

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Галеева А.Г., 2017

УДК 577.124:547.995.15:615.032:611.77]-092.9

DOI:10.23888/HMJ20172152-157

**ОБМЕН УГЛЕВОДОВ В КОЖЕ КРЫС В ОБЛАСТИ
ВНУТРИДЕРМАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ПРЕПАРАТА
ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОГО НАТИВНОГО ГИАЛУРОНАНА**

А.Г. ГАЛЕЕВА

Башкирский государственный медицинский университет,
ул. Ленина, 3, 450008, г. Уфа, Российская Федерация

У самок белых крыс зрелого возраста (11-12 месяцев) массой 280-320 г при ин-тердермальном трёхкратном введении препарата нестабилизированной высокомо-лекулярной гиалуроновой кислоты изучали содержание в коже в области инъекциро-вания следующие показатели углеводного обмена: пируват, лактат, активность гек-сокиназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы, уровни гликоге-на, гликозаминогликанов суммарно и гиалуроновой кислоты. Препарат, содержа-щий 13,5 мг/мл геля гиалуронана с молекулярной массой 1 млн Да вводили на 1-й, 3-й и 6-й день эксперимента методом мезотерапии. Содержание показателей угле-водного обмена и активность ферментов изучали на 2-е, 4-е, 7-е, 21-е и 37-е сутки опыта. Результаты исследования позволили придти к заключению, что внутридер-мальное курсовое введение препарата высокомолекулярной нативной гиалуроновой кислоты методом мезотерапии приводит в коже в зоне инъекции в первые дни к по-вышению процессов анаэробного окисления углеводов с мобилизацией гликогена. Об этом свидетельствуют статистически значимое увеличение в коже содержания молочной кислоты на 2-е, 4-е и 7-е сутки эксперимента до 120,8%, 144,8% и 139,8%, соотношения лактат/пируват до 118,2%, 152,3% и 146,9%, уменьшение содержания гликогена до 90,1%, 76,8% и 78,6% с повышением активности лактатдегидрогеназы до 138,9%, 133,3% и 139,1% соответственно. В отдалённые сроки после проведения курсовой терапии препарата гиалуронана в коже происходит активация процессов аэробного окисления с усилением использования глюкозы на биосинтетические це-ли, что находит своё отражение в достоверном увеличении на 37-е сутки эксперимен-та активности гексокиназы до 133,3% и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы до 164,1%, снижении коэффициента лактат/пируват до 80,7%, повышении концентрации гиа-луронана до 130% и общих гликозаминогликанов до 114,3%. Изменение в обмене уг-леводов в коже в области внутридермального введения препарата высокомолеку-лярной нативной гиалуроновой кислоты является отражением улучшения обменных процессов, позволяющих пролонгировать эстетический эффект мезотерапии.

Ключевые слова: высокомолекулярный гиалуронан, интердермальное введение, об-мен углеводов кожи.

CARBOHYDRATE METABOLISM IN THE SKIN RATS IN INTRADERMAL ADMINISTRATION OF THE PREPARATION OF HIGH-MOLECULAR NATIVE HYALURONAN

A.G. GALEEVA

Bashkir State Medical University, Lenina str., 3, 450008, Ufa, Russian Federation

At females of white rats of mature age (11-12 months) weighing 280-320 g at interdermal triple introduction of medicine of not stabilized high-molecular hyaluronic acid studied contents in skin in the field of an injection the following indicators of carbohydrate exchange: pyruvate, lactate, activity of a hexokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, levels of a glycogen, glycosaminoglycan totally and hyaluronic acid. The medicine containing 13,5 mg/ml of gel of a hyaluronan with a molecular weight of 1 million. It was entered for the 1st, 3rd and 6th day of an experiment by a mesotherapy method. The maintenance of indicators of carbohydrate exchange and activity of enzymes studied for the 2nd, 4th, 7th, 21st and 37th days of experience. Results of a research have allowed to come to conclusion that interdermal course introduction of medicine of high-molecular native hyaluronic acid by method of a mesotherapy brings in skin in an injection zone in the first days an increase in processes of anaerobic oxidation of carbohydrates with mobilization of a glycogen. Ratios a lactate/pyruvate to 118,2%, 152,3% and 146,9%, reduction of maintenance of a glycogen to 90,1%, 76,8% and 78,6% with increase in activity of a lactated ehydrogenesis to 138,9%, 133,3% and 139,1% respectively testify to it statistically significant increase in skin of content of lactic acid for the 2nd, 4th and 7th days of an experiment to 120,8%, 144,8% and 139,8%. In the remote terms after performing course therapy of medicine of a hyaluronan in skin there is an activation of processes of aerobic oxidation to strengthening of use of glucose on the biosynthetic purposes that finds the reflection in reliable increase for the 37th days of an experiment of activity of a hexokinase up to 133,3% and glucose-6-Phosphatdehydrogenesis to 164,1%, decrease in coefficient a lactate/pyruvate to 80,7%, increase in concentration of a hyaluronan to 130% and the general glycosaminoglycan to 114,3%. Change in exchange of carbohydrates in skin in the field of interdermal introduction of medicine of high-molecular native hyaluronic acid is reflection of improvement of the exchange processes allowing to prolong esthetic effect of a mesotherapy.

Keywords: high-molecular hyaluronan, interdermal injection, exchange of carbohydrates of skin.

Кожа характеризуется высоким содержанием и интенсивным обменом полисахаридов. Период полураспада гиалуронана в коже человека составляет 24-48 ч [1], в коже крысы, кролика 2,4-4 суток [2].

Оба компонента дисахаридного фрагмента полимера гиалуронана являются производными глюкозы, синтезируются из глюкозы и состояние обмена глюкозы при внутридермальном введении гиалуроновой кислоты представляет несо-

мненный интерес, поскольку широко используемый в эстетической медицине и косметологии гиалуронан в составе различных препаратов химически идентичен гиалуронану дермы и отличается лишь количеством дисахаридных звеньев [3, 4].

Цель исследования

Охарактеризовать обмен углеводов в коже при внутридермальном курсовом введении препарата высокомолекулярного гиалуронана экспериментальным животным.

Материалы и методы

В опытах были использованы 114 самок крыс зрелого (11-12 месяцев) возраста, которые содержались в виварии при сбалансированном питании и естественном освещении. При проведении экспериментов соблюдали этические нормы и рекомендации по гуманному отношению к животным, изложенным в Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях, а также приказ Минздрава РФ от 19.06.2013 г. №267 «Об утверждении правил лабораторной практики».

В работе использовали препарат «Juvederm Hydrate™», содержащий в 1 мл фосфатного буфера pH 7,2 13,5 мг геля гиалуроновой кислоты и 9 мг маннитола. Введение препарата производили под лёгким эфирным наркозом интердермально техникой мезотерапии на боковую поверхность туловища (площадь 3x3 см) после предварительного удаления шерстяного покрова из расчёта 0,06 мл на 100 г массы тела крысы трижды на 1-е, 3-и и 6-е сутки эксперимента. Контрольной группе животных также интердермально инъецировали стерильный физиологический раствор.

Животных выводили из эксперимента мгновенной декапитацией под лёгким эфирным наркозом на 2-е, 4-е, 7-е, 21-е и 37-е сутки.

В коже в областях инъекции препарата гиалуронана и физиологического раствора изучали содержание гликогена [5] с последующим определением глюкозы в гидролизате глюкозооксидазным методом (реагенты ООО «Ольвекс Диагностикум», Россия), гиалуронана [6], суммарных гликозаминогликанов [7], пирувата [8], лактата (реагенты ООО «Ольвекс Диагностикум»), активность гексокиназы [9], лактатдегидрогеназы (реагенты ООО «Ольвекс Диагностикум») и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [10]. Содержание белка в пробах определяли по Лоури.

Статистическую обработку результатов осуществляли, используя пакет про-

грамм Statistica 6,0 for Window, рассчитывали медиану, верхний и нижний квартили. Межгрупповые различия показателей оценивали по U-критерию Манна-Уитни.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования показали, что в коже животных в области введения препарата гиалуроновой кислоты содержание пировиноградной кислоты не претерпевает существенных изменений (табл. 1). При этом уровень молочной кислоты после введения препарата повышается, достигая статистически значимых различий на 2-е, 4-е и 7-е сутки, характеризуя усиление анаэробного окисления глюкозы. Показательно в этом отношении динамика изменений лактат/пируват. У крыс 1-й, 2-й и 3-й групп (на 2-е, 4-е и 7-е сутки эксперимента) этот коэффициент возрастает, отражая превалирование анаэробных процессов утилизации глюкозы, а на поздних сроках эксперимента (21-е и 37-е сутки) – снижается, характеризуя усиление аэробного окисления.

Об изменении обмена глюкозы в коже при внутридермальном введении препарата гиалуронана свидетельствуют и результаты определения активности ферментов. Активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) повышалась в первые дни эксперимента, подтверждая данные определения лактата и пирувата, свидетельствующие об усилении анаэробного окисления глюкозы.

Активность ключевого фермента обмена глюкозы – гексокиназы, наоборот, статистически значимо увеличивалась в поздние сроки после инъекции препарата гиалуронана, отражая интенсификацию потребления глюкозы. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-фДГ) в первые дни при курсовом введении гиалуронана снижалась, а на 21-е и 37-е сутки опыта была статистически значимо выше контрольных значений. Увеличение окисления глюкозы по гексозомонофосфатному пути характеризует повышение продукции восстановленного НАДФН и фосфорных эфиров пентоз, используемых на биосинтетические цели.

**Изменение показателей обмена углеводов в коже животных
в области введения препарата гиалуронана**

| Показатели | Контрольная группа n=24 | Опытная группа животных | | | | |
|---|----------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | 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] | 0,049 [0,04-0,056] | 0,054 [0,048-0,06] | 0,049 [0,04-0,061] | 0,065 [0,061-0,07] |
| Лактат, мкмоль/г ткани | 0,96 [0,76-1,13] | 1,16* [0,97-1,43] | 1,39*** [1,3-1,42] | 1,34*** [1,31-1,40] | 0,80 [0,75-0,84] | 0,92 [0,83-1,04] |
| Лактат/пируват | 17,6 [14,2-18,8] | 20,8** [19,2-22,5] | 26,8** [25,2-29,7] | 25,8** [23,6-27,0] | 15,3 [13,3-17,1] | 14,2* [13,2-15,6] |
| Гексокиназа, нмоль НАДФН мг белка ⁻¹ мин ⁻¹ | 4,2 [3,1-4,8] | 4,6 [4,0-4,9] | 3,8 [3,1-4,5] | 3,9 [3,3-4,6] | 5,3* [4,1-5,8] | 5,6*** [4,4-6,2] |
| ЛДГ, Ед/мг белка | 0,18 [0,16-0,21] | 0,25* [0,21-0,29] | 0,24* [0,18-0,29] | 0,25* [0,17-0,28] | 0,21 [0,18-0,30] | 0,20 [0,2-0,24] |
| Г-6-ф ДГ, Ед/мг белка | 1,03 [0,99-1,21] | 0,78* [0,72-0,84] | 0,75** [0,7-0,84] | 0,80* [0,73-1,04] | 1,44*** [1,21-1,56] | 1,69*** [1,41-1,80] |
| Гликоген, мг/г ткани | 3,93 [3,42-4,53] | 3,7 [3,54-4,32] | 3,02** [2,75-3,5] | 3,09* [2,45-4,07] | 3,35* [2,9-3,65] | 3,69 [3,01-4,35] |
| ГАГ сумм., моль гексуроновых кислот/ г ткани | 16,8 [14,3-20,4] | 30,4*** [25,1-33,3] | 30,8*** [26,2-34,6] | 34,0*** [27,2-36,5] | 18,8 [15,6-23,7] | 19,2* [15,8-24,6] |
| Гиалуронан, мг гексуроновых кислот/ г ткани | 274 [246-303] | 678*** [576-795] | 623*** [583-710] | 607*** [570-645] | 305** [271-400] | 357** [332-374] |

Примечание: * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001.

У опытной группы животных в первые дни после инъекции препарата гиалуронана в коже содержание гликогена снижалась, а уровень суммарных гликозаминогликанов (ГАГ) и гиалуроновой кислоты резко увеличивался. Снижение гликогена, очевидно, связано с усилением его мобилизации на обеспечение энергетических и других процессов на фоне некоторого падения активности гексокиназы. Увеличение уровня ГАГ и гиалуронана на следующие сутки после внутридермального введения гиалуроновой кислоты извне вполне объяснимо его накоплением, поскольку основная масса (99%) полисахарида находится во внеклеточном пространстве в свободном состоянии [3]. Статистически значимое увеличение гиалуронана в коже опытных животных на 21-е и 37-е сутки свидетельствует об усилении биосинтетических процессов с образованием полисахаридов *de novo*. Повышение

активности гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в эти же сроки эксперимента не противоречат данному предположению.

В практике эстетической медицины препарат гиалуронан в настоящее время используется не только с целью восстановления оптимальных параметров вязкоэстетических и других биомеханических свойств ткани, но и как модулятор процессов пролиферации и функционального состояния фибробластов, стимулятор неоангиогенеза, биосинтеза коллагена и других компонентов межклеточного матрикса [3, 4, 11]. Изменения в обмене углеводов в коже в области внутридермального введения препарата гиалуронана являются отражением этих процессов.

Выводы

1. Внутридермальное курсовое введение препарата высокомолекулярной нативной гиалуроновой кислоты методом

мезотерапии приводит в зоне инъекции в коже в первые дни к повышению процессов анаэробного окисления углеводов с мобилизацией гликогена. Об этом свидетельствуют увеличение в коже содержания молочной кислоты и соотношения лактат/пируват с повышением активности лактатдегидрогеназы.

2. В отдалённые сроки после проведения курсовой терапии препарата гиалу-

ронана в коже происходит активация процессов аэробного окисления с усилением использования глюкозы на биосинтетические цели, что находит своё отражение в увеличении активности гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, снижении коэффициента лактат/пируват, повышении концентрации гиалуронана и общих гликозаминогликанов.

Конфликт интересов отсутствует.

Литература

1. Кошевенко Ю.Н. Кожа человека: в 2-х т. М.: Медицина, 2006. Т. 1. 360 с.

2. Слуцкий Л.И. Биохимия нормальной и патологически изменённой соединительной ткани. Ленинград: Изд-во «Медицина», 1969. 374 с.

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

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

5. Good C., Cramer H., Somogyi M. The determination of glycogen // J. Biol. Chem. 1933. Vol. 2. P. 485-497.

6. Башкатов С.А. Гликозаминогликаны в механизмах адаптации организма. Уфа: Изд-во Башкирского ГУ, 1995. 144 с.

7. Шараев П.Н., Пешков В.Н., Зубарев О.Н. и др. Биохимические методы анализа показателей обмена биополимеров соединительной ткани. Ижевск, 1990. 22 с.

8. Асатиани В.С. Ферментные методы анализа. М.: Наука, 1969. С. 201-203.

9. Алексахина Н.В. Сетина Н.Ю., Щербатых Л.Н. Солюбилизация, очистка и некоторые свойства гексокиназы скелетных мышц крыс // Биохимия. 1973. Т. 38, №5. С. 915-921.

10. Медицинские лабораторные технологии и диагностика: справочник / под ред. проф. А.И. Карпищенко. СПб.: Интермедика, 1999. С. 24-25.

11. Михайлова Н.П., Шехтер А.Б. Сравнительное исследование взаимодей-

ствия инъекционных гелей немодифицированной и модифицированной гиалуронозой кислоты с биотканью // Вестник эстетической медицины. 2014. Т. 13, №3-4. С. 55-62.

References

1. Koshevenko YN. *Kojacheloveka [Human skin]* v 2-h t. Moscow: Medicina, 2006; 1: 360 p. (in Russian)

2. Slushzkij LI. *Biohimija normal`noi i patologicheski izmenennoi soedinitel`noi tkani [Biochemistry of normal and pathologically altered connective tissue]*. Leningrad: Izd-vo «Medicina»; 1969. 374 p. (in Russian)

3. Habarov VN, Baikov PYa, Selyanin MA. *Gialuronovaya kislota [Hyaluronic acid]*. Moscow: Prakticheskaya medicina; 2012. 224 p. (in Russian)

4. Chaikovskya EA. *Gialuronovaya kislota i ee frakcij. Biologicheskie funkcij v rakurse farmakoterapij [Hyaluronic acid and its fractions. Biological functions pharmacotherapy foreshortened]*. In`ekcionnye metody i kompozishchij [Injection methods and compositions]. 2012; 1: 9-16. (in Russian)

5. Good C, Cramer H, Somogyi M. The determination of glycogen. *J. Biol. Chem.* 1933; 2: 485-97.

6. Bashkatov SA. *Glycosaminoglycany v mehanizmah adaptacii organizma [Glycosaminoglycans in the body's mechanisms of adaptation]* Ufa: Izd-vo Bashkirskogo GU; 1995. 144 p. (in Russian)

7. Sharaev PN, Peshkov BN, Zubarev ON [i dr.]. *Biohimicheskie metody analiza pokazateley obmena biopolimerov soedinitel`noi tkani [Biochemical analysis of the indicators of exchange of connective tissue biopolymers]*. Izhevsk; 1990. 22 p. (in Russian)

8. Asatiani VS. *Fermentnye metody analiza [Enzymatic methods of analysis]*, Moscow: Nauka; 1969. P. 201-3. (in Russian)

9. Aleksahina NB, Setina NYu, Shcherbatyh LN. Solubilizacija, ochistka i nekotorye svoistva geksokinazi skeletnyh myshzkrys [Solubilization, purification and some properties of rat skeletal muscle hexokinase]. *Biohimija [Biochemistry]*. 1973; 38 (5): 915-21. (in Russian)

10. *Medicinskie laboratornye tehnologii i diagnostika [Medical laboratory tech-*

nology and diagnostics]. Spravochnik [Directory] / pod red. prof. A.I. Karpishchenko. Saint Petersburg: Intermedika; 1999. P. 24-5. (in Russian)

11. Mihailova NP. Sravnitel'noe issledovanie vzaimodeistvija in'ecirovaniya geley nemodificirovannoi i modificirovannoi gialuronovoi kisloty s biotkan'y [A comparative study of the interaction of the injected gel unmodified and modified hyaluronic acid from biological tissue]. *Vestnic esteticeskoi mediciny [Journal of Aesthetic Medicine]*. 2014; 13 (3-4): 55-62. (in Russian)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ

Галеева А.Г. – аспирант кафедры биологической химии, Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, Российская Федерация.

E-mail: galeevmt@mail.ru

INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Galeeva A.G. – graduate student of biological chemistry, Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation.

E-mail: galeevmt@mail.ru