гликоген, мг/г ткани	3,93 [3,42- 4,53]	3,70 [3,54- 4,32] P=0,659	3,02 [2,75- 3,58] P=0,007	3,09 [2,45- 4,07] P=0,021	3,35 [2,9- 3,65] P=0,031	3,69 [3,01-4,35] P=0,398
ГАГ сумм., моль гексуроновых .к-т/г ткани	16,8 [14,3- 23,4]	30,4 [25,1- 33,3] P<0,001	30,8 [26,2- 34,6] P<0,001	34,0 [27,2- 36,5] P<0,001	18,8 [15,6- 23,7] P=0,096	19,2 [15,8- 24,56] P=0,042
Гиалуронан, мг гексуроновых .к-т/г ткани	274 [246-303]	678 [576- 795] P<0,001	623 [583- 710] P<0,001	607 [570- 645] P<0,001	306 [271- 400] P=0,041	357 [332-374] P=0,001

Результаты этой серии экспериментов показали, что первые дни проведения инъекционной терапии препаратом высокомолекулярного гиалуронана сопровождаются в коже повышением процессов анаэробного окисления углеводов с интенсификацией гликогенолиза. Основанием для данного заключения явилось увеличение содержания в коже лактата, соотношения молочной к пировиноградной кислоте и активности лактатдегидрогеназы на фоне снижения активности гексокиназы, Г-6-фДГ и содержания гликогена на 2-е, 4-е и 7-е сутки эксперимента. Содержание ГАГ и гиалуронана вполне закономерно при экзогенном его введении на эти сроки эксперимента были в коже значительно увеличены. В более отдаленные сроки после завершения курсовой мезотерапии в коже коэффициент лактат/пируват снижался, активность гексокиназы и Г-6-фДГ повышалась, уровень гликогена оставался ниже, чем в группе интактных животных, а содержание ГАГ и гиалуронана резко снижалось, но оставалось более высоким, чем у подопытных крыс. Эти результаты были интерпретированы как активация процессов аэробного окисления и усиление использования глюкозы на биосинтетические цели. Важно, что уровень ГАГ и гиалуронана в коже в зоне введения гиалуронана на 37-е сутки было выше, чем на 21-е, что со значительной долей вероятности позволяло говорить об интенсификации в коже опытной группы животных новообразования собственных гетерополисахаридов.

В развитии возрастных изменений кожи особую роль отводят состоянию окислительного баланса с превалированием ПОЛ и окислительной модификации белков, связанных с инволюционным снижением в организме природных антиоксидантов и активности ферментативного звена антиокислительной защиты тканей (Колосова Н.Г. и др., 2003; Ястребов А.П., Мещанинов В.А., 2005; Омельянена Н.П., Слуцкий Л.И., 2010).

Интрадермальное введение препарата ГК самкам крыс зрелого возраста показало наличие у гиалуронана антиоксидантного эффекта. У опытной группы животных в коже в области введения гиалуронана на 4-е и 7-е сутки эксперимента наблюдалось более низкое содержание первичных (диеновые конъюгаты) и

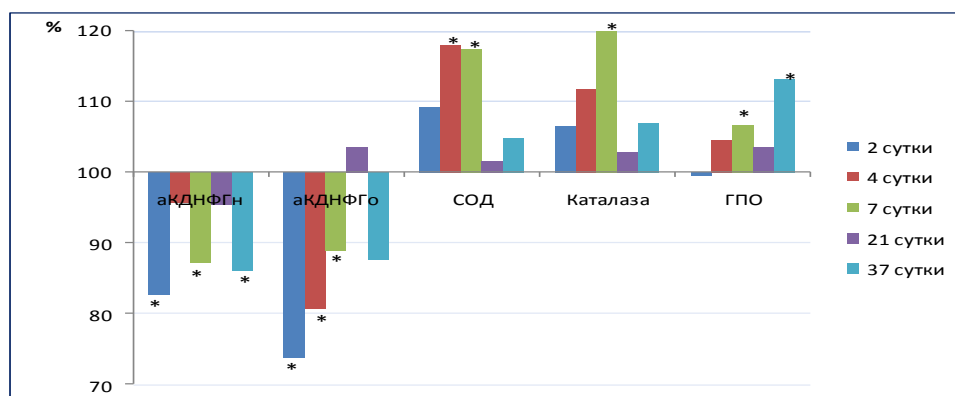
**Таблица 2** – Влияние внутридермального введения препарата гиалуронана на содержание продуктов перекисного окисления липидов (изопропаноловая фаза) кожи, в усл.ед./г ткани, Ме[Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>]

Группа животных		Диеновые конъюгаты	Кетодиены и сопряж. триены	Шиффовы основания
Интактные, n=12		0,200[0,177-0,234]	0,291[0,284-0,296]	0,076[0,054-0,087]
2-е сут., n=8	Контр.	0,275[0,239-0,292] p=0,0015	0,345[0,307-0,375] p=0,0124	0,091[0,075-0,103] p=0,0544
	Опыт	0,242[0,209-0,296] p=0,0027 P1=0,0306	0,324[0,301-0,384] p=0,0466 P1=0,0732	0,087[0,070-0,121] p=0,0508 P1=0,6101
4-е сут., n=10	Контр.	0,284[0,236-0,310] p=0,0016	0,340[0,316-0,372] p=0,0096	0,112[0,083-0,126] p=0,0415
	Опыт	0,218[0,182-0,242] p=0,0566 P1=0,0246	0,307[0,285-0,373] p=0,0134 P1=0,0488	0,098[0,081-0,134] p=0,0418 P1=0,0608
7-е сут., n=8	Контр.	0,273[0,211-0,304] p=0,0036	0,342[0,296-0,382] p=0,0174	0,110[0,100-0,138] p=0,0228
	Опыт	0,214[0,184-0,246] p=0,0833 P1=0,0114	0,310[0,28-0,344] p=0,0576 P1=0,0516	0,077[0,062-0,110] p=0,9008 P1=0,0353
21 сут., n=10	Контр.	0,211[0,179-0,241] p=0,6834	0,306[0,277-0,324] p=0,4526	0,084[0,070-0,093] p=0,0611
	Опыт	0,204[0,183-0,242] p=0,6942 P1=0,7203	0,288[0,271-0,318] p=0,4965 P1=0,0733	0,080[0,061-0,106] p=0,2543 P1=0,5237
37 сут., n=10	Контр.	0,209[0,170-0,235] p=0,6113	0,290[0,282-0,303] p=0,5217	0,077[0,060-0,089] p=0,8915
	Опыт	0,186[0,149-0,273] p=0,0903 P1=0,7415	0,278[0,256-0,294] p=0,6302 P1=0,8371	0,069[0,056-0,078] p=0,0544 P1=0,1124

**Примечания:** P-различие с показателями интактных животных, P1-различие с контрольной группой

вторичных (кетодиены и сопряженные триены) продуктов ПОЛ как в гептановой, так и изопропаноловой фазах липидного экстракта, чем в коже контрольной области (таблица 2). Статистически значимое снижение при введении в дерму кожи животных препарата гиалуронана по сравнению с инъекциями физиологического раствора было получено и при изучении содержания таких продуктов окислительной модификации белков, как алифатические кетондинитрофенолгидразоны нейтрального и основного характера (рисунок 1).

Вместе с тем, изучение влияния введения гиалурононовой кислоты в кожу экспериментальных животных на активность антиоксидантных ферментов выявило статистически значимые различия между опытной и контрольной зонами лишь на 4-е и 7-е сутки эксперимента относительно СОД, на 7-е сутки каталазы и 7-е и 37-е – ГПО.



**Рисунок 1** – Влияние внутридермального введения препарата гиалуронана на уровень алифатических кетондинитрофенилгидразонов и активность антиоксидантных ферментов в коже животных зрелого возраста в области инъекций (в % к контролю; αКДНФГн – алифатические кетондинитрофенилгидразоны нейтрального характера, αКДНФГо – алифатические кетондинитрофенилгидразоны основного характера; \*<sup>o</sup> p<0,05)

Активация окислительных процессов при внутридермальном введении препаратов, вероятно, является следствием развития воспалительного ответа ткани кожи на процедуру инъекций, что экспериментально показано Н.П. Михайловой и др. (2013, 2014). Важнейшим и наиболее распространенным белком кожи является коллаген. С возрастом происходят количественные и качественные изменения коллагена кожи (Кубанова А.А. и др., 2007; Омеляненко Н.П., Слуцкий Л.И., 2009). Определение в коже зрелых крыс

суммарного коллагена (СК), нейтральносоластворимой его фракции (НСРК) и свободного гидроксипролина при внутридермальном введении препарата ГК показало, что через 3-5 недели после инъекирования обнаруживается увеличение как НСРК, так и СК. При этом повышение уровня НСРК фракции предшествует увеличению СК (таблица 3). НСРК представляет фракцию вновь образованных («молодых») волокнистых структур, и повышение его уровня отражает активацию биосинтетических функций фибробластов (Серов В.В., Шехтер А.Б., 1981; Омеляненко Н.П., Слущкий Л.И., 2009). Регуляция функционирования зрелых фибробластов, интенсивность их пролиферации осуществляется как системными, так и локальными факторами. Роль локальных («короткодистантных») регуляторов (цитокины, факторы роста, морфогены) особенно велика в воспалительных реакциях, в процессах регенерации, регуляции иммунных реакции.

**Таблица 3** – Показатели обмена коллагена кожи при внутридермальном введении высокомолекулярной нестабилизированной гиалуроновой кислоты, Me [Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>]

Показатель и, ммоль оксипролин а/кг сухой массы	Группа животных					
	Контроль (интактная) n=24	1-я, n=10	2-я, n=16	3-я, n=14	4-я, n=14	5-я, n=16
Суммарный коллаген	210 [191-234]	184 [160- 203 P=0,080	202 [181-238] P=0,373	225 [213-255] P=0,058	212 [181-221] P=0,274	237 [220- 254] P=0,020
Нейтрально соластвор имый коллаген	7,6 [5,6-9,8]	8,0 [7,3- 8,8] P=0,192	6,4 [5,3- 10,7] P=0,795	6,2 [4,7-9,0] P=0,272	8,8 [5,4-10,2] P=0,041	9,8 [7,1- 14,8] P=0,037
Свободный оксипролин, мкмоль/г ткани	23,0 [21,0-26,0]	20,0 [17,0- 23,0] P=0,051	24,5 [17,0-8,5] P=0,745	20,5 [18,5-26,0] P=0,113	27,3 [19,8- 27,3] P=0,773	29,0 [26,0- 34,0] P=0,906

Определение содержания в сыворотке крови крыс опытной группы IGF-1, TGF-β<sub>1</sub>, IL-1β и TNF-α выявило значительные различия в динамике изменений их содержания в первые дни и в отдаленные сроки после проведения курса инъекций (таблица 4). В первые дни непосредственно после интрадермальных инъекций



гиалуронана уровень провоспалительных цитокинов – IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  в сыворотке увеличивался, отражая воспалительную реакцию на процедуру введения. На 21-е, 37-е сутки их содержание не отличалось от контроля. Содержание IGF-1, наоборот, увеличивалось в отдаленные сроки после завершения курсового введения гиалуронана, а в начальные дни эксперимента не отличалось от контроля. Уровень TGF –  $\beta$ 1 увеличивался в сыворотке крови крыс опытной группы уже на вторые сутки после инъекции препарата ГК (p=0,002) и с некоторыми колебаниями сохранялся на более высоких значениях до конца эксперимента, чем в группе интактных крыс.

**Таблица 4** – Содержание некоторых цитокинов в сыворотке крови самок крыс зрелого возраста при внутридермальном введении препарата гиалуронана, Ме [Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>]

Цитокины, пг/мл	Интактные крысы, n=14	Опытная группа				
		2-е сут., n=8	4-е сут., n=10	7-е сут., n=10	21-е сут., n=10	37-е сут., n=10
IGF-1	124 [88–153]	118 [85-136] P=0,383	142 [98-152] P=0,113	133 [125- 144] P=0,109	184 [126- 188] P=0,052	202 [171-223] P=0,024
TGF- $\beta$ 1	3248 [2563-4009]	4798 [4207- 4930] P=0,002	3945 [3606- 4116] P=0,026	4779 [4596- 4994] P=0,008	3988 [3521- 4299] P=0,038	4077 [3868- 4479] P=0,034
IL-1 $\beta$	28,3 [25,6-34,3]	35,4 [30,3- 47,6] P=0,042	34,6 [31- 41,4] P=0,047	36,2 [28,6- 45,4] P=0,045	30,8 [25,3- 37,6] P=0,476	27,5 [22,5- 29,7] P=0,711
TNF- $\alpha$	13,3 [10,6-17,2]	16,8 [15,4- 23,6] P=0,032	16,4 [14,9- 25,1] P=0,041	16,5 [16,0- 24,1] P=0,028	14,1 [11,2- 18,5] P=0,801	14,5 [12,3- 20,4] P=0,504

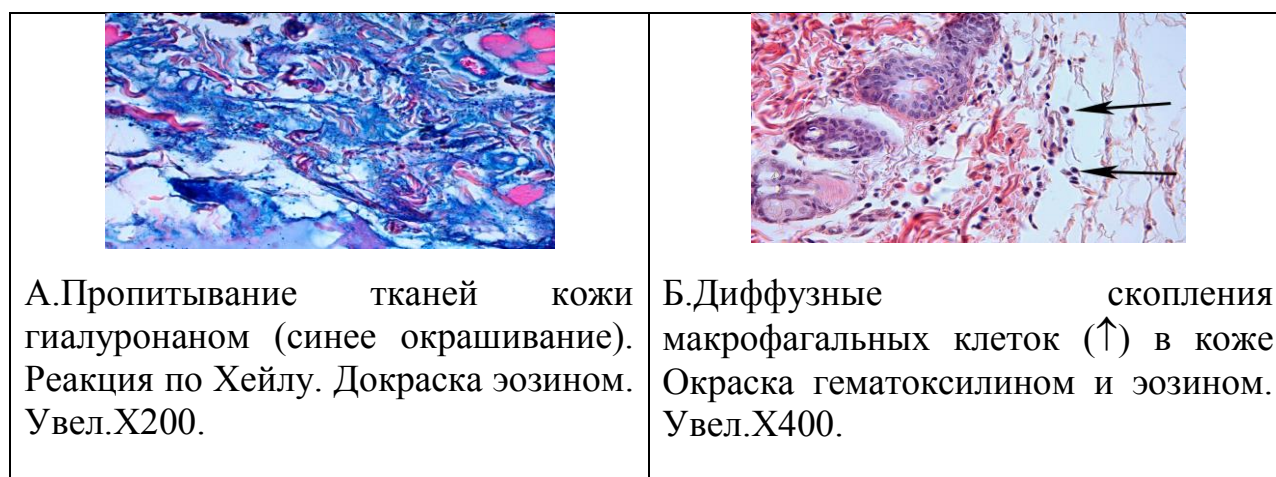
IGF-1 и TGF- $\beta$ 1 относятся к группе регуляторов, основное действие которых направлено на стимулирование пролиферации и роста клеток, хотя обладают плеiotропным действием (Monzani R., Coken P., 2002; Tedeschi A. et al., 2015). Противовоспалительные эффекты TGF- $\beta$ 1 связаны с индукцией макрофагов фенотипа M2, которые продуцируют ингибиторы воспаления и ростовые факторы (Ivashkiv L.V., 2013). Повышение его уровня в отдаленные сроки наблюдения

после интрадермального введения гиалуронана, вероятно, отражают, как и IGF-1 интенсификацию процессов пролиферации и активацию фибробластических клеток в коже. Для получения ответов на эти и другие возникающие вопросы по ходу экспериментальных исследований были проведены гистологические и иммуногистохимические исследования. В контрольной группе крыс в области кожи, где внутридермально методом мезотерапии вводился физиологический раствор, на 2-е сутки определялись отек тканей и развитие асептической воспалительной реакции на травму (рисунок 2).



**Рисунок 2** – Гистологическая структура кожи крыс после внутридермального введения физиологического раствора. А – на 2-е сутки, Б – на 4-е сутки

В области внутридермального введения гиалуронана (ГК) на 2-е сутки также определялись признаки отёка и дезорганизации тканей в результате пропитывания кожи ГК (рисунок 3А). В отечных тканях дермы и гиподермы выявились небольшие диффузные скопления клеток, большинство которых составляли макрофаги (рисунок 3Б).



**Рисунок 3** – Гистологическая структура кожи крыс на 2-е сутки после внутридермального введения гиалуронана

На 4-е сутки после введения гиалуронана отек тканей слегка спадал, макрофагальная реакция несколько увеличилась. На больших увеличениях микроскопа просматривалась отростчатая широкая цитоплазма, многие клетки имели светлую вакуолизированную цитоплазму и круглую форму, что характерно для фагоцитирующего макрофага. При проведении реакции по Хейлу в цитоплазме макрофагов визуализировался гиалуронан.

На 7-е сутки интенсивность окрашивания элементов соединительной ткани после реакции Хейла ослабевала, отражая рассасывание введенного гиалуронана, хотя признаки отека и инфильтрация лимфоцитарными клетками ткани кожи сохранялись. Одновременно наблюдалось увеличением под слоем эпидермиса количества фибробластических клеток.



**Рисунок 4** – Структура кожи крыс на 21-е сутки после внутридермального введения препарата гиалуронана

На 21-е сутки после введения в кожу крыс ГК кислоты в ткани определялось большое количество гистиоцитов и фибробластических клеток, синтезирующих коллаген. При импрегнации гистологических препаратов по методу Фута выявилось значительное количество новообразованных незрелых коллагеновых волокон (рисунок 4). При реакции по Хейлу в зоне регенерации кожи под эпидермисом обнаруживалось высокое содержание ГАГ (рисунок 5А).

На 37-е сутки эксперимента кожа в области введения препарата гиалуроновой кислоты соответствовала нормальной структуре, однако в некоторых участках кожи определялись новообразованные тонкие коллагеновые

волокна (рисунок 5Б), свидетельствуя о биосинтетической активности фибробластов.



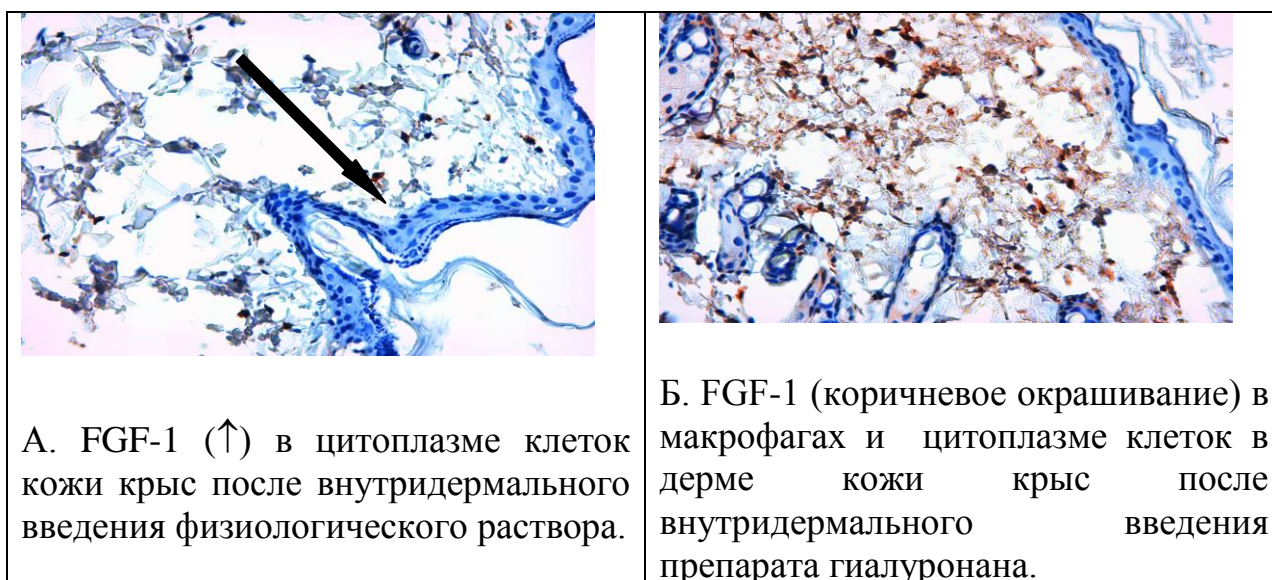
**Рисунок 5** – Гистологическая структура кожи крыс после внутридермального введения препарата гиалуроновой кислоты. А – на 21-е сутки, Б – на 37-е сутки

Иммуногистохимическое исследование антигена Ki-67 и фактора роста фибробластов (FGF-1) выявило в зонах введения препарата интенсификацию процессов пролиферации. У животных в контрольной области кожи белок Ki-67 выявлялся лишь в отдельных клетках базального слоя эпидермиса, характеризуя слабо выраженное обновление (рисунок 6А). После внутридермального введения гиалуронана, начиная с 4-х суток опыта антиген Ki-67 обнаруживался в ядрах многих клеток базального слоя эпителия. Наибольшей интенсивности процесс пролиферации достигал на 7-е и 21-е сутки опыта (рисунок 6Б).



**Рисунок 6** – Иммуногистохимическое выявление антигена Ki-67 в ядрах пролиферирующих клеток (коричневое окрашивание) в коже крыс из контрольной (А) и опытной (Б) областей на 7-е сутки эксперимента. Докраска гематоксилином

FGF-1 в контрольной области кожи после внутридермального введения физиологического раствора во все сроки опыта слабо экспрессировался в цитоплазме лишь отдельных клеток (рисунок 7А). Внутридермальное введение препарата гиалуронана усиливает экспрессию фактора роста фибробластов (рисунок 7Б). Наиболее высокая экспрессия клетками FGF-1 выявилось на 21-е сутки опыта.



**Рисунок 7** – Иммуногистохимическое выявление FGF-1 в клетках кожи контрольной (А) и опытной областей на 21-е сутки эксперимента. Докраска гематоксилином. Увел. X400

## ВЫВОДЫ

1. В коже в области курсового внутридермального введения высокомолекулярной нативной ГК техникой мезотерапии в первые дни происходит усиление анаэробного окисления углеводов с мобилизацией гликогена. Об этом свидетельствует увеличение соотношения в коже содержания лактат/пируват, активности лактатдегидрогеназы и снижение уровня гликогена. В более отдаленные сроки наблюдается активация аэробного окисления с усилением использования глюкозы на биосинтетические процессы, что отражается повышением активности гексокиназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, снижением коэффициента лактат/пируват, увеличением содержания суммарных гликазаминогликанов и гиалуронана.

2. Процедура внутридермального введения инъекционных средств методом мезотерапии в первые дни приводит к активации свободнорадикального окисления с нарастанием содержания в коже продуктов перекисления липидов и окислительной модификации белков. Высокомолекулярный нативный гиалуронан при этом препятствует снижению активности антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и каталазы, накоплению продуктов свободнорадикального окисления.

3. В коже белых крыс зрелого возраста определяется более низкое содержание суммарного и, особенно, нейтральносолеорастворимого коллагена, чем у животных молодой возрастной группы. Внутридермальное введение нативного гиалуронана животным зрелого возраста приводит в более отдаленные сроки (21-37 сутки) к увеличению содержания нейтральносолеорастворимой и суммарной фракции коллагена.

4. В начальные сроки непосредственно после проведения процедуры внутридермального введения ГК методом мезотерапии в сыворотке крови определяется повышение содержания интерлейкина-1-бета, фактора некроза опухоли-альфа и трансформирующего ростового фактора – бета 1. В более отдаленные сроки (21-37 дни) содержание  $IL-1\beta$  и  $TNF-\alpha$  снижается, уровень  $TGF-\beta 1$  сохраняется, а уровень инсулиноподобного ростового фактора-1 увеличивается.

5. После внутридермального введения нативной ГК наблюдаются пропитывание ткани гиалуронаном и признаки асептического воспаления – явления отёка и дезорганизации, невыраженная диффузная инфильтрация макрофагами, активно резорбирующими гиалуронан. В более отдаленные сроки наблюдения в коже усиливаются процессы пролиферации, возрастает количество клеток, экспрессирующих белок Ki-67 и фактор роста фибробластов-1, и функциональная активность фибробластов.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Гиалуронан: свойства и биологическая роль [Текст] / О. Капулер [и др.] // **Врач.** – 2015. – № 2. – С. 25-27. - (Соавт.: **А. Галеева**, Б. Сельская, Ф. Камилов).
2. **Галеева, А.Г.** Влияние внутридермального введения экспериментальным животным гиалуронана на содержание коллагена в коже [Текст] / А.Г. Галеева // **Наука молодых.** – 2016. – № 1. – С.23-27.
3. **Галеева, А.Г.** Метаболизм коллагена кожи при внутридермальной инъекции нестабилизированной гиалуроновой кислоты в эксперименте (Электронный ресурс) [Текст] / А.Г. Галеева, Ф.Х. Камилов, О.М. Капулер // Медицина: актуальные вопросы и тенденции развития: материалы VII Международной научно-практической конференции: сборник научных трудов. – Краснодар, 2016. – С. 33-36. – Режим доступа: [URL:http://www.apriorinauka.ru/electronic-are/Medicina-aktualnye-voprosy-i-tendencii-razvitiia](http://www.apriorinauka.ru/electronic-are/Medicina-aktualnye-voprosy-i-tendencii-razvitiia)
4. **Галеева, А.Г.** Содержание биополимеров в коже экспериментальных животных при внутридермальном введении нестабилизированного высокомолекулярного гиалуронана [Текст] / А.Г. Галеева // Вестник Башкирского государственного медицинского университета (сетевые издания). – 2016. – № 4. – С. 134-138.
5. Влияние интрадермального введения препарата высокомолекулярного гиалуронана на уровень некоторых факторов роста [Текст] / **А.Г. Галеева** [и др.] // **Медицинский вестник Башкортостана.** – 2017. – № 4. – С. 71-75. – (Соавт.: О.М. Капулер, Л.М. Саптарова, Ф.Х. Камилов).
6. **Галеева А.Г.** Влияние интрадермального введения гиалуроновой кислоты на процессы липопероксидации в коже экспериментальных животных [Текст] / А.Г. Галеева // **Аспирантский вестник Поволжья.** – 2017. – № 1-2 . – С. 171-175.
7. **Галеева, А.Г.** Обмен углеводов кожи в области внутридермального введения препарата высокомолекулярного нативного гиалуронана [Текст] / А.Г. Галеева // **Наука молодых.** – 2017. – № 2. – С. 152-157.

8. Камилов, Ф.Х. Влияние внутридермального введения гиалуроновой кислоты на интенсивность окислительной модификации белков кожи экспериментальных животных [Текст] / Ф.Х. Камилов, О.М. Капулер, **А.Г. Галеева** // **Международный журнал прикладных фундаментальных исследований**. – 2017. – № 2 . – С. 210-213.

9. Пролиферация клеток кожи экспериментальных животных при внутридермальном введении гиалуроновой кислоты [Текст] / **А.Г. Галеева** [и др.] // **Здоровье и образование в XXI веке**. – 2017. – Т.19, № 9. – С. 139-143. – (Соавт.: Ф.Х. Камилов, О.М. Капулер, О.В. Данилова).

#### **Патенты**

1. Патент РФ 2571686. Способ омоложения кожи лица у пациентов с анатомо-физиологическими особенностями лицевой части черепа [Текст] / О.М. Капулер, Б.Н. Сельская, **А.Г. Галеева**. – №2014143667; заявл. 28.10.2014; опубл. 25.11.2015.

2. Патент на промышленный образец №101550. Схема алгоритма коррекции суборбикалярной и среднечелюстной областей [Текст] / О.М. Капулер, Б.Н. Сельская, **А.Г. Галеева**. – №2016501792; заявл. 11.05.2016; опубл. 27.12.2016.