

**Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Башкирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России)**

На правах рукописи

Галеева Айгуль Гафуровна

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

03.01.04 – Биохимия

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель: доктор медицинских наук,
профессор, заслуженный деятель науки РФ и РБ

Камилов Феликс Хусаинович

Научный консультант: доктор медицинских наук,

Капулер Ольга Марселевна

Уфа – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. Обзор литературы	12
1.1. Биохимические и молекулярно-биологические механизмы и проявления старения кожи	12
1.2. Особенности структуры, физико-химических свойств, обмена и физиологических функций гиалуронана	18
1.3. Инъекционные средства на основе гиалуроновой кислоты, применяемые в косметологии	32
ГЛАВА 2. Материал и методы исследования	41
2.1. Материал исследования	41
2.2. Биохимические методы исследования	42
2.3. Гистологические и иммуногистохимические исследования	55
2.4. Статистическая обработка результатов	56
ГЛАВА 3. Результаты собственных исследований	58
3.1. Характеристика биохимических констант сыворотки крови экспериментальных животных при внутридермальном введении гиалуроновой кислоты	58
3.2. Состояние углеводного обмена кожи экспериментальных животных в области интрадермального введения гиалуронана	59
3.3. Интенсивность липопероксидации и уровень окислительной модификации белков кожи в зоне внутридермального введения гиалуроновой кислоты	65
3.4. Влияние внутридермального введения гиалуронана на содержание коллагена в коже в области мезотерапии	88
3.5. Динамика содержания некоторых цитокинов в сыворотке крови экспериментальных животных при интрадермальном введении гиалуроновой кислоты	93

3.6. Характеристика изменений гистологической структуры кожи экспериментальных животных в области введения гиалуроновой кислоты..99

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	125
ВЫВОДЫ	138
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	140
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	142

ВВЕДЕНИЕ

Старение – закономерный процесс у живых организмов, характеризующийся постепенностью, неуклонным прогрессированием, затрагивающим все уровни биологической организации [42]. Достаточно ранние и заметные возрастные изменения демонстрирует кожа. Это стимулирует изучение механизмов, лежащих в основе старения, и поиск оптимальных средств и подходов, задерживающих развитие инволюционных процессов.

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. Алгоритм лечебных подходов при этом диктуется этиопатогенетической обоснованностью, предсказуемостью эффекта, удобством использования и другими требованиями [48], он стратегически должен быть направлен на создание физиологических условий для повышения метаболической активности клеток кожи с улучшением обмена экстрацеллюлярного матрикса дермы [95].

Одним из наиболее физиологических и безопасных методов в инъекционной косметологии с этих позиций является введение препаратов нативной и частично стабилизированной гиалуроновой кислоты, которые нашли повсеместное распространение [13, 37, 522, 62, 95, 209, 251, 256], что, вероятно, объясняется рядом причин, связанных с особенностями структуры, свойств и биологических функций гиалуронана.

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 гиалуроновой кислотой дермы; в-третьих, гиалуронан – один из основных компонентов межклеточного

матрикса дермы и участвует в различных внеклеточных и внутриклеточных метаболических процессах [100, 174].

С начала применения препаратов гиалуронана в косметологии изменились источники сырья (от животного происхождения до биоинженерного производства), концепция состава (от двухфазных к монофазным), расширился потенциальный спектр показаний к применению, появились препараты, содержащие преимущественно стабилизированную низкомолекулярную гиалуроновую кислоту, а также модифицированную витаминами, аминокислотами и олигопептидами [60, 95, 157, 237].

В России одобрена и разрешена к применению большая группа препаратов на основе гиалуроновой кислоты. 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, противоречивы и недостаточны для понимания тех процессов, которые лежат в основе действия этой группы препаратов [16, 100, 101, 120, 123, 124, 138, 153, 157, 185, 188, 252, 256, 275]. В то же время очевидно, что сбалансированность процессов синтеза и деградации гиалуронана, направленной 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 гиалуронан уровень общего и нейтральносолеорастворимого коллагена, свободного гидроксипролина.

4) Определить содержание в сыворотке крови некоторых цитокинов (IGF-1, TGF- β 1, IL-1 β , TNF- α).

5) Оценить в области введения полисахарида гистоморфологические изменения кожи.

Научная новизна

Результаты работы позволили получить новые данные, характеризующие влияние нестабилизированной высокомолекулярной гиалуроновой кислоты на биохимические процессы в коже в области её внутридермального введения.

Впервые в зоне интрадермального введения высокомолекулярной нативной гиалуроновой кислоты охарактеризовано состояние углеводного обмена кожи. Показано усиление анаэробного окисления углеводов с мобилизацией гликогена в течение первой недели после начала введения гиалуронана, интенсификация окисления с активацией гексозодифосфатного и гексозомонофосфатного путей окисления 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 гиалуроновой кислоты проявляет антиоксидантное действие, снижая накопление в коже продуктов перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков, препятствуя снижению активности основных антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы и каталазы.

Установлено, что при внутридермальном введении гиалуронана методом мезотерапии в ткани кожи экспериментальных животных в течение недели наблюдаются признаки асептической воспалительной реакции (отек тканей, разрыхление 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 ($TGF-\beta1$), 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, вызывает в коже невыраженный асептический воспалительный ответ ткани, проявляющийся развитием отека,

признаками разряжения волокнистых пучков в дермальной пластинке и небольшим диффузным скоплением макрофагальных клеток. Показано, что при этом в коже происходят метаболические изменения: усиление анаэробного окисления углеводов с мобилизацией гликогена, активация процессов свободнорадикального окисления липидов и белков кожи, интенсификация продукции цитокинов провоспалительного (IL-1 β , TNF- α) и противовоспалительного (TGF- β 1) характера действия.

Показано также, что гиалуронан проявляет антиоксидантный эффект, препятствуя активации в коже процессов липопероксидации и карбонилирования белков.

Выявлено, что внутридермальное введение высокомолекулярной гиалуроновой кислоты 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 под влиянием экзогенной гиалуроновой кислоты активных макрофагов с экспрессией ростовых факторов –IGF1, TGF- β 1, FGF-1. Усиление аэробного окисления углеводов подихотомическому и апотомическому 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 гиалуроновой кислоты 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» (заявка № 2014143667 от 26.10.2014г.) и патент на промышленный образец № 101551 от 27.12.2016г. «Схема алгоритма коррекции возрастных изменений верхней трети лица» (заявка № 2016501793 от 11.05.2016г.).

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 гиалуроной кислоты методом мезотерапии сопровождается активацией процессов свободнорадикального окисления липидов и белков кожи. Гиалуроновая кислота при этом оказывает антиоксидантный эффект.

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

4. В механизмах действия на кожу внутридермально введённой экзогенной гиалуроновой кислоты 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 Statistika 6,0 forWindows.

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: 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); совместном заседании проблемной комиссии и кафедры биологической химии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол от 07.07.2017).

Внедрение результатов исследования в практику

Основные результаты диссертационного исследования используются в практической деятельности: ЗАО «Косметологическая лечебница» г. Уфа (акт от 01.06.2017 г.); включены в лекционный курс кафедры биологической химии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России (акт от 02.06.2017 г.) и учебный процесс кафедры ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России (июль, 2017 г.).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 7 научных работ, из них 4 - в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень Российских рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертации. Остальные работы опубликованы в материалах региональных, российских и международных конференций и симпозиумов, получено патент на изобретение и патент на промышленный образец.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 174 страницах машинописного текста, содержит 12 таблиц, 38 рисунков. 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Биохимические и молекулярно-биологические механизмы и проявления старения кожи

Старение – биологический процесс, характеризующийся обменными, структурными и функциональными изменениями клеточных структур тканей [48]. Процесс старения нарастает во времени, сопровождается формированием сцепленных с ним болезней, увеличением вероятности смерти.

Для процесса старения характерны: 1) гетерохронность – различие во времени наступления старения отдельных тканей, органов и систем; 2) гетеротропность – неодинаковая выраженность в различных органах, в различных структурах одного и того же органа; 3) гетерокинетичность – различная скорость развития возрастных изменений в различных органах и системах; 4) гетерокатефтенность – разнонаправленность возрастных изменений (активация одних и подавление других процессов) [42, 112].

Эти изменения у людей одного и того же возраста имеют существенные индивидуальные различия, связанные с особенностями генетического аппарата и его фенотипической реализацией, своеобразием биохимического гомеостаза и нейроэндокринной регуляции, обеспечивающей активность нервной, сердечно-сосудистой, дыхательной, иммунной и других систем, а также образом жизни, физической активностью, характером питания, вредными привычками, стрессом, условиями окружающей среды и др.

Возрастные изменения кожи у человека обнаруживаются уже после 35 лет. Наблюдается истончение кожи, уменьшение объёма дермы, теряется эластичность, кожа становится вялой и более сухой, появляются мелкие морщины, складчатость, прогрессивно развивается гравитационный птоз [5, 76].

Процесс старения кожи фактически развивается на протяжении всего онтогенеза и, прежде всего, определяется эндогенными (генетическими,

эпигенетическими) и экзогенными факторами. Генетические факторы играют определяющую роль в развитии возрастных изменений клеток кожи, приводящей к перестройке всего их фенотипа [122]. «Старение клеток» является определенным итогом реализации их генетической программы, которая контролирует стабильность генома и динамику экспрессии отдельных генов на разных стадиях онтогенеза. Изменяется биосинтетическая активность фибробластов, наблюдаемое понижение начинается у человека во второй декаде жизни и с различной динамикой продолжается вплоть до старости. Реализация генетической программы включает в себя апоптоз определённой части клеточных популяций. Утрата сохраняющихся в дерме прогениторных мезенхимальных стволовых клеток вызванная апоптозом в результате возрастных изменений, возмещается лишь частично, что приводит к уменьшению численности активных в отношении биосинтетических процессов фибробластов [117, 119, 147, 163, 178]. Количество фибробластов в квадратном миллиметре в дерме человека к 31-40 годам снижается вдвое по сравнению с первой декадой жизни [18]. Как результат понижается продукция структурных компонентов внеклеточного матрикса, активность ферментов, участвующих в биосинтетических процессах и в процессах посттрансляционной модификации коллагена, эластина, протеогликанов [119, 270].

Популяции фибробластов дермы кожи старых и молодых лиц отличаются снижением миграционной активности, биоэнергетического потенциала. По данным M.J. Reed et al. (2001), N.M. Iudintseva et al. (2008), у фибробластов дермы пожилых лиц наблюдается изменения активного цитоскелета, низкая экспрессия интегринов, необходимых для связывания с коллагеном I типа и ламинином. Митохондрии этих фибробластов характеризуются сниженной эффективностью окислительного фосфорилирования, более низким уровнем мембранного потенциала и продукции АТФ, а также биосинтеза митохондриальных протеинов [204]. У людей 80 лет и старше фибробласты дермы синтезируют коллаген почти на 75% меньше, чем клетки дермы молодых (18-25 лет) доноров. Одновременно с возрастом происходит

изменение соотношения коллагенов типа I и III в дерме с явным доминированием коллагена типа I [38, 76].

В старости наблюдается активация катаболизма структурных компонентов экстрацеллюлярного матрикса, связанная с гиперэкспрессией ряда протеолитических энзимов, включая матриксные металлопротеиназы (ММП), на фоне уменьшения продукции их ингибиторов (ТИМП). Усиливается протеолитическая деградация коллагеновых фибрилл, состоящих в основном из коллагена типа I [70, 219] с накоплением фрагментированного коллагена, которое приводит к ослаблению контактов фибрилл с клеточными элементами дермы.

Одновременно происходят и качественные возрастные изменения фибриллярных белков дермы – коллагена, эластина, фибриллина. Эти изменения касаются системы интермолекулярных поперечных связей. Так, в коллагенах уменьшается количество редуцируемых дифункциональных и трифункциональных связей, возрастает количество поперечных связей, возникающие при неэнзиматическом гликозилировании – AGE (advanced glycation endproducts) [70], которые накапливаются, достигают в старческом возрасте значительной степени. Важно, что эти поперечные связи образуются хаотично, влияют на растворимость (понижают), жесткость (повышают) и резистентность к протеолитическому действию ММП. Кроме того, модификация боковых аминогрупп остатков лизина и аргинина в коллагене снижает взаимодействие коллагена с клетками дермы, связывание коллагеновых фибрилл с протеогликанами и гиалуронатом, нарушаются адгезия и миграция клеток [218]. В культуре фибробластов AGE угнетают пролиферацию клеток, а при длительном соприкосновении AGE с клетками возникает апоптоз, усиливается экспрессия генов, кодирующих протеолитические ферменты (ММП-9, серпин-1), угнетается экспрессия коллагена, кадгерина, фибронектина [70]. Конечные продукты AGE, накапливаясь в коллагеновых, коллагеноэластических и эластических волокнах, способствуют развитию изменений, свойственных старению, - повышению их

жѐсткости, понижению эластичности, а также образованию свободных кислородных радикалов [232]. Старение эластических волокон затрагивает не только эластин, но и все компоненты волокон, включая микрофибриллиновый структурный каркас дермы [115, 135, 158, 232].

Активация протеолиза при старении приводит к избыточному образованию пептидных фрагментов молекул экстрацеллюлярного матрикса и базальных мембран – фибронектинов и ламининов, которые обладают биологической активностью, становятся матриканами [70]. Матриканы взаимодействуют с рецепторами S-Gal фибробластов и усиливают экспрессию протеолитических ферментов, образование активных форм кислорода, которые повреждают структурные макромолекулы матрикса. Они, кроме того, вызывают хемотаксис лейкоцитов, стимулируют пролиферацию фибробластов и гладкомышечных клеток, проявляют ангиогенную активность. Эти явления способствуют поддержанию в дерме изменений, свойственных старению матрикса и придают старению черты прогрессирующего хронического воспаления [154, 199].

При старении существенные изменения претерпевают гиалуронан и протеогликаны, являющиеся основным компонентом интегративно-буферной среды экстрацеллюлярного матрикса и необходимые для поддержания физико-химических и биомеханических свойств матрикса, а также для перевода к клеткам регуляторных и других сигналов [70]. Возрастные изменения протеогликанов затрагивают как коровый белок, так и гликозаминогликаны.

Гликозаминогликаны (ГАГ) представляют собой углеводные полимеры, в отличие от белков являются вторичными продуктами генов, поскольку их биосинтез контролируется не непосредственно генетической информацией, а координируется функцией ферментов, осуществляющих сборку их молекул. Эта усложненная система контроля может привести к возникновению определенного количества вариаций гликозаминогликановых цепочек, не предусмотренных генетически [195]. Такие вариации затрагивают следующие детали структуры, как длина гликозаминогликановых цепочек, степень

сульфатации, локализация сульфатных групп, эпимеризация остатков уроновых кислот. По мере старения происходит накопление вариации, приводящее к изменению углеводного состава протеогликанов матрикса дермы, что меняет взаимодействие протеогликанов с другими структурными компонентами матрикса, сигнальными молекулами, клетками [137, 246]. Так, при старении в коже утрачивается гликозаминогликановая цепочка декорина (протеогликана 1 или PG-S1), как следствие уменьшается расстояние между соседними коллагеновыми фибриллами [174, 217]. Декорин с бигликаном влияют на формирование коллагеновых фибрилл, участвуя в регуляции их диаметра и темпов фибриллогенеза, повышают резистентность коллагеновых фибрилл к действию коллагеназ [169]. Малые протеогликаны, содержащие дерматансульфат (бигликан, декорин), взаимодействуя с факторами роста, активно влияют на пролиферацию и функцию клеток [127, 219, 252]. В меньшей степени, чем ГАГ, возрастные изменения затрагивают стержневые белки протеогликанов. Они определяются действием тех же факторов и механизмов, что и изменения коллагена и эластина. Повышенная активность ММП лежит в основе качественных изменений корового белка большого протеогликана дермы – версикана (PG-M), приводящая к нарушению его связывания с гиалуронатом, осуществляемым N-концевым доменом [272]. С-терминальным доменом коровый белок версикана взаимодействует с гликопротеинами матрикса и плазматической мембраны клеток [260]. Кроме того, версикан содержит специфические домены, которые близки по первичной структуре к эпидермальному фактору роста, и они могут оказывать влияние на дифференциацию, организацию, миграцию и адгезию клеток, а также на функцию клеток, включая активность факторов транскрипции [133, 173, 269].

Таким образом, возрастные структурные изменения протеогликанов дермы кожи оказывают существенное влияние на развитие процессов старения кожи.

Эндогенные изменения фибриллярных и нефибриллярных структур кожи, развивающиеся с возрастом, находятся под контролем регулирующих факторов – гормонов и факторов локального действия [163]. Однако, в старости у

фибробластов проявляется резистентность к их действию, которая объясняется, по мнению авторов, снижением экспрессии клетками соответствующих рецепторов. Кроме того, меняется и секреция регуляторных факторов [42]. Особое внимание привлекают среди этих факторов «ось гипофизарный гормон роста – инсулиноподобный фактор роста». С возрастом повышается в крови концентрация белков, связывающих и инактивирующих инсулиноподобный фактор роста. Важное значение имеют эстрогены (как у женщин, так и у мужчин), а также андрогены (у мужчин), содержание которых с возрастом падает. Наконец, старению способствуют и многофункциональные цитокины (например, интерлейкины-1 и -6), уровень которых в сыворотке крови повышается к старости.

На протяжении жизни к эндогенным факторам старения кожи присоединяются экзогенные – солнечный свет, изменения температуры и влажности воздуха, косметические средства, поллютанты окружающей среды и др. Из числа этих факторов при старении открытых участков кожи особо важное значение имеет ультрафиолетовое излучение. Под влиянием ультрафиолетового излучения образуются активные формы кислорода, оказывающие активирующее действие на ряд трансмембранных рецепторов ростовых факторов и цитокинов, которые включают интрацеллюлярные каскады передачи сигналов. Эти сигналы, достигая клеточного ядра, вызывают изменения экспрессии генов: угнетается экспрессия генов полипептидных цепей коллагенов и эластина, других компонентов эластических структур, усиливается экспрессия генов протеолитических ферментов, включая ММП. Активные формы кислорода приводят к истощению антиокислительной системы кожи, оказывают непосредственное влияние на внеклеточный матрикс, активируя протеолиз коллагеновых структур [35, 133, 266].

Некоторые авторы в механизмах возрастных изменений кожи особое внимание уделяют хроническому воспалительному процессу [18, 170, 203], который запускает и поддерживает ряд факторов, таких как солнечный свет, компоненты пищи, неблагоприятная экологическая ситуация и др. Указанные

факторы активируют иммунокомпетентные клетки кожи. Последние продуцируя цитокины, хемокины, молекулы адгезии и другие сигнальные молекулы, инициируют воспалительную реакцию, в которую вовлекаются различные клеточные диффероны кожи, включая фибробластический. Воспалительный процесс приводит к изменению внеклеточного матрикса с нарушениями исходной пространственной организации его компонентов, соотношения основного вещества и клеток, уровня кровоснабжения.

В возрастных изменениях кожи пристальное внимание привлекает гиалуроновая кислота, которая, благодаря своим физико-химическим свойствам и заряду, связывает воду в межклеточном пространстве, формируя высокогидрофильную среду, определяя высокий тургор и тонус кожи, обеспечивая диффузию нутриентов и кислорода из дермы в эпидермисе. Гиалуронан выполняет и целый ряд других физиологических функций, и средства на основе гиалуроновой кислоты в настоящее время составляют основную долю инъекционных препаратов, используемых в эстетической медицине.

В этой связи представляет интерес более детальное рассмотрение структуры, свойств и метаболизма данного гликозаминогликана.

1.2. Особенности структуры, физико-химических свойств, обмена и физиологических функций гиалуронана

Гиалуроновая кислота (гиалуронан, гиалуронат), как и остальные гликозаминогликаны (ГАГ) представляет собой неразветвлённый линейный полимер, построенный из повторяющегося дисахаридного фрагмента состоящий из D-глюкуронида- $\beta(1,3)$ -N-ацетил-D-глюкозамина, соединённых между собой $\beta(1,4)$ -гликозидной связью. Карбоксильные, гидроксильные и ацетоамидные группы придают молекуле этого полианионного гетерополисахарида выраженные гидрофильные свойства. В отличие от других ГАГ гиалуронан не сульфатирован, не образует ковалентных связей с белками

и не используется при построении макромолекул протеогликанов, не подвергается химической модификации после биосинтеза, имеет высокую молекулярную массу и в экстрацеллюлярном матриксе соединительной ткани находится в свободном состоянии [95, 231].

Молекулярная масса гиалуронана (ГУ) колеблется от 10^5 до 10^7 дальтон, что соответствует 10 000 и более повторяющихся дисахаридных единиц. Другие ГАГ имеют более низкую молекулярную массу и представлены, как правило, многочисленными изомерами, связанные с расположением сульфатных групп и координацией функции ферментов (гликозилтрансфераз, сульфотрансфераз), осуществляющих сборку их молекул [70]. Средний продольный размер макромолекулы ГУ с молекулярной массой 2 500 000 Да в растворе составляет более 10 мкм, что приблизительно равно диаметру эритроцита человека и значительно превышает средний размер бактериальной клетки. Длина и гибкость макромолекулы ГУ в значительной мере изменчивы и, по данным С.М. Бычкова и др. (1982), доминирующее влияние на конформацию его макромолекулы оказывает природа катиона, и особенно активны в этом отношении Ca^{2+} и Mg^{2+} . Цепь ГУ в твердом состоянии (натриевая соль) представляет собой спираль, закрученную в левостороннем направлении, из 4-х дисахаридных единиц. Методом ядерного магнитного резонанса показано, что ГУ обладает стерическим расположением донорных и акцепторных групп, которое необходимо для образования стабильных водородных связей между ацетоамидными и карбоксилатными группами [240].

ГУ был открыт и выделен Карлом Мейером в 1934 году из стекловидного тела глаза коровы (hyalos – стекловидный), позднее ГУ выделили из различных тканей и большинства биологических жидкостей позвоночных. Содержание ГУ в пуповине составляет 4100 мкг/г, в синовиальной жидкости – 1400-3600 мкг/мл, в стекловидном теле – 140-340 мкг/мл, в дерме – 200-500 мкг/г, в эпидермисе 100 мкг/г и выше, в сыворотке крови 0,01-0,1 мкг/мл [165]. ГУ отсутствует у насекомых, растений, в грибах, но активно синтезируется бактериями.

ГУ может существовать на клеточной поверхности в большом количестве конформационных состояний. В водном растворе молекулы ГУ при высоких концентрациях принимают глобулярную форму. Поведение и свойства биополимерного материала однозначно не определяет его химический состав и способ соединения атомов в молекуле, и свойства такого вещества, прежде всего, зависит от надмолекулярной (физической) структуры. Многообразие форм надмолекулярной структуры высокомолекулярных соединений определяет структурные и функциональные свойства биополимеров в живых организмах [254]. В межклеточном матриксе ГУ чаще приобретает динамичную третичную структуру хаотически извитой перекрученной тесьмы [179]. В растворе его макромолекулы могут находиться в двух основных формах: в упорядоченном состоянии и в виде статистического клубка. В определенных условиях цепи биополимера могут переходить из состояния спирали в состояние клубка. При такой упаковке длинной спиральной цепи дисахаридов захватывается огромное количество воды, в 1 000 раз больше относительно массы самой молекулы ГУ. Методом ядерного магнитного резонанса показано, что при концентрации 1 мг/мл и более объемы раствора, занимаемые отдельными молекулами ГУ, перекрывают друг друга. Возникает упорядоченная и относительно стабильная трёхмерная структура в виде пластинок и трубочек, хотя молекулы полисахарида в растворе продолжают находиться в движении [240]. Такую структуру поддерживают внутримолекулярные водородные связи, которые придают макромолекуле определенную жесткость и способствуют образованию на её поверхности гидрофобных участков, что делает возможным поперечное связывание соседних молекул ГУ, а также его взаимодействие с клеточными мембранами и липидными компонентами. Наличие полярных и неполярных фрагментов в структуре макромолекулы ГУ влияет не только на способность взаимодействовать с различными химическими соединениями, но играет важную роль в разнообразных конформационных превращениях полисахарида. Конформационные переходы ГУ типа спираль-клубок (глобула) возникают на

фоне изменений таких параметров окружающей среды как температура, рН, ионное окружение, и они сопровождаются изменением ряда физико-химических и биологических свойств тканей [215]. Так, длина и гибкость молекулы ГУ изменчивы. Гибкость ГУ – одна из характеристик, определяющих его макроскопические свойства, в частности, амортизации ударных нагрузок в хрящах, сокращения поперечно-полосатых мышц, упругость кожи и др. [251]. Помимо конформационных особенностей на образование ГУ сетчатой структуры, и в целом на вязко-эластические (вязкоупругие) свойства влияют размер молекулы и его концентрация. Сетчатую структуру образует не только высокомолекулярный, но и низкомолекулярный ГУ. Однако, структура из низкомолекулярного ГУ имеет отдельные сетчатые островки, находящиеся друг от друга на определенном расстоянии. Такие изменения в результате уменьшения размера макромолекулы особенно опасны для тканей, выполняющих оптические и механические функции (стекловидное тело, дерма, синовиальная жидкость) [162].

Таким образом, физико-химические свойства ГУ, особенно способность к гидратации и формированию трёхмерной сети путем нековалентных ассоциаций с протеогликанами, обуславливают важную роль в гомеостазе воды, в обеспечении фильтрующих эффектов, в изменении свободной ее доли, доступной для растворения других молекул. Благодаря таким свойствам экстрацеллюлярный матрикс, содержащий ГУ, может высвобождать и задерживать воду, сигнальные молекулы, микробные тела, способствовать или препятствовать миграции клеток, то есть выполнять не только структурообразующие, но и другие биологические функции [100].

Гиалуроновая кислота присутствует в соединительной ткани всех позвоночных, в наибольшей степени – в рыхлой соединительной ткани и подвержена интенсивному метаболизму. Биосинтез ГУ в отличие от других ГАГ, сборка которых осуществляется на мембранах гранулярного эндоплазматического ретикулума на стержневом (коровом) белке, протекает на внутренней поверхности клеточной мембраны клеток фибробластического

дифферона [142, 250] с участием гиалуронансинтазы (HAS). Это небольшой фермент, несколько раз пронизывающий плазматическую мембрану и образующий канал, через который вновь синтезируемая молекула ГУ выводится из клетки в экстрацеллюлярный матрикс с помощью специальной транспортной системы [200]. Фермент осуществляет поочередный перенос остатков глюкуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамина в активированных формах с участием абсорбционного и каталитических центров для каждого из этой производной глюкозы. Большая макромолекула ГУ требует от клетки для своей сборки значительного расхода энергии (до 50 тысяч эквивалентов аденозинтрифосфата, 20 тысяч молекул НАД-кофактора, 10 тысяч молекул ацетилкоэнзима А). Специальная зона фиксации, синтезируемой *de novo* цепи полисахарида, обеспечивает перемещение молекулы ГУ на одно звено по мере присоединения последующего мономера. Перенос очередного моносахаридного звена сопровождается расходом энергии с отщеплением молекулы уридиндифосфата, поскольку донорами моносахарида служат их нуклеотидные производные – уридиндифосфонуклеотиды.

Длина синтезируемой макромолекулы гиалуронана зависит от вида гиалуронансинтаз, катализирующей его образование. У человека известно 3 изоформы HAS [250]. Для ферментативной активности всех изоформ HAS важнейшими являются аминокислотные остатки Асп 242, Асп 355 и Три 384 [200]. Первый изофермент HAS 1 осуществляет медленный синтез высокополимерного ГУ (более 2 млн Да), второй HAS 2 синтезирует полисахарид с меньшей молекулярной массой (до 2 млн Да), третий HAS3 – самый активный, катализирует продукцию короткоцепочечный ГУ – $3 \cdot 10^5$ Да. Эти три изоформы HAS являются продуктами трёх различных генов. Экспрессия синтетаз HAS 1 и HAS 2 осуществляется под влиянием трансформирующего рост фактора – бета 1 (TGF- β 1) [189, 252].

Превалирование в биосинтезе той или иной длины молекулы ГУ зависит от изоформы HAS, активность которых, в свою очередь, зависит от этапа жизнедеятельности клетки – продуцента. Так, если клетка в состоянии

дифференцировки, экспериментально показано, что преимущественно вырабатывается полисахарид с молекулярной массой не более 10^5 Да, а при переходе в зрелое состояние клетки возрастает продукция ГУ с молекулярной массой до $2 \cdot 10^6$ Да [200].

Ежедневно разрушается около 30% этого ГАГ, находящегося в организме. Скорость обмена ГУ высокая. Период полураспада ГУ в коже ($T_{1/2}$) составляет 24-48 часов. Как уже отмечали, ГУ не вступает в ковалентные связи с белками и не участвует в образовании протеогликанов, но *in vivo* связывается устойчивыми электростатическими связями с различными белками, которые объединяются в семейство гиаладгеринов. Существуют гиаладгерины внеклеточного матрикса, цитоплазматической мембраны и интерцеллюлярные гиалуронансвязующие белки. Во внеклеточном матриксе, таким образом, имеются три метаболических пула ГУ: гиалуронан, связанный с гиаладгерином матрикса; гиалуронан, связанный с гиаладгерином клеточной мембраны; свободный гиалуронан. Эти пулы мало отличаются по $T_{1/2}$. Основная масса (99%) ГУ межклеточного матрикса находится в свободном состоянии. Роль гиаладгеринов в экстрацеллюлярном матриксе выполняют коровые белки протеогликанов (версикан, агрекан, нейрокан, бревикан и др.), а гиаладгерины клеточных мембран являются трансмембранными рецепторными протеинами – RHAMM, BRAL1, SPACRAN, LYVE-1 [141], однако наибольшее распространение и значение в качестве гиаладгерина имеет рецептор CD 44, являющийся гепарансульфатным протеогликаном.

CD 44 – поверхностный клеточный гликопротеин, который играет важную роль в межклеточных взаимодействиях, клеточной адгезии и миграции. Кроме гиалуронана, это рецептор для таких лигандов как остеопонтин, коллаген, ММП, а на гемопоэтических клетках и для E- и L-селектина [132, 172, 224, 258]. Обнаружены изоформы CD 44, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга иРНК, на клетках разных типов. CD 44 содержит 2 внеклеточных домена (дистальный и проксимальный), трансмембранный и цитоплазматический домены. Транскрипция CD 44 активируется

провоспалительными цитокинами, а также эпидермальным фактором роста, трансформирующим фактором роста [265]. Рецептор CD 44 может претерпевать значительные модификации путём фосфорилирования, гликозилирования и добавлением цепей ГАГ у некоторых изоформ белка. За связывание ГУ отвечает дистальный внеклеточный домен, который, по некоторым данным [26, 235], для этого должен подвергнуться гликозилированию. Рецептор CD 44 участвует вместе с гиалуронансинтазой в формировании перицеллюлярной зоны, совместно с ГУ – в образовании агрегатов клеток и участвует в передаче сигналов в зависимости от калибра фрагментов ГУ, а также в интернализации и деградации ГУ.

Молекулы CD 44 связываются длинной макромолекулой ГУ, собираются в кластер на стенках клеточной мембраны, вовлекая ГУ в кавеолу. В последующем образуется эндосома, которая сливается с лизосомой. В эндосоме и преимущественно в лизосоме ГУ подвергается воздействию гиалуронидаз, а затем β -гликуронидазы и β -(N-ацетил) глюкозаминидазы. Конечные продукты деградации, состоящие преимущественно из 4-х дисахаридов и моносахаридов поступают в кровь и частично выводятся с мочой [250]. При этом, часть межклеточного ГУ подвергается катаболизму *in situ*, часть попадает в лимфу и катаболизируется в лимфоузлах, около 10% ГУ покидает лимфоузлы и поступает в печень, где связывается с синусными клетками и разрушается.

Тем не менее, в катаболизме ГУ остаётся еще достаточно не ясного, не весь интернализированный гиалуронан попадает в лизосомы и подвергается немедленной деградации. По данным J. Lee и A. Spicer [200] клетки содержат гиалуронансвязывающие белки (intracellular HA-binding proteins, ИНАВР). Гиалуроновая кислота, во взаимодействии с ИНАВР, участвует в процессинге РНК. По данным R. Stern (2008), внеклеточная деградация ГУ до низкомолекулярных фрагментов происходит при участии гиалуронидазы-2, встроенной в мембрану. Этот фермент начинает действовать при связывании ГУ с рецепторами клетки (CD 44, RНАММ). Образующиеся фрагменты частично дренируются в кровеносную и лимфатическую систему и в печени

подвергаются полному окислению. Внутриклеточный катаболизм осуществляется в ФБ, гепатоцитах, хондроцитах в эндосомах и лизосомах с участием гиалуронидазы 1 и других ферментов, описанных выше.

В организме человека идентифицировано 7 типов гиалуронидаз. Вероятно, деградация высокомолекулярного ГУ является многостадийным процессом, при котором образуются фрагменты с различной молекулярной массой. Установлено, что скорость ферментативной деградации ГУ зависит от длины цепи. Особенно быстро деполимеризуются цепи с молекулярной массой около 400 кДа [157].

Некоторые продукты расщепления ГУ служат ингибиторами гиалуронидазы, подавляют активность некоторых ММП, кислых лизосомальных гидролаз, сериновых протеаз, тем самым процесс обмена ГАГ во многом может регулироваться автономно [150, 224]. Не весь интернализированный ГУ попадает в лизосомы и подвергается срочной деградации. Продукты частичной деградации полисахарида связываются внутри клеток с гиалуронансвязывающими белками и выполняют регуляторные функции, контролируя активность некоторых генов и пролиферацию клеток соединительнотканного дифферона [13, 92]. Интенсивность катаболизма ГУ, как и других компонентов внеклеточного матрикса, сильно варьирует в разных тканях и зависит от состояния тканей и организма в целом (повреждения, воспаление, стресс и др.).

Деполимеризация ГУ происходит и под действием свободных радикалов, которые постоянно образуются в процессах метаболизма. При воспалении наблюдается форсированная оксидативная деполимеризация, поскольку активные формы кислорода в большом количестве генерируются активированными макрофагами и другими лейкоцитарными клетками [82].

ГУ выполняет различные физиологические функции. ГУ совместно со специализированными гликопротеинами и протеогликанами формирует основное вещество экстрацеллюлярного матрикса. Структурная организация и уникальные физико-химические свойства придают растворам ГУ вязкоупругие

свойства и обеспечивают биомеханические функции в матриксе, такие как функция заполнения, функция фильтра, смазочная функция [265]. ГУ непосредственно определяет такие функции основного вещества, как водоудерживающая способность, ионный обмен, избирательная по молекулярной массе скорость транспорта веществ. Небольшие молекулы, в частности молекулы воды, электролитов, питательных веществ, конечных продуктов катаболизма клеток свободно диффундируют в толще домена макромолекулы ГУ, а большие молекулы при этом, например, белки задерживаются. По этой же причине внеклеточный матрикс непроницаем для микроорганизмов и высокомолекулярных токсинов. Коллоидный гликозаминогликановый матрикс и водная фаза формируют основной компонент матрикса. Водная фаза, с одной стороны, разобщает структурные элементы межклеточного вещества, поддерживая их пространственное положение, с другой стороны, она является интегрирующей средой, обеспечивающей процессы диффузии и активного транспорта различных молекул. ГУ, формируя высокогидрофильную среду, повышает сопротивление тканей деформации, обеспечивая, например, коже высокий тургор и тонус [250]. Одновременно ГУ является важнейшим компонентом, способствующим поддержанию водного гомеостаза тканей, необходимых для их нормальной жизнедеятельности.

ГУ участвует в формировании сети коллагеновых волокон типов I, III, IV, VII. В комплексе с протеогликанами способствует реализации биологических функций таких важных молекул внеклеточного матрикса, как фибронектин, витронектин, ламинин, агректин, версикан и других, в поддержании структурной целостности различных тканей (хрящевая, дерма, нервная, стенки кровеносных сосудов и т.д.). Адгезивные свойства ГУ проявляются и тем, что тонкий слой богатого ГУ перицеллюлярного вещества, обволакивающий клетку, обеспечивает первоначальную адгезию фибробласта и матрикса, которая позднее сменяется прочной адгезией, опосредованной интегринами и формирующимися фокальными контактами [176].

Вероятно, что ГУ присуща роль сигнальной молекулы, оказывающей воздействие через определенные рецепторы цитоплазматической мембраны и некоторые интрацеллюлярные пути распространения сигналов на различные функции клеток [200]. Во время дифференцировки клеточного пула происходит накопление ГУ, что совпадает с процессом миграции клеток во внеклеточном матриксе [95]. Являясь основным компонентом перицеллюлярного слоя, который формируется на поверхности пролиферирующих и мигрирующих клеток, ГУ облегчает разделение клеток, а также участвует в образовании каналов разной степени гидратированности, способствующие миграции клетки. Не исключено, что участие в процессе клеточной миграции реализуется ГУ и за счет рецепторов CD 44. Так, установлено, что добавление к очень подвижным трансформированным фибробластам высокомолекулярного ГУ приводит к резкому снижению двигательной активности, за счет связывания полисахарида с CD 44, и данный механизм регулируется при непосредственном участии ММП [71]. ММП способны отщеплять домен связывания ГУ у рецептора CD 44, при этом миграция клеток облегчается. Ингибиторы металлопротеиназ блокируют эту регуляторную систему [196]. Через этот же рецептор ГУ влияет на апоптоз клеток, а на подвижность клеток ГУ влияет и с участием другого специфического рецептора – RНАММ.

Однако в настоящее время остается неясным роль ГУ в процессе инвазии и метастазирования опухолевых клеток, т.к. активно синтезируемый обогащенный ГУ матрикс опухоли является хорошо гидратированной средой, способствующей миграции клеток, с одной стороны, а с другой, обогащенный ГУ матрикс создает вязкий барьер, затрудняющий миграцию клеток. В то же время ясно, что связывание рецептора CD 44 с ГУ – это необходимый этап для инвазии и метастазирования опухолевых клеток [98, 126, 262].

ГУ помимо роста и метастазирования опухолей принимает участие в процессах овуляции, оплодотворения, эмбриогенеза. ГУ обладает противовоспалительными свойствами, участвует в обеспечении защиты клеток и внутриклеточных структур от окислительной деградации [98, 101, 138]. ГУ

замедляет движение лейкоцитов и ограничивает адгезию нейтрофилов к стенке сосуда [192], снижает проницаемость сосудистой стенки [264]. Одним из механизмов действия высокомолекулярного ГУ является подавление экспрессии белка, связывающего гиалуроновую кислоту (НАВР2), являющегося индуктором протеаз, «разрыхляющих» стенку сосудов [185]. На фоне повреждения высокомолекулярный ГУ блокирует синтез некоторых медиаторов воспаления – интерлейкин-1 (ИЛ-1) и ИЛ-6, фактор некроза опухоли (ФНО), избыточную продукцию фосфолипазы 2 [146, 177, 275], является селективным ингибитором циклооксигеназы 2 и подавляет образование макрофагами провоспалительных простагландинов [275], снижает секрецию гистамина [77] и конверсию кининогена в брадикинин [138].

В последние годы особое внимание привлекают функциональные свойства ГУ с различной молекулярной массой. Фрагменты высокомолекулярного ГУ разного размера, являющегося продуктами ферментативной и оксидативной деполимеризации, обладают различной биологической активностью. Так, ГУ с молекулярной массой более 500 000 Да подавляет размножение клеток, их миграцию, ангиогенез, а продукты деполимеризации с мол.массой до 100 000. Да наоборот, усиливают размножение клеток. Фрагменты с мол. массой менее 30 000 Да стимулируют ангиогенез, а также обладают провоспалительным потенцированием [157, 216, 250]. Низкомолекулярные фрагменты деполимеризованного ГУ способны связываться с изоформами рецептора CD 44, выполняющими функции межклеточных взаимодействий [189], а также служить эндогенными сигналами тревоги и запускать различные сигнальные пути, контролируемые цитокинами. Фрагментированный низкомолекулярный ГУ стимулирует продукцию и высвобождение макрофагами цитокинов ИЛ-1, ФНО- α , инсулиноподобного ростового фактора 1 и оксида азота. Попав во внеклеточную среду, оксид азота может вступить в реакцию с супероксиданионом с образованием пероксинитрита, который способствует активной дефрагментации ГУ с образованием полимеров «поддерживающих» патологический цикл воспаления [138]. Олигосахариды ГУ длиной 6-10

моносахаридных звеньев в низких концентрациях стимулируют пролиферацию эндотелиальных клеток и хемотаксис, проявляют ангиогенные свойства, активизируют пролиферацию фибробластов и синтез коллагена [121, 181]. Растворимый природный ГУ и олигосахариды ГУ больших размеров не оказывают никакого хемотаксического влияния на эти клетки.

При повреждении тканей и воспалении происходит повышение экспрессии HAS1 и HAS3 (активируется синтез высокополимерного ГУ), ускоренная деполимеризация ГУ с образованием олигосахаридов, повышается экспрессия рецепторов CD 44 и RНАММ. На последних стадиях ранозаживления (рубцевание) олигомеры вновь замещаются высокополимерным ГУ, который прерывает каскад образования сигнальных регуляторных молекул, стимулирующих пролиферативные процессы, происходит завершение ремодуляции тканей [124, 165, 174, 183].

Все фракции ГУ обладают функцией стимуляции фагоцитоза, но низкомолекулярным с мол. массой около 52 000 Да присуща максимальная активность, минимальная – с мол. массой около одного млн. Да [236]. Более мелкие олигосахариды (4-6 звеньев) вместе с интерфероном-гамма стимулируют продукцию цитокинов с хемокинов дендритными и антигенпрезентирующими клетками иммунной системы [257].

Для участия в сигнальных путях, регулирующих активацию, пролиферацию, адгезию, дифференцировку, апоптоз ГУ кооперируется с группой белков – гиаладгеринами, взаимодействует с рецепторами на поверхности клеточной мембраны, включая рецепторы CD 44 и RНАММ, а также толл-подобными рецепторами на мембране иммунокомпетентных клеток [201]. Взаимодействие ГУ с толл-подобными рецепторами индуцирует активацию кератиноцитов эпидермиса и синтез ими дефензинов. Рецептор RНАММ обнаружен не только на цитоплазматической мембране, но и в цитозоле и ядре клетки, что, возможно, свидетельствует о его участии во внутриклеточном транспорте ГУ [201]. Имеются предположения о том, что

внутриклеточный ГУ участвует в процессинге РНК и перегруппировке хромосом [200].

С участием низкомолекулярных фрагментов происходит и ауторегуляция синтеза ГУ. Высокомолекулярный ГУ ограничивает удлинение полисахаридной цепи, связываясь с расположенной на мембране гиалуронатсинтазой с участием рецептора CD 44. Конкурентное вытеснение длинных цепей ГУ короткими цепями способствует освобождению гиалуронатсинтазы и активации синтеза ГУ. Следовательно, накопление высокомолекулярного ГУ приводит к ограничению его синтеза, а фрагментация с образованием низкомолекулярных олигосахаридов – к стимуляции синтеза [100, 250]. Замещение олигосахаридами высокомолекулярного ГУ в области связывания с рецептором CD 44 приводит к экспрессии ММП, генов коллагена, гиаладгеринов и HAS 2, создавая условия для полноценной ремодуляции внеклеточного матрикса [180]. Подобная картина прослеживается и в участии ГУ в регуляции ангиогенеза [181].

Таким образом, сбалансированность процессов синтеза и деградации ГУ, направленных на поддержание оптимального соотношения высоко- и низкомолекулярных его форм, становится важным фактором обеспечения гомеостаза. В основе развития патологических процессов нередко лежит нарушение этого баланса [174].

ГУ имеет особо важное значение для состояния кожи. В коже находится до 50% общего количества ГУ в организме человека. Максимальное количество ГУ в коже обнаруживается на уровне сосочкового слоя дермы. ГУ кожи характеризуется интенсивным обменом. Кожный покров использует такие свойства ГУ, как эластичность, вязкость (обеспечивает тургор кожи), реологические свойства (заполнитель объёма основного вещества межклеточного матрикса), осмотическое давление (поддержание интегративно-буферной среды), диффузионный барьер (поддержание защитных функций, задерживая проникновение микрофлоры при ранах), сопротивление потоку (плотная сеть полисахаридных цепочек задерживает ток жидкости),

исключённый объем (вытеснение остальных макромолекул), поддержание разнонаправленного потока диффузии воды и др. [47, 65]. В эпидермисе кожи, которая лишена кровоснабжения, ГУ выполняет трофическую функцию, обеспечивая диффузию нутриентов и кислорода из дермы.

Проведенные ранее гистологические исследования свидетельствовали о прогрессивном снижении величины электронной плотности гранул гиалуроновой кислоты вплоть до их полного исчезновения в возрасте 60 лет [186]. Изучение с использованием других методов показали, что общее количество ГУ в коже, включая его низкомолекулярные фрагменты, в течение жизни остаётся на постоянном уровне. В эпидермисе его содержание уменьшается, а в дерме не изменяется или даже повышается на участках, подверженных хроническому воздействию ультрафиолетового излучения [188]. Однако, с возрастом увеличивается количество ГУ, связанного с гиаладгеринами, т.е., со сниженной биодоступностью. У плода лишь 7% ГУ в коже находится в связанном с белками состоянии, а у пожилых людей этот показатель возрастает до 23%. Одновременно с возрастом происходит перераспределение ГУ: он преимущественно обнаруживается в глубоких слоях кожи. Всё это является причиной формирования выраженной сухости кожи, которая является одним из признаков старения, проблем с ранозаживлением и развитием воспалительных заболеваний [193].

Однако содержание гиалуронана в коже человека, по многочисленным сведениям других авторов [166, 198], не является постоянной величиной: снижается в летний период по сравнению с зимним, а начиная с 60-летнего возраста происходит значительное его уменьшение в дерме.

Уникальные физико-химические свойства, исключительная роль ГУ в поддержании метаболизма и функции кожи, снижение его концентрации с возрастом, иммунологическая инертность, предопределили использование для коррекции развивающихся возрастных изменений инъекционное внутрικοжное введение препаратов гиалуроновой кислоты.

1.3. Инъекционные средства на основе нестабилизированной гиалуроновой кислоты, применяемые в косметологии

Первые лекарственные средства на основе гиалуроновой кислоты пытались получить для замены стекловидного тела, и в 1970 г. был получен препарат достаточно свободный от примесей, вызывающих воспалительную реакцию [100]. Этот препарат впервые был успешно использован для введения в суставы беговым лошадям, страдавшим от артритов [9]. Работы по созданию заменителей стекловидного тела продолжались, и в 1980-х гг. компания PharmaciaAB (Швеция) начала производство препарата “Healon” для офтальмохирургии [95], что положило начало активному использованию препаратов гиалуроновой кислоты в клинической медицине. Эти препараты, кроме офтальмологии, стали применяться в хирургии, урологии, артрологии, оториноларингологии, онкологии, дерматокосметологии [13, 23, 89, 198].

В арсенале специалистов эстетической медицины появилось значительное количество технологий и средств, которые позволяют улучшить внешний вид пациентов, обратившихся к дерматокосметологам с жалобами на морщины, складки, снижение тургора кожи, изменение овала лица и другие эстетические недостатки. Современная терапия возрастных изменений включает в себя системные (гормонозаместительная, антиоксидантная и пр.), инъекционные (ботулинотерапия, контурная пластика), физиотерапевтические (микротоковая, IPL-терапия, RF-технологии и др.) методы восстановительного лечения. При этом спектр инъекционных методик, предназначенных для коррекции эстетических недостатков внешности, достаточно широк и постоянно пополняется. Алгоритм лечебных подходов диктуется этиопатогенетической обоснованностью, предсказуемостью эффекта, удобством использования и другими требованиями [48, 116]. С этих позиций одним из наиболее физиологичных и безопасных методов восстановления структуры кожи является применение/введение препаратов экзогенной гиалуроновой кислоты, которые нашли широкое распространение в эстетической медицине [37, 95].

Стабилизированная, или ретикулированная гиалуроновая кислота используется для проведения биоармирования, инъекционной и объёмной контурной пластики, а нативная, не модифицированная гиалуроновая кислота – для проведения метода биоревитализации. Кроме того в арсенале врачей-косметологов появились в последнее время препараты нового класса – безлекарственные макромолекулярные терапевтические средства (биорепаранты), в которых на молекуле гиалуронана химически иммобилизованы различные биологически активные соединения (витамины, аминокислоты, олигопептиды и др.), способствующие стабилизации кожного гомеостаза и предотвращению возрастных изменений кожи [13, 61, 62, 97].

Химически стабилизированный (сшитый) с помощью бифункциональных сшивающих агентов (дивинилсульфон, 1,4-бутандиолдиглицидиоловый эфир) гиалуронан стал применяться с середины 90-х годов прошлого столетия для коррекции депрессивных косметических дефектов. Препараты на основе ГУ, стабилизированного с помощью поперечных сложноэфирных связей, восполняют объём мягких тканей, выполняя в основном замещающую роль. Они значительно медленнее, чем нативная ГК подвергаются деградации и обеспечивают длительное присутствие в коже полисахарида, а его низкомолекулярные фракции, пролонгируют эффект регенерации [101]. Полная деградация ретикулированного ГУ на месте инъекции может происходить в течение 4-6 месяцев [95]. Хотя по своим характеристикам дермальные имплантаты на основе стабилизированного ГУ приближаются к “идеальному” филлеру за счет биоинертности, простоты введения и длительности сохранения препарата в организме, имеется потенциальная опасность, связанная с длительным применением подобных материалов. В структуре ГУ за счет сшивающего агента появляются свободные группы $-CH_2-$, которых нет в нативной молекуле ГУ. При действии активных форм кислорода, образующихся в коже, эти группы могут участвовать в механизмах свободнорадикального цепного окисления, и сшитый ГУ может проявлять прооксидантные свойства, став источником свободных радикалов, и, как

следствие, привести к ухудшению структуры белковых и других компонентов дермы в месте введения филлера [95].

Биоревитализация – методика восстановления и улучшения эстетических параметров кожи посредством интрадермального введения препаратов на основе нативной гиалуроновой кислоты. Основные цели данной методики следующие: пополнить водный резерв тканей, воссоздать в коже естественные условия для функционирования клеток и таким образом активизировать механизм ауторегуляции синтеза эндогенной гиалуроновой кислоты и других компонентов внеклеточного матрикса дермы.

Термин “биоревитализация” был предложен в 2001г. итальянским исследователем А. Ди Пьетро. Биоревитализацию следует рассматривать не столько как метод восполнения эндогенного дефицита ГУ, а как метод восстановления межклеточного матрикса, создающего оптимальный алгоритм жизнедеятельности клеткам кожи, опосредованной стимуляции синтеза гиалуроновой кислоты, коллагеногенеза и эластиногенеза, улучшения метаболических процессов в дерме активации дифференцировки фиброцитов в фибробласты и ангиогенеза [37, 55, 95].

С этих позиций использование ГУ не только с целью восстановления оптимальных параметров вязкоэластичности и других биомеханических свойств ткани, а преимущественно как модуляторов физиологических процессов, важнейшее значение имеют молекулярная масса ГУ и концентрация активного вещества, поскольку макромолекулы с различной массой, как уже отмечалось, по-разному влияют на метаболизм кожи [208]. Вследствие этого к технологии производства инъекционных имплантатов на основе гиалуроновой кислоты предъявляются очень жёсткие требования как относительно пределов величины молекулярной массы, так и наличия всевозможных примесей, особенно белковой природы во избежание побочных аллергических реакций.

Источником для получения гиалуронана первоначально было сырьё животного происхождения – петушиные гребни, стекловидное тело глаз крупного рогатого скота, пуповина человека. В последующем предпочтение

было отдано ГУ, полученному биоферментативным путём из растительного сырья с использованием бактериальных культур [95].

Показаниями для биоревитализации являются [37, 55]:

- дегидратация кожи различного генеза, вызванная гормональными перестройками, неблагоприятными метеорологическими условиями, неправильным косметическим уходом и др.,

- уменьшение тургора, вызванной дефицитом эндогенных гликозаминогликанов в результате снижения синтетической активности фибробластов,

- фотоиндуцированное и биологическое старение, характеризующееся гиперкератозом и гиперпигментацией, хроническим воспалением, повышением активности металлопротеиназ и др.

Кроме того, биоревитализация широко используется для сокращения репаративного периода после процедур химического пилинга, фракционного фототермолиза и других шлифовок кожи, для повышения эффективности физиотерапевтических anti-age методов, в комплексном лечении атрофических рубцов кожи. Преимущественно биоревитализация проводится с целью профилактики инволюционных изменений, для ослабления воспалительных реакций, ингибирования процессов свободно-радикального окисления, возникающих в результате оксидативного стресса [37]. Таким образом, патогенетическая обоснованность и физиологичность биоревитализации позволяет применять эту процедуру как монотерапию, так и в сочетании с современными эстетическими методиками.

Вместе с тем, в литературе экспериментальные данные, основанные на исследовании состояния метаболизма кожи при биоревитализации, по сравнению с клиническими результатами, представлены весьма ограничено.

На добровольцах, рандомизированных на 6 групп по 10 человек в зависимости от возраста (35-45 лет и 65-75 лет) и сроков наблюдения (1, 3 и 6 месяцев), изучали влияние инъекции филлера «Лайтон 3» на процессы метаболизма коллагена на содержание проколлагена, двух субъединиц

коллагенов типа I и типа III, матричных металлопротеиназ (ММП – 3 и 9) и тканевых ингибиторов ММП (ТИМП 1, 2 и 3) в коже, взятой панч-биопсией в местах введения препарата (внутренней части одного плеча) и введения физиологического раствора NaCl в аналогичной области другого плеча (контрольная область). Через 1 месяц после инъекции выявилось, статически значимое увеличение уровня проколлагена, которое в экспериментальных зонах сохранилось и через 3 месяца, а в контрольных областях его содержание, как и содержание коллагена не отличалось от исходных значений.

Активность ММП в обеих исследуемых областях кожи существенных изменений не претерпела, уровень ТИМП в экспериментальной области повысился, в контрольной – нет [105]. Изучение методом цепной полимеразной реакции состояния генов двух изоформ коллагена типа I и коллагена типа III, ТИМП 2 и ТИМП 3 выявило их экспрессию в коже из экспериментальной области через 1 и 3 месяца. При этом у пожилых людей наблюдалось более выраженная реакция на инъекции гиалуронана, чем у лиц зрелого возраста. Таким образом, результаты этих исследований позволяют прийти к заключению, что инъекции филлера Глайтон 3, содержащего нестабилизированный гиалуронан с молекулярной массой 1,2 млн Да, стимулируют процесс неоколлагенеза в коже, который обнаруживается через месяц и выявляется на протяжении 3-х месяцев. Одновременно фиксируется значительное повышение экспрессии генов и тканевых ингибиторов ММП, регулирующих интенсивность катаболизма коллагена. В условиях *in vitro* на модели дермальных фибробластов, подвергнутых процессу стресс-индуцированного ускоренного старения кожи путём использования пероксида водорода, добавление нестабилизированного ГУ с молекулярной массой около 1,2 млн. Да способствовало сохранению пролиферации клеток, уровней биосинтеза коллагена *de novo* и активность ММП-1. В тоже время внесение в культурную среду пероксида водорода без гиалуроновой кислоты приводило к гибели многих фибробластов, снижению на 18% синтеза коллагена и возрастанию активности ММП-1 в 2,6 раза [105].

ГУ с молекулярной массой 800 кДа стимулировал биосинтез фактора роста фибробластов 2 и фактора роста кератиноцитов фибробластами дермы кожи человека [220]. В условиях *in vitro* в культурной среде, содержащей гиалуроновую кислоту 20 мг/мл, установлено увеличение в фибробластах экспрессии генов ММП-3, ММП-2, ММП-13, HAS-1, а также генов гиалуронидазы 1 и эластазы нейтрофилов через 24 часа. Экспрессия генов HAS-1, ММП-3 сохранялась до 72 часов, а экспрессия генов ССП-2, ММП-13, гиалуронидазы 1 и эластазы к 72 часам снижалась. Эти результаты демонстрируют, что в коже, подвергаемой биоревитализации путём инъекции ГК, наблюдается усиление некоторых генов, вовлечённых в организацию и дегрегацию внеклеточного матрикса, динамика поведения которых зависит от времени культивирования клеток [130].

Гиалуроновая кислота снижает апоптоз фибробластов кожи, индуцированный различными стрессирующими факторами (ультрафиолетовое облучение, физическое воздействие), в то время как фибробласты has 1/3, имеющие высокий уровень экспрессии гиалуронансинтазы HAS 2, более устойчивы к апоптозу, вызванному стрессом [182].

Положительный клинический эффект инъекции препаратов ГУ отмечен при лечении шрамов от угревой сыпи [221], терапии возрастных изменений кожи лица и рук женщин в возрасте 35-55 лет с использованием 5-бальной стандартизированной международной шкалы GAIS, стандартизированной 5-бальной шкалы оценки сухости кожи, определением уровня трансэпидермальной потери влаги (TEWL) [52].

Клинический эффект биоревитализации возрастных изменений кожи препаратами нативной высокомолекулярной гиалуроновой кислоты показан различными авторами [113, 152, 209, 211, 222, 228, 251, 256, 275].

С позиции стратегии эффективности инъекционной косметологии, в последние годы разработана технология создания нового класса инъекционных препаратов на основе гиалуроновой кислоты, модифицированной низкомолекулярными биорегуляторами – биорепарантами [10, 96, 97].

Витамины (аскарбиновая кислота, ретинол, рабофлавин, токоферол, фолиевая кислота), аминокислоты (глицин, цистеин, метионин, пролин, лизин), олигопептиды (глутатион, карнитин), коферменты (коэнзим Q), металлы (Cu, Zn, Mg), иммобилизированные к полисахариду ковалентными химическими связями, при деградации ГУ во внеклеточном пространстве вместе с его фрагментами с помощью специфических рецепторов CD 44 и RНАММ фибробластов путём эндоцитоза адресно поступают в клетки. Модифицированный ГУ при этом выполняет роль «наноконтейнера» для данных веществ. В результате, по мнению авторов, создаётся активное депо витаминов, аминокислот, металлов, антиоксидантов, коферментов, необходимых для нормализации метаболизма фибробластов в местах инъекции на достаточно продолжительное время [96], что способствует запуску клетками собственного синтеза коллагена, эластина и неколлагеновых белков и достижению основной цели биоревитализации.

Эксперименты на животных с подкожным введением биорепаранта «Гиалрипаейр-02» (Россия), показали равномерное распределение препарата в межклеточном пространстве дермы кожи в местах инъекции и заметную пролиферацию фибробластов [62, 63, 95, 96].

Отмечены и клинические положительные результаты применения биопрепаратов при восстановлении инволюционных изменений кожи. Так, изучение уровня ИЛ-6, ИЛ-1 β , ММП-1, коллагена типа I, а также показателей GAIS и шкалы тяжести морщин WSRS до начала инъекции техникой мезотерапии кожи лица и через 1 и 2 месяца при четырёхкратном введении композиции гиалуроновой кислоты с витаминами, аминокислотами, коферментами и антиоксидантом женщинам 50-65 лет, а также композиции гиалуроновой кислоты с коэнзимом Q₁₀ женщинам 35-50 лет выявило статически значимую эффективность лечения [237]. В то же время при использовании в целях биоревитализации таких модифицированных препаратов ГУ трудно оценить, за счёт какого компонента этих композиции

(гиалуроновой кислоты или связанных с ним низкомолекулярных биорегуляторов) наблюдается обнаруживаемые положительные результаты.

К настоящему времени в России были одобрены и разрешены к практическому применению в дерматокосметологии большая группа биоревитализантов.

Вместе с тем в литературе имеются данные об отсутствии эффективности мезотерапии. Так, проспективное исследование по оценке клинической эффективности мезотерапии с инъекциями в периокулярные области (шесть сессий с интервалом в две недели) с биопсией кожи в области лечения и через 3 месяца после лечения показало, что статистически значимых изменений количества коллагена типов I, III, VI, вновь синтезированного коллагена, общего эластина и тропоэластина, определяемых иммуногистологически с использованием компьютеризированного морфометрического анализа, не наблюдается [153]. Другие авторы указывают на неоднозначность эффективности мезотерапии, наличие явных и потенциальных побочных эффектов или на отсутствие серьезных научных данных, посвященных влиянию мезотерапии на выраженность возрастных изменений кожи при кратковременном или длительном наблюдении [120, 123, 149].

Завершая обзор литературы, можно прийти к следующему заключению. Старение кожи происходит в соответствии с общими закономерностями возрастной инволюции и под воздействием факторов внешней среды.

Возрастные изменения кожи проявляются, в основном, после 35 лет и они связаны с изменениями стационарного состояния метаболизма внеклеточного матрикса, снижением количества и биосинтетической функции фибробластов, возрастанием скорости распада основных биополимеров – гиалуронана, коллагена и протеогликанов, приводящих к дезорганизации компонентов экстрацеллюлярного матрикса.

Уникальные физико-химические свойства гиалуроновой кислоты, её биологические функции в ткани кожи, способность взаимодействовать с другими компонентами экстрацеллюлярного матрикса и фибробластами

привлекли внимание к возможности использования для коррекции возрастных изменений. Использование для этих целей высокомолекулярного ГУ (метод биоревитализации) является способом не только восполнения эндогенного дефицита гиалуроновой кислоты в коже, приводящего к улучшению тургора, разглаживанию микрорельефа, выравниванию тона, повышению стрессоустойчивости, а и создания физиологически благоприятной среды для активации метаболизма клеток кожи с усилением синтеза основных компонентов внеклеточного матрикса дермы.

Однако, сведения, имеющиеся в литературе, не однозначны в отношении оценки эффективности данного метода терапии возрастных изменений кожи. Кроме того, несмотря на широкое применение в практической косметологии научных исследований, посвященных изучению эффективности при коррекции возрастных изменений кожи, явно недостаточно.

В этой связи целью настоящего исследования явилось оценка влияния одного из препаратов, используемых для биоревитализации – JuvedermHydrate™ (Франция), содержащего высокомолекулярную нативную гиалуроновую кислоту, на метаболизм ткани кожи в местах его введения методом мезотерапии.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал исследования

Исследования были проведены на 160 самках белых беспородных крыс массой 280–320 г зрелого возраста (11–12 месяцев) и 30 – молодого возраста (4 – 5 месяцев) массой 160 – 170 г., содержащиеся в условиях вивария при сбалансированном питании и естественном освещении. При проведении экспериментов соблюдали этические нормы и рекомендации по гуманному отношению к лабораторным животным [40], которые введены Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1985), а также приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19.06.2003 г. №267 «Об утверждении правил лабораторной практики».

Животные были разделены на две группы. Крысам контрольной группы под лёгким эфирным наркозом вводили стерильный физиологический раствор хлористого натрия. Крысам опытной группы вводили препарат нестабилизированной гиалуроновой кислоты «Juvederm hydrateTM» (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 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, 3 и 6-е сутки эксперимента. Эвтаназию животных осуществляли под эфирным наркозом путём мгновенной декапитации на 2, 4, 7, 21 и 37-е сутки после первой инъекции гиалуронана.

Для исследований использовали сыворотку крови и кожу боковых поверхностей туловища в области введения препарата.

2.2. Биохимические методы исследования

В сыворотке крови опытной и контрольной групп животных 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 динамики изменений содержания цитокинов – инсулиноподобного фактора роста – 1 (IGF - 1) и трансформирующего фактора роста – бета1 (TGF- β 1), интерлейкина -1 β (IL-1 β) и фактора некроза опухолей – альфа (TNF- альфа).

В коже в области введения препарата гиалуронана изучали состояние углеводного обмена по активности гексокиназы, глюкозо-6-фосфатадегидрогеназы, лактатдегидрогеназы, уровней лактата и пирувата, содержанию общих гликозаминогликанов, гиалуроновой кислоты, гликогена. Выраженность процессов свободнорадикального окисления в коже оценивали по уровню первичных, вторичных и конечных продуктов перекисного окисления липидов, окислительной модификации белков, а состояние антиоксидантной защиты – по активности основных ферментов антиоксидантной защиты: супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы. Кроме того, определяли содержание в коже общего коллагена и его нейтрально-соле-растворимой фракций, свободного гидроксипролина.

Определение суммарного содержания гликозаминогликанов [11]. Принцип метода заключается в том, что гликозаминогликаны (ГАГ) экстрагируют щёлочью, далее осаждают этанолом, содержащим 0,1 М уксуснокислый калий и 0,17 М уксусной кислоты, подвергают гидролизу 0,3 М раствором

трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Образовавшиеся гексуроновые кислоты (глюкуроновая, идуроновая) определяют по образованию окрашенного продукта с карбозолом в присутствии концентрированной серной кислоты, имеющего максимум поглощения при 530 нм.

Навеску свежей кожи (100 мг) на холоде растирали в фарфоровой ступке с кварцевым песком. Гомогенат переносили в центрифужную пробирку, вносили 4 мл 0,5 н. раствора едкого натра и экстрагировали при постоянном встряхивании в течение 6 часов. Надосадочную жидкость отделяли путём центрифугирования в течение 6 минут при 3000 об/мин. 0,5 мл надосадочной жидкости помещали в другую центрифужную пробирку, добавляли 2 мл охлаждённого до 1–4 °С этанола, содержащего 0,1 М уксуснокислый калий и 0,14 М уксусную кислоту. Содержимое пробирки перемешивали и через 5–6 мин. центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость удаляли, к осадку добавляли 3 мл 0,3 М раствор ТХУ, эмульгировали и подвергали гидролизу в кипящей водной бане в течение 30 минут, пользуясь каплеуловителем. Пробу охлаждали и центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин. В надосадочной жидкости определяли содержание гексуроновых кислот.

Для этого в две пробирки (контроль и опыт) при охлаждении пробирок в ледяной воде вносили по 1 мл надосадочной жидкости и по 5 мл концентрированной серной кислоты, содержащей 0,2 М тетраборнокислый натрий. Обе пробирки нагревали в кипящей водяной бане в течение 10 минут и охлаждали. В опытную пробу вносили 0,1 мл 0,01 М раствора карбозола в 16,1 М этаноле, в контрольную пробу — 0,1 мл этанола. Пробы встряхивали, нагревали в сильно кипящей водяной бане в течение 120–130 секунд, охлаждали и фотометрировали при 530 нм опытную пробу против контрольной. Содержание гликозаминогликанов определяли по калибровочному графику концентрации глюкуроновой кислоты.

Определение гиалуроновой кислоты производили по M.F. Chaplin, Y.F. Kennedy [8]. По данному методу вначале гиалуроновая кислота выделяется из

общих гликозаминогликанов путём ионообменной хроматографии и в последующем количественно определяется по реакции Дише с карбозолом [11].

1,0 мл щелочного экстракта ГАГ ткани кожи (получение см. выше) нейтрализовали 0,2 н. раствором HCl и подвергали протеолизубелка добавлением протеиназы К с детергентом (0,5 % додецилсульфата натрия и протеиназы KV302 В с содержанием более 100 мкг/мл) при 42–45 °С в течение 4 часов.

Депротеинизацию гидролизата осуществляли методом ионообменной хроматографии на микроколонке с ДЕАЕ–целлюлозой с использованием концентрированного раствора мочевины и детергентом (8 М раствора мочевины, 0,05 М раствор ацетата натрия и 0,1 % раствор тритона X–100, рН 6). Для этого гидролизат разбавляли 5–й кратным объёмом раствора мочевины с детергентом и заливали хроматографическую колонку (высота 70 мм, диаметр 7 мм), заполненную ДЕАЕ–целлюлозой, предварительно промытой этим же раствором мочевины. Белки гидролизата вымывали тем же раствором мочевины со скоростью 0,2–0,4 мл/мин, контролируя наличие белка спектрофотометрически при длине волны 280 нм.

После полного удаления белка приступали к выделению гиалуроновой кислоты путём элюции раствором NaCl: вначале 0,15 М раствором элюировали оставшиеся в гидролизате гликопротеины, а затем 0,3 М раствором – гиалуроновую кислоту в отдельный стаканчик, выпаривали досуха при 45–50 °С, остаток растворяли в 2 мл дистиллированной воды и определяли в ней содержание гексурановых кислот по реакции Дише карбозоловым методом после предварительного гидролиза гиалуроновой кислоты (как описано выше).

Для изучения содержания гликогена выделение полисахарида из ткани кожи проводили по G. Good, H. Cramer, M. Somogyi в модификации [172] путём солубилизации в 30% горячем растворе KOH, последующего осаждения и трёхкратного промывания осадка гликогена этанолом. Промытый осадок подвергали кислотному гидролизу и производили определение количества образовавшейся глюкозы.

Навеску свежесыделенной ткани кожи (100 мг) помещали в центрифужную пробирку, добавляли 1 мл 30% раствора КОН, нагревали в течение 2 часов в кипящей водяной бане, охлаждали, добавляли 2 мл этанола, давали вскипеть и ставили в холодильник для выпадения осадка. Осадок, содержащий гликоген, центрифугировали в течение 30 минут при 3000 об/мин, надосадочную жидкость декантировали, осадок трёхкратно промывали этанолом с последующим центрифугированием. Остаток этанола выпаривали на водяной бане. К осадку добавляли 3 мл горячей дистиллированной воды, 2 мл 2 н. раствора серной кислоты и подвергали гидролизу гликоген путём нагревания в кипящей водяной бане в течение 120 минут с каплеуловителем. Пробу охлаждали и содержимое пробирки последовательно нейтрализовали 5 н. и 0,5 н. растворами едкого натра до pH 7,5–8 и доводили объём содержимого в пробирке до 10 мл дистиллированной водой, перемешивали.

В 0,1 мл гидролизата определяли содержание глюкозы глюкозооксидазным методом с использованием набора реагентов ООО «Ольвекс Диагностикум» (Россия). Метод основан на том, что глюкоза при действии глюкозооксидазы окисляется до глюколактона с образованием пероксида водорода. H_2O_2 с участием пероксидазы способствует окислительному азототечению 4-аминоантипирина и фенола с образованием хинолинового красителя. Интенсивность окраски раствора пропорциональна содержанию глюкозы в исследуемом материале и определяется фотометрически при длине волны 500 нм. Расчёт содержания глюкозы производится с учётом разведения и её концентрации в калибраторе.

Схема реакции:



$$2\text{H}_2\text{O}_2 + 4\text{-аминоантипирин} + \text{фенол} \xrightarrow{\text{пероксидаза}} 4\text{H}_2\text{O} + \text{хинолиновый краситель}.$$

Расчёт содержания гликогена в мг/г ткани осуществляли по формуле:

$X \text{ мг/г} = m * V * 0,927 / V_1 * P$, где m – количество определяемой глюкозы в мг, V – общий объём гидрализата после нейтрализации в мл, V_1 – объём гидрализата взятый на определение (0,1 мл), P – навеска ткани в г, 0,927 – переводной коэффициент от глюкозы к гликогену.

Определение пировиноградной кислоты осуществляли по методу Н. Gloster, Н. Harris [4].

Принцип метода состоит в том, что пировиноградная кислота под действием лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27) восстанавливается в молочную кислоту. Это сопровождается окислением НАДН. При рН 6,9 превращение НАДН в НАД⁺ протекает практически до конца и эквимолекулярно превращению пирувата в лактат. Понижение концентрации НАДН измеряется спектрофотометрически при длине волны 340 нм.

Для определения свежевыделенную ткань кожи (100 мг) сразу помещали в замороженную в лёд фарфоровую ступку, содержащую 2 мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ) в 0,5 н. растворе соляной кислоты, измельчали ножницами и растирали с кварцевым песком. Гомогенат переносили в центрифужную пробирку, фарфоровую ступку промывали 1 мл того же раствора ТХУ и объединяли с гомогенатом. Пробирку центрифугировали в течение 10 мин при 2000 об/мин. К 2 мл прозрачной надосадочной жидкости прибавляли 1 мл 1,1 М раствора K_2HPO_4 и 2 мл забуференного фильтрата переносили в кювету спектрофотометра, вносили в неё 1 мл 1,1 М раствора K_2HPO_4 и 0,05 мл $3 \cdot 10^{-3}$ М раствора восстановленного НАДН.

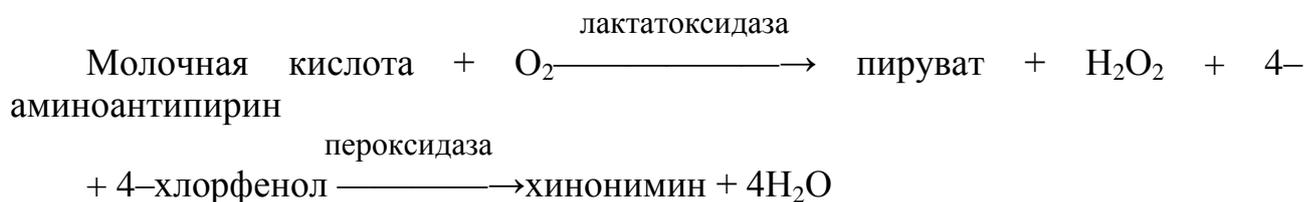
Первый отсчёт оптической плотности против дистиллированной воды при длине волны 340 нм делали через 2 мин. после внесения НАДН. Затем в кювету добавляли 0,05 мл раствора лактатдегидрогеназы (0,75 мг/мл в растворе сульфата аммония), хорошо перемешивали и спустя 2 мин. отмечали оптическую плотность. Отсчёты оптической плотности повторяли с минутными интервалами в течение 3 мин.

Количество пировиноградной кислоты вычисляли по изменению оптической плотности пробы после вычитания экстинкции контроля, с учётом массы ткани и разведения. Для расчёта пирувата использовали пробы с содержанием пировинограднокислого лития с концентрацией 0,1 мкмоль/мл.

Определение молочной кислоты проводили набором реагентов «Молочная кислота» ООО «Ольвекс Диагностикум».

Принцип метода заключается в окислении молочной кислоты лактатоксидазой. Образующийся в данной реакции пероксид водорода при участии пероксидазы способствует окислительному азотосочетанию 4-аминоантипирина и 4-хлорфенола с образованием окрашенного соединения (хинонимина). Концентрация хинонимина пропорциональная содержанию молочной кислоты и определяется фотометрически при длине волны 500 нм. Расчёт концентрации молочной кислоты осуществляется с помощью калибратора, содержащего 3,34 ммоль/л молочной кислоты.

Схема реакции:



В качестве исследуемого образца при процедуре анализа использовали 0,1 мл забуференного фильтрата гомогената ткани кожи в 10% растворе ТХУ в 0,5 н. растворе соляной кислоты, полученной при определении пировиноградной кислоты.

При определении активности ферментов для получения гомогената ткани кожу немедленно, после выведения животного из эксперимента, очищали от жировой ткани и взвешивали на торсионных весах. Затем ткань кожи помещали в холодный 0,25 М раствор сахарозы, измельчали и растирали на холоду с использованием кварцевого песка в течение 2–3 мин. Полученный гомогенат обрабатывали тритоном X-100 в конечной концентрации 0,1% для разрушения клеточных и субклеточных мембран, оставляли на холоду и через

30 минут центрифугировали в течение 10 минут при 2800 об/мин. Супернатант переносили в отдельную пробирку и использовали для определения активности ферментов. Содержание белка в пробе определяли по Лоури.

Определение активности лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27) выполняли с использованием набора реагентов «Лактатдегидрогеназа» ООО «Ольвекс Диагностикум».

Принцип метода состоит в том, что пируват при добавлении восстановленного НАДН превращается в лактат. Скорость окисления НАДН в НАД⁺ пропорциональна активности лактатдегидрогеназы, измеряется спектрофотометрически при длине волны 340 нм (334 или 365 нм) против воздуха.

Схема реакции:



Расчёт активности фермента (Ед/мг_{белка}) осуществляется по формуле:

$$\text{Ед/мг}_{\text{белка}} = 8,095 * \Delta E_{340}/\text{мин при } 25^{\circ}\text{C} * V, \text{ где } 8,095 - \text{коэффициент, } V - \text{содержание белка в гомогенате в мг/мл}$$

Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.49) определяли по методу G. Glock, P. McLean (1953) в модификации [58]. Принцип метода заключается в определении количества восстановленного НАДН, образующегося при окислении глюкозо-6-фосфата в 6-фосфоглюколактон, спектрофотометрически при длине волны 340 нм.

В кювету спектрофотометра с длиной оптического пути 10 мм вносили 2,9 мл триэтанолового буфера рН 7,5, 0,1 мл 0,03 М раствора НАДФ и 0,02 мл гомогената ткани кожи (получение гомогената см. выше), перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 5 минут. Затем добавляли 0,05 мл 0,04 М раствора динатриевой соли глюкозо-6-фосфата и тотчас же измеряли оптическую плотность пробы при 340 нм, а затем ровно через 5 минут измерение оптической плотности повторяли. Расчёт результатов производили по формуле:

$$A = \frac{\Delta E / \text{мин} * 3,07 * 50}{6,22 * 60 * V}$$

где A – активность фермента в мкмоль/(с*мг) белка, ΔE – разность интенсивности поглощения в конце и в начале пробы, 50 – коэффициент пересчета на мл гомогената, 6,22 – коэффициент миллимолярной экстинкции НАДФ, 3,07 – объем пробы, 60 – коэффициент перевода из минут в секунды, V – содержание белка в гомогенате в мг/мл.

Активность гексокиназы (КФ 2.7.1.1) изучали спектрофотометрически по методу, основанному на применении сопряженной системы, где в качестве вспомогательного фермента используется глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа. Инкубационная среда содержала $5 \cdot 10^{-2}$ М трис – HCl-буфер, pH 8,0, 2 мМ АТФ, 5 мкМ MgCl₂, 0,25 мМ НАДФ, 0,3 МЕ дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата. Объем среды составлял 3 мл. Реакцию проводили при комнатной температуре. Реакцию начинали добавлением в кювету спектрофотометра глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (0,5 - 1 мг белка). В указанных условиях реакция протекает линейно в течение 20 – 25 мин. Измеряли оптическую плотность пробы при 340 нм, а точно через 5 мин. повторяли измерение оптической плотности. Активность выражали в нмоль НАДФН, восстановленного за 1 мин. на мг белка.

Определение уровня окислительно модифицированных белков проводили по методу R.L. Levine в модификации Е.Е. Дубининой (1995) [71, 93]. Метод основан на реакции взаимодействия карбонильных групп и иминогрупп окисленных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, характеризующихся специфическим спектром поглощения в ультрафиолетовой и видимой областях спектра.

В две центрифужные пробирки (контроль и опыт) вносили по 0,1 мл гомогената кожи, добавляли по 1 мл 20% раствора ТХУ для осаждения белка, 1 мл 2 М раствора HCl в контрольную пробу и 1 мл 0,01 М раствора 2,4-ДНФГ в

2 М раствора HCl в опытную пробу. Пробирки оставляли в тёмном месте на 1 час. Центрифугировали пробы при 3000 об/мин в течение 15 минут, трижды проводили отмывку полученных осадков от остатков 2,4-ДНФГ смесью спирта-ректификата и этилацетата (1:1). Осадки высушивали, растворяли в 8 М растворе мочевины. Оптическую плотность образовавшихся динитроненилгидразонов регистрировали на спектрофотометре при длинах волн 270, 370 и 430 нм. Содержание динитрофенилгидразонов выражали в единицах оптической плотности на г белка, при этом при длине волны 270 нм определяются алифатические альдегиддинитрофенилгидразоны (АДНФГ) нейтрального характера, при 370 нм – алифатические кетондинитрофенилгидразоны (КДНФГ) нейтрального характера, при 430 нм – КДНФГ основного характера.

Продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли спектрофотометрически в гептан-изопропаноловых экстрактах, первичные и вторичные – по методу, описанному И.А. Волчегорским и др. [107], конечные продукты – по методу, описанному Е.И. Львовской и др. [87].

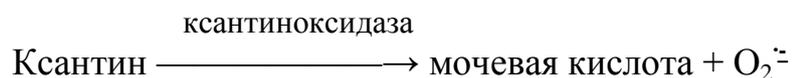
Липиды ткани экстрагируются гептан-изопропаноловой смесью, которые впоследствии разделяются. При этом в гептановую экстрагируются преимущественно нейтральные липиды, в изопропаноловую – дифильные (полярные). В обеих липидных фазах измеряются оптическая плотность изолированных двойных связей при длине волны 220 нм, ацилгидроперекисей и диеновых конъюгатов (первичные продукты перекисного окисления липидов) – при 233 нм, кетодиенов и сопряжённых триены (вторичные продукты перекисного окисления липидов) – при 278 нм, шиффовых оснований (конечные продукты) – при 400 нм. Содержание продуктов липопероксидации рассчитывается по величине отношений экстинкций E_{233}/E_{220} , E_{278}/E_{220} и E_{400}/E_{220} в каждой фракции.

В пробирку вносили 0,2 мл гомогената кожи, добавляли 6 мл смеси гептан-изопропанол (2:1 по объёму) и экстрагировали при встряхивании в шуттель-аппарате в течение 20 минут. Добавляли 1 мл 1н. раствора HCl,

интенсивно перемешивали и оставляли на 30 мин. После разделения фаз верхнюю гептановую фазу отсасывали и переносили в чистую пробирку. К водно-спиртовому (нижнему) слою добавляли 1 г сухого NaCl для обезвоживания. Оптический контроль готовили по описанной схеме с экстрагированием 0,2 мл дистиллированной воды. В каждой фазе измеряли оптическую плотность опыт против контроля при 220, 233, 278 и 400 нм. Пересчёт относительного содержания продуктов пероксидации (E) в условных единицах на г ткани проводили с учётом разведения.

Активность супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1) оценивали с использованием набора реагентов «RANSOD» фирмы «RandoxLabor. Ltd». СОД катализирует превращение супероксиданионного радикала кислорода ($O_2^{\cdot-}$), продуцируемого в окислительных процессах, в пероксид водорода и молекулярный кислород. Ксантин и ксантинооксидаза используются для генерации $O_2^{\cdot-}$, который, вступая в реакцию с хлоридом 2-(4-йодофенил)-3-(4- $O_2^{\cdot-}$ -нитрофенил)-5-фенилтетразолия (I.N.T.), образует формазан красного цвета. Активность СОД определяется как степень ингибирования этой реакции.

Схема реакции:



За единицу активности СОД принимается то количество фермента, которое вызывает 50% угнетение образования формазана.

В одну пробирку вносили 0,05 мл гомогената ткани, в другую стандарт (0,05 мл). В обе пробирки добавляли по 0,05 мл разбавителя проб, по 1,7 мл смешанного субстрата, содержащего ксантин и I.N.T. и 0,25 мл раствора ксантинооксидазы. Перемешивали и через 30 секунд измеряли при длине волны 505 нм оптическую плотность A_1 , через 3 мин — A_2 . Содержание супероксиданиона в пробирках вычисляли по формуле : $A_2 - A_1/3 = \Delta A/\text{мин}$

стандарта и пробы. Далее рассчитывали выраженность ингибирования реакции СОД по формуле:

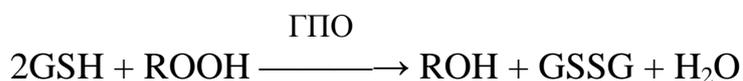
$$\% \text{ ингибирования} = 100 \frac{100 * \Delta A_{\text{ст.}}/\text{мин}}{\Delta A_{\text{пр.}}/\text{мин} * SL},$$

где SL — разбавитель проб.

Для определения активности СОД в Ед/мл гомогената ткани строили график процентного ингибирования для каждой точки стандарта в шкале Log 10 (концентрация стандарта СОД в Ед/мл). Для расчёта переводили активность СОД на мг белка в пробе.

Активность глутатионпероксидазы (ГПО, КФ 1.11.1.9) изучали с использованием набора реагентов «Glutationperoxidase» фирмы «Randox Labor. Ltd». В основе метода лежит способ, предложенный Paylia и Valentine. ГПО с помощью гидроперекиси кумина катализирует окисление глутатиона. Окисленный глутатион в присутствии глутатионредуктазы и восстановленного НАДФН переходит в восстановленную форму с параллельным окислением НАДФН в НАДФ⁺, что сопровождается уменьшением абсорбции при 340 нм.

Схема реакции:



К 0,05 мл гомогената кожи (опыт) и 0,05 мл дистиллированной воды (контроль) в двух разных пробирках приливали по 1,0 мл агента разведения, через 5 мин. добавляли по 1 мл реактива Драбкина, по 2,5 мл реагента (глутатион 4 ммоль/л, глутатионредуктаза > 0,5 Е/л, НАДФН 0,34 ммоль/л в фосфатном буфере), затем по 0,1 мл кумина, перемешивали. Через 1 мин измеряли начальную абсорбции пробы и контроля (E_0) при длине волны 340 нм, через 1 мин – E_1 , через 3 мин – E_2 .

Расчёт в Е/мг белка в гомогенате:

$X \text{ E/мг} = 8412 * ((E_1 - E_2) + (E_2 - E_1)/2)/\alpha$, где 8412 – коэффициент, учитывающий объем пробы и молярную экстинкцию образования НАДФ, α – концентрация белка в пробе в мг.

Активность каталазы (КФ 1.11.1.6) оценивали по методу, описанному М.А. Королюк и др. [46]. Пероксид водорода образует с солями молибденовой кислоты стойкий окрашенный комплекс. В присутствии каталазы интенсивность окрашивания раствора снижается вследствие разложения каталазой H_2O_2 .

В две центрифужные пробирки (холостой опыт и проба) помещали по 2 мл 0,03% раствора пероксида водорода и запускали реакцию добавлением в пробу 0,1 мл тканевого гомогената кожи, в холостой опыт вносили одновременно 0,1 мл дистиллированной воды. Реакцию через 10 мин. при комнатной температуре (24–25°C) останавливали добавлением в обе пробирки по 1 мл 4% раствора молибдата аммония и по 0,5 мл 20% раствора ТХУ. Пробирки центрифугировали 10 минут при 2800 об/мин. Интенсивность развивающейся окраски измеряли при длине волны 410 нм, опыт против контрольной пробы. В контрольную пробу вместо раствора пероксида водорода вносили 2 мл фосфатного буфера рН 7,6. Активность фермента рассчитывали по формуле:

$A = (E_{\text{хол}} - E_{\text{оп}}) * V * t * K/a$, где A активность каталазы в $\text{мкмоль/мин} \cdot \text{мг}$ белка, $E_{\text{хол}}$ и $E_{\text{оп}}$ – экстинкции холостой и опытной проб, V – объем вносимой пробы, t – время инкубации в минутах, K – коэффициент микромолярной экстинкции пероксида водорода, равный 36,81, a – количество белка в мг в пробе.

Определение свободного гидроксипролина (СГП) в коже осуществляли по П.Н. Шараеву и др. [11]. Принцип метода основан на окислении гидроксипролина хлорамином Б с последующей конденсацией продукта окисления с пара-диметиламинобензальдегидом.

Навеску ткани (15мг) растворили с кварцевым песком в фарфоровой ступке на холоде, добавляя 0,6 мл. дистиллированной воды. Гомогенат

переносили в мерную центрифужную пробирку, центрифугировали 15 мин. при 3000об/мин. Надосадочную жидкость переносили в другую центрифужную пробирку. Экстракцию повторяли, супернатант объединяли с предыдущим и добавляли 0,5мл. 57% раствора хлорной кислоты и 0,5 мл 5% раствора трихлоруксусной кислоты. Центрифугировали 7 мин. при 3000об/мин. Надосадочную жидкость нейтрализовали 6,0 н раствором NaOH по фенолфталеину до слабозимой окраски, соответствующей рН 8,0. Содержимое пробирки доводили до 3 мл. дистиллированной водой. В контрольную центрифужную пробирку добавляли 3мл, дистиллированной воды. В обе пробирки (контроль и опыт) вносили по 0,5мл. 7% раствора хлорамина Б в 0,1М фосфатном буфере (рН8,0), через 5 минут в обе пробирки приливали по 0,5 мл 57% раствора хлорной кислоты и 10% раствора парадиметиламинобензальдегида в 96% этаноле. Содержимое пробирок перемешивали и помещали в кипящую водяную баню на 100-120 сек. Пробирки охлаждали и добавляли по 0,5 мл. насыщенного раствора NaCl, по 1 мл. CCl₄ и по 3 мл. н-бутанола. Содержимое пробирок тщательно перемешивали, центрифугировали в течение 10 мин. при 3000 об/мин., верхнюю фазу отсасывали и фотометрировали при 550-560 нм в кювете толщиной 10 мм. опыт против контроля. Содержание СГП рассчитывали по калибровочному графику.

Суммарный коллаген в коже определяли по П.Н. Шараеву и др. [11]. Коллаген ткани подвергается кислотному гидролизу и в гидролизате определяется концентрация гидрокапролина.

Навеску кожи 30 мг. обезжировали в смеси этанола и этилового эфира (1:1) и эфира, гомогенизировали и высушивали до постоянной массы. 5 мг. сухой массы ткани запаивали в ампулы с 2 мл. 6,0 н раствором HCl и гидролизовали при 106°C в течение 6 часов. Гидролизат нейтрализовали 6,0н раствором NaOH и определяли концентрацию гидроксипролина по вышеописанной методике.

Определение фракции нейтральносоле-растворимого коллагена проводили по методу, описанному Л.Я. Прошиной, М.Н. Приваленко [78]. При этом

нейтральносолеорастворимый коллаген экстрагируется 0,2М раствором NaCl. Экстракт подвергается кислотному гидролизу, в гидролизате определяется концентрация гидроксипролина.

10 мг. обезжиренной и гомогенизированной сухой массы ткани помещали в центрифужную пробирку, проливали 2,0 мл. 0,2М раствора NaCl и экстрагировали при 4°C в течение 24 часов при встряхивании на жутель-аппарате. Пробирку центрифугировали 10 мин. при 3000 об/мин., надосадочную жидкость переносили в другую пробирку, приливали концентрированную HCl до конечной концентрации 6,0н раствор запаивали в ампулу и подвергали гидролизу при 106°C в течение 6 часов. Гидролизат нейтрализовали 6,0н раствором NaOH и определяли содержание гидроксипролина.

Содержание цитокинов: инсулиноподобного фактора роста -1 (IGF -1), трансформирующего фактора роста – бета (TGF-β1), интерлейкина – 1-бета (IL - 1β), фактора некроза опухоли – альфа (TNF-α) определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа на анализаторе StatFox 2100 с использованием наборов реагентов IGF ELISA(фирма «Mediagnost»), TGF-β ELISA (Affymetrix Bioscience), ИФА-ИЛ-1β и ИФА-ФНО-альфа (ОО «Цитокиновый контур») согласно протоколу производителя.

2.3. Гистологические и иммуногистохимические методы исследования¹

Объектом морфологического и иммуногистохимического изучения стали фрагменты кожных покровов в области внутридермального введения препарата гиалуроновой кислоты и физиологического раствора. Забор материала на исследование производили на 2-е, 4-е, 7-е, 21-е и 37-е сутки после проведения инъекций. Кусочки ткани фиксировали в 10 % нейтральном формалине, осуществляли стандартную проводку спиртом (70°, 80°, 90° и 100°), спирт –

¹Выражаем благодарность д.м.н., профессору, заведующему кафедрой гистологии Ижевской государственной медицинской академии Г.В. Шумихиной за помощь при выполнении данного раздела работы.

хлороформом, парафин – хлороформом, двумя порциями парафина и заливали в парафин. Из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 5-6 микрон с использованием микротомы LEICA 4RM 2145 (Германия). Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по методу Ван-Гизона, по Маллори [81]. Для выявления аргирофильных волокон импрегнировали солями серебра по Футу [19]. Для гистохимического выявления суммарной фракции ГАГ в ткани на срезах проводили качественную реакцию по Хейлу [45]. Визуализацию и фотографирование препаратов осуществляли с использованием микроскопа LEICA ДМ-5000 В (Германия) со специализированными программным обеспечением управления настройками и захвата изображения.

Иммуногистохимическое выявление цитокинов Ki-67, определяющегося в ядрах пролиферирующих клеток, и фактора роста фибробластов-1 (FGF-1) в цитоплазме экспрессирующих этот фактор клеток осуществляли согласно протоколу производителя с использованием мышиных поликлональных антител («Santa Cruz Biotechnology», США) в универсальной системе вторичной детекции для визуализации (поликлональная непрямая стрептовидин – биотиновая система детекции LEICABOND («Novocastra^{t m}», Германия). Окрашивание производили в гистостейнере для иммуногистохимии LEICA BOND MAX («LEICA», Германия). После проведения реакции срезы докрашивали раствором гематоксилина и заключали в бальзам. Подсчет клеток, экспрессирующих цитокин FGF-1, осуществляли с помощью микроскопа LEICA ДМ-5000В. Окрашенные клетки считали в поле зрения при увеличении в 400 раз. В каждой группе крыс на каждый срок исследования делали измерения в 20 полях зрения.

2.4. Статистическая обработка результатов

Математическую обработку результатов исследования проводили с помощью пакета программ Statistica 6,0 фирмы Stat Soft для обработки статистической информации. 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 нормальном распределении) и U-критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферони (при асимметричном распределении). Критический уровень значимости принимали $\rho=0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Характеристика биохимических констант сыворотки крови лабораторных животных при внутридермальном введении гиалуроновой кислоты

На начальном этапе исследований мы хотели ответить на вопрос, оказывает ли влияние внутридермальное введение препарата высокомолекулярной нестабилизированной гиалуроновой кислоты методом мезотерапии на биохимический статус экспериментальных животных. Для решения этого вопроса в сыворотке крови экспериментальных животных изучили основные биохимические показатели.

Результаты изучения основных биохимических констант сыворотки крови экспериментальных животных приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Биохимические показатели сыворотки крови самок крыс при внутридермальном введении препарата нативной гиалуроновой кислоты

Показатели	Группы животных					
	Контрольная, n=18	Опытная				
		2-е утки n=12	4-е утки, n=12	7-е утки, n=12	21- сутки, n=16	37-е сутки, n=16
Белок общ. г/л	70±1,3	67±1,4	63±1,7*	64±1,6*	66±1,5*	75± 3,5
Мочевина, ммоль/л	4,5±0,66	3,6±0,56	5,2±0,34	6,4±0,33	4,2±0,36	4,3±0,29
Креатинин, мкмоль/л	52±3,3	45±1,3	43±3,5	50±2,5	54±2,2	57± 1,8
Билирубин, мкмоль/л	15,3±0,33	15,8±0,30	17,8±0,32	20,3±0,52	12,6±0,16	13,8±0,28
Триглицериды, ммоль/л	1,0±0,19	0,8±0,17	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,Е/Л	17,8±1,62	15,3±0,55	18,6±1,25	27,5±0,73*	30,0±3,82*	22,0± 3,05
АЛТ, Е/л	63±5,1	79±6,3	67±3,7	47±3,5	66±4,4	64±4,5
АСТ, Е/л	158±5,9	167±9,9	146±3,9	141±6,3	155±4,5	150± 8,2

*Примечание: *)P<0,05, *) P <0,01*

Показатели биохимических констант сыворотки крови контрольной группы крыс сопоставимы с данными, представленными другими авторами [41, 51, 109].

Введение нестабилизированной высокомолекулярной гиалуроновой кислоты внутридермально техникой мезотерапии сопровождалось некоторыми изменениями биохимического статуса животных. У крыс опытной группы наблюдалось статистически значимое снижение содержания в сыворотке крови общего белка холестерина и триацилглицеролов, повышение активности щелочной фосфатазы на 7 и 21-е сутки эксперимента по сравнению с контрольной группой. Однако эти колебания не выходили за пределы физиологических норм данных показателей согласно литературным данным приведенных выше авторов.

Таким образом, внутридермальное курсовое введение препарата высокомолекулярной нативной гиалуроновой кислоты (JuvedermHydrate™, Франция) не приводит к существенным изменениям биохимического статуса организма экспериментальных животных.

3.2. Состояние углеводного обмена кожи экспериментальных животных в области интрадермального введения гиалурона

Кожа, в частности дерма, характеризуется высоким содержанием и интенсивным обменом гиалуронана. Период полураспада гиалуроновой кислоты в коже человека составляет 24-48 часов [47, 250], в коже крыс и кроликов 2,4-4 суток [85].

Оба компонента дисахаридного фрагмента полимера гиалуронана являются производными глюкозы, синтезируются из глюкозы и состояние обмена углеводов, прежде всего глюкозы в коже, представляет несомненный интерес, поскольку применяемый в виде инъекционного препарата гиалуронан химически идентичен гиалуронану дермы и отличается лишь количеством дисахаридных звеньев.

Необходимо также отметить, что рассмотрение биохимических данных относительно кожи приходится сопровождать определенной оговоркой, поскольку две главные составляющие части кожи – дерма и эпидермис – представляют собой ткани, существенно отличающиеся по химическому составу и клеточным элементам [70, 85]. Их разделение, с сохранением нативных свойств, практически вряд ли возможно, поскольку границы этих слоев кожи нечетки. В связи с морфологическими особенностями кожи, ее химический состав в значительной мере зависит от локализации и от толщины, отбираемой для анализа пробы. Учитывая указанные особенности, для анализа у всех групп животных бралась ткань кожи из аналогичных участков боковой поверхности туловища, а рыхлая (жировая) подкожная соединительная ткань отделялась на холоде при температуре 1-3⁰С и сразу же удалялась.

Для характеристики состояния углеводного обмена кожи у животных были изучены содержания пировиноградной и молочной кислот, уровни гликогена, гликозаминогликанов, гиалуроновой кислоты, активность гексокиназы, лактатдегидрогеназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. В эксперименте использовались самки крыс в возрасте 11-12 месяцев массой 280-320 г. Результаты исследования показали, что в коже животных в области введения гиалуроновой кислоты содержание пировиноградной кислоты практически не претерпевает изменений (таблица 2). Уровень молочной кислоты в первые сутки после введения препарата повышается, достигая статистически значимых различий на 4 и 7-е сутки опыта, характеризуя, вероятно, усиление процесса анаэробного окисления глюкозы. Показательно в этом отношении динамика изменений соотношения лактат/пируват. У крыс опытной группы на вторые, четвертые и седьмые сутки эксперимента после трехкратного интрадериального введения гиалуронана данный коэффициент возрастает, а в последующие дни наблюдения (21 - 37-е сутки опыта) – снижается, отражая превалирование вначале анаэробных процессов, а в последующем – аэробных.

Таблица 2 – Изменение показателей обмена углеводов в коже животных в области введения препарата гиалуроновой кислоты, Me[Q₁-Q₃]

Показатели	Группы животных					
	Контроль- ная, n=24	Опытная				
		2-е сутки, n=10	4-е сутки, n=16	7-е сутки, n=14	21-е сутки, n=14	37-е сутки 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<0,001
Г-6-ф ДГ, 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- 1,67] 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- 4,5] 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 гексуриновых 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 гексуриновых 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

Об изменении интенсивности обмена глюкозы в коже у животных подопытных групп свидетельствуют и колебания активности ферментов (рисунок 1). Активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) особенно значительно повышается на 2-е, 4-е и 7-у сутки эксперимента, подтверждая данные

определения лактата и пирувата. Высокий уровень активности ЛДГ сохраняется независимо от динамики соотношения лактат /пируват.

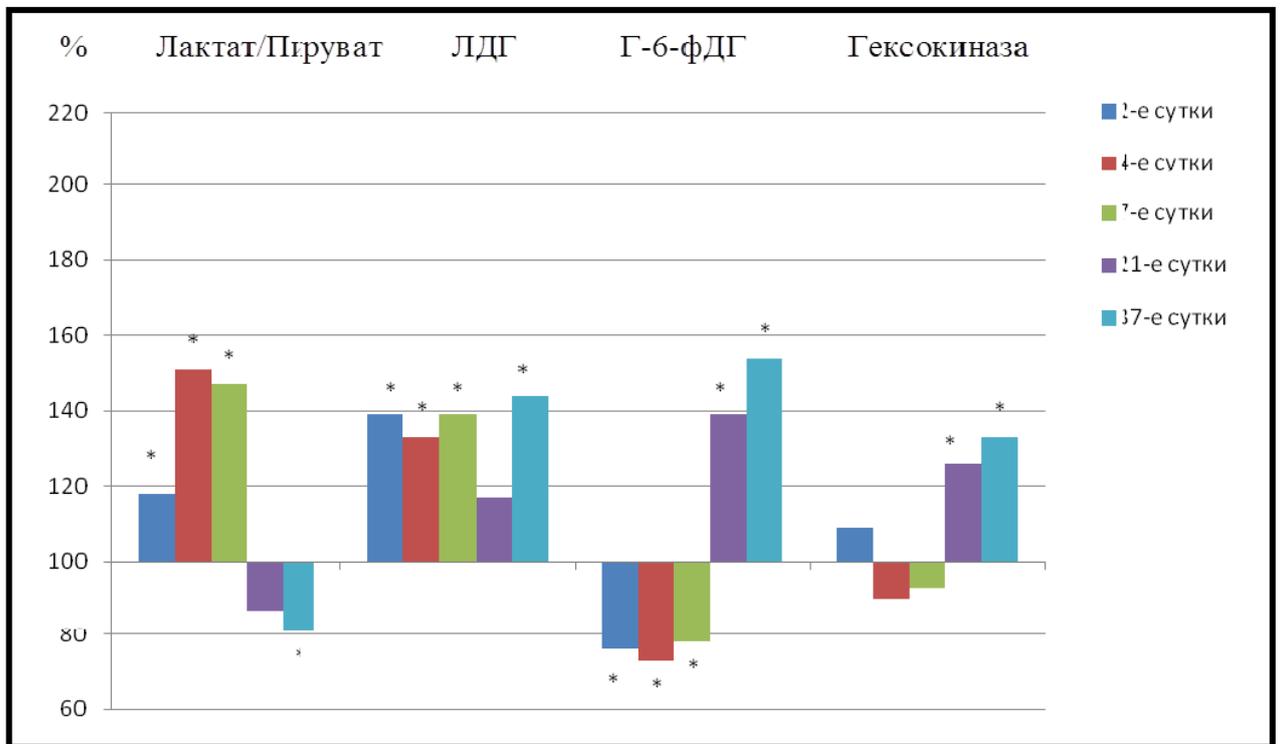


Рисунок 1 – Динамика изменений коэффициента лактат/пируват и активности ферментов углеводного обмена в коже опытной группы животных (в % к контролю)

Активность ключевого фермента углеводного обмена гексокиназы в первую неделю эксперимента не претерпевала статистически значимых изменений. Но на 24-е и 37-е сутки опыта существенно повышалась, отражая интенсификацию потребления глюкозы.

Активность ключевого фермента пентозофосфатного (гексозомонофосфатного) пути окисления глюкозы-глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы при интрадермальном введении глюкурона в коже в первую неделю эксперимента была существенно снижена. В более поздние сроки наблюдения на 21 и 37-е сутки от начала эксперимента она повышалась статистически значимо, характеризуя усиление в коже продукции восстановленного НАДФН и пентоз, используемых на биосинтетические цели.

Изучение содержания гликогена в коже при внутридермальной инъекции препарата гиалуронана выявило его снижение на все сроки наблюдения. При

этом на 4, 7 и 21-е сутки эксперимента падение уровня гликогена в коже было статистически значимым (рисунок 2). Снижение гликогена, очевидно, связано с усилением его мобилизации на обеспечение энергетических и других процессов на фоне некоторого падения активности гексокиназы.

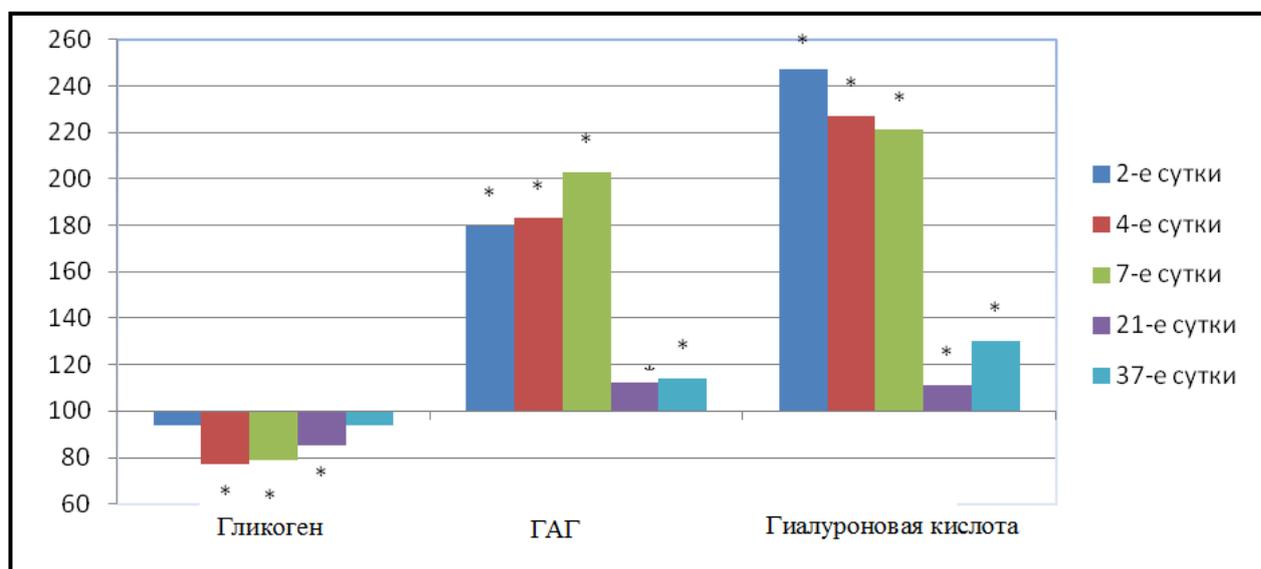


Рисунок 2 – Содержание некоторых биополимеров углеводов в коже в области внутридермального введения высокомолекулярного гиалуронана (в процентах к контролю)

Внутридермальные инъекции гиалуронана на следующие сутки после введения сопровождались увеличением содержания в коже суммы гликозаминогликанов (ГАГ) и гиалуронана в области введения. Гиалуронан в дерме кожи является наиболее представленным ГАГ [85], составляя более 60% от их суммарного содержания. Резкое повышение уровня ГАГ и гиалуронана вполне объяснимо распределением гиалуронана, введенного извне, поскольку основная масса (99%) гиалуронана экстрацеллюлярного матрикса находится в свободном состоянии [141]. Катаболизм гиалуронана в физиологических условиях осуществляется в фибробластах. При этом деградации гиалуронана предшествует связывание с белками семейства гиаладгеринов, и решающая роль в катаболизме гиалуронана принадлежит рецептору CD44, который необходим для его эндоцитоза [141]. Молекулы CD44 связываются с длиной макромолекулой полисахарида, собираются в кластер на стенках клеточной

мембраны, вовлекают гиалуронан в кавеолу, образуется эндосома, которая сливается с лизосомой. В лизосомах и частично в эндосомах гиалуронозная кислота подвергается воздействию гиалуронидаз, а затем β -глюкуронидазы и β -(N-ацетил)-глюкозаминидазы [250]. Конечные продукты деградации представлены олигосахаридом, состоящим из 4 дисахаридных звеньев и моносахаридами. Они могут поступать в кровь и частично выводиться с мочой [250], а моносахара использоваться для нужд тканей.

Таким образом, экзогенная гиалуронозная кислота, химически и структурно идентичная гиалуронану дермы, при внутридермальном введении методом мезотерапии приводят не только к увеличению содержания этого полисахарида в коже, но оказывают существенное влияние на метаболизм углеводов в области инъекций. При этом нельзя упускать из внимания то важное обстоятельство, что продукты деградации гиалуронана могут быть использованы и для энергетических нужд клеток кожи.

Гликолиз и окислительное фосфорилирование являются важнейшими процессами, которые обеспечивают клетки постоянным обновлением АТФ. Для клеток кожи характерным является интенсивное течение гликолитических процессов [47]. Об этом в наших экспериментах свидетельствует многократное превалирование концентрации лактата в коже экспериментальных животных над содержанием пирувата. Изучение активности ферментов гликолиза в различных клетках позволило установить строгую пропорциональность скорости гликолиза с активностью не только ключевых ферментов – гексокиназы, фосфофруктокиназы и пируваткиназы, но и лактатдегидрогеназы. В начальный период после интрадермального введения препарата гиалуронана на фоне статистически не значимых колебаний активности гексокиназы, характеризующей поглощение клетками кожи глюкозы, снижается активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, ключевого фермента пентозофосфатного пути окисления глюкозы, необходимого для продукции компонентов (НАДФН, пентозофосфаты), используемых в клетке, прежде всего, для биосинтетических

целей. При этом усиливается потребление гликогена, поскольку его содержание на 4, 7 и 21-е сутки статистически значимо снижается.

На 21 и 37-е сутки эксперимента наблюдается статистически значимое повышение активности и гексокиназы, и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы, что отражает усиление использования глюкозы не только на окислительные цели, но и на биосинтетические процессы. Это находит свое отражение в увеличении в коже экспериментальных животных уровня ГАГ и гиалуронана.

Таким образом, проведение курса внутридермального введения высокомолекулярного нестабилизированного гиалуронана методом мезотерапии приводит у экспериментальных животных зрелого возраста к интенсификации в коже в зоне инъекций в первые дни к повышению процессов анаэробного окисления углеводов с мобилизацией гликогена. Об этом свидетельствует увеличение в коже содержания молочной кислоты и соотношения лактат/пируват с повышением активности лактатдегидрогеназы. В отдаленные сроки после проведения курсовой терапии гиалуронаном в коже происходит активация аэробного окисления с усилением использования глюкозы на биосинтетические цели, что находит свое отражение в увеличении активности гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, снижении коэффициента лактат/пируват и повышении содержания гиалуронана и суммарных гликозаминогликанов.

3.3 Интенсивность липопероксидации и уровень окислительной модификации белков кожи в зоне внутридермального введения гиалурононовой кислоты

В процессах старения дермального слоя кожи особое внимание придается действию реактивных кислородных радикалов (активных форм кислорода), которые приводят к активации перекисного окисления липидов (ПОЛ), окислительной модификации белков, нарушению стабильности и динамики экспрессии различных генов на разных стадиях онтогенеза клеток [70]. Ряд

авторов в инициации возрастных изменений увеличению содержания продуктов ПОЛ отводят центральную роль [17, 44, 88, 90, 112, 234]. Наряду с повышением интенсивности ПОЛ при старении, показано снижение концентрации или активности компонентов антиоксидантной системы [88, 112].

По мнению А.П. Ястребова, В.А. Мещанинова [112], существенную роль свободнорадикального окисления при старении подтверждают несколько групп результатов экспериментальных исследований: во-первых, снижение с возрастом активности антиоксидантных ферментов; во-вторых, установленное во второй половине онтогенеза повышение содержания в тканях продуктов ПОЛ; в-третьих, инволюционное снижение в организме природных антиоксидантов; в-четвертых, снижение содержания продуктов ПОЛ под влиянием геропротекторов или мероприятий геропротекторного характера; в-пятых, увеличение продолжительности жизни животных под влиянием ряда антиоксидантов.

Таблица 3 – Содержание продуктов перекисного окисления липидов кожи у молодых и зрелых самок крыс, *Me* [Q₁-Q₃]

Показатели, усл. ед.	Возрастная группа		p
	Молодые (4-5 мес.), n=10	Зрелые (11-12 мес.), n=12	
Диеновые конъюгаты (гептан.фаза)	0,263 [0,178-0,291]	0,276 [0,218-0,351]	0,1593
Кетодиены и сопряженные триены (гептан.фаза)	0,102 [0,094-0,133]	0,139 [0,131-0,150]	0,0190
Шиффовы основания (гептан.фаза)	0,011 [0,010-0,014]	0,016 [0,013-0,022]	0,0172
Диеновые конъюгаты (изопропанол. фаза)	0,138 [0,128-0,156]	0,200 [0,177-0,234]	0,0056
Кетодиены и сопряженные триены (изопропанол. фаза)	0,205 [0,186-0,267]	0,291 [0,284-0,296]	0,0401
Шиффовы основания (изопропанол. фаза)	0,054 [0,035-0,066]	0,076 [0,054-0,087]	0,0013

В этой связи представляет интерес изучение интенсивности перекисидации липидов, окислительной модификации белков и состояние антиоксидантной системы кожи при интердермальном введении препарата гиалуроновой кислоты зрелым животным.

В таблице 3 представлены результаты определения продуктов перекисного окисления липидов, извлеченных из кожи молодых (возраст 4-5 месяцев) и зрелых (возраст 11-12 месяцев) самок белых крыс.

Из представленных в таблице данных видно, что имеются статистически значимые различия между возрастными группами в содержании первичных продуктов липопероксидации – диеновых конъюгатах (ДК) радикалов жирных кислот в изопропаноловой фазе липидного экстракта кожи, а также в уровнях вторичных (кетодиены и сопряженные триены, КД и СТ) и конечных (шиффовы основания, ШО) продуктов в гептановой и изопропаноловой фазах. У группы зрелых крыс выявляется увеличение продуктов липопероксидации в изопропаноловой фазе, в которую экстрагируются в основном полярные или дифильные липиды (фосфолипиды, сфинголипиды и др.), содержащиеся преимущественно в структуре биологических мембран клеток кожи. В гептановой фракции, в которую экстрагируются неполярные или нейтральные липиды (триацилглицеролы, стериды и др.), повышается содержание вторичных и конечных продуктов перекисного окисления липидов. При этом в обеих фазах липидного экстракта кожи обнаруживается тенденция более выраженного накопления конечных продуктов перекисления липидов. Так, содержание шиффовых оснований в гептановой фракции липидного экстракта кожи зрелых крыс по сравнению с молодыми животными составило 154,4%, в изопропаноловой фазе – 140,4%. Статистически значимое увеличение содержания продуктов липопероксидации, а также нарастание интенсивности хемилюминесценции гомогенатов кожи крыс в зависимости от возраста было отмечено и другими авторами [27, 112].

В целом результаты проведенных исследований позволяют резюмировать, что при физиологическом старении организма происходит умеренная активация свободнорадикального окисления липидов кожи.

В следующей серии экспериментов была проведена оценка влияния препарата гиалуроновой кислоты «Juvederm hydrate» на состояние оксидантно-антиоксидантной системы кожи у зрелых крыс. При этом один бок туловища крысы являлся опытной областью, другой – контрольной. В одно и то же время под легким эфирным наркозом в опытную область внутридермально техникой мезотерапии вводили препарат гиалуронана, в контрольную - стерильный физиологический раствор хлористого натрия.

Внутридермальное введение гиалуронана, также как и физиологического раствора уже на следующие сутки приводило к преимущественному увеличению в гептановой фазе липидного экстракт кожи диеновых конъюгатов ацилгидроперекисей нейтральных липидов – первичных продуктов липоперекисидации, в то время как вторичные и конечные продукты накапливались в меньшей степени (таблица 4). На 4-е и 7-е сутки эксперимента после повторных инъекций физиологического раствора наблюдалось увеличение и первичных, и вторичных, и конечных продуктов ПОЛ. На 21 и 37-е сутки наблюдения уровень продуктов перекисного окисления липидов кожи в контрольной области резко снижался, статистически значимо не отличался от результатов интактных животных.

В коже в области введения гиалуронана на 4 и 7-е сутки эксперимента после повторных введений препарата в липидном экстракте кожи содержание ДК, КД, СТ постепенно снижалось, а - ШО начинало превалировать. При этом обнаружилось статистически значимое различия в концентрации ДК и КД с СТ между областями кожи животных при введении физиологического раствора и препарата гиалуронана на 1, 4 и 7-е сутки эксперимента.

Таблица 4 – Влияние внутридермального введения гиалуронана на содержание продуктов перекисного окисления липидов (гептановая фаза) кожи

Группа животных		Диеновые конъюгаты	Кетодиены и сопряж. 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 сут. n=8	Контр.	0,439[0,384-0,469] p=0,0001	0,179[0,173-0,189] p=0,0036	0,019[0,015-0,023 P=0,0731]
	Опыт	0,365[0,312-0,407] p=0,0034 p ₁ =0,0216	0,172[0,146-0,182] p=0,0051 p ₁ =0,4466	0,018[0,013-0,025] p=0,6930 p ₁ =0,0813
4-е сут. 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
	Опыт	0,309[0,3-0,34] p=0,0321 p ₁ =0,0015	0,15[0,132-0,169] p=0,0740 p ₁ =0,0044	0,021[0,016-0,035] p=0,0425 p ₁ =0,0732
7-е сут. 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
	Опыт	0,307[0,283-0,336] p=0,0506 p ₁ =0,0237	0,136[0,121-0,157] p=0,7348 p ₁ =0,0170	0,020[0,014-0,031] p=0,0618 p ₁ =0,1162
21 сут. n=10	Контр.	0,272[0,196-,0353] p=0,9492	0,137[0,118-0,170] p=0,9613	0,017[0,013-0,022] p=0,6132
	Опыт	0,281[0,21-0,36] p=0,4276 p ₁ =0,1365	0,131[0,114-0,188] p=0,7223 P ₁ =0,4256	0,014[0,009-0,018] p=0,0675 p ₁ =0,0423
37 сут. n=10	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=0,0724
	Опыт	0,256 [0,187-0,294] p=0,1593 p ₁ = 0,0831	0,132[0,109-0,156] p=0,2829 p ₁ =0,0538	0,284 [0,109-0,317] p=0,6038 p ₁ =0,0476

Примечание: в этой и последующих таблицах P – значимость различий с группой интактных животных, P₁ – значимость различий с контрольной областью кожи

В содержании конечных продуктов перекисного окисления липидов-шиффовых оснований статистически значимое снижение под действием препарата гиалуроновой кислоты наблюдалось лишь на 21 и 37-е сутки опыта.

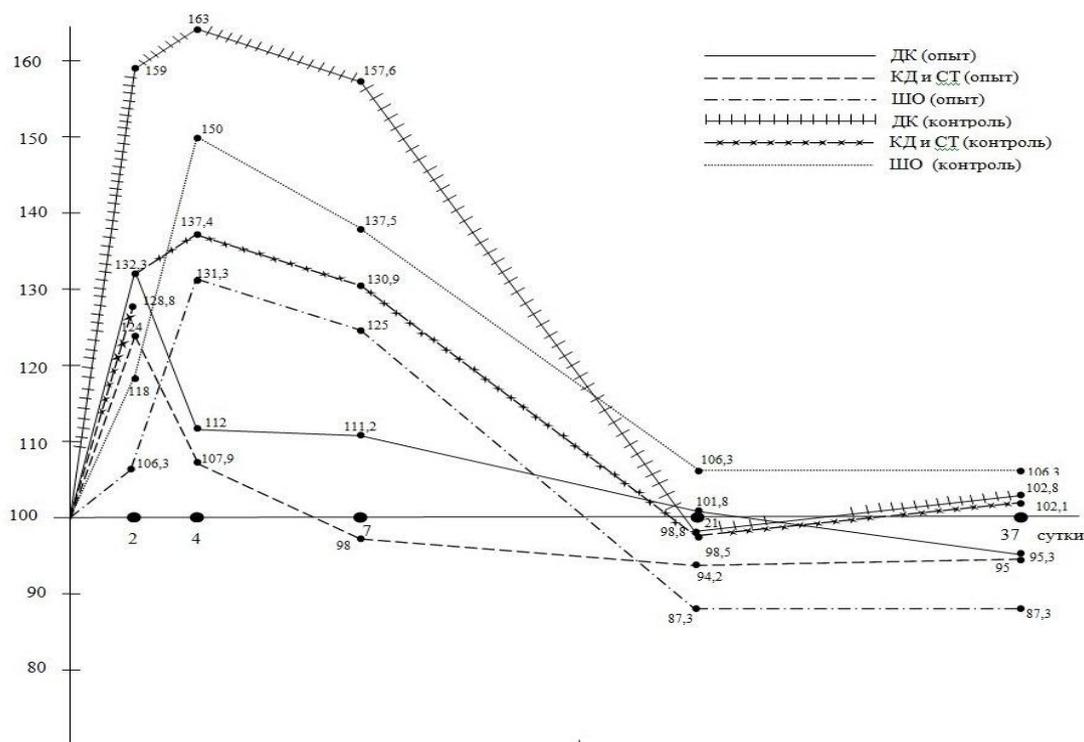


Рисунок 3 – Содержание продуктов липопероксидации в липидном экстракте кожи (гептановая фаза) экспериментальных животных (в % к интактным животным, ДК – диеновые конъюгаты, КД и СТ – кетодиены и сопряженные триены, ШО – шиффовы основания)

В коже в области инъекций гиалуронана и в области введения физиологического раствора на вторые сутки от начала опытов в изопропаноловой фазе липидного экстракта, обнаружилось более выраженное увеличение первичных продуктов ПОЛ (диеновые конъюгаты), по сравнению со вторичными и конечными продуктами липопероксидации. В последующие сроки при внутридермальном введении физиологического раствора (группы контроля) эта ситуация сохранялась. В коже в области внутридермальной инъекции препарата высокомолекулярной гиалуроновой кислоты к 7-м суткам наблюдения выявлялось некоторое снижение продуктов ПОЛ и уровень ДК, КД и СТ и шиффовых оснований статистически не различался от их содержания в коже интактных самок крыс ($P=0,0833$ для ДК, $P=0,0516$ для КД и СТ, $P=0,9118$ для шиффовых оснований).

На 21 и 37-е сутки содержание всех изучаемых продуктов ПОЛ кожи крыс в опытной зоне приближалось к показателям интактных животных.

Близкая динамика изменений содержания продуктов ПОЛ кожи была получены и при изучении изопропаноловой фазы липидного экстракта (таблица 5).

Таблица 5 - Влияние внутридермального введения препарата гиалуронана на содержание продуктов перекисного окисления липидов (изопропаноловая фаза) кожи, усл.ед./г ткани

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 p ₁ =0,0306	0,324[0,301-0,384] p=0,0466 p ₁ =0,0732	0,087[0,070-0,121] p=0,0508 p ₁ =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 p ₁ =0,0246	0,307[0,285-0,373] p=0,0134 p ₁ =0,0488	0,098[0,081-0,134] p=0,0418 p ₁ =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 p ₁ =0,0114	0,310[0,28-0,344] p=0,0576 p ₁ =0,0516	0,077[0,062-0,110] p=0,9008 p ₁ =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 p ₁ =0,7203	0,288[0,271-0,318] p=0,4965 p ₁ =0,0733	0,080[0,061-0,106] p=0,2543 p ₁ =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 p ₁ =0,7415	0,278[0,256-0,294] p=0,6302 p ₁ =0,8371	0,069[0,056-0,078] p=0,0544 p ₁ =0,1124

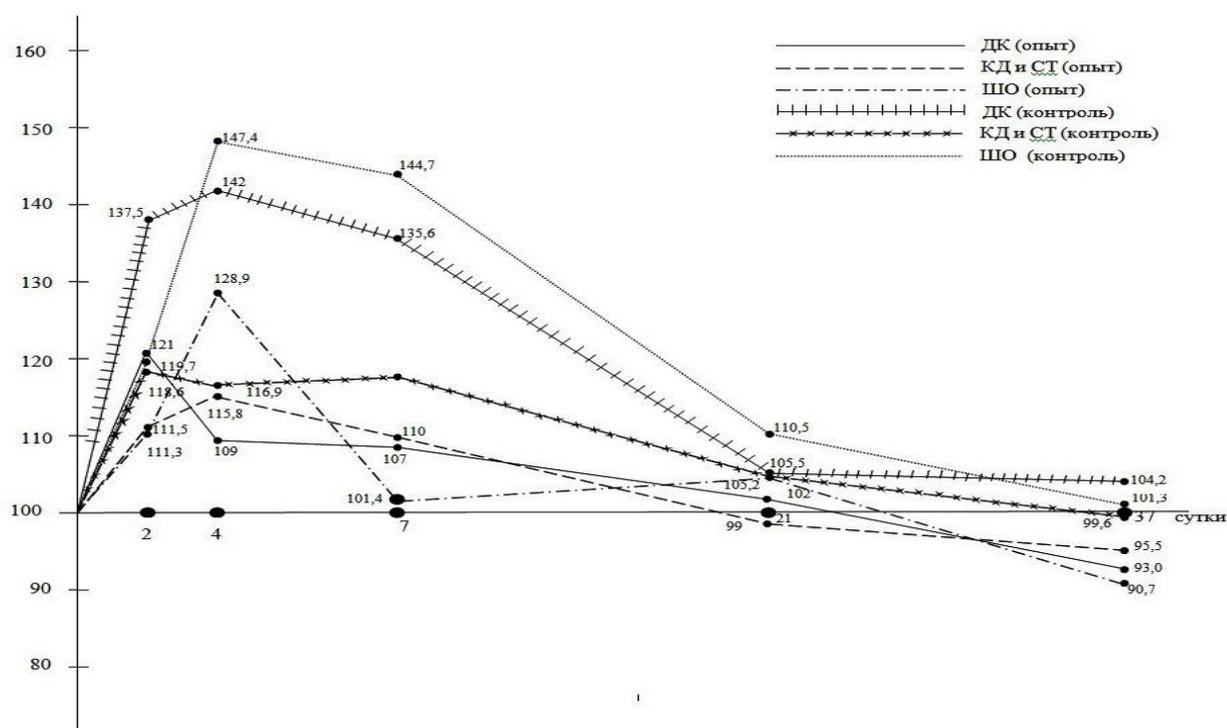


Рисунок 4 – Содержание продуктов перекисного окисления липидов в коже (изопропаноловая фракция) экспериментальных животных (в % к интактным животным, ДК – диеновые конъюгаты, КД и СТ – кетодиены и сопряженные триены, ШО – шиффовы основания)

Следует особо подчеркнуть тот факт, что при введении препарата гиалуронана концентрация продуктов ПОЛ в коже выявлялась меньшей степени, чем при введении физиологического раствора. Если относительно конечных продуктов это наблюдалось на уровне тенденции, то содержание диеновых конъюгатов, кетодиенов и сопряженных триенов в области внутридермальной инъекции препарата гиалуронана на 2, 4 и 7-е сутки было статистически ниже, чем в коже в местах инъекции физиологического раствора.

Увеличение интенсивности ПОЛ кожи в области введения в дерму физиологического раствора или препарата гиалуроновой кислоты на следующие сутки после инъекции, вероятнее всего, связано с развитием ответной реакции ткани на травмирующее воздействие с привлечением (миграцией) клеток воспалительного ответа, обладающих фагоцитарной активностью и способствующих активации продукции активных форм кислорода. Так, Н.П. Михайловой и др. [60, 61, 62, 63, 64] установлено, что при подкожном и внутрикожном введении экспериментальным животным гелей

гиалуроновой кислоты, начиная с первых суток, гели присутствуют в ткани кожи в виде свободно лежащих компактных образований, а также частично пропитывая близлежащие соединительную ткань и подкожно-жировую клетчатку.

Немодифицированная гиалуроновая кислота с участием фагоцитирующих клеток и путем бесклеточного ферментативного лизиса к третьим суткам подвергалась почти полной деградации и резорбции. В местах введения имплантатов гелей гиалуронана авторами отмечено развитие умеренного асептического воспаления на границе между гелями и окружающими тканями. Наблюдалась на первые сутки слабая нейтрофильная инфильтрация, которая сменялась лимфоцитарно-макрофагальной инфильтрацией на более поздних сроках. Это могло быть проявлением тканевой реакции на повреждение при инъекционном введении препарата.

На 21-е и, особенно, 37-е сутки эксперимента у опытных групп животных наблюдалось снижение содержания продуктов ПОЛ как в гептановой, так и изопропаноловой фазах липидных экстрактов кожи в области введения препарата геля гиалуронана. Связано ли это с непосредственно антиокислительной активностью вводимого препарата или с механизмами пролиферативной активности клеток дермы и повышения синтеза компонентов экстрацеллюлярного матрикса, как отмечено рядом авторов [37, 92, 96, 105, 157, 220, 251] требуют дальнейшего изучения.

Подводя итоги рассмотрению результатов данной серии экспериментов можно прийти к заключению, что процесс интрадермального введения физиологического раствора и препарата гиалуроновой кислоты методом мезотерапии в первые сутки после инъекцирования способствует активация перекисного окисления липидов с накоплением первичных, вторичных и конечных продуктов липопероксидации. Высокомолекулярная немодифицированная гиалуроновая кислота при этом препятствует накоплению в коже в области введения продуктов перекисного окисления липидов.

Свободнорадикальной модификации подвергаются не только липиды, но и белки, окисленные формы которых рассматриваются как один из ранних маркеров окислительного поражения клеток.

К окислительной модификации могут подвергаться радикалы почти всех аминокислот. Это сопровождается изменением структурной организации белковых молекул с дальнейшей их агрегацией и фрагментацией, повышением их гидрофобности и чувствительности к протеолизу [1, 93].

При старении под влиянием реактивных кислородных радикалов (активных форм кислорода, АФК) происходят существенные изменения белков экстрацеллюлярного матрикса, приводящие к понижению в дерме коллагеновых белков. Это понижение затрагивают большие, фибриллярные коллагены типа I и III и микрофибриллярный коллаген типа VII [145]. На фоне протеолитической деградации части коллагеновых фибрилл, в отличие от нефибриллярных белков, при старении наблюдаются некоторые изменения свойств коллагеновых структур в сторону повышения их жесткости и устойчивости к действию ферментов [233].

В этой связи были проведены исследования окислительной модификации белков кожи экспериментальных животных.

В таблице 6 приведены результаты определения базального уровня карбонилирования белков кожи самок крыс разных возрастных групп и их уровня после индукции образования АФК добавлением в реакционную среду ионов двухвалентного железа и пероксида водорода.

Результаты исследования показывают, что в белках кожи группы животных зрелого возраста некоторое увеличение содержания алифатических альдегид-динитрофенилгидразинов (а АДФНГ) по сравнению с группой крыс молодого возраста не достигает статистической значимости ($P=0,1259$), но базальные уровни алифатических кетон-динитрофенилгидразинов (аКДФНГ) и нейтрального, и основного характера в белках кожи животных зрелого возраста существенно преобладают ($P=0,0217$ и $P=0,0443$ соответственно).

Таблица 6 – Уровень окислительной модификации белков кожи у самок крыс разных возрастных групп

Показатели	Возрастные группы		p
	Молодые (4-5 мес.), n=10	Зрелые (10-12 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))	24,9[16,6-26,3]	25,4[19,3-31,2]	0,6217
Соотношение а КДНФГ (б)/ а КДНФГ (и) нейтрального характера	0,95[0,084-0,196]	0,134[0,109-0,166]	0,0407
Соотношение а КДНФГ (б)/ а КДНФГ (и) основного характера	0,190[0,172-0,244]	0,231[0,196-0,264]	0,0378

Примечание: АДНФГ - альдегид динитрофенилгидразоны, КДНФГ – алифатические кетон-динитрофенилгидразоны

При индукции образования радикалов в реакционной среде путем добавления пероксида водорода и ионов двухвалентного железа наблюдалось более интенсивное образование аАДНФГ в белках кожи животных молодого

возраста ($P = 0,0134$), в то время в содержании аКДФГ нейтрального и основного характеров определенных различий не было выявлено. Тем не менее, полученные результаты позволяют констатировать, что имеются возрастные изменения в содержании продуктов перекисидации белков.

Ряд авторов отмечает, что альдегидные производные являются маркерами ранней окислительной модификации белка, а кетонные производные – поздними маркерами, характеризующими степень окислительной дистрикции белковой молекулы [25, 54, 91, 93].

Исходя из этих позиций, по результатам исследования можно высказать предположение, что с возрастом в белках кожи происходит, увеличение преимущественно маркеров более длительной (более поздней) модификации белковых структур. Это предположение подтверждается и статистически значимым превалированием соотношений базального и индуцированного уровней аКДФГ нейтрального и основного характера.

Учитывая описанные результаты, в следующей серии опытов в белках кожи экспериментальных животных нами было изучено лишь содержание аКДФГ.

Результаты определения интенсивности карбонилирования белков кожи у животных зрелого возраста в области внутридермального введения методом мезотерапии препарата гиалуронана и в области введения физиологического раствора предоставлены в таблице 7. На вторые сутки после первой инъекции препарата и физиологического раствора наблюдалось повышение базального уровня алифатических кетон-динитрофенилгидразонов как нейтрального, так и основного характера в коже контрольной области, а уровень алифатических кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального и основного характера в коже опытной области статистически значимо не различался с контролем.

При этом соотношение содержания а КДФГ базального уровня и а КДФГ при индукции основного характера повышалось в обеих исследуемых областях (и опыт, и контроль), однако в коже опытной области это увеличение было статистически значимо ниже, чем в контрольной ($P_1 = 0,0322$).

Таблица 7 – Влияние внутридермального введения препарата гиалуронана на интенсивность окислительной модификации белков (мкмоль/г белка) кожи крыс зрелого возраста

Группа живот-ных		а КДФГ н.б.	а КДФГ о.б.	а КДФГ н.и.	а КДФГ о.и.	Соотношение а КДФГ б./ а КДФГи. нейтр. характера	Соотношени е а КДФГ б./ а КДФГи. основного характера
1		2	3	4	5	6	7
Интактн ые, n=12		19,6 [14,2-3,6]	5,11 [4,61-6,14]	182,4 [166,5-200,8]	25,4 [19,3-31,2]	0,107 [0,102-0,136]	0,221 [0,196-0,274]
2-е сут., n=10	к	27,6 [19,8-4,1] P=0,035	8,18 [5,12-0,13] P=0,017	176,8 [164,0184,3] P=0,324	27,4 [19,7-29,5] P=0,046	0,152 [0,128-0,159] P=0,0216	0,298 [0,244-0,318] P=0,0236
	о	22,8 [14,825,6] P=0,124 P ₁ =0,034	6,03 [4,12-7,86] P=0,079 P ₁ =0,042	201,4 [170,6230,4] P=0,134 P ₁ =0,076	27,7 [20,3-33,8] P=0,043 P ₁ =0,871	0,118 [0,096-0,138] P=0,1407 P ₁ =0,0326	0,221 [0,191-0,256] P=0,8341 P ₁ =0,0322
4-е сут., n=8	к	29,6 [24,3-6,2] P=0,010	8,76 [5,3011,16] P=0,020	170,6 [160,2-182,3] P=0,053	27,9 [20,5-31,4] P=0,037	0,170 [0,119-0,152] P=0,0034	0,315 [0,242-0,332] P=0,0214
	о	28,3 [20,3-3,6] P=0,032 P ₁ =0,663	7,07 [4,90-9,15] P=0,013 P ₁ =0,036	214,7 [182,3-221,6] P=0,067 P ₁ =0,042	28,1 [21,4-34,6] P=0,046 P ₁ =0,743	0,138 [0,116-0,163] P=0,0476 P ₁ =0,0362	0,280 [0,246-0,293] P=0,0384 P ₁ =0,0486
7-е сут., n=10	к	29,5 [23,6-3,8] P=0,021	9,15 [5,7112,09] P=0,012	168,2 [160,1-181,6] P=0,042	28,3 [20,6-31,4] P=0,039	0,172 [0,128-0,184] P=0,0322	0,320 [0,252-0,354] P=0,0136
	о	25,7 [21,4-0,6] P=0,040 P ₁ =0,044	8,06 [4,7710,16] P=0,011 P ₁ =0,05	224,0 [192,4-241,6] P=0,038 P ₁ =0,039	28,0 [20,9-36,3] P=0,045 P ₁ =0,799	0,106 [0,089-0,122] P=0,8126 P ₁ =0,0021	0,282 [0,248-0,304] P=0,0296 P ₁ =0,0303
21-е сут., n=10	к	19,9 [15,6-4,4] P=0,709	5,81 [4,02-7,16] P=0,264	180,5 [159,8-200,5] P=0,897	27,9 [21,4-33,3] P=0,046	0,116 [0,102-0,134] P=0,4836	0,229 [0,188-0,244] P=0,0622
	о	19,0 [16,6-2,8] P=0,687 P ₁ =0,831	6,02 [4,72-7,16] P=0,121 P ₁ =0,727	194,9 [175,6-197,3] P=0,068 P ₁ =0,218	26,3 [24,1-28,8] P=0,741 P ₁ =0,671	0,097 [0,075-0,136] P=0,0541 P ₁ =0,0429	0,209 [0,204-0,209] P=0,8534 P ₁ =0,0534

Продолжение таблицы 7

1	2	3	4	5	6	7	
37-е сут., n=10	к	20,2 [14,725,2] P=0,623	5,67 [3,85-6,44] P=0,425	188,8 [172,4- 201,6] P=0,713	25,8 [197-30,6] P=0,833	0,118 [0,104-0,142] P=0,0647	0,220 [0,190-0,248] P=0,4252
	о	17,4 [15,4- 22,7] P=0,051 P ₁ =0,047	5,05 [3,56-5,72] P=0,830 P ₁ =0,374	196,6 [180,3- 214,3] P=0,061 P ₁ =0,233	26,6 [20,1-30,6] P=0,708 P ₁ =0,834	0,104 [0,078-0,135] P=0,6318 P ₁ =0,0455	0,192 [0,156-0,249] P=0,0216 P ₁ =0,0514

Примечания: аКДНФГ н.б. – алифатические кетон-динитрофенилгидразоны нейтрального характера, базальный уровень, а КДНФГ о.б. – алифатические кетон-динитрофенилгидразоны основного характера, базальный уровень, а КДНФГ н.и. – алифатические кетон-динитрофенилгидразоны нейтрального характера при индукции, а КДНФГ о.и. – алифатические кетон-динитрофенилгидразоны основного характера при индукции, к- контрольная область кожи, о – опытная область кожи

Соотношение а КДНФГ базального уровня и при индукции нейтрального характера в белках кожи области контроля (внутридермальная инъекция физиологического раствора) повышалось, а в опытной области оставалось на более низком уровне (P=0,0326). На 4 и на 7-е сутки эксперимента после второй и третьей инъекции препарата гиалуронана и физраствора в белках кожи и контрольной и опытной областей выявилось повышение уровней базального уровня аКДНФГ нейтрального и основного характеров, однако в опытной зоне кожи оно было менее выражено.

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

В то же время соотношения аКДНФГ базального уровня к аКДНФГ при индукции основного характера в белках опытной области также сохранялась на более низком уровне, чем в области контроля (P=0,0486 на 4-е сутки, P₁ = 0,0303 на 7-е сутки). Соотношение аКДНФГ нейтрального характера

базального уровня и при индукции в белках кожи опытной и контрольной областей также было статистически значимо выше, чем в опыте.

На 21-е и 37-е сутки существенных различий в интенсивности карбонилирования белков кожи в области инъекций в дерму физиологического раствора и препарата гиалуронана не выявились, однако соотношение аКДНФГ нейтрального характера базального уровня к уровню при индукции в белках кожи опытной области было существенно ниже, чем в области контроля.

Обращает также внимание, что величины соотношении аКДНФГ и нейтрального характера в белках кожи опытной области были статистически значимо ниже, чем в контрольной.

Подводя итоги рассмотрению результатов изучения карбонилирования белков кожи, можно прийти к следующему заключению: введение препарата гиалуроновой кислоты препятствует окислительной деструкции белковых структур, снижая в коже накопление продуктов карбонилирования белков.

В качестве индукторов окислительно-модифицированных белков могут быть не только активные формы кислорода, но и активные формы азота, металлы переменной валентности, а также такие продукты липопероксидации как малоновый диальдегид и 4-гидрокси-2-ноненаль [7, 25, 54]. Окислительная атака полипептидной цепи приводит к изменению в пептидной связи боковых радикалов аминокислот [124, 207, 226, 273] и сопровождается образованием радикального центра в результате реакции водородного атома аминокислотного остатка с гидроксил-радикалом (O_2), что может завершиться разрывом полипептидных связей. В результате окисления боковых цепей аминокислотных остатков происходит образование карбонильных производных: окисление остатков лизина, аргинина, гистидина, пролина приводят к формированию альдегидных или кетонных производных, а окисление радикалов глутаминовой и аспарагиновой кислот сопровождается разрывом полипептидной цепи с образованием пирувильной группы из N – концевой аминокислоты [25, 136].

Металлкатализируемому окислению белки подвергаются продуктами распада пероксида водорода в присутствии металлов переменной валентности (железо, медь). Наиболее чувствительными к данному процессу являются радикалы гистидина, аргинина, лизина, цистеина, метионина, тирозина, фенилаланина, триптофана [25, 248].

Окислительная модификация бокового радикала цистеина при действии АФК может приводить к формированию S-S-сшивок с последующей агрегацией белковой молекулы [131]. Агрегации белка приводит также образование битирозиновых сшивок, конъюгация белка с продуктами окисления [25, 93].

Относительно давно установлено, что окислительная модификация белков характерна для их старения и может сопровождаться изменением молекулярной массы, процессами агрегации или фрагментации молекул [116, 139, 143, 243], что приводит к изменениям физико-химических свойств белков: увеличению гидрофобности со снижением растворимости, изменением изоэлектрической точки и устойчивости к действию протеолитических ферментов. Белковые агрегаты и фрагменты более устойчивы к протеолизу и могут проявлять токсические свойства, способствуя развитию процессов апоптоза или некроза клеток [67].

Основной белок внеклеточного матрикса дермы коллаген типа I в первичной структуре α -цепей в значительных количествах содержит аминокислоты, боковые радикалы которых могут быть подвержены окислительной атаке активными формами кислорода. Пролин и гидроксипролин составляют около 30% его первичной структуры, на долю лизина, оксилизина и аргинина приходится около 9%, аспарагиновой, глутаминовой, аспарагина и глутамина – около 10% [206, 227].

Хотя аминокислотный состав коллагена характеризуется полным отсутствием остатка триптофана, крайне низким содержанием остатков ароматических (фен, тир) и серусодержащих (цис, мет.) аминокислот и сравнительно низким содержанием гистидина (около 1,5%), окислительная

модификация коллагена, наряду с процессами неэнзиматического гликозилирования [245], может оказывать влияние на физические свойства коллагеновых фибрилл, а также на взаимодействие между макромолекулами внутри коллагеновых фибрилл, повышая их жесткость и резистентность к протеолитическому действию металлопротеиназ [70]. Однако необходимо отметить, что плотно упакованные в нативных фибриллах коллагеновые макромолекулы весьма защищены от окислительной модификации и неэнзиматического гликозилирования, и, следовательно, эффективному действию этих процессов должны предшествовать другие изменения [245].

Формирование окислительной модификации белков и интенсификация липопероксидации происходит не только при увеличении концентрации индуцирующих агентов, но также и при истощении антиоксидантной системы со смещением баланса антиоксидантов и прооксидантов в пользу последних.

Изучение активности основных ферментов антиоксидантной защиты в гомогенатах кожи животных разного возраста выявило некоторое снижение у крыс зрелого возраста по сравнению с молодыми (таблица 8). Статистически значимое снижение активности в ферментативном звене антиокислительной системы было выявлено лишь относительно глутатионпероксидазы (ГПО), а активность каталазы была снижена на уровне вероятности.

Таблица 8 – Активность ферментов антиокислительной защиты кожи самок крыс разных возрастных групп

Ферменты	Возрастные группы		P
	Молодые (4-5 мес.), n=10	Зрелые (11-12 мес.), n=12	
Супероксиддисмутаза, Ед/мг белка	82,5 [74,4-96,3]	78,5 [70,4-88,3]	0,3137
Каталаза, Мкмоль/мин•мг белка	0,112 [0,086-0,123]	0,098 [0,074-0,121]	0,0501
Глутатионпероксидаза, Е/мг белка	215,2 [183,6-234,8]	196,4 [170,2-221,8]	0,0394

В целом активность антиокислительных ферментов была ниже у животных зрелого возраста на 5-10% (рисунок 5). Ряд авторов [27, 35, 112] указывают на незначительные изменения в значениях параметров перекисное окисление липидов/антиоксидантная система (ПОЛ/АОА) крови у животных при старении, однако при воздействии экстремальных факторов (ультрафиолетовое излучение, гипоксия, эндотоксинемии) эти различия проявлялись в существенной мере. Аналогичные результаты были получены и при изучении показателей системы ПОЛ/АОА кожи у зрелых и старых крыс [28].

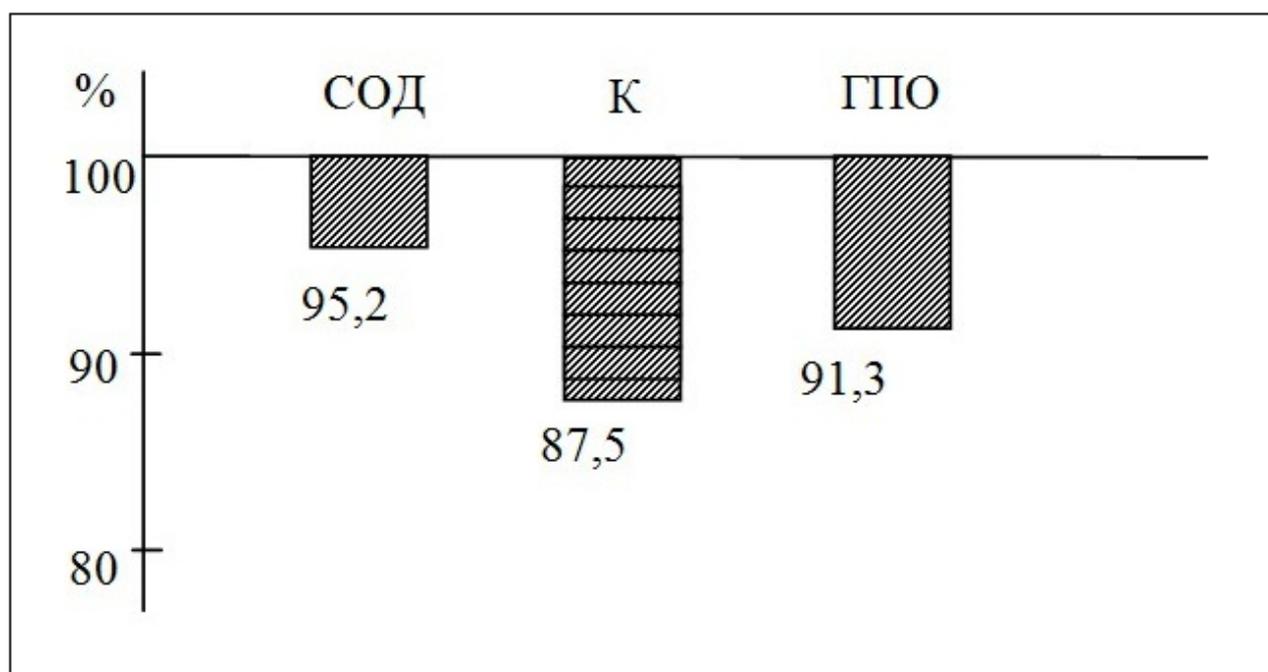


Рисунок 5 – Активность антиоксидантных ферментов кожи крыс зрелого возраста (%) по сравнению с молодыми (принято 100%). СОД – супероксиддисмутаза, К-каталаза, ГПО-глутатионпероксидаза

В литературе имеются указания, что высокомолекулярные фрагменты молекулы гиалуронана обладают антиоксидантным эффектом [100, 157, 240].

Результаты, полученные при изучении влияния внутридермального введения методом мезотерапии препарата гиалуроновой кислоты на активность ферментов антиоксидантной системы кожи зрелых крыс представлены в таблице 9. Из приведенных в таблице данных видно, что в коже контрольной области на 2-е сутки эксперимента наблюдалось повышение активности СОД, которая на 4-е и 7-е сутки была статистически значимо сниженной. В опытной

зоне кожи экспериментальных животных активность фермента имела такую же динамику, но в отличие от контрольной зоны была менее выраженной и не достигала статистической достоверности.

Таблица 9 – Влияние внутридермального введения препарата гиалуронана на активность ферментов антиоксидантной защиты кожи животных зрелого возраста

Группа животных		СОД, Ед/мг белка	Каталаза, Е/мг белка	ГПО, Е/мг белка
Интактные, n=12		78,5[70,4-88,5]	0,098 [0,074-0,121]	196 [170-222]
12-е сут., n=10	к	93,4[80,1-95,2] P=0,043	0,086[0,066-0,101] P=0,059	185 [170-203] P=0,041
	о	89,3 [72,3-95,5] P=0,157 P ₁ =0,704	0,082 [0,067-0,108] P=0,056 P ₁ =0,684	187 [172-207] P=0,042 P ₁ =0,883
4-е сут., n=10	к	66,1 [55,4-71,8] P=0,037	0,076[0,068-0,082] P=0,034	172 [160-193] P=0,036
	о	69,8 [63,1-77,4] P=0,061 P ₁ =0,044	0,085 [0,071-0,097] P=0,055 P ₁ =0,077	180 [166-197] P=0,038 P ₁ =0,112
37-е сут., n=8	к	61,3 [56,2-72,9] P=0,034	0,072 [0,06-0,091] P=0,032	173 [164-194] P=0,033
	о	72,0 [63,7-80,4] P=0,325 P ₁ =0,046	0,08[0,071-0,104] P=0,073 P ₁ =0,037	184 [176-205] P=0,040 P ₁ =0,056
21-е сут., n=10	к	79,6 [70,2-90,4] P=0,8916	0,102[0,075-0,121] P=0,636	198 [173-224] P=0,869
	о	80,8 [71,5-90,6] P=0,523 P ₁ =0,749	0,105[0,078-0,128] P=0,402 P ₁ =0,564	205[176-229] P=0,331 P ₁ =0,408
37-е сут., n=8	к	80,1 [72,3-89,5] P=0,536	0,101[0,096-0,124] P=0,619	189 [175-221] P=0,464
	о	83,6 [73,5-95,3] P=0,296 P ₁ =0,704	0,108 [0,091-0,127] P=0,068 P ₁ =0,346	214 [190-232] P=0,042 P ₁ =0,031

Согласно сложившимся классическим представлениям антиоксидантная система включает низкомолекулярные антиоксиданты и антиоксидантные ферменты, структурно-функциональное взаимодействие которых образует, как минимум, три линии защиты [30, 31, 50, 68, 69, 271]. СОД, являющаяся компонентом первой, подвергает детоксикации первичную АФК – супероксиданион-радикал, катализируя реакцию дисмутации с образованием пероксида водорода. При этом фермент не нуждается в кофакторе и функционирует относительно автономно, не завися от функционирования других клеточных структур. У млекопитающих выявлены три формы СОД, которые отличаются первичной структурой и строением активного центра. СОД 1 (цитозольная преимущественно) и СОД 3 (экстрацеллюлярная) более близки по структуре, и содержат в качестве кофактора Cu и Zn. В митохондриях содержится другая органеллоспецифическая СОД 2, содержащая Mn [74]. Уровень СОД в тканях животных в условиях прерывистой гипоксии и гипероксии, усиливающих образование АФК, подвержен индукции, что авторы напрямую связывают с устойчивостью к окислительному повреждению [59, 164]. Однако при длительной гипоксии, наоборот, уровень фермента может снижаться. И установленная в наших опытах динамика изменения активности фермента в коже при внутридермальном введении, и по всей вероятности, связана с характером ответной реакции сосудистой системы кожи на травму структуры ткани при первой и последующих инъекциях физиологического раствора или же гиалуроновой кислоты.

Участие супероксидных радикалов в процессах клеточной пролиферации и экспрессии определенных генов (c-fos, c-myc), фактора транскрипции NF-kB [219, 238], позволяет рассматривать СОД как фермент, выполняющий и регуляторную функцию, являясь ключевым звеном системы регуляции стационарной концентрации супероксиданион-радикала. Снижение активности СОД через 3-4 суток после частичной гепатэктомии сопровождается многократным увеличением образования супероксид-анион-радикала в ядерных мембранах, что предшествует усилению митотической активности в

регенирирующей ткани [15]. Обнаруженное нами в экспериментах снижение активности фермента на 4-е и 7-е сутки, возможно, приводит к повышению концентрации супероксиданион-радикала, что является стимулом к усилению восстановительных и пролиферативных процессов в последующие (более поздние) сроки наблюдения в зонах введения в кожу геля гиалуроновой кислоты.

Два других фермента антиоксидантной защиты каталаза и глутатионпероксидаза в контрольной и опытной областях кожи крыс на 2, 4 и 7-е сутки эксперимента также снижались. Однако статистической значимости в коже опытной зоны снижение активности каталазы не достигало, а на 7-е сутки опыта статистически достоверно превышала активность в контрольной зоне. Что касается активности глутатионпероксидазы, то различия активности фермента в коже контрольной и опытной областей статистической значимости ни на один срок наблюдения в эксперименте не достигали.

Каталаза и глутатионпероксидаза участвуют в инактивации пероксида водорода. Сродство ГПО к пероксиду водорода выше, чем у каталазы, поэтому она более эффективно работает при низких концентрациях H_2O_2 , а при высоких концентрациях субстрата ключевая роль принадлежит каталазе [148]. Селеновые ГПО участвуют в регуляции биосинтеза эйкозаноидов, контролируя содержание органических перекисей и поддерживая своеобразный «перекисный статус», благодаря которому определяется функция ГПО в патогенезе воспалительных процессов [30, 31]: циклооксигеназа и липооксигеназа, отвечающие за синтез эйкозаноидов, относящихся к медиаторам воспаления, являются объектами перекисной регуляции, поскольку активируются гидроперекисью. В то же время высокое содержание органических гидроперекисей и пероксида водорода приводит к самоактивации фермента.

АФК проявляют ингибирующую активность к антиоксидантным ферментам. Все три основных фермента антиоксидантной системы – Сод, ГПО и каталаза инактивируются продуктами их ферментативных реакций [205].

Однако, эти ферменты в тканях функционируют содружественно, защищая друг друга от окислительного повреждения образующихся кислородных радикалов. ГПО и каталаза предохраняют СОД от инактивации, катализируя расщепление H_2O_2 . СОД, в свою очередь, предохраняет ГПО и каталазу от инактивирующего действия супероксиданион – радикала [23, 69]. Потенциальными ингибиторами ГПО являются также H_2O_2 , $HOCl$, $\bullet NO$. Имеются в литературе указания и об ингибирующем действии H_2O_2 , $HOCl$, $\bullet NO$ и на активность каталазы [197].

Таким образом, только кооперативное действие ферментов антиоксидантной системы в условиях окислительного стресса обеспечивает как проявление их биологической активности, как синергичную защиту от генерируемых кислородных радикалов. И в контексте представленных сведений, имеющих в литературе, вполне объяснимо наблюдаемое в наших экспериментах однонаправленное снижение активности этих ферментов в первые сутки после внутридермального введения в кожу, как физиологического раствора, так и геля гиалуроновой кислоты. Возможно, в этих условиях большее значение имеет сама процедура процесса мезотерапии, приводящая к определенным нарушениям целостности структуры кожи, вызывая ответную реакцию ткани. При смещении оксидантно-антиоксидантной системы в сторону преобладания прооксидантных процессов компоненты клеточных структур оказываются легкодоступными для свободнорадикальной атаки, и ведущим механизмом падения активности различных ферментов может оказаться не столько ПОЛ, сколько окислительная модификация белковых молекул [25]. Так показан ингибирующий эффект гидроксилрадикала на активность гексокиназы, глицероальдегид-3-фосфатдегидрогеназы, ацил-КоА-гидролазы [140], супероксиданион-радикала на глицероальдегид-3-фосфатдегидрогеназы и 6-глюконатдегидрогеназы, которая угнетается также H_2O_2 [3, 69, 167].

В более поздние сроки после проведения процедуры мезотерапии (21-е и 37-е сутки эксперимента) активность изучаемых антиоксидантных ферментов соответствует уровню пределов колебания интактных животных. При этом

существенных различий в активности СОД и каталазы между опытной и контрольной областями кожи не было установлено, активность ГПО в опытной зоне превышал контрольную на 21-е сутки статистически вероятно, а на 37-е сутки – достоверно ($P=0,031$).

Подводя итоги изучения влияния высокомолекулярной нативной гиалуроновой кислоты при внутридермальном введении методом мезотерапии на состоянии оксидантно-антиоксидантных процессов в коже, а также возрастных различий данных процессов в коже у животных молодого и зрелого возрастов, можно придти к следующему заключению:

- У зрелых животных (самки белых крыс в возрасте 4-5 месяцев) в коже обнаруживается более высокий уровень липопероксидации, который отражается увеличением содержания первичных (диеновые конъюгаты), вторичных (кетодиены и сопряженные триены) и конечных (шиффовы основания) продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропаноловых экстрактах;

- В зрелом возрасте в коже экспериментальных животных выявляется также более выраженная интенсивность окислительной модификации белков, которая проявляется повышением содержания карбонилированных остатков алифатических аминокислот нейтрального и основного характера, а также снижением базального уровня к уровню их образования при индукции пероксидации;

- Внутридермальная инъекция высокомолекулярного гиалуронана в коже зрелых крыс способствует в первые сутки после введения статистически значимому снижению продуктов липопероксидации, соотношения базального уровня карбонилирования белков и карбонилирования при индукции, а также в определенной степени препятствует снижению активности основных антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы кожи.

Повышение интенсивности свободнорадикального окисления с соответствующим снижением активности антиоксидантных ферментов в коже в

области инъекцирования и физиологического раствора, и нативной гиалуроновой кислоты на следующие сутки после проведения процедуры внутридермального введения методом мезотерапии, вероятно, связано с проявлением тканевого ответа с развитием воспалительной реакции на травмирующее воздействие. Так, по данным Н.П. Михайловой и др. [61, 62, 64], при внутридермальной инъекции экспериментальным животным геля высокомолекулярной немодифицированной гиалуроновой кислоты в местах введения наблюдалось развитие асептического воспаления с нейтрофильной инфильтрацией на первые сутки, которая в последующем сменялась лимфоцитарно-микрофагальной на более поздних сроках.

3.4. Влияние внутридермального введения гиалуронана на содержание коллагена в коже в зоне мезотерапии

Старение кожи сопровождается изменением соотношения структурных компонентов экстрацеллюлярного матрикса, их физико-химических свойств. Содержание коллагена составляет около 70% сухой массы дермы, и на протяжении всей жизни человека содержание коллагена снижается примерно на один процент в год. Основная масса коллагена дермы представлена коллагеном типа I (на его долю приходится до 80% всего коллагена), меньшее – коллагеном типа III (около 15%) [33, 48]. У людей старческого возраста фибробласты дермы продуцируют коллаген почти на $\frac{3}{4}$ меньше, чем клетки лиц молодого возраста [270]. В фибробластах при старении снижается также синтез тканевых ингибиторов металлопротеиназ, а выработка протеолитических ферментов – коллагеназ, желатиназ и эластазы повышается [159], что приводит к усилению катаболизма фибриллярных структур экстрацеллюлярного матрикса, накоплению фрагментированного коллагена с ослаблением контактов фибрилл с клетками дермы [70]. С возрастом дегенеративные изменения затрагивают и эластин, на долю которого приходится около 2% от общего количества белков дермы. Кроме того происходят и качественные возрастные

изменения фибриллярных белков дермы, нарушается система интермолекулярных поперечных связей, увеличивается количество хаотично возникающих нередуцируемых связей, влияющих на растворимость, жесткость, эластичность коллагеновых молекул, повышается их резистентность к протеолитическому действию матриксных металлопротеиназ [122, 137].

Гиалуроновая кислота и её фрагменты, по данным ряда авторов [95, 100, 138, 157, 251] участвуют в процессах регуляции деления, дифференцировки, миграции и апоптоза, биосинтетической активности фибробластов и других клеток кожи, оказывая опосредованное влияние на состояние коллагеновых структур внеклеточного матрикса ткани.

Для выявления закономерностей изменений содержания коллагена кожи, в процессе физиологического старения были изучены уровень общего суммарного коллагена, его нейтрально-растворимой фракции и свободного оксипролина у самок белых крыс молодого возраста (4-5 месяцев, массой 160-180 г) и зрелого возраста (11-12 месяцев, массой 280-320 г). При этом исходили из следующих предпосылок. Биосинтез и созревание коллагена осуществляется в несколько стадий и в зависимости от этого коллаген можно экстрагировать разными растворами [55, 70, 83, 85]. Нейтрально-растворимый коллаген представляет собой фракцию, содержащую вновь синтезированные структуры (проколлаген, тропоколлаген, микрофибриллы), а нерастворимая фракция – более поздние уровни организации («созревания») коллагена – фибриллы, волокна. Концентрация свободного оксипролина отражает в определенной мере интенсивность катаболизма коллагена [11], поскольку гидроксипролина осуществляется только в процессе биосинтеза проколлагеновых полипептидных α -цепей и появление свободного гидроксипролина происходит лишь при расщеплении коллагена. Результатом изучения возрастных различий содержания коллагена в коже экспериментальных животных представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Содержание коллагена в коже самок крыс разных возрастных групп, Me [Q₁–Q₃]

Возрастная группа	Показатели, ммоль/г сухой массы		
	Суммарный Коллаген	Нейтрально-солерастворимый коллаген	Свободный гидроксипролин
Молодые, n=10	246 [216-258]	10,4 [6,8-14,3]	23 [22-32]
Зрелые, n=24	210 [191-234] P=0,0317	7,6 [5,6-9,8] P=0,0264	26 [21-27] P=0,2216

Кожа животных молодого возраста, как видно из предоставленных данных, отличается более высоким содержанием как суммарного, так и нейтральносолерастворимого коллагена, характеризуя, вероятно, более высокую интенсивность продукции коллагена фибробластами кожи.

При этом, содержание нейтральносолерастворимой фракции коллагена кожи у молодых животных над зрелыми более значительно превышает различие в содержании суммарного коллагена (рисунок 7). О более интенсивном обмене коллагена в коже молодых животных свидетельствует и более высокий уровень свободного оксипролина по сравнению с животными зрелого возраста.

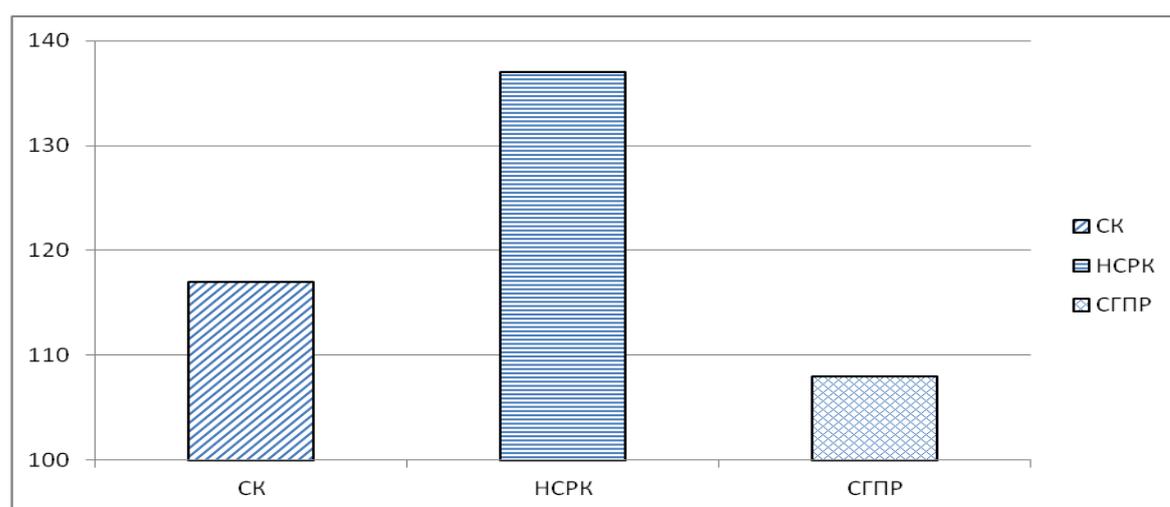


Рисунок 7 – Показатели обмена коллагена в коже крыс молодого возраста относительно зрелого, принятых за 100% (СК-суммарный коллаген, НСРК-нейтральносолерастворимый коллаген, СГПР – свободный гидроксипролин)

В следующей серии экспериментов была проведена оценка влияния внутридермальной инъекции высокомолекулярной нестабилизированной гиалуроновой кислоты на обмен коллагена кожи животных зрелого возраста.

Гель полисахарида вводили, как и в предыдущих сериях опытов внутридермального из расчета 0,06 мл на 100 г массы крысы техникой мезотерапии на боковые поверхности туловища после предварительного удаления шерсти самок белых крыс в возрасте 11-12 месяцев массой 280-320 г на 1-е сутки и через 3 и 6 суток после первой инъекции. На другой стороне туловища аналогичным образом вводили стерильный физиологический раствор.

Введение высокомолекулярной гиалуроновой кислоты в дерму кожи экспериментальных животных зрелого возраста вызывала изменения фракций коллагена (таблица 11).

Таблица 11 – Показатели метаболизма коллагена кожи при внутрикожном введении препарата гиалуронана

Группы животных		Показатели, ммоль оксипролина/кг сухой массы		
		Суммарный коллаген	Нейтрально-солеорастворимый коллаген	Свободный гидроксипролин
Интактные, n=24		210[191-234]	37,6[5,6-9,8]	423[21-27]
2-е сут., n=14	Контр.	204[186-241] P=0,3816	8,2[6,4-10,2] P=0,0745	25[20-28] P=0,8913
	Опыт	184[160-203] P=0,0843 P ₁ =0,1225	8,0[7,3-8,8] P=0,1916 P ₁ =0,7483	20[17-23] P=0,0503 P ₁ =0,0816
4-е сут., n=14	Контр.	208[177-239] P=0,6388	7,2[5,5-9,4] P=0,7663	25[18-29] P=0,9014
	Опыт	202[181-238] P=0,3755 P ₁ =0,4136	6,4[5,3-10,7] P=0,7856 P ₁ =0,6233	24,5[17-28,5] P=0,7462 P ₁ =0,8479

Продолжение таблицы 11

7-е сут., n=14	Контр.	216[190-226] P=0,3698	7,0[5,7-9,4] P=0,0643	27 [19,5-29,3] P=0,8766
	Опыт	225[213-255] P=0,0608 P ₁ =0,2611	6,2[5,7-9,0] P=0,2795 P ₁ =0,3116	20,5[18,5-26] P=0,1134 P ₁ =0,0963
21-е сут., n=14	Контр.	209[185-230] P=0,9064	7,3[5,8-11,1] P=0,5216	27,5[21-33] P=0,7904
	Опыт	212[181-221] P=0,2744 P ₁ =0,8765	8,8[6,4-10,2] P=0,0411 P ₁ =0,0445	27,3 [19,8-27,8] P=0,7730 P ₁ =0,8691
37-е сут., n=14	Контр.	207[188-232] P=0,7244	7,4[5,6-9,2] P=0,8336	25[21-28] P=0,8547
	Опыт	237[220-254] P=0,02042 P ₁ =0,0194	9,8[7,1-14,8] P=0,0367 P ₁ =0,0416	29[26-34] P=0,0766 P ₁ =0,0837

Статически значимые изменения – повышение содержания нейтральносоластворимого коллагена наблюдались на 21-е и 37-е сутки эксперимента, и содержания суммарного коллагена – на 37-е сутки, что свидетельствует об активации биосинтеза коллагена или коллагеногенеза.

При введении препарата гиалуронана достоверных изменений уровня свободного гидроксипролина в коже по сравнению с контролем не было выявлено.

Усиление коллагеногенеза при внутридермальном введении гиалуронана, вероятно, связано с действием фрагментов ферментативной деполимеризации высокомолекулярной молекулы, которые стимулируют пролиферативную и биосинтетическую активность фибробластов, взаимодействуя с рецепторами СД44 [100, 119, 157, 251].

Таким образом, проведенные исследования показывают, что в содержании суммарного коллагена и его фракции имеются возрастные различия, связанные со снижением уровня суммарного коллагена и, особенно, нейтральносоластворимой его фракции. Внутридермальное курсовое введение высокомолекулярного немодифицированного гиалуронана приводит у животных зрелого возраста к увеличению нейтральносоластворимого и

суммарного коллагенов в коже на участках инъекирования через 4-5 недель после начала терапии, характеризуя усиление коллагеногенеза.

Регуляция функционирования зрелых фибробластов, интенсивность их пролиферации осуществляется как системными, так и локальными факторами. В воспалительных реакциях, в процессах регенерации, регуляции иммунных реакций особенно велика роль короткодистантных регуляторов (цитокины, факторы роста, морфогены). Поэтому в следующей серии экспериментов было изучено содержание некоторых интерлейкинов и ростовых факторов.

3.5. Динамика содержания некоторых цитокинов в сыворотке крови экспериментальных животных при интрадермальном введении гиалуроновой кислоты

В данной серии экспериментов были использованы 62 самки белых неимбранных крыс зрелого возраста (11-12 месяцев) массой 280-325г. Крысам опытной группы, как и предыдущих сериях, под легким эфирным наркозом трехкратно внутридермально вводили препарат гиалуроновой кислоты.

В сыворотке крови определяли содержание инсулиноподобного ростового фактора 1 (IGF-1), трансформирующего ростового фактора бета 1 (TGF- β 1), интерлейкина 1 бета (IL-1 β) и фактора некроза опухолей – альфа (TNF – α) методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов “IGFELISA” (Mediagnost), “TGF- β -1-ELISA (Affymetrix/Bioscience), ИФА-ИЛ-1 β и ИФА-ФНО-альфа (ОО «Цитокиновый контур»), анализатора StatFox 2100 согласно протокола производителя.

Из результатов, представленных в таблице 12, видно, что динамика изменений содержания определяемых сигнальных молекул в сыворотке крови на протяжении эксперимента значительно отличается. Уровень IGF – 1 на следующие после введения гиалуроновой кислоты дни (2, 4, 7-е сутки опыта) не подвергался статистически значимым колебаниям по сравнению с контролем. Повышение его содержания обнаруживалось в более отдаленный

сроки: на 21-е сутки статистически вероятно ($p=0,052$), а на 37-е сутки – статистически значимо ($p=0,024$).

Таблица 12 – Содержание некоторых цитокинов в сыворотке крови самок крыс зрелого возраста при внутридермальном введении гиалуронана

Цито- кины пг/мл	Интактные, 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- β 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 β	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- α	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

Уровень TGF – β 1 увеличивался в сыворотке крови крыс опытной группы уже на вторые сутки после инъекции препарата гиалуроновой кислоты ($p=0,002$) и с некоторыми колебаниями сохранялся на более высоких, чем у интактных животных, значениях до конца эксперимента (рисунок 8).

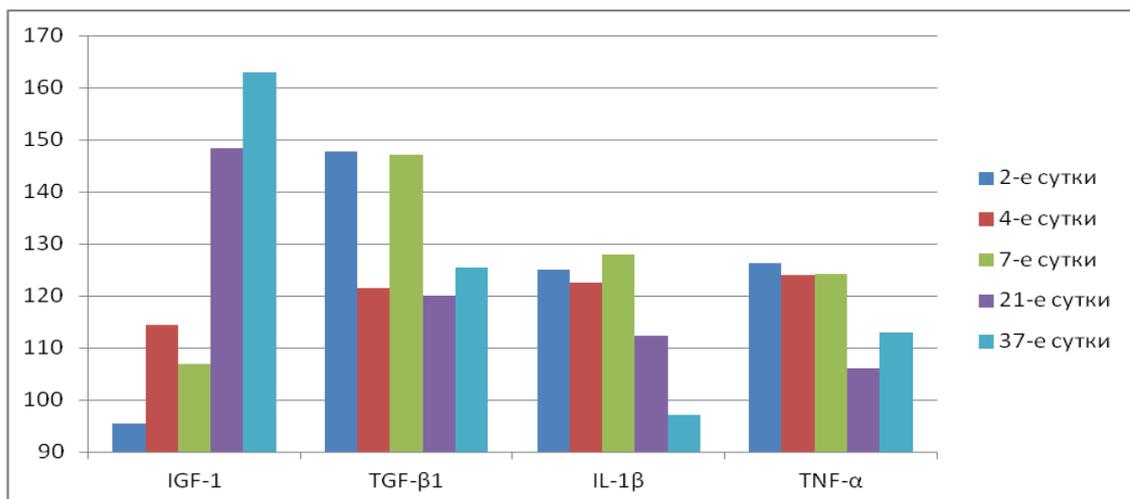


Рисунок 5 – Изменение уровня цитокинов в сыворотки крови крыс при внутридермальном введении гиалуронана (в % к показателям интактных крыс)

Содержание провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF- α было увеличенным на 2, 4 и 7-е сутки эксперимента, т.е., на следующие сутки после

очередной внутридермальной инъекции препарата гиалуронана, а в поздние сроки наблюдения (21-е и 37-е сутки) не отличалось от уровня контроля.

IGF-1 и TGF- β 1 относятся к группе сигнальных молекул, основное действие которых направлено на стимулирование пролиферации и роста клеток, хотя они обладают плеiotропным характером эффектов [210, 256]. IGF-1 по структуре близок к инсулину (43% гомологии), продуцируется печенью, клетками соединительной и других тканей (в основном под контролем соматотропного гормона), обладает прямым эффектом как *in vivo*, так и *in vitro*, относится к аутокринно-паракринным факторам, вовлеченным в клеточную пролиферацию и дифференцировку *in situ* [223]. Свое действие фактор оказывает через рецептор IGFR-1, и частично через рецептор инсулина IR аутокринным-паракринным механизмом. Его взаимодействие с рецепторами, обладающими ферментативной активностью тирозинкиназы, включает в последующем активацию (фосфорилирование) белков нескольких путей интерцеллюлярного распространения сигналов [210]. С этих позиций увеличение содержания IGF-1 в сыворотке крови в отдаленные сроки после введения препарата гиалуроновой кислоты может быть косвенным отражением стимуляции процессов пролиферации и роста клеток кожи в области введения гиалуронана.

TGF- β 1 является членом суперсемейства трансформирующего ростового фактора, насчитывающего около 100 представителей, действует на клетки через рецепторы – серин/треонинпротеинкиназы, и использует SMAD – систему интерцеллюлярного распространения сигналов [230], продуцируется многими типами клеток, включая активированные макрофаги, Т-лимфоциты, фибробласты, фиброциты, эпителиальные и др. Фибробласты способны синтезировать разные ключевые посредники воспаления [171], а TGF- β 1 обладает противовоспалительным эффектом, подавляя синтез воспалительных цитокинов, снижает цитотоксическую и цитокинпродуцирующую активность моноцитов/макрофагов, ответ лимфоцитов на действие IL -2, -4, -7, формирование цитотоксических NK – и Т – клеток [230]. TGF- β 1 индуцирует макрофаги фенотипа M2, которые необходимы для разрешения воспаления,

заживления и восстановления гомеостаза и характеризуются экспрессией «мусорных» рецепторов, ростовых факторов и ингибиторов воспаления [191, 244].

В исследованиях по оценке влияния нативной гиалуроновой кислоты и ее модифицированных форм на биологическую ткань и клеточные линии показано, что при субдермальном введении экспериментальным животным воспалительный ответ на повреждение ткани при инъекции препарата сопровождается умеренной нейтрофильной инфильтрацией, сменяющейся в динамике на лимфоцитарно-макрофагальную [62, 64]. Возможно в этой связи, увеличение содержания TGF- β 1 в первую неделю эксперимента, когда через каждые 3 дня – первые, третьи и шестые сутки опыта проводились инъекции препарата гиалуронана, связано реакцией клеток кожи и иммунной системы на воспалительный ответ ткани дермы интенсификацией секреции данного противовоспалительного регуляторного фактора.

О возможности воспалительного ответа ткани кожи в первую неделю эксперимента при внутридермальном введении препарата гиалуронана экспериментальным животным свидетельствует и результаты определения в сыворотки крови таких цитокинов, как IL-1 β и TNF- α .

IL-1 β многофункциональный цитокин с широким спектром действия, играет ключевую роль в развитии и регуляции неспецифической защиты и специфического иммунитета. Он одним из первых включается в ответную защитную реакцию при действии тех или иных стрессорных факторов. Основными продуцентами IL-1 β являются макрофаги и моноциты. Данный цитокин могут также синтезировать НК-лимфоциты, фибробласты, дендритные, эндотелиальные клетки, кератиноциты. Клетками-мишенями являются иммукомпетентные, эндотелиальные и эпителиальные клетки, фибробласты и др. IL-1 β инициирует и регулирует воспалительные, иммунные процессы, активирует нейтрофилы, Т- и В- лимфоциты, стимулирует синтез цитокинов (IL-2, -3, -6, TNF- α), молекул адгезии, простагландинов, белков острой фазы, индуцирует образование активных форм кислорода, повышает

фагоцитоз, проницаемость сосудистой стенки [84, 98, 106, 110, 125]. Таким образом, IL-1 β играет важную роль в формировании цитокиновой сети в ответ на повреждение тканей.

TNF- α является также плейотропным медиатором воспаления. Особенно активно и достаточно быстро вырабатывается активированными мононуклеарными фагоцитами. Кроме того, его могут продуцировать фибробласты, дендритные клетки, тучные клетки, гемопоэтические и эндотелиальные клетки, Т-лимфоциты [118]. Он индуцирует синтез простаглицина (ПГ-I₂), экспрессию ELAM-1, ICAM-1 и мембранно - I₂ ассоциированного IL-1, повышает секрецию IL-2, IL-6, IL-8, GM-CSF, моноцитарного хемотоксического белка и др [110]. TNF регулирует множество биологических процессов, включая пролиферацию, дифференцировку и гибель различных клеток, воспаленные реакции, врожденный и приобретенный иммунитет, а также формирование структуры различных органов и тканей, включая вторичные лимфоидные органы. Рецепторы к TNF – TNFR 1/p55 и TNFR 2/p75 экспрессируются большинством клеток в организме. Связывание цитокина с рецепторами индуцирует сигнальные каскады, ведущие к активации митогенактивированных протеинкиназ и транскрипционных факторов, включая NF- κ B и активирующий протеин, которые регулируют экспрессию генов-медиаторов воспаления [255, 268]. TNF является одним из основных воспалительных цитокинов и индуцирует поляризацию M1 – фенотип макрофагов, вырабатывающих воспалительные цитокины, антимикробные молекулы и реактивные метаболиты кислорода (АФК) [191, 213]. Таким образом, многие функции TNF- α идентичны функциям IL-1.

IL-1 и TNF- α действуют синергично на фибробласты. Одновременно провоспалительные цитокины усиливают фагоцитоз, продукцию кислородных радикалов фагоцитирующими клетками, активируют метаболизм соединительной ткани, стимулирует пролиферацию фибробластов и клеток эндотелия, что важно для повреждения, заживления и восстановления целостности ткани [73, 84, 98, 110, 111, 125].

В то же время уровень цитокинов в циркуляции находится в физиологических условиях под контролем нескольких систем, включая синтез стероидных гормонов, экспрессию растворимых форм рецепторных антагонистов, выработку сигнальных ингибиторов, регуляцию транскрипции и стабильности мРНК, выведение из организма [98, 111, 118, 255].

TGF- β 1 оказывает и анаболическое действие. Он усиливает синтез белков внеклеточного матрикса, способствует заживлению ран и стимулирует ангиогенез [2300]. Сохранение его повышенного уровня на 21-е и 37-е сутки эксперимента, по всей вероятности, является следствием интенсификации пролиферации фибробластов, усиления их биосинтетических функций. Так, при введении гелей гиалуроновой кислоты в кожу у экспериментальных животных, наряду с интенсивной резорбцией гиалуронана, активизировались процессы пролиферации фибробластов, синтеза коллагена и неоангиогенез [64]. С этих позиций важно не только способность клеток соединительной ткани продуцировать TGF- β 1, но и возможность под его влиянием активной дифференциации циркулирующих фиброцитов в репаративные фибробласты [144] и эпителиально-мезенхимального перехода (трансдифференциации) клеток эктодермального происхождения в репаративные фибробласты [114, 133], которые в свою очередь экспрессируют сигнальные молекулы – TGF- β 1 и ростовой фактор соединительной ткани, интенсивно продуцируют коллагены 1 и 3 типов [210].

Таким образом, проведенные опыты показывают, что внутридермальное введение нестабилизированной высокомолекулярной гиалуроновой кислоты методом мезотерапии приводит у животных зрелого возраста к усилению секреции в первые дни непосредственно после процедуры инъекции LI-1 β , TNF- α и TGF- β 1, что может отражать воспалительную реакцию дермы кожи на нарушение целостности ткани. В отдаленные сроки (3-5 недели эксперимента) увеличивается уровень IGF-1 и TGF- β 1, характеризуя усиление процессов пролиферации и рост клеток кожи и сосудов в области инъекций препарата. В

литературе появилось сообщение R.M. Kavasi et al. [174] о действии сульфатированных дериватов гиалуронана на рецепторный комплекс TGF- β 1.

Для получения ответов на эти и другие возникающие вопросы по ходу экспериментальных исследований были проведены гистологические и иммуногистохимические исследования.

3.6. Характеристика изменений гистологической структуры кожи экспериментальных животных в области введения гиалуроновой кислоты

Самкам белых крыс зрелого возраста под эфирным рауш-наркозом на боковую поверхность туловища внутридермально однократно методом мезотерапии вводили опытной группы животных препарат высокомолекулярной гиалуроновой кислоты “Juvederm hydrateTM”, контрольной группы – физиологический раствор хлористого натрия из расчета 0,06 мл/100 г массы тела.

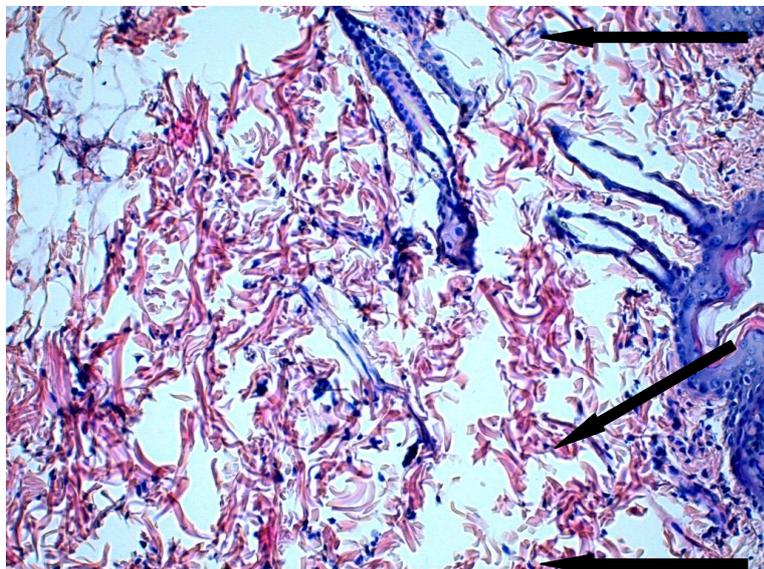


Рисунок 6 – Признаки набухания кожи крыс контрольной области в виде разрыхления волокнистых пучков, увеличения межпучковых пространств (\uparrow) в дерме после введения физиологического раствора на 2-е сутки. Окраска гематоксилином и эозином. Увел. X100

В коже контрольной области крыс, где внутридермально методом мезотерапии вводился физиологический раствор (0,87% раствор NaCl). На 2-е сутки определялись признаки выраженного отека тканей. Наблюдалось набухание коллагеновых волокон, их разрыхление, расширение межпучковых пространств, увеличение макрофагальных клеток, отражая развитие ответной реакции ткани кожи воспалительного характера (рисунок 6).

Аналогичные изменения были выявлены и в коже опытной области. На вторые сутки после внутридермального введения препарата (ГК) на гистологических препаратах кожи также определялись признаки отека тканей в виде разрежения волокнистых пучков в дермальной пластинке и увеличения под ней ширины слоя гиподермы (рисунок 7).

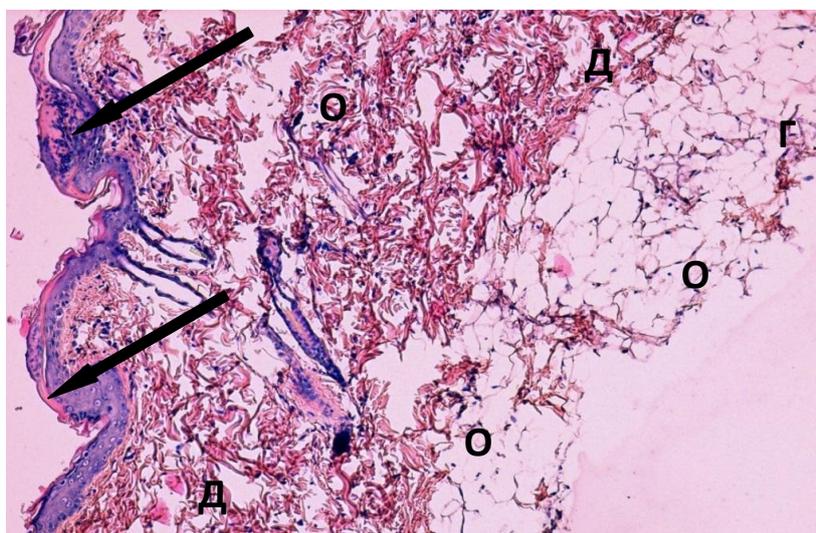


Рисунок 7 – Отек (О) тканей в дерме (Д) и гиподерме (Г) кожи крыс на 2-е сутки после введения препарата ГК. Участки струпа (↑) в зоне входа инъекционной иглы. Окраска гематоксилином и эозином. Увел. X100

На поверхности эпидермиса хорошо были видны небольшие участки струпа, образовавшегося в месте входа инъекционной иглы. Введенная экзогенная гиалуроновая кислота визуализировалась только после проведения гистохимической реакции по Хейлу. Пропитывая ткани кожи, в значительном количестве гиалуронан выявлялся в соединительнотканной пластинке между волокнистыми структурами и в гиподерме в виде расплывчатых островков разной формы и разных размеров, которые давали довольно интенсивную

голубую или синюю окраску после проведения указанной специфической реакции на гликозаминогликаны (рисунок 8).

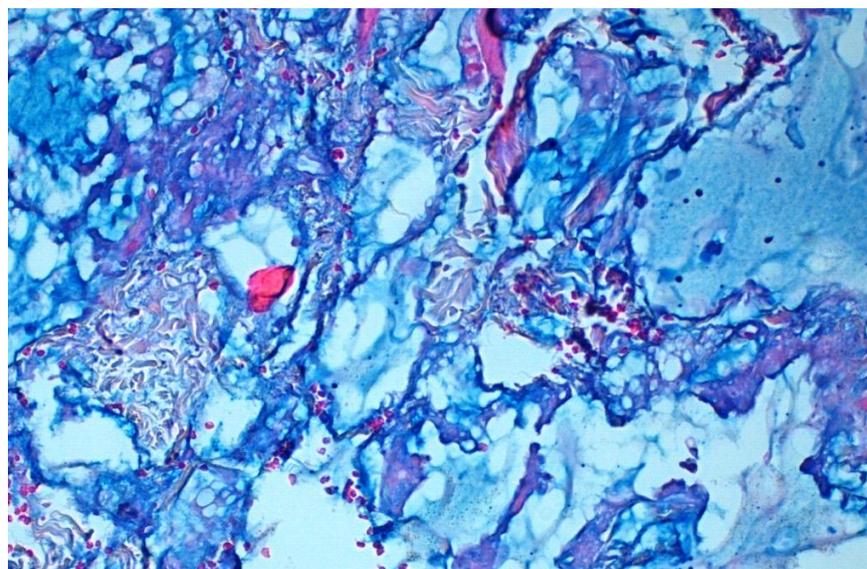


Рисунок 8 – Выявление гликозаминогликанов в виде голубого и синего - окрашивания в гиподерме кожи крысы на 2-е сутки после введения препарата ГК. Реакция по Хейлу. Докраска эозином. Увел.Х200

Так как реакция Хейла направлена на выявление суммарных гликозамингликанов синее окрашивание характерно определялось и в основном веществе между коллагеновыми волокнами, и в самих коллагеновых волокнах (рисунок 9).

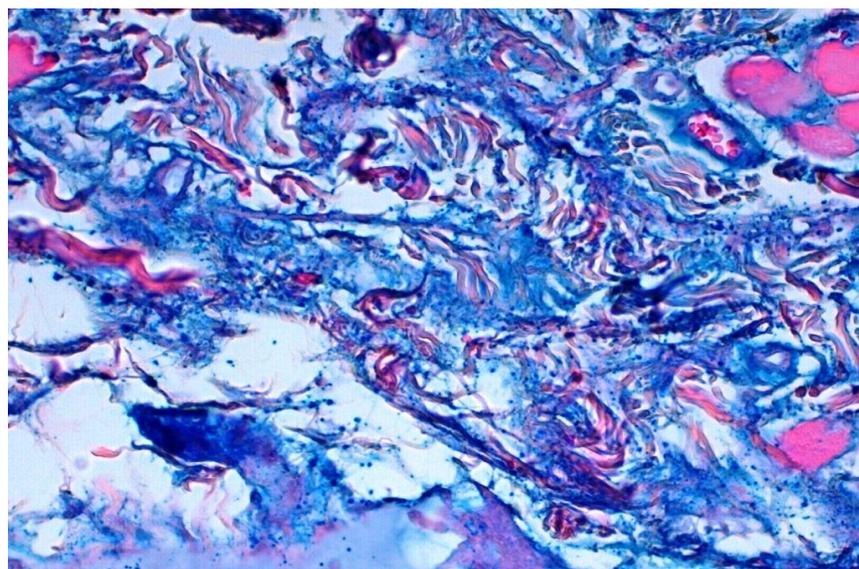


Рисунок 9 – Выявление гликозаминогликанов в виде синего окрашивания в дерме кожи крысы на 2-е сутки после введения препарата ГК. Реакция по Хейлу. Докраска эозином. Увел.Х200

Уже на 2-е сутки после внутридермального введения в кожу гиалуронана в отечных тканях дермы и гиподермы выявились небольшие диффузные скопления клеток, большинство которых составляли макрофаги. Макрофаги представляли собой крупные клетки с бобовидными крупными ядрами и обильной цитоплазмой (рисунок 10). Признаков выраженных воспалительных процессов в виде инфильтрации лимфоцитарными клетками в тканях не обнаруживалось.

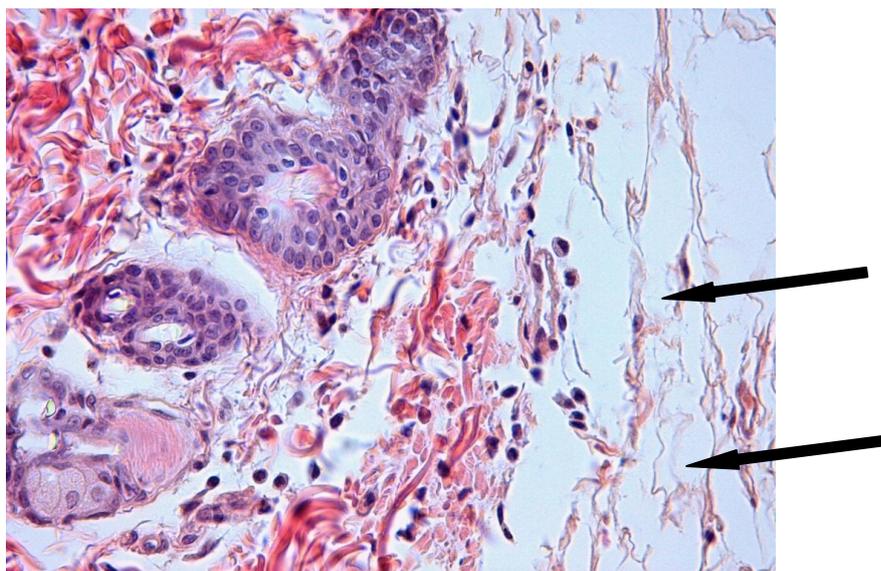


Рисунок 10 – Диффузные скопления макрофагальных клеток (↑) в коже крыс на 2-е сутки после введения препарата ГК. Окраска гематоксилином и эозином. Увел.Х400

На 4-е сутки отек ткани в контрольной области кожи по степени выраженности несколько снижался, в отдельных участках оставался, особенно вокруг волосяных влагалищ и луковиц. Признаки отчетности не пропадали и в фациальной прослойке кожи. В некоторых участках выявлялись слабо выраженные клеточные инфильтраты по ходу вкола инъекционной иглы (рисунок 11). Такие клеточные «дрождки» как реакция на травму ткани введенной иглой выявились и в более глубоких слоях ближе к гиподерме.

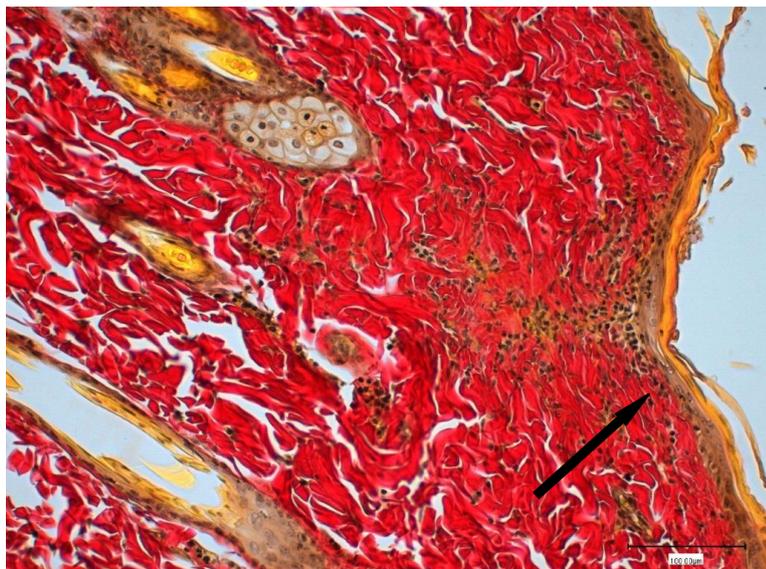


Рисунок 11 – Структура кожи крысы контрольной группы на 4-е сутки после внутридермального введения физиологического раствора. Слабо выраженные клеточные инфильтры (↑) по ходу вкола инъекционной иглы. Окраска по Ван-Гизону. Увел.Х100

На 4-е сутки после введения препарата ГК отек тканей слегка спадал, но не исчезал полностью, большей частью он определялся в слое гиподермы (рисунок 12). Введенный в ткани гиалуронан при проведении гистохимической реакции по Хейлу на 4-е сутки продолжал интенсивно выявляться в дермальной пластинке между пучками коллагеновых волокон и в слое гиподермы (рисунок 13). Макрофагальная реакция в данный срок несколько усиливалась. Из слегка расширенных кровеносных сосудов продолжали мигрировать в ткани клетки, участвующие в лизисе и фагоцитозе введенного гиалуронана (рисунок 14). Крупные макрофаги определялись между волокнистыми пучками дермальной пластинки и в гиподерме (рисунок 15). Причем они определялись чаще не в виде гранулем (скоплений клеток, характерных для воспаления), а были диффузно рассеяны по слоям кожи. На больших увеличениях микроскопа просматривалась отростчатая широкая цитоплазма клеток. Такая цитоплазма характерна для фагоцитирующих макрофагов. Многие клетки имели светлую вакуолизированную цитоплазму и округлую форму, что является признаком активации фагоцитирующей функции (рисунок 16).

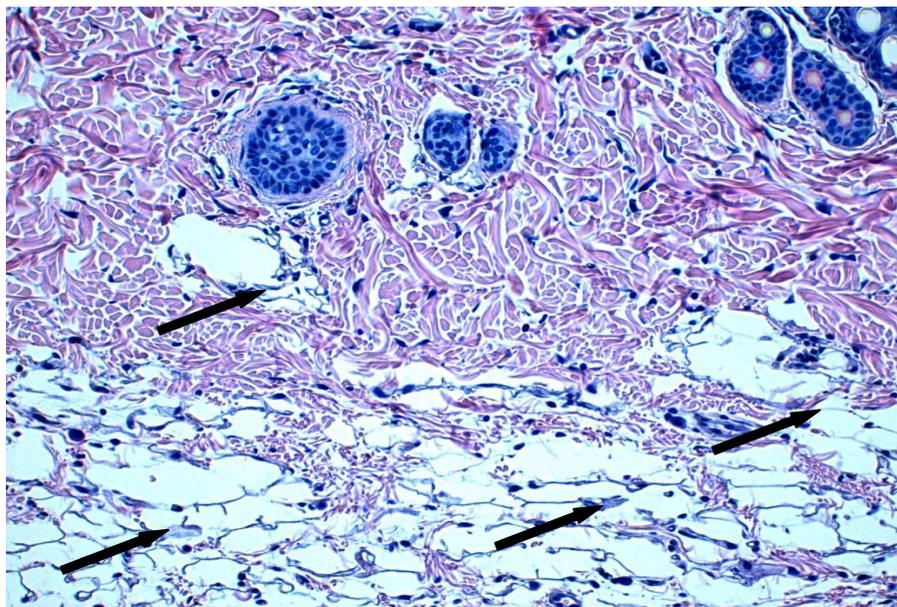


Рисунок 12 – Сохранившиеся признаки отека (↑) в коже крыс на 4-е сутки после введения препарата ГК. Окраска гематоксилином и эозином. Увел.Х200

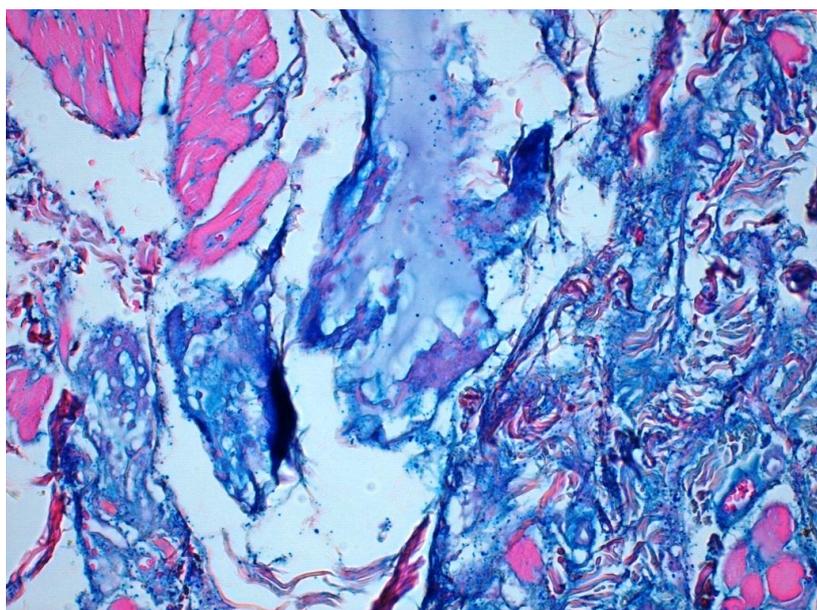


Рисунок 13 – Выявление гликозаминогликанов в виде голубого и синего окрашивания в гиподерме кожи крысы на 4-е сутки после введения препарата ГК. Реакция по Хейлу. Докраска эозином. Увел.Х200

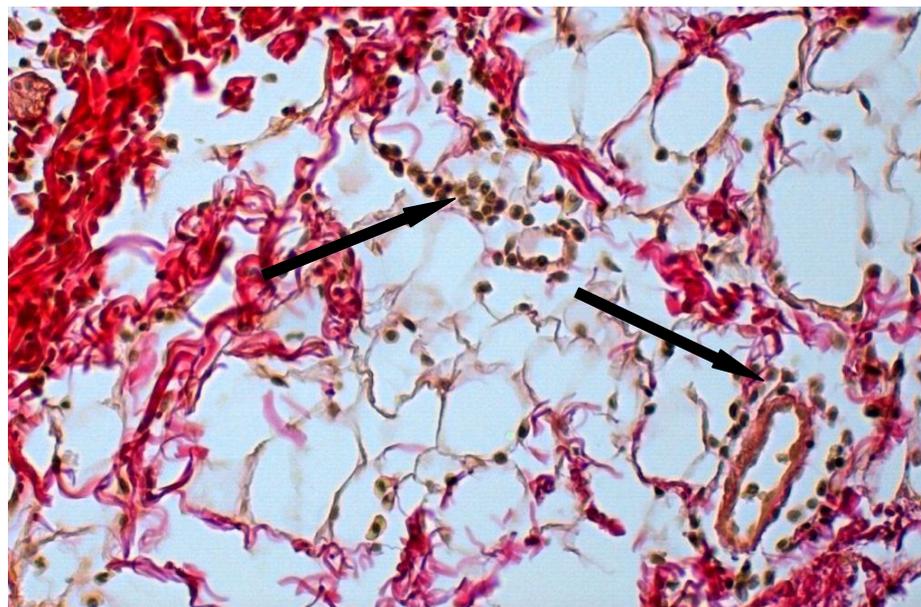


Рисунок 14 – Скопления фагоцитирующих макрофагов (↑) в коже крыс на 4-е сутки после введения препарата ГК. Окраска по Ван-Гизону. Увел.Х400

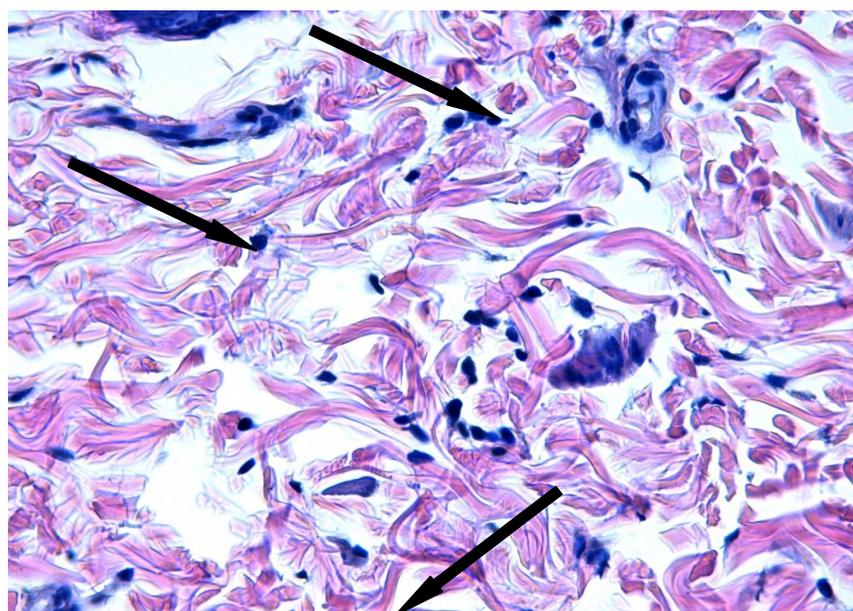


Рисунок 15 – Макрофаги с большой отростчатой цитоплазмой (↑) в коже крыс на 4-е сутки после введения препарата ГК. Окраска гематоксилином и эозином. Увел.Х400

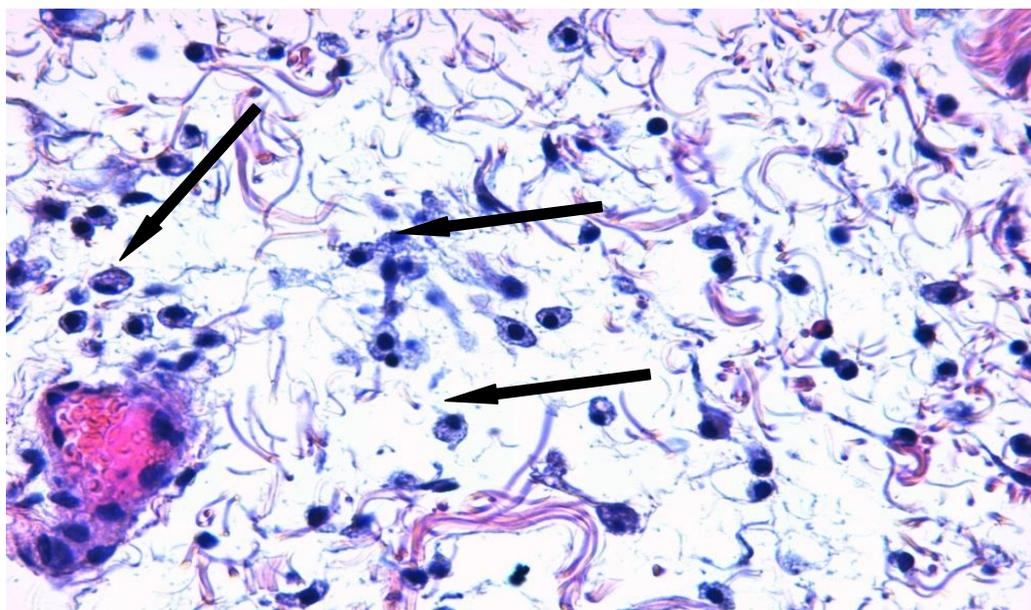


Рисунок 16 – Фагоцитарные макрофаги с вакуолизированной светлой цитоплазмой (↑) в коже крысы на 4-е сутки после введения препарата ГК. Окраска гематоксилином и эозином. Увел.Х400

Так как введенный препарат ГК был в виде геля, в цитоплазме макрофагов он визуализировался в виде вакуолей. В подтверждение этому после проведенной реакции по Хейлу цитоплазма данных макрофагов окрашивалась в синий цвет (рисунок 17).

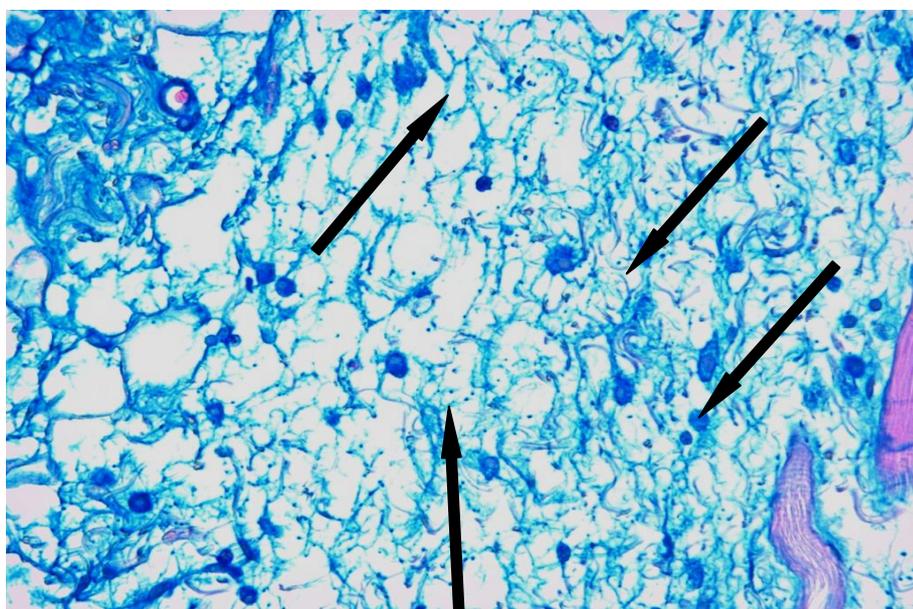


Рисунок 17 – Фагоцитарные макрофаги (↑) с цитоплазмой синего цвета в коже крыс на 4-е сутки после введения препарата ГК. Реакция по Хейлу. Докраска эозином. Увел.Х400

При этом признаки выраженного воспаления в виде инфильтрации большим количеством лимфоцитарных клеток не выявлялись, в тканях преобладали фибробластические клетки и макрофаги, местами встречались тучные клетки, единичные лимфоциты и эозинофилы.

На 7-е сутки после введения физиологического раствора и в дальнейшие сроки эксперимента гистологическая структура кожи крыс контрольной группы почти полностью соответствовала норме (рисунок 18). Гистохимически при реакции Хейла гликозаминогликаны специфично определялись в основном веществе между коллагеновыми волокнами в дерме кожи. Под эпидермисом, где в опытной группе выявлялась полоса новообразованной соединительной ткани, богатой гликозаминогликанами и окрашивающейся в синий цвет, ни на одном сроке опыта в контрольной группе такой картины не выявлено (рисунок 19), определялась лишь слабо выраженная реакция на гликозаминогликаны.

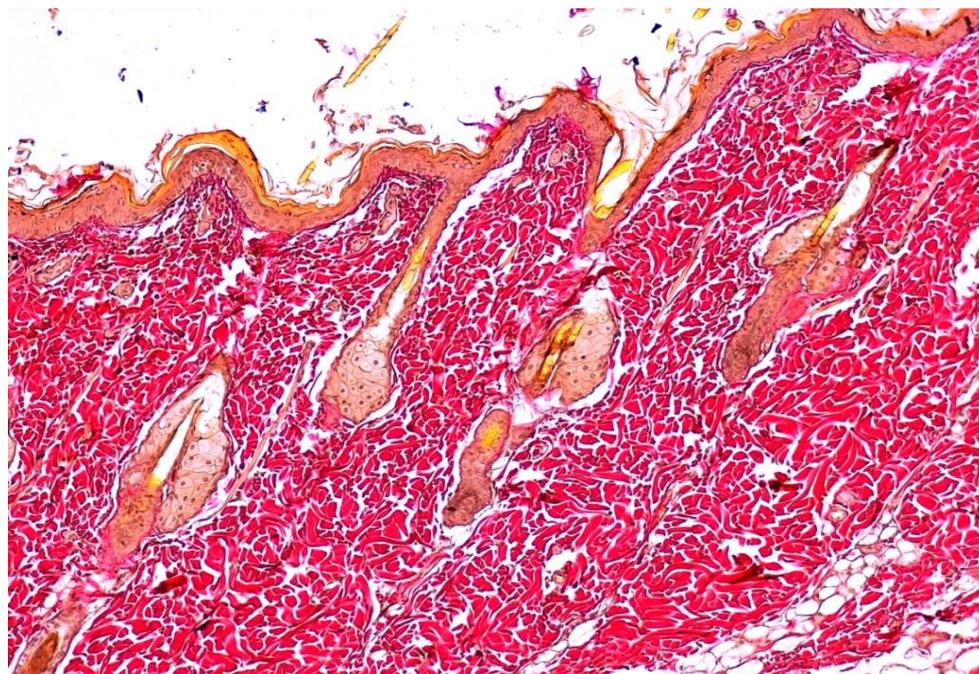


Рисунок 18 – Структура кожи крысы контрольной группы на 7-е сутки после внутридермального введения р-ра физиологического раствора. Окраска по Ван-Гизону. Увел.Х100

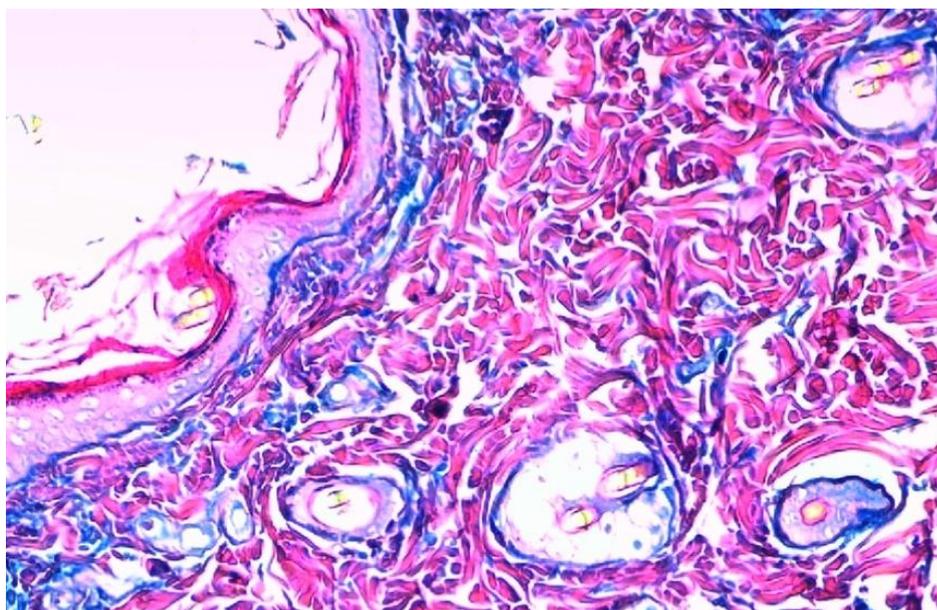


Рисунок 19 – Слабоположительная реакция на гликозаминогликаны в коже крыс контрольной группы на 21-е сутки после введения физиологического раствора. Реакция по Хейлу. Докраска эозином. Увел.Х200

На 7-е сутки у животных опытной группы после реакции Хейла интенсивность окрашивания в синий цвет элементов соединительной ткани кожи крыс ослабевала, что свидетельствовало о рассасывании введенной ГК (рисунок 20).

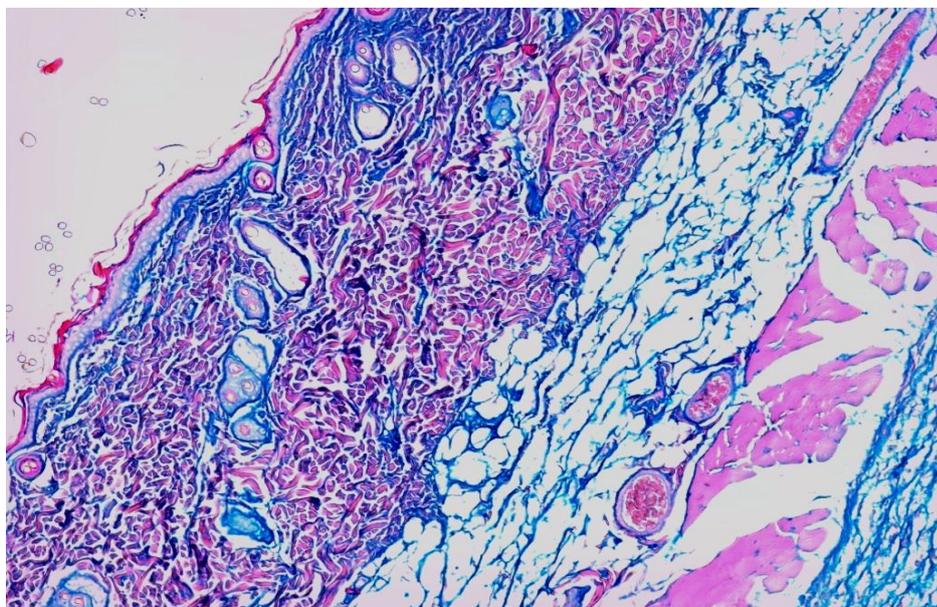


Рисунок 20 – Слабоположительная реакция на гликозаминогликаны в коже крыс на 7-е сутки после введения препарата ГК. Реакция по Хейлу. Докраска эозином. Увел.Х100

«Островки» голубого цвета и диффузное пропитывание тканей ГК не определялись. Синее окрашивание по Хейлу между пучками и самих коллагеновых волокон было большей частью характерно для тканей в норме.

При этом по сравнению с предыдущим сроком опыта количество инфильтрирующих клеток в тканях не снижалось (рисунок 21).

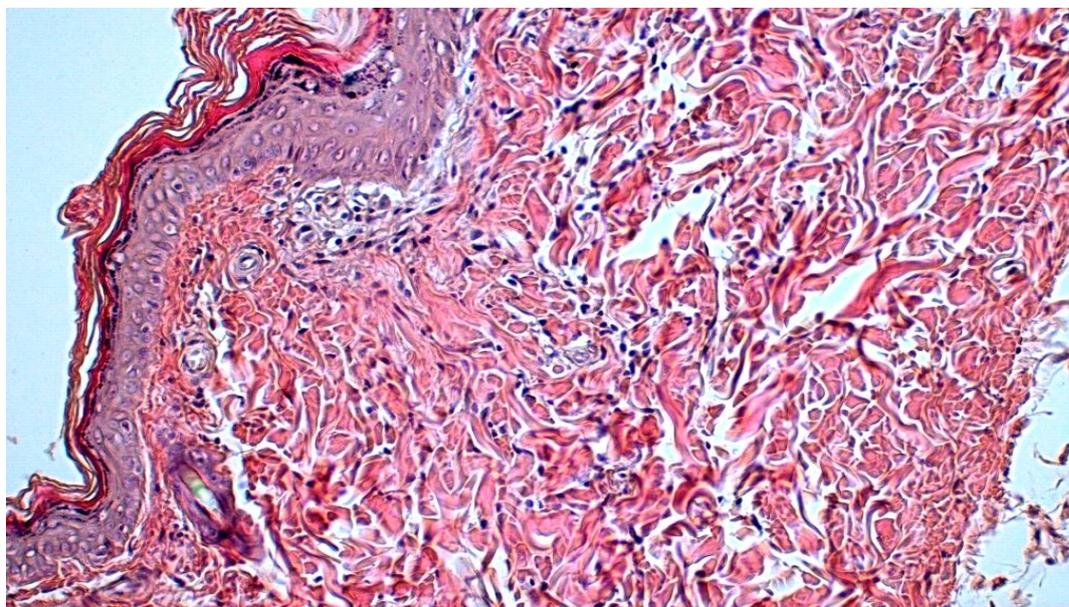


Рисунок 21 – Структура кожи крыс на 7-е сутки после введения препарата ГК. Окраска гематоксилином и эозином. Увел.Х200

Так же, особенно в фасциальной прослойке кожи, продолжали определяться фагоцитарные макрофаги с вакуолизированной цитоплазмой.

Местами в коже выявлялись признаки слабо выраженного отека в виде расширенных межволоконистых пространств, хотя кровеносные сосуды в дермальной пластинке имели характерное для них строение и не были сильно расширены.

Сосочковый слой дермальной пластинки под эпидермисом на большом протяжении имел обычное строение. Но отдельные участки содержали повышенное количество гистиоцитов и фибробластических клеток (источник синтеза коллагена) (рисунок 22).

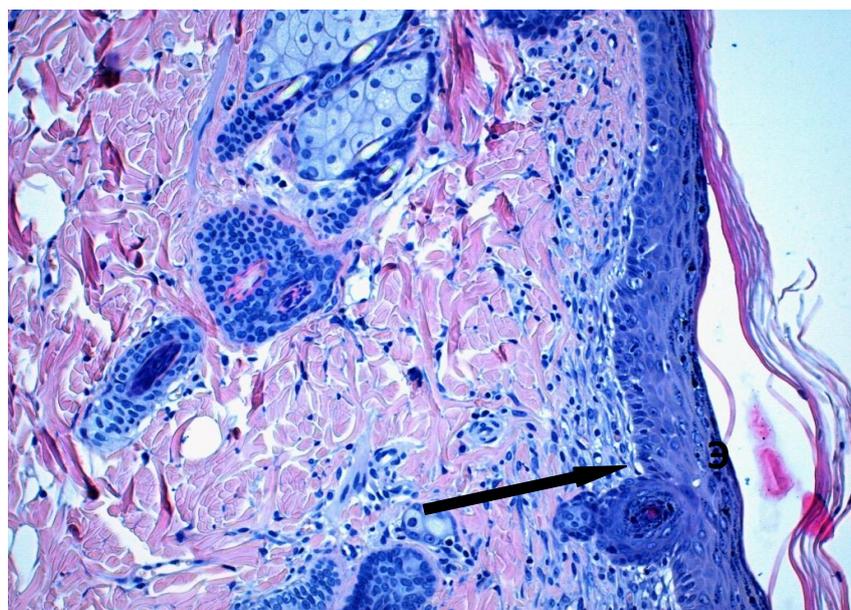


Рисунок 22 – Повышение количества фибробластических клеток (↑) под слоем эпидермиса (Э) в коже крыс на 7-е сутки после введения препарата ГК. Окраска гематоксилином и эозином. Увел.Х200

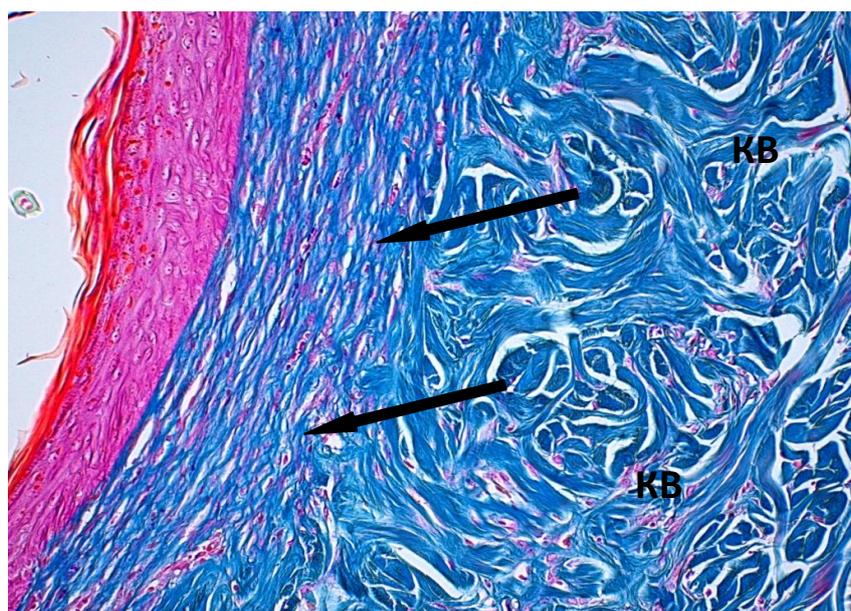


Рисунок 23 – Тонкие новообразованные коллагеновые волокна (↑) под эпидермисом (Э) на 21-е сутки после внутридермального введения препарата ГК. KV – зрелые коллагеновые волокна. Окраска по Маллори. Увел.Х200

На 21-е сутки после введения в кожу опытной группы крыс препарата ГК под эпидермисом в сосочковом слое такие зоны регенерации становились более протяженными. Данные участки были с признаками формирования новых

коллагеновых волокон (рисунок 23). В ткани определялось большое количество гистиоцитов и фибробластических клеток, синтезирующих коллаген.

Новообразованные коллагеновые волокна под эпидермисом кожи были очень тонкими, почти нитеобразными. Между ними выявлялись растущие мелкие тонкостенные капилляры (рисунок 24).

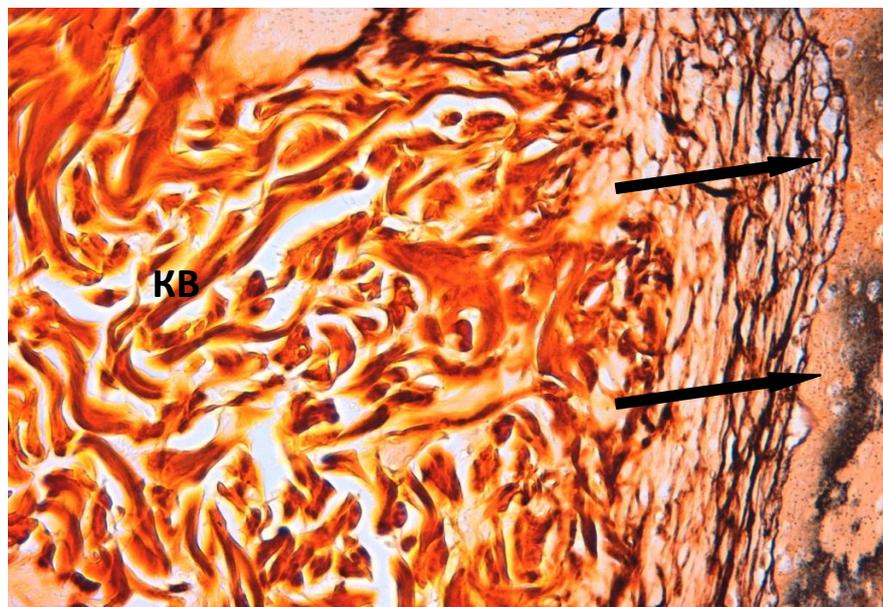


Рисунок 24 – Новообразованные незрелые коллагеновые волокна (↑) черного цвета под эпидермисом (Э) на 21-е сутки после внутридермального введения препарата ГК. КВ – зрелые коллагеновые волокна. Импрегнация по Футу. Увел.Х400

При импрегнации гистологических препаратов раствором серебра по методу Фута новообразованные коллагеновые фибриллы были аргирофильны, то есть приобретали черный цвет в отличие от зрелых «старых» коллагеновых волокон, которые типично импрегнировались в золотисто-желтые оттенки (рисунок 27). Метод Фута специфичен – в черный цвет импрегнируются фибриллы содержащие «незрелый» коллаген I и III типов, а желто-коричневые цвета принимают коллагеновые волокна, содержащие «зрелый» коллаген I типа.

Гистохимически, при реакции по Хейла на гликозаминогликаны, введенный внутридермально ГК у крыс в большом количестве в тканях не определялся. Но интенсивно в голубой цвет прокрашивалась зона регенерации

кожи непосредственно под эпидермисом, что свидетельствовало о высоком содержании в ней гликозаминогликанов, характерной для новообразованной грануляционной ткани (рисунок 25).

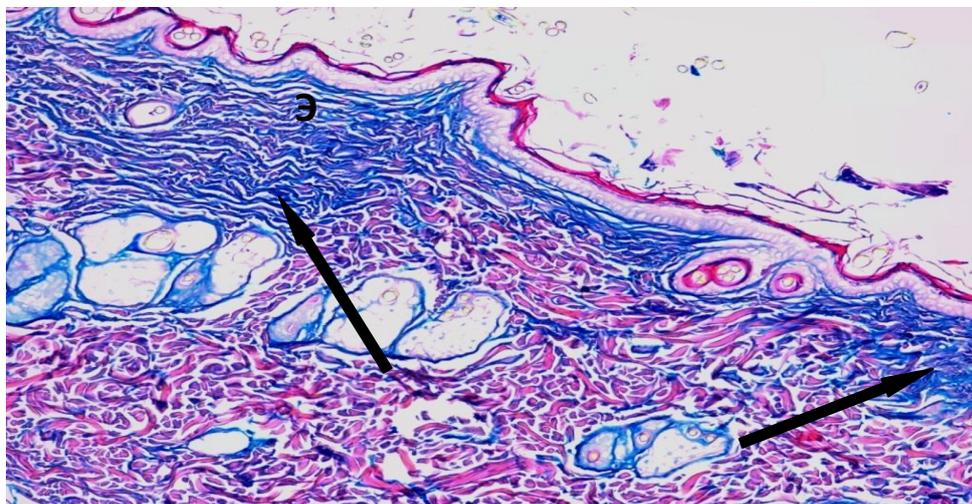


Рисунок 25 – Выявление гликозаминогликанов в виде синего окрашивания под эпидермисом (Э) кожи крысы на 21-е сутки после введения препарата ГК. Реакция по Хейлу. Докраска эозином. Увел.Х200

На 37-е сутки после введения в кожу опытной группы крыс препарата ГК гистологическая структура кожи соответствовала норме. Под толстым слоем эпидермиса, представленного многослойным ороговевающим эпителием, лежала довольно широкая соединительнотканная пластинка, содержащая волосяные луковицы и сальные железы (рисунок 26). Она состояла из сосочкового и сетчатого слоя дермы. Толстые пучки коллагеновых волокон в сетчатом слое характерные для кожи переплетались друг с другом. Под плотной дермальной пластинкой кожи лежал слой подкожно-жировой клетчатки, называемой гиподермой. При окраске по Ван-Гизону волокнистые элементы кожи окрашивались в ярко-красный цвет, свидетельствуя о зрелости коллагеновых волокон. Под эпидермисом в сосочковом слое дермы под большим увеличением микроскопа в некоторых участках продолжали определяться новообразованные тонкие коллагеновые волоконца (рисунок 27). В других участках новообразованная ткань несколько уплотнялась, коллагеновые волокна утолщались, и между ними выявлялось множество мелкокалиберных тонкостенных кровеносных сосудов (рисунок 28).

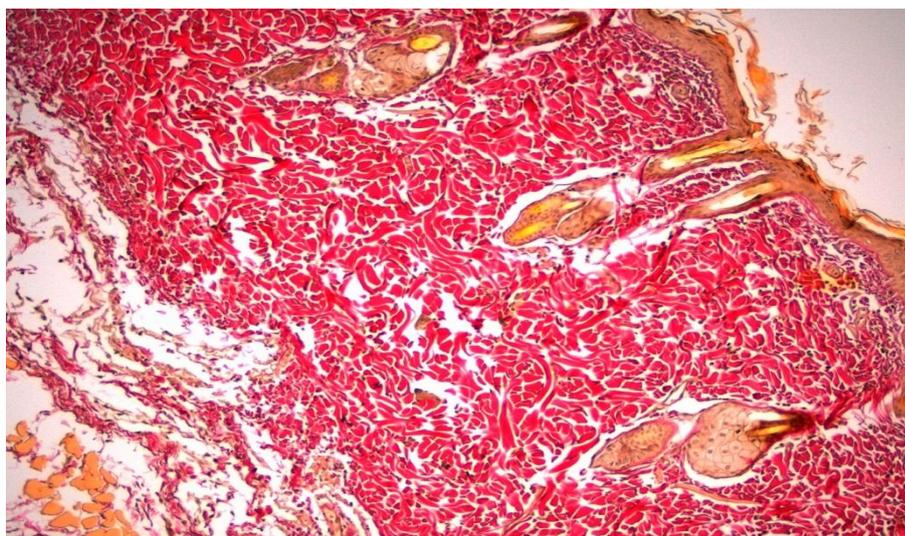


Рисунок 26 – Структура кожи крысы опытной группы на 37-е сутки после внутридермального введения препарата ГК. Окраска по Ван-Гизону. Увел.Х100

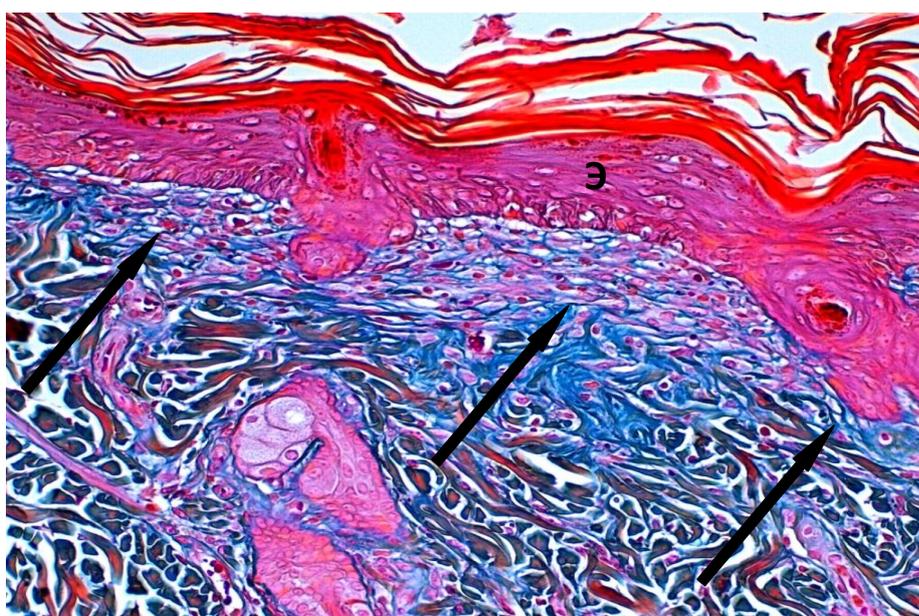


Рисунок 27 – Тонкие новообразованные коллагеновые волокна синего цвета под эпидермисом (Э) в коже крысы опытной группы на 37-е сутки после внутридермального введения препарата ГК. Окраска по Маллори. Увел.Х200

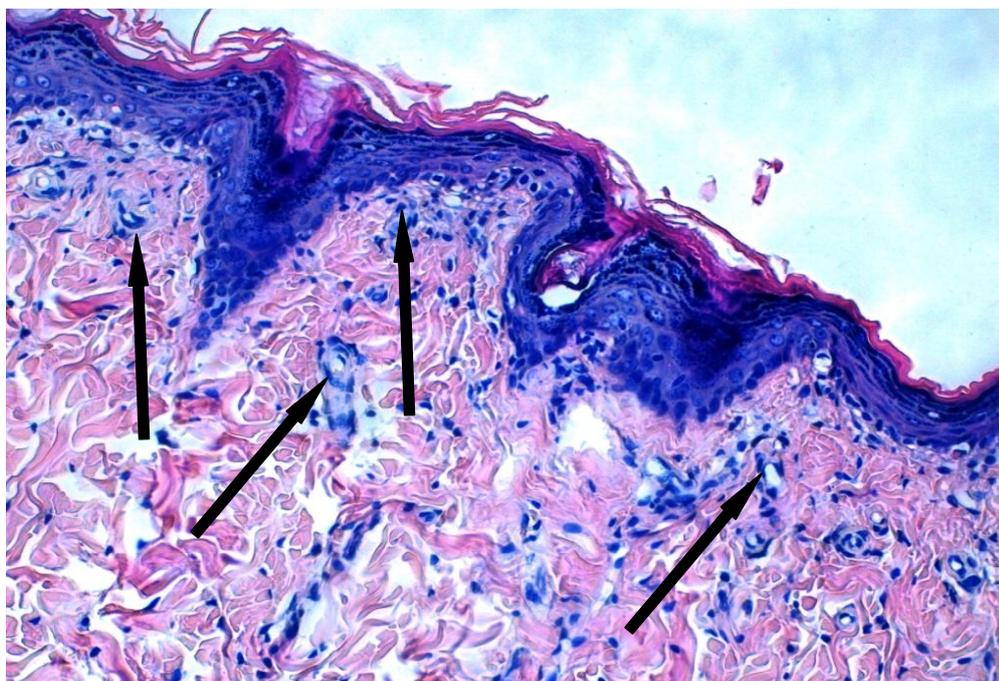


Рисунок 28 – Новообразованные тонкостенные мелкие сосуды (↑) в коже крыс на 37-е сутки после введения препарата ГК. Окраска гематоксилином и эозином. Увел.Х200

Каких-либо признаков воспалительного процесса в коже в виде клеточных инфильтраций и других явлений не обнаруживалось. Между коллагеновыми волокнами определялись типичные удлиненные веретеновидной формы фибробластические клетки с крупными темными ядрами и изредка более крупные гистиоциты с округлыми такими же темными ядрами. Кровеносные сосуды не были расширены и отечных явлений в тканях не наблюдалось.

Таким образом, проведенные гистологические и гистохимические исследования показали, что препарат ГК обладает биосовместимостью и после внутридермального введения крысам не вызывает выраженных воспалительных процессов в коже. В течение 7 суток большая часть введенного гиалуронана резорбируется макрофагальными клетками и к 21-м суткам практически не обнаруживается в тканях. С 7-х суток активизируются фибробласты и процессы новообразования коллагеновых волокон, а также регенерации мелких сосудов в коже под эпидермисом.

Результаты биохимических исследований обмена углеводов, коллагена, гистохимического изучения структуры кожи в области внутридермального

введения экспериментальным животным, а также динамики изменения содержания в сыворотке крови таких факторов, как IGF-1 и TGF- β 1, препарата нативной высокомолекулярной гиалуроновой кислоты позволяют предположить с большой долей вероятности интенсификацию процессов пролиферации и дифференцировки фибробластов с активацией биосинтетических функций и усиление неоангиогенеза.

В этой связи было проведено иммуногистохимическое исследование таких маркеров пролиферации как антиген Ki-67 и фактор роста фибробластов (FGF-1).

Антиген Ki-67 является широко используемым и достаточно специфичным маркером пролиферации. Этот ядерный антиген состоит из двух полипептидных цепей, ассоциирован с хромосомами фазы митоза. Экспрессия Ki-67 позволяет выделить клетки, находящиеся в активной фазе клеточного цикла, на всем его протяжении (G1-, S-, G2- b, M - фазы) [194].

Семейство фактора роста фибробластов (FGF) включает 19 различных белков, молекулярная масса которых колеблется от 16800 до 34000 Да. Биологическая активность FGF разнообразна. Они являются митогенами для различных клеток нейроэктодермального и мезенхимального происхождения, потенциальными митогенами и стимуляторами ангиогенеза. Действие FGF на клетки опосредовано специфическими рецепторами 4-х видов (FGFR1-FGFR4), имеющие интерцеллюлярные домены, являющиеся рецепторными тирозинкиназами. Присоединение лиганда активирует их ферментативную функцию, происходит фосфорилирование определенных тирозиновых остатков в молекуле рецептора, и путем связывания со специальным адаптерным белком вызывает активацию ряда интрацеллюлярных киназ, действие которых включает несколько путей передачи сигналов к клеточному ядру. Так, через киназу JAK активируются белки, входящие в семейство передатчиков сигналов – активаторов транскрипции (STAT), другой путь распространения сигнала приводит к индукции фактора транскрипции Sox 2 [249]. Используя эти пути распространения сигналов, FGF оказывает модулирующее влияние на все

основные внутриклеточные события, включая коммитирование клеток, их пролиферацию, дифференцировку, миграцию и апоптоз [134]. Направленность действия FGF в основном связана с контролем дифференцировки.

У животных контрольной группы после иммуногистохимической реакции с применением моноклональных антител на выявление в клетках Ki-67 положительно менялись лишь отдельные клетки базального слоя эпидермиса, свидетельствуя о слабо выраженном клеточном обновлении эпителиальных клеток (рисунок 29). Большинство ядер эпителиоцитов окрашивались гематоксилином в синий цвет, характеризуя об отсутствии клеток, находящихся в активной фазе клеточного цикла.

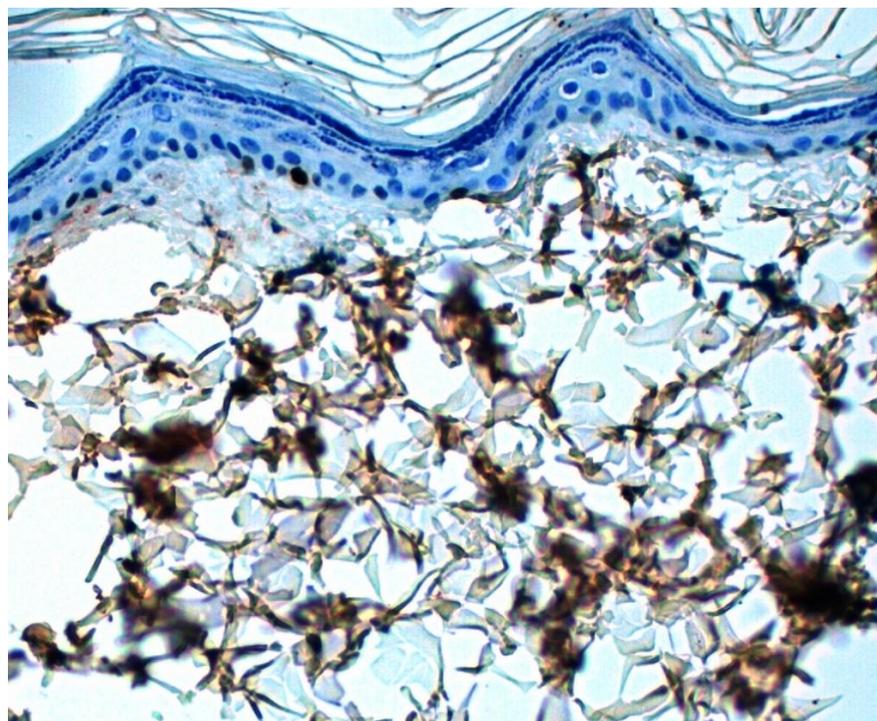


Рисунок 29 – Иммуногистохимическое выявление белка Ki-67 в ядрах пролиферирующих клеток (коричневое окрашивание) в коже крыс на 7 сутки после введения физиологического раствора. Докраска гематоксилином. Увел. X200

После внутридермального введения крысам препарата ГК, начиная с 4-х суток опыта, иммуногистохимически при выявлении в клетках кожи цитокина Ki-67 метились многие клетки базального слоя эпителия. Этот факт

свидетельствовал о процессе пролиферации данных клеток, то есть об их делении. Ядра пролиферирующих клеток, содержащих исследуемый антиген, после реакции с применением моноклональных антител окрашивались в интенсивно коричневый цвет, а ядра неделящихся клеток окрашивались гематоксилином в синий цвет. Наибольшей интенсивности процесс пролиферации в эпителиальном слое кожи достигал на 7-е сутки опыта (рисунок 30).

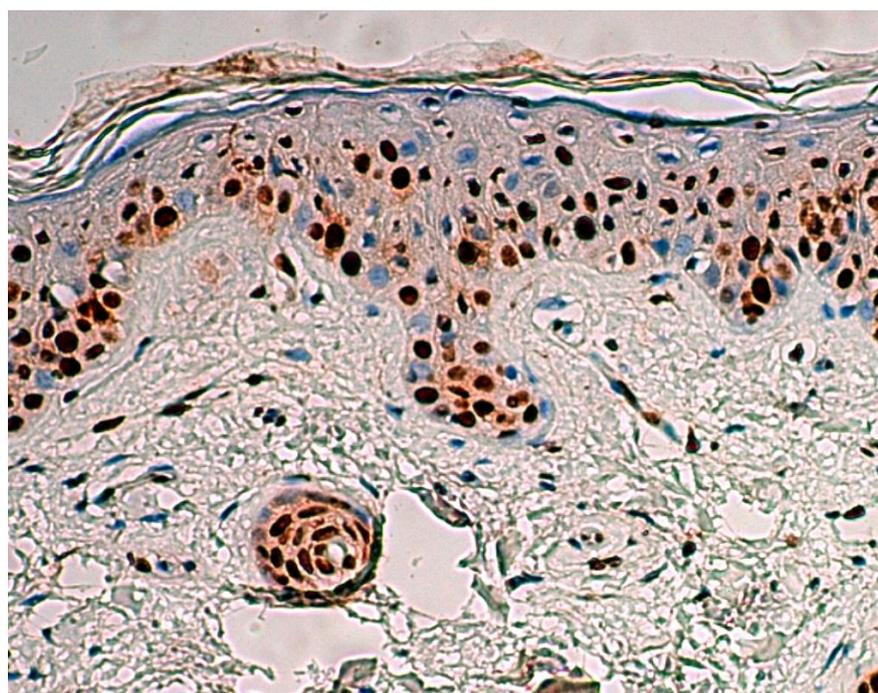


Рисунок 30 – Иммуногистохимическое выявление белка Ki-67 в ядрах пролиферирующих клеток (коричневое окрашивание) в коже крыс на 7 сутки после введения препарата ГК. Докраска гематоксилином. Увел.Х400

На 21-е сутки в эпителиальном слое кожи крыс только отдельные клетки базального слоя экспрессировали белок Ki-67. В данный срок эксперимента Ki-67 интенсивно экспрессировался клетками волосянных фолликулов и фибробластическими клетками в сосочковом слое дермы под эпидермисом (рисунок 31). Кроме того, цитокин Ki-67 выявлялся и в ядрах эндотелиальных клеток стенки отдельных кровеносных сосудов (рисунок 32). На 37-е сутки после введения в кожу крыс препарата ГК белок Ki-67 экспрессировали лишь

отдельные клетки эпителиального слоя и клетки волосяных луковиц, участвующих, как известно, в регенерации клеток эпителия (рисунок 33).

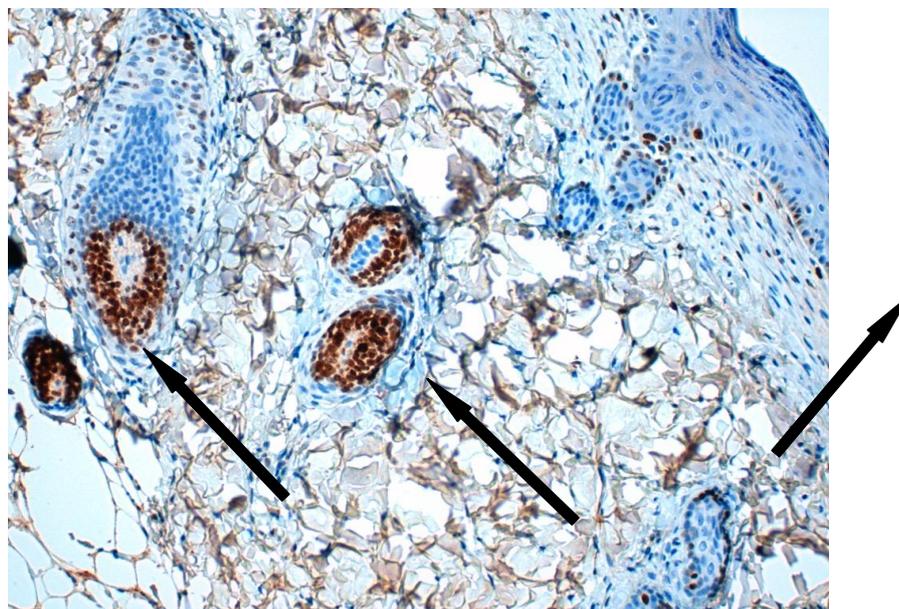


Рисунок 31 – Иммуногистохимическое выявление белка Ki-67 (↑) в ядрах пролиферирующих клеток (коричневое окрашивание) в коже крыс на 21-е сутки после введения препарата ГК. Докраска гематоксилином. Увел.Х200

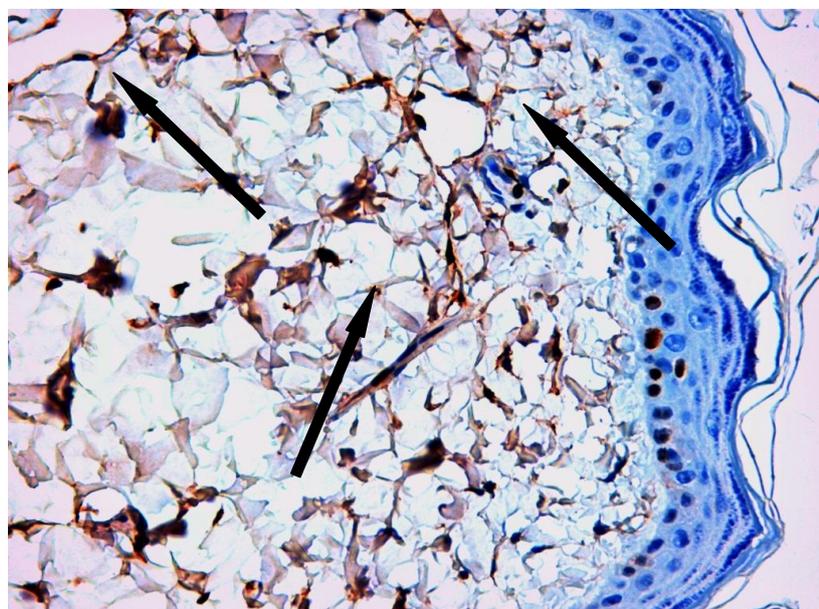


Рисунок 32 – Иммуногистохимическое выявление белка Ki-67 (↑) в ядрах пролиферирующих эндотелиальных клеток (коричневое окрашивание) сосудов в коже крыс на 21-е сутки после введения препарата ГК. Докраска гематоксилином. Увел.Х400

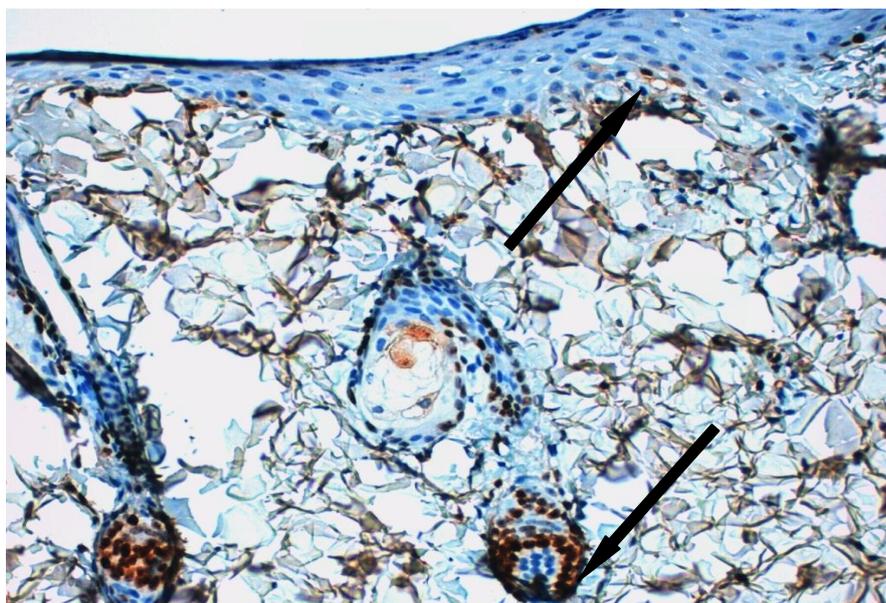


Рисунок 33 – Иммуногистохимическое выявление белка Ki-67 (↑) в ядрах пролиферирующих клеток (коричневое окрашивание) в коже крыс на 37-е сутки после введения препарата ГК. Докраска гематоксилином. Увел.Х200

По результатам иммуногистохимической реакции с применением моноклональных антител на выявление фактора роста фибробластов (FGF-1) в коже животных контрольной группы можно констатировать, что во все сроки опыта цитокин слабо экспрессировался в цитоплазме лишь отдельных клеток (рисунки 34 и 35).

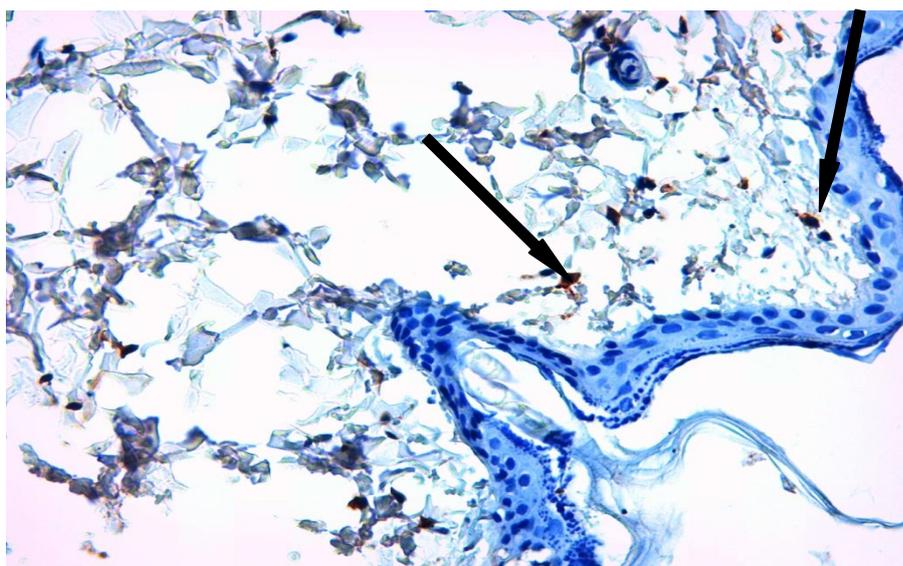


Рисунок 34 – Иммуногистохимическое выявление белка FGF-1 (↑) в цитоплазме клеток (коричневое окрашивание) на 7-е сутки после введения физиологического раствора. Докраска гематоксилином. Увел.Х100

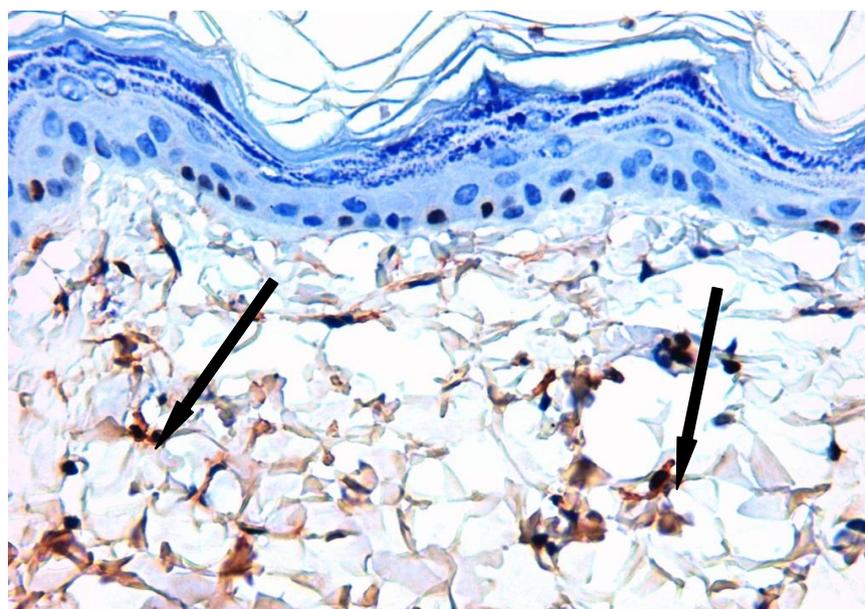


Рисунок 35 – Иммуногистохимическое выявление белка FGF-1 (↑) в цитоплазме клеток (коричневое окрашивание) на 21-е сутки после введения физиологического раствора. Докраска гематоксилином. Увел.Х100

После внутридермального введения препарата ГК в кожу опытных крыс наиболее высокая экспрессия цитокина FGF-1, стимулирующего пролиферацию фибробластических клеток, выявлялась, начиная с 4-х суток, и достигала максимума на 21-е сутки опыта. Белок экспрессировался различными клетками: макрофагами, эндотелиальными клетками, перицитами и отдельными фибробластами. При визуализации и подсчете окрашенных клеток подсчитывали все меченые FGF-1-положительные клетки, так как при проведении данной иммуногистохимической реакции затруднительно точно определить тип клетки. Но, все же, при этом было отмечено, что наиболее интенсивно в виде ярко-коричневого окрашивания он выявлялся в цитоплазме макрофагов, которые можно было дифференцировать по широкой отростчатой цитоплазме (рисунок 36). Таких макрофагов было достаточно много в фасциальной прослойке кожи крыс, вокруг кровеносных сосудов, а также непосредственно под эпителием в сосочковом слое (рисунок 37).

На 37-е сутки опыта количество клеток, экспрессирующих белок FGF-1, снижалось и показатели почти приближались к контролю. На диаграмме,

показанной на рисунке 38, хорошо видно, что наиболее высокая экспрессия клетками цитокина FGF-1 выявляется на 21-е сутки опыта ($P < 0,001$).

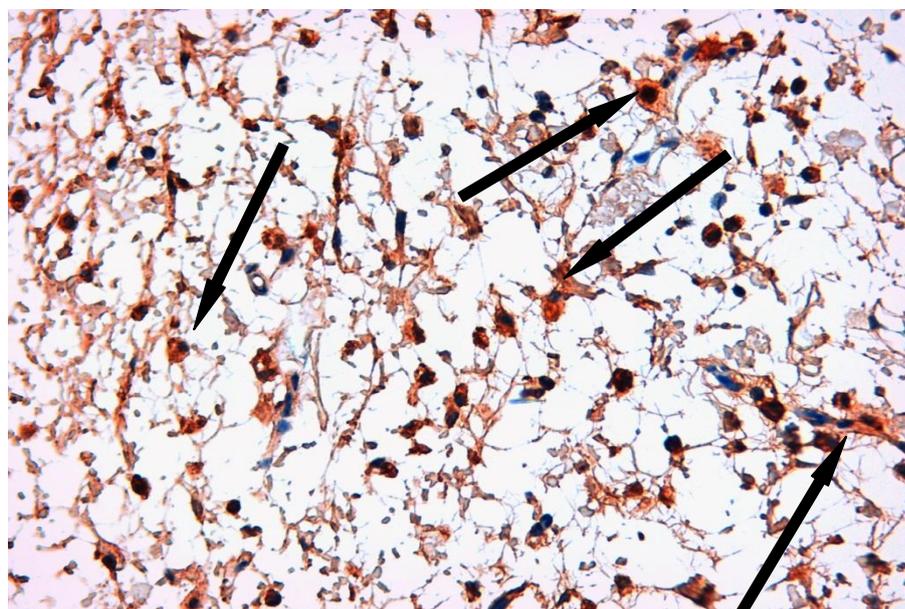


Рисунок 36 – Иммуногистохимическое выявление цитокина FGF-1 в цитоплазме клеток (коричневое окрашивание) в фасциальной прослойке кожи крыс на 21-е сутки после введения препарата ГК. Макрофаги, экспрессирующие FGF-1 (↑). Докраска гематоксилином. Увел.Х400

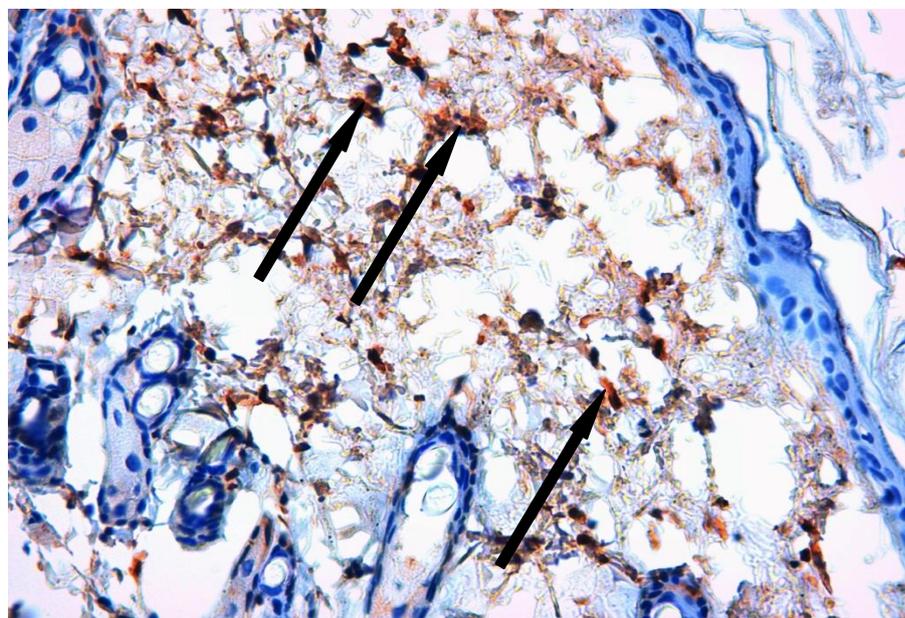


Рисунок 37 – Иммуногистохимическое выявление цитокина FGF-1 в цитоплазме клеток (коричневое окрашивание) в дерме под эпидермисом кожи крыс на 21-е сутки после введения препарата ГК. Макрофаги, экспрессирующие FGF-1 (↑). Докраска гематоксилином. Увел.Х400

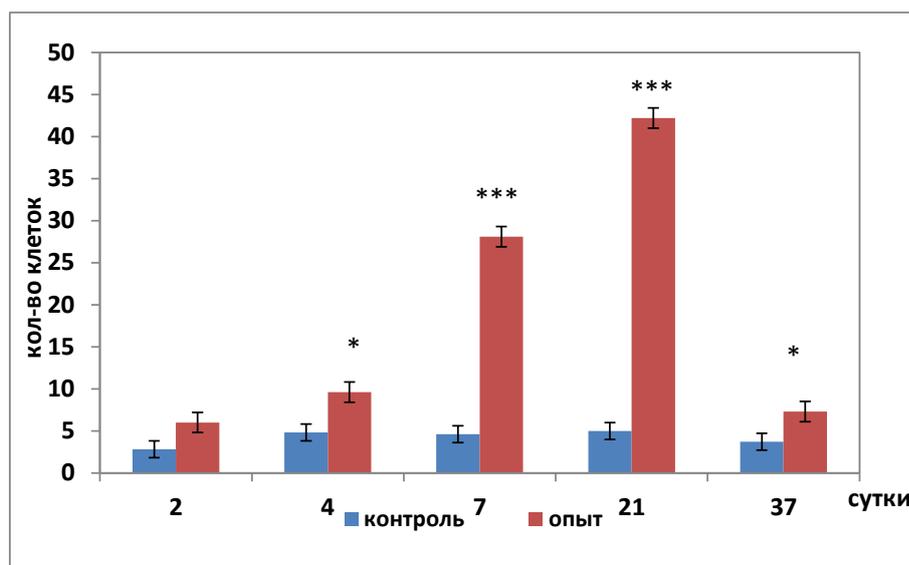


Рисунок 38 – Диаграмма среднего количества клеток, экспрессирующих цитокин FGF-1 в коже крыс после введения препарата ГК. *) $p < 0,05$, **) $p < 0,01$, ***) $p < 0,001$

Таким образом, результаты иммуногистохимических исследований с применением моноклональных антител на выявление цитокина Ki-67 показали, что внутридермальное введение крысам зрелого возраста высокомолекулярного гиалуронана усиливает пролиферацию клеток эпителия кожи, фибробластов, эндотелиальных клеток стенки кровеносных сосудов, эпителиальных клеток волосяных фолликул. При этом возрастает количество клеток, экспрессирующих цитокин FGF-1, также отражающее усиление пролиферации фибробластов и их функционирующую активность.

В целом, результаты проведенных нами гистологических и иммуногистохимических исследований показали, что препарат ГК обладает биосовместимостью и после внутридермального введения крысам не вызывает выраженных воспалительных процессов в коже, хотя в первые дни после введения выявляются явления отека и признаки дезорганизации ткани, которые на 7-е сутки практически не обнаруживаются. В течение 7 суток большая часть введенного гиалуронана фагоцитируется макрофагами и к 21-м суткам не обнаруживается в тканях опытных крыс. При этом нами отмечен факт воспалительной реакции кожи в виде диффузной инфильтрации

макрофагальными клетками и отсутствия большого количества лимфоцитов. В противовес этому, при выраженном воспалении в тканях обычно выявляются большие плотные скопления макрофагов и лимфоцитов [53, 83].

Именно макрофаги играют центральную роль, выполняя функцию очищения организма от естественно деградированных тканей или измененным под действием каких-либо фактором, а также защитную, трофическую, репаративную и другие [57, 70, 104, 261]. Они осуществляют контакт с компонентами экстрацеллюлярного матрикса (коллагены, гиалуронан, протеогликаны, гликопротеины) и клетками соединительной ткани с помощью рецепторов, относящихся к группе интегринов (GDI1a/CD18, GDI1b/CD18, CD49 и др.) [202]. Макрофаги синтезируют и выделяют факторы роста, химокины, цитокины (интерлейкины-IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF, TGF), для аутокринных воздействий и регуляции межклеточных взаимодействий при воспалении и регенерации соединительной и других тканей. При этом макрофаги воздействуют гидролитическими ферментами на компоненты внеклеточного матрикса соединительной ткани, поглощают продукты расщепления коллагена, ГАГ, протеогликанов. Внутридермально введенный препарат ГК посредством стимуляции макрофагов приводит к активации фибробластов и синтезу коллагеновых и других структур межклеточного матрикса А.Б. Шехтер и др. [104] обнаружили непосредственные клеточные контакты между макрофагами и фибробластами в кожных ранах, чаще встречающиеся в начале пролиферативной фазы воспаления.

Подтверждением активации макрофагов и фибробластов в наших экспериментах было повышение количества крупных фагоцитирующих макрофагов с каплями гликозаминогликанов в цитоплазме и повышенная экспрессия клетками в коже крыс опытной группы FGF-1, усиливающего пролиферацию фибробластов – главный источник синтеза и обновления компонентов внеклеточного матрикса (коллагена, гиалуронана, противогликанов) кожи [73].

Установлена также регенерация мелких сосудов в коже под эпидермисом и самих эпителиальных клеток. Результаты иммуногистохимических исследований с применением моноклональных антител на выявление цитокина Ki-67 показали, что внутридермальное введение крысам препарата ГК усиливает пролиферацию клеток эпителия кожи, эндотелиальных клеток стенки кровеносных сосудов, фибробластов, эпителиальных клеток волосяных фолликул, участвующих в регенерации эпителия. Ядерный белок Ki-67 является антигеном, ассоциированным с фазами клеточного цикла митоза [155, 259].

Результаты гистохимических исследований кожи крыс с использованием реакции Хейла показали, что в новообразованной тонковолокнистой соединительной ткани под эпидермисом в большом количестве определяются свободные гликозаминогликаны, что характерно для молодой незрелой ткани при ее регенерации [34]. Гликозаминогликаны и протеогликаны, кроме выполнения функции связывания коллагеновых фибрилл между собой, влияют на пролиферацию клеток и синтез фибробластами коллагена, ослабляют воспалительные реакции и участвуют в репаративных процессах [187, 214].

При этом, выявленные регенеративные процессы большинства составных элементов кожи приводят к обновлению клеток и внеклеточного матрикса дермальной пластинки и эпителиального слоя кожи. К 37-м суткам опыта структура кожи опытных крыс была характерна для нормы. В коже крыс контрольной группы после внутридермального введения физиологического раствора в первые дни после инъекции определялись явления слабо выраженной воспалительной реакции с развитием отека, но признаков интенсификации процессов регенерации тканей в отдаленные сроки наблюдения нами не было обнаружено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Возрастные изменения кожи - закономерный процесс, который зависит от особенностей генетического аппарата и его фенотипической реализации. При этом происходит снижение количества клеток, изменения их морфологической структуры, пролиферативной активности. Как результат уменьшается продукция структурных компонентов внеклеточного матрикса, активности ферментов, участвующих в биосинтетических процессах. Наиболее заметным изменениям подвергаются фибробласты дермы. Ко времени достижения человеком зрелого возраста их количество в дерме снижается почти вдвое по сравнению с первыми десятилетиями жизни [18]. Одновременно падает их миграционная активность и энергетический потенциал. К старости в коже происходит активация катаболизма, усиливается протеолитическая деградация коллагеновых белков кожи на фоне снижения продукции тканевых ингибиторов матриксных металлопротеаз: как результат обнаруживаются сдвиги в структуре основных компонентов внеклеточного матрикса дермы кожи – коллагеновых белков, протеогликанов, гликозамингликанов.

Параллельно происходят и качественные возрастные изменения, которые, прежде всего, затрагивают фибриллярные белки дермы - коллаген, эластин и фибриллин. Особенно характерны в этом отношении накопление в коллагенах дермы поперечных связей, возникающих при гликозилировании хаотично без ферментативной регуляции, но выражено влияющих на растворимость, растяжимость и подверженность коллагеновых белков протеолитическому расщеплению матриксными металлопротеиназами.

Существенные изменения претерпевают гиалурон и протеогликаны дермы. С одной стороны, вариации, возникающие в структуре, степени сульфатации, локализации сульфатных групп в протеогликанах вносят изменения во взаимодействии протеогликанов с другими структурными компонентами матрикса, с клетками, регуляторными молекулами, с другой, они

активно влияют на пролиферацию, адгезию, миграцию, интенсивность и метаболические функции клеток кожи.

Особое внимание в возрастных изменениях кожи привлекает гиалуроновая кислота. Она, благодаря своим физико-химическим свойствам, определяет высокий тургор, эластичность и тонус кожи, амортизацию к ударным нагрузкам, выполняя структурообразующую и биомеханические функции. Помимо этого, гиалуронан участвует в формировании сети коллагеновых молекул, адгезии, миграции, дифференцировке и апоптозе клеточных элементов дермы. Помимо этого, фрагменты гиалуронана с различной молекулярной массой обладают по данным литературы [100, 101, 157, 216, 250], разной, подчас противоположной, биологической активностью, влияя на размножение, миграцию фибробластов дермы, на процессы ангиогенеза, воспаление, регуляцию синтеза самой гиалуроновой кислоты и в целом на полноценную ремодуляцию внеклеточного матрикса [180]. Гиалуроновая кислота в коже характеризуется интенсивным обменом. С возрастом количество гиалуронана дермы, по данным некоторых авторов [166, 186, 198] снижено, а по данным других [188] перераспределяется, связываясь в большем объёме с белками группы гиаладгеринов, что приводит, наряду с изменениями коллагеновых белков, к формированию ряда клинических признаков старения кожи.

Уникальные физико-химические свойства гиалуронана, его роль в поддержании структуры, функции и метаболизма кожи, снижение его концентрации с возрастом, химическая идентичность у всех живых организмов, а, следовательно, и иммунологическая инертность совершенно оправдано привлекли внимание с целью его использования для коррекции возрастных изменений кожи.

При значительном количестве технологий и средств, которые позволяют специалистам эстетической медицины улучшить внешний вид пациентов, обратившихся с жалобами на морщины, складки, снижение тургора и другие эстетические недостатки кожи, применение препаратов гиалуронана нашли

наиболее широкое распространение. В 2001 г. появилась специальная методика внутридермального введения препаратов нативной гиалуроновой кислоты, получивших название биоревитализация. Итальянский исследователь А. Ди Пьетро определил биоревитализацию как «метод интрадермальных инъекций немодифицированного гиалуронана, позволяющий достигнуть восстановления физиологической среды и нормализации обменных процессов в дерме, в результате которых эстетический эффект пролонгируется и усиливается с течением времени за счет восстановления собственных свойств ткани» [37]. Биоревитализация преимущественно проводилась с целью профилактики инволюционных изменений, для ослабления воспалительных реакций кожи после некоторых физиотерапевтических процедур. В настоящее время потенциальный спектр показаний к применению препаратов гиалуроновой кислоты расширяется, появились препараты, модифицированные витаминами, аминокислотами, олигопептидами.

В России одобрена и разрешена к применению большая группа биоревитализантов на основе гиалурона. Продемонстрирован положительный эффект и накоплен определенный опыт их использования в коррекции возрастных изменений кожи. Вместе с тем успешность их применения обосновывается преимущественно констатацией видимых клинических результатов визуальных критериев [16]. Экспериментальные данные, характеризующие влияние гиалуроновой кислоты на метаболизм кожи, представлены ограниченно и недостаточны для характеристики процессов, лежащих в основе действия [62, 95, 105, 130, 182, 220]. Кроме того в литературе имеются сведения об отсутствии эффективности мезотерапии [120, 123, 153].

В этой связи были проведены настоящие исследования, целью которых стала характеристика изменений метаболизма кожи экспериментальных животных зрелого возраста в области внутридермального введения нативной высокомолекулярной гиалуроновой кислоты.

Исследования были проведены на белых беспородных крысах зрелого возраст (11-12 месяцев) [41, 109]. Прежде всего было установлено, что

троекратное введение внутридермально методом мезотерапии препарата нативной высокомолекулярной кислоты на 1, 3 и 6-е сутки не вызывает существенных изменений биохимического статуса организма экспериментальных животных. Об этом свидетельствовали результаты определения содержания в сыворотке крови общего белка, мочевины, креатинина, билирубина, триглицеридов, холестерина, активности АЛТ, АСТ и щелочной фосфатазы.

Гиалуронан является гетерополисахаридом, синтезируемым в конечном итоге из глюкозы, и образующем при катаболизме под действием гиалуронидаз последовательно фрагменты с более низкой молекулярной массой вплоть до тетра-и гексозахаридов, которые подвергаются атаке β - гиалуронидазы и β – (N-ацетил) глюкаминидазы с отщеплением глюкуроната и ацетилглюкозамина. В этой связи представлял интерес изучить, отражается ли внутридермальное введение гиалуронана на метаболизм углеводов кожи в зоне инъекции препарата. Для решения этой задачи на следующий день после внутридермального введения гиалуронана (2, 4 и 7-е сутки эксперимента), а также в более отдаленные сроки после завершения курса инъекции препарата (21-е и 37-е сутки эксперимента) были определены в коже опытной группы крыс содержание пирувата и лактата с расчетом их соотношения, активность лактатдегидрогеназы. Это позволило оценить интенсивность течения анаэробного гликолиза, являющегося в клетках кожи основным энергетическим путем окисления глюкозы. Определение гликогена и активности гексокиназы представлял интерес для характеристики соотношения интенсивности поглощения глюкозы и активности гликогенолиза, а изучение активности одного из ключевых ферментов гексозомонофосфатного пути окисления глюкозы – глюкозо -6 –фосфатдегидрогеназы – для представления о выраженности использования углеводов на процессы образования в цитоплазме клеток кожи восстановленных эквивалентов и пентозофосфатов, активно используемых в коже на биосинтетические цели. Определение суммарного содержания обеих гликозамингликанов и гиалуронана позволило судить о

количественных изменениях этих биополимеров в коже при введении экзогенной гиалуроновой кислоты.

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, глюкозо – 6 – фосфатдегидрогеназы и содержания гликогена на 2, 4 и 7-е сутки эксперимента.

Содержание ГАГ и гиалуронана в результате введения гиалуроновой кислоты вполне закономерно на эти сроки эксперимента были в коже значительно увеличены. В более отдаленные сроки после завершения курсовой мезотерапии в коже в зоне введения препарата гиалуронана коэффициент лактат/пируват снижался, активность гексокиназы и глюкозо – 6 – фосфатдегидрогеназы повышался, 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 при этом 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, получило сто подтверждение при гистологическом изучении кожи при окраске срезов по Хейла на гликозаминогликаны.

Превалирование в коже в первые дни после инъекций гиалуронана анаэробных процессов вероятно связано с развитием воспалительного ответа ткани кожи на травмирующее воздействие самого процесса внутридермального введения. Гистохимическое изучение ткани кожи после инъекции гиалуронана

показало в зонах введения препарата не только резкое увеличение гиалуроновой кислоты, но и наличие явлений воспаления с набуханием и разрыхлением коллагеновых волокон, развитием отёка, диффузным скоплением лимфоидных клеток (преимущественно макрофагов), которые ослабевали лишь на 7-е сутки после инъекции.

В развитии возрастных изменений кожи особую роль отводят изменениям окислительного баланса с превалированием перекисления липидов и окислительной модификации белков, связанных с инволюционным снижением в организме природных антиоксидантов и активности ферментивного звена антиокислительной защиты тканей. Сравнительное изучение уровня продуктов перекисного окисления липидов, карбонилирования белков и активность основных антиоксидантных ферментов в коже молодых (4-5 месяцев) и зрелых (11-12 месяцев) животных действительно выявили определенные различия. У животных более старшего возраста статистически значимо было выше содержание в ткани кожи вторичных (кетодиены и сопряженные триены) и конечных (шиффовы основания) продуктов ПОЛ, алифатических кетондинитрофенилгидразонов нейтрального и основного характера, относящиеся, по мнению ряда авторов, к поздним маркерам окислительной деструкции белков, а также более низкой активности глутатионпероксидазы и каталазы [25, 54, 91, 93].

Интрадермальное введение препарата гиалуроновой кислоты самкам крыс зрелого возраста показало, что у опытной группы животных в коже в области введения гиалуронана на 4-е и 7-е сутки эксперимента наблюдаются более низкое содержание первичных (диеновые конногиты) и вторичных (кетодиены и сопряженные триены) продуктов ПОЛ как в гентановой, так и изопропаноловой фазал липидного экстракта, чем в коже контрольной области, куда также методом мезотерапии внутридермального тоекратно на 1, 3 и 6-е сутки вводили стерильной физиологический раствор. 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 кетондинитрофенилдрозоны нейтрального и основного характера. Индукция процессов карбонилирования белков путем введения в реакционную среду пероксида водорода и ионов двухвалентного железа, также подтвердила возможность антиоксидантного действия гиалуронана.

Вместе с тем, изучение влияния введения гиалуроновой кислоты в кожу экспериментальных животных на активность антиоксидантных ферментов выявило статистически значимые различия между опытной и контрольной зонами лишь на 7-е сутки эксперимента и только относительно глутатионпероксидазы. Активность супероксиддисмутазы и каталазы при инъекциях гиалуронана в опытной зоне снижалось также менее выражено, чем в контрольной зоне, но статистически значимых различий не наблюдалось.

Связано ли обнаруженное влияние гиалуронана в коже с непосредственным антиоксидантным (антирадикальным) эффектом биополимера на процессы свободнорадикального окисления, или это влияние опосредовано другими метаболическими механизмами, по результатам наших экспериментов, остаются неясными. Возможно, это связано с противовоспалительными свойствами гиалуронана [101, 138]. На фоне тканевых повреждений высокомолекулярная гиалуроновая кислота подавляет синтез некоторых медиаторов воспаления [77, 177, 250, 275], селективно ингибирует циклооксигеназы 2 и продукцию макрофагами провоспалительных простагландинов [275], замедляет адгезию нейтрофилов к стенке сосудов [192] и снижает проницаемость сосудистой стенки [264].

Как показали гистохимические исследования, внутридермальное введение препарата гиалуроновой кислоты сопровождается активацией резорбции гиалуронана. При этом гиалуроновая кислота активно фагоцитировалась макрофагами, диффузные скопления которых обнаруживались в коже опытной группы животных на 2, 4 и 7-е сутки эксперимента. В физиологических условиях в деградации гиалуронана кожи активное участие принимают фибробласты, вырабатывающие гиалуронидазы различных типов, а также β -

глюкуронидазу и β -(N-ацетил) глюкаминидазу. Деградация гиалуроновой кислоты до низкомолекулярных компонентов, с участием фибробластов происходит как внутриклеточно, так внеклеточно [250]. Внеклеточная гиалуронидаза – 2, встроенная в мембрану, начинает действовать при связывании гиалуронана с специфическими рецепторами – CD 44 и RHAMM. Активная оксидантная деполимеризация гиалуронана происходит под действием активных форм кислорода, генерируемых макрофагами и другими лейкоцитарными клетками. Таким образом, с участием активированных макрофагов и других механизмов введенная внутридермально гиалуроновая кислота подвергается интенсивной деградацией при этом образуются её фрагменты с молекулярной массой, обладающие различной биологической активностью, включая активацию продукции фибробластами коллагена, протеогликанов и гиалуронана, а также синтез и высвобождение макрофагами провоспалитель цитокинов (ИЛ-1, ФНО- α), оксида азота и ростовые факторы (IGF, TGF- β и др.) [138].

Определение в коже зрелых крыс суммарного коллагена, нейтральносолеорастворимой его фракции и свободного гидроскипролина при внутридермальном введении нативной гиалуроновой кислоты показало, что через 3-5 недели после инъектирования обнаруживается увеличение как нейтральносолеорастворимого, так и суммарного коллагена. При этом повышение уровня нейтральносолеорастворимой фракции предшествует увеличению суммарной фракции коллагена. Биосинтез и созревание коллагена протекает в несколько фаз от образования пропреколлагена, его гликозилирования, поступления во внеклеточный матрикс с отцеплением N- и C- концевых доменов тропоколлагена, формирования в экстрацеллюлярной среде микрофибрилле, а затем участие протеогликанов и гиалуронана более сложных коллагеновых волокнистых структур – фибрилл, волокон и волокнистого органов и тканей [70, 83]. Нейтральносолеорастворимый коллаген представляет фракцию вновь образованных («молодых») волокнистых

структур, и повышение его уровня отражает активацию биосинтетических функций фибробластов.

Гистологические методы исследования кожи с окраской на выявление коллагеновых волокон (окраска по Маллори, импрегнация по Футу) подтвердили биохимические данные о новообразовании коллагеновых волокон в дерме кожи у крыс зрелого возраста на 21-е и 37-е сутки после внутридермального введения нативной гиалуроновой кислоты. Одновременно в эти же сроки исследования в коже подопытных животных определялось при окраске по Хейла высокое содержание гликозаминогликанов. Полученные данные при определении фракции коллагена, а также суммарных гликозаминогликанов и гиалуронана биохимическими и гистохимическими методами свидетельствовали об активации анаболических процессов в коже опытной группы животных с образованием важнейших биополимеров межклеточного матрикса в более поздние сроки после завершения курса мезотерапии гиалуроновой кислоты.

Регуляция функционирования зрелых фибробластов, интенсивности их пролиферации осуществляется как системными, так и локальными факторами [70]. Материальным субстратом локальных («короткодистантных») регуляторов является особая группа сигнальных молекул, представленных группой пептидов и белков, условно подразделяемых на четыре группы: ростовые факторы, цитокины, нейропептиды и морфогены. Основным эффектом ростовых факторов является стимуляция пролиферации и дифференциации клеток, хотя действие большинства из них носит плеiotропный характер. Плеiotропный характер действия присущ и для цитокинов, функциональное и структурное сходство которых близко к ростовым факторам, что большинство авторов использует термин «цитокины», объединяя их в одну группу сигнальных молекул белковой природы, хотя формальной особенностью структуры молекул цитокинов (интерлейкины, химокины), в отличие от ростовых факторов, считается присутствие в аминотерминальном конце четырех расположенных близко друг к другу

остатков цистеина [160]. Роль цитокинов особенно велика в воспалительных реакциях, в нормальных и патологических иммунных процессах. Ростовые факторы и цитокины могут также попадать в кровь и, благодаря этому, границы между функциями «короткодистантных» сигнальных молекул и гормонов системных несколько размываются.

Определение содержания в сыворотке крови крыс зрелого возраста при курсовом внутридермальном введении нативной высокомолекулярной гиалуроновой кислоты IGF-1, TGF- β 1, IL-1 β и TNF- α выявило значительные различия в динамике изменений их содержания в первые дни и в отдаленные сроки после проведения курса инъекций. В первые дни непосредственно после процедуры инъекций гиалуронана уровень провоспалительных цитокинов – IL-1 β и TNF- α в сыворотке увеличивалось, отражая воспалительную реакцию на введение препарата с нарушением целостности ткани. Гистологическое изучение кожи крыс в зоне инъекций также подтвердило воспалительный ответ, хотя и относительно слабо выраженный. На 21-е и 37-е сутки эксперимента содержание IL-1 β и TNF- α было в пределах контрольных значений, что по времени соответствовало исчезновению признаков воспаления, определяемых гистологически.

Содержание инсулиноподобного ростового фактора – 1, наоборот, увеличивалось в отдаленные сроки после завершения курсового введения гиалуронана, а в начальные дни эксперимента не отличалось от контроля. Увеличение уровня в сыворотке крови опытной группы крыс IGF-1 по времени совпадало с наблюдаемыми при гистологическом изучении ткани кожи повышением в коже под слоем эпидермиса количества фибробластических клеток, интенсивной экспрессии в ядрах фибробластов в сосочковом слое дермы, ядрах эндотелиальных клеток кровеносных сосудов и клеток волосяных фолликул антигена Ki-67, а в цитоплазме - фактора роста фибробластов-1 (FGF-1), являющимися маркерами пролиферации.

Уровень трансформирующего ростового фактора бета-1 был повышен в сыворотке крови на все сроки исследования. TGF- β 1 продуцируется многими

типами клеток, включая активированные макрофаги, фибробласты и др. [230]. Он обладает не только свойством стимуляции пролиферации и роста клеток [256], но и индуцирует макрофаги фенотипа М-2, которые характеризуются продукцией ростовых факторов и ингибиторов воспаления [191].

Несомненно, данным свойством TGF- β объясняется ранее установленные его противовоспалительные эффекты [230]. В первые дни эксперимента при проведении курса внутридермальной инъекции гиалуронана методом мезотерапии повышение содержания этого фактора, по всей вероятности, связано с воспалительным ответом ткани кожи на процедуру введения гиалуронана с реакцией макрофагов, активно фагоцитирующих введенную гиалуроновою кислоту. В отдаленные сроки наблюдения (21, 37-е сутки) повышение уровня TGF- β 1 возможно связано с интенсификацией процессов пролиферации и активации фибробластических клеток и гистиоцитов, обнаруживаемое при гистологическом, гистохимическом и иммуногистохимическом методах изучения состояния кожи опытной группы животных в зонах введения гиалуроновою кислоты.

Таким образом, интрадермальное введение препарата нативной высокомолекулярной гиалуроновою кислоты методом мезотерапии в первые дни после инъекций вызывает в коже в зонах инъекции развитие невыраженной воспалительной реакции с развитием отека в результате пропитывания основного вещества ткани (гиподермы и дермы), с разрыхлением волокнистых структур, увеличением межпучковых пространств и макрофагальной инфильтрации, участвующих в фагоцитозе и лизисе введенного препарата. Такая реакция кожи на введение значительных количеств экзогенной гиалуроновою кислоты, во-первых, свидетельствуют о том, что препарат гиалуронана обладает биосовместимостью; во-вторых, изменяет согласно данным литературы [16, 37, 52, 95, 100, 105, 120, 153, 157, 168, 174, 186] физико-химические свойства внеклеточного матрикса на данном участке кожи, восполняя дефицит эндогенного гиалуронана, повышая тургор, эластичность кожи, объем дермы, изменяя в конечном итоге, внешние клинические

проявления возрастных изменений кожи. Одновременно в коже происходят и метаболические сдвиги, наблюдается усиление анаэробного окисления углеводов с интенсификацией использования гликогена, активация процессов свободнорадикального окисления и экспрессия провоспалительных цитокинов. Главными действующими факторами в развитии этих процессов становятся макрофаги.

Важнейшими компонентами последующей реакции кожи на введение гиалуроновой кислоты являются ростовые факторы, основными источниками которых помимо макрофагов, по всей вероятности, становятся и фибробластические клетки кожи. Хотя в экспериментах на клеточных культурах фибробластов показано, что и провоспалительные цитокины – TNF- α , TL-1 β , интерферон-гамма способны индуцировать МРНК гиалуронансинтазы [263]. В более отдаленные сроки наблюдения в коже в зонах введения гиалуроновой кислоты усиливаются процессы пролиферации с увеличением количества клеток фибробластического дифферона, что подтверждается не только визуально при окраске гистологических препаратов гематоксилином и эозином, но гистоиммунохимическими методами изучения клеток, экспрессирующих маркеры пролиферации – Ki-67, FGF-1. Эти результаты не противоречат данным литературы о том, что фибробласты, культивированные на поверхностях, покрытых высокомолекулярной гиалуроновой кислоты, продуцируют большее количество фактора роста фибробластов – 2 и фактора роста кератиноцитов [220]. В коже одновременно происходят метаболические изменения – усиливается аэробное окисление как по гексозодифосфатному, так и гексозомонофосфатному путям окисления глюкозы с интенсификацией энергообеспечения, образования пентозофосфатов и восстановленных эквивалентов, необходимых для пролиферативных и биосинтетических процессов, синтеза коллагена, протеогликанов и гиалуроновой кислоты, увеличение уровня которых выявляется при исследовании как биохимическими, так и гистохимическими методами.

Следовательно, интрадермальное введение гиалуроновой кислоты приводит к активации метаболических процессов в коже, опосредованной стимуляции синтеза основных компонентов внеклеточного матрикса дермы, усилению пролиферации и дифференцировки в коже фибробластических клеток и ангиогенеза.

ВЫВОДЫ

1. В коже в области курсового внутридермального введения препарата высокомолекулярной гиалуроновой кислоты 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 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 переокисления липидов и окислительной модификации белков. Высокомолекулярный нативный гиалуронан при этом препятствует снижению активности антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы и каталазы, накоплению продуктов свободнорадикального окисления липидов и белков кожи.

3. В коже белых крыс зрелого возраста определяется более низкое содержание суммарного и, особенно, нейтральносолеорастворимого коллагена, чем у животных молодой возрастной группы. Внутридермальное введение препарата 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 гиалуроновой кислоты 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 β и TNF- α снижается, уровень TGF- β 1 сохраняется, а уровень инсулиноподобного ростового фактора-1 увеличивается

5. После внутридермального введения нативной гиалуроновой кислоты наблюдается пропитывание тканей гиалуронатом и признаки аспетического воспалительного ответа – явления отёка и дезорганизации, невыраженная диффузная инфильтрация макрофагами, активно резорбирующими гиалуронат. В более отдаленные сроки наблюдения в коже усиливается процессы пролиферации, возрастает количество клеток, экспрессирующих белок Ki-67 и фактор роста фибробластов – 1, и функциональная активность фибробластов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АДА – антиоксидантная активность
- АДНФГ – альдегиддинитрофенилгидразоны
- АЛТ – аланиновая аминотрансфераза
- АСТ – аспарагиновая аминотрансфераза
- АТФ – аденозинтрифосфорная кислота
- Г-6-фДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
- ГАГ – гликозаминогликаны
- ГК – гиалуроновая кислоты
- ГПО – глутатионпероксидаза
- ГУ – гиалуронана
- ДК – диеновые конъюгаты
- ИЛ – интерлейкины
- КД – кетодиены
- КДНФГ – кетондинитрофенилгидразоны
- ЛДГ – лактатдегидрогеназа
- ММП – матриксная металлопротеиназа
- НАД⁺ – никотинамидадениндинуклеотид
- НАДН – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный
- НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат
- НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный
- НСРК – нейтральносолеорастворимый коллаген
- ПОЛ – перекисное окисление липидов
- СГПР – свободный гидроксипролин
- СК – суммарный коллаген
- СОД – супероксиддисмутаза
- СРО – свободнорадикальное окисление
- СТ – сопряженные триены
- ТИМП – тканевой ингибитор металлопротеиназы
- ТХУ – трихлоруксусная кислота

ФНО – фактор некроза опухоли

ЩФ – щелочная фосфатаза

AGE (advanced glycation endproducts) – конечные продукты завершённого неэнзиматического гликозилирования

BRAL – один из рецепторов гиалуронана

CD (cluster или center of differentiation) – кластеры или центры дифференциации, антигены поверхности клеточной мембраны

FGF (fibroblast growth factor) – ростовой фактор фибробластов

GAIS – стандартная международная шкала возрастных изменений кожи

GSH – глутатион восстановленный

GSSG – глутатион окисленный

HAS – гиалуронансинтеза

IGF (insulinlike growth factor) – инсулиноподобный ростовой фактор

IL – интерлейкин

Ki-67 – ядерный антиген – маркер пролиферации

NADP – никотинамидаденидинуклеотидфосфат

Ras – семейство протеинкиназ, действующих в составе интрацеллюлярных путей передачи сигналов

RHAMM – рецептор гиалуроновой кислоты

SMAD – белки одного из интрацеллюлярных путей передачи сигналов

Sox2 – фактор транскрипции

SPACRAN – рецептор гиалуроновой кислоты

TGFBR – рецептор TGF- β

TGF- β – суперсемейство трансформирующих ростовых факторов

TNF – семейство факторов некроза опухолей

TNFR – рецептор факторов некроза опухолей

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексахина, Н.В. Солюбилизация, очистка и некоторые свойства гексокиназы митохондрий скелетных мышц [Текст] / Н.В. Алексахина, Н.Ю. Ситнина, Л.Н. Щербатых // Биохимия. - 1973. - Т. 38, № 5. - С. 915-921.
2. Арутюнян, А.В. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: метод. рекомендации [Текст] / А.В. Арутюнян, Е.Е. Дубинина, Н.Н. Зыбина, под ред. В.Х. Хавинсона. - СПб.: ИКФ "Фолиант", 2000. - 103 с.
3. Арчаков, А.И. Окислительная модификация цитохрома P450 и других макромолекул в процессе их обновления [Текст] / А.И. Арчаков, В.Г. Згода, И.И. Карузина // Вопр. мед. химии. – 1998. - Т. 44, вып. 1. - С. 3-27.
4. Асатиани, В.С. Ферментные методы анализа [Текст] / В.С. Асатиани; АН ГССР. - М.: Наука, 1969. - 740 с.
5. Ахтямов, С.Н. Практическая дерматокосметология : учеб. пособие для слушателей системы последиплом. образования [Текст] / С.Н. Ахтямов, Ю.С. Бутов. - М.: Медицина, 2003. - 396 с.
6. Бадюкин, В.В. Препараты гиалуроновой кислоты в терапии остеоартроза: фокус на хондрорепарант гиалрипайер [Текст] / В.В. Бадюкин, Н.П. Михайлова // Журнал международной медицины. - 2016. - № 4 (21). - С. 16-24.
7. Байбурина, Г.А. Роль путей клеточной сигнализации в развитии последствий окислительного стресса [Текст] / Г.А. Байбурина // Медицинский вестник Башкортостана. - 2016. - Т. 11, № 2 (62). - С. 82-91.
8. Башкатов, С.А. Гликозаминогликаны в биохимических механизмах адаптации организма [Текст] / С.А. Башкатов. - Уфа: изд-во БашГУ, 1996. - 144 с.

9. Беленький, А.Г. Препараты гиалуроновой кислоты в лечении остеоартроза [Текст] / А.Г. Беленький. - М., 2005. - 263 с.
10. Биоактивные композиции на основе модифицированной гиалуроновой кислоты [Текст] / В.Н. Хабаров [и др.] // Вестник эстетической медицины. - 2009. - Т. 8, № 1. - С. 49-54.
11. Биохимические методы анализа показателей обмена биополимеров соединительной ткани [Текст] / П.Н. Шараев [и др.]. - Ижевск, 1990. - 22 с.
12. Болдырев, А.А. Окислительный стресс и старение организма [Текст] / А.А. Болдырев, В.А. Мальцева // Косметика и медицина. - 2002. - №4. - С. 15-25.
13. Бурлуцкая, О.И. Комплексная косметическая композиция "Гиалуроновая кислота+матричные пептиды" [Текст] / О.И. Бурлуцкая, Р.Р. Рахматуллин // Экспериментальная и клиническая дерматокосметология. - 2011. - № 4. - С. 41-43.
14. Бычков, С.М. Биологическая роль гиалуроновой кислоты [Текст] / С.М. Бычков, С.А. Кузьмина // Вопросы медицинской химии. - 1986. – Вып. 1. - С. 19-32.
15. Вартамян, Л.С. Образование супероксидных радикалов в мембранах субклеточных органелл регенерирующей печени [Текст] / Л.С. Вартамян // Биохимия. - 1992. - Т. 57, № 5. - С. 671-678.
16. Влияние внутридермальных наполнителей на структурные и функциональные параметры инволюционно измененной кожи [Текст] / Е.В. Иванова [и др.] // Экспериментальная и клиническая дерматокосметология. – 2009. - № 4. – С. 9-15.

17. Воейков, В.Л. Био-физико-химические аспекты старения и долголетия [Текст] / В.Л. Воейков // Успехи геронтологии. - 2002. - Вып. 9. - С. 261-266.
18. Возрастные изменения численности и пролиферации фибробластов в коже человека [Текст] / А.Г. Гунин [и др.] // Успехи геронтологии. – 2011. – Т. 24, № 1. – С. 43-47.
19. Волкова, О.В. Основы гистологии с гистологической техникой [Текст] / О.В. Волкова, Ю.К. Елецкий. – М.: Медицина, 1982. – 304 с.
20. Воспаление: руководство для врачей [Текст] / В.В. Серов [и др.]; под ред. В.В. Серова, В.С. Паукова. - М.: Медицина, 1995. - 640 с.
21. Высвобождение фактора некроза опухолей-альфа *in vitro* мононуклеарами периферической крови человека, вызванное цитостатиком этопозидом [Текст] / М.П. Потапнев [и др.] // Иммунология. - 2016. - Т. 37, № 5. - С. 253-255.
22. Высокий уровень гликозаминогликанов сыворотки крови как независимый предиктор развития спаечной болезни брюшины [Текст] / И.Ф. Суфияров [и др.] // Креативная хирургия и онкология. – 2017. – Т. 7, № 2. – С. 48-53.
23. Гиалуроновая кислота в лечении и профилактике послеоперационных осложнений эндоскопических операций по поводу доброкачественной гиперплазии предстательной железы [Текст] / Д.А. Сорокин [и др.] // Современные технологии в медицине. – 2015. – Т. 7, № 4. – С. 97-104.
24. Действие хронического введения низких доз интерлейкина-1 β на исследовательское поведение и пространственную память крыс [Текст] / С.В. Калеменин [и др.] // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. - 2015. - Т. 101, № 5. - С. 550-558.

25. Дубинина, Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение): физиологические и клинико-биохимические аспекты [Текст] / Е.Е. Дубинина. – СПб., 2006. – 400 с.
26. Евдокимова, Н.Ю. Гиалуроновая кислота, рецептор CD44 и их роль в осложнениях сахарного диабета [Текст] / Н.Ю. Евдокимова // Украинский биохимический журнал. - 2008. – Т. 80, № 5. – С. 5-14.
27. Ермакова, Е.Ю. Влияние ультразвукового излучения и эндотоксемии на кожу [Текст] / Е.Ю. Ермакова, М.А. Соколова, В.Н. Мещанинов // Геронтология и гериатрия. – М., 2005. – С. 132-134.
28. Ермакова, Е.Ю. Перекисное окисление липидов и барьерная функция кожи в условиях старения организма [Текст]: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.00.04 / Ермакова Екатерина Юрьевна. - Челябинск, 2005. – 22 с.
29. Захарова, В.В. Роль митохондрий в нарушении барьерной функции эндотелия, вызванном фактором некроза опухоли [Текст]: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.03.04 / Захарова Влада Вячеславовна. - М., 2016. - 20 с.
30. Зенков, Н.К. Окислительный стресс. Биохимические и патофизиологические аспекты [Текст] / Н.К. Зенков, В.З. Лапкин, Е.Б. Меньшикова. - М.: Наука /Интерпериодика, 2001. - 343 с.
31. Зенков, Н.К. Окислительный стресс. Диагностика, терапия, профилактика [Текст] / Н.К. Зенков, Е.Б. Меньшикова, С.М. Шергин. - Новосибирск, 1993. - 181 с.
32. Зимницкий, А.Н. Гликозаминогликаны в биохимических механизмах адаптации организма к некоторым физиологическим и патологическим состояниям [Текст] / А.Н. Зимницкий, С.А. Башкатов. – М., 2004. – 208 с.

33. Игнатъева, И. Коллаген – основной белок соединительной ткани [Текст] / И. Игнатъева // Эстетическая медицина. – 2005.- № 3. – С. 247-256.
34. Идентификация гликозаминогликанов в соединительной ткани при имплантации различных биоматериалов [Текст] / Л.А. Мусина [и др.] // Морфологические ведомости. – 2006. - № 1-2 (Прил. 1). – С. 194-196.
35. Изменение показателей ПОЛ/АОЛ при действии на кожу ультразвукового облучения и экспериментальной эндотоксинемии [Текст] / М.А. Соколова [и др.] // Вестник УГМА. – 2002. – Вып. 12. – С. 20-23.
36. Иммуногистохимические методы [Текст]: руководство пер. с англ. / под ред. Г.А. Франка, П.Г. Малькова. – М., 2011. – 224 с.
37. Камелина, Л.И. Нативная гиалуроновая кислота: метод биоревитализации [Текст] / Л.И. Камелина, О.В. Забненкова // Экспериментальная и клиническая дерматокосметология. - 2010. - № 4. - С. 35-40.
38. Капулер, О.М. Теоретические аспекты и клинические принципы коллагенотерапии в косметологии [Текст] / О.М. Капулер // Инъекционные методы в косметологии. – 2013. - № 1. – С. 100-109.
39. Караулов, А.В. Иммунология, микробиология и иммунопатология кожи [Текст] / А.В. Караулов, С.А. Быков, А.С. Быков. – М., 2012. – 328 с.
40. Касаткина, Т.Б. Этика экспериментальных исследований на животных в космической биологии и медицине [Текст] / Т.Б. Касаткина, А.С. Капланский // Авиакосмическая и экологическая медицина. - 2000. - Т. 34, № 2. - С. 17-21.
41. Кигель Т.Б. Отдельные показатели биологической нормы лабораторных крыс: методич. руководство [Текст] / Т.Б. Кигель. - М., 1982. – 165 с.

42. Кишкун А.А. Биологический возраст и старение: возможности определения и пути коррекции: руководство для врачей [Текст] / А.А. Кишкун. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. - 973 с.
43. Колесниченко, Л.С. Глутатионтрансферазы [Текст] / Л.С. Колесниченко, В.И. Кулинский // Успехи современной биологии. - 1989. - Т. 107, вып. 2. - С. 179-194.
44. Кольтовер, В.К. Свободнорадикальная теория старения: исторический очерк [Текст] / В.К. Кольтовер // Успехи геронтологии. - 2000. - № 4. - С. 273-278.
45. Кононский, А.И. Гистохимия [Текст]: учеб. пособие для студентов биол. специальностей вузов / А.И. Кононский. - Киев: Вища школа, 1976. - 278 с.
46. Королюк, М. Метод определения активности каталазы [Текст] / М. Королюк, Д. Иванова, И. Майорова // Лабораторное дело. - 1988. - № 1. - С. 16-19.
47. Кошевенко, Ю.Н. Кожа человека: в 2 т. [Текст] / Ю.Н. Кошевенко. - М.: Медицина, 2006. - Т. 1. Структура, физиология и предназначение функциональных элементов кожного органа человека. - 300 с.
48. Кубанова, А.А. Старение кожи и возможности коррекции препаратом коллагена [Текст] / А.А. Кубанова, В.А. Смольяникова, Н.Г. Служаева // Вестник дерматологии и венерологии. - 2007. - № 5. - С. 70-73.
49. Кулинский, В.И. Биологическая роль глутатиона [Текст] / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко // Успехи современной биологии. - 1990. - Т. 110, вып. 1. - С. 157-179.

50. Кулинский, В.И. Структура, свойства, биологическая роль и регуляция глутатионпероксидазы [Текст] / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко // Успехи современной биологии. - 1993. - Т. 113, вып. 1. - С. 107-122.
51. Лабораторные животные: Разведение, содержание, использование в эксперименте [Текст]: учеб. пособие для студентов биол. спец. вузов / И.П. Западнюк [и др.]. - 3-е изд., перераб. и доп. - Киев: Вища шк., 1983. - 383 с.
52. Лапатина, Н.Г. Современные тенденции биоревитализации [Текст] / Н.Г. Лапатина // Вестник эстетической медицины. - 2008. - № 1. - С. 34-37.
53. Лебедева, А.И. Экспериментальное моделирование процесса хронического воспаления и фиброза [Текст] / А.И. Лебедева, С.А. Муслимов, Л.А. Мусина // Биомедицина. - 2013. - Т. 1, № 4. - С. 114-123.
54. Лушак, В.И. Свободнорадикальное окисление белков и его связь с функциональным состоянием организма (обзор) [Текст] / В.И. Лушак // Биохимия. - 2007. - Т. 72, № 8. - С. 995-1017.
55. Мазуров, В.И. Биохимия коллагеновых белков [Текст] / В.И. Мазуров. - М.: Медицина, 1974. - 275 с.
56. Марголина, А. Новая косметология [Текст] / А. Марголина, Е. Эрнандес. - М.: Кавель, 2005. - 424 с.
57. Маянский, Д.Н. Роль макрофагов в репаративных процессах [Текст] / Д.Н. Маянский // Механизмы патологических реакций. - Томск, 1981. - С. 56-62.
58. Медицинские лабораторные технологии и диагностика: справочник [Текст] / под ред. А.И. Карпищенко. - СПб.: Интермедика, 1999. - Т.2. - С. 24-26.
59. Меерсон, Ф.З. Противоположное влияние адаптации к непрерывной и периодической гипоксии на антиоксидантные ферменты [Текст] / Ф.З.

Меерсон, Ю.В. Архипенко, И.И. Рожицкая // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 1992. - № 7. - С. 14-15.

60. Михайлова, Н.П. Влияние интрадермального введения модифицированной гиалуроновой кислоты на морфофункциональное состояние кожи у пациенток с инволюционными изменениями [Текст] / Н.П. Михайлова // Вестник дерматологии и венерологии. - 2013. - № 5. - С. 152-159.

61. Михайлова, Н.П. Клинико-экспериментальное изучение морфофункционального состояния кожи с инволюционными изменениями при введении модифицированной гиалуроновой кислоты [Текст] / Н.П. Михайлова // Клиническая дерматология и венерология. - 2014. - Т. 12, № 2. - С. 14-21.

62. Михайлова, Н.П. Клинико-экспериментальное исследование влияния интрадермального введения модифицированной гиалуроновой кислоты на морфофункциональное состояние кожи с инволюционными изменениями [Текст]: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 19.11.2014 / Михайлова Наталья Павловна. - М., 2015. – 25 с.

63. Михайлова, Н.П. Клинико-экспериментальное исследование интрадермального введения модифицированной гиалуроновой кислоты [Текст] / Н.П. Михайлова // Инъекционные методы в косметологии. – 2014. - № 1. – С. 27-39.

64. Михайлова, Н.П. Морфологическое исследование результатов подкожного введения гелей гиалуроновой кислоты [Текст] / Н.П. Михайлова, А.Б. Шехтер, Т.Г. Руденко // Мезотерапия. – 2013. - № 24/04. – С. 6-16.

65. Ноздрин, В.И. Гистофизиология кожи [Текст]: учебное пособие для студентов медицинских вузов и сузов / В.И. Ноздрин, С.А. Барашкова, В.В. Семченко. - Омск, 2008. – 279 с.

66. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека. Метод её определения [Текст] / Е.Е. Дубинина [и др.] // Вопросы мед. химии. – 1995. – Т. 41, вып. 1. – С. 24-26.
67. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования [Текст] / Л.Е. Муравлева [и др.] // Фундаментальные исследования. - 2010. - № 1. - С. 74-78.
68. Окислительный стресс. Патологические состояния [Текст] / Е.Б. Меньшикова [и др.]. - Новосибирск: АРГА, 2008. - 284 с.
69. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты [Текст] / Е.Б. Меньшикова [и др.]. - М.: Фирма «Слово», 2006. - 556 с.
70. Омеляненко, Н.П. Соединительная ткань: (гистофизиология и биохимия): в 2-х т. [Текст] / Н.П. Омеляненко, Л.И. Слуцкий; под ред. акад. РАН и РАМН С.П. Миронова. - М.: Известия, 2009. - Т. 1. - 380 с.
71. Онищенко, К. Внеклеточный матрикс [Текст] / К. Онищенко // Эстетическая медицина. – 2008. – Т. 7, № 4. – С. 449-456.
72. Отдельные показатели биологической нормы лабораторных животных (крыс): метод. руководство [Текст] / Т.Б. Кигель [и др.]. - М., 1982. – 165 с.
73. Пальцев, М.А. Межклеточные взаимодействия [Текст] / М.А. Пальцев, А.А. Иванов. – М.: Медицина, 1995. – 224 с.
74. Поберёзкина, Н.Б. Биологическая роль супероксиддисмутазы [Текст] / Н.Б. Поберёзкина, Л.Ф. Лосинская // Украинский биохимический журнал. - 1989. - Т. 61, № 2. - С. 1427.
75. Потапнев, М.П. Аутофагия, апоптоз, некроз клеток и иммунное распознавание своего и чужого [Текст] / М.П. Потапнев // Иммунология. - 2014. - Т. 35, № 2. - С. 95-102.

76. Прогнозирование результатов эстетических вмешательств по механизмам старения кожи и соотношению коллагена I/III типов [Текст] / Г.О. Смирнова [и др.] // Фундаментальные исследования. - 2012. - № 7-1. - С. 190-194.

77. Противовоспалительная активность гиалуроновой кислоты [Текст] / М.Т. Азнабаев [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2003. - Т. 66, № 6. - С. 246-253.

78. Прошина А.Я. Исследование фракционного состава коллагена в ткани печени [Текст] / Л.Я. Прошина, М.Н. Приваленко // Вопр. мед. химии. – 1982. – Вып. 1. – С. 115-119.

79. Рагино, Ю.И. Простой способ оценки концентрации витаминов Е и А в липопротеинах низкой плотности [Текст] / Ю.И. Рагино, Е.В. Каштанова // Клиническая лабораторная диагностика. - 2002. - № 12. - С. 11-13.

80. Родионов, А.Н. Поражения кожи. Диагностика. Лечение. Профилактика [Текст] / А.Н. Родионов. – СПб.: Наука и техника, 2012. – 912 с.

81. Саркисов, Д.С. Общая патология человека [Текст] / Д.С. Саркисов, М.А. Пальцев, Н.К. Хитров. - 2-е изд., перераб. и доп. - М.: Медицина, 1997. - 608 с.

82. Свободнорадикальные процессы и воспаление (патогенетические, клинические и терапевтические аспекты) [Текст] / Т.В. Сологуб [и др.]. – М., 2008. – 246 с.

83. Серов, В.В. Соединительная ткань: (Функциональная морфология и общая патология) [Текст] / В.В. Серов, А.Б. Шехтер. - М.: Медицина, 1981. - 312 с.

84. Симбирцев, А.С. Цитокины: классификация и биологические функции [Текст] / А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. - 2004. - Т. 3, № 2. - С. 16-23.
85. Слуцкий, Л.И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани [Текст] / Л.И. Слуцкий. - Л.: Медицина. Ленингр. отделение, 1969. - 375 с.
86. Смирнова, И.О. Функциональная морфология старения кожи [Текст] / И.О. Смирнова // Успехи геронтологии. - 2004. - Вып. 13. - С. 44-51.
87. Спектрофотометрическое определение конечных продуктов перекисного окисления липидов [Текст] / Е.И. Львовская [и др.] // Вопросы медицинской химии. - 1991. - Т. 37, вып. 4. - С. 92-94.
88. Сравнительный анализ содержания продуктов ПОЛ в структурах мозга крыс Вистар и OXYS разного возраста [Текст] / Н.Г. Колосова [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2003. - Т. 135, № 6. - С. 696-699.
89. Строителев, В. Гиалуроновая кислота в медицинских и косметических препаратах [Текст] / В. Строителев, И. Федорищев // Косметика и медицина. - 2000. - № 3. - С. 21-30.
90. Титов, С.А. Современные представления о механизмах старения [Текст] / С.А. Титов, В.Н. Крутько // Физиология человека. - 1996. - Т. 22, № 2. - С. 118-123.
91. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях [Текст] / Ю.И. Губский [и др.] // Сучасні проблеми токсикології. - 2005. - Т. 8, № 3. - С. 20-27.

92. Фарвик, М. Низкомолекулярная гиалуроновая кислота: влияние на генетический аппарат кератиноцитов и старение кожи [Текст] / М. Фарвик, П. Лерг, Г. Штрутц // Косметика и медицина. – 2009. - № 1. – С. 36-39.
93. Фомина, М.А. Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях: метод. рекомендации разработаны в соответствии с планом работ по внутривузовскому гранту (договор № 111 от 05.03.2014) [Текст] / М.А. Фомина, Ю.В. Абаленихина. - Рязань, 2014. – 60 с.
94. Хабаров, В.Н. Биопрепараты - новый класс инъекционных препаратов [Текст] / В.Н. Хабаров, Н.П. Михайлова, М.А. Селянин // Вестник эстетической медицины. – 2010. - Т. 9, № 2. – С. 3-12.
95. Хабаров, В.Н. Гиалуроновая кислота [Текст] / В.Н. Хабаров, П.Я. Бойков, М.А. Селянин. – М.: Практическая медицина, 2012. - 224 с.
96. Хабаров, В.Н. Инновационные технологии в инъекционной косметологии с точки зрения биоорганической химии: линия «гиалрипайер» [Текст] / В.Н. Хабаров, М.А. Селянин, Н.П. Михайлова // Вестник эстетической медицины. - 2010. - Т. 9, № 2. - С. 69-76.
97. Хабаров, В.Н. Перспективы создания новых препаратов для биоревитализации [Текст] / В.Н. Хабаров, М.А. Селянин, А.Н. Зеленецкий // Вестник эстетической медицины. – 2008. - Т. 7, № 4. – С. 40—46.
98. Цепилов, Р.Н. Гиалуроновая кислота – «старая» молекула с «новыми» функциями: биосинтез и деполимеризация гиалуроновой кислоты у бактерий и в тканях позвоночных, в том числе в процессах канцерогенеза (обзор) [Текст] / Р.Н. Цепилов, А.В. Белодед // Биохимия. – 2005. – Т.80, №9. – С. 1315-1333.
99. Цитокиновая регуляция биотрансформации ксенобиотиков и эндогенных соединений [Текст] / С.В. Сибиряк [и др.]; Рос. акад. наук, Урал.

отд-ние, Ин-т иммунологии и физиологии. - Екатеринбург: УрО РАН, 2006. - 160 с.

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

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

102. Швайчак, Э. Зависимость вязкости водного раствора гиалуроновой кислоты от внешних полей. Часть II [Текст] / Э. Швайчак // Российский журнал биомеханики. - 2004. - Т. 8, № 1. - С. 98-104.

103. Шехтер, А.Б. Воспаление, адаптивная регенерация и дисрегенерация (анализ межклеточных взаимодействий) [Текст] / А.Б. Шехтер, В.В. Серов // Архив патологии. - 1991. - Т. 53, № 7. - С. 7-14.

104. Шехтер, А.Б. Макрофагально фибропластическое взаимодействие и его возможная роль в регуляции метаболизма коллагена при заживлении ран [Текст] / А.Б. Шехтер, А.В. Николаев Г.Н. Берченко // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1977. - № 5. - С. 627-630.

105. Ширшакова, М. Клиническая эффективность стимуляции кожи препаратами нативной гиалуроновой кислоты в зеркале инструментальной диагностики [Текст] / М. Ширшакова // Инъекционные методы в косметологии. – 2010. - № 3. – С. 74–81.

106. Шичкин, В.П. Патогенетическое значение цитокинов и перспективы цитокиновой/антицитокиновой терапии: обзор [Текст] / В.П. Шичкин // Иммунология. - 1998. - № 2. - С. 9-13.

107. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма [Текст] / И.А. Волчегорский [и др.]. - Челябинск: ЧГПУ, 2000. - 167 с.

108. Экспрессия генов *fgf2* и *timp1* в мозге взрослых крыс после введений интерлейкина-1 β в раннем постнатальном онтогенезе [Текст] / А.Н. Трофимов [и др.] // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. - 2014. - Т. 100, № 9. - С. 1025-1037.

109. Юшков, Б.Г. Понятие нормы в физиологии (физиологические константы лабораторных животных): монография [Текст] / Б.Г. Юшков, В.А. Черешнев; Ин-т иммунологии. – М.: НП Центр стратегического партнерства, 2016. – 616 с.

110. Ярилин, А.А. Система цитокинов и принципы ее функционирования в норме и при патологии: обзор [Текст] / А.А. Ярилин // Иммунология. - 1997. - № 5. - С. 7-14.

111. Ярилин, Д.А. Роль фактора некроза опухолей в регуляции воспалительного ответа моноцитов и макрофагов [Текст] / Д.А. Ярилин // Иммунология. - 2014. - Т. 35, № 4. - С. 195-201.

112. Ястребов, А.П. Старение, перекисное окисление липидов и биовозраст [Текст] / А.П. Ястребов, В.Н. Мещанинов. - Екатеринбург: Урал. следопыт, 2005. - 217 с.

113. A prospective, split-face, randomized, comparative study of safety and 12-month longevity of three formulations of hyaluronic acid dermal filler for treatment of nasolabial folds [Text] / W. Prager [et al.] // J. Dermatol. Surg. – 2012. – Vol. 38, № 7 (Pt. 2). – P. 1143-50.

114. A proximal activator of transcription in epithelial-mesenchymal transition [Text] / C.D. Venkov [et al.] // J. Clin. Invest. – 2007. – Vol. 117, № 2. – P. 482-91.

115. Accumulation of elafin in actinic elastosis of sun-damaged skin: elafin binds to elastin and prevents elastolytic degradation [Text] / J. Muto [et al.] // J. Invest. Dermatol. – 2007. – Vol. 127, № 6. – P. 1358-66.
116. Agarwal, S. Differential oxidative damage to mitochondrial proteins during aging [Text] / S. Agarwal, R.S. Sohal // Mech. Ageing Dev. – 1995. – Vol. 85, № 1. – P. 55-63.
117. Age-dependent depletion of human skin-derived progenitor cells [Text] / N. Gago [et al.] // Stem Cells. – 2009. – Vol. 27, № 5. – P. 1164-72.
118. Aggarwal, B.B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword [Text] / B.B. Aggarwal // Nat. Rev. Immunol. – 2003. – Vol. 3, № 9. – P. 745-56.
119. Aging fibroblasts resist phenotypic maturation because of impaired hyaluronan-dependent CD44/epidermal growth factor receptor signaling [Text] / R.M. Simpson [et al.] // Am. J. Pathol. – 2010. – Vol. 176, № 3. – P. 1215-28.
120. Amin, S.P. Mesotherapy for facial skin rejuvenation: a clinical, histologic, and electron microscopic evaluation [Text] / S.P. Amin, R.G. Phelps, D.J. Goldberg // Dermatol. Surg. – 2006. – Vol. 32, № 12. – P. 1467-72.
121. Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan enhance the production of collagens by endothelial cells [Text] / P. Rooney [et al.] // J. Cell Sci. – 1993. – Vol. 105 (Pt. 1). – P. 213-8.
122. Arnesen, S.M. Age-related changes in focal adhesions lead to altered cell behavior in tendon fibroblasts [Text] / S.M. Arnesen, M.A. Lawson // Mech. Ageing Dev. – 2006. – Vol. 127, № 9. – P. 726-32.
123. Atiyeh, B.S. Cosmetic mesotherapy: between scientific evidence, science fiction, and lucrative business [Text] / B.S. Atiyeh, A.E. Ibrahim, S.A. Dibo // Aesthetic Plast. Surg. – 2008. – Vol. 32, № 6. – P. 842-9.

124. Baraibar, M.A. Proteomic quantification and identification of carbonylated proteins upon oxidative stress and during cellular aging [Text] / M.A. Baraibar, R. Ladouce, B. Friguet // *J. Proteomics*. – 2013. – Vol. 92. – P. 63-70.
125. Beutler, B. Innate immunity: an overview [Text] / B. Beutler // *Mol, Immunol*. – 2004. - Vol. 40, № 12. – P. 845-59.
126. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis [Text] / F. Li [et al.] // *Cell Res*. – 2007. – Vol. 17, № 1. – P. 3-14.
127. Biglycan is a new extracellular component of the Chordin-BMP4 signaling pathway [Text] / M. Moreno [et al.] // *EMBO J*. – 2005. – Vol. 24, № 7. – P. 1397-405.
128. Biomimetic electrospun scaffolds from main extracellular matrix components for skin tissue engineering application – The role of chondroitin sulfate and sulfated hyaluronan [Text] / S. Bhowmick [et al.] // *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. – 2017. – Vol. 79. – P. 15-22.
129. Biomolecular characterization of CD44-fibrin(ogen) binding: distinct molecular requirements mediate binding of standard and variant isoforms of CD44 to immobilized fibrin(ogen) [Text] / C.S. Alves [et al.] // *J. Biol. Chem*. – 2009. – Vol. 284, № 2. – P. 1177-89.
130. Bio-Revitalization: Effects of NASHA on Genes Involving Tissue Remodeling [Text] / A. Avantaggiato [et al.] // *Aesthetic Plast. Surg*. – 2015. – Vol. 39, № 4. – P. 459-64.
131. Cai, Z. Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health [Text] / Z. Cai, L.J. Yan // *J. Biochem. Pharmacol. Res*. – 2013. – Vol. 1, № 1. – P. 15-26.

132. CD44 on LS174T colon carcinoma cells possesses E-selectin ligand activity [Text] / W.D. Hanley [et al.] // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65, № 13. – P. 5812-17.
133. Cell contact-dependent regulation of epithelial-myofibroblast transition via the rho-rho kinase-phospho-myosin pathway [Text] / L. Fan [et al.] // *Mol. Biol. Cell.* – 2007. – Vol. 18, № 3. – P. 1083-97.
134. Chen, L. Roles of FGF signaling in skeletal development and human genetic diseases [Text] / L. Chen, C.X. Deng // *Front. Biosci.* – 2005. – № 10. – P. 1961-76.
135. Clusterin associates with altered elastic fibers in human photoaged skin and prevents elastin from ultraviolet-induced aggregation in vitro [Text] / E. Janig [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2007. – Vol. 171, № 5. – P. 1474-82.
136. Colak, E. New markers of oxidative damage to macromolecules [Text] / E. Colak // *JMB.* – 2008. – P. 1-16.
137. Comparative glycomics of connective tissue glycosaminoglycans [Text] / A.M. Hitchcock [et al.] // *Proteomics.* – 2008. – Vol. 8, № 7. – P. 1384-97.
138. Cooper, C.A. Inflammation and Hyaluronick acid [Text] / C.A. Cooper, K.K. Brown, C.D. Meletis // *Alternat. Compl. Ther.* – 2008. – Vol. 146, № 2. – P. 78-84.
139. Davies, K.J. Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure [Text] / K.J. Davies, M.E. Delsignore // *J. Biol. Chem.* – 1987. – Vol. 262, № 20. – P. 9908-13.
140. Davies, K.J. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects [Text] / K.J. Davies // *J. Biol. Chem.* – 1987. – Vol. 262, № 20. – P. 9895-9901.

141. Day, A.J. Hyaluronan-binding proteins: tying up the giant [Text] / A.J. Day, G.D. Prestwich // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277, № 7. – P. 4585-8.
142. DeAngelis, P.L. Hyaluronan synthases: fascinating glycosyltransferases from vertebrates, bacterial pathogens, and algal viruses [Text] / P.L. DeAngelis // *Cell Mol. Life Sci.* – 1999. – Vol. 56, № 7-8. – P. 670-82.
143. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins [Text] / R.L. Levine [et al.] // *Methods Enzymol.* – 1990. – Vol. 186. – P. 464-78.
144. Differentiation of human circulating fibrocytes as mediated by transforming growth factor-beta and peroxisome proliferator-activated receptor gamma [Text] / K.M. Hong [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282, № 31. – P. 22910-20.
145. Distribution and expression of type VI collagen in photoaged skin [Text] / R.E. Watson [et al.] // *Br. J. Dermatol.* – 2001. – Vol. 144, № 4. – P. 751-9.
146. Does hyaluronan affect inflammatory cytokines in knee osteoarthritis? [Text] / M. Sezgin [et al.] // *Rheumatol. Int.* – 2005. – Vol. 25, № 4. – P. 264-9.
147. Donor age-dependent acceleration of cellular aging by repeated ultraviolet A irradiation of human dermal fibroblasts derived from a single donor [Text] / E. Naru [et al.] // *Hum. Cell.* – 2009. – Vol. 22, № 2. – P. 31-7.
148. Eaton, J.W. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary [Text] / J.W. Eaton // *J. Lab. Clin. Med.* – 1991. – Vol. 118, № 1. – P. 3-4.
149. Edwards, P.C. Review of long-term adverse effects associated with the use of chemically-modified animal and nonanimal source hyaluronic acid dermal fillers [Text] / P.C. Edwards, J.E. Fantasia // *Clin. Interv. Aging.* – 2007. – Vol. 2, № 4. – P. 509-19.

150. Effect of hyaluronan oligosaccharides on the expression of heat shock protein 72 [Text] / H. Xu [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277, № 19. – P. 17308-14.
151. Effects of ingestion of collagen peptide on collagen fibrils and glycosaminoglycans in the dermis [Text] / N. Matsuda [et al.] // *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. – 2006. – Vol. 52, № 3. – P. 211-5.
152. Efficacy and safety of a new hyaluronic acid dermal filler in the treatment of severe nasolabial lines - 6-month interim results of a randomized, evaluator-blinded, intra-individual comparison study [Text] / B. Ascher [et al.] // *J. Cosmet. Dermatol.* – 2011. – Vol. 10, № 2. – P. 94-8.
153. Efficacy of mesotherapy in facial rejuvenation: a histological and immunohistochemical evaluation [Text] / M. El-Domyati [et al.] // *Int. J. Dermatol.* – 2012. – Vol. 51, № 8. – P. 913-9.
154. Elastin-elastases and inflamm-aging [Text] / F. Antonicelli [et al.] // *Curr. Top. Dev. Biol.* – 2007. – Vol. 79. – P. 99-155.
155. Endl, E. The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function [Text] / E. Endl, J. Gerdes // *Exp. Cell Res.* – 2000. – Vol. 257, № 2. – P. 231-7.
156. Evaluation of angiogenic activities of hyaluronan oligosaccharides of defined minimum size [Text] / X. Cui [et al.] // *Life Sci.* – 2009. – Vol. 85, № 15-16. – P. 573-7.
157. Evaluation of the physical and biological properties of hyaluronan and hyaluronan fragments [Text] / E.L. Ferguson [et al.] // *Int. J. Pharm.* – 2011. – Vol. 420, № 1. – P. 84-92.
158. Expression of elastin-related proteins and matrix metalloproteinases in actinic elastosis of sun-damaged skin [Text] / Y. Ohnishi [et al.] // *Arch. Dermatol. Res.* – 2000. – Vol. 292, № 1. – P. 27-31.

159. Fenske, N.A. Structural and functional changes of normal aging skin [Text] / N.A. Fenske, C.W. Lober // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 1986. – Vol. 15, № 4 (Pt. 1). – P. 419-426.
160. Fernandes, E.J. Structure, function and inhibition of chemokines [Text] / E.J. Fernandes, E. Lolis // *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2002. – Vol. 42. – P. 469-499.
161. Fibrocytes from burn patients regulate the activities of fibroblasts [Text] / J.F. Wang [et al.] // *Wound Repair Regen.* – 2007. – Vol. 15, № 1. – P. 113-21.
162. Fisher, E. Shear flow affects secondary and tertiary structures in hyaluronan solution as shown by rheo-NMR [Text] / E. Fisher, P.T. Callaghan, F. Heatley // *J. Mol. Struct.* – 2002. – Vol. 22. – P. 603, 303-311.
163. Freemont, A.J. Morphology, mechanisms and pathology of musculoskeletal ageing [Text] / A.J. Freemont, J.A. Hoyland // *J. Pathol.* – 2007. – Vol. 211, № 2. – P. 252-9.
164. Fridovich, I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas [Text] / I. Fridovich // *J. Biol. Chem.* – 1989. – Vol. 264, № 14. – P. 7761-4.
165. Gall, Y. Hyaluronic acid: structure, metabolism and implication in cicatrisation [Text] / Y. Gall // *Ann. Dermatol. Venereol.* – 2010. – Vol. 137 (Suppl. 1). – P. S30-9.
166. Gard, H.G. Chemistry and biology of hyaluronan [Text] / H.G. Garg, C.A. Hales. – Amsterdam, 2004. – 540 p.
167. Gardner, P.R. Superoxide and chemical sensitivities of the 6-phosphogluconate dehydratase [Text] / P.R. Gardner, I. Fridovich // *Free Radic. Biol. Med.* - 1990. - Vol. 912, № 9. - P. 84.
168. Gel properties of hyaluronic acid dermal fillers [Text] / K. Edsman [et al.] // *Dermatol. Surg.* – 2012. - Vol. 38, № 7 (Pt. 2). – P. 1170-9.

169. Geng, Y. SLRP interaction can protect collagen fibrils from cleavage by collagenases [Text] / Y. Geng, D. McQuillan, P.J. Roughley // *Matrix Biol.* – 2006. – Vol. 25, № 8. – P. 484-91.
170. Giacomoni, P.U. Factors of skin ageing share common mechanisms [Text] / P.U. Giacomoni, G. Rein // *Biogerontology.* – 2001. – Vol. 2, № 4.- P. 219-29.
171. Gomperts, B.N. Fibrocytes in lung disease [Text] / B.N. Gomperts, R.M. Strieter // *J. Leukoc. Biol.* – 2007. – Vol. 82, № 3. – P. 449-56.
172. Good, C. The determination of glycogen [Text] / C. Good, H. Cramer, M. Somogyi // *J. Biol. Chem.* – 1933. – Vol. 2. – P. 485-497.
173. Gueniche, A. Efficacy of Glucosamine Sulphate in SkinAgeing: Results from an ex vivo Anti-Ageing Model and a Clinical Trial [Text] / Gueniche, I. Castiel-Higounenc // *Skin Pharmacol Physiol.* – 2017. – Vol.30, № 1. – P. 36-41.
174. HA metabolism in skin homeostasis and inflammatory disease [Text] / R.M. Kavasi [et al.] // *Food Chem Toxicol.* – 2017. – Vol. 101. – P. 128-138.
175. HCELL is the major E- and L-selectin ligand expressed on LS174T colon carcinoma cells [Text] / M.M. Burdick [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 276, № 10. – P. 29420-29434.
176. Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes [Text] / R. Zaidel-Bar [et al.] // *Biochem. Soc. Trans.* – 2004. – Vol. 32 (Pt. 3). – P. 416-20.
177. High molecular size hyaluronan differently modulates toll-like receptor-4 in LPS-induced inflammation in mouse chondrocytes [Text] / G.M. Campo [et al.] // *Biochimie.* – 2010. – Vol. 92, № 2. – P. 336-340.
178. Human skin stem cells and the ageing process [Text] / C.C. Zouboulis [et al.] // *Exp. Gerontol.* – 2008. – Vol. 43, № 11. – P. 986-97.

179. Hyaluronan chain conformation and dynamics [Text] / S. Furlan [et al.] // *Carbohydr. Res.* – 2005. – Vol. 340, № 5. – P. 959-70.
180. Hyaluronan oligosaccharide treatment of chondrocytes stimulates expression of both HAS-2 and MMP-3, but by different signaling pathways [Text] / I. Schmitz [et al.] // *Osteoarthritis Cartilage.* – 2010. – Vol. 18, № 3. – P. 447-54.
181. Hyaluronan oligosaccharides promote excisional wound healing through enhanced angiogenesis [Text] / F. Gao [et al.] // *Matrix Biol.* – 2010. – Vol. 29, № 2. – P. 107-16.
182. Hyaluronan synthase 2 protects skin fibroblasts against apoptosis induced by environmental stress [Text] / Y. Wang [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2014. – Vol. 289, № 46. – P. 32253-65.
183. Hyaluronan-oligosaccharide-induced transcription of metalloproteases [Text] / C. Fieber [et al.] // *J. Cell Sci.* – 2004. – Vol. 117, Pt. 2. – P. 359-67.
184. Hyaluronate fragments reverse skin atrophy by a CD44-dependent mechanism [Text] / G. Kaya [et al.] // *PLoS Med.* – 2006. – Vol. 3, № 12. – P. e493.
185. Hyaluronic Acid binding protein 2 is a novel regulator of vascular integrity [Text] / N. Mambetsariev [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2010. – Vol. 30, № 3. – P. 483-90.
186. Hyaluronic acid in cutaneous intrinsic aging [Text] / I. Ghersetich [et al.] // *Int. J. Dermatol.* – 1994. – Vol. 33, № 2. – P. 119-22.
187. Hyaluronic acid modulates proliferation, collagen and protein synthesis of cultured fetal fibroblasts [Text] / B.A. Mast [et al.] // *Matrix.* – 1993. – Vol. 13, № 6. – P. 441-6.
188. Intrinsic aging- and photoaging-dependent level changes of glycosaminoglycans and their correlation with water content in human skin [Text] / J.H. Oh [et al.] // *J. Dermatol. Sci.* – 2011. – Vol. 62, № 3. – P. 192-201.

189. Involvement of hyaluronan in regulation of fibroblast phenotype [Text] / S. Meran [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282, № 35. – P. 25687-97.
190. Iudintseva, N.M. Characteristics of cytoskeleton organization of human normal postnatal, scar and embryonic skin fibroblasts spreading on different proteins of extracellular matrix [Text] / N.M. Iudintseva, M.I. Blinova, G.P. Pinaev // *Tsitologia.* – 2008. – Vol. 50, № 10. – P. 861-7.
191. Ivashkiv, L.B. Epigenetic regulation of macrophage polarization and function [Text] / L.B. Ivashkiv // *Trends Immunol.* – 2013. – Vol. 34, № 5. – P. 216-23.
192. Johnson, P. CD44 and its role in inflammation and inflammatory diseases [Text] / P. Johnson, B. Ruffell // *Inflamm. Allergy Drug Targets.* – 2009. – Vol. 8, № 3. – P. 208-20.
193. Juhlin, L. Hyaluronan in skin [Text] / L. Juhlin // *J. Intern. Med.* – 1997. – Vol. 242, № 1. – P. 61-6.
194. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential [Text] / R. Yerushalmi [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2010. – Vol. 11, № 2. – P. 174-83.
195. Kobata, A. Glycobiology in the field of aging research--introduction to glycoogerontology [Text] / A. Kobata // *Biochimie.* – 2003. – Vol. 85, № 1-2. – P. 13-24.
196. Kogan, G. Hyaluromic acid: its function and degradation in vivo systems [Text] / G. Kogan, I. Solts, R. Stern // *Bioactive natural products. Part D.* – Amsterdam: Elsevier, 2008. – Vol. 35. – P. 131-143.
197. Kono, Y. Superoxide radical inhibits catalase [Text] / Y. Kono, I. Fridovich // *J. Biol. Chem.* – 1982. – Vol. 257, № 10. – P. 5751-4.
198. Kuo, J.W. Practical aspects of HA based medical products [Text] / J.W. Kuo. – N.Y.: CRC Press Taylor, 2005. – 240 p.

199. Labat-Robert, J. Age-dependent remodeling of connective tissue: role of fibronectin and laminin [Text] / J. Labat-Robert // *Pathol. Biol. (Paris)*. – 2003. – Vol. 51, № 10. – P. 563-8.
200. Lee, J.J. Hyaluronan: multifunctional megadalton, stealth molecule [Text] / J.J. Lee, P.A. Spicer // *Curr. Opin. Cell Biol.* - 2000. – Vol. 12. – P. 582-586.
201. Low molecular weight hyaluronic acid increases the self-defense of skin epithelium by induction of beta-defensin 2 via TLR2 and TLR4 [Text] / S. Gariboldi [et al.] // *J. Immunol.* – 2008. – Vol. 181, № 3. – P. 2103-10.
202. Macrophage receptors and immune recognition [Text] / P.R. Taylor [et al.] // *Annu Rev. Immunol.* – 2005. – Vol. 23. – P. 901-44.
203. Makrantonaki, E. Molecular mechanisms of skin aging: state of the art [Text] / E. Makrantonaki, C.C. Zouboulis // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2007. – № 1119. – P. 40-50.
204. Marked aging-related decline in efficiency of oxidative phosphorylation in human skin fibroblasts [Text] / M. Greco [et al.] // *FASEB J.* – 2003. – Vol. 17, № 12. – P. 1706-8.
205. Matés, J.M. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes [Text] / J.M. Matés, F. Sánchez-Jiménez // *Front. Biosci.* – 1999. - № 4. – P. D339-45.
206. Miller, E.J. Chemistry of the collagens and their distribution [Text] / E.J. Miller // *Extracellular matrix biochemistry* / eds.: K.A. Piez, A.H. Reddi. – N.Y.: Elsevier, 1984. - P. 41-81.
207. Modification of peptide and protein cysteine thiol groups by conjugation with a degradation product of ascorbate [Text] / P. Kay [et al.] // *Chem. Res. Toxicol.* – 2013. – Vol. 26, № 9. – P. 1333-9.

208. Molecular size hyaluronan differently modulates toll-like receptor-4 in LPS-induced inflammation in mouse chondrocytes [Text] / G.M. Campo [et al.] // *Biochimie.* – 2010. – Vol. 92, № 2. – P. 204-15.
209. Monteiro, E.D.O. Facial rejuvenation treatment with nonanimal, nonstabilized hyaluromic acid micro droplet placed into the derms [Text] / E.D.O. Monteiro // *Rev. Brazil. Med.* – 2011. – Vol. 68, № 6. – P. 198-200.
210. Monzavi, R. IGFs and IGFBPs: role in health and disease [Text] / R. Monzavi, P. Cohen // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2002. – Vol. 16, № 3. – P. 433-47.
211. Moradi, A. A guide to temporal fossa augmentation with small gel particle hyaluronic acid dermal filler [Text] / A. Moradi, A. Shirazi, V. Perez // *Drugs Dermatol.* – 2011. – Vol. 10, № 6. – P. 673-6.
212. Mummert, M.E. Immunologic roles of hyaluronan [Text] / M.E. Mummert // *Immunol. Res.* – 2005. – Vol. 31, № 3. – P. 189-206.
213. Murray, P.J. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets [Text] / P.J. Murray, T.A. Wynn // *Nat. Rev. Immunol.* – 2011. – Vol. 11, № 11. – P. 723-37.
214. Myofibroblastic differentiation leads to hyaluronan accumulation through reduced hyaluronan turnover [Text] / R.H. Jenkins [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, № 40. – P. 41453-60.
215. Nishinari, K. Interaction in polysaccharide solutions and gels [Text] / K. Nishinari // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* – 2003. – Vol. 8, № 4-5. – P. 396-400.
216. Noble, P.W. Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair [Text] / P.W. Noble // *Matrix Biol.* – 2002. – Vol. 21, № 1. – P. 25-9.
217. Nomura, Y. Structural change in decorin with skin aging [Text] / Y. Nomura // *Connect Tissue Res.* – 2006. – Vol. 47, № 5. – P. 249-55.

218. Non-enzymatic glycation of type I collagen diminishes collagen-proteoglycan binding and weakens cell adhesion [Text] / K.L. Reigle [et al.] // *J. Cell Biochem.* – 2008. – Vol. 104, № 5. – P. 1684-98.

219. Oxidant stress induces the protooncogenes c-fos and c-myc in mouse epidermal cells [Text] / D. Crawford [et al.] // *Oncogene.* - 1989. - № 3. - P. 27-32.

220. Park, J.U. Increase in gap junctional intercellular communication by high molecular weight hyaluronic acid associated with fibroblast growth factor production in normal human dermal fibroblasts [Text] / J.U. Park, T. Tsuchiya // *Tissue Engineering.* – 2002. – Vol. 8, № 3. – P. 419-427.

221. Patel, T. Effective treatment of acne scars using pneumatic injection of hyaluronic acid [Text] / T. Patel, O. Tevet // *J. Drugs Dermatol.* – 2015. – Vol. 14, № 1. – P. 74-6.

222. Persistence of nasolabial fold correction with a hyaluronic acid dermal filler with retreatment: results of an 18-month extension study [Text] / R.S. Narins [et al.] // *Dermatol. Surg.* – 2011. – Vol. 37, № 5. – P. 644-50.

223. Planque, N. Nuclear trafficking of secreted factors and cell-surface receptors: new pathways to regulate cell proliferation and differentiation, and involvement in cancers [Text] / N. Planque // *Cell Commun. Signal.* – 2006. – № 4. – P. 7.

224. Ponta, H. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators [Text] / H. Ponta, L. Sherman, P.A. Herrlich // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2003. – Vol. 4, № 1. – P. 33-45.

225. Presti, D. Hyaluronan-mediated protective effect against cell damage caused by enzymatically produced hydroxyl (OH[•]) radicals is dependent on hyaluronan molecular mass [Text] / D. Presti, J.E. Scott // *Cell Biochem. Funct.* – 1994. – Vol. 12, № 4. – P. 281-8.

226. Protein oxidation: identification and utilisation of molecular markers to differentiate singlet oxygen and hydroxyl radical-mediated oxidative pathways [Text] / J.E. Plowman [et al.] // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2013. – Vol. 12, № 11. – P. 1960-7.

227. Ramirez, F. The fibrillins [Text] / F. Ramirez, L. Pereira // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 1999. – Vol. 31, № 2. – P. 255-9.

228. Reduced value of a novel hyaluromic acid dermal filleer required for optimal correction of nasolabial folds compared to nonanimal stabilized hyaluromic acid [Text] / G.D. Monheit [et al.] // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 2010. – Vol. 62, № 3 (Suppl. 1). – P. AB 143.

229. Reed, M.J. Impaired migration, integrin function, and actin cytoskeletal organization in dermal fibroblasts from a subset of aged human donors [Text] / M.J. Reed, N.S. Ferrara, R.B. Vernon // *Mech. Ageing Dev.* – 2001. – Vol. 122, № 11. – P. 1203-20.

230. Rifkin, D.B. Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability [Text] / D.B. Rifkin // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280, № 9. – P. 7409-12.

231. Robert, L. Hyaluronan, a truly "youthful" polysaccharide. Its medical applications [Text] / L. Robert // *Pathol. Biol. (Paris)*. – 2015. – Vol. 63, № 1. – P. 32-4.

232. Robert, L. Rapid increase in human life expectancy: will it soon be limited by the aging of elastin? [Text] / L. Robert, A.M. Robert, T. Fülöp // *Biogerontology*. – 2008. – Vol. 9, № 2. – P. 119-33.

233. Robins, S.P. Biochemistry and functional significance of collagen cross-linking [Text] / S.P. Robins // *Biochem. Soc. Trans.* – 2007. – Vol. 35, Pt. 5. – P. 849-52.

234. Rollo, C.D. Accelerated aging of giant transgenic mice is associated with elevated free radical processes [Text] / C.D. Rollo, J. Carlson, M. Sawada // *Can. J. Zool.* – 1996. – Vol. 74, № 4. – P. 606-620.

235. Sackstein, R. Glycosyltransferase-programmed stereosubstitution (GPS) to create HCELL: engineering a roadmap for cell migration [Text] / R. Sackstein // *Immunol. Rev.* – 2009. – Vol. 230, № 1. – P. 51-74.

236. Safrankova, B. The potency of hyaluronan of different molecular weights in the stimulation of blood phagocytes [Text] / B. Safrankova, S. Gajdova, L. Kubala // *Mediators Inflamm.* – 2010. – №9. – P. 380948. doi: 10.1155/2010/380948. Epub 2011 Feb 9.

237. Savoia, A. A new minimally invasive mesotherapy technique for facial rejuvenation [Text] / A. Savoia, S. Landi, A. Baldi // *Dermatol. Ther. (Heidelb).* – 2013. – Vol. 3, № 1. – P. 83-93.

238. Schreck, R. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1 [Text] / R. Schreck, P. Rieber, P.A. Baeuerle // *EMBO J.* – 1991. – Vol. 10, № 8. – P. 2247-58.

239. Schulz, A. Anti-inflammatory action of a hyaluronic acid-chondroitin sulfate preparation in an in vitro bladder model [Text] / A. Schulz, A.M. Vestweber, D. Dressler // *Aktuelle Urol.* – 2009. – Vol. 40, № 2. – P. 109-12.

240. Scott, J.E. Hyaluronan forms specific stable tertiary structures in aqueous solution: a ¹³C NMR study [Text] / J.E. Scott, F. Heatley // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1999. – Vol. 96, № 9. – P. 4850-5.

241. Sengupta, P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's [Text] / P. Sengupta // *Int. J. Prev. Med.* – 2013. – Vol. 4, № 6. – P. 624-30.

242. Sengupta, P.A. A Scientific Review of Age Determination for Laboratory Rat: How old is it comparison with Human age? [Text] / P.A. Sengupta // Biomed. Int. – 2012. - № 2. – P. 81-89.

243. Shacter, E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples [Text] / E. Shacter // Drug Metab. Rev. – 2000. – Vol. 32, № 3-4. – P. 307-26.

244. Sica, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas [Text] / A. Sica, A. Mantovani // J. Clin. Invest. – 2012. – Vol. 122, № 3. – P. 787-95.

245. Slatter, D.A. Collagen in its fibrillar state is protected from glycation [Text] / D.A. Slatter, N.C. Avery, A.J. Bailey // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2008. – Vol. 40, № 10. – P. 2253-63.

246. Sodium storage in human tissues is mediated by glycosaminoglycan expression [Text] / M. Fischereder [et al] // Am J Physiol Renal Physiol. – 2017. – Vol. 313, N 2. – P. 319-325.

247. Sox2 induction by FGF and FGFR2 activating mutations inhibits Wnt signaling and osteoblast differentiation [Text] / A. Mansukhani [et al.] // J. Cell Biol. – 2005. – Vol. 168, № 7. – P. 1065-76.

248. Stadtman, E.R. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences [Text] / E.R. Stadtman // Free Radic Biol. Med. – 1990. – Vol. 9, № 4. – P. 315-25.

249. Stat1 controls postnatal bone formation by regulating fibroblast growth factor signaling in osteoblasts [Text] / L. Xiao [et al.] // J. Biol. Chem. – 2004. – Vol. 279, № 26. – P. 27743-52.

250. Stern, R. Hyaluronan fragments: an information-rich system [Text] / R. Stern, A.A. Asari, K.N. Sugahara // Eur. J. Cell Biol. – 2006. – Vol. 85, № 8. – P. 699-715.

251. Stern, R. Hyaluronan in skin: aspects of aging and its pharmacologic modulation [Text] / R. Stern, H.I. Maibach // *Clin. Dermatol.* – 2008. – Vol. 26, № 2. – P. 1006–1022.
252. Sulfated Hyaluronan Derivatives Modulate TGF- β 1: Receptor Complex Formation: Possible Consequences for TGF- β 1 Signaling [Text] / L. Koehler [et al.] // *Sci Rep.* – 2017. – Vol.26, № 7(1). – P.1210.
253. Sustained efficacy and high patient satisfaction after cheek enhancement with a new hyaluronic acid dermal filler [Text] / P. Kestemont [et al.] // *J. Drugs Dermatol.* – 2012. – Vol. 11, № 1 (Suppl.). – P. s9-16.
254. Tammi, M.I. Hyaluronan and homeostasis: a balancing act [Text] / M.I. Tammi, A.J. Day, E.A. Turley // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277, № 7. – P. 4581-4.
255. Targeting TNF receptors in rheumatoid arthritis [Text] / S. Blüml [et al.] // *Int. Immunol.* – 2012. – Vol. 24, № 5. – P. 275-81.
256. Tedeschi, A. Mesotherapy with an Intradermal Hyaluronic Acid Formulation for Skin Rejuvenation: An Inpatient, Placebo-Controlled, Long-Term Trial Using High-Frequency Ultrasound [Text] / A. Tedeschi, F. Lacarrubba, G. Micali // *Aesthetic Plast. Surg.* – 2015. – Vol. 39, № 1. – P. 129-33.
257. Termeer, C. Hyaluronan--magic glue for the regulation of the immune response? [Text] / C. Termeer, J.P. Sleeman, J.C. Simon // *Trends Immunol.* – 2003. – Vol. 24, № 3. – P. 112-4.
258. The dual role of CD44 as a functional P-selectin ligand and fibrin receptor in colon carcinoma cell adhesion [Text] / C.S. Alves [et al.] // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2008. – Vol. 294, № 4. – P. 907-16.
259. The proliferation-specific human Ki-67 protein is a constituent of compact chromatin [Text] / S. Kreitz [et al.] // *Exp. Cell Res.* – 2000. – Vol. 261, № 1. – P. 284-92.

260. The proteoglycans aggrecan and Versican form networks with fibulin-2 through their lectin domain binding [Text] / A.I. Olin [et al.] // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276, № 2. – P. 1253-61.

261. The role of macrophages in the tissues regeneration stimulated by the biomaterials [Text] / E.R. Muldashev [et al.] // Cell Tissue Bank. – 2005. – Vol. 6, № 2. – P. 99-107.

262. The role of the CD44/ezrin complex in cancer metastasis [Text] / T.A. Martin [et al.] // Crit. Rev. Oncol. Hematol. – 2003. – Vol. 46, № 2. – P. 165-86.

263. TNF-alpha, IFN-gamma, and IL-1beta modulate hyaluronan synthase expression in human skin fibroblasts: synergistic effect by concomital treatment with FeSO4 plus ascorbate [Text] / G.M. Campo [et al.] // Mol. Cell Biochem. – 2006. – Vol. 292, № 1-2. – P. 169-78.

264. Transactivation of sphingosine 1-phosphate receptors is essential for vascular barrier regulation. Novel role for hyaluronan and CD44 receptor family [Text] / P.A. Singleton [et al.] // J. Biol. Chem. – 2006. – Vol. 281, № 45. – P. 34381-93.

265. Two novel functions of hyaluronidase-2 (Hyal2) are formation of the glycocalyx and control of CD44-ERM interactions [Text] / C. Duterme [et al.] // J. Biol. Chem. – 2009. – Vol. 284, № 48. – P. 33495-508.

266. Uitto, J. The role of elastin and collagen in cutaneous aging: intrinsic aging versus photoexposure [Text] / J. Uitto // J. Drugs Dermatol. – 2008. – Vol. 7, № 2. – P. s12-6.

267. UVA and UVB decrease the expression of CD44 and hyaluronate in mouse epidermis, which is counteracted by topical retinoids [Text] / E. Calikoglu [et al.] // Photochem. Photobiol. – 2006. – Vol. 82, № 5. – P. 1342-7.

268. Vallabhapurapu, S. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system [Text] / S. Vallabhapurapu, M. Karin // *Annu Rev. Immunol.* – 2009. – Vol. 27. – P. 693-733.
269. Versican: signaling to transcriptional control pathways [Text] / M. Rahmani [et al.] // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2006. – Vol. 84, № 1. – P. 77-92.
270. Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin [Text] / J. Varani [et al.] // *J. Inves. Dermatol.* – 2000. – Vol. 114, № 3. – P. 480-6.
271. Wendel, A. Enzymes acting against reactive oxygen [Text] / A. Wendel // *Enzymes: Tools and Targets.* - Basel: Karger, 1988. - P. 161-167.
272. Wight, T.N. Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology [Text] / T.N. Wight // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2002. – Vol. 14, № 5. – P. 617-23.
273. Yan, L.J. Analysis of oxidative modification of proteins [Text] / L.J. Yan // *Curr. Protoc. Protein Sci.* – 2009. – Ch. 14. doi: 10.1002/0471140864.ps1404s56.
274. Yan, L.J. Protein redox modification as a cellular defense mechanism against tissue ischemic injury [Text] / L.J. Yan // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2014. – Vol. 2014. doi: 10.1155/2014/343154.
275. Yasuda, T. Hyaluronan inhibits cytokine production by lipopolysaccharide-stimulated U937 macrophages through down-regulation of NF-kappaB via ICAM-1 [Text] / T. Yasuda // *Inflamm. Res.* – 2007. – Vol. 56, № 6. – P. 246-53.