

УДК 577.122:547.995.15:615.032.77:[612.66:611.77]-092.9

## ВЛИЯНИЕ ВНУТРИДЕРМАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ КОЖИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Камилов Ф.Х., Капулер О.М., Галеева А.Г.

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа, e-mail: [olgakapuler@rambler.ru](mailto:olgakapuler@rambler.ru)

Изучена окислительная модификация белков кожи у самок белых крыс молодого (4-5 месяцев) и зрелого (11-12 месяцев) возрастов. Установлено, что с увеличением возраста в коже происходит повышение содержания альдегид- и кетондинитрофенилгидразонов. В другой серии экспериментов оценивали влияние внутридермального введения препарата немодифицированной высокомолекулярной гиалуроновой кислоты методом мезотерапии на выраженность карбонилирования белков кожи зрелых животных. Препарат инъецировали на 1-е, 3-и и 6-е сутки эксперимента на боковую поверхность туловища (площадь 3x3 см) после удаления шерстяного покрова. В контрольную область (другой бок туловища) аналогичным образом вводили стерильный физиологический раствор. На 2-е, 4-е, 7-е, 21-е и 37-е сутки изучали окислительную модификацию белков кожи контрольной и опытной областей туловища. Результаты исследования позволили прийти к заключению, что внутридермальное курсовое введение препарата немодифицированной высокомолекулярной гиалуроновой кислоты приводит в коже животных зрелого возраста снижению уровня продуктов карбонилирования белков, проявляя антиоксидантные свойства.

**Ключевые слова:** высокомолекулярная гиалуроновая кислота, внутридермальное введение, окислительная модификация белков кожи

## INFLUENCE OF INTERDERMAL INJECTION OF HYALURONIC ACID ON INTENSITY OF OXIDIZING MODIFICATION OF SKIN PROTEINS OF EXPERIMENTAL ANIMALS

Kamilov F.Kh., Kapuler O.M., Galeeva A.G.

FSBEI of Higher Education «The Bashkir state medical university» of the Russian Ministry of Public Health, Ufa, e-mail: [olgakapuler@rambler.ru](mailto:olgakapuler@rambler.ru)

Oxidizing modification of proteins of skin at females of white rats young (4-5 months) and mature (11-12 months) age is studied. It is established that the older the rat, the more ketondinitrophenilgidrazone in skin it contents. In other series of experiments it is estimated an influence of interdermal injection of medicine of unmodified high-molecular hyaluronic acid by a mesotherapy method on expressiveness of carbonylation of leather proteins of mature animals. Medicine injected on the 1st, 3rd and 6th days of an experiment on the side surface of a trunk (the area 3\*3sm) after removal of a woolen cover. Into the control area (other side of a trunk) similarly entered sterile physiological solution. For the 2nd, 4th, 7th, 21st and 37th days it is studied oxidizing modification of proteins of skin of control and skilled areas of a trunk. Results of a research have allowed to come to conclusion that interdermal injection course of medicine of unmodified high-molecular hyaluronic acid gives decrease in level of products of carbonylation of proteins in leather of animals of mature age, showing antioxidant properties.

**Keywords:** high-molecular hyaluronic acid, interdermal introduction, oxidizing modification of proteins of skin

С возрастом в коже происходят закономерные изменения количества, морфологической структуры, функциональных возможностей и пролиферативной активности клеток – дермальных фибробластов, кератиноцитов, меланоцитов и др. [6, 10]. В эпигенетических факторах старения особое внимание уделяется действию свободных радикалов, их повреждающему эффекту на клеточные структуры в результате окислительной модификации белков и нуклеиновых кислот, перекисления липидов [6, 8]. Ряд авторов считают белки главными мишенями для активных форм кислорода из-за своей высокой чувствительности к свободным радикалам и распространенности в биологических материалах [4, 8]. Нельзя упускать из внимания при этом ответственность белков за большинство функциональных процес-

сов в клетке. Окислительная модификация белков связана как с процессами ковалентного их преобразования, вызванного непосредственным воздействием активных форм кислорода, так и последствиями взаимодействия с вторичными побочными продуктами перекисного окисления липидов (малоновый диальдегид, 4-гидрокси-2-ноненаль [4, 7]. Формирование окислительной модификации белков происходит и при смещении баланса антиоксидантов и прооксидантов в пользу вторых в условиях истощения антиоксидантной системы, которое наблюдается при старении [2, 8, 11]. Окислительной модификации могут подвергаться радикалы почти всех аминокислот. Это сопровождается изменением пространственной организацией белковых молекул, повышением их агрегации, фрагментации, гидрофобности и чувстви-

тельности к протеолизу. При старении происходят существенные модификации белков экстрацеллюлярного матрикса, приводящее к понижению в дерме коллагенов типа I, III и VII. В отличие от нефибриллярных белков при старении структура коллагена изменяется в сторону повышения их жесткости и устойчивости к действию протеиназ [9].

Для коррекции фотостарения и возрастных изменений кожи в косметологической практике широко применяются препараты гиалуроновой кислоты (ГК). ГК, являясь одним из важных биополимеров дермы, участвует в регуляции водного баланса, обеспечении тургора, тонуса и эластичности кожи, процессов апоптоза, пролиферации и миграции клеток, обладает биостимулирующим действием на обменные процессы, способствует увеличению объема межклеточного вещества дермы, его структурных элементов вследствие активации биосинтетической функции фибробластов, обладает противовоспалительными свойствами, участвует в обеспечении защиты клеток и внутриклеточных структур от окислительной дегградации [1, 5].

#### Цель исследования

Охарактеризовать интенсивность окислительной модификации белков кожи при внутридермальном курсовом введении препарата нативной высокомолекулярной гиалуроновой кислоты.

#### Материалы и методы исследования

Опыты проведены на самках крыс молодого (4-5 месяцев) и зрелого (11-12 месяцев) возраста. Животные содержались в условиях вивария при сбалан-

сированном питании и естественном освещении. При проведении экспериментов были соблюдены этические нормы и рекомендации по гуманному отношению к животным, введённые Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях, а также приказ Минздрава РФ № 267 «Об утверждении правил лабораторной практики» от 19.06.2003 г.

Эксперименты были проведены в два этапа. Вначале оценивали выраженность окислительной модификации белков в коже интактных крыс молодого и зрелого возрастов. На втором этапе изучали влияние препарата «Jvederm<sup>®</sup>Hydrate<sup>™</sup>» («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 1мл фосфатного буфера pH 7,2. Введение препарата осуществляли под лёгким эфирным наркозом внутридермально техникой мезотерапии на боковую поверхность туловища (площадь 3x3 см) после удаления шерстяного покрова из расчёта 0,06 мл на 100 г массы тела трижды на 1-е, 3-и и 6-е сутки эксперимента. В контрольную область кожи (другой бок туловища) аналогичным образом инъецировали стерильный физиологический раствор. Из эксперимента животных выводили под лёгким эфирным наркозом на 2-е, 4-е, 7-е, 21-е и 37-е сутки опыта. В коже в областях инъекции препарата гиалуронана и физиологического раствора определяли уровень окислительной модификации белков по регистрации 2,4-динитрофенилгидразонов спектрофотометрически при 270 нм (алифатические альдегиддинитрофенилгидразоны нейтрального характера), при 370 нм (алифатические кетондинитрофенилгидразоны нейтрального характера), при 430 нм (алифатические кетондинитрофенилгидразоны основного характера) [1, 4]. Для оценки активности антиоксидантной системы изучали содержание карбонилированных белков разного характера в ответ на индукцию свободнорадикального окисления системой Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в пробирочных условиях.

**Таблица 1**

Уровень окислительной модификации белков кожи у самок крыс разных возрастных групп

Показатели	Возрастные группы		P
	Молодые (4-5 мес.), n = 10	Зрелые (11-12 мес.), n = 12	
Алифатические АДНФГ, Ед/г белка	0,478 [0,452-0,521]	0,503 [0,448-0,533]	0,1259
Алифатические АДНФГ при индукции, Ед/г белка	1,206 [0,943-1,301]	0,964 [0,758-1,281]	0,0134
Алифатические КДНФГ нейтрального характера (мкмоль/г белка) базальный уровень (б)	16,8 [12,6-20,8]	19,6 [14,2-23,6]	0,0262
Алифатические КДНФГ нейтрального характера (мкмоль/г белка) при индукции (и)	186,3 [174,2-199,3]	182,4 [166,5-200,8]	0,8634
Алифатические КДНФГ основного характера (мкмоль/г белка) базальный уровень (б)	4,15 [3,80-4,94]	5,11 [4,61-6,04]	0,0443
Алифатические КДНФГ основного характера (мкмоль/г белка) при индукции (и)	26,4 [19,3-31,2]	24,9 [16,6-26,3]	0,6217

Таблица 2

Влияние интердермального введения препарата нативного высокомолекулярного гиалуронана на интенсивность окислительной модификации белков (мкмоль/г белка) кожи крыс зрелого возраста

Группа животных	а КДНФГ нейтрального характера		а КДНФГ основного характера	
	Базальный уровень	При индукции	Базальный уровень	При индукции
Интактные, n = 12	19,6 [14,2-23,6]	182,4 [166,5-200,8]	5,11 [4,61-6,04]	24,9 [16,6-26,3]
2-е сутки, n = 10	К 27,6 [19,8-34,1] P = 0,036	176,8 [164,0-184,3] P = 0,324	8,18 [5,12-10,13] P = 0,017	21,4 [17,3-25,8] P = 0,046
	On 22,8 [14,8-25,6] P = 0,124 P <sub>1</sub> = 0,034	201,4 [170,6-230,4] P = 0,135 P <sub>1</sub> = 0,076	6,03 [4,12-7,86] P = 0,079 P <sub>1</sub> = 0,042	27,7 [20,3-33,8] P = 0,043 P <sub>1</sub> = 0,036
4-е сутки, n = 8	К 29,6 [24,3-36,2] P = 0,011	170,6 [160,2-182,3] P = 0,050	8,76 [5,3-11,16] P = 0,020	21,9 [19,5-30,4] P = 0,038
	On 28,3 [20,3-33,6] P = 0,033 P <sub>1</sub> = 0,663	214,7 [182,3-221,6] P = 0,067 P <sub>1</sub> = 0,042	7,07 [4,9-9,15] P = 0,013 P <sub>1</sub> = 0,036	28,1 [21,4-34,6] P = 0,047 P <sub>1</sub> = 0,029
7-е сутки, n = 10	К 29,5 [23,6-33,8] P = 0,021	168,2 [160,1-181,6] P = 0,042	9,15 [5,71-12,09] P = 0,012	20,4 [16,6-24,2] P = 0,035
	On 25,7 [21,4-30,6] P = 0,040 P <sub>1</sub> = 0,044	224,0 [192,3-241,6] P = 0,038 P <sub>1</sub> = 0,039	8,06 [4,77-10,16] P = 0,011 P <sub>1</sub> = 0,05	28,0 [20,9-33,6] P = 0,045 P <sub>1</sub> = 0,031
21-е сутки, n = 10	К 19,9 [15,6-24,4] P = 0,709	180,5 [159,4-200,5] P = 0,897	5,81 [4,02-7,16] P = 0,264	23,6 [18,3-31,5] P = 0,794
	On 19,0 [16,6-22,8] P = 0,687 P <sub>1</sub> = 0,831	194,9 [175,6-197,3] P = 0,068 P <sub>1</sub> = 0,218	6,02 [4,72-7,16] P = 0,121 P <sub>1</sub> = 0,727	26,3 [24,1-28,8] P = 0,741 P <sub>1</sub> = 0,071
37-е сутки, n = 10	К 20,2 [14,7-25,2] P = 0,707	188,8 [172,4-201,6] P = 0,713	5,67 [3,85-6,44] P = 0,426	22,8 [17,3-26,6] P = 0,631
	On 17,4 [13,4-22,7] P = 0,051 P <sub>1</sub> = 0,047	196,3 [180,3-214,3] P = 0,061 P <sub>1</sub> = 0,233	5,05 [3,56-5,72] P = 0,831 P <sub>1</sub> = 0,374	26,8 [20,1-30,6] P = 0,637 P <sub>1</sub> = 0,045

Примечание: К-контрольный участок кожи, Оп-опытный участок кожи.

Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием пакета программ Statistica 6,0 for Windows, рассчитывали медиану, верхний и нижний квартили, межгрупповые различия показателей оценивали по U-критерию Манна-Уитни.

#### Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследования (табл. 1) белков кожи группы животных зрелого возраста показывают, что некоторое увеличение содержания алифатических альдегиднитро-

фенилгидразонов (а АДНФГ) по сравнению с группой крыс молодого возраста не достигает статической значимости ( $P = 0,1259$ ), но базальные уровни алифатических кетондинитрофенилгидразонов (а КДНФГ) и нейтрального, и основного характера преобладают ( $P = 0,0262$  и  $P = 0,0443$  соответственно). При индукции образования радикалов путём добавления в реакционную среду пероксида водорода и ионов двухвалентного железа наблюдалось более интенсивное образование альдегидных про-

дуктов карбонилирования белков кожи животных молодого возраста, отражая в коже молодых большую емкость антиоксидантной системы. Однако при определении содержания кетондинитрофенилгидразонов на фоне индукции свободнорадикальных процессов существенных различий между возрастными группами не обнаружилось.

В целом анализ полученных результатов позволяют констатировать, что имеются возрастные различия в интенсивности окислительной модификации белков кожи. Ряд авторов отмечает, что альдегидные производные карбонилирования белков являются маркерами их ранней окислительной модификации, а кетонные производные – маркерами более поздних изменений, характеризующие степень окислительной деструкции белковой молекулы [1, 4]. Исходя из этих позиции, можно предположить, что с возрастом в белках кожи увеличивается содержание белков, подверженных более глубокой окислительной модификации.

Результаты изучения влияния препарата ГК на интенсивность карбонилирования белков кожи животных зрелого возраста представлены в табл. 2.

На 2-е, 4-е и 7-е сутки эксперимента на следующие сутки после трёхкратного введения препарата ГК и физиологического раствора в зонах инъекций наблюдался статистически значимое увеличение аКДНФГ нейтрального и основного характера. На более поздние сроки наблюдения (21-е и 37-е сутки) интенсивность карбонилирования белков кожи не отличалась от уровня животных интактной группы. В то же время на участках введения препарата ГК на 2-е, 4-е и 7-е сутки базальный уровень аКДНФГ основного характера, на 2-е и 7-е сутки – нейтрального характера она была статистически значимо ниже, чем в контрольной зоне.

При индукции свободнорадикальных процессов добавлением пероксида водорода и ионов двухвалентного железа содержание аКДНФГ нейтрального характера на 4-е и 7-е сутки, основного характера на 2-е, 4-е и 7-е сутки на участках интердермального введения препарата ГК было статистически значимо больше, чем в контрольных участках, свидетельствуя о более высоком уровне антиоксидантной защиты.

Увеличение интенсивности окислительной модификации белков в участках внутридермального введения препарата ГК и физиологического раствора на следующие сутки после проведения процедуры мезотерапии, по всей видимости, связано с характером тканевого ответа кожи с развитием воспалительной реакции на травмирующее воздействие. При подкожном вве-

дении экспериментальным животным геля немодифицированной высокомолекулярной ГК некоторые авторы [7] в местах инъекции на первые сутки наблюдали развитие асептического воспаления с нейтрофильной инфильтрацией, которая позднее сменялась лимфоцитарно-макрофагальной.

Таким образом, результаты проведённых исследований позволяют прийти к заключению, что интердермальное инъекционное введение методом мезотерапии в первые сутки после процедуры приводит к активации окислительной модификации белков кожи в участках введения препарата. Немодифицированная высокомолекулярная гиалуроновая кислота при этом проявляет антиоксидантные свойства, снижая содержание в коже продуктов карбонилирования белков.

### Выводы

1. При биологическом старении в коже экспериментальных животных происходит увеличение окислительной модификации белков, о чём свидетельствует нарастание с возрастом содержания продуктов карбонилирования.

2. Интердермальное введение препарата высокомолекулярной нативной гиалуроновой кислоты способствует снижению содержания алифатических кетондинитрофенилгидразонов белков кожи экспериментальных животных зрелого возраста, проявляя антиоксидантные свойства.

### Список литературы

1. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биологические аспекты. – СПб.: Изд-во «Медицинская пресса», 2006. – 400 с.
2. Капулер О., Галеева А., Сельская Б., Камилев Ф. Гиалуронат: свойства и биологическая роль // *Врач*. – 2015. – № 2. – С. 25-27.
3. 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.
4. Фомина М.А., Абаленихина Ю.В. Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях: методические рекомендации. – Рязань: РИО РязГМУ. – 2014. – 60 с.
5. 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.
6. Ястребов А.П., Мещанинов В.Н. Старение, перекисное окисление липидов и биовозврат. – Екатеринбург: ООО «Уральский следопыт», 2005. – 220 с.
7. Baraibar M.A., Ladonce R., Friguet B. Proteomic quantification and identification of carbohydrate proteins upon oxidative stress and during cellular aging // *J. Proteomic*. – 2013. – Vol. 92. – P. 67-70.
8. Hawkins C.L., Morgan P.E., Davies M.J. Quantification by oxidants // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2009. – Vol. 46 – P. 965-988.
9. Robins S.P. Biochemistry and functional significance of collagen cross-linking. – *Biochem. Soc. Trans.* – 2007. – Vol. 35, № 5 – P. 849-852.
10. Sorrell M., Caplan A.I. Fibroblasts – a diverse population at the center of all. // *Int. Rev. Cell Molecular Biol.* – 2009. – Vol. 276. – P. 161-214.