

На правах рукописи

Сельская Бэла Натановна

**МЕТАБОЛИЗМ КОЛЛАГЕНА И ГЛИКОЗАМИНОГЛИКАНОВ В КОЖЕ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ
ПРИ ИНТРАДЕРМАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ
КОЛЛАГЕНСОДЕРЖАЩЕГО ИНЪЕКЦИОННОГО ПРЕПАРАТА**

03.01.04 – Биохимия (медицинские науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Рязань – 2018

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор **Камилов Феликс Хусаинович**

Научный консультант:

доктор медицинских наук, **Капулер Ольга Марселевна**

Официальные оппоненты:

Быков Илья Михайлович, д.м.н., профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой фундаментальной и клинической биохимии

Бутолин Евгений Германович, д.м.н., профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ижевская государственная медицинская академия», заведующий кафедрой клинической биохимии и лабораторной диагностики факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «___» _____ 2018 года в _____ на заседании диссертационного совета Д 208.084.05 на базе ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России по адресу: 390026 г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (390026, г. Рязань, ул. Шевченко, 34) и на сайте www.rzgmu.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
к.м.н., доцент

Фомина Мария Алексеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Старение населения стало закономерным демографическим показателем во всех экономически развитых странах мира. Повышение качества жизни в условиях постарения населения становится важной задачей медицины. Существенное влияние на качество жизни человека оказывает состояние кожных покровов, которое имеет не только эстетическое, но и биологическое значение (Калиниченко С.Ю. и др., 2014).

Процессы возрастной инволюции кожи у людей вызываются комбинированным воздействием возраста и факторов внешней среды и обнаруживаются уже после 35 лет (Кошевенко Ю.Н., 2006; Родионов А.Н., 2012). Внешние признаки старения кожи связаны со снижением количества и функциональной активности клеток, изменениями интенсивности метаболизма и дезорганизацией основных компонентов внеклеточного матрикса, прежде всего коллагенового каркаса дермы, а также протеогликанов и гиалуронана (Кубанова А.А. и др., 2007; Гунин А.Г. и др., 2011). Процессы старения напрямую отражаются на состоянии коллагена кожи (Суховой Ю.Г. и др., 2016). Ведущее значение при этом имеют возрастание количества хаотично образуемых поперечных связей в процессах неферментативного гликирования-AGE (advanced glycation endproducts) и окислительная модификация под влиянием активных форм кислорода (Омельяненко Н.П., Слуцкий Л.П., 2009; Хавинсон В.Х. и др., 2016; Мещанинов В.Н. и др., 2017).

Коррекция возрастных изменений кожи является основным направлением дерматокосметологии. Имеется широкий спектр инъекционных препаратов, но основную долю составляют препараты гиалуроновой кислоты и коллагена (Кубанова, А.А. и др., 2007; Бакина, Е.В., 2016). Препараты коллагена являются перспективным биоматериалом, что связано с его природой как основного структурного белка дермы, обеспечивающего форму, стабильность, трехмерный каркас и механическую прочность ткани, а также упорядоченность межклеточных взаимодействий, миграцию и фиксацию клеток. Препараты коллаген-

на важны в репаративных и инволюционных процессах как естественный субстрат для адгезии, дифференцировки и роста клеток соединительной ткани (Капулер О.М., 2013; Орасмяэ-Медер Т., 2016).

Понимание метаболических процессов и физиологических механизмов, происходящих в коже при старении, является фундаментальной основой для разработки различных методов коррекции инволюционных изменений (Капулер О.М. и др., 2015), однако адекватность их выбора должна быть продиктована этиопатогенетической обоснованностью, предсказуемостью эффекта, удобствами использования. Хотя препараты коллагена для пластики мягких тканей используются сравнительно давно, тем не менее, остается достаточно спорных вопросов, касающихся объективизации эффективности, частоты и кратности применения коллагенотерапии в комплексной программе коррекции инволюционных изменений кожи, механизмов фармакологического эффекта, биохимических процессов, лежащих в основе действия на состояние и пролиферативную активность клеток кожи, характер изменений метаболизма кожи в зонах введения коллагеносодержащих препаратов.

Цель исследования

Охарактеризовать изменения обмена коллагена и гликозаминогликанов в коже экспериментальных животных в зонах интрадермального введения препарата нативного коллагена.

Задачи исследования

1. Провести сравнительный анализ общего содержания коллагена, его соле- и кислоторастворимых фракций, окислительных изменений белков и липидов, активности антиоксидантных ферментов кожи крыс молодого и зрелого возрастов.
2. При внутридермальном введении коллагеносодержащего препарата изучить в коже крыс зрелого возраста уровень коллагена, его нейтральносоле-растворимой и цитратрастворимой фракций, коллагенолитическую активность и концентрацию свободного гидроксипролина.
3. Оценить в коже животных в области интрадермальной инъекции препа-

рата коллагена изменения содержания суммарных и сульфатированных гликозаминогликанов, гиалуроновой кислоты, характер окислительного метаболизма углеводов.

4. Определить в сыворотке крови крыс при внутридермальном введении коллагенсодержащего препарата уровень провоспалительных цитокинов – интерлейкина-1-бета (ИЛ-1 β), фактора некроза опухолей-альфа (ФНО- α) и факторов роста – инсулиноподобного-1 (ИФР-1), трансформирующего-бета1 (ТФР- β 1).

5. Сопоставить выявленные метаболические сдвиги с пролиферативной активностью клеток и гистоморфологическими изменениями кожи крыс зрелого возраста в области интрадермального введения коллагенсодержащего препарата.

Методология и методы исследования

Работа выполнена в период 2014-2018 гг. на кафедре биологической химии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России с использованием научной методологии, основанной на системном подходе, с применением формально-логических, общенаучных и специфических методов. Она является экспериментальным исследованием, проведена на беспородных белых крысах – самках молодого (3-4 месяцев, массой 160-170 г) и зрелого возрастов (12-13 месяцев, массой 280-320 г) (Юшков Б.Г., Черешнев В.А., 2016).

Для решения поставленных цели и задач исследования использовались биохимические, гистохимические, иммуногистохимические и статистические методы. При проведении экспериментов соблюдали требования международных и российских законодательных актов о юридических и этических принципах исследований с использованием лабораторных животных. Организация исследований одобрена этическим комитетом ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России.

Научная новизна

В результате проведенных исследований получены новые данные, характеризующие влияние препарата нативного коллагена крупного рогатого скота

на метаболические и пролиферативные процессы в коже в области внутридермального введения.

Установлены динамика изменений содержания и метаболизма основных компонентов внеклеточного матрикса дермы – коллагена, сульфатированных гликозаминогликанов (ГАГ) и гиалуронана.

Впервые показано, что в первые дни после введения техникой мезотерапии коллагеносодержащего препарата в коже наблюдается активация резорбции, лизиса и катаболизма коллагена, а в отдаленные сроки (3-5 недель) увеличение его содержания с усилением коллагеногенеза. Активацию биосинтетических функций фибробластов кожи в более отдаленные сроки после введения коллагена отражает и увеличение содержания в коже гиалуроновой кислоты, сульфатированных и суммарных ГАГ.

Впервые в области внутридермального введения препарата коллагена охарактеризовано состояние окислительного обмена углеводов. Выявлено превалирование анаэробных процессов с усилением гликогенолиза в первые дни после инъекций, и повышение аэробных процессов по гликолитическому и пентозофосфатному путям окисления в более поздние сроки. Гистохимическими исследованиями показано, что выявленные метаболические изменения в ткани кожи в отдаленные сроки после введения коллагеносодержащего препарата сопровождается активацией биосинтетической функции фибробластов. В сыворотке крови экспериментальных животных при этом наблюдается возрастание уровня ИФР-1 и ТФР- β 1, в коже иммуногистологически определяется увеличение количества клеток, экспрессирующих маркеры пролиферации – белок Ki-67 и фактор роста фибробластов-1 (ФРФ-1), гистохимически – увеличение уровней тонковолокнистого новообразованного коллагена и ГАГ.

Теоретическая и практическая значимость

Показано, что препарат нереконструированного коллагена кожи крупного рогатого скота при внутридермальном введении экспериментальным животным (самки крыс зрелого возраста), вызывает невыраженную воспалительную реакцию с диффузным скоплением макрофагальных клеток в зонах инъекции. При

этом в сыворотке крови повышается уровень цитокинов провоспалительного (ИЛ- β 1, ФНО- α) и противовоспалительного характера действия (ТФР- β 1), в коже наблюдается превалирование анаэробного окисления с активацией распада гликогена, усиливается резорбция и катаболизм коллагена.

Установлено, что введение коллагенсодержащего препарата в более отдаленные сроки (3-5 недель) стимулирует процессы пролиферации фибробластов с усилением их биосинтетической функции, что отражается увеличением содержания коллагена, уровня гиалуроновой кислоты и других ГАГ кожи в зоне инъекций коллагена. Одновременно выявляется активация аэробного окисления глюкозы по гексозомонофосфатному и гексозодифосфатному путям, способствующая энергетическому и пластическому обеспечению течения биосинтетических и пролиферативных процессов. Важную роль в развитии регенеративных процессов в коже под влиянием экзогенного коллагена играют макрофагальные клетки с экспрессией ростовых факторов – ИФР-1, ТФР- β 1 и ФРФ-1.

Полученные данные свидетельствуют о необходимости дальнейшей разработки схем использования инъекционных препаратов нативного коллагена в коррекции участков кожи, подверженных инволюционным и другим изменениям, с учетом воспалительного ответа ткани, а также сроков активации пролиферации клеток кожи и стимуляции биосинтеза собственных биополимеров внеклеточного матрикса. Результаты исследования позволили оформить патенты РФ на изобретение № 2571686 от 25.11.2015 г. и промышленный образец № 101550 от 27.12.2016 г.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Обмен коллагена кожи в области интрадермального введения немодифицированного бычьего коллагена техникой мезотерапии характеризуется в начальный период (2-7-е сутки) усилением катаболических процессов, а в более отдаленные (21-37-е сутки) – анаболических.
2. Внутридермальное введение коллагена сопровождается в коже активацией гликолиза и гликогенолиза, в последующем усилением аэробного окисления глюкозы и биосинтеза гиалуронана и сульфатированных гликозаминогликанов.

3. Препарат немодифицированного бычьего коллагена при внутридермальном введении стимулирует в коже пролиферативные процессы и биосинтетическую функцию фибробластов.

Апробация результатов

Основные результаты диссертации доложены и обсуждены на: VII Международной научно-практической конференции «Медицина: актуальные вопросы и тенденции развития» (Краснодар, 2016); 81-й и 82-й Всероссийских итоговых молодёжных 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); межрегиональной научно-практической конференции с Международным участием «Актуальные вопросы медицинской биохимии и лабораторной диагностики» (Ижевск, 2017); X Юбилейной научно-практической конференции с Международным участием (Казань, 2018); совместном заседании проблемной комиссии «Морфология и общая патология» и кафедры биологической химии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России 25 мая 2018 г.

Внедрение результатов исследования в практику

Основные результаты диссертационного исследования используются в практической деятельности ЗАО «Косметологическая лечебница» г. Уфа (акт от 07.03.2018 г.), образовательном процессе кафедр биологической химии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России (акт от 11.05.18 г.) и ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России (акт от 06.02.2018 г.).

Публикации

Диссертант имеет 14 опубликованных работ по теме диссертации объёмом 3,23 печатных листа, из них 7 статей в научных журналах и изданиях, включенных в перечень рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертаций, 2 патента РФ. 4

работы опубликованы в материалах региональных, российских и международных конференций и симпозиумов.

Объём и структура работы

Диссертация изложена на 168 страницах машинописного текста содержит 10 таблиц и 46 рисунков. Состоит из введения, обзора литературы, главы описания материалов и методов исследования, главы результатов исследования, обсуждения результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений, списка литературы, включающей 299 источников, в том числе, 162 иностранных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Исследования проведены на 170 самках белых крыс зрелого (12-13 месяцев, 280-320г) и 20 – молодого (3-4 месяца, 150-160 г) возраста. Животные содержались в стандартных условиях вивария. Крысам опытной группы вводили препарат «Коллост[®] ГЕЛЬ» (ООО «Ниармедик плюс», Россия), содержащий 7% бычьего коллагена в растворе глюкозы, контрольной группы - изотонический раствор глюкозы. Инъекции проводили внутридермально под лёгким эфирным наркозом техникой мезотерапии на боковые поверхности туловища (площадь 3х3 см) после предварительного удаления шерстяного покрова из расчёта 0,06 мл/100г массы животного, дважды на 1-е и 6-е сутки эксперимента. Животных забивали под эфирным наркозом на 2-е, 4-е, 7-е, 21-е и 37 сутки после первой инъекции препарата.

В сыворотке крови изучали содержания ИЛ-1 β , ФНО- α (реагенты ИФА-ИЛ-1 β , ИФА-ФНО-альфа ТОО «Цитокиновый контур»), ИФР-1 (реагенты IGF-1 ELISA, Mediagnost) и ТФР- β 1 (реагенты TGF- β 1 ELISA, Affimetryхе Bioscience) методом твёрдофазного ИФА на анализаторе «StatFox 2100» согласно протоколу производителей.

В зонах введения препарата и раствора глюкозы в коже боковых поверхностей туловища после обезжиривания смесью этанол-этиловый эфир (1:1) определяли содержание суммарного коллагена (Шараев П.Н. и др.,1990), его нейтральносолеорастворимой (НСРК) и цитратрастворимой (ЦРК) фракций

(Прошина Л.Я., Приваленко М.Н., 1982). Коллагенолитическую активность и содержание свободного гидроксипролина (СГП) исследовали в гомогенатах нативной ткани (Шараев П.Н. и др., 1990). Для характеристики гликозаминогликанов (ГАГ) изучали динамику изменений в коже гиалуроновой кислоты (ГК), сульфатсодержащих и суммарных ГАГ. Суммарные ГАГ определяли по методу, описанному П.Н. Шараевым и др. (1990), гиалуроновой кислоты - по методу M.F. Chaplin, Y.E. Kennedy с изменениями (Башкатов С.А., 1996) сульфатированных ГАГ – методом ИФА (реагенты Wieslab[®] s GAG quantitative kit, Euro Diagnostica A.V.). Состояние углеводного обмена в коже оценивали также по содержанию лактата, пирувата, гликогена, активности гексокиназы, ЛДГ, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-фДГ). Определение лактата осуществляли набором реагентов ООО «Ольвекс Диагностикум», пирувата с использованием лактатдегидрогеназы (ЛДГ) (Асатиани В.С., 1969), гликогена – по G.Good H., Cramer M. Somogyi (1933), активность гексокиназы – по Алексахиной Н.В. и др. (1973). Г-6-фДГ – по G. Glock, Ms. Leon в модификации (Карпищенко А.И., 2012), ЛДГ – набором реагентов ООО «Ольвекс Диагностикум».

Уровень процессов свободнорадикального окисления в коже оценивали по содержанию первичных, вторичных и конечных продуктов (Волчегорский И.А. и др., 2000) перекисного окисления липидов (ПОЛ) в гептан- и изопропаноловых экстрактах, по ТБК-активным соединениям (реагенты ООО «АГАТ-МЕД») и окислительной модификации белков по методу R.L. Levine в модификации (Дубинина Е.Е., 2006), рассчитывали резервно-адаптационный потенциал по Ю.В. Никитиной, И.В. Мухиной (2009). Активность ферментов антиоксидантной защиты – СОД и ГПО изучали наборами реагентов «RANSOD» и «GLUTATIONPEROXIDASE» (Randox Labor. Ltd.), каталазы – по М.А. Королюк и др. (1988).

Ткань кожи в зонах внутридермального введения препарата коллагена и раствора глюкозы была также подвергнута гистологическому и иммуногистохимическому изучению. После стандартной проводки кусочков кожи готовили гистологические срезы на микротоме LEICA 4 RM 2145, окрашивали ге-

матоксилином и эозином, по методу Ван-Гизона, по Маллори, для выявления новообразованных волокон коллагена импрегнировали солями серебра по Футу (Волкова О.В., 1982). Суммарную фракцию ГАГ на срезах определяли окраской по Хейлу (Кононский А.И., 1976). Выраженность пролиферативных процессов изучали путём иммуногистохимического выявления белка Ki-67 и ФРФ-1 с использованием мышинных поликлональных антител (реагенты «Santa Cruz Biotechnology») и универсальной системы детекции «Novocastratm». Окрашивание производили в гистостейнере (LICA BOND MAX) с докраской гематоксилином. Подсчет клеток, экспрессирующих цитокины, производили с помощью микроскопа LEICA ДМ-5000В в 20 полях зрения при увеличении в 400 раз.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Statistica 6,0 (Stat Soft). Тип распределения для выборок определяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. При параметрическом распределении значений оценивали выборочную среднюю арифметическую (\bar{X}) и выборочную стандартную ошибку средней (s_x). При ассиметричном распределении данных применяли критерий непараметрической статистики с определением медианы (Me), верхнего и нижнего квартилей (Q_1 - Q_3). Значимость межгрупповых различий определяли с использованием t-теста Стьюдента при нормальном распределении и U-критерия Манна-Уитни при ассиметричном. Вероятность справедливости нулевой гипотезы принимали за $P \leq 0,05$.

Результаты исследования

Процесс старения кожи сопровождается изменениями содержания, свойств и интенсивности метаболизма коллагена. По мнению большинства авторов, качественные и количественные сдвиги в коллагеновых белках связаны с негативными факторами, среди которых основную роль играют процессы гликации и свободнорадикального окисления (Омельяненко Н.П., Слуцкий Л.П., 2009; Мещанинов, В.Н. и др., 2017; Robins S.P., 2007).

В этой связи нами было проведено сравнительное определение содержания в коже крыс молодого (3-4 месяца) и зрелого (12-13 месяцев) возрастов суммарного коллагена и его растворимых фракций, интенсивности течения

процессов ПОЛ, окислительной модификации белков (ОМБ) и активности антиоксидантных ферментов. Результаты исследования показали (таблица 1), что у животных зрелого возраста в коже выявляется меньшее содержание НСРК, ЦРК, а снижение уровня суммарного коллагена (СК) и свободного гидроксипролина (СГП) не достигает статистической значимости.

Таблица 1 – Содержание свободного гидроксипролина, суммарного коллагена и его фракций в коже самок крыс в зависимости от возраста, $\bar{X} \pm s_x$

Показатели	Молодые, n=10	Зрелые, n=16	P
СГП, моль/г ткани	18,7±0,97	15,5±1,21	0,206
СК, мкмоль ГП/г сухой ткани	294±9,7	258±12,4	0,084
НСРК, мкмоль ГП / г сухой ткани	11,2±0,76	7,9±0,45	0,017
ЦРК, мкмоль ГП / г сухой ткани	16,7±0,28	14,2±0,49	0,038

В ткани кожи крыс зрелого возраста по сравнению с молодыми определяется (таблица 2) более высокое содержание первичных (диеновые конъюгаты), вторичных (кетодиены и сопряжённые триены, ТБК-активные соединения) и конечных (шиффовы основания) продуктов ПОЛ, продуктов ОМБ (алифатические альдегид- и кетон-динитрофенилгидразоны). С увеличением возраста в коже происходит смещение оксидантно-антиоксидантного равновесия с накоплением продуктов ПОЛ и ОМБ. Статистически значимо снижается активность антиоксидантных ферментов – каталазы и ГПО. Об этом свидетельствуют и результаты расчёта резервно-адаптационного потенциала (РАП) – с возрастом увеличивается доля спонтанно образованных продуктов ОМБ относительно металл-индуцированных.

Таблица 2 – Уровень продуктов липопероксидации, окислительной модификации белков и резервно-адаптационного потенциала кожи у самок белых крыс разных возрастных групп, Me[Q₁-Q₃]

Показатели	Возрастные группы		P
	Молодые (3-4 мес.), n=10	Зрелые (12-13 мес.), n=10	
ТБК-АС, нмоль/г ткани	2,27 [1,84-2,79]	2,94 [2,03-3,46]	0,033
ДК (гептановая фаза), усл.ед.	0,244 [0,175-0,288]	0,266 [0,223-0,304]	0,231

Показатели	Возрастные группы		P
	Молодые (3-4 мес.), n=10	Зрелые (12-13 мес.), n=10	
КД и СТ (гептановая фаза), усл.ед.	0,114 [0,096-0,138]	0,142 [0,132-0,154]	0,021
ШО (гептановая фаза), усл.ед.	0,011 [0,010-0,015]	0,016 [0,012-0,021]	0,027
ДК (изопропаноловая фаза), усл.ед.	0,132 [0,120-0,153]	0,204 [0,184-0,233]	0,026
КД и СТ (изопропаноловая фаза), усл.ед.	0,208 [0,184-0,253]	0,286 [0,262-0,298]	0,018
ШО (изопропаноловая фаза), усл.ед.	0,054 [0,036-0,062]	0,074 [0,058-0,089]	0,028
аАДФНГн спонтанно образован- ные, мкмоль/г белка	0,456 [0,432-0,502]	0,504 [0,458-0,532]	0,078
аАДФНГн металлиндуцированные, мкмоль/г белка	1,188 [0,956-1,248]	0,953 [0,85-1,195]	0,023
аАДФНГо спонтанно образован- ные, мкмоль/г белка	0,168 [0,137-0,181]	0,186 [0,148-0,192]	0,054
аАДФНГо металл-индуци- рованные, мкмоль/г белка	1,065 [0,911-1,088]	0,974 [0,922-1,095]	0,038
аКДФНГн спонтанно образован- ные, мкмоль/г белка	16,8 [13,7-20,2]	19,7 [15,3-23,5]	0,031
аКДФНГн металл-индуци- рованные, мкмоль/г белка	186,8 [175,4-200,4]	174,1 [162,7-199,8]	0,724
аКДФНГо спонтанно образован- ные, мкмоль/г белка	3,92 [3,76-4,91]	5,17 [4,67-6,09]	0,044
аКДФНГо металл-индуци- рованные, мкмоль/г белка	27,4 [18,6-29,5]	28,0 [20,7-32,8]	0,822
РАП при 256 нм	84,1 [80,7-86,9]	79,8 [75,1-83,5]	0,034
РАП при 270 нм	61,6 [54,8-63,3]	47,2 [46,0-55,4]	0,051
РАП при 370 нм	90,8 [83,6-92,9]	84,6 [81,1-89,0]	0,048
РАП при 430 нм	85,5 [79,3-87,5]	78,3 [74,6-84,8]	0,038

Примечания: ДК – диеновые конъюгаты, КД и СТ – кетодиены и сопряжённые триены, ШО-шиффовы основания, аАДФНГн – алифатические альдегид-динитрофенилгидразоны нейтрального характера, аАДФНГо – алифатические альдегид-динитрофенилгидразоны основного характера, аКДФНГн – алифатические кетон-динитрофенилгидразоны нейтрального характера, аКДФНГо – алифатические кетон-динитрофенилгидразоны основного характера, РАП – резервно-адаптационный потенциал

Внутридермальное введение препарата нативного коллагена животным зрелого возраста вызывало в зоне инъекций повышение содержания суммарного коллагена и его растворимых фракций (таблица 3). Если увеличение суммарного коллагена в начальные сроки наблюдения (2-7-е сутки) после инъекции препарата можно объяснить суммацией содержания собственного коллагена кожи и экзогенно введённого, то в отдалённые сроки (21-е и 37-е сутки) его повышение связано с интенсификацией синтеза de novo.

Таблица 3 – Содержание суммарного коллагена и его фракций в коже крыс зрелого возраста при внутридермальном введении коллагеносодержащего препарата, $\bar{X} \pm s_x$

Показатели, мкмоль ГП/г сухой ткани	Группы животных					
	Конт-рольная, n=16	Опытная				
		2-е сутки, n=10	4-е сутки, n=10	7-е сутки, n=12	21-е сутки, n=10	37-е сутки, n=12
Суммарный коллаген	256±12,4	381±21,6 P < 0,001	336±16,4 P < 0,001	398±21,3 P < 0,001	301±14,6 P = 0,042	354±22,5 P = 0,009
НСРК	7,9±0,45	10,4±1,23 P = 0,081	9,8±1,04 P = 0,073	11,6±1,21 P = 0,044	14,6±1,07 P = 0,005	14,8±1,36 P = 0,006
ЦРК	14,2±0,49	16,2±0,55 P = 0,035	16,5±0,41 P = 0,030	23,9±1,34 P = 0,005	27,8±1,51 P = 0,004	28,5±1,48 P < 0,001

На усиление биосинтеза коллагена в эти сроки указывает и возрастание уровней НСРК и ЦРК фракций. Одновременно в коже происходит усиление деградации коллагена в области инъекции препарата, что находит своё отражение в увеличении уровня СГП и коллагенолитической активности (КА) кожи (таблица 4). Параллельно увеличивается и содержание СГП.

Таблица 4 – Содержание свободного гидроксипролина и коллагенолитическая активность кожи крыс в зоне внутридермального введения коллагеносодержащего препарата, $\bar{X} \pm s_x$

Показатели	Группы животных					
	Конт-рольная, n=16	Опытная				
		2-е сутки, n=10	4-е сутки, n=10	7-е сутки, n=12	21-е сутки, n=10	37-е сутки, n=12
СГП, мкмоль/г ткани	15,5±1,21	16,3±1,04 P = 0,186	17,8±1,02 P = 0,024	18,8±1,03 P = 0,021	19,2±1,2 P = 0,018	18,7±1,06 P = 0,022
КА, мкмоль ГП/час × г белка	1,28±0,13	1,99 ±0,26 P = 0,042	2,08±0,10 P = 0,002	2,07±1,21 P = 0,022	1,64±0,2 P = 0,058	1,47±0,21 P = 0,084

В целом результаты изучения содержания СК, его фракций, показателей интенсивности катаболизма коллагена позволяют прийти к заключению о том, что внутридермальное введение препарата коллагена стимулирует биосинтез собственного коллагена кожи экспериментальных животных.

Внеклеточный матрикс кожи характеризуется высоким содержанием гиалуроновой кислоты (ГК) и сульфатированных ГАГ, входящих в состав протеогликанов. ГК и протеогликаны создают интегративно-буферную метаболическую среду (основное вещество) экстрацеллюлярного матрикса и выполняют разнообразные физиологические функции в коже. Метаболизм ГАГ кожи характеризуется высокой интенсивностью и определяется состоянием обмена углеводов в целом.

В коже опытной группы крыс содержание гетерополисахаридов (ГК, сульфатированных и суммарных ГАГ) в первую неделю от начала инъекции коллагенсодержащего препарата несколько снижается, в отдалённые сроки статистически значимо повышается (таблица 5).

Таблица 5 – Содержание гликозаминогликанов в коже крыс зрелого возраста в области интрадермального введения препарата коллагена, Ме [Q₁ – Q₃]

Показатели	Группы животных					
	Контрольная, n=16	Опытная				
		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
Гиалуронан, мг гексуро-нида / 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
Суммарные ГАГ, мкмоль гексуро- нида /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	16,4 [14,1- 19,7] P=0,870	18,9 [15,7- 20,5] P=0,036	21,4 [16,2- 24,6] P=0,022
Сульфатирован- ные ГАГ, мкг /г белка	122[115- 131]	120 [115- 130] P=0,781	116 [110- 125] P=0,602	131 [115- 148] P=0,433	158 [144- 165] P=0,041	162 [148- 172] P=0,032

Увеличение содержания ГАГ, очевидно, является результатом усиления их биосинтеза, и оно по времени совпадает с повышением уровня коллагена. ГК и протеогликаны принимают непосредственное участие в формировании колла-

геновых микрофибрилл, фибрилл и волокон, образуя вокруг них своеобразные протеогликановые оболочки (Омельяненко Н.П., Слуцкий Л.И., 2009).

Биосинтез ГАГ требует не только значительных количеств глюкозы, но и большого расхода энергии. Изучение некоторых звеньев обмена углеводов (таблица 6) показывает, что в первые дни при внутридермальном введении препарата коллагена в коже животных наблюдается усиление анаэробного окисления и интенсификация гликогенолиза.

Таблица 6 – Показатели обмена углеводов в коже крыс зрелого возраста в области интрадермального введения немодифицированного препарата бычьего коллагена, Ме [Q₁-Q₃]

Показатели	Группы животных					
	Конт- рольная, n=16	Опытная				
		2-е сутки, n=10	4-е сут- ки, n=12	7-е сут- ки, n=14	21-е сутки, n=12	37-е сут- ки, n=14
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	61 [52-78] P=0,196
Лактат, мкмоль /г ткани	1,01 [0,78- 1,17]	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<0,001	0,83 [0,8-1,14] P=0,604	0,90 [0,84- 1,16] P=0,311
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- 35,0] P<0,001	16,3 [14,4-18,2] P=0,44	14,0 [12,3- 17,4] P=0,38
Гексокиназа, нмоль/мин·мг белка	4,3 [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	5,92 [5,5- ,6,36] P=0,018
Г-6-фДГ, мкмоль/сек·мг белка	1,04 [0,99- 1,21]	0,76 [0,69- 0,83] P=0,028	0,74 [0,64- 0,82] P=0,013	0,73 [0,62- 0,80] P=0,011	1,52 [1,33-1,69] P=0,010	1,50 [1,40- 1,72] P=0,016
ЛДГ, Ед/мг белка	0,17 [0,15- 0,20]	0,26 [0,22- 0,30] 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	3,95 [3,44- 4,58]	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

На 2-е, 4-е и 7-е сутки эксперимента выявляется повышение содержания лактата, соотношения лактат/пируват и активности ЛДГ при снижении актив-

ности гексокиназы, Г-6-фДГ и содержания гликогена. В отдалённые сроки коэффициент лактат/пируват снижается, активность гексокиназы и Г-6-фДГ повышается, а ЛДГ и гликоген достигают уровня животных контрольной группы. Нарастание активности ключевого фермента пентозо-фосфатного окисления – Г-6-фДГ отражает усиление образования пентозофосфатов и восстановленных НАДФН, необходимых для обеспечения биосинтетических процессов.

В целом, результаты, полученные на 21-е и 37-е сутки опыта, свидетельствуют, что в эти сроки происходит активация аэробного окисления и использование глюкозы на биосинтетические цели. Повышение содержания в коже в отдалённые сроки после интрадермального введения коллагенсодержащего препарата НСРК, ЦРК и суммарного содержания коллагена, уровня гиалуроновой кислоты и ГАГ протеогликанов, активности гексокиназы и Г-6-фДГ отражает интенсификацию биосинтетических функций клеток кожи и прежде всего фибробластов (Зорина А.И. и др., 2012).

Процессы пролиферации, функциональной активности зрелых фибробластов контролируется системными и тканевыми (локальными) факторами. Роль тканевых факторов (факторы роста, интерлейкины, морфогены и др.) особенно значительна в течение воспалительной реакции, в регуляции процессов регенерации, модуляции и ремодуляции. В этой связи в следующей серии экспериментов в сыворотке крови у животных опытной группы изучали содержание ИЛ-1 β , ФНО- α , ИФР-1 и ТФР- β 1 (таблица 7).

На 2-7-е сутки после введения препарата в сыворотке крови увеличивался уровень ИЛ-1 β и ФНО- α – провоспалительных цитокинов, отражая воспалительный ответ ткани кожи на внутридермальное введение препарата. На 21-е и 37-е сутки их содержание снижалось до значений у интактных животных. Содержание ИФР-1 увеличивалось в более отдалённые сроки, а в первые сутки эксперимента статистически значимо не повышалось. Концентрация ТФР- β 1 увеличивалась на 4-е сутки опыта и оставалась повышенной в последующие дни наблюдения. ИФР-1 и ТФР- β 1 относятся к группе сигнальных молекул, обладающих плеiotропным действием, однако их основной эффект связан с ин-

дукцией процессов пролиферации и дифференцировки клеток (Hong K.M. et al., 2007). ТФР- β 1 стимулирует также трансдукцию ряда клеток в репаративные фибробласты (Fan, L. et al., 2007), обладает противовоспалительным действием, индуцируя макрофаги фенотипа M2 (Ivashkiv L.V., 2013). Повышение уровня изучаемых факторов роста в более поздние сроки наблюдения, вероятно, характеризует усиление процессов пролиферации и роста клеток кожи и сосудов в области инъекции коллагенсодержащего препарата.

Таблица 7 – Содержание некоторых цитокинов в сыворотке крови крыс зрелого возраста при интрадермальном введении коллагенсодержащего препарата, Ме [Q₁-Q₃]

Показатели, пг/мл	Группа животных					
	Контрольная, n=10	опытная				
		2-е сут, n=10	4-е сут, n=12	7-е сут, n=10	21-е сут, n=10	37-е сут, n=10
ИЛ-1 β	25,3 [22,6-33,2]	35,4 [25,3-39,7] P<0,001	34,5 [26,3-38,5] P<0,001	37,4 [29,3-38,4] P<0,001	25,9 [20,2-33,2] P=0,912	26,5 [19,9-33,2] P=0,902
ФНО- α	11,8 [10,2-13,5]	16,6 [11,8-19,6] P=0,007	19,9 [14,5-24,7] P<0,001	17,6 [11,9-19,4] P=0,003	12,9 [9,9-13,4] P=0,901	12,8 [9,9-15,4] P=0,911
ИФР- α	152 [142-171]	163 [143-175] P=0,393	168 [142-184] P=0,314	180 [162-185] P=0,054	204 [169-198] P<0,001	214 [172-226] P<0,001
ТФР- β 1	3093 [2663-3296]	3212 [3093-3648] P=0,475	3733 [3094-4005] P<0,001	4091 [3693-4993] P<0,001	3478 [3092-3906] P<0,001	3682 [3193-4060] P<0,001

В целях уточнения этих и других возникших в процессе проведения экспериментов вопросов были проведены гистологические и иммуногистохимические исследования. В коже крыс контрольной группы на 2-е сутки после введения глюкозы проявлялись признаки набухания ткани, отёка, разрыхления пучков коллагеновых волокон, на 4-е сутки отёчность тканей снижалась. На 7-е сутки и в последующие сроки кожа крыс контрольной группы имела обычную окраску.

На 2-е сутки в зоне введения препарата также определялись признаки отёка, коллагеновые волокна препарата визуализировались в виде тонковолокнистых коротких структур среда пучков коллагеновых волокон, по ходу вкола инъекционной иглы и в отёчной жидкости в гиподерме выявлялись клеточные

инфильтраты, преимущественно состоящие из макрофагов. На 4-е сутки отдельные волокна введённого коллагена при окраске препаратов по Ван-Гизону становились пикрофильными, что свидетельствует об их лизировании и резорбции макрофагальными клетками (рисунок 1А), количество которых возрастало. К 7-м суткам на уровне сосочкового слоя дермы выявлялись значительные очаги грануляционной ткани (рисунок 1Б), содержащих большое количество различных клеток.

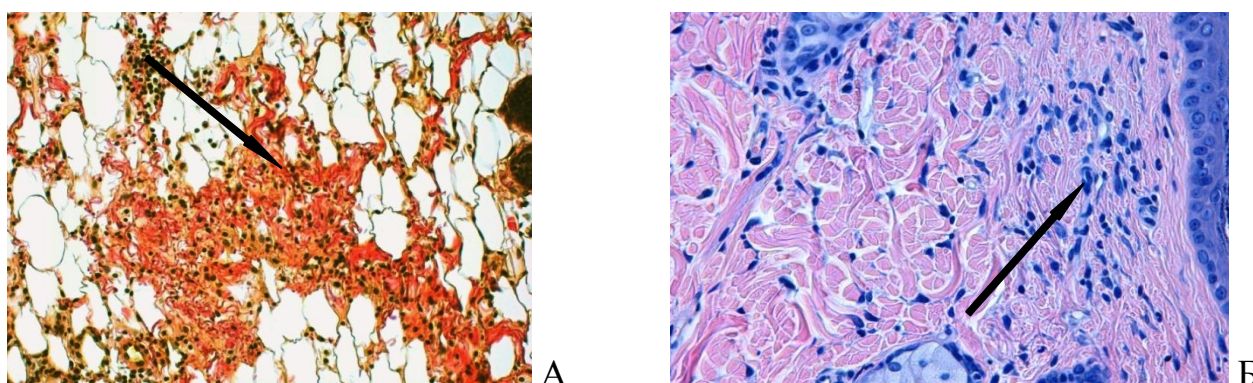


Рисунок 1 – Гистологическая структура кожи крыс опытной группы: А – на 4-е, Б – на 7-е сутки после введения коллагенсодержащего препарата
 А. Пикринофилия (желтое окрашивание) волокон экзогенного коллагена в гиподерме. Окраска по Ван-Гизону. Увел. X200. Б. Усиление клеточной реакции (↑) в дермальной пластинке кожи. Окраска гематоксилином и эозином. Увел. X400

При окраске специфичными методами для выявления волокон соединительной ткани (по Ван-Гизону, по Малори) в этих зонах под эпидермисом хорошо просматривались новообразованные очень тонкие коллагеновые волокна, между которыми выявлялись и регенерирующие мелкие капилляры (рисунок 2А). При импрегнации препаратов по Футу новообразованные волокна в отличие от желто-коричневых зрелых были чёрного цвета (рисунок 2Б).

К 21-м суткам опыта после введения препарата в коже крыс происходило формирование более утолщённых коллагеновых пучков в зонах регенерации, клеточных элементов воспалительного характера не выявлялось, среда волокнистых пучков просматривалось умеренное количество фибробластических клеток и гистиоцитов, множество новообразованных мелких капилляров. На 37-е сутки эксперимента экзогенно введённый коллаген в свободном незамещенном виде в коже не выявлялся. Кожа имела характерное для неё строение,

однако в некоторых участках определялись новообразованные коллагеновые волокна, свидетельствующие о биосинтетической активности фибробластов.

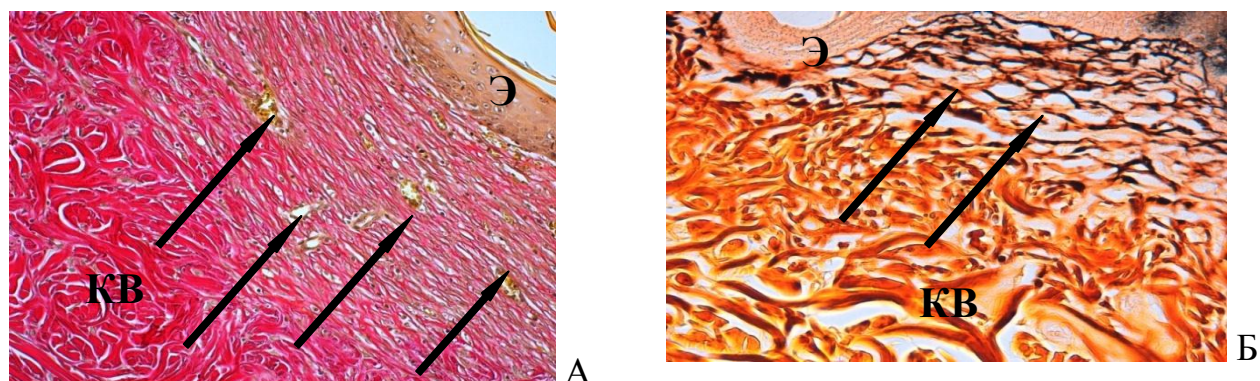


Рисунок 2 – Структура кожи крыс опытной группы на 7-е сутки после внутридермального введения коллагенсодержащего препарата

А. Новообразованные коллагеновые волокна под эпидермисом (Э) и мелкие кровеносные сосуды (↑). КВ – зрелые коллагеновые волокна. Окраска по Ван-Гизону. Увел. X200. **Б.** Новообразованные незрелые коллагеновые волокна (↑) черного цвета под эпидермисом (Э) КВ – зрелые коллагеновые волокна. Импрегнация по Футу. Увел. X400

Гистохимические исследования с использованием качественной реакции Хейла показали, что у животных контрольной группы, а также на 2-е и 4-е сутки после введения коллагенсодержащего препарата ГАГ дифференцировались в виде синих вкраплений в основном веществе между коллагеновыми волокнами дермальной пластинки (рисунок 3А). На 7-е и 21-е сутки в зоне грануляционной ткани под эпидермисом у животных опытной группы определялось большое количество ГАГ (рисунок 3Б), что характерно для зон регенерации соединительной ткани.

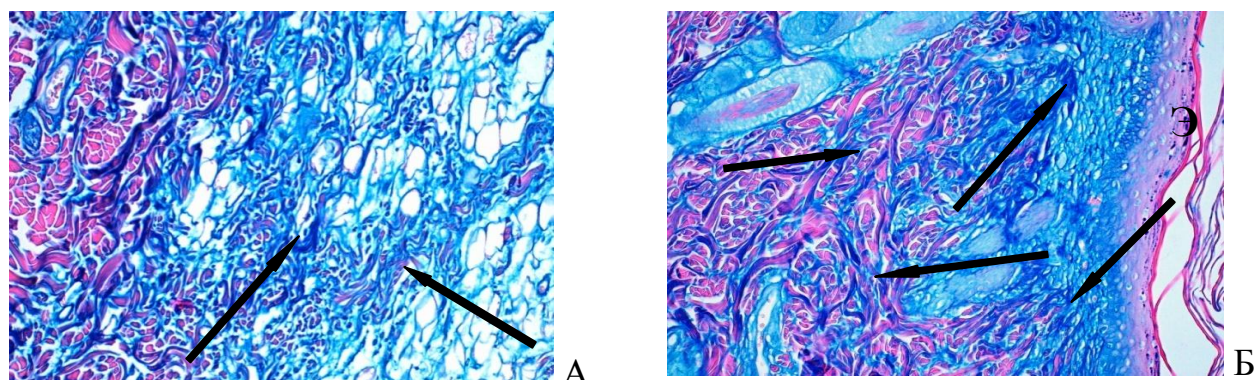


Рисунок 3 – Выявление гликозаминогликанов (синее окрашивание) в коже крыс после внутридермального введения коллагенсодержащего препарата.

А. ГАГ (↑) в зоне резорбции волокнистых структур на 4-е сутки эксперимента. Реакция по Хейлу. Увел. X200. **Б.** ГАГ (↑) в грануляционной ткани под эпидермисом (Э) на 21-е сутки опыта. Реакция по Хейлу. Увел. X200

Иммуногистохимический метод определения белка Ki-67 и фактора роста фибробластов (ФРФ-1) показал в области внутридермального введения препарата коллагена усиление процессов пролиферации клеток кожи. В коже животных контрольной группы на ядерный маркер пролиферации – цитокин Ki-67 на протяжении всего эксперимента положительную реакцию давали лишь клетки базального слоя эпидермиса (рисунок 4А). При внутридермальном введении нативного коллагена, начиная с 4-х суток, включая 7-е и 21-е сутки эксперимента положительно метились многие клетки и отдельные клетки шиповидного слоя эпидермиса, свидетельствуя об интенсификации обновления (рисунок 4Б).

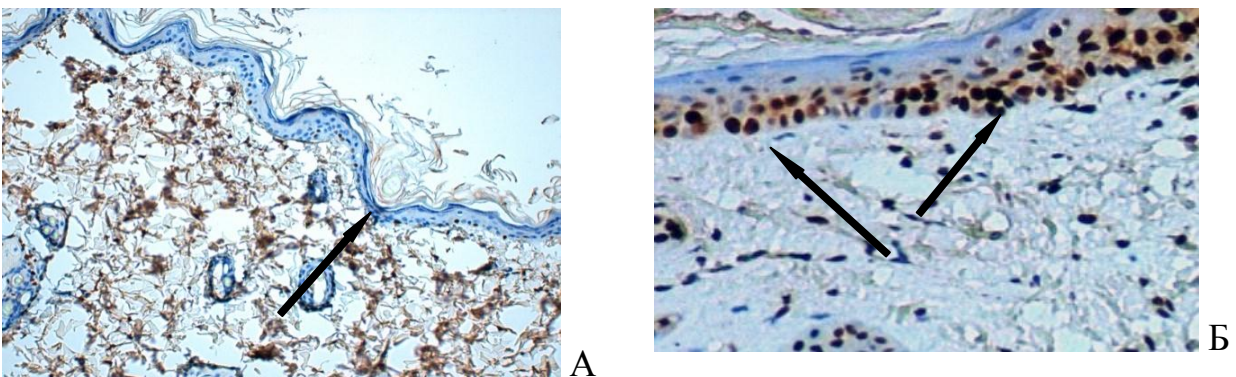


Рисунок 4 – Белок Ki-67 в ядрах пролиферирующих клеток (коричневое окрашивание) в коже крыс контрольной (А) и опытной (Б) групп на 7-е сутки эксперимента. Докраска гематоксилином

А. Выявление белка Ki-67 (↑) в ядрах клеток кожи при внутридермальном введении раствора глюкозы. Увел. x100Б. Антиген Ki-67 (↑) в ядрах клеток кожи крыс после введения препарата коллагена. Увел. x400

Антиген Ki-67, ассоциированный с хромосомами фазы митоза, экспрессируется в ядрах клеток, находящихся в активной фазе клеточного цикла (Yerushalmi R. et al., 2010). На Ki-67 положительно метились многие фибробластические клетки в дермальной пластинке, эпителиальные клетки и клетки в матрице волосяных фолликул. На 21-е и 37-е сутки темпы пролиферации клеток снижались.

После введения изотонического раствора глюкозы в коже контрольной группы крыс ФРФ-1 слабо экспрессировался в цитоплазме лишь отдельных клеток. Внутридермальное введение препарата коллагена значительно повыша-

ло экспрессию этого фактора роста. Наиболее активная экспрессия ФРФ-1 наблюдалась на 7-е и 21-е сутки эксперимента.

Выводы

1. С увеличением возраста в коже экспериментальных животных происходит изменение состава коллагеновых белков со снижением нейтрально-растворимой и цитратрастворимой фракций, повышается содержание продуктов перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков, снижается активность антиоксидантных ферментов – каталазы, глутатионпероксидазы.
2. Внутридермальное введение техникой мезотерапии препарата нереконструированного бычьего коллагена животным зрелого возраста приводит в зонах инъекции к увеличению суммарного коллагена кожи и его растворимых фракций. Метаболизм коллагена кожи в области внутридермального введения коллагенсодержащего препарата в первые дни характеризуется активацией катаболизма, а в более отдалённые сроки (21-37 сутки) – интенсификацией биосинтеза.
3. Внутридермальное введение препарата нативного коллагена приводит в коже к усилению анаэробного (гликолиз, гликогенолиз), а в последующем аэробного окисления углеводов и использования глюкозы на биосинтетические процессы с увеличением содержания гиалуроновой кислоты, сульфатированных и суммарных гликозаминогликанов.
4. В сыворотке крови в начальные сроки после внутридермального введения коллагенсодержащего препарата определяется повышение уровня ИЛ-1 β , ФНО- α и ТФР- β 1. В более отдалённые сроки наблюдается нормализация уровней ИЛ-1 β и ФНО- α , сохранение повышенного содержания ТФР- β 1 и увеличение ИФР-1.
5. Выявленные изменения метаболизма основных биополимеров внеклеточного матрикса кожи в области интрадермального введения коллагенсодержащего препарата согласуются с результатами гистоморфологического исследования ткани. В начальные сроки после инъекции выявляется слабовыраженная воспалительная реакция, проявляющаяся отеком дермы и гиподермы, диффузной инфильтрацией макрофагами, активно резорбирующими волокнистые структу-

ры препарата. В более отдаленные сроки наблюдается стимуляция продукции коллагена и гликозаминогликанов, процессов пролиферации с экспрессией клетками дермального слоя ФРФ-1 и Ki-67.

Практические рекомендации

При выявлении у пациентов инволюционных изменений кожи можно рекомендовать внутридермальное инъекционное введение методом мезотерапии коллагенсодержащего препарата «Коллост[®]ГЕЛЬ» (ООО «Ниармедик плюс»), содержащий 7% коллаген типа I. При планировании комплексного протокола при этом необходимо учитывать, что коллагенолитическая активность и выраженность воспалительности реакции в ответ на интрадермальное введение препарата наблюдается в течение первых 7 дней, а максимальная пролиферативная активность клеток кожи и формирование новых волокон коллагена достигается через 3-5 недель.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Метаболизм коллагеновых волокон на фоне возрастных изменений [Текст] / О. Капулер [и др.] // **Врач.** - 2015. № 8. - С. 64-69. – (Соавт.: **Б. Сельская**, А. Галеева, Ф. Камилов).
2. Гиалуронат: свойства и биологическая роль [Текст] / О. Капулер [и др.] // **Врач.** - 2015. - №2. - С. 25-27. – (Соавт.: А. Галеева, **Б. Сельская**, Ф. Камилов).
3. **Сельская Б.Н.** Содержание коллагена в коже экспериментальных животных при инъекции коллагенсодержащего препарата, применяемого для коррекции инволюционно-депрессивных изменений кожи [Текст] / Б.Н. Сельская // **Наука молодых.** -2016 - №1.- С. 46-49.
4. **Сельская Б.Н.** Состояние внеклеточного матрикса кожи экспериментальных животных при внутридермальном введении коллагенсодержащего препарата [Текст] / Б.Н. Сельская // **Научный вестник БГМУ (Электронное издание).** - 2016.- №4.- С.71-76.- Режим доступа: <http://s.siteapi.org/7bd21d3a35e453b.ru/docs/c0147b6bb559d84c40c2c13eb94c45a60f4920c6.pdf>.
5. **Сельская Б.Н.** Влияние внутридермального введения коллагенсодержащего препарата экспериментальным животным на содержание коллагена в коже [Электронный ресурс] / Б.Н. Сельская, Ф.Х. Камилов, О.М. Капулер // **Медицина: актуальные вопросы и тенденции развития: материалы VII международной научно-практической конференции 3 февраля 2016 г.: сборник научных трудов.**- Краснодар,2016.- С.65-75.- Режим доступа: <http://www.apriori-nauka.ru/electronic-arc/Medicina-aktualnye-voprosi-i-tendencii-razvitiya>.
6. **Сельская Б.Н.** Интенсивность биосинтеза коллагеновых белков в коже экспериментальных животных при внутридермальном введении коллагенсодержащего препарата [Текст] / Б.Н. Сельская // **Научный вестник БГМУ [Элек-**

тронное издание].- 2017.- Приложение 1.- Режим доступа: <http://s.siteapi.org/7bd21d3a35e453b.ru/docs/4bf4f42ce92622b34b4f5628c60dc3c35dc08b90.pdf>.

7. Обмен углеводов в области внутридермального введения препарата, содержащего немодифицированный коллаген типа I [Текст] / **Б.Н. Сельская** [и др.] // **Вестник Удмуртского университета. Серия: Биология. Наука о Земле.** - 2017.- Т.27, вып.3. - С. 392-395. – (Соавт.: О.М. Капулер, В.Г. Иванов, Ф.Х. Камиллов).

8. Метаболизм коллагена при внутридермальной инъекции немодифицированного бычьего коллагена типа I. [Текст]. / Ф.Х. Камиллов [и др.] // **Вестник Удмуртского университета. Серия: Биология, Наука о Земле.** - 2017. - Т.27, вып.3 - С. 356-361. – (Соавт.: **Б.Н. Сельская**, О.В. Данилова, О.М. Капулер).

9. **Сельская Б.Н.** Влияние коллагенсодержащего препарата на морфологию кожи в эксперименте [Текст] / Б.Н. Сельская, Л.А. Мусина, Ф.Х. Камиллов // **Казанский медицинский журнал.** - 2018. - Т.98, № 6. - С.962-967.

10. **Сельская Б.Н.** Уровень некоторых цитокинов в сыворотке крови экспериментальных животных при интрадермальном введении препарата нереконструированного бычьего коллагена [Текст] / Б.Н. Сельская, О.М. Капулер, Ф.Х. Камиллов // **Журнал научных статей «Здоровье и образование в XXI веке».** – 2018. – Т. 20, №2 - С. 98-102. <http://dx.doi.org/10.26787/nydha-2226-7425-2018-20-2-98-102>

11. Влияние интрадермального введения немодифицированного коллагена на пролиферативную активность клеток кожи экспериментальных животных [Текст] / **Б.Н. Сельская** [и др.] // **Биомедицина.** – 2018.- № 3. – С.110-114. – (Соавт.: Л.А, Мусина, Г.В. Иванова, Ф.Х. Камиллов).

12. Возрастная динамика окислительных изменений липидов и белков кожи у экспериментальных животных [Текст] / **Б.Н. Сельская** [и др.] // **Здоровье в 21-веке: материалы X Юбилейной научно-практической конференции с Международным участием (Казань, 30-31 марта 2018 г.).** – Казань, 2018. - С. 470-475. – (Соавт.: А.Г. Галеева, Г.В. Иванова, О.В. Данилова).

Патенты

1. **Сельская Б.Н.**, Капулер О.М., Галеева А.Г. Способ омоложения кожи лица у пациентов с анатомо-физиологическими особенностями лицевой части черепа. Патент РФ на изобретение №2571686. 25.11.2015. Бюл. № 35, 7 с.

2. **Сельская Б.Н.**, Капулер О.М., Галеева А.Г. Схема алгоритма коррекции суборбиткулярной и среднещечной областей. Патент РФ на промышленный образец № 101550. 27.12.2016. Бюл. № 1, 1 с.