

А.Г. ГАЛЕЕВА

Башкирский государственный медицинский университет

ВЛИЯНИЕ ИНТЕРДЕРМАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ПРОЦЕССЫ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ В КОЖЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Изучено содержание первичных (диеновые конъюгаты), вторичных (кетодиены и сопряженные триены) и конечных (шиффовы основания) продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в гептановой и изопропаноловой фазах липидного экстракта кожи самок крыс молодого (4-5 месяцев) и зрелого (11-12 месяцев) возрастов. Установлено при старении возрастание продуктов ПОЛ. Показано, что интердермальные инъекции препарата нативной высокомолекулярной гиалуроновой кислоты методом мезотерапии животным зрелого возраста оказывают тормозящий эффект на интенсивность липопероксидации кожи.

Ключевые слова: старение, кожа экспериментальных животных, продукты липопероксидации, препарат нативной гиалуроновой кислоты

Галеева Айгуль Гафуровна – аспирант кафедры биохимии Башкирского государственного медицинского университета. E-mail: galeevmt@mail.ru

A.G. GALEEVA

Bashkir State Medical University

INFLUENCE OF INTRADERMAL HYALURONIC ACID ADMINISTRATION ON LIPOPEROKSIDATION PROCESSES IN THE SKIN OF EXPERIMENTAL ANIMALS

The content of primary (diene conjugates), secondary (ketodienes and integrated trienes) and final (basis shiffova) products of lipid peroxidation in heptanew and isopropanol phases of lipidic extract of the skin of young female rats (4-5 months) and adult female rats (11-12 months) is studied. It is established that aging increase POL products. It is shown that intradermal injections of medicine of native high-molecular hyaluronic acid by a method of mesotherapy to animals of mature age renders the skin lipoperoksidation intensity braking effect.

Key words: aging, skin of experimental animals, lipoperoksidation products, medicine of native hyaluronic acid

Aygul Gafurovna Galeeva – Postgraduate student, Department of Biochemistry. E-mail: galeevmt@mail.ru

Возрастные изменения кожи – закономерный процесс с участием генетических и эпигенетических факторов, оказывающих влияние на количество, морфологическую структуру, пролиферативную активность, функциональные возможности дермальных фибробластов, кератиноцитов, меланоцитов [1, 12, 14]. В процессах старения особое внимание уделяется действию в клетках свободных радикалов, их повреждающему эффекту на клеточные структуры в результате переокисления липидов, окислительной модификации белков, нуклеиновых кислот [1, 6, 11]. На фоне накопления свободных радикалов при старении наблюдается истощение антиокислительных резервов и нарушение мобилизации компонентов антиокислительной защиты [4, 11, 13].

Для коррекции возрастных изменений и фотостарения кожи широкое применение

нашли препараты гиалуроновой кислоты (ГК). ГК участвует не только в регуляции водного баланса, обеспечении тургора и тонуса кожи, но и процессов пролиферации, миграции и апоптоза клеток, обладает биостимулирующим действием на обменные процессы, способствует увеличению объема межклеточного вещества дермы, его структурных элементов за счет активации биосинтетической функции фибробластов, обладает противовоспалительными свойствами, участвует в обеспечении защиты клеток и внутриклеточных структур от окислительной дегградации [8, 9, 10].

Цель исследования: охарактеризовать интенсивность процессов перекисного окисления липидов кожи при внутридермальном курсовом введении препарата гиалуроновой кислоты экспериментальным животным.

Материал и методы. Эксперименты были проведены на самках крыс молодого (4-5 месяцев) и зрелого (11-12 месяцев) возраста. Животные содержались в условиях вивария при сбалансированном питании и естественном освещении. При проведении экспериментов соблюдали этические нормы и рекомендации по гуманному отношению к животным, введенные Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях, а также приказ Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 267 «Об утверждении правил лабораторной практики».

Эксперименты были проведены в два этапа. На первом этапе изучали перекисное окисление липидов (ПОЛ) в коже интактных животных молодого и зрелого возрастов. На втором этапе оценивали влияние препарата «Juvederm[®]Hydrate[™]» (Франция) на эти процессы в коже зрелых животных. Препарат содержит 13,5 мг геля гиалуроновой кислоты с молекулярной массой 1 млн. дальтон и 9 мг маннитола в 1 мл фосфатного буфера pH7,2. Введение препарата осуществляли под легким эфирным наркозом интердермально техникой мезотерапии на боковую поверхность туловища (площадь 3x3 см) после удаления шерстяного покрова из расчета 0,06 мл на 100 г массы крысы трижды на 1-е, 3-и и 6-е сутки экспе-

римента. В контрольную область кожи (другой бок туловища) внутридермально инъецировали стерильный физиологический раствор.

Животных выводили из эксперимента под легким эфирным наркозом на 2-е, 4-е, 7-е, 21-е и 37-е сутки. В коже в областях инъекции препарата ГК и физиологического раствора после удаления подкожной клетчатки определяли содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) спектрофотометрически в гептан-изопропаноловых экстрактах, первичные и вторичные продукты – по методу, описанному Волчегорским И.А., Долгушиной И.И. и др. [2], конечные – по Львовской Е.И., Волчегорским И.А. и др. [6].

Статистическую обработку результатов осуществляли, используя пакет программ Statistica 6,0 for Window, рассчитывали медиану, верхний и нижний квартили. Межгрупповые различия показателей оценивали по U-критерию Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

При изучении уровня липопероксидации в коже животных разного возраста (таблица 1) были выявлены статистически значимые различия в содержании первичных (диеновые конъюгаты радикалов жирных кислот), вторичных (кетодиены и сопряженные триены) и конечных (шиффовы основания) продуктов.

Таблица 1

Уровень продуктов, липопероксидации в коже самок крыс разного возраста

Показатели, условные ед.	Возрастная группа		P
	Молодые (4-5 мес.), n=10	Зрелые (11-12 мес.), n=12	
диеновые конъюгаты (гептановая фаза)	0,263 [0,178-0,291]	0,276 [0,218-0,361]	0,1593
кетодиены и сопряженные триены (гептановая фаза)	0,102 [0,094-0,133]	0,139 [0,134-0,150]	0,0190
шиффовы основания (гептановая фаза)	0,011 [0,010-0,014]	0,016 [0,013-0,022]	0,0172
диеновые конъюгаты (изопропаноловая фаза)	0,138 [0,128-0,156]	0,200 [0,177-0,234]	0,0056
кетодиены и сопряженные триены (изопропаноловая фаза)	0,205 [0,186-0,267]	0,291 [0,284-0,296]	0,0001
шиффовы основания (изопропаноловая фаза)	0,054 [0,035-0,066]	0,076 [0,054-0,087]	0,0130

У группы зрелых животных обнаружилось увеличение продуктов липопероксидации как в гептановой фазе, в которую преимущественно экстрагируются нейтральные липиды, так и в изопропаноловой фазе, содержащей в основном полярные (дифильные) липиды. Полученные результаты не противоречат данным авторов, также констатировавших увеличе-

ние содержания продуктов ПОЛ и нарастающую интенсивность хемилюминесценции гомогенатов кожи в зависимости от возраста животных [3, 11].

Результаты изучения влияния инъекций препарата ГК на липопероксидацию в коже зрелых животных представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2

**Содержание продуктов липопероксидации в гептановой фазе
липидного экстракта из кожи самок крыс при внутридермальном
введении препарата гиалуроновой кислоты**

Группы животных		Диеновые конъюгаты	Кетодиены и сопряженные триены	Шиффовы основания
Интактные, n=12		0,276 [0,218-0,361]	0,139 [0,134-0,150]	0,016 [0,013-0,022]
2-е сутки, n=8	Контр.	0,439 [0,384-0,469] P=0,0001	0,179 [0,173-0,188] P=0,0036	0,019 [0,015-0,023] P=0,0731
	Опытн.	0,365 [0,312-0,407] P=0,0034 P1=0,0216	0,172 [0,146-0,182] P=0,0051 P1=0,4466	0,018 [0,013-0,025] P=0,6930 P1=0,0813
4-е сутки, n=10	Контр.	0,450 [0,403-0,468] P=0,0008	0,191 [0,18-0,198] P=0,0029	0,024 [0,018-0,031] P=0,0159
	Опытн.	0,309 [0,30-0,34] P=0,0321 P1=0,0015	0,150 [0,132-0,169] P=0,0740 P1=0,0044	0,021 [0,016-0,035] P=0,0425 P1=0,0832
7-е сутки, n=8	Контр.	0,435 [0,401-0,444] P=0,0004	0,182 [0,167-0,204] P=0,0162	0,022 [0,016-0,032] P=0,0363
	Опытн.	0,307 [0,283-0,336] P=0,0506 P1=0,0237	0,136 [0,121-0,157] P=0,7348 P1=0,0170	0,020 [0,014-0,031] P=0,0618 P1=0,1162
21-е сутки, n=10	Контр.	0,272 [0,196-0,353] P=0,9492	0,137 [0,118-0,17] P=0,9613	0,017 [0,013-0,025] P=0,6132
	Опытн.	0,281 [0,21-0,36] P=0,4276 P1=0,1365	0,131 [0,114-0,188] P=0,7223 P1=0,4256	0,014 [0,009-0,018] P=0,0675 P1=0,0423
37-е сутки	Контр.	0,284 [0,206-0,317] P=0,6038	0,142 [0,116-0,176] P=0,7155	0,017 [0,014-0,024] P=0,0744
	Опытн.	0,265 [0,187-0,294] P=0,1593 P1=0,0831	0,132 [0,109-0,156] P=0,2829 P1=0,0538	0,014 [0,008-0,019] P=0,0711 P1=0,0476

Примечание: P-различия с группой интактных животных, P₁ – с контрольной областью кожи.

Таблица 3

**Содержание продуктов перекисного окисления липидов
в изопропановой фазе липидного экстракта кожи при внутридермальном
введении препарата гиалуроновой кислоты**

Группы животных		Диеновые конъюгаты	Кетодиены и сопряженные триены	Шиффовы основания
Интактные, n=12		0,200 [0,171-0,234]	0,291 [0,284-0,375]	0,076 [0,054-0,087]
2-е сутки, 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
	Опытн.	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 [0,07-0,121] P=0,0508 P1=0,6101
4-е сутки, 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
	Опытн.	0,218 [0,182-0,242] P=0,0568 P1=0,0246	0,307 [0,285-0,343] P=0,0504 P1=0,0488	0,098 [0,081-0,134] P=0,0418 P1=0,0608
7-е сутки, n=8	Контр.	0,273 [0,211-0,304] P=0,0039	0,342 [0,296-0,382] P=0,0174	0,110 [0,10-0,138] P=0,0228
	Опытн.	0,214 [0,184-0,246] P=0,0833 P1=0,0114	0,310 [0,280-0,344] P=0,0516 P1=0,0576	0,077 [0,062-0,110] P=0,9008 P1=0,0353

21-е сутки, n=10	Контр.	0,211 [0,179-0,241] P=0,6834	0,306 [0,277-0,324] P=0,4526	0,084 [0,07-0,093] P=0,0611
	Опытн.	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-е сутки n=10	Контр.	0,209 [0,17-0,235] P=0,6113	0,290 [0,282-0,303] P=0,5217	0,077 [0,060-0,089] P=0,8905
	Опытн.	0,186 [0,149-0,237] 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

Примечание: P-различия с группой интактных животных, P₁ – с контрольной областью кожи.

Внутридермальные инъекции и препарата ГК и физраствора на следующие сутки после процедуры приводили к увеличению в гептановой фазе продуктов ПОЛ. На 21-е и 37-е сутки эксперимента содержание продуктов липопероксидации в контрольной области кожи не отличалось от уровня у животных интактной группы. В коже в области введения препарата ГК статистически значимое снижение концентрации первичных и вторичных продуктов ПОЛ по сравнению с контрольной областью обнаруживалось на 4-е и 7-е сутки опыта, или после повторных инъекций препарата, а конечных продуктов – лишь в более поздние сроки исследования.

Близкая динамика изменений содержания продуктов ПОЛ кожи была выявлена и при определении изопренололевой фазы липидного экстракта кожи (таблица 3). И в этой фазе, преимущественно содержащей фосфолипиды биологических мембран, наблюдалось повышение уровня продуктов липопероксидации в первые дни эксперимента.

Как в области инъекции препарата ГК, так и физиологического раствора, на 21-е и 37-е сутки существенных различий показателей липопероксидации в коже опытных и интактных животных не выявлялись.

Однако в коже в области введений препарата ГК содержание диеновых конъюгатов на 2-е, 4-е и 7-е сутки, кетодиенов и сопряженных триенов, шиффовых оснований на 7-е сутки эксперимента было статистически значимо ниже, чем в контрольных участках кожи.

Повышение интенсивности липопероксидации в коже в области инъекции физиологического раствора и препарата гиалуроновой кислоты на следующие сутки после проведения процедуры мезотерапии, вероятно, связано с проявлением тканевого ответа и с развитием воспалительной реакции на травмирую-

щее воздействие. Так, по данным Н.П. Михайловой и соавт. [7], при подкожной инъекции геля высокомолекулярной немодифицированной ГК экспериментальным животным в местах введения наблюдалось развитие асептического воспаления с нейтрофильной инфильтрацией на первые сутки, которая в последующем сменялась лимфоцитарно-макрофагальной на более поздних сроках.

Таким образом, результаты проведенных исследований показывают, что интердермальное инъекционное введение препарата гиалурона методом мезотерапии в первые сутки приводит к активации липопероксидации в коже в области введения препарата и физиологического раствора. Высокомолекулярная немодифицированная гиалуроновая кислота при этом проявляет антиоксидантное действие, снижая содержание в коже продуктов перекисного окисления липидов.

Выводы

При физиологическом старении в коже экспериментальных животных происходит увеличение содержания продуктов перекисного окисления липидов – диеновых конъюгатов, кетодиенов и сопряженных триенов, шиффовых оснований.

Интердермальное введение препарата нативной высокомолекулярной гиалуроновой кислоты способствует снижению содержания продуктов липопероксидации в коже экспериментальных животных зрелого возраста.

Список литературы

1. Болдарев А. А., Мальцева В. А. Окислительный стресс и старение организма // Косметика и медицина. – 2002. – № 4. – С.15-25.
2. Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.А., Цейликман В.Э. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакции организма. Челябинск: изд-во Челябинского педагогического университета. – 2000. – С. 21-28.
3. Ермакова Е.Ю. Перекисное окисление липидов и барьерная функция кожи в услови-

ях старения организма: Автореф. дисс. ...канд. мед. наук: 03.00.04 –Биохимия. – Челябинск, 2005 – 22 с.

4. Кошевенко Ю.Н. Кожа человека. Том 1. Структура, физиология и предназначение функциональных элементов кожного органа человека. – М.: Медицина, 2006. – 360 с.

5. Кубанов А.А., Жилова М.Б., Кубанова А.А. Фотостарение кожи: механизмы развития, особенности клинических проявлений // Вестник дерматологии и венерологии. – 2012. – №5. – С. 53-59.

6. Львовская Е.И., Волчегорский И.А., Шеляков Е.Е., Лифшиц Р.И. Спектрофотометрическое определение конечных продуктов перекисного окисления липидов // Вопросы медицинской химии. – 1991. – № 4. – С. 92-94.

7. Михайлова Н.П., Шехтер А.Б., Руденко Т.Г. Морфологическое исследование результатов подкожного введения гелей немодифицированной и модифицированной гиалуроновой кислоты // Мезотерапия. – 2013. – № 24/04. – С. 6-16.

8. Хабаров В.Н., Байков П.Я., Сеянин М.А. Гиалуроновая кислота. – М.: Практическая медицина, 2012. – 224 с.

9. Чайковская Е.А., Парсагашвили Е.З. Гиалуроновая кислота: биологический контроль над воспалением и ранозаживлением // Инъекционные методы в косметологии. – 2011. – № 4. – С. 20-29.

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

11. Ястребов А.П., Мещанинов В.Н. Старение, перекисное окисление липидов и биовозраст. Екатеринбург: ООО «Уральский следопыт». – 2005. – 220 с.

12. Lee D.E., Cho K.H. The effects of epidermal Keratinocytes and dermal fibroblasts on the formation of cutaneous basement membrane in three dimensional culture systems // Arch.Dermatol. Res. – 2005. – Vol. 296 (7). – P. 296-302.

13. Levine R.L., Stadtman E.R. Oxidative modification of proteins during ageing // Exp. Gerontol. – 2001. – Vol. 36 (9). – P.495-1502.

14. Sorrell M., Caplan A.I. Fibroblasts – a diverse population at the center of it all // Int.Rev. Cell Molecul.Biol. – 2009. – Vol. 276. – P.161-214.