

УДК 612.79:577.124

*Б.Н. Сельская, О.М. Капулер, В.Г. Иванов, Ф.Х. Камиллов***ОБМЕН УГЛЕВОДОВ В КОЖЕ В ОБЛАСТИ ВНУТРИДЕРМАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ПРЕПАРАТА, СОДЕРЖАЩЕГО НЕМОДИФИЦИРОВАННЫЙ КОЛЛАГЕН ТИПА I**

Целью исследований явилось изучение характера изменений путей окисления углеводов, уровня основных полисахаридов кожи экспериментальных животных в области внутридермального введения коллагенсодержащего препарата. Эксперименты проведены на 78 самках крыс зрелого возраста (12-13 месяцев) при внутридермальном введении препарата, содержащего 7 %-й немодифицированный бычий коллаген, дважды на 1-е и 6-е сутки опыта на боковые поверхности кожи после удаления шерсти из расчёта 0,06 мл / 100 г массы тела техникой мезотерапии. На 2-е, 4-е, 7-е, 21-е и 37-е сутки в коже в области введения препарата определены содержание молочной и пировиноградной кислот, гликогена, суммы гликозаминогликанов (ГАГ) и гиалуроновой кислоты (ГК), активность гексокиназы, глюкозо-6- фосфатдегидрогеназы (Г-6-фДГ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ).

В результате проведённых исследований установлено, что в ближайшие дни после инъекций препарата в коже увеличивается уровень лактата, соотношение лактат/пируват, активность ЛДГ. Активность гексокиназы и содержание гликогена снижается. Активность Г-6-фДГ и концентрация ГАГ и ГК не претерпевает статистически значимых изменений. В более отдалённые сроки наблюдения (21-е и 37-е сутки) наблюдается падение коэффициента лактат/ пируват ниже контрольных значений, повышение активности гексокиназы и Г-6-фДГ, содержание ГАГ и ГК. Полученные данные позволяют прийти к заключению, что в первые сутки после внутридермального введения коллагенсодержащего препарата в коже усиливаются процессы анаэробного окисления углеводов и гликогенолиза. В более отдалённые сроки наблюдается активация аэробного окисления по гексозодифосфатному и гексозомонофосфатному путям с интенсификацией биосинтеза гиалурона на и суммарных гликозаминогликанов.

Ключевые слова: кожа, обмен углеводов, влияние коллагенсодержащего препарата.

Возрастное старение кожи сопровождается количественными и качественными изменениями клеточных элементов и основных биополимеров внеклеточного матрикса – коллагена, эластина, протеогликанов, гиалуроновой кислоты и специфических гликопротеинов. С возрастом снижается не только общая численность фибробластов в коже, но и их метаболическая активность [1; 2]. В митохондриях фибробластов наблюдается падение мембранного потенциала, клеточного дыхания, эффективности окислительного фосфорилирования [3]. В дерме кожи лиц пожилого возраста значительно снижается биосинтез гиалуронана, коллагена, нарушается пространственная организация внеклеточного матрикса, снижается количество сосудов и поглощение кислорода [4; 5]. В возрастных изменениях кожи пристальное внимание привлекают гиалуронан и гликозаминогликаны в составе протеогликанов, которые, благодаря своим физико-химическим свойствам и заряду связывают воду в межклеточном пространстве, формируя высокогидрофильную среду, определяя высокий тургор и тонус кожи, обеспечивая диффузию нутриентов и кислорода [6].

Для коррекции возрастных изменений кожи наиболее широкое применение нашли препараты гиалуроновой кислоты и коллагена. Коллаген – важнейший компонент реконструкции ткани после её нарушений, основной субстрат для адгезии, роста и дифференцировки клеток. Формирование пространственной структуры коллагеном является ключевым моментом в организации ткани кожи, измененной при старении [7; 8]. В настоящее время разработана большая группа коллагенсодержащих препаратов, являющиеся эффективными филлерами [8], однако остаётся много нерешённых вопросов, касающихся механизмов их фармакологических эффектов, характера изменений метаболизма и их стабильности в коже в местах их введения.

Цель исследования. Изучить характер изменений путей окисления углеводов, уровня основных полисахаридов кожи экспериментальных животных в области внутридермального введения коллагенсодержащего препарата.

Материалы и методы исследования

Исследования проведены на 78 самках белых крыс зрелого возраста (12-13 месяцев) массой 280–320 г с соблюдением этических норм и требований по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и иных научных целях. Животные были разделены на 2 группы. Под

легким эфирным наркозом животным опытной группы внутридермально техникой мезотерапии вводили препарат «КОЛЛОСТ гель^{MT}» (Россия), содержащий 7 %-й нативный коллаген типа I крупного рогатого скота в изотоническом растворе глюкозы, контрольной группе – стерильный физиологический раствор глюкозы. Растворы вводили в кожу боковых поверхностей туловища после удаления шерсти на площади 3x3 см из расчета 0,06 мл/100 г массы крысы на 1-е и 6-е сутки эксперимента. Животных под легким эфирным наркозом выводили из эксперимента на 2-е, 4-е, 7-е, 21-е и 37-е сутки опыта путем декапитации.

В коже в местах инъекций препарата и физиологического раствора определяли содержание молочной кислоты (набор реагентов ООО «Ольвекс Диагностикум»), пировиноградной кислоты [9], гликогена [10], гиалуронана [11], суммарных гликозаминогликанов [12], активность гексокиназы (КФ 2.7.1.1) [13], глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.49) [14], лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27, набор реагентов ООО «Ольвекс Диагностикум»). Содержание белка в пробах определяли по Лоури.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью прикладных программ Statistica 6,0 for Windows, используя непараметрические методы. Рассчитывали медиану, верхний и нижний квартили. Статистическую значимость межгрупповых различий оценивали по U- критерию Манна-Уитни с поправкой Бонферони.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования (табл. 1) показывают, что внутридермальное введение коллагенсодержащего препарата техникой мезотерапии в первые дни наблюдения (2-е, 4-е и 7-е сутки) после инъекции сопровождаются в коже статистически значимым повышением содержания молочной кислоты, в то время как уровень пировиноградной не подвергается существенным колебаниям. В результате значительно повышается коэффициент лактат/пируват, отражающий отношение аэробного и анаэробного путей окисления углеводов в тканях. Активность гексокиназы, характеризующая интенсивность потребления тканью глюкозы при этом не претерпевает выраженных изменений, активность ключевого фермента гексозомонофосфатного пути окисления – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы снижается, а фермента гликолитического окисления – лактатдегидрогеназы увеличивается на 33–50 %. Полученные результаты свидетельствуют о том, что после процедуры внутридермальной инъекции препарата в коже наблюдается интенсификация процессов анаэробного окисления. Статистически значимое снижение содержания гликогена в эти же сроки наблюдения вероятно, связано с усилением гликогенолиза. При этом важно отметить, что 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 ЛДГ [15]. Одновременно происходит и некоторое снижение содержания в коже суммарных гликозаминогликанов (ГАГ) и гиалуронана.

В более отдалённые сроки наблюдения (21-е–37-е сутки) уровень лактата в коже снижается до значений в группе контроля, а коэффициент лактат/пируват уменьшается, достигая статистической значимости. Активность ЛДГ при этом остаётся несколько повышенной, но не отличается от контрольных значений. Активность гексокиназы и Г-6-фДГ усиливается существенно. Так, активность гексокиназы на 21-е сутки эксперимента у животных опытной группы составляет 126,7 % ($P=0,023$), на 37-е сутки – 133,8 % ($P=0,018$) по сравнению с контролем, Г-6-фДГ – соответственно 147,6 % ($P=0,01$) и 145,6 % ($P=0,016$). Полученные данные указывают на изменения характера течения в коже углеводно-энергетического обмена с усилением аэробного окисления, повышением использования глюкозы на окислительные процессы как по гексозоdifосфатному, так и гексозомонофосфатному путям. Через 3–5 недель после первой инъекции коллагенсодержащего препарата в коже экспериментальных животных, по всей вероятности, увеличивается необходимость обеспечения как пластических процессов, так и энергетических потребностей. Подтверждением этого предположения является увеличение содержания гиалуронана и суммарных ГАГ на 37-е сутки эксперимента на 27,0 % ($P=0,022$) и 27,4 % ($P=0,021$) соответственно.

С действием каких патогенетических механизмов связаны изменения углеводного обмена в коже в области внутридермального введения коллагенсодержащего препарата, требует дальнейшего изучения. При интрадермальном введении экспериментальным животным техникой мезотерапии ряда препаратов в коже в области инъекции некоторые авторы [16] наблюдали воспалительную реакцию тканей дермы, сопровождающуюся развитием отёка, умеренной нейтрофильной инфильтрацией, которая в динамике сменялась на лимфоцитарно-макрофагальную. Не исключена подобная реакция

кожи на процедуру внутридермального введения препарата, содержащего нативный коллаген типа I из кожи крупного рогатого скота, и в условиях нашего эксперимента.

Показатели обмена углеводов в коже белых крыс в области внутридермального введения коллагенсодержащего препарата, Ме [Q₁-Q₃]

Показатели	Контрольная группа, n=16	Опытная группа				
		2-е сутки, n=10	4-е сутки, n=12	7-е сутки, n=14	21-е сутки, n=12	37-е сутки, n=14
Лактат, мкмоль/г ткани	1,01 [0,78-1,16]	1,23 [0,96-1,39] P=0,048	1,28 [1,03-1,42] P=0,034	1,56 [1,25-1,66] P<0,0001	0,83 [0,8-1,14] P=0,604	0,9 [0,84-1,16] P=0,311
Пируват, нмоль/г ткани	57 [46-72]	54 [48-71] P=0,812	52 [50-80] P=0,804	54 [42-69] P=0,783	51 [47-72] P=0,233	64 [52-78] P=0,196
Лактат Пируват	17,7 [15,3-19,2]	22,7 [19,0-25,4] P=0,007	24,6 [22,3-28,6] P=0,004	33,1 [25,6-35] P<0,0001	16,3 [14,4-18,2] P=0,044	14,0 [12,3-17,4] P=0,038
Гексокиназа, нмоль/мин.*мг белка	4,2 [3,4-4,8]	3,84 [3,1-4,4] P=0,108	4,3 [3,38-4,53] P=0,777	3,96 [3,5-4,6] P=0,277	5,32 [4,37-5,6] P=0,022	5,62 [5,5-6,36] P=0,018
Г-6-фДГ, мкмоль/сек*мг белка	1,03 [0,99-1,21]	0,76 [0,69-0,83] P=0,038	0,74 [0,64-0,82] P=0,013	0,74 [0,62-0,8] P=0,011	1,52 [1,33-1,69] P=0,01	1,5 [1,4-1,72] P=0,016
ЛДГ, Ед/мг белка	0,18 [0,16-0,21]	0,26 [0,22-0,3] P=0,028	0,27 [0,22-0,34] P=0,025	0,24 [0,18-0,27] P=0,036	0,20 [0,16-0,28] P=0,134	0,20 [0,16-0,27] P=0,211
Гликоген, мг/г ткани	3,93 [3,42-4,53]	2,84 [2,01-2,94] P=0,011	3,09 [2,49-3,31] P=0,024	2,65 [2,31-3,03] P=0,004	3,46 [3,22-3,92] P=0,388	3,48 [3,28-4,11] P=0,419
Суммарные ГАГ, ммоль гексуронида/г ткани	16,8 [14,3-20,4]	15,7 [14,2-19,9] P=0,242	16,0 [14,3-21,1] P=0,270	15,4 [14,1-19,7] P=0,087	18,9 [15,7-20,5] P=0,036	21,4 [16,2-24,6] P=0,022
ГК, мг гексуронида/г ткани	277 [246-303]	258 [241-286] P=0,364	249 [230-290] P=0,193	248 [232-294] P=0,098	332 [287-372] P=0,037	354 [327-368] P=0,021

Усиление биосинтетических процессов в более отдалённые сроки наблюдения после завершения инъекций препарата подтверждается не только повышением содержания в ткани кожи таких компонентов внеклеточного матрикса как гиалуронан и протеогликаны, наблюдаемые в наших экспериментах на 21-е и 37-е сутки, но увеличением уровня суммарного коллагена и его нейтрально-растворимой фракции, установленным в ранее проведённых исследованиях при введении этого же коллагенсодержащего препарата [17].

Заключение

В коже экспериментальных животных в области внутридермального введения техникой мезотерапии препарата, содержащего немодифицированный коллаген типа I, в первые дни усиливаются процессы анаэробного окисления углеводов с мобилизацией гликогена. В более отдалённые сроки происходит интенсификация аэробного окисления углеводов по гексозомонофосфатному и гексозодифосфатному путям с активацией образования суммарного содержания гликозаминогликанов и гиалуроновой кислоты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гунин А.Г., Корнилова Н.К., Петров В.В., Васильева О.В. Возрастные изменения численности и пролиферации фибробластов коже человека // Успехи геронтологии. 2011. Т. 24, № 1. С. 43-47.
2. Iudinsteva N.M., Blinova M.I., Pinaev G.P. Characteristics of sytoskeleton organization of human normal postnatal, scar and embryonic skin fibroblasts spreading on different proteins of extracellular matrix // Tsitologia. 2008. Vol. 50 (10). P. 361-367.
3. Greco M., Dame G., Rittie L. et al. Marked aging-related decline in efficiency of oxidative phosphorylation in human skin fibroblasts // FASEB J. 2003. Vol. 17 (23). P. 1706-1708.
4. Ishida Y., Kimura A., Takayasu T. et al. Detection of fibroblastes in human skin wounds and its application of wound age determination // Int. J. Legal. Med. 2009. Vol. 123. P. 299-304.
5. Varani J., Dame M.K., Rittie L. et al. Decreased collagen production in chronologically agea skin. Roles of age. dependet alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation // Am. J. Pathol. 2006. Vol. 168, № 6. P. 1861-1868.
6. Кошевенко Ю.Н. Кожа человека: в 2-х томах. Т. 1. Структура, физиология и предназначение функциональных элементов кожного органа человека. М.: Медицина, 2006. 300 с.
7. Кубанова А.А., Смолянников В.А., Служаева Н.Г. Старение кожи и возможности коррекции препаратом коллагена // Вестник дерматологии и венерологии. 2006. №5. С. 70-73.
8. Ruszczak Z. Effect of collagen matrices on dermal wound healing // Adv. Drug. Deliv. Rev. 2003. Vol. 55(12). P. 1595-1611.
9. Асатиани В.С. Ферментные методы анализа. М.: Наука, 1969. 740 с.
10. Прохорова М.И. Методы биохимических исследований. Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. 272 с.
11. Башкатов С.А. Гликозаминогликаны в биохимических механизмах адаптации организма. Уфа: Изд-во БашГУ, 1996. 144 с.
12. Шараев П.Н., Пешков В.Н., Зубарев О.Н. и др. Биохимические методы анализа показателей обмена показателей биополимеров соединительной ткани. Ижевск, 1990. 22 с.
13. Алексахина Н.В., Ситина Н.Ю., Щербатых Л.Н. Солюбилизация, очистка и некоторые свойства гексокиназы митохондрий скелетных мышц крыс // Биохимия. 1973. Т. 38, № 5. С. 915-921.
14. Медицинские лабораторные технологии и диагностика: справочник в 2-х томах / под ред. А.И. Карпищенко. Т. 2. СПб.: Интермедика, 1999. 656с.
15. Clark M.G., Lardy H.A. Regulation of Intermediary Carbohydrate Metabolism // MTP Int. Rev. Sei. 1975. Vol. 5 (1). P. 391-425.
16. Михайлова Н.П., Шехтер А.Б., Руденко Т.Г. Морфологическое исследование результатов подкожного введения гелей гиалуроновой кислоты // Мезотерапия. 2013. № 24/04. С. 6-16.
17. Сельская Б.Н., Капулер О.М., Камиллов Ф.Х. Влияние внутридермального введения коллагенсодержащего препарата экспериментальным животным на содержание коллагена в коже // Медицина: актуальные вопросы и тенденции развития: материалы VII научно-практической конференции (электронное издание). Краснодар, 2016. С. 65-70.

Поступила в редакцию 22.05.17

B.N. Selskaya, O.M. Kapouler, V.G. Ivanov, F.Kh. Kamilov

CARBOHYDRATE METABOLISM IN THE SKIN AT THE INTRADERMAL INJECTION OF THE DRUG CONTAINING NON-MODIFIED TYPE I COLLAGEN

The aim of the research was to study the nature of the changes of carbohydrate oxidation, the level of the major polysaccharides of the skin of experimental animals in the area of intradermal injection of collagen-containing preparation. The experiments were carried out in 78 female rats of mature age (12-13 months) with intradermal injection of a preparation containing 7 % modified bovine collagen, twice on 1st and 6th day of the experiment on the lateral surface of the skin following removal of wool from the calculation of 0, 06 ml/100 g body mass by mesotherapy. On the 2nd, 4th, 7th, 21st and 37th day in the skin in the area of drug injection the content of lactic and pyruvic acids, glycogen, the amount of glycosaminoglycans (GAGS) and hyaluronic acid (ha), the activity of hexokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase (LDH) were determined. As a result of the studies, it was established that in a few days after injection of the drug in the skin the level of lactate increases, as well as the ratio of lactate/pyruvate and the LDH activity. The activity of hexokinase and glycogen content decrease. The activity of G-6-f-DG and the concentration of GAG and hyaluronic acid do not undergo statistically significant changes. In more remote periods of observation (21 and 37 days) there is a decline of the ratio lactate/pyruvate below control values, the increase in the activity of hexokinase and G-6-f-DG, the content of GAG and hyaluronic acid. The obtained data allow to come to the conclusion that in the first days after intradermal introduction of collagen the processes of anaerobic oxidation of carbohydrates and glycogenolysis intensify in the skin. In more distant periods, activation of aerobic oxidation by hexose-diphosphate and hexosomonophosphate pathways with intensification of biosynthesis of hyaluronium and total glycosaminoglycans is observed.

Keywords: skin, metabolism of carbohydrates, the effect of collagen preparation.

REFERENCE

1. Gunin A.G., Kornilova N.K., Petrov V.V. and Vasil'eva O.V. [Age changes in the number and proliferation of fibroblasts to human skin], in *Uspehi gerontologii*, 2011, vol. 24, no 1, pp. 43-47 (in Russ.).
2. Iudinsteva N.M., Blinova M.I. and Pinaev G.P. Characteristics of sytoskeleton organization of human normal post-natal, scar and embryonic skin fibroblasts spreading on different proteins of extracellular matrix, in *Tsitologia*, 2008, vol. 50 (10), pp. 361-367.
3. Greco M., Dame G., Rittie L. et al. Marked aging-related decline in efficiency of oxidative phosphorylation in human skin fibroblasts, in *FASEB J.*, 2003, vol. 17 (23), pp. 1706-1708.
4. Ishida Y., Kimura A., Takayasu T. et al. Detection of fibroblastes in human skin wounds and its application of wound age determination, in *Int. J. Legal. Med.*, 2009, vol. 123, pp. 299-304.
5. Varani J., Dame M.K., Rittie L. et al. Decreased collagen production in chronologically agea skin. Roles of age. dependet alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation, in *Am. J. Pathol.*, 2006, vol. 168, no 6, pp. 1861-1868.
6. Koshevenko Ju.N. *Kozha cheloveka: v 2-h tomah. T. 1. Struktura, fiziologija i prednaznachenie funkcionalj-nyh elementov kozhnogo organa cheloveka* [Human skin: in 2 volumes. Vol.1. Structure, physiology and function of functional elements of the human skin organ], M.: Medicina, 2006, 300 p. (in Russ.).
7. Kubanova A.A., Smol'jannikov V.A. and Sluzhaeva N.G. [Aging of the skin and the possibility of correction with a collagen preparation], in *Vestnik dermatologii i venerologii*, 2006, no 5, pp. 70-73 (in Russ.).
8. Ruszczak Z. Effect of collagen matrices on dermal wound healing, in *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 2003, vol. 55(12), pp. 1595-1611.
9. Asatiani V.S. *Fermentnye metody analiza* [Enzymatic methods of analysis], M.: Nauka, 1969, 740 p. (in Russ.).
10. Prohorova M.I. *Metody biohimicheskikh issledovanij* [Methods of biochemical research], L.: Izd-vo LGU, 1982, 272 p. (in Russ.).
11. Bashkatov S.A. *Glikozaminoglikany v biohimicheskikh mehanizmah adaptacii organizma* [Glycosaminoglycans in the biochemical mechanisms of adaptation of the organism], Ufa: Izd-vo Bash GU, 1996, 144 p. (in Russ.).
12. Sharaev P.N., Peshkov V.N., Zubarev O.N. i dr. *Biohimicheskie metody analiza pokazatelej obmena pokazatelej biopolimerov soedinitel'noj tkani* [Biochemical methods for analyzing indicators of the exchange of biopolymer indicators of connective tissue], Izhevsk, 1990, 22 p. (in Russ.).
13. Aleksahina N.V., Sitina N.Ju. and Scherbatyh L.N. [Solubilization, purification and some properties of hexokinase mitochondria of skeletal muscles in rats], in *Biohimija*, 1973, vol.38, no 5. pp. 915-921 (in Russ.).
14. *Medicinskie laboratornye tehnologii i diagnostika: spravochnik v 2-h tomah* [Medical laboratory technologies and diagnostics: a guide in 2 volumes], Karpischenko A.I. (ed.), vol. 2, SPb.: Intermedika, 1999, 656 c. (in Russ.).
15. Clark M.G. and Lardy H. A. Regulation of Intermediary Carbohydrate Metabolism, in *MTP Int. Rev. Sei.*, 1975, vol. 5 (1), pp. 391-425.
16. Mihajlova N.P., Shehter A.B., Rudenko T.G. [Morphological study of the results of subcutaneous introduction of hyaluronic acid gels], in *Mezoterapija*, 2013, no 24/04, pp. 6-16 (in Russ.).
17. Sel'skaja B.N., Kapuler O.M. and Kamilov F.H. [Influence of intradermal administration of a collagen-containing preparation to experimental animals on collagen content in the skin], in *Materialy VII nauchno-prakticheskoy konferencii «Medicina: aktual'nye vopro-sy i tendencii razvitija»*, (elektronnoe izdanie), Krasnodar, 2016, pp. 65-70 (in Russ.).

Сельская Бэла Натановна, аспирант
E-mail: centrdbgmy@mail.ru

Камилов Феликс Хусаинович,
доктор медицинских наук, профессор
E-mail: centrdbgmy@mail.ru

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный
медицинский университет»
450008, Россия, г. Уфа, ул. Ленина, 3

Капулер Ольга Марселевна,
доктор медицинских наук
ЗАО «Косметологическая лечебница»
450009, Россия, г. Уфа, ул. Комсомольская, 37

Иванов Вадим Геннадьевич,
кандидат медицинских наук, доцент кафедры
клинической и лабораторной диагностики
ФГБОУ ВО «Ижевская государственная
медицинская академия»
426034, Россия, г. Ижевск, ул. Коммунаров, 281

Selskaya B.N., postgraduate student
E-mail: centrdbgmy@mail.ru

Kamilov F.Kh.,
Doctor of Medicine, Professor
E-mail: centrdbgmy@mail.ru

Bashkir State Medical University
Lenina st., 37, Ufa, Russia, 450008

Kapouler O.M.,
Doctor of Medicine
CJSC "Cosmetic clinic"
Komsomolskaya st., 37, Ufa, Russia, 450009

Ivanov V.G.,
Candidate of Medicine, Associate Professor
at Department of Clinical and Laboratory Diagnostics
Izhevsk state medical Academy
Kommunarov st., 281, Izhevsk, Russia, 426034