

*ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ*

© Галеева А.Г., 2016  
УДК 615.26.015.42:612.79

**ВЛИЯНИЕ ВНУТРИДЕРМАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ЖИВОТНЫМ ГИАЛУРОНАНА НА СОДЕРЖАНИЕ КОЛЛАГЕНА В КОЖЕ**

А.Г. ГАЛЕЕВА

Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа

**THE EFFECT OF INTRADERMAL INJECTION OF EXPERIMENTAL ANIMALS OF HYALURONAN TO THE COLLAGEN CONTENT IN THE SKIN**

A.G. GALEEVA

Bashkir State Medical University, Ufa

У 94 белых крыс-самок зрелого возраста (8-10 месяцев) исследовали содержание суммарного и нейтральносолеорастворимого коллагена, свободного гидроксипролина в коже на участках внутридермального введения препарата «Juvederm hydrate™» (Франция), содержащего 13,5 мкг/мл геля нестабилизированного высокомолекулярного (мол. масса 1 млн) гиалуронана. Препарат вводили техникой мезотерапии после предварительного удаления шерстяного покрова на боковых поверхностях туловища на 1-е сутки, через 2 и 6 суток после первой инъекции из расчета 0,06 мл геля на кг массы животного. Установлено статистически значимое повышение содержания суммарного и нейтральносолеорастворимого коллагена лишь на поздние сроки наблюдения (37-е сутки). В первые 3 недели после начала инъекции препарата существенных изменений в показателях обмена коллагена не выявлено.

*Ключевые слова:* коллаген кожи, мезотерапия нестабилизированным высокомолекулярным гиалуронаном.

At 94 white rats – females of mature age (8-10 months) was investigated the content of total and neutral salt-soluble collagen, a free hydroxyproline on skin sites of intradermal introduction of the preparation "Juvederm hydrate™" (France) containing 13,5 micrograms/ml of gel of unstabilized high-molecular (molecular weight 1 mln) hyaluron. The preparation was injected with a mesotherapy after preliminary removal of a woolen cover on side surfaces of a trunk for the first day, in two and six days after the first injection at the rate of 0,06 ml of gel per kg of an animal mass. It was found a statistically significant increase of the content of total and neutral salt-soluble collagen only in late terms of supervision (37 days) In the first three weeks after the beginning of the preparation injection essential changes in indicators of a collagen exchange are not revealed.

*Keywords:* skin collagen, mesotherapy with unstabilized high-molecular hyaluronan.

Возрастные изменения кожи, обнаруживаемые в зрелом возрасте, характеризуются ее истончением, уменьшением объема дермы, потерей эластичности, появлением мелких морщин, складчатости, прогрессированием гравитационного птоза [4]. При этом происходит снижение количества фибробластов и изменение их функционального состояния, приводящие к понижению продукции структурных компонентов внеклеточного матрикса [2, 12].

Особую роль в состоянии экстрацеллюлярного матрикса дермы играет гиалуронан, который благодаря своим уникальным физико-химическим свойствам, способностью к гидратации и формированию трехмерной сети путем нековалентных ассоциаций с протеогликанами, фибриллярными белками, гликопротеинами и клеточными элементами, определяет состояние и поддержание водного баланса, тургор, упругость и другие биомеханические характеристики кожи [7]. Гиалуронан и его фрагменты участвуют в процессах регуляции деления, дифференцировки, миграции и апоптоза клеток, проницаемости сосудов и интенсивности ангиогенеза в коже, синтеза и секреции медиаторов воспаления, защиты клеток и внутриклеточных структур от окислительного повреждения [6, 9, 10, 13]. Эти свойства гиалуронана привлекли внимание специалистов эстетической медицины, в результате инъекционные и косметические средства на его основе нашли широкое применение [6, 7, 8, 13]. Хотя уже накоплен значительный практический опыт биоревитализации при использовании этих средств, основанный преимущественно на констатации визуализируемых изменений кожи, биохимические механизмы фармакотерапевтических эффектов препаратов на основе гиалуронана требуют дальнейших исследований.

#### **Цель исследования**

Охарактеризовать содержание коллагена в коже в местах внутридермального введения препарата гиалуронана при курсовой терапии в эксперименте.

#### **Материал и методы**

Исследования проведены на 94 самках белых крыс зрелого возраста (8-10 месяцев) массой 280-320 г. При проведении экспериментов соблюдали этические нормы и рекомендации по гуманному отношению к животным. Животные были разделены на 6 групп. Под легким эфирным наркозом крысам контрольной группы внутридермально вводили стерильный физиологический раствор, а крысам опытных групп – препарат нестабилизированной гиалуроновой кислоты «Juvedern hydrate™» (Франция), содержащий 13,5 мг геля гиалуронана с мол. массой 1 млн. дальтон и 9 мг маннитола в 1 мл фосфатного буфера pH 7,2, из расчета 0,06 мл на кг массы. Инъекции осуществляли внутридермально техникой мезотерапии на боковые поверхности туловища животных (площадь 3×4 см) после предварительного удаления шерстяного покрова. Препарат вводили трижды на 1-е сутки, через 2 и 6 суток после первой инъекции. Эвтаназию животных проводили под эфирным наркозом путем мгновенной декапитации: крыс первой группы через 1 сутки после первой инъекции гиалуронана, второй группы – через 3 суток, третьей – через 6 суток, четвертой – 20 суток и пятой – 36 суток. Для исследования использовали сыворотку крови и кожу в местах введения препарата гиалуронана и физиологического раствора.

В сыворотке крови определяли содержание общего белка, креатинина, мочевины, билирубина, холестерина, триглицеридов, активность щелочной фосфатазы (ЩФ), аланиновой (АЛТ) и аспарагиновой (АСТ) трансаминаз, используя реагенты наборов «Диокон» (Пушино, Россия) 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 эксперимента.

Состояние обмена коллагена в коже оценивали по содержанию суммарного

коллагена [1] его нейтральносолеорастворимой фракции [5] и свободного гидроксипролина [1].

Для обработки результатов исследования использовали пакет прикладных программ Statistica 6,0 for Windows. В зависимости от особенностей выборки по разным переменным использовали параметрические и непараметрические методы статистики. Нормальность распределений определяли с помощью теста Колмогорова-Смирнова. При соответствии распределения признаков закону нормального распределения в группах определяли среднюю (M) и стандартную ошибку средней (m), в остальных случаях – медиану (Me) и межквартильные интервалы [Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>]. Достоверность межгрупповых различий оценивали по t-критерию Стьюдента и U-критерию Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. Различия считали значимыми при P≤0,05.

#### Результаты и их обсуждение

Введение препарата нестабилизированной высокомолекулярной гиалуроновой

кислоты внутридермально техникой мезотерапии сопровождалось некоторыми изменениями биохимического статуса животных (таблица 1). У крыс опытных групп наблюдалось в сыворотке крови статистически значимое снижение содержания белка, холестерина и триацилглицеролов, повышение активности щелочной фосфатазы на 7-е и 21-е сутки эксперимента (у животных 3-й и 4-й групп), отражая изменения биосинтетической и желчевыделительной функции печени. Реакция печени при введении высокомолекулярной гиалуроновой кислоты, а животным этих групп трижды на 1-е, 3-и и 6-е сутки эксперимента внутридермально инъецировали препарат, возможно, связана с непосредственным участием печени в поглощении и окончательном окислении продуктов деградации гиалуронана, поступающих из кожи в кровяное русло [6, 13]. На 37-е сутки наблюдения (5-я группа) у животных обнаруживаемые биохимические изменения в крови нормализовались, отражая стабилизацию функции печени.

Таблица 1

#### Биохимические показатели сыворотки крови экспериментальных животных, M ± m

Показатели	Группы животных					
	Контрольная, n=18	1-я 1-е сутки n=14	2-я, 3-и сутки n=12	3-я, 7-е сутки n=12	4-я, 21-е сутки n=16	5-я, 37-е сутки n=16
Белок, г/л	70±1,3	67±1,4	63±1,7*	64±1,0*	60±1,1**	75±3,5
Креатинин, мкмоль/л	52±3,3	45±1,3	43±3,5	50±2,5	54±1,2	57±1,8
Мочевина, ммоль/л	4,5±0,66	3,6±0,56	5,2±0,34	6,4±0,33	4,2±0,36	3,4±0,29
Билирубин, мкмоль/л	15,3±0,33	15,8±0,30	17,8±0,23	20,3±0,52	12,6±0,16	11,8±0,28
Триацилглицеролы, ммоль/л	1,0±0,18	0,8±0,16	1,3±0,15	0,5±0,08*	0,5±0,08*	1,4±0,07
Холестерин, ммоль/л	2,0±0,13	2,2±0,10	1,9±0,16	1,4±0,14*	1,4±0,16*	2,2±0,20
Щелочная фосфатаза, Ед/л	17,8±1,62	15,3±0,55	18,6±1,25	27,5±0,7*	30,0±3,8*	22,0±3,55
АЛТ, Ед/л	63,0±5,1	79,0±6,3	67,0±3,7	47,0±3,5	66,0±4,4	64,0±4,4
АСТ, Ед/л	158±6	167±10	146±4	141±6	155±5	150±8

Примечание: \* P<0,05; \*\* P<0,01 с контрольной группой

Внутридермальное введение препарата гиалуроновой кислоты экспериментальным животным приводило к изменению содержания и фракционного состава коллагена (табл. 2). К 37-м суткам наблюдения в коже обнаруживалось статистически значимое повышение как суммарного коллагена, так и его нейтрально-соле- растворимой фракции. Нейтрально-соле- растворимый коллаген является фракцией структур (тропоколлаген, протофибриллы, микрофибриллы), еще не вовлеченных в формирование коллагеновых фибрилл и волокон с образованием прочных интра- молекулярных ковалентных и других свя- зей [3]. Увеличение содержания этой

фракции в коже свидетельствует об акти- вации биосинтеза коллагенов, поскольку содержание свободного гидроксипролина, характеризующего выраженность процес- сов катаболизма этих белков, у животных опытных групп не претерпевало суще- ственных изменений. Данный эффект при введении нестабилизированной высоко- молекулярной гиалуроновой кислоты мо- жет быть связан с действием фрагментов ее ферментативной деполимеризации, ко- торые, по данным ряда авторов [7, 10, 11, 13], стимулируют пролиферацию фиброб- ластов и эндотелиальных клеток, а также их функциональную активность и биосин- тетический потенциал.

Таблица 2

**Показатели обмена коллагена кожи при внутридермальном введении высокомолекулярной нестабилизированной гиалуроновой кислоты, Ме [Q1-Q3]**

Показатели, ммоль оксипро- лина/кг сухой массы	Группа животных					
	Конт-роль 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=0,303	237 [220-254] P=0,017
Нейтрально-соле-растворимый 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	5,2 [4,7-9,0] P=0,212	6,8 [5,4-8,2] P=0,521	9,8 [7,1-14,8] P=0,048
Свободный оксипролин	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=0,107	24,3 [19,8-7,3] P=0,767	22,0 [20,0-31,0] P=0,906

*Примечание:* P по U критерию Манна-Уитни с группой контроля

**Выводы**

1. Внутридермальное введение техникой мезотерапии препарата нестабилизированного высокомолекулярного гиалуронана приводит у самок крыс зрелого возраста к повышению содержания нейтрально-соле-растворимого и суммарного коллагена в коже на участках инъекцирования в поздние сроки наблюдения.

2. При введении препарата гиалуронана у экспериментальных животных наблюдается транзиторные изменения функционального состояния печени

**Литература**

1. Биохимические методы анализа показателей обмена биополимеров соеди-

нительной ткани: методические рекоменда- ции./ П.Н. Шараев [и др.]. – Ижевск, 1990. – 22 с.

2. Возрастные изменения численно- сти и пролиферации фибробластов в коже человека / А.Г. Гунин [и др.] // Успехи геронтологии. – 2011. – Т. 24, №1. – С. 43-47.

3. Омеляненко Н.П. Соединительная ткань (гистофизиология и биохимия) / Н.П. Омеляненко, Л.И. Слуцкий; под ред. С.П. Миронова. – М.: Изд-во «Известия», 2009. – Т. 1. – 380 с.

4. Прогнозирование результатов эстетических вмешательств по механизмам старения кожи и соотношению коллагена I/II типов / Г.О. Смирнова [и др.] // Фун-

даментальные исследования. – 2012. – №7. – С. 190-194.

5. Прошина Л.Я. Исследование функционального состояния коллагена в ткани печени / Л.Я. Прошина, М.Н. Приваленко // Вопросы мед. химии – 1989. – Вып. 1. – С. 115-119.

6. Хабаров В.Н. Гиалуроновая кислота / В.Н. Хабаров, П.Я. Байков, М.А. Селянин. – М.: Практическая медицина, 2012. – 224 с.

7. Чайковская Е.А. Гиалуроновая кислота и ее фрагменты. Биологические функции в ракурсе фармакотерапии / Е.А. Чайковская, А.А. Шарова // Инъекционные методы и композиции. – 2012. – № 1. – С. 9-16.

8. A composite Dermal Filler Comprising Cross-Linked Hyaluronic Acid and Human Collagen for Tissue Reconstruction / Z-Hun Kim [et al.] // Microbiol. Biotechnol. – 2015. – Vol. 25, №3. – P. 399-406.

9. Cooper C.A. Inflammation and Hyaluronic acid / C.A. Cooper, K.K. Brown, C.D. Meletis // Alternat. Complement. Ther. – 2008. – Vol. 146, №2. – P. 78-84.

10. Ferguson E.L. Evaluation of the physical and biological properties of hyaluronan and hyaluronan fragments / E.L. Ferguson // International J. Pharm. – 2011. – Vol. 420, № 1. – P. 84-92.

11. Hyaluronan oligosaccharides promote excisional wound healing through enhanced angiogenesis / F. Gao [et al.] // Matrix. Bid. – 2010. – Vol. 29, №2. – P. 107-116.

12. Simpson R.M. Aging fibroblasts resist phenotypic maturation because of impaired hyaluronan dependent CD 44/epidermal growth factor receptor signaling / R.M. Simpson // Amer. J. Pathol. – 2010. – Vol. 176. – P. 1215-1228.

13. Stern S. Hualuronan in skin: aspects of aging and pharmacology modulation / S. Stern, H.I. Maibac // Clinics in Dermatology. – 2008. – Vol. 26, № 2. – P. 1006-1022.

---

#### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Галеева Айгуль Гафуровна – аспирант кафедры биологической химии ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России, г. Уфа.  
E-mail: aigaf@mail.ru