

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

СЕЛЬСКАЯ БЭЛА НАТАНОВНА

**Метаболизм коллагена и гликозамингликанов в коже экспериментальных  
животных при интрадермальном введении коллагенсодержащего  
инъекционного препарата**

03.01.04 – биохимия (медицинские науки)

Диссертация  
на соискание учёной степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук, профессор,  
заслуженный деятель науки РФ и РБ  
Камилов Феликс Хусаинович  
Научный консультант:  
доктор медицинских наук, доцент  
Капулер Ольга Марселевна

Уфа – 2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1. Семейство коллагенов. Особенности структуры и метаболизма коллагенов дермы кожи .....	11
1.2. Гликозамингликаны кожи.....	21
1.3. Метаболические изменения в коже при старении.....	25
Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	37
2.1. Объект исследования.....	37
2.2. Биохимические методы исследования.....	39
2.3. Гистологические и иммуногистохимические методы исследования.....	53
2.4. Статистическая обработка результатов.....	54
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	56
3.1. Характеристика обмена коллагена кожи в области внутридермального введения препарата нереконструированного коллагена типа I. ....	56
3.2. Влияние интрадермального введения коллагеносодержащего препарата на уровень гликозаминогликанов и обмен углеводов в коже.....	68
3.3. Изменение уровня некоторых интерлейкинов и факторов роста в сыворотке крови экспериментальных животных при внутридермальной инъекции коллагеносодержащего препарата.....	76
3.4. Гистологическая структура кожи экспериментальных животных в зоне внутридермального введения препарата нереконструированного коллагена.	82
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	93
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	111
ВЫВОДЫ.....	113
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	115
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	116
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	118
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	149

## ВВЕДЕНИЕ

Старение – биологический процесс, который проявляется изменениями метаболизма, снижением адаптационных возможностей организма и надежности функционирования отдельных систем, органов и тканей. Эти изменения нарастают с разной скоростью, способствуют развитию возрастной патологии, повышают вероятность смертности, различаются по времени и выраженности в отдельных тканях [64, 68]. Старение населения стало закономерным демографическим показателем во всех экономически развитых странах мира. По заключению экспертов ВОЗ к 2050 г. в возрасте старше 60 лет будет в два раза больше мирового населения, чем в 2000 г. (21% против 10%). Повышение качества жизни в условиях старения населения становится важной задачей медицины. Существенное влияние на качество жизни человека оказывает состояние кожных покровов, которое имеет не только эстетическое, но и биологическое значение [77].

Процессы возрастной инволюции кожи у людей вызываются комбинированным воздействием возраста (биологическое старение) и факторов внешней среды (особенно фотоповреждение ультрафиолетовым излучением, погодные условия, образ жизни, стресс и др.) [102], обнаруживаются уже после 35 лет [51, 102]. 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 [17, 18, 32, 52, 68, 266]. Процессы старения напрямую отражаются на состоянии коллагена кожи [91]. 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 [63, 80, 105, 137]. Происходит накопление белков с измененной молекулярной массой, агрегацией и фрагментацией молекул, сниженной растворимостью и биологическими характеристиками, низкими функцио-

нальными достоинствами [257], метаболически инертных и устойчивых к протеолизу [275]. Изменения свойств коллагена негативно отражается на экспрессии генетического аппарата и функционального состояния фибробластов, на взаимодействии коллагена с клетками дермы [33, 68, 83, 116].

Коррекция возрастных изменений кожи является ведущим направлением дерматокосметологии. Имеется широкий спектр инъекционных препаратов, но основную долю составляют препараты гиалуроновой кислоты и коллагена [7, 52]. 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, их миграцию и фиксацию. Препараты коллагена важны в репаративных и инволюционных процессах как естественный субстрат для адгезии, дифференцировки и роста соединительной ткани [39, 52, 86].

Понимание молекулярных механизмов и процессов, происходящих в коже при старении, позволяют целенаправленно использовать различные методы коррекции инволюционных изменений [62], однако адекватность их выбора должна быть продиктована этиопатогенетической обоснованностью, предсказуемостью эффекта, удобствами использования. Хотя препараты коллагена крупного рогатого скота 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 коллагенсодержащих 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 коллагенсодержащего препарата изучить в коже крыс зрелого возраста уровень коллагена, его нейтральносоле- и цитратрастворимой фракций, коллагенолитическую активность и концентрацию свободного гидроксипролина.
3. Оценить в коже животных в области интрадермальной инъекции препарата 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 $\beta$ ), фактора некроза опухолей-альфа (ФНО- $\alpha$ ) и факторов роста – инсулиноподобного-1 (ИФР-1), трансформирующего-бета1 (ТФР- $\beta$ 1).
5. Сопоставить выявленные метаболические сдвиги с пролиферативной активностью клеток и гистоморфологическими изменениями кожи крыс зрелого возраста в области интрадермального введения коллагенсодержащего препарата.

#### **Научная новизна**

В результате проведенных исследований получены новые данные, характеризующие влияние препарата нативного коллагена крупного рогатого скота на метаболические и пролиферативные процессы в области внутридермального введения.

Установлены динамика изменений содержания и метаболизма основных компонентов внеклеточного матрикса дермы – коллагена, 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- $\beta$ 1, в коже иммуногистологически определяется увеличение количества клеток, экспрессирующих маркеры пролиферации – антиген Ki-67 и фактор роста фибробластов-1 (ФРФ-1), гистохимически – повышение содержания тонковолокнистого новообразованного коллагена и гликозаминогликанов.

### **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- $\beta$ 1, ФНО- $\alpha$ ) и противовоспалительного характера действия (ТФР- $\beta$ 1), в коже наблю-

дается 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 в коже. Важную роль в развитии регенеративных процессов в коже под влиянием экзогенного коллагена играют активные макрофагальные клетки с экспрессией ростовых факторов – ИФР-1, ТФР- $\beta$ 1 и ФРФ-1.

Проведенные исследования позволили оформить патент на изобретение РФ N2571686 от 25.11.2015г. «Способ омоложения кожи лица у пациентов с анатомо-физиологическими особенностями лицевой части черепа» (заявка от 28.10.2014г. N 2014143667) и патент на промышленный образец РФ №101550 от 27.12.2016г. «Схема алгоритма коррекции суборбикалярной и среднещёчной областей» (заявка №2016501793 от 11.05.2016.).

### **Методология и методы исследования**

Работа выполнена в период 2014-2018 гг. на кафедре биологической химии ФГБОУ БГМУ Минздрава России с использованием научной методологии, основанной на системном подходе с применением формально-логических, общенаучных и специфических методов. Она является экспериментальным исследованием, проведённым на беспородных лабораторных крысах – самках разных возрастных групп: животных молодого (3-4 месяцев, массой 160-170 г) и зрелого возраста (12-13 месяцев, массой 280-320 г) [133]. Для решения поставленных цели и задач исследования использовались биохимические, гистологические, иммуногистохимические и статистические методы. При проведении экспериментов соблюдали эти-

ческие нормы и рекомендации по гуманному отношению к лабораторным животным, которые введены Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, и приказ Минздравсоцразвития Российской Федерации от 23.08.2010г. №708н «Об утверждении правил лабораторной практики».

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Обмен коллагена кожи в области интрадермального введения немодифицированного бычьего коллагена техникой мезотерапии характеризуется в начальный период (1-7-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, сульфатированных и суммарных гликозаминогликанов.
3. Препарат немодифицированного бычьего коллагена при внутридермальном введении стимулирует в коже пролиферативные процессы и биосинтетическую функцию фибробластов.

### **Степень достоверности, апробация результатов, личное участие автора**

Достоверность полученных результатов, обоснованность выводов базируется на адекватности экспериментальной модели, достаточном объёме исследований, использовании сертифицированного оборудования, реагентов и современных методов, применением пакета прикладных программ статистической обработки материалов исследования.

Данные, содержащиеся в работе, получены автором лично или при непосредственном его участии. Постановка задач, анализ, интерпретация и обобщение результатов проводились совместно с научным руководителем и с научным консультантом.

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); Международной научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы медицинской биохимии и лабораторной диагностики» (Ижевск, 2017); X Юбилейной Всероссийской научно-практической конференции «Здоровье человека в XXI веке» (Казань, 2018); на 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. 2018г.), включены в лекционный курс кафедры биологической химии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России (акт от 11.05.2018г.) и учебный процесс кафедры биологической химии ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России (акт от 06.02.2018г.).

### **Публикации**

Диссертант имеет 14 опубликованных работ по теме диссертации объёмом 3,23 печатных листа, из них 8 статей – в научных журналах и изданиях, включенных в перечень рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертаций, а также 2 патента РФ (на изобретение и на промышленный образец), 4 работы опубликованы в материалах региональных, российских и международных конференций и симпозиумов.

Авторский вклад составляет 61,8%.

### **Объём и структура работы**

Диссертация изложена на 168 страницах машинописного текста, содержит 10 таблиц, 9 рисунков и 37 микрофотографий в приложении. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы, включающего 299 источников, в том числе 162 иностранных, и приложения.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Семейство коллагенов. Особенности структуры и метаболизма коллагенов дермы кожи

Дерма кожи в основном состоит из соединительной ткани: сетчатый слой – из волокнистой плотной неоформленной соединительной ткани, сосочковый слой – из волокнистой рыхлой неоформленной, а глубокий слой дермы, не прерываясь, переходит в рыхлую неоформленную соединительную ткань подкожно-жировой клетчатки [70, 79, 82]. Дерма в составе кожи играет важную структурообразующую роль, обеспечивая поддержание биомеханических свойств кожи, сохранение и восстановление её целостности [51]. Основное вещество сетчатого и сосочкового слоёв дермы преимущественно состоит из гиалуронана, протеиногликанов и гликопротеинов и имеет свойства геля.

Коллаген – общее название суперсемейства похожих фибриллярных белков. Это наиболее распространенный белок в организме человека и животных. На долю коллагена приходится не менее 30% общей массы белков [80]. У человека к настоящему времени выявлено 28 типов коллагена, содержащих в общей сложности не менее 42 различных полипептидных  $\alpha$ -цепей, каждая из которых является продуктом экспрессии индивидуального гена.

Для коллагеновых белков характерно образование трехспиральных доменов, когда три  $\alpha$ -цепи образуют правостороннюю спираль второго порядка. Между  $\alpha$ -цепями в этой структуре образуются многочисленные внутримолекулярные поперечные водородные связи, обеспечивающие прочность и жесткость трехспиральных доменов [233].

Суперсемейство коллагеновых белков в зависимости от четвертичной структуры, характера формирующихся из них макромолекулярных образований, свойств и функций подразделяют на два семейства: волокнообразующие (фибриллярные) и не образующие фибрилл (нефибриллярные) коллагены [78, 80]. К

волокнуобразующим относятся коллагены I, II, III, V и XI типов [175, 233]. Этим коллагенам принадлежит основная роль в выполнении формообразующей и биомеханической функций соединительной ткани. Второе семейство включает остальные 23 типа коллагена и делится на несколько подсемейств.

В состав дермы входят волокнуобразующие коллагены I, III и V типов, FACIT-коллагены (ассоциированные с фибриллами) типа XII, XIV и XXII, коллаген типа VII, относящийся к «заякоренным» и обнаруживаемый на границе дермы и эпидермиса, а также коллаген типа VI, образующий микрофибриллы [80, 160, 262]. Наиболее представленными в коже являются коллагены типа I и III. Соотношение их уровней на протяжении жизни меняется: волокна коллагена типа III преобладают в эмбриональном и раннем постнатальном периодах, а у взрослого доминирует коллаген типа I [52, 97, 287]. Собранный из трех  $\alpha$ -цепей ( $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$ ) макромолекула коллагена типа I (тропоколлаген) состоит в большей своей части из непрерывного трехспирального домена, имеет в длину более 300 нм и толщину около 1,5 нм. На концах содержит N- и C-терминальные домены, не имеющие трехспиральные структуры.  $\alpha 1(I)$ - цепь трехспирального домена состоит из 1014 аминокислотных остатков, N-концевой телопептид из 16, C-концевой из 25 аминокислотных остатков. Присутствие в повторяющихся участках первичной структуры остатков Про и гидроксипролина имеет большое значение для стабилизации вторичной структуры  $\alpha$ -цепей, жесткости (ригидности) структуры тропоколлагена. Особенность коллагена типа I связана с укладкой молекул тропоколлагена в одну линию по типу «голова к хвосту» – начало аминотерминального телопептида каждой из них направлено к концу карбокситерминального телопептида предшествующей. Но в местах сближения эти молекулы не связаны между собой и разделены промежутками. Такое расположение поддерживается взаимодействием «бок о бок» со смежными линейными укладками со смещением почти на четверть длины каждой молекулы тропоколлагена. Объединяются от 20 до 100 параллельных рядов, каждый протяженностью в десятки молекул тропоколлагена. Просветы между концами молекул тропоколлагена имеют значение для структурных

взаимодействий микрофибрилл с другими компонентами внеклеточного матрикса [175]. Сами микрофибриллы организуются в более крупные фибриллы.

Развитая система интрамолекулярных поперечных связей обеспечивает им такую продольную прочность, которая сопоставима с прочностью стальной проволоки соответствующего диаметра [80].

Коллаген III типа построен из трёх  $\alpha 1(\text{III})$  полипептидных цепей, содержит дисульфидные поперечные связи, входит в состав коллагеновых ретикулярных (ретикулиновых) волокон. Они представляют собой фибриллы коллагена типа I, поверхностные слои которых состоят из коллагена типа III [259].

Коллаген типа V присутствует внутри фибрилл, в основном состоящих из коллагена типа I, относится к «минорным» фибриллярным, но самостоятельно не образует фибриллы, а принимает участие в их формировании. Коллагены XII, XIV и XXII типов располагаются на поверхности фибрилл коллагена I типа, не принимают участия в их формировании, связаны с ними прерывистой тройной спиралью [146]. Коллаген типа VII образует особые микрофибриллы, прикрепляющие клетки к базальным мембранам. Он играет существенную роль в структурном взаимодействии дермы и эпидермиса [160]. Коллаген типа VI образует микрофибриллы путём объединения четырёх макромолекул и последовательного соединения тетрамеров [281]. Коллаген типа XVII, входящий в подсемейство трансмембранных, N-терминальным концом находится в цитоплазме фибробластов, а C-терминальным – в экстрацеллюлярном матриксе [107].

Все коллагены синтезируются фибробластными клетками. Основные закономерности биосинтеза полипептидных цепей коллагена и его генетической регуляции наиболее полно изучены на примере коллагена I типа. Транскрипция генов полипептидных  $\alpha$ -цепей контролируется сложными программами, включающими участие цис-регулирующих цепей и действие трансрегулирующих элементов.

Гены, кодирующие цепи коллагена типа I, локализованы на разных хромосомах. Поэтому транскрипция и трансляция генетической информации для его полипептидных цепей должны быть согласованы по времени и интенсивности

[80]. В достижении этой согласованности ведущую роль играет цинксодержащий фактор с-Krox, который способен связываться с промоторами генов обеих  $\alpha$ -цепей [171].

На рибосомах начинают синтезироваться препро- $\alpha$ -цепи, содержащие на N-концах сигнальный пропептид, необходимый для поступления цепи в цистерны гранулярного эндоплазматического ретикула. После этого взаимодействия пре-пептид отщепляется с образованием про- $\alpha$ -цепи. По завершению процесса трансляции в области карбокситерминального пропептида с участием протеиндисульфидизомеразы возникают дисульфидные связи, и благодаря им про- $\alpha$ -цепи начинают взаимодействовать друг с другом, что облегчает последующее их соединение в трёхспиральную макромолекулу тропоколлагена. По мере продвижения удлиняющейся про- $\alpha$ -цепи в цистерну гранулярного ретикула начинают действовать гидроксилирующие ферменты – пролил-4-гидроксилаза, пролил-3-гидроксилаза и лизилгидроксилаза [168, 225, 295]. Пролл-4-гидроксилаза действует только на пролил, находящихся в положении Ууу коллагеновых триплетов Глу-Ххх-Ууу, а пролил-3-гидроксилаза гидроксилирует пролил во втором положении (Ххх). В результате 3-гидроксипролил в  $\alpha 1(I)$  цепи обнаруживается только в одном положении, в то время как в каждой  $\alpha$ -цепи может появиться не менее 90 остатков 4-гидроксипролина [255, 295]. Образование гидроксильной формы пролила важно для взаимодействия с тройной спиралью молекул воды и возникновения водородных связей, поддерживающих спиральную конформацию. Следовательно, содержащиеся в коллагене все гидроксипролилы образуются посттрансляционно, а свободный гидроксипролин, освобождающийся в тканях в процессе гидролиза коллагена, не может быть повторно утилизирован в биосинтезе, поскольку в геноме животных нет соответствующего кодона, неизвестна также и гидроксипролиновая транспортная РНК. Гидроксилирование некоторых остатков лизина в про- $\alpha$ -цепях осуществляется преимущественно в участках, содержащих кислые аминокислотные остатки [168].

В цистернах эндоплазматического ретикула при гидроксилировании ли-

зила в про- $\alpha$ -цепях происходит гликозилирование некоторых из них с участием галактозилтрансферазы и гликозилтрансферазы. Этот процесс протекает параллельно с продолжающейся на рибосоме трансляцией цепи и приостанавливается после образования тройной спирали проколлагена. В процессе инициации спирализации основную роль играет С-терминальный домен  $\alpha 2(I)$ -цепи [245]. Фолдинг проколлагена осуществляется быстро с участием шаперона  $H_{sp}47$  и пептидилпролилизомеразы [256, 271].

Трёхспиральные молекулы проколлагена с помощью специфических белков (дикантин и динеин) перемещаются по системе микротрубочек в полость пластинчатого комплекса и секретируются в экстрацеллюлярный матрикс [178], где происходит отщепление аминотерминального и карбокситерминального пропептидов с участием различных протеолитических ферментов – толлоидов и ADAMTS-2, -3 и -14 [163].

Во внеклеточном пространстве молекулы тропоколлагена претерпевают изменения, приводящие к химической стабильности и механической прочности коллагена, – образуются ковалентные интрамолекулярные и интермолекулярные поперечные связи: редуцируемые связи, возникающие между альдегидами лизила и гидроксизила, а также связи типа оснований Шиффа, возникающие между альдегидами лизила и гидроксизила и аминогруппами радикалов этих же аминокислот [199]. Образование этих связей осуществляется в два этапа. На первом действует фермент лизилоксидаза (протеинлизил-6-оксидаза), катализируя окислительное дезаминирование лизиновых остатков с образованием аллизолов (альдегидов лизила). На втором этапе происходит самопроизвольное взаимодействие двух остатков аллизолов, или остатков аллизина с  $\epsilon$ -аминогруппой гидроксизилов, расположенных в непосредственной близости. Связь альдольаллизила (редуцируемая связь) возникает интрамолекулярно между  $\alpha 1(I)$ -цепями коллагена I типа, а альдиминовые связи (тип оснований Шиффа) образуются интермолекулярно, способствуя формированию волокон коллагена [80]. Эти связи локализуются в зависимости от положения лизиновых остатков в первичной структуре  $\alpha$ -цепей. Ко-

валентные поперечные связи между тропоколлагеновыми молекулами существуют только внутри микрофибрилл. Редуцируемые поперечные связи образуются, главным образом, в период роста организма. Их количество при определении химическими методами с возрастом уменьшается, но возникают и возрастают поперечные связи другого типа, нередуцируемые, называемые ещё зрелыми, что повышает механическую прочность и снижает экстрагируемость коллагена [267, 284].

Коллагеновые фибриллы довольно часто построены из макромолекул коллагенов разных типов, или гетеротипичны: коллаген I и коллаген III типов, I и V типов. На поверхности коллагеновых фибрилл располагаются молекулы FACIT – коллагенов, они не связываются ковалентными связями и участвуют во взаимодействии фибрилл с неколлагеновыми компонентами внеклеточного матрикса.

Спонтанный процесс самосборки коллагеновых надмолекулярных структур после секреции и образования тропоколлагена требует дальнейшего изучения. Считается, что молекулы образовавшегося тропоколлагена формируют вблизи клетки молекулярные скопления (мезофазы), в которых молекулы располагаются параллельно, но между ними сохраняются прослойки жидкости, образуются тактоиды или жидкие кристаллы. Благодаря действию протеогликанов (декорин, бигликан, фибромодулин и др.) и гиалуроновой кислоты, находящихся на поверхности молекул тропоколлагена, возникают протофибриллы, из которых формируются микрофибриллы, включающие 4-5 протофибрилл [147]. С их помощью (протеогликаны, гиалуронан) происходит также интеграция микрофибрилл в фибриллу, фибрилл в коллагеновые волокна.

Процесс фибриллообразования лабилен и зависит от целого ряда факторов и условий. Условия – это водная среда, концентрация тропоколлагена, осмотическое давление, ионная сила, рН, подвижность среды и др. Реагентами, влияющими на волокнообразование, являются протеогликаны, гиалуронан, ионы – комплексообразователи, АТФ, аскорбиновая кислота, протеолитические ферменты и др. [80, 81]. Параметры образующихся коллагеновых молекул (форма, количество

фибрилл, толщина) определяются типом коллагеновых белков, биохимической функцией органа, химическим составом окружающей среды, свойствами компонентов, входящих в структуру волокон. Таким образом, организационная иерархия коллагеновых волокнистых структур включает молекулы (тропоколлаген и др.) и надмолекулярные уровни: микрофибриллы; фибриллы, волокна и волокнистый остов [78, 80]. Микрофибриллы – элементы нитевидной формы, толщиной 3,5-5,0 нм и длиной в 64 нм, образующиеся при взаимодействии молекул коллагена с разноименно заряженными участками поверхности. Причём, структурные элементы фибрилл находятся, очевидно, в спирализованном состоянии [81, 206].

Фибриллы могут существовать самостоятельно или объединяться в волокна. В интеграции фибрилл в волокна участвуют протеогликаны, образуя «зоны контактов». Кроме абсорбированных протеогликанов между коллагеновыми фибриллами обнаруживаются своеобразные «перемычки» [25]. Фибриллы в составе коллагеновых волокон располагаются «антипараллельно», условно обозначаемые R и L. При этом каждая R-фибрилла окружена четырьмя L-фибриллами [78]. Ещё одной особенностью строения коллагеновых волокон является ветвление волокнистых элементов и их интеграция. Фибриллы могут делиться на две и более ветвей в одном месте сразу или на протяжении, образуя единый волокнистый каркас [80].

Характерным признаком волокон является их вытянутая спиральная форма. Волокна имеют диаметр 500-20000 нм. Наряду с коллагеновыми и эластическими волокнами в дерме кожи человека встречаются смешанная форма коллагеново-эластических волокон [80]. Вероятно, они являются ограниченными по протяженности участками взаимодействия коллагеновых волокон с эластическими фибриллами с помощью протеогликанов путём образования «зон контакта». Такое взаимодействие, по мнению авторов, суммирует в себе два качества: прочность коллагеновых и эластичность эластических волокон. При растяжении происходит разворачивание спиральной формы коллагеновых волокон, они выпрямляются, а взаимодействующие с ними (прикреплённые дискретно) эластические фибриллы растягиваются. После устранения напряжения-растяжения эластические структу-

ры сокращаются, возвращая в исходное (спирализованное) состояние коллагеновые волокна. В этих процессах участвуют и система связывающих волокон, и основное вещество.

Однако, длительное пребывание волокнистых структур в выпрямленном (деспирализованном) состоянии приводит к ремоделированию коллагеновых и эластических волокон. В зоне ремоделирования увеличивается активность и количество фибробластов, восстанавливается спиральная форма коллагеновых волокон, эластические волокна удлиняются. Это снимает напряжение-растяжение, действующее на волокна, и они принимают более выгодное энергетическое состояние. Данная особенность не позволяет длительно сохранять эффект пластических операций на коже лица («подтяжки») с целью устранения морщин и получения видимости омоложения, но позволяет создать «запас» кожного покрова для аутотрансплантации [80].

Поддержание структурной целостности соединительной ткани зависит от постоянного обновления коллагеновых волокон. На скорость обновления влияет вид ткани (в сетчатом слое дермы она ниже, чем в сосочковом), возраст, условия питания и наличие патологии. Большое значение имеет изменение концентрации в межклеточном веществе протеогликанов, рН, содержания витаминов и биоэлементов [40]. В среднем физиологический процесс обновления коллагеновых волокон у человека занимает 40-60 дней [181].

Деградацию коллагена можно рассматривать как двухступенчатый процесс [195]. На первой стадии происходит фрагментирование волокон и фибрилл коллагена, на второй – мелкие фрагменты фагоцитируются фиброкластами и макрофагами и расщепляются до коротких пептидов и аминокислот. Фрагментирование волокнистых структур экстрацеллюлярного матрикса дермы осуществляется многочисленными протеиназами. Центральную роль в катаболических процессах матрикса соединительной ткани играют металлопротеиназы, содержащие в активном центре цинк и каталитический домен с мотивом Гис-Глу-Ххх-Ххх-Гис-Ххх-Ххх-Гли-Ххх-Ххх-Гис, где Ххх может быть любым аминокислотным остат-

ком, а три остатка Гис связывают цинк [241]. Металлопротеазы являются гликопротеинами и подразделяются на семейства матриксинов или металлопротеиназ матрикса (ММП), адамализинов – металлопротеиназ с дезинтегрированным доменом (АДАМ) и астацитов.

ММП расщепляют коллаген, а также другие внеклеточные белки. В настоящее время идентифицировано 28 ММП [205], которые вырабатываются фибробластами и макрофагами, эндотелиальными, тучными и другими клетками, имеют оптимум рН при нейтральных значениях. Различаются по некоторым особенностям строения и спектру субстратной специфичности. Действие ММП не только специфично, но и точно направлено. Нативные коллагены I, II, III типов разрушаются ММП-1, -8, -13, и -14 между остатками Гли и Иле. Они также гидролизуют коллагены типа VII и X. На коллаген типа I действуют также ММП-2, -18. Ряд ММП расщепляют фрагменты больших коллагенов (ММП-3, -9, -10, -11, -15, -16, -17, -19, -20, -22, -24, -25, -26). Однако скорость гидролиза коллагена этими протеазами сильно различается. ММП-2, -3, -7, -9, -10, -12 и -14 способны гидролизовать и эластин. Среди них наиболее эффективна ММП-12.

Индукторами синтеза ММП-1, -8, -13 и -14 являются фактор некроза опухоли-альфа (TNF- $\alpha$ ), интерлейкин-1-бета (IL-1 $\beta$ ), ростовый фактор эпидермиса (EGF), ростовые факторы тромбоцитов (PDGF). Выделяются ММП в матриксе в форме неактивных предшественников, ферментативное отщепление пропептида деблокирует атом цинка и переводит фермент в активное состояние. Роль активаторов выполняют плазмин и другие ММП (ММП-3, -7, -10 и др.), вероятно такая активация партнерами усиливает надёжность системы в целом [205]. ММП-14, -15, -16 и -17 имеют трансмембранный С-терминальный конец и небольшой внутриклеточный домен, они проявляют каталитическое действие, не отщепляясь от клеток [253].

Внеклеточные протеиназы участвуют также в функционально важных реакциях ограниченного протеолиза, а не только обеспечивают общую деградацию белков экстрацеллюлярного матрикса. ММП-2 избирательно отщепляет пропеп-

тид от предшественника лизилоксидазы, преобразуя его в активный фермент. Такой выборочный гидролиз приводит к освобождению биологически активных сигнальных молекул, включённых в структуру многих белков матрикса (различные факторы роста, морфогены, ингибиторы протеиназ типа Кунитцы, фактор фон Виллебранда и др.) [72]. Выраженность катаболических процессов не распределена равномерно по всему пространству внеклеточного матрикса. Наибольшая ферментативная активность выявляется вблизи клеток, секретирующих протеазы. В этих зонах протеазы могут действовать эффективно даже в присутствии ингибиторов [152].

Базальный уровень биосинтеза ММП очень незначителен. Однако может резко возрастать в ответ на изменения в состоянии компонентов внеклеточного матрикса и межклеточных контактов, а также под действием регуляторных (сигнальных) молекул. В физиологических условиях каталитическая активность ММП находится в соответствии с состоянием ткани [189]. Это соответствие регулируется интенсивностью экспрессии ферментов, контролируемом на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях. Так, на посттранскрипционном уровне активность ММП ингибируется связыванием с некоторыми интегринами и синдиканами (белки поверхности клеток) и с такими компонентами матрикса, как тромбоспондины [241]. Однако ведущее значение в ингибирование ММП имеют специальные тканевые ингибиторы металлопротеаз [TIMP]. У млекопитающих выделено 4 TIMP, они секретируются во внеклеточный матрикс, содержат по 6 дисульфидных связей, инактивируют все металлопротеазы, связываясь с их активными центрами [150]. Некоторая избирательность действия отчётливо выражена только у TIMP-3 [296].

Таким образом, коллаген, являясь основным фибриллярным белком соединительной ткани, в частности, дермы кожи, обеспечивает структурную основу ауторегуляции неоколлагеногенеза его фрагментами.

Другим важнейшим компонентом внеклеточного матрикса дермы являются гликозаминогликаны.

## 1.2. Гликозаминогликаны кожи

Макромолекулярными компонентами основного вещества внеклеточного матрикса являются специализированные гликопротеины, протеогликаны и гиалуроновая кислота. Протеогликаны представляют собой углеводно-белковые комплексы, где коровый белок ковалентно соединен с сульфатированными гликозамингликанами (ГАГ). ГАГ – однотипно построенные гетерополисахариды, образованные многократным повторением дисахарида: уроновой кислоты с глюкозы или галактозамином. Для позвоночных типичными являются гиалуронан (гиалуроновая кислота, ГК), хондроинтинсульфаты, дерматансульфаты, гепарансульфаты и кератансульфаты. Они отличаются особенностями дисахаридной единицы, которые последовательно соединяясь друг с другом формируют неразветвленную цепь полианионного характера. За исключением ГК, все ГАГ являются сульфатированными. Все ГАГ, входящие в состав протеогликанов, имеют общий скелет, построены из чередующихся галактозных и глюкозных остатков в циклической форме [273], который и обеспечивает одинаковую вторично-спиральную конфигурацию их молекул. Супрамолекулярные структуры ГАГ стабилизируются интрамолекулярными водородными связями, а также ацидамидными и сульфатными группами. Будучи гидрофильными, ГАГ связывают большое количество воды и придают основному веществу характер сильно гидратированного геля, создающего тургор и вполне проницаемого для молекул, растворимых в воде. В этом геле передвигаются и клетки, и их отростки [80].

Главным в функциональном плане компонентом большинства протеогликанов являются не ГАГ, а цепи стержневых белков, которые играют решающую роль в определении состава, длины и количества присоединяемых ГАГ, в формировании супрамолекулярной организации экстрацеллюлярного матрикса, взаимодействия с другими компонентами межфибриллярной субстанции, волокнистыми структурами и клетками [166]. Суперсемейство протеогликанов, насчитывающее не менее 60 членов, делится по локализации в тканях: а) протеогликаны экстра-

целлюлярного матрикса; б) протеогликаны базальных мембран; в) протеогликаны цитоплазматических мембран; г) внутриклеточные протеогликаны [80].

Биосинтез протеогликанов включает в себя: а) экспрессию стержневого белка; б) последующее присоединение к нему свойственных гликопротеинам олигосахаридных групп; в) сборку присоединенных к соответствующим локусам стержневого белка полимерных цепей ГАГ с участием ксилозилтрансферазы, галактозилтрансфераз I и II, трансфераз глюкуроновой кислот I и II, N-ацетилгалактозаминотрансферазы, сульфаттрансфераз [216].

При этом наблюдается строгая субстратная специфичность гликозилтрансфераз. После освобождения из рибосом полипептидная цепь корового белка по каналам эндоплазматического ретикулума переходит в аппарат Гольджи, где связанные с мембранами трансферазы начинают последовательный синтез полисахаридных групп. Полностью синтезированные молекулы протеогликана поступают в область плазматической мембраны клетки и секретируются. По данным некоторых авторов [282], отдельные гликозилтрансферазы не являются индивидуальными белками, а представляют собой единый белковый комплекс. Благодаря особенностям экспрессии и специфичности модифицирующих энзимов, сборка каждого ГАГ подвержена вариабельности.

Катаболизм протеогликанов осуществляется вначале под действием протеиназ (матриксные металлопротеиназы, катепсин Д и др.), вырабатываемых макрофагами, фибробластами и другими клетками. Далее протеиногликаны могут подвергаться деградации лизосомальными протеиназами, сульфатазами и гликозидазами, либо диффундировать в систему циркуляции и разрушаться в печени. Ключевой стадией в этих реакциях является удаление сульфата, т.к. сульфатированные олигосахариды не гидролизуются лизосомальными гликозидазами [274].

Наиболее распространенным в коже ГАГ является гиалуронан. ГК не подвергается сульфатированию, не входит в структуру протеогликанов, поскольку не образует с белками ковалентных связей. Около половины гиалуронана, содержащегося в организме человека, находится в коже, преимущественно в дерме (200-

500мкг/г) и эпидермисе (100 мкг/г) [210]. Дисахаридные фрагменты ГК состоят из остатков Д-глюкуроновой кислоты с N-ацетил-βД-глюкозамином (связь β 1,3-гликозидная), соединенных между собой β (1,4)-гликозидными связями. Гиалуронан имеет высокую молекулярную массу  $10^3$ - $10^4$  кДа. В межклеточном матриксе ГК приобретает третичную структуру, позволяющую связывать массу воды в тысячу раз большую, чем ее масса [221]. В то же время на ее поверхности сохраняются гидрофобные участки, способствующие взаимодействию соседних молекул гиалуронана, связыванию с липидными компонентами и клеточными мембранами. Длина и гибкость молекулы гиалуронана изменчивы, что позволяет ГК определять упругость кожи [280].

Биосинтез ГК в коже осуществляют фибробластные клетки. Гиалуронансинтаза (HAS) является трансмембранным белком плазматической мембраны, имеющий специальный канал для выведения ГК из клетки [279]. У позвоночных выделено 3 вида HAS. HAS1 синтезирует высокомолекулярную ГК (2 млн. Да и более), HAS2-гетерополисахарид с молекулярной массой до 2 млн. Да, а HAS3 продуцирует ГК с низкой молекулярной массой – около  $3 \times 10^5$  Да. Каждая изоформа HAS кодируется своим геном [227].

Гиалуронан с некоторыми белками, получившими название гиаладгеринов, связывается устойчивыми электростатическими связями. Это гиаладгерины внеклеточного матрикса, роль которых выполняют стержневые белки протеогликанов (версикана, нейрокана, агрекана, бревикана и др.), белки клеточных мембран (трансмембранные рецепторы – RHAMM, BRAL1, SPACRAN, LYVE-1 и поверхностный рецептор – CD-44 [179], а также внутриклеточные гиалуронансвязывающие белки. Наиболее представленным гиаладгерином является CD-44, участвующий в клеточной адгезии, миграции и межклеточных взаимоотношениях [155, 217]. Вместе с HAS CD-44 принимает участие в образовании перичеллюлярной зоны фибробластов, с ГК участвует в агрегации клеток, в передаче регуляторных сигналов, в интернализации и распаде ГК [29, 155].

Скорость метаболизма гиалуронана в коже высокая, период полужизни со-

ставляет 1-2 сутки. При связывании ГК с CD44 и RHAMM фибробластов начинается внеклеточное ее расщепление. Часть гиалуронана поступает в клетку с образованием эндосомы и лизосомы, в которых с участием гиалуронидаз,  $\beta$ -глюкуронидазы и  $\beta$ -(N-ацетил)-глюкозаминидазы подвергается деградации. Часть фрагментов ГК поступает в лимфатическую и кровеносную систему, а затем в печень, где подвергается полному окислению или выводится с мочой [196].

ГК расщепляется в несколько стадий. В результате образуются фрагменты с разной молекулярной массой и биологической активностью: некоторые подавляют активность ММП, кислых лизосомальных протеиназ [260], другие вызывают экспрессию генов, участвующих в пролиферации клеток соединительнотканного дифферона [115, 124]. Интенсивность катаболизма ГК возрастает при повреждении, воспалении ткани, биосинтез усиливается при активации функций фибробластов в процессах регенерации и восстановления [125].

Физиологические функции гиалуронана в коже разнообразны. ГК формирует с гликопротеинами и протеогликанами основное вещество внеклеточного матрикса, является интегрирующей, высокогидрофильной средой, обеспечивая тургор, тонус, упругость и другие биомеханические свойства кожи, участвует в регуляции водного баланса, ионного обмена. ГК участвует в формировании сети коллагеновых волокон в коже, адгезии клеток, в их миграции [83, 120, 122, 191, 218].

Кроме того ГК принимает участие в процессах эмбриогенеза, оплодотворения, овуляции, метастазирования опухолей, обладает противовоспалительным эффектом, блокирует синтез лейкоцитарными клетками провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ), снижает проницаемость стенок сосудов микроциркуляторного русла [124, 125, 154, 177, 215, 219, 299].

Низкомолекулярные фрагменты частично расщепленного гиалуронана также обладают физиологической активностью: усиливают пролиферацию клеток, обладают противовоспалительным регулирующим действием, стимулируют формирование новых сосудов и функции макрофагов, связываясь с определенными изоформами рецептора CD-44, запускают внутриклеточные сигнальные пути и

активируют процессы биосинтеза компонентов внеклеточного матрикса в фибробластах [11, 196, 222, 227], обладают иммуностимулирующим эффектом [269].

Таким образом, гиалуроновая кислота, являясь наиболее представленным ГАГ, определяет в комплексе с протеогликанами и фибриллярными структурами основные свойства внеклеточного матрикса кожи, важнейшие биологические функции кожного покрова, а также участвует в регуляции пролиферации, дифференцировки, миграции, адгезии и апоптоза клеток.

Гиалуроновая кислота, коллаген и гликозаминогликаны протеогликанов как наиболее представленные компоненты внеклеточного матрикса дермы привлекают пристальное внимание специалистов, изучающих биохимические и молекулярно-биологические механизмы инволюционных изменений кожи в процессе старения.

### **1.3. Метаболические изменения в коже при старении**

Старение – универсальный процесс у живых организмов, проявляющийся нарушениями в их структуре и функции, изменениями обмена веществ. При этом наблюдается уменьшение физиологических функций и резервных возможностей большинства систем организма, снижение их надёжности, развитие возрастной патологии, увеличение вероятности смертности [45, 47, 64, 68, 137]. Существует около 300 гипотез, объясняющих причины старения. Выделяют в настоящее время несколько групп гипотез, рассматривающих старение как: 1) результат накопления повреждений клеток в течение жизни (свободнорадикальная гипотеза, группа иммунологических гипотез); 2) генетически запрограммированный процесс (гипотеза соматических мутаций, теломерная гипотеза); 3) многопричинный процесс (адаптационно-регуляторная гипотеза, другие «синтетические» гипотезы) [64, 137].

Инволюционное снижение резервных возможностей функциональных систем организма приближает их к порогу дисфункции, и при действии внутренних

и внешних стрессорных факторов может произойти срыв адаптационных возможностей. Важно, что инволюционные изменения в различных тканях, органах и системах организма наступают в разном возрасте, нарастают с разной скоростью, т.е. наблюдается гетерохронность, гетеротропность и гетерокинетичность их развития [45, 137].

Старение кожи происходит в соответствии с общими закономерностями возрастной инволюции (биологическое или хронологическое старение) [87], а также под воздействием факторов внешней среды, наибольшее значение из которых придаётся ультрафиолетовому излучению (фотоповреждение, фотостарение кожи). Целенаправленные исследования показали, что принципиальных различий в путях и механизмах дизрегуляции метаболизма в дерме кожи при хронобиологическом и фотоиндуцированном старении кожи нет [132, 181, 204].

Возрастные изменения кожи у человека проявляются, как правило, после 35 лет. Происходит истончение эпидермального слоя, сглаживание дермально-эпидермального соединения, кожа становится вялой, более сухой в результате нарушения гидробаланса и микроциркуляции, наблюдаются выраженные изменения дермы (уменьшение объема ткани и др.), потеря эластичности, появляются складчатость, мелкие морщины, прогрессирует гравитационный птоз [35, 97, 110]. Наблюдаемые сдвиги во многом связаны с изменением количества и снижением функции клеток соединительной ткани, дезорганизацией компонентов экстрацеллюлярного матрикса и, главным образом, коллагена [38, 59, 70, 116, 266].

Основной клеточной популяцией фибробластического дифферона дермы являются дифференцированные фибробласты. Они обеспечивают морфофункциональную организацию и гомеостаз дермы за счет выполнения ключевых функций: структурной, регуляторной, ремодуляционной, репаративной [18, 32, 119]. Фибробласты (ФБ), локализованные в разных слоях кожи несколько отличаются функциональными особенностями [58]. Так, ФБ эпителиальнодермального соединения продуцируют важнейшие компоненты базальной мембраны (коллаген IV типа, ламинины, нидоген, тенасцин и другие гликопротеины), секретируют ряд

биологически активных веществ (факторы роста, интерлейкины), необходимые в регуляции эпидермального гистогенеза [13, 14, 50, 186, 277]. ФБ папиллярного слоя дермы формируют основные компоненты межклеточного матрикса (МКМ) рыхлой волокнистой соединительной ткани коллагены типа: I, III, IV, V, VI, XII, XVI, эластин, протеогликаны, гиалуронан, ферменты, участвующие в катаболических реакциях и пострасляционном процессинге структурных белков [80, 90].

Они также экспрессируют биологически активные вещества, стимулирующие хоуминг других клеточных дифферонов (макрофаги, тканевые базофилы, лимфоциты и др.). Дифференцированные ФБ ретикулярного слоя дермы продуцируют фибриллярные компоненты МКМ, которые характерны для плотной волокнистой неоформленной соединительной ткани [197].

ФБ являются основой морфофункциональной организации кожи, а также исполнительными клетками кожи регуляторных влияний общего (нейро-эндокринная система) и местного (цитокины, клеточно-матриксные и межклеточные взаимодействия) уровней, кроме того, сами выполняют регуляторную функцию, продуцируя комплекс проангиогенных факторов, пептидные гормоны, био-генные амины и др. [92, 114, 116, 230].

Кожа содержит иммунокомпетентные клетки (Th1 и Th2-лимфоциты, В-лимфоциты, внутридермальные макрофаги (клетки Лангерганса), другие Т-клетки, мигрирующие в кожу из кровеносного русла), которые в физиологических условиях выполняют барьерную функцию, участвуют в иммунном надзоре, но при действии повреждающих или стимулирующих факторов они включают активирующие каскады путём экспрессии цитокинов, химокинов, молекул адгезии, рецепторов [2, 43]. ФБ дермы тоже участвуют в регуляции иммунного ответа, являются своеобразными «сторожевыми» клетками [80], организующими ответы соединительной ткани на инфекцию или повреждение. ФБ реагируют на регуляторные факторы, вырабатываемые другими клетками дермы, в частности иммунокомпетентными клетками: трансформирующие ростовые факторы бета (TGF- $\beta$ ) и IL-1 стимулируют, а интерферон-гамма (IF- $\gamma$ ) ингибирует продукцию коллагена,

TGF- $\beta$  снижает экспрессию металлопротеаз [186].

ФБ отводят главную роль в реализации процессов ремоделирования межклеточного матрикса, протекающего в организме непрерывно [32, 116]. В процессе ремоделирования под действием цитокинов (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) ФБ продуцируют ММП, активируемые в межклеточном матриксе плазмином и катепсинами В и L. Происходит разрушение компонентов матрикса, продукты деградации путём эндоцитоза поступают в ФБ, в которых по механизму обратной связи происходит увеличение экспрессии TIMP, блокирующих протеолиз [89, 91], реализуется процесс репаративного гистогенеза в результате синтеза всех структур экстрацеллюлярного матрикса дермы.

В процессе старения в коже происходят изменения численности и метаболического функционального состояния ФБ. С возрастом снижается общая численность ФБ в дерме. Так, количество ФБ в 1 мм<sup>2</sup> дермы человека возрасте 31-40 лет почти в два раза меньше, чем в возрасте 1-10 лет [17], биоптаты кожи людей в возрасте 80 лет и старше содержит примерно на 35 % меньше ФБ, чем у доноров 18-29 лет [181].

Наблюдаемое с возрастом уменьшение численности ФБ в дерме связывают со снижением скорости обновления их клеточной популяции, менее активным образованием ФБ из малодифференцированных предшественников, уменьшением количества стволовых клеток в коже, интенсификацией апоптоза и изменениями ряда функциональных параметров ФБ [18, 68, 142, 144, 187, 220, 243].

Популяция ФБ, выделенных из старых и молодых доноров, отличаются снижением миграционной способности. Это обусловлено определённой дезорганизацией активного цитоскелета, пониженной экспрессией  $\alpha$ 2-,  $\beta$ 1-интегринов, связывающихся с ламинином и коллагеном типа I [22, 24, 228, 263], снижением вязкоэластических свойств организуемого ими коллагенового матрикса. Важным различием между ФБ дермы молодых и пожилых людей является снижение пролиферативной потенции и увеличение частоты апоптозов [181].

Возрастные изменения ФБ дермы пожилых, по сравнению с молодыми,

проявляются и в меньшей синтетической активности. В ФБ дермы людей старше 40 лет наблюдается потеря мембранного потенциала митохондрий со снижением процессов клеточного дыхания, эффективности окислительного фосфорилирования и продукции АТФ, происходит существенное падение уровня синтеза митохондриальных белков [246]. ФБ дермы пожилых людей значительно меньше осуществляют продукцию экстрацеллюлярного матрикса. В коже людей 80 лет и старше общая выработка коллагена примерно на 75% снижена по сравнению с людьми молодого (18-29 лет) возраста [181]. При этом происходит параллельное снижение синтеза коллагена типа I и III с изменением их соотношения со значительным доминированием коллагена типа I [97, 110]. Снижение содержания коллагена в дерме считается одним из главных индикаторов ослабления функционирования ФБ дермы [32, 181].

По мнению ряда авторов [17, 213, 244], ключевым процессом, который приводит к старению кожи, является воспаление. Воспаление в коже запускает и поддерживает целый спектр факторов, таких как солнечный свет, низкая температура, низкая влажность воздуха, компоненты пищи и косметических средств, загрязнение окружающей среды, различные заболевания. Воспаление обеспечивают две группы клеток кожи: иммунокомпетентные клетки и ФБ. Иммунокомпетентные клетки при действии перечисленных факторов инициируют воспалительную реакцию. Продуцируемые ими цитокины и другие биологически активные вещества приводят к включению в процесс сосудистого русла и привлечению в очаг воспаления клеток, мигрирующих в кожу из кровеносного русла. В развитие воспалительной реакции вовлекаются и ФБ. ФБ сами синтезируют ряд посредников воспаления [2, 17].

Под действием ультрафиолетового излучения, как и в процессе хронологического старения, наблюдается повышение активности ММП, нарушается баланс активности ММП и ТИМП, происходит усиление катаболизма коллагена и других компонентов экстрацеллюлярного матрикса [181, 204]. Одновременно через ряд сигнальных путей снижается синтетическая активность ФБ за счёт уменьшения

экспрессии генов коллагена и ферментов, участвующих в посттрансляционной модификации белков. Возможно, накопление фрагментированного коллагена приводит к ослаблению контактов фибрилл с клетками, которые в отсутствие внешних стимулов снижают физиологическую активность. Вероятно, фрагментация коллагена и возрастное ослабление механического воздействия (натяжения) ФБ вносят в процесс снижения синтетической активности клеток не меньший вклад, чем подчиняющееся общебиологическим законам старения изменения клеток [181].

В целом, воспалительный процесс приводит к повреждению внеклеточного матрикса с последующим образованием нового, часто изменённого, в котором нарушены исходная пространственная организация его компонентов, соотношение межклеточного вещества и клеток, снижено количество сосудов [182, 213, 251].

Согласно концепции, выдвинутой Верцаром (1964 г.), одной из основных причин, приводящих к старению организма человека и животных, является старение наиболее распространённого белка в организме – коллагена [45].

Возрастные изменения волокнистых коллагенов характеризуются повышением механической прочности. «Созревание» коллагена с возрастом связано с тем, что к редуцируемым интермолекулярным поперечным связям присоединяются нередуцируемые (зрелые) поперечные связи. Основная их часть возникает путём дополнительного усложнения редуцируемых связей [80]. Одна из таких нередуцируемых связей возникает между имидазольной группой гистидина и норлейцином, который образуется в результате окислительного дезаминирования лизила. Норлейцин, в свою очередь, связывается с аминогруппой гидроксизила [284]. Другая усложнённая поперечная связь (особенно у коллагена типа II) является продуктом взаимодействия оксоиминовой связи и гидроксиаллизила, объединяющая три  $\alpha$ -цепи, входящие в состав двух или трёх соединений молекул [267].

Имеются сведения и о других ковалентных поперечных связях, которые требуют дальнейшего подтверждения.

Количественные изменения содержания коллагенов, которые вызываются недостаточной экспрессией и избыточным протеолитическим катаболизмом по мере старения, обусловлены генетически, а наблюдаемые качественные изменения коллагеновых структур связаны, в основном, негенетическими факторами. Эти изменения развиваются преимущественно на уровне посттрансляционных модификаций коллагенов и проявляются в системе интермолекулярных поперечных связей [148].

Особую роль в молекулярных механизмах старения придают активным формам кислорода с усилением свободнорадикального окисления липидов и белков на фоне снижения физиологической антиоксидантной защиты [9, 47, 105, 137]. В коже активные формы кислорода (АФК) появляются преимущественно под влиянием ультрафиолетовой радиации. АФК вызывают истощение антиоксидантной защитной системы дермы, приводят к активации ряда трансмембранных рецепторов ростовых факторов и цитокинов. В результате активируются внутриклеточные каскады передачи сигналов, вызывая экспрессию генов ММП и угнетая экспрессию генов, кодирующих полипептидные цепи фибриллярных коллагенов [204]. Непосредственное действие АФК оказывают и на экстрацеллюлярный матрикс, усиливая протеолиз коллагеновых белков (коллагены типа I, III, VII) [292].

В долгоживущих белках, к которым относятся коллаген и эластин, в результате их продолжительного взаимодействия с редуцирующими сахарами (глюкоза, фруктоза, рибоза и др.) образуются новые межмолекулярные поперечные связи: альдегидная группа редуцирующего сахара неферментативно связывается со свободной аминогруппой белка, как правило, с аминогруппами остатков лизина или аргинина. После серии химических неферментативных превращений (перегруппировка Амадори и др.) радикал моносахарида, присоединенный к белку, взаимодействует с остатком аргинина или лизина другой макромолекулы белка и становится межмолекулярной поперечной связью – осуществляется неферментативное гликозилирование, или гликация. Известно около 20 конечных продуктов гликации, среди которых преобладают глюкозепаны,  $\alpha$ -кетон, лизин-

дигидропиридиний лизин [80]. Конечные продукты гликации накапливаются в старческом возрасте в значительной степени и вызывают изменения в коллагеновых структурах двух типов.

1) Поперечные связи, вызываемые конечными продуктами гликации, в отличие от ферментативного регулируемого поперечного связывания в процессе созревания коллагена, образуются беспорядочно, включая центральный трёхспиральный домен макромолекулы белка. В результате снижается растворимость и растяжимость фибрилл, повышается их жёсткость и резистентность к действию протеолитических ферментов.

2) Кроме того, модуляция белковых аминокрупп коллагена изменяет их электрический заряд с последующим нарушением взаимодействия макромолекул внутри коллагеновых волокон, а также нарушает взаимодействие коллагена с клетками в результате модуляции аргинина в последовательностях RGD и GFOGER на коллагене [80]. Изменения затрагивают и связывание фибрилл с протеогликанами, глюкуроном, нарушается адгезия и миграция клеток.

Одновременно с интерстициальными фибриллярными коллагенами при действии конечных продуктов гликации страдают коллагены базальных мембран, что приводит к их уплотнению, понижению проницаемости и нарушению метаболизма.

Существенно страдает при старении и другой белок волокнистой структуры – эластин. Основные возрастные изменения эластических волокон состоят в усилении связывания (фиксации) кальция и липидов, и протеолитической деградации [266]. Ультрафиолетовое излучение способствует протеолитической деструкции эластических волокон кожи и одновременно вызывает эластоз – накопление и отложение в верхнем и средних слоях дермы масс эластина, имеющих неполноценную супрамолекулярную организацию и эластическую функцию [292]. Этот своеобразный феномен объясняется тем, что под влиянием ультрафиолетовой радиации происходит усиление экспрессии промотора гена эластина. Нарушения эластинового фибриллогенеза при развитии эластоза связаны с возрастными измене-

ниями экспрессии и ряда белков, участвующих в эластогенезе – фибулина-5, эластина, кластерина [140, 174, 203]. В возникновении неполноценности эластических волокон/фибрилл при эластозе имеет значение уменьшение фибриллина-1 и гликопротеинов фибриллиновых микрофибрилл MAGP-1, MAGP-4 и др. [198].

Активация протеолиза при старении приводит к изменениям и протеогликанов, затрагивающим как стержневые белки, так и гликозаминогликаны, необходимые для поддержания метаболических процессов, физико-химических и биомеханических свойств матрикса. В результате меняется взаимодействие протеогликанов с другими структурными компонентами матрикса, с сигнальными молекулами и клетками [176]. В постепенном ослаблении при старении экспрессии ФБ дермы коровых белков протеогликанов, малых протеогликанов семейства SLRP, богатых лейцином, включая люмикан и фибромодулин [202, 226] лежат действие тех же факторов и механизмов, что и изменения коллагеновых белков дермы.

Возрастное старение кожи сопровождается изменением содержания гиалуронана. Согласно данным ряда авторов [211, 223, 239] после 60 лет в дерме кожи происходит резкое снижение ГАГ. Однако имеются также указания на то, что с возрастом и при фотостарении наблюдается лишь перераспределение гиалуронана с перемещением в более глубокие слои кожи с увеличением доли гетерополисахарида, связанного с белками [192, 231].

Таким образом, при старении в коже под влиянием генетических и негенетических факторов происходят существенные изменения, затрагивающие дерму: дисбаланс между биосинтезом и катаболизмом внеклеточного матрикса; уменьшение численности активных прогениторных клеток и биосинтетической активности ФБ; изменения молекулярного состава матрикса, особенно выраженные у коллагена и эластина, затрагивающие и другие молекулярные компоненты; накопление в матриксе деградированных (существенно изменённых) макромолекул; изменения уровня регулирующих факторов – гормонов, цитокинов и ростовых факторов локального действия; понижение функциональной активности всех элементов ткани [80, 208].

Коррекция возрастных изменений кожи – одна из самых актуальных проблем. При этом используется широкий спектр препаратов, однако наиболее широкое применение нашли препараты гиалуронана и коллагена [52].

Коллаген является одним из наиболее перспективных материалов, широко применяемых в медицинской практике. Перспективность применения коллагена как биологического пластического материала обусловлена самой его природой, как основного структурного белка, отвечающего за поддержание формы и стабильности тканей организма [80]. Волокна коллагена создают трехмерный каркас, который придает внеклеточным структурам механическую прочность, обеспечивая гибкость, упругость и эластичность ткани, упорядоченность миграции, фиксации клеток и их межклеточные взаимодействия.

Коллаген – важнейший компонент реконструкции ткани после ее нарушений, основной субстрат для адгезии, роста и дифференцировки клеток [268], и формирование пространственной структуры коллагеном является ключевым моментом в организации ткани кожи, измененной при старении.

Использование коллагена как филлера связано с работами Гросса и Кирка (Gross, Kirk), успешно выделивших гель бычьего коллагена еще в 1950 году [161]. Удаление неспирализованных участков аминокислотных телопептидов в 60-е годы стал стимулом дальнейшего активного препарирования бычьего коллагена. В 1981 году препарат ZydermR Collagen Implant (INAMED Aesthetics, USA) получил разрешение Управления питания и лекарств (FDA) США и быстро стал популярным филлером для пластики мягких тканей [237]. Выделялись пожеланию низкие или высокие концентрации вещества, доступные для кросс-линкинга. Эти филлеры использовались инъекционно – внутридермально или суперфасциально в папиллярную дерму носогубной складки [236].

В дальнейшем для большей прочности бычьего коллагенового филлера, способного удерживать большую концентрацию воды, был осуществлен кросс-линкинг глутаральдегидом. Стабилизация коллагеновых волокон глутаральдегидом сделало его более резистентным к протеолитической деградации [194]. Бычий

коллаген, стабилизированный глутаральдегидом используется для инъекций в средне-ретикулярную или глубоко-ретикулярную дерму, а также в дермальную подкожную интерфасцию [170].

Позднее появились препараты нативного (неизмененного) коллагена кожи человека, изолированного из культуры фибробластов кожи, а также этот же коллаген, подвергнутый кросс-линкингу глутаральдегидом, получившие разрешение на использование FDA Соединенных штатов Америки [157].

Таким образом, мягкие коллагеновые филлеры представлены бычьим коллагеном кожи и натуральным коллагеном кожи человека, выделенным из культуры фибробластов, а также этими же коллагенами, подвергнутыми кросс-линкингу глицероальдегидом.

Коллаген типа I, полученный из кожи крупного рогатого скота, является максимально приближенным по своему составу и структуре к человеческому коллагену типа I [173, 225]. Установлено, что бычий коллаген высоко биосовместим и безопасен [200]. Опыт использования для контурной пластики фибриллярного очищенного коллагена из бычьей дермы в инъекционной форме более, чем 750 000 пациентов привел к осложнениям небольшого числа пациентов. Наиболее частым осложнением явилась локальная реакция гиперчувствительности в месте инъекции у 1-2% пациентов, обусловленное, по мнению авторов, нарушениями структуры коллагена при его выделении и/или степенью очистки [173]. Считается, что коллагеновый матрикс физиологичен, безопасен и эффективен [200, 235, 268], относится к группе нулевого фактора риска, т.е. вероятность передачи вируса энцефалита через кожу крупного рогатого скота практически отсутствует [WHO/TVC/ZOO/97,3].

Особенно важен коллаген в репаративных процессах, поскольку является ведущим компонентом реконструкции ткани после ее поражения, естественный субстрат для адгезии, роста и дифференцировки клеток [39, 40, 52, 268]. В настоящее время разработана большая группа коллагеносодержащих препаратов, являющихся эффективными наполнителями с высокой биосовместимостью, отсут-

ствием или слабой иммуногенностью, способностью к биологическому разложению [138]. Используются, как наполнители смеси пептидов коллагена и гликозаминоглюканов, реконструированной гиалуроновой кислоты и коллагена и др. Вместе с тем, остается много нерешенных вопросов, касающихся не только частоты и кратности показаний и противопоказаний, объективизации оценки эффективности, оптимальности применения тех или иных препаратов, но и вопросы механизмов фармакологических эффектов, биохимических основ влияния на жизнеспособность и пролиферативную активность клеток, характера изменений метаболизма и их стабильности в коже в местах введения коллагеносодержащих препаратов. При этом важно отметить, что ряд фрагментов основных полимерных компонентов экстрацеллюлярного матрикса, образующихся при их деградации, обладают биологической активностью, которая несвойственна самим биополимерам – коллагену, эластину, гиалуронану.

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Объект исследования

Объектом явились 170 самок белых крыс зрелого возраста (12-13 месяцев, 280-320 г) и 20 – молодого возраста (3-4 месяца) массой 150-160 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария при температуре  $24\pm 3^{\circ}\text{C}$ , естественном освещении, сбалансированном рационе питания и доступом к воде *ad libitum*.

Эксперименты были приведены в строгом соответствии с этическими нормами и рекомендациями по гуманному отношению к лабораторным животным [42], отраженными в Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1985) и приказе Минздравсоцразвития Российской Федерации №708н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» по содержанию, кормлению, уходу, выводу их из эксперимента и последующей утилизации.

Животным опытных групп под лёгким эфирным наркозом вводили отечественный препарат «Коллост<sup>R</sup> ГЕЛЬ» (ООО «Ниарбмедик плюс»), содержащий 7% коллагена в растворе глюкозы, из расчёта 0,06 мл на 100 г массы животного внутридермально техникой мезотерапии на боковые поверхности туловища (площадь 3х3 см) после предварительного удаления шерстяного покрова.

Препарат вводили дважды на 1-е и 6-е сутки эксперимента. Контрольной группе животных вводили внутридермально стерильный изотонический раствор глюкозы.

В качестве материала для исследования использовали сыворотку крови и ткань кожи в зонах введения препарата и раствора глюкозы. Животных забывали под легким эфирным наркозом на 2,4,7, 21 и 37-е сутки после первой инъекции прпарата собирали кровь в центрифужные пробирки и немедленно извлекали кожу.

Для получения сыворотки пробирки после свертывания крови центрифуги-

ровали в течение 10 мин при 2800 об/мин и отсасывали сыворотку. Кожу для исследования немедленно очищали от подкожной жировой ткани и обрабатывали разными способами.

При определении содержания суммарного коллагена и его фракций навеску ткани обезжиривали смесью этанол-этиловым эфиром (1:1). Для получения гомогената навеску сырой ткани кожи помещали в фарфоровые ступки, замороженные в лед, измельчали ножницами и растирали с кварцевым песком с соответствующими реагентами и буферными растворами. Для более полного разрушения клеток и субклеточных структур вносили детергент тритон X-100 до конечной концентрации 0,1 %, перемешивали и оставляли на 30 мин, или замораживали и размораживали содержимое 2-3 раза, центрифугировали, надосадочную жидкость переносили в отдельную пробирку и использовали для определения. При изучении содержания гликогена, гиалурона и суммарных ГАГ использовали навески сырой ткани кожи.

Для гистологических и гистохимических исследований мм кусочки кожи площадью 5X5 фиксировали в 10 % растворе формалина и после стандартной проводки заливали в парафин.

При необходимости сыворотку крови и гомогенаты тканей хранили при температуре  $-25^{\circ}\text{C}$  в течение нескольких суток.

В сыворотке крови контрольной и основной групп изучали изменения интерлейкина 1-бета (ИЛ-1 $\beta$ ), фактора некроза опухолей-альфа (ФНО- $\alpha$ ), содержания инсулиноподобного ростового фактора -1 (ИФР-1) и трансформирующего ростового фактора-бета1 (ТФР- $\beta$ 1).

Состояние метаболизма коллагена оценивали по следующим показателям:

- содержанию свободного гидроксипролина (СГП) [10; 84];
- содержанию суммарного коллагена (СК) по количеству гидроксипролина (ГП) [10];
- содержанию нейтральносолерасворимой (НСРК) и цитратрастворимой (ЦРК) фракций коллагена (НСРК) [100];

- коллагенолитической активности по E. Schalinatus et al. (1978) в модификации [126].

Для характеристики гликозамингликанов (ГАГ) изучали динамику изменений в коже содержания гиалуроновой кислоты, суммарных и сульфатированных ГАГ. Кроме того, определяли содержание гликогена, лактата, пирувата и их соотношение, активность лактатдегидрогеназы, гексокиназы и глюкозо-6- фосфатдегидрогеназы.

## 2.2. Биохимические методы исследования

*Определение свободного гидроксипролина.* Принцип метода состоит в окислении гидроксипролина хлорамином Б и конденсации продукта окисления с пара-диметиламинобензальдегидом.

Для определения содержания СГП в коже навеску ткани (15 мг) гомогенизировали при температуре 2-4 °С в фарфоровой ступке с кварцевым песком при добавлении четырёхкратного объёма дистиллированной воды. Гомогенат переносили в мерную центрифужную пробирку и центрифугировали при 2800 об/мин в течение 12 минут, супернатант переносили в другую центрифужную пробирку. Экстракцию повторяли, надосадочные жидкости объединяли, в ней определяли содержание СГП.

К надосадочной жидкости в центрифужной мерной пробирке добавляли 0,5 мл 57% раствора хлорной кислоты и 0,5 мл 5% раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Пробирки центрифугировали в течение 7-8 минут при 2800 об/мин. Супернатант отделяли и нейтрализовали 6,0н раствором NaOH по фенолфталеину до слабо пурпурной окраски, соответствующей рН 8,0 и доводили до 3 мл дистиллированной водой. В контрольную пробирку приливали 3 мл дистиллированной воды.

В обе пробирки (контроль и опыт) вносили по 0,5 мл 7% раствора хлорамина Б в 0,1 М фосфатном буфере (рН 8,0). Через 5 мин в них добавляли по 0,5 мл

57% раствора хлорной кислоты и 7% раствора пара-диметиламинобензальдегида в 95-96% этаноле. Содержимое пробирок перемешивали и пробирки помещали в кипящую водяную баню (100°C) на 110-120 сек. После охлаждения в пробирки добавляли по 4,0 мл н-бутанола, встряхивали, центрифугировали в течение 10 мин при 2800 об/мин, декантировали верхнюю фазу и фотометрировали при длине волны 560 нм опыт против контроля. По калибровочному графику рассчитывали содержание СПГ.

*Изучение коллагенолитической активности* основано на инкубации ферментсодержащего биологического объекта с коллагеном и определением интенсивности продуктов расщепления по СПГ [126].

В две пробирки (контроль и опыт) вносили по 10 мг коллагена и по 0,5 мл 0,015% раствора хлорида кальция в боратном буфере рН 8,0. В опытную пробирку добавляли 0,2 мл гомогената кожи в трис-буфере рН 7,6, в контрольную – 0,2 мл этого же буфера.

Пробирки перемешивали и инкубировали в термостате при 37-38°C в течение 4 часов. Затем в контроль вносили по 0,5 мл 5% раствора ТХУ и 57% раствора хлорной кислоты. Содержимое пробирок перемешивали и центрифугировали при 3000 об/мин. в течение 10 мин. По 1 мл надосадочной жидкости переносили в мерные центрифужные пробирки, гидролизовали в кипящей водяной бане в течение 40 минут с каплеуловителем и определяли содержание гидроксипролина по вышеописанной методике.

По разнице между контрольной и опытной пробирками находили величину коллагенолитической активности с учётом содержания белка в гомогенате кожи, которое определяли по методу Лоури.

Для получения гомогената кожи, свежевыделенную при температуре 2-4 °С ткань кожи взвешивали (20 мг) и гомогенизировали с кварцевым песком на холоде, добавляя 0,3 мл трис-буфера рН 7,6. Полученный гомогенат обрабатывали тритоном X-100 в конечной концентрации 0,1% для разрушения биологических мембран, выдерживали 30 мин на холоде и центрифугировали 10 минут при 2800

об/мин.

*Для определения суммарного коллагена и его фракций* навески ткани кожи (50 мг) обезжиривали в смеси этанола и этилового эфира (1:1), гомогенизировали и высушивали до постоянной массы. Далее сухую массу ткани кожи (5 мг) запаивали в ампулы с 6,0н раствором HCl и гидролизовали при 106°C в течение 6 часов. О содержании суммарного коллагена судили по содержанию ГП в гидролизате.

*Определение нейтрально-растворимой и цитрат-растворимой фракций коллагена.* Нейтрально-растворимый коллаген экстрагировали из сухой, обезжиренной массы кожи (5 мг) в центрифужных пробирках с 0,2 М раствором NaCl при температуре 4°C в течение 24 часов при встряхивании на шуттель-аппарате.

После этого центрифугировали в течение 10 минут при 2800 об/мин и надосадочную жидкость использовали для определения НСРК по содержанию гидроксипролина после гидролиза 6,0н раствором HCl.

К осадку ткани кожи после экстрагирования НСРК добавляли цитратный буфер (рН 3,6) и стряхивали на шуттель-аппарате в течение 24 часов при температуре 4°C. После пробирки центрифугировали в течение 10 минут при 2800 об/мин и надосадочную жидкость использовали для определения цитрат-растворимой фракции коллагена (ЦРК).

К экстракту ЦРК приливали концентрированную HCl в таком объёме, чтобы её конечная концентрация была равна 6,0н раствора, после чего экстракт запаивали в ампулы и подвергали гидролизу при 106°C в течение 6 часов. О содержании растворимых фракций судили по уровню гидроксипролина.

*Определение содержания продуктов окислительной модификации белков* осуществляли по методу R.L. Levine в модификации [27, 28, 118]. В основе метода лежит реакция взаимодействия карбонильных групп и иминогрупп окисленных радикалов аминокислот в полипептидной цепи с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, которые отличаются характером спектра поглощения в ультрафиолетовой и видимых областях света.

Параллельно изучали уровень карбонилирования белков при металлоин-

дукции *in vitro*  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ .

Для проведения реакции спонтанной окислительной модификации белков в две центрифужные пробирки (опыт и контроль) вносили по 0,1 мл гомогената кожи и 0,9 мл 1/15 М фосфатного буфера pH 7,4, прибавляли по 1 мл 20% раствора ТХУ, в опытную пробу добавляли 1 мл 0,01 М раствора 2,4-ДНФГ в 2М растворе HCl, в контроль – 1 мл 2М раствора HCl. Пробирки инкубировали в тёмном месте 1 час при комнатной температуре.

Пробы центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин, осуществляли трехкратное промывание осадка смесью этилового спирта и этилацетата (1:1). Осадок подсушивали на воздухе, растворяли в 3 мл 8М раствора мочевины. Для лучшего растворения осадка в пробы вносили 15 мкл 2М раствора HCl. Оптическую плотность образовавшихся динитрофинилгидразонов определяли на спектрофотометре при длинах волн 258 нм, 270 нм, 370 нм и 430 нм. Содержание динитрофинилгидразонов выражали в единицах оптической плотности на г белка.

При длине волны 258 нм при этом определяются алифатические альдегиддинитрофенилгидразоны (аАДНФГ) основного характера, при 270 нм – аАДНФГ нейтрального характера, при 370 нм – алифатические кетондинитрофенилгидразоны (аКДНФГ) нейтрального характера, при 430 нм – аКДНФГ основного характера.

Для проведения индуцированной окислительной модификации белков в две центрифужные пробирки (опыт и контроль) помещали по 0,1 мл гомогената кожи, 0,75 мл 1/15 М фосфатного буфера pH 7,4, 0,05 мл 4мМ раствора  $\text{FeSO}_4$ , 0,05 мл 1мМ раствора ЭДТА и 0,1 мл 0,3 мМ раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Инкубировали при 37°C в течение 15 мин. В дальнейшем ход проведения реакции был идентичен ходу работы при схеме определения спонтанного образования динитрофенилгидразонов белков.

Рассчитывали резервно-адаптационный потенциал по Ю.В. Никитиной и И.В. Мухиной [74], который представляет разницу между уровнями динитрофенилгидразонов при металлиндуцированной окислительной модификации белков,

принятой за 100%, и спонтанно образованных. Чем больший процент составляет спонтанная окислительная модификация белка, тем ниже резервно-адаптационный потенциал.

*Изучение содержания продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ)* проводили спектрофотометрическим методом в гептан-изопропаноловых экстрактах. Первичные и вторичные продукты определяли по методу, описанному И.А. Волчегорским и др. [130], конечные – по методу, описанному Е.И. Львовской и др. [112].

Для определения липиды ткани экстрагируются смесью гептан-изопропанол, которые затем разделяются. В гептановой фазе при этом растворяются преимущественно нейтральные липиды и свободные жирные кислоты, а в изопропаноловой – полярные (дифильные).

В обеих липидных фракциях измеряется оптическая плотность при 220 нм, 233 нм, 278 нм и 400 нм. При 220 нм определяется содержание изолированных двойных связей ацильных радикалов, при 233 нм – ацилгидропероксидов и диеновых конъюгатов (первичные продукты ПОЛ), при 278 нм – кетодиенов и сопряжённых триенов (вторичные продукты ПОЛ), при 400 нм – шиффовых оснований (конечные продукты ПОЛ).

Содержание продуктов липопероксидации рассчитывается в условных единицах как величина отношений экстинкций  $E_{233}/E_{220}$ ,  $E_{278}/E_{220}$  и  $E_{400}/E_{220}$  соответственно в каждой фракции с учётом разведения пробы.

Для определения продуктов ПОЛ в пробирку переносили 0,2 мл гомогената кожи, вносили 6 мл смеси гептан-изопропанол (2:1 по объёму) и экстрагировали при встряхивании в шуттель-аппарате в течение 30 мин. Далее в пробу вносили 1 мл 1н раствора HCl, интенсивно встряхивали и оставляли на 30 мин.

После разделения фаз гептановую верхнюю переносили в другую пробирку. К нижнему водно-спиртовому слою вносили 1 г сухого NaCl для обезвоживания. Параллельно готовили контрольную пробу по описанной схеме с экстрагированием 0,2 мл дистиллированной воды. В каждой фазе измеряли оптическую плот-

ность опыт против контроля при 220, 233, 278 и 400 нм. Относительное содержание продуктов ПОЛ рассчитывали на 1г ткани.

*Определение содержания ТБК-реагирующих веществ* проводили с помощью набора реагентов «ТБК-АГАТ» фирмы ООО «АГАТ-МЕД» (Россия). Продукты ПОЛ образуют с тиобарбитуровой кислотой окрашенный комплекс, экстрагируемый бутанолом. Оптическая плотность образовавшихся продуктов определяется фотометрически при длинах волн 535 нм и 570 нм.

Для определения в центрифужные пробирки (опыт и контроль) вносили по 3 мл 1,4% ортофосфорной кислоты, в опыт – 0,25 мл гомогената кожи, контроль – 0,25 мл дистиллированной воды. В обе пробирки добавляли по 1 мл 0,6% раствора ТБК.

Пробирки накрывали конденсирующими колпачками, помещали в кипящую водяную баню на 45 мин и после охлаждения в пробы вносили по 4 мл н-бутанола, полностью перемешивали содержимое. Пробирки центрифугировали при 2800 об/мин в течение 10 минут, отбирали 3 мл супернатанта розового оттенка и измеряли оптическую плотность опытной пробы против контроля при 535 нм и 570 нм. Расчёт осуществляли по формуле:

$$C = \frac{D_{535} - D_{570}}{0,156} \times 16, \text{ где}$$

C – содержание ТБК-активных продуктов в опытной пробе в мкмоль/г ткани,  $D_{535}$  и  $D_{570}$  – оптическая плотность пробы при 535 и 570 нм, 0,156 – коэффициент молярной экстинкции комплекса малоновый диальдегид-тиобарбитуровая кислота в мкмоль/ см, 16 – коэффициент разведения образца.

*Выделение гликогена* из ткани кожи проводили по методу С. Good, Н. Cramer, М. Somogy (1933) [214]. Ткань подвергалась солюбилизации 30% горячим раствором КОН, гликоген из раствора осаждался этанолом. В последующем гликоген подвергался кислотному гидролизу и в гидролизате определялся уровень глюкозы.

Навеску свежей ткани кожи (100 мг) переносили в мерную центрифужную пробирку, добавляли 1 мл 30% раствора КОН и пробирки нагревали в кипящей

водяной бане с каплеуловителем в течение 2-х часов. Пробы охлаждали, вносили 2 мл 96% этанола, ставили в кипящую водяную баню, давали вскипеть и переносили в холодильник для выпадения осадка. Выпавший осадок гликогена центрифугировали при 2800 об/мин в течение 0,5 часа. Надосадочную жидкость удаляли, а осадок подвергали трехкратному промыванию этанолом 60°, 80° и 96° соответственно с последующим центрифугированием и удалением супернатанта.

Осадок высушивали выпариванием остатка спирта на кипящей водяной бане. Осадок растворяли в 3 мл горячей дистиллированной воды, добавляли в пробирку 2 мл 2н раствора  $H_2SO_4$  и гидролизовали гликоген нагреванием пробирок в течение 2 часов в кипящей водяной бане с каплеуловителем.

Пробирки охлаждали и содержимое нейтрализовали последовательно 5н и 0,5н раствором NaOH до pH 7,5-8. Содержимое пробирок доводили до 10 мл дистиллированной водой и в разведенном гидролизате определяли содержание глюкозы глюкозооксидным методом (набор реактивов «Глюкозо-УФ-Ново» ЗАО «Вектор-Бест»). Глюкоза при этом под действием гексокиназы и АТФ образует глюкозо-6-фосфат, который окисляется глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой с образованием восстановленного НАДФН.

Концентрация глюкозы пропорциональна оптической плотности образовавшегося НАДФН и измеряется фотометрически при длине волны 340 нм. Определение содержания глюкозы производится с учетом разведения и ее концентрации в калибраторе по формуле:  $C = A/A_k$ , где  $C$  – концентрация глюкозы в ммоль/л,  $A$  – оптическая плотность опытных,  $A_k$  – оптическая плотность калибровочных проб против реагента.

Количество гликогена в ткани в мг/г ткани вычисляется по формуле:

$X \text{ мг/г} = m \times V \times 0,9297/V_1 \times P$ , где  $m$  – количество определяемой глюкозы в мг,  $V$  общий объем гидролизата после нейтрализации и разведения в мл,  $V_1$  – объем гидролизата, взятого на определение,  $P$  – навеска ткани в г, 0,937 – коэффициент перевода от глюкозы в гликоген.

*Определение суммарного содержания гликозаминогликанов в коже осу-*

ществляли согласно методическим рекомендациям П.Н. Шараева и соавт. (1990) [10]. При этом гликозаминогликаны экстрагируют щёлочью при кипячении, осаждают охлаждённым этанолом, содержащим 0,1М уксуснокислый калий и 0,17М уксусную кислоту, подвергают гидролизу 0,3М раствором ТХУ. Освобождающиеся гексуроновые кислоты образуют в присутствии серной кислоты 5-карбоксифурфурол, который с карбозолом даёт окрашенный продукт с максимумом поглощения при 530 нм. Количество гексуроновых кислот определяют по калибровочному графику.

Навеску кожи (100 мг) растирали с кварцевым песком в фарфоровой ступке, замороженной в лёд. Гомогенат переносили в центрифужную пробирку, вносили 4 мл 0,5н раствора NaOH и извлекали ГАГ в течение 6 часов при встряхивании в шуттель-аппарате при комнатной температуре. Затем пробирки центрифугировали при 2800 об/мин в течение 5-6 минут. 0,5 мл надосадочной жидкости переносили в центрифужную пробирку, добавляли 2 мл охлаждённого до 1-4°C этанола, содержащего 0,1М уксуснокислого калия и 0,17М уксусной кислоты.

Пробирки встряхивали и через 5-6 мин центрифугировали при 2800 об/мин в течение 15 минут. Центрифугат удаляли, осадок эмульгировали в 3 мл 0,3М раствора ТХУ и пробирки помещали для гидролиза в кипящую водяную баню на 30 мин с каплеуловителем. Пробу охлаждали и центрифугировали при 2800 об/мин в течение 10 мин. В надосадочной жидкости определяли содержание гексуроновых кислот.

В две пробирки (опыт и контроль) при охлаждении в ледяной воде вносили по 1 мл надосадочной жидкости и добавляли по 5 мл концентрированной серной кислоты, содержащей 0,2М тетраборнокислый натрий. Пробирки нагревали в течение 10 мин в кипящей водяной бане, охлаждали. В опытную пробирку вносили 0,1 ил 0,01М раствора карбозола в 16,1М этилового спирте, в контрольную пробирку – 0,1 мл 96° этанола.

Содержимое пробирок перемешивали, пробирки ставили на 120-130 секунд в кипящую водяную баню, охлаждали и пробы фотометрировали при 530 нм опыт

против контроля. Содержание ГАГ выражали через гексоурановые кислоты в мкмоль/г ткани, используя для расчета калибровочный график.

*Определение сульфатированных гликозаминогликанов* производили в гомогенате кожи, получаемом с 0,25М раствором сахарозы с добавлением тритона X-100 до конечной концентрации 0,1% и центрифугирования в течение 10 мин при 2800 об/мин методом иммуноферментного анализа с использованием реагентов «Wieslab<sup>®</sup> s GAG quantitative kit» фирмы «Euro Diagnostica AB» на анализаторе StatFox 2100 согласно протокола производителя.

*Определение гиалуроновой кислоты* осуществляли по методу M.F Chaplin, Y.E. Kennedy [8]. При этом гиалуронан путем ионообменной хроматографии выделяли из общих ГАГ и количественно определяли по реакции Дише с карбозолом [10].

1,0 мл щелочного экстракта кожи (получение см. в разделе определение ГАГ) нейтрализовали 0,2н раствором соляной кислоты. Белковые компоненты щелочного экстракта подвергали протеолизу добавлением катепсина К с детергентом (протеиназа К V302В с содержанием более 100 мкг/мл, 0,5% додецилсульфат натрия) при 43-45°C в течение 4 часов.

Удаление белковых примесей гидролизата осуществляли методом ионообменной хроматографии на микроколонке с ДЕАЕ-целлюлозой, с использованием раствора мочевины с детергентом – 8М раствор мочевины в 0,05М растворе ацетата натрия, содержащего 0,1% раствор тритона X-100, рН 6,0.

К гидролизату добавляли 5-ти кратный объем раствора 8М мочевины с детергентом, заливали в хроматографическую колонку (70мм x 7мм), заполненную ДЕАЕ-целлюлозой, промытой предварительно тем же раствором мочевины.

Белки удаляли этим же раствором мочевины (скорость элюции 0,2-0,4 мл/мин, контроль наличия белка спектрометрически при длине волны 280 нм).

Выделение ГК после полного вымывания белка осуществляли элюцией раствором хлористого натрия. Вначале элюировали 0,15М раствора NaCl оставшиеся в гидролизате гликопротеины, а затем в отдельный стаканчик выделяли 0,3М рас-

твором NaCl гиалуронан.

Раствор выпаривали досуха при 46-44°C в термостате, растворяли в 2 мл дистиллированной воды и определяли в растворе содержание гексуровых кислот карбозоловым методом (реакция Дише) после предварительного гидролиза в 0,3М растворе трихлоруксусной кислоты в кипящей водяной бане в течение 30 мин.

*Содержание пировиноградной кислоты* изучали спектрометрически с использованием лактатдегидрогеназы [5]. Пируват с помощью ЛДГ восстанавливается до лактата. При этом происходит окисление НАДН, реакция превращения при pH 6,9 практически протекает до конца.

Понижение концентрации НАДН эквимолекулярно концентрации пирувата и измеряется при длине волны 340нм.

Свежевыделенную кожу (100мг) сразу помещали в фарфоровую ступку, замороженную в лед и содержащую 2мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты в 0,5н соляной кислоте, измельчали ножницами и растирали с кварцевым песком.

Гомогенат переносили в центрифужную пробирку, фарфоровую ступку промывали 1мл раствора трихлоруксусной кислоты, объединяли с гомогенатом и центрифугировали в течение 10 мин. при 2800 об/мин. 2 мл надосадочной жидкости переносили в другую пробирку, вносили в пробирку 1 мл 1,1М раствора  $K_2HPO_4$  и 2 мл забуференного раствора переливали в кювету спектрофотометра, добавляли в пробу 1мл 1,1М раствора  $K_2HPO_4$  и 0,05мл  $3 \times 10^{-3}$ М раствора НАДН.

Через 2 мин делали отсчет оптической плотности при 340 нм, затем в кювету вносили 0,05 мл раствора ЛДГ (0,75 мг/мл в растворе сульфата аммония), перемешивали и спустя 2 мин вновь измеряли оптическую плотность, а затем с интервалами в 1 минуту в течение 3 минут повторяли отсчет оптической плотности.

Содержание пирувата рассчитывали по изменению оптической плотности пробы после вычитания экстинкции контроля с учетом разведения и массы взятой на анализ ткани.

Для расчета пирувата использовали пробы с содержанием пирувата лития с концентрацией 0,1 мкмоль/мл.

*Уровень молочной кислоты* в ткани кожи определяли с использованием набора реагентов «Молочная кислота» (ООО «Ольвекс Диагностикум», Россия). При окислении лактата лактатоксигеназой образуется перекись водорода, которая разлагается пероксидазой и приводит к окислительному фазосочетанию 4-аминоантипирина и 4-хлорфенола с образованием окрашенного хинонимина. Концентрация хинонимина пропорциональна содержанию лактата и определяется фотометрически при длине волны 500нм. Уровень молочной кислоты определяется с помощью калибратора, содержащего 3,34 ммоль/л лактата.

Схема реакции:



Для определения молочной кислоты в образцах ткани кожи использовали 0,1 мл забуференного раствора супернатанта гомогената в 10% растворе трихлоруксусной кислоты, содержащим 0,5н HCl при определении пирувата.

*Определение активности ферментов.* Для получения гомогената кожи при определении активности гексокиназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-фДГ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) кожу экспериментальных животных очищали от подкожной клетчатки, помещали в фарфоровые ступки, замороженные в лед, измельчали ножницами и растирали с кварцевым песком в холодном 0,25М растворе сахарозы.

Полученный гомогенат перемещали в центрифужную пробирку, для разрушения клеточных и субклеточных мембран вносили тритон X-100 до конечной концентрации 0,1% и оставляли на 30 минут на холоде после перемешивания.

Пробирки центрифугировали 10 мин при 2800 об/мин, надосадочную жидкость переносили в отдельные пробирки и использовали для определения активности энзимов. Содержание белка в пробе определяли по Лоури.

*Определение активности супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1)* осуществляли набором реагентов «RANSOD» (Ransox Labor Ltd).

Фермент активизирует образование пероксида водорода и молекулярного кис-

лорода из супероксидного радикала кислорода и водорода. Ксантин и ксантинооксидаза генерируют  $O_2^{\cdot -}$ , который реагирует с хлоридом 2-(4-йодофенил)-3-(4-нитрофенил)-5-фенилнитразолия (I.N.T.) и образует красного цвета фермазан.

Степень ингибирования этой реакции определяется как активность фермента. За единицу активности СОД принимается то количество фермента, которое вызывает 50% угнетения образования фермазана, измеряемого при длине волны 505 нм.

Для проведения реакции в пробирку приливали 0,05 мл супернатант гомогената кожи (опыт), в другую 0,05 мл стандарта. В обе пробирки вносили разбавитель проб по 0,05 мл, смешанного субстрата по 1,7 мл, содержащего I.N.T. и ксантин, и раствора ксантинооксидазы по 0,25 мл. Перемешивали. Через 30 с при длине волны 505 нм измеряли  $A_1$ , а через 3 мин. –  $A_2$ . Содержание СОД в пробе рассчитывали по формуле:  $A_2 - A_1/3 = \Delta A/\text{мин}$ , стандарта (ст) и пробы (пр).

Выраженность ингибирования реакции СОД вычислили по формуле:

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

где SL – разбавитель проб.

Для определения активности СОД в ед/мл гомогената ткани составляли график процентного ингибирования для каждой точки стандарта по шкале Log 10 (концентрация стандарта СОД в ед/мл) и переводили при расчете активности СОД на мг белка в пробе. Содержание белка определяли по Лоури.

*Определение активности глутатионпероксидазы (ГПО, КФ 1.11.1.9) проводили набором реагентов «GLUTATIONPEROXIDASE» (Ransox Labor Ltd).*

Принцип метода основан на утилизации глутатиона восстановленного с помощью гидроперекиси кумина.

Окисленный глутатион впоследствии под действием глутатионредуктазы и восстановленного НАДФН переходит в восстановленную форму. Окисление НАДФН с превращением  $\text{НАДФ}^+$  сопровождается снижением абсорбции при 340 н.м.

Для проведения ферментивной реакции использовали супернатант гомогената ткани, который разводили 0,1 м калий-фосфатным буфером рН7,4.

В опытную пробирку вносили 0,05 мл пробы, в контрольную – 0,05 мл дистиллированной воды, добавляли по 1,0 мл агента разведения и через 5 мин – по 1 мл реактива Драпкина, по 2,5 мл реагента, содержащего 4 ммоль/л глутатиона восстановленного, глутатионредуктазы более 0,5 е/л, НАДФН 0,34 ммоль/л в фосфатном буфере, и по 0,1 мл кумина, перемешивали. Через 1 мин определяли исходную абсорбцию опыта и контроля ( $E_0$ ) при длине волны 340 нм, далее через 1 мин  $E_1$  и через 3 мин –  $E_2$ . Расчет активности осуществляли по формуле:

$$E/\text{мг белка} = 8412 \cdot \frac{((E_1 - E_0) + (E_2 - E_1/2))}{a},$$

где 8412 – коэффициент, учитывающий объем пробы и молярную экстинкцию НАДФ, а – концентрация белка в мг в пробе.

*Определение активности каталазы (КФ 1.11.1.6)* осуществляли по методу, описанному М.А. Королюк и др. [64]. Метод основан на взаимодействии  $\text{H}_2\text{O}_2$  с солями молибденовой кислоты с образованием стойкого окрашенного продукта. При наличии каталазы уровень образования комплекса снижается в результате разложения каталазой пероксида водорода.

В две пробирки (холостая проба и опыт) для центрифугирования вносили по 2 мл 0,03 % раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Реакцию запускали приливанием в опыт 0,1 мл супернатанта тканевого гомогената ткани кожи, в холостую пробу добавляли одновременно 0,1 мл дистиллированной воды.

Выдерживали пробирки при комнатной температуре 10 мин и добавляли в обе пробирки по 1 мл 4% раствора молибдата алюминия и по 0,5 мл 20 % раствора трихлоуксусной кислоты. Пробирки центрифугировали при 2800 об/мин в течение 10 мин. В супернатанте измерял интенсивность окраски при длине волны 410 нм, опыт и холодную пробу против контроля.

В контрольную пробу вносили 2 мл калий-фосфатного буфера рН 7,4 вместо раствора пероксида водорода.

Формула расчета:

$$A = \frac{(E_{\text{хол}} - E_{\text{оп}}) \cdot V \cdot t \cdot K}{a},$$

где А активность фермента в Е/мг белка,  $E_{\text{хол}}$  и  $E_{\text{оп}}$  – экстинкции холостной и опытной проб, V – объем вносимой пробы, t – время инкубации в мин, K – коэффициент микромолярной экстинкции пероксида водорода, равняется 36,81; а – количество белка в мг в пробе.

*Определение активности гексокиназы* (КФ 2.7.1.1) проводили спектрофотометрически с использованием сопряженной системы, включающую вспомогательную глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу [1].

Инкубационная система в кювете спектрофотометра содержала  $5 \times 10^{-2}$  М трис-НСI-буфер рН 8,0, 2 мкМ АТФ, 5 мкМ  $\text{MgCl}_2$ , 0,25 мкМ НАДФ, 0,3 МЕ глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу (общий объем пробы 3 мл).

Реакцию начинали добавлением в кювету спектрофотометра 0,1 мл гомогената ткани кожи (0,5-1мг белка), измеряли оптическую плотность пробы при 340 нм. Реакцию проводили при комнатной температуре. Точно через 5 минут повторяли измерения оптической плотности.

Активность выражали в нмоль НАДФН, восстановленного за 1 мин на 1 мг белка с учетом коэффициента микромолярной экстинкции НАДФН, равной 6,22.

*Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы* (КФ 1.1.1. 49) осуществляли по методу G.Glok, Mc Leon (1953) в модификации [61]. Метод основан на измерении при длине волны 340 нм уровня образующегося НАДФН при окислении глюкозо-6- фосфата в 6-фосфоглюколактон.

Инкубационная среда, которую вносили в кювету спектрофотометра, содержала 2,9 мл триэтаноловый буфер рН 7,5, 0,1мл 0,03 раствора  $\text{НАДФ}^+$  и 0,02 мл гомогената ткани кожи. Среду перемешивали и оставляли на 5 мин. Реакцию начинали внесением в пробу 0,05 мл 0,04М раствора динатриевой соли глюкозо-6-фосфата и тотчас измеряли оптическую плотность при длине волны 340 нм. Повторно измерение проводили точно через 5 мин. Активность фермента выражали в мкмоль/(с·мг белка) с учетом миллимолярной экстинкции НАДФН, равный 6,22

по формуле:

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

где  $A$  – активность фермента в мкмоль/ (с·мг белка);  $\Delta E$  – разность интенсивности поглощения в конце и начале пробы; 3,97 – объем пробы; 50 – коэффициент перерасчета в мл на гомогенат; 60 – коэффициент перевода из мин в секунды;  $V$  – содержание белка в гомогенате в мг/мл

*Активность лактатдегидрогеназы* (КФ 1.1.1. 24) изучали, используя набор реагентов «Лактатдегидрогеназа» ООО «Ольвекс Диагностикум» (Россия).

Принцип метода основан на измерении количества восстановленного НАДН, используемого на восстановление пирувата в лактат. Скорость окисления НАДН пропорциональна активности ЛДГ и измеряется спектрофотометрически при длине волны 340 нм.

В кювету спектрофотометра вносятся реагенты согласно приложенной инструкции и производятся измерения при 340 нм в течение 3-х минут через каждую минуту ровно.

Расчет активности фермента (Е/мг белка) осуществляется по формуле

$C = 8,095 \times E_{340/\text{мин}} \times V$ , где 8,095 – коэффициент пересчета при 25<sup>0</sup>С,  $V$  – содержание белка в гомогенате в мг/мл.

*Определение цитокинов в сыворотке крови.* Содержание ИЛ-1 $\beta$ , ФНО- $\alpha$ , ИФР-1, ТФР-1 $\beta$  изучали методом твердофазного иммуноферментного анализа на анализаторе StatFox 2100 с использованием наборов реагентов ИФА –ИЛ-1 $\beta$  и ИФА-ФНО-альфа (ООО «Цитокиновый контур»), IGF-ELISA (фирмы «Mediagnost») и TGF- $\beta$ - ELISA (фирмы «Affymetric Biosiens) согласно протоколам производителей.

### 2.3. Гистологические и иммуногистохимические методы исследования<sup>1</sup>

При проведении гистологических и гистохимических исследований кусочки

---

<sup>1</sup> *Выражаем благодарность Шумихиной Г.В. доктору медицинских наук, профессору, заведующей кафедрой гистологии ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России за помощь в выполнении данного раздела работы*

ткани кожи площадью 5X5 мм фиксировали в 10% нейтральном формалине, после стандартной проводки заливали в парафин. С использованием микротомы LEICA 4 RM 2145 (Германия) изготавливали срезы, окрашивали их гематоксилином и эозином по методу Ван-Гизона, по Маллори, импрегнировали солями серебра по Футу [19]. С целью гистохимического выявления суммарных ГАГ на срезах проводили качественную реакцию по Хейлу [49]. Визуализацию и фотографирование препаратов делали с помощью микроскопа LEICA ДМ-5000 (Германия) со специализированным программным обеспечением управления настройки и захвата изображения. Иммуногистохимически изучали клетки, экспрессирующие цитокин Ki-67 и фактор роста фибробластов-1 (FGF-1). Белок Ki-67 определяется в ядрах, а FGF-1 в цитоплазме пролиферирующих клеток. Выявление цитокинов осуществляли согласно протоколу производителя с использованием мышиных поликлональных антител (фирма «Santa Cruz Biotechnology», США) и универсальной системы вторичной детекции для визуализации (непрямая поликлональная стрептовидин-биотиновая система детекции («Novocastra<sup>tm</sup>», Германия). Окрашивание производили в гистостейнере (LICA BOND MAX («Leica», Германия). Срезы докрашивали раствором гематоксилина и заключали в бальзам. Подсчет клеток, экспрессирующих цитокины, производили с помощью микроскопа LEICA ДМ-5000В в поле зрения при увеличении в 400 раз. В каждой группе животных на каждый срок исследования делали измерения в 20 полях зрения.

#### **2.4. Статистическая обработка результатов**

Статистическую обработку результатов осуществляли, используя пакет программ Statistica 6,0 фирмы (Stat Soft). Тип распределения для выборок определяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. В группах выборки при параметрическом распределении значений оценивали выборочную среднюю арифметическую ( $\bar{X}$ ) и выборочную стандартную ошибку средней ( $s_x$ ). При ассиметричном распределении данных исследования применяли критерий непараметрической статистики:

определяли медиану (Me), верхний и нижний квартили ( $Q_1$ - $Q_3$ ). Статистическую значимость межгрупповых различий выявляли с использованием t-теста Стьюдента при нормальном распределении, а при асимметричном распределении – U-критерия Манна-Уитни. Вероятность справедливости нулевой гипотезы принимали за  $P=0,05$  [22].

## Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1. Характеристика обмена коллагена кожи в области внутридермального введения препарата нереконструированного коллагена типа I

Коллагеновые волокна формируют остов, каркас дермы, обеспечивая прочность и ряд других биомеханических свойств кожи. Они обладают информационно-регуляторной функцией: участвуют в морфогенезе, дифференцировке фибробластов, взаимодействуют со всеми компонентами межклеточного матрикса кожи. Около 70% сухой массы дермы приходится на коллаген. При биологическом старении кожи и старении под действием ультрафиолетовых лучей происходят качественные изменения в структуре коллагеновых волокон, а также развивается дисбаланс между синтезом и распадом коллагена, увеличивается количество метаболически инертного коллагена. При этом в течение жизни человека содержание коллагена в коже снижается в среднем примерно на один процент в год [45, 52, 287]. У людей пожилого и старческого возраста фибробласты синтезируют коллаген более чем на половину меньше, по сравнению с клетками лиц молодого возраста [181]. Как следствие нарушается архитектоника дермы со снижением эластичности, упругости кожи, появлением морщин, изменениями овала лица.

В отдельной серии экспериментов было проведено определение содержания суммарного коллагена (СК) кожи, его нейтральносолеорастворимой (НРСК), цитратрастворимой (ЦРК) фракций и свободного гидроксипролина (СГП) у самок крыс зрелого (12-13 месяцев) и молодого возраста (3-4 месяца). Концентрация нейтральносолеорастворимой фракции представляет содержание вновь синтезированных структур (проколлаген и молекулярный коллаген), цитратрастворимый коллаген – супрамолекулярных структур (микрофибриллярный и фибриллярный коллаген), свободный гидроксипролин косвенно отражает выраженность протеолиза коллагена. Полученные результаты представлены в таблице 1.

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

Показатели	Возрастная группа		P
	Молодые, n=10	Зрелые, n=16	
СГП, мкмоль /г ткани	18,7±0,97	15,5±1,21	0,206
НСРК, мкмоль ГП /г сухой ткани	11,2±0,76	7,9±0,45	<b>0,017</b>
ЦРК, мкмоль ГП /г сухой ткани	16,7±0,28	14,2±0,29	<b>0,038</b>
СК, мкмоль ГП /г сухой ткани	294±9,7	258±12,4	0,084

В коже животных молодого возраста выявляется более высокое содержание нейтральносоластворимого и цитратрастворимого коллагена, а суммарная фракция достоверно не отличается. Различие уровня нейтральносоластворимой и цитратрастворимой фракций коллагена в коже крыс молодого возраста над зрелыми животными превышает таковое суммарного коллагена (рисунок 1). По всей вероятности, эти различия отражают более интенсивное течение биосинтетических процессов коллагена в коже у животных молодого возраста. О более активном метаболизме коллагена в коже молодых животных свидетельствует и уровень свободного оксипролина.

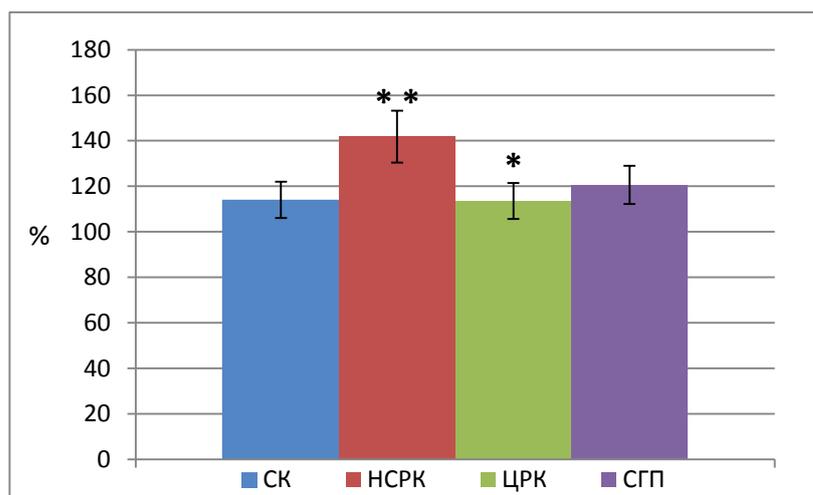


Рисунок 1 – Различия содержания коллагена и его фракций в коже самок молодого возраста относительно крыс зрелого возраста, принятых за 100% (\* – P < 0,05;

\*\* – P < 0,02)

При возрастной инволюции кожи происходят и качественные изменения белков, особенно это касается коллагеновых белков, характеризующихся более длительным периодом обновления [181]. Эти качественные изменения коллагеновых структур, по мнению большинства авторов [45, 80, 148, 267], связаны с негенетическими факторами, среди которых основную роль отводят процессам гликации и усилению процессов свободнорадикального окисления в результате воздействия активных форм кислорода (АФК). АФК вызывают истощение антиоксидантной защиты, усиливают процессы перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков, приводят к активации ряда трансмембранных рецепторов ростовых факторов и других цитокинов. Как следствие, активируются внутриклеточные каскады передачи сигналов, угнетая экспрессию генов, кодирующих полипептидные цепи фибриллярных коллагенов [204].

В этой связи были проведены эксперименты по изучению выраженности ПОЛ, окислительной модификации белков и антиоксидантной системы кожи у самок крыс молодого (3-4 месяца) и зрелого (12-13 месяцев) возрастов.

Результаты определения продуктов перекисления липидов, экстрагированных из кожи крыс разных возрастных групп (таблица 2), свидетельствуют о наличии статистически значимых различий в содержании первичных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов радикалов жирных кислот в изопропаноловой фазе липидного экстракта и вторичных (кетодиены и сопряжённые триены) и конечных (шиффовы основания) продуктов в гептановой и изопропаноловой фракциях, а также в содержании соединений, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой.

В гептановой фазе, в которую экстрагируются преимущественно свободные жирные кислоты, неполярные (нейтральные) липиды, повышается уровень вторичных и конечных продуктов липопероксидации. Статистически значимое повышение содержания первичных, вторичных и конечных продуктов в изопропаноловой фракции у группы животных зрелого возраста по сравнению с молодыми отражает более высокую интенсивность течения процессов перекисного окисления в дифильных липидах, составляющих основу биологических мембран.

Таблица 2 – Уровень продуктов перекисного окисления липидов кожи у самок белых крыс молодого и зрелого возрастов, Me[Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>]

Показатели	Возрастные группы		P
	Молодые (3-4 мес.), n=10	Зрелые (12-13 мес.), n=10	
ТБК-активные продукты, нмоль/г ткани	2,27 [1,84-2,79]	2,94 [2,03-3,46]	<b>0,033</b>
Диеновые конъюгаты (гептановая фаза), усл.ед.	0,244 [0,175-0,288]	0,266 [0,223-0,304]	0,231
Кетодиены и сопряжённые триены (гептановая фаза), усл.ед.	0,114 [0,096-0,138]	0,142 [0,132-0,154]	<b>0,021</b>
Шиффовы основания (гептановая фаза), усл.ед.	0,011 [0,010-0,015]	0,016 [0,012-0,021]	<b>0,027</b>
Диеновые конъюгаты (изопропаноловая фаза), усл.ед.	0,132 [0,120-0,153]	0,204 [0,184-0,233]	<b>0,026</b>
Кетодиены и сопряжённые триены (изопропаноловая фаза), усл.ед.	0,208 [0,184-0,253]	0,286 [0,262-0,298]	<b>0,018</b>
Шиффовы основания (изопропаноловая фаза), усл.ед.	0,054 [0,036-0,062]	0,074 [0,058-0,089]	<b>0,028</b>

Увеличение содержания продуктов перекисного окисления липидов, увеличение интенсивности процессов хемилюминесценции, отражающих процессы свободнорадикальных процессов, в гомогенатах кожи у крыс более старшего возраста по сравнению с молодыми было выявлено и другими авторами [30; 137].

Свободнорадикальной модификации подвергаются и белки, окисленные формы которых рассматриваются как один из ранних маркёров окислительного поражения тканей. Окислительную модификацию белков могут вызывать не только активные формы кислорода, но и азота, металлы переменной валентности, продукты липидопероксидации, например, малоновый диальдегид, 4- гидроксид-2-ноненаль и др. [6; 28; 56]. Окислительная атака белковой молекулы приводит к изменению в полипептидной цепи боковых радикалов аминокислот [53; 117; 151; 261; 298]. Это приводит к реорганизации структуры белковых молекул с их дальнейшей фрагментацией и агрегацией, увеличением гидрофобности и чувствительности к протеолизу [4; 53; 118; 267].

Результаты изучения спонтанно образованного уровня карбонилирования белков кожи самок крыс разных возрастных групп и их уровня после индукции образования активных форм кислорода путём введения в реакционную среду пероксида водорода и ионов двухвалентного железа представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Содержание продуктов окислительной модификации белков (мкмоль/г белка) и резервно-адаптационный потенциал кожи самок белых крыс разных возрастных групп, Me[Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>]

Показатели	Возрастные группы		P
	Молодые (3-4 мес.), n=10	Зрелые (12-13 мес.), n=10	
аАДФГ со нейтрального характера, спонтанно образованный уровень	0,456 [0,432-0,502]	0,504 [0,458-0,532]	0,078
аАДФГ и нейтрального характера, при металлоиндукции	1,188 [0,956-1,248]	0,953 [0,850-1,195]	<b>0,023</b>
аАДФГ со основного характера, спонтанно образованный уровень	0,168 [0,137-0,181]	0,186 [0,148-0,192]	0,054
аАДФГ и основного характера, при металлоиндукции	1,065 [0,911-1,088]	0,974 [0,922-1,095]	<b>0,038</b>
аКДФГ со нейтрального характера, спонтанно образованный уровень	16,8 [13,7-20,2]	19,7 [15,3-23,5]	<b>0,031</b>
аКДФГ и нейтрального характера, при металлоиндукции	186,8 [175,4-200,4]	174,1 [162,7-199,8]	0,724
аКДФГ со основного характера, спонтанно образованный уровень	3,92 [3,76-4,91]	5,17 [4,67-6,09]	<b>0,044</b>
аКДФГ и основного характера, при металлоиндукции	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]	<b>0,034</b>
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]	<b>0,048</b>
РАП при 430 нм	85,5 [79,3-87,5]	78,3 [74,6-84,8]	<b>0,038</b>
Примечания: аАДФГ – алифатические альдегид-динитрофенилгидразоны, аКДФГ – алифатические кетон-динитрофенилгидразоны, РАП – резервно-адаптационный потенциал			

Из приведённых в таблице данных видно, что в белках кожи животных зрелого возраста по сравнению с молодыми наблюдается некоторое повышение спонтанно образованного уровня алифатических альдегид-динитрофенилгидразонов и нейтрального и основного характера (аАДФНГн и аАДФНГо). Однако это повышение не достигает статистической достоверности ( $P = 0,078$  и  $P = 0,054$  соответственно). При металл-катализируемой окислительной модификации белков наблюдалось более интенсивное образование аАДФНГ нейтрального ( $P=0,0213$ ) и основного ( $P=0,038$ ) характера в коже животных молодого возраста. При изучении содержания в белках кожи алифатических кетон-динитрофенилгидразонов (аКДФНГ) выявилась обратная картина. Спонтанно образованный уровень аКДФНГ нейтрального и основного характера у животных зрелого возраста был статистически значимо выше по сравнению с крысами молодого возраста:  $P=0,031$  для аКДФНГ нейтрального характера и  $P= 0,044$  для аКДФНГ основного характера, а оценка индуцированного уровня этой группы кетон-динитрофенилгидразонов не выявила статистически значимого различия между белками кожи крыс молодого и зрелого возрастов.

Полученные различия в возрастной динамике определения альдегидных и кетонных производных окислительной модификации белков кожи, возможно, связаны с тем, что по данным ряда авторов [28, 56, 113, 118], альдегидные производные динитрофенилгидразонов являются маркёрами ранней окислительной модификации белков, а их кетонные производные – поздними маркёрами, отражающими степень окислительной дезорганизации молекул белков. Согласно этим представлениям можно высказать предположение, что с увеличением возраста в коже происходит преимущественное увеличение (накопление) продуктов более поздней модификации белковых структур.

Нельзя упускать из вида, что интенсификация ПОЛ и ОМБ является отражением смещения оксидантно-антиоксидантной системы в результате не только интенсификации образования и действия реакционно активных прооксидантных компонентов, но и снижения факторов антиокислительной защиты. Определение

активности основных антиоксидантных ферментов в ткани кожи крыс разного возраста показывают, что у животных с увеличением возраста наблюдается некоторое их падение (таблица 4).

Таблица 4 – Активность антиоксидантных ферментов кожи крыс-самок молодого и зрелого возрастов,  $\bar{X} \pm s_x$

Показатели	Группа животных		P
	Молодые (3-4 мес.), n=10	Зрелые (12-13 мес.), n=10	
Супероксиддисмутаза, Ед/мг белка	86,5±7,12	78,1±5,44	0,438
Каталаза, Е/мг белка	0,14±0,011	0,10±0,012	<b>0,048</b>
Глутатионпероксидаза, Е/мг белка	223±12,6	184±11,8	<b>0,039</b>

При этом статистически значимое уменьшение активности выявляется при определении энзимов, участвующих в разложении неорганического и органических пероксидов – каталазы и глутатионпероксидазы. При старении, по данным ряда авторов [30,137], показатели системы ПОЛ/ антиоксидантная защита в крови смещаются в сторону превалирования ПОЛ незначительно, однако при действии ультрафиолетового излучения, эндотоксемии они становятся статистически значимыми. Аналогичная динамика изменений параметров оксидантно-антиоксидантной системы были выявлены в коже у крыс зрелого возраста и старых крыс [30].

Таким образом, при увеличении возраста в коже происходят изменения, свидетельствующие о снижении потенциала антиокислительной защиты на фоне повышения продуктов ПОЛ и ОМБ. Ю.В. Никитина, И.В. Мухина [74] предложили характеризовать смещение оксидантно-антиоксидантную систему тканей путем расчёта резервно-адаптационного потенциала, который представляет собой соотношение спонтанно образованного уровня алифатических альдегид- и кетон-динитрофенилгидразонов при ОМБ к металлиндуцированному уровню их образований, принятого за 100%. Чем выше процентная доля спонтанно образованных

динитрофенилгидразонов, тем меньше резервно-адаптационный потенциал (таблица 3, рисунок 2).

У животных зрелого возраста при изучении окислительного карбонилирования белков на всех длинах волн (258 нм, 270 нм, 370 нм, 430 нм) резервно-адаптационный потенциал оказался ниже, достигая статистической значимости при определении аАДНФГ нейтрального и аКДНФГ основного характера.

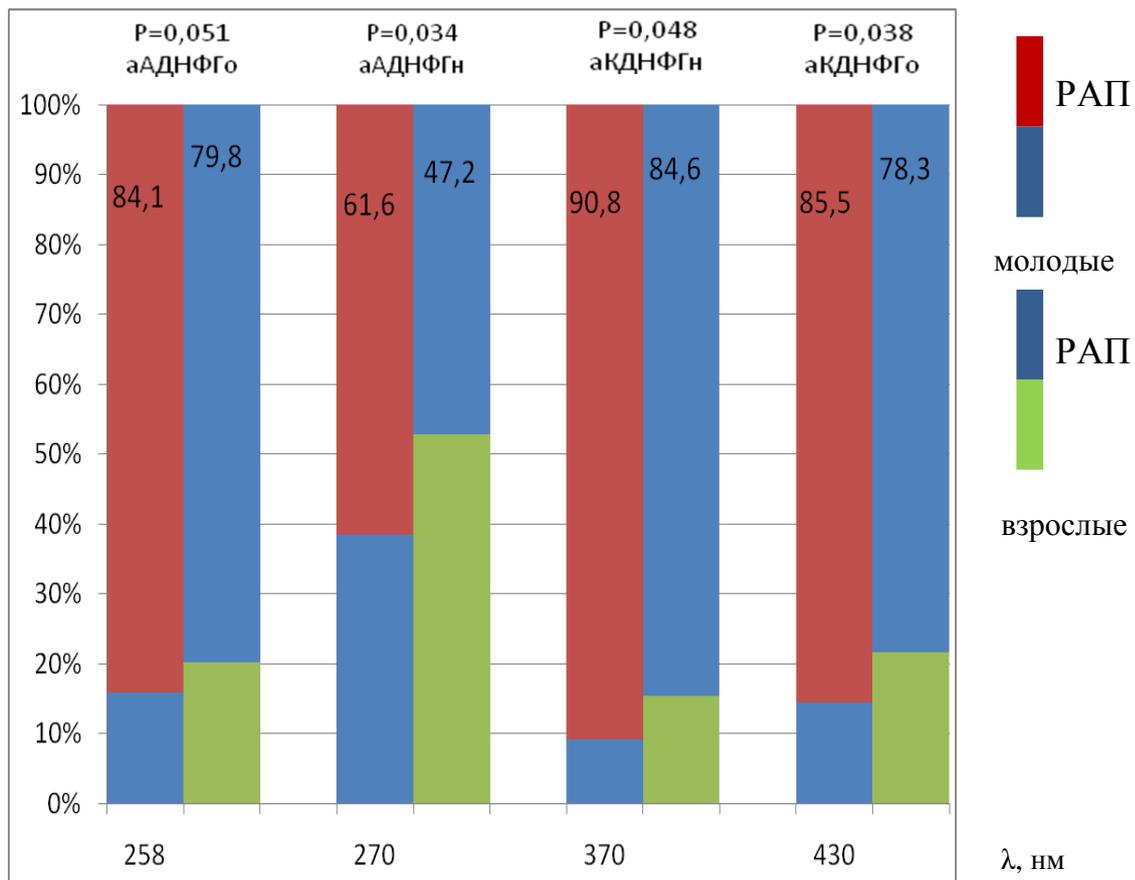


Рисунок 2 – Резервно-адаптационный потенциал белков кожи крыс разного возраста (аАДНФГн-алифатические альдегиддинитрофенилгидразоны нейтрального, аАДНФГо-основного характера; аКДНФГн-алифатические кетондинитрофенилгидразоны нейтрального, аКДНФГо-основного характера)

Таким образом, возрастные изменения белков кожи характеризуются снижением резервно-адаптационного потенциала, поскольку комплекс окислительной модификации белков представляет собой совокупность продуктов окисления

белковой природы, разнородных по структуре, источникам и срокам формирования, патологическому воздействию соединений, образованных при накоплении окисленных продуктов. Так, при окислении боковых цепей аминокислотных остатков происходит формирование карбонильных производных. Окисление радикалов лизина, аргинина, пролина, гистидина приводит к образованию альдегидных или кетонных производных, а окисление боковых цепей глутамата и аспартата может привести к разрыву полипептидной цепи с образованием пировальной группы из N-концевой аминокислоты. Разрыв полипептидной цепи может произойти и при окислительной атаке с образованием радикального центра в результате реакции водородного атома аминокислотных остатков с гидроксил-радикалом [28]. Наиболее чувствительными к металл-зависимому окислению являются радикалы гистидина, лизина, аргинина, метионина, цистеина, фенилаланина, тирозина, триптофана. При окислительной модификации бокового радикала цистеина под влиянием активных форм кислорода может происходить образование дисульфидных сшивок с последующей агрегацией белковой молекулы. Агрегацией белка могут сопровождаться и образование битирозиновых сшивок, конъюгация белка с продуктами окисления [117; 164]. Образовавшиеся агрегаты и фрагменты белков более устойчивы к действию протеолитических ферментов и могут обладать токсическими свойствами, способствуя некрозу или апоптозу клеток [76].

Основной белок дермы коллаген типа I в структуре  $\alpha$ -цепей содержит большой объем аминокислот, радикалы которых могут быть подвергнуты окислительной модификации. Так, на долю пролина и гидроксипролина приходится около 30% его первичной структуры, лизин, гидроксизин и аргинин составляют более 9%, аспартат, глутамат, аспарагин и глутамин – около 10% [80, 262]. Поэтому окислительная модификация коллагена, совместно с процессами неэнзиматического гликирования, способствуя возрастным изменениям, оказывает влияние на физико-химические свойства коллагеновых фибрилл, на взаимодействие меж-

ду компонентами коллагеновых волокон, а также на интенсивность их метаболизма.

Оценка влияния интрадермального введения техникой мезотерапии немодифицированного бычьего коллагена типа I на метаболизм этого фибриллярного белка кожи у животных зрелого возраста была проведена в следующей серии экспериментов. Препарат коллагена животным опытной группы вводили на 1-е и 6-е сутки эксперимента.

Внутридермальное введение коллагеносодержащего препарата у животных опытной группы сопровождалось изменениями содержания в коже в области инъекций нейтральносолеорастворимого, цитратрастворимого и суммарного коллагена (таблица 5).

Таблица 5 – Содержание суммарного коллагена и его фракций в коже крыс зрелого возраста при внутридермальном введении коллагеносодержащего препарата,

$$\bar{X} \pm s_x$$

Показатели	Группы животных					
	Кон- трольная, n=16	Опытная				
		2-е сут- ки, n=10	4-е сут- ки, n=10	7-е сут- ки, n=12	21-е сут- ки, n=10	37-е сут- ки, n=12
СК, мкмоль ГП/ г сухой ткани	256±12,4	381±21,6 <b>P &lt; 0,001</b>	336±16,4 <b>P &lt; 0,001</b>	398±21,3 <b>P &lt; 0,001</b>	301±14,6 P = 0,052	354±22,5 P = 0,009
НСРК мкмоль ГП/ г сухой тка- ни	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, мкмоль ГП/г сухой ткани	14,2±0,49	16,2±0,55 P = 0,035	16,5±0,41 P = 0,050	23,9±1,34 P = 0,005	27,8±1,51 <b>P = 0,004</b>	28,5±1,48 <b>P &lt; 0,001</b>

Содержание суммарного коллагена в коже животных опытной группы статистически значимо повышено во все сроки исследования, кроме 21-х суток (рисунок 3). В ближайшие дни после интрадермального введения препарата увеличение содержания коллагена можно объяснить суммацией собственного коллагена кожи и экзогенного коллагена, введенного техникой мезотерапии. В более отдаленные дни наблюдения (21-е, 37-е сутки) его повышение, вероятно, связано с интенсификацией синтеза de novo. На это указывает и динамика изменений содер-

жания в коже крыс нейтрально-растворимой и цитрат-растворимой фракций коллагена.

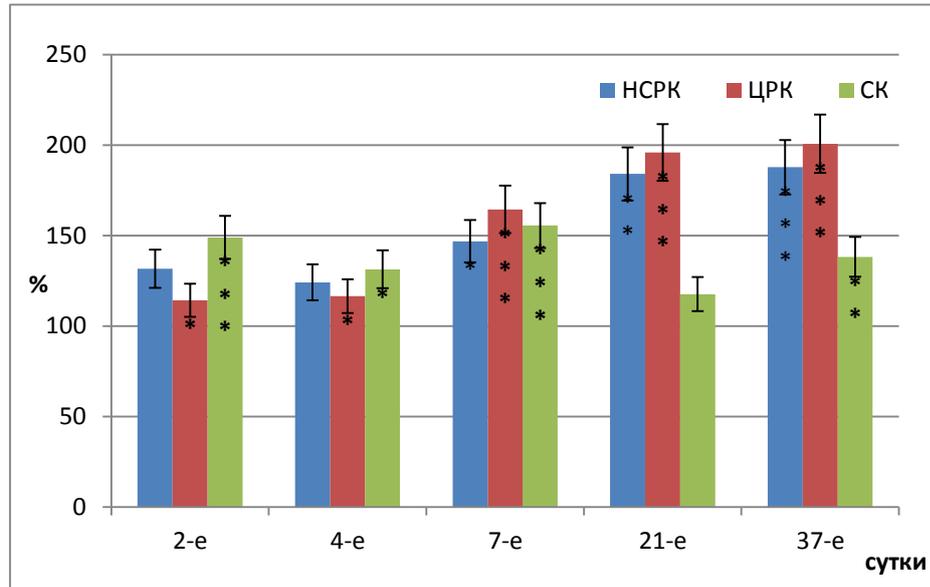


Рисунок 3 – Динамика изменений содержания фракций коллагена в коже крыс в области введения немодифицированного бычьего коллагена типа I, в % к контролю, принятому за 100% (\* –  $P < 0,05$ ; \*\* –  $P < 0,01$ ; \*\*\* –  $P < 0,001$ )

В первые сутки наблюдения (2-е, 4-е, 7-е сутки) некоторое возрастание растворимых фракции коллагена кожи в местах инъекции препарата, вероятно, связано не только с усилением биосинтеза коллагена, но и с активацией деградации введенного экзогенного белка, а в более отдаленные сроки наблюдения – с интенсификацией процессов биосинтеза коллагена.

На усиление процессов деградации коллагена в зонах его внутридермального введения указывают усиление содержания в коже свободного гидроксипролина во все сроки наблюдения кроме 2-х суток и повышение коллагенолитической активности (КА) гомогената ткани кожи опытной группы животных (таблица 6, рисунок 4). Так, коллагенолитическая активность гомогената кожи у животных опытной группы на 2-е сутки эксперимента повышалось до 155,5 % по сравнению с контролем, на 7-е сутки – до 161,7%.

Уровень свободного гидроксипролина повышался постепенно и не столь значительно. В отдаленные сроки коллагенолитическая активность кожи снижа-

лась, но не достигала контрольного уровня и отличалась более высокими значениями, сравнительно давно [57; 290; 291] экспериментами с введением радиоактивных аминокислот ( $^{14}\text{C}$ -глицин,  $^{14}\text{C}$ -пролин) и экстрагированием коллагена из кожи крыс при помощи солевых и кислых растворов через различные интервалы времени показали, что интенсивность метаболизма этих фракций белка многократно превышает нерастворимый коллаген.

Таблица 6 – Содержание свободного гидроксипролина и коллагенолитическая активность кожи самок крыс в зонах внутридермального введения препарата немодифицированного коллагена,  $\bar{X} \pm s_x$

Показатели	Группы животных					
	Контрольная, n=16	Опытная				
		2-е сут- ки, n=10	4-е сут- ки, n=10	7-е сут- ки, n=12	21-е сут- ки, n=10	37-е сут- ки, 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 = 0,032
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 = 0,002	1,64±0,2 P = 0,058	1,47±0,21 P = 0,084

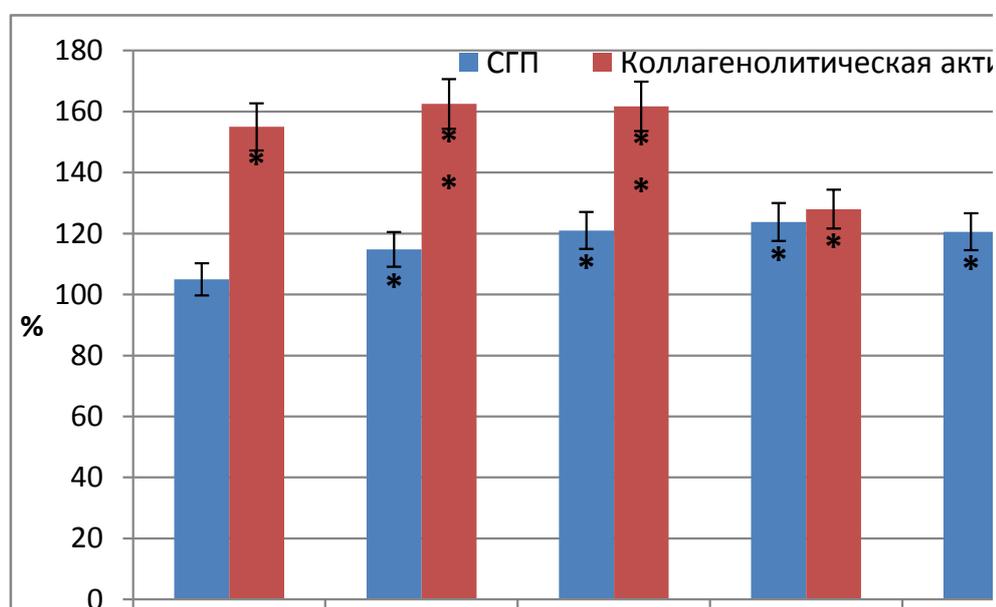


Рисунок 4 – Динамика изменений содержания свободного гидроксипролина и коллагенолитической активности кожи крыс в области введения немодифицированного бычьего коллагена типа I, в % к контролю за 100%

(\* – P < 0,05; \*\* – P < 0,02)

Значительная часть растворимых фракций не успевает вовлекаться в образование последующих коллагеновых волокнистых структур и появляется в виде продуктов распада, что объясняет повышение содержания свободного гидроксипролина и коллагенолитической активности кожи в отдалённые сроки наблюдения (21-е и 37-е сутки).

Таким образом, результаты эксперимента подтверждают, что увеличение содержания нейтрально-соле-растворимой фракции и суммарного коллагена в коже животных в более отдаленные сроки наблюдения после интрадермального введения препарата, содержащего немодифицированный бычий коллаген типа I, связано с активацией белоксинтезирующей функции фибробластов.

### **3.2. Влияние интрадермального введения коллагенсодержащего препарата на уровень гликозаминогликанов и обмен углеводов в коже**

Внеклеточный матрикс кожи характеризуется высоким содержанием гиалуроновой кислоты и сульфатированных гликозаминогликанов, находящихся в составе протеогликанов. Гликозаминогликаны кожи характеризуются интенсивным обменом. Так, период полужизни ( $T_{1/2}$ ) гиалуроновой кислоты в коже крыс и кроликов составляет 2,5 - 4 суток [109]. Синтез структурных компонентов ГАГ осуществляется из глюкозы и состояние обмена углеводов в коже в области интрадермального введения каких-либо препаратов представляет несомненный интерес, учитывая биологическую роль гиалуроновой кислоты и протеогликанов в коже и их изменения в процессах её возрастного старения.

Для характеристики состояния обмена углеводов в коже животных при интрадермальном введении немодифицированного бычьего коллагена типа I были определены содержание пировиноградной и молочной кислот, соотношение лактата к пирувату, активность гексокиназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы, уровень гликогена, гиалуроновой кислоты и суммарного содержания гликозаминогликанов. При этом исходили из того, что соотношение

лактат/пируват и активность лактатдегидрогеназы косвенно будет отражать соотношение анаэробного и аэробного путей окисления углеводов. Активность гексокиназы – начального фермента метаболических превращений глюкозы, будет характеризовать интенсивность поглощения кожей глюкозы, а активность ключевого фермента гексомонофосфатного пути окисления глюкозы – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы будет свидетельствовать о характере изменений течения биосинтетических процессов в коже с использованием пентозофосфатов и восстановленных эквивалентов в виде НАДФН.

Результаты исследований сульфатированных и суммарных гликозаминогликанов и гиалуроновой кислоты представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Содержание гликозаминогликанов в коже самок крыс в зоне внутридермального введения немодифицированного коллагена, Ме [Q<sub>1</sub> – Q<sub>3</sub>]

Показатели	Группы животных					
	Контрольная, n=16	Опытная				
		2-е сут- ки, n=10	4-е сут- ки, n=12	7-е сут- ки, n=14	21-е сут- ки, n=12	37-е сут- ки, n=14
Гиалуронан, 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] <b>P=0,037</b>	354 [327-368] <b>P=0,021</b>
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] <b>P=0,036</b>	21,4 [16,2-24,6] <b>P=0,022</b>
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] <b>P=0,041</b>	162 [148-172] <b>P=0,032</b>

В коже опытной группы крыс наблюдаются закономерные сдвиги в содержании этих структурных компонентов внеклеточного матрикса (рисунок 5). Если уровень ГАГ в коже в первую неделю от начала инъекций коллагенсодержащего препарата несколько снижается, но не достигает до статистически значимых значений, то в более отдаленные сроки после завершения процедуры введения – повышается.

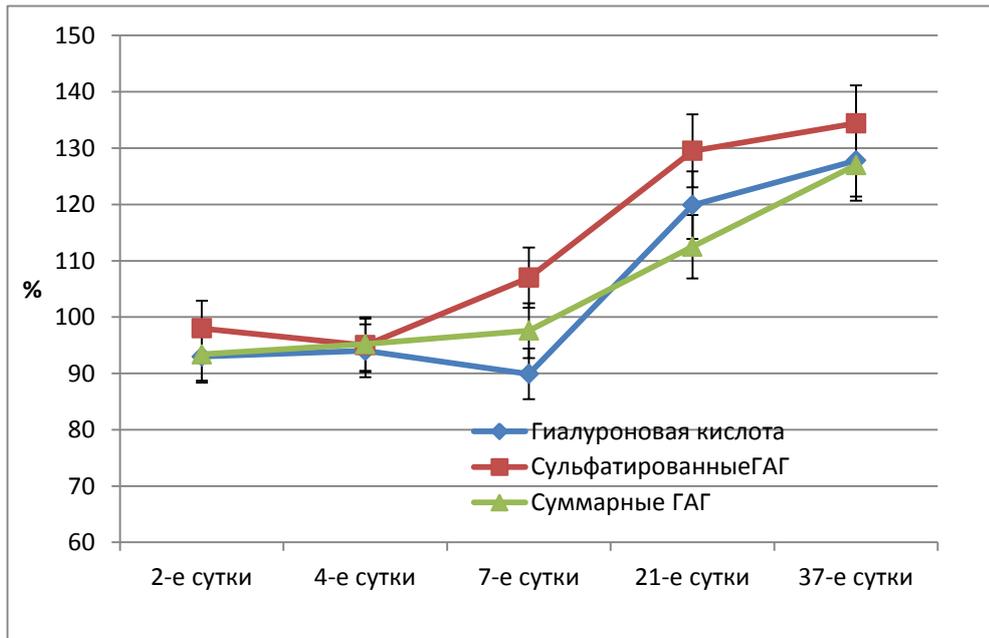


Рисунок 5 – Динамика содержания суммарных гликозаминогликанов и их фракций в коже крыс в зоне введения коллагенсодержащего препарата (в % к контрольному уровню)

Так, содержание гиалуроновой кислоты составляет на 21-е сутки эксперимента 119,9% ( $P=0,037$ ), а на 37-е сутки – 127,0% ( $P=0,021$ ) по сравнению с ее уровнем у животных контрольной группы. Очевидность увеличения содержания этих гетерополисахароидов в результате усиления их биосинтеза едва ли вызывает сомнений. Увеличение содержания ГАГ по времени не противоречит результатам изучения метаболизма коллагена, поскольку известно: участие протеогликанов и ГК в формировании коллагеновых надмолекулярных структур.

Биосинтез протеогликанов и гиалуроновой кислоты является системой сложных скоординированных синтетических реакций. При этом биосинтез ГАГ в составе протеогликанов и гиалуронана принципиально отличается, поскольку гиалуронан не находится в ковалентной связи с белком.

В биосинтезе протеогликанов выделяют следующие этапы; а) экспрессию стержневого белка, б) последующее присоединение к нему олигосахаридных групп, свойственных гликопротеинам и в) сборку присоединенных к соответствующим локусам стержневого белка полимерных цепей гликозаминогликанов [80].

Начальным этапом сборки гликозаминогликановой цепи является O-гликозилирование – присоединение с участием ксилозилтрансферазы ксилозы к гидроксильной группе остатка серина в коровом белке с использованием только определенных сериновых остатков (тетрапептида S-G-X-G, редко других вариантов окружения остатков серина) [234]. Донором этой реакции служит уридиндифосфаткиназа. Следующим звеном в области присоединения ГАГ к стержнево-му белку является остаток галоктазы, который взаимодействует с ксилозой с участием галактозилтрансферазы I. При этом рецептором реакции является O-β-D-ксилозил-L-серил, а донором УДФ-галактоза. Дальнейшее удлинение области связывания ГАГ происходит путем присоединения второго остатка галактозы к первому с участием УДФ-галактозы и галактозилтрансферазы II. Вслед за завершением сборки области присоединения начинается удлинение ГАГ, которое осуществляется под действием специфических гликозилтрансфераз, работающих по принципу «одна связь – один фермент» и соответствующих нуклеотидных производных углеводов – УДФ (УДФ-N-ацетилглюкозамина, УДФ-N-ацетилгалактозамина, УДФ-глюкуроната, УДФ-идуроната, УДФ-галактозы). Сульфатирование осуществляется до завершения сборки ГАГ с помощью нескольких специфических сульфотрансфераз и предварительного образования 3-фосфоаденозин-5-фосфосульфата (ФАФС).

В отличие от биосинтеза протеогликанов, гликозаминогликанирование которых происходит на мембранах гранулярного (поверхностного) эндоплазматического ретикулума и при наличии в полипептидной цепи стержневого белка специфического локуса, служащего носителем информации для инициации сборки гликозаминогликана, биосинтез гиалуроновой кислоты осуществляется на внутренней поверхности клеточной мембраны. Ферменты, собирающие гиалуронан в виде линейного полисахарида – гиалуронансинтазы (гиалуронансинтетазы) являются интегральными белками клеточной мембраны [180, 240, 283]. При этом, гиалуронансинтазы обладают способностью перемещать огромную макромолекулу гиалуронана по мере удлинения цепи в экстрацеллюлярный матрикс.

Вместе с тем, в процессах биосинтеза протеогликанов и гиалуронана остаются неразрешенные вопросы. Каков механизм выбора пути сборки гликозаминогликанов? Какие механизмы определяют в каждом конкретном случае использование соответствующей сульфотрансферазы? Действительно ли отдельные гликозилтрансферазы, участвующие в синтезе протеогликанов, являются индивидуальными белками или они представляют собой единый белковый комплекс, обладающий мультэнзимными функциями [80; 282].

Следует особо отметить тот факт, что биосинтез гиалуронана и сульфатированных ГАГ, входящих в состав протеогликанов, требует не только значительных количеств глюкозы, но и очень большого расхода энергии. Согласно расчетам J. Lee, A.S. Spicer (2000) [240], гиалуроновая кислота у позвоночных построена в среднем из 10 тысяч дисахаридов и для своей сборки требует от клетки АТФ до 50 тысяч эквивалентов, НАД-кофактора 20 тысяч молекул и ацетилкоэнзима А 10 тысяч молекул.

В этой связи представлялось целесообразным охарактеризовать обмен глюкозы в коже в области введения коллагеносодержащего препарата. Полученные результаты представлены в таблице 8.

Как видно, внутридермальное введение коллагеносодержащего препарата техникой мезотерапии в коже экспериментальных животных в первые дни наблюдения (2-е, 4-е и 7-е сутки) сопровождается повышением концентрации молочной кислоты, в то время как концентрация пировиноградной не подвергается значительным изменениям. Это отражается статистически значимым повышением соотношения лактат/пируват. Так, данный коэффициент на 7-е сутки эксперимента повышается до 187,0% по отношению к контрольным показателям. Одновременно в коже опытной группы животных значительно (133,3% - 152,4%) повышается и активность лактатдегидрогеназы. Эти данные свидетельствуют об усилении в ткани кожи в области введения препарата процессов анаэробного окисления углеводов.

Таблица 8 – Показатели обмена углеводов в коже крыс зрелого возраста в области интрадермального введения немодифицированного препарата бычьего коллагена, Me [Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>]

Показатели	Группы животных					
	Контроль- ная, n=16	Опытная				
		2-е сут- ки, n=10	4-е сут- ки, n=12	7-е сут- ки, n=14	21-е сут- ки, 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] <b>P=0,048</b>	1,28 [1,03-1,42] <b>P=0,034</b>	1,56 [1,25-1,66] <b>P&lt;0,001</b>	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] <b>P=0,004</b>	33,1 [25,6-35,0] <b>P&lt;0,001</b>	16,3 [14,4-18,2] <b>P=0,044</b>	14,0 [12,3-17,4] <b>P=0,038</b>
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=2770,	5,32 [4,37-5,6] <b>P=0,022</b>	5,92 [5,5-6,36] <b>P=0,018</b>
Г-6-фДГ, мкмоль/сек·мг белка	1,04 [0,99-1,21]	0,76 [0,69-0,83] <b>P=0,028</b>	0,74 [0,64-0,82] <b>P=0,013</b>	0,73 [0,62-0,80] <b>P=0,011</b>	1,52 [1,33-1,69] <b>P=0,010</b>	1,50 [1,40-1,72] <b>P=0,016</b>
ЛДГ, Ед/мг белка	0,17 [0,15-0,20]	0,26 [0,22-0,30] <b>P=0,028</b>	0,27 [0,22-0,34] <b>P=0,025</b>	0,24 [0,18-0,27] <b>P=0,036</b>	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] <b>P=0,011</b>	3,09 [2,49-3,31] <b>P=0,024</b>	2,65 [2,31-3,03] <b>P=0,004</b>	3,46 [3,22-3,92] P=0,388	3,48 [3,28-4,11] P=0,419

В более поздние сроки наблюдения (21-е и 37-е сутки) содержание лактата в коже снижается и происходит падение коэффициента лактат/пируват ниже контрольных значений (рисунок 6). Одновременно снижается и активность лактатдегидрогеназы. Вероятно, в более отдаленные сроки в коже происходит усиление процессов аэробного окисления углеводов. Активность гексокиназы в первые сутки эксперимента после введения препарата коллагена в коже крыс опытной группы не подвергается статистически значимым изменениям. Однако в отдаленные сроки наблюдения активность гексокиназы возрастает, характеризуя более интенсивное использование глюкозы на метаболические процессы (рисунок 7).

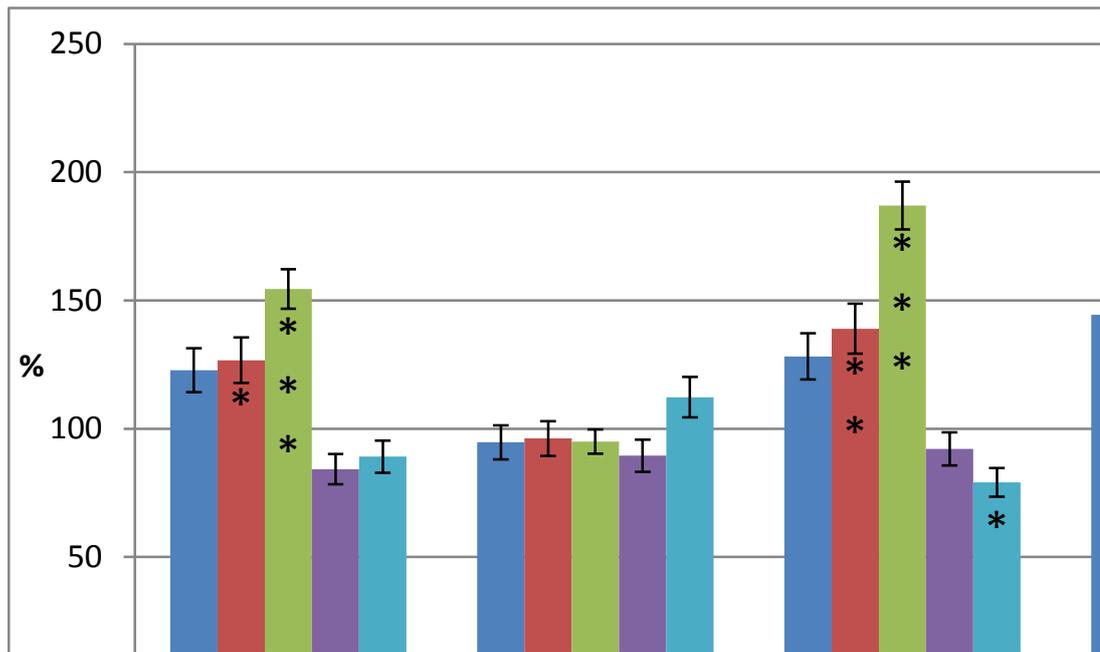


Рисунок 6 – Динамика изменений содержания лактата, пирувата и активности лактатдегидрогеназы в коже крыс в зоне интрадермального введения коллагенсодержащего препарата, в % к контрольным значениям, принятым за 100%, (\*-  $P < 0,05$ , \*\*- $P < 0,01$ , \*\*\*- $P < 0,001$ ).

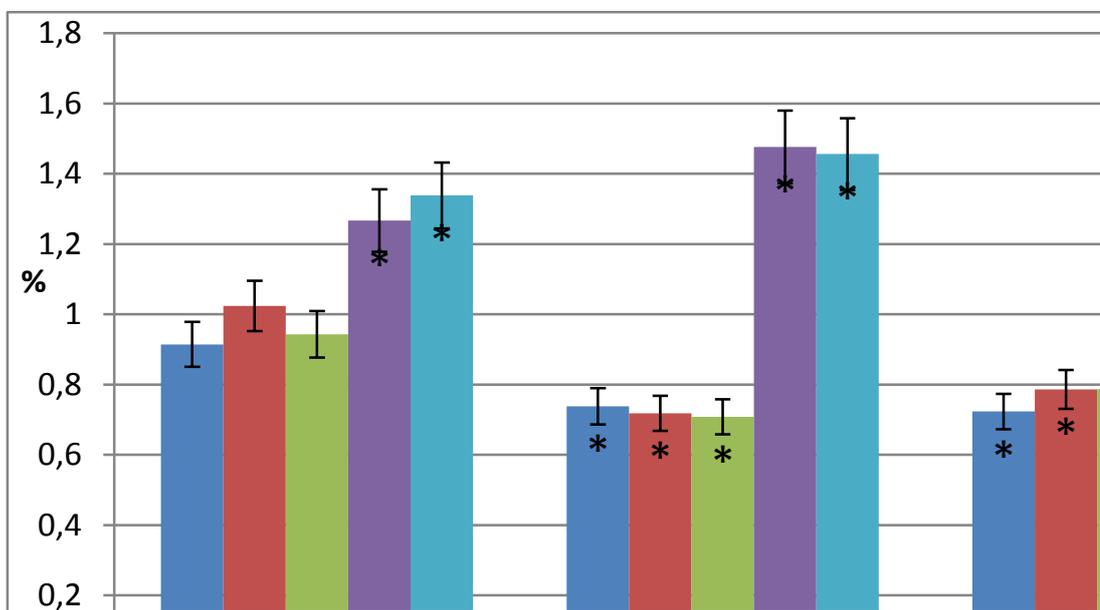


Рисунок 7 – Активность ключевых ферментов обмена глюкозы и содержание гликогена в коже крыс в зоне интрадермального введения коллагенсодержащего препарата, в % к контрольным значениям, принятым за 100%.

(\*-  $P < 0,05$ , \*\*-  $P < 0,01$ )

Так, активность гексокиназы у животных опытной группы на 21-е сутки эксперимента составила 126,7% ( $P=0,023$ ), а на 37-е сутки – 133,8% ( $P=0,018$ ) по сравнению с контролем.

В первые сутки экспериментов на фоне некоторых колебаний активности гексокиназы в коже самок крыс опытной группы наблюдается достоверное снижение содержания гликогена, указывая на интенсификацию процессов гликогенолиза. На 21-е и 37-е сутки от начала опыта содержание гликогена остается несколько сниженным, но статистически не различается от уровня животных контрольной группы.

Активность ключевого фермента гексозомонофосфатного (пентозофосфатного) пути окисления в зависимости от времени исследования после начала введения коллагенсодержащего препарата также подвержена фазовым изменениям – снижается в первые сутки после инъекций и повышается в отдаленные сроки наблюдения. Так, активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы на 2-е, 4-е и 7-е сутки соответственно снижается до 73,8%, 71,8% и 70,8%, а на 21-е и 37-е сутки повышается до 147,6% и 145,6% от контрольных значений. Окисление глюкозы по гексозофосфатному пути протекает в цитоплазме и в аэробных условиях, и выявленная динамика фазовых изменений глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы не противоречит результатам определения лактат/пируватного коэффициента, характеризующего соотношений интенсивности течения в коже после введения препарата анаэробных и аэробных процессов. С другой стороны, активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, являющегося начальным ферментом гексозомонофосфатного пути окисления, который является основным циклом, обеспечивающим цитозоль клеток восстановленными эквивалентами в виде НАДФН, используемыми на биосинтетические процессы и процессы детоксикации, а также пентозофосфатами, необходимыми для пополнения нуклеотидов при интенсификации биосинтеза нуклеиновых кислот и обмена группы макрофагов, а также пентоз при синтезе протеогликанов, косвенно может отражать и активность течения биосинтетических процессов в клетках кожи.

Таким образом, в коже экспериментальных животных в зоне внутридермального введения техникой мезотерапии препарата, содержащего немодифицированный коллаген типа I, в первые дни усиливаются процессы анаэробного окисления углеводов с мобилизацией гликогена. В более отдаленные сроки происходит интенсификация аэробного окисления по гексозодифосфатному и гексо-зомонофосфатному путям с активацией биосинтеза суммарных гликозаминогликанов и их фракций – сульфатированных ГАГ и гиалуроновой кислоты.

### **3.3. Изменения уровня некоторых интерлейкинов и факторов роста в сыворотке крови экспериментальных животных при внутридермальной инъекции коллагеносодержащего препарата**

Коллаген является важным компонентом реконструкции ткани после ее нарушений. Он является основой формирования пространственной структуры ткани кожи, измененной при старении. Волокна коллагена не только создают трехмерный каркас, который придает внеклеточным структурам механическую прочность, отвечая за гибкость, упругость, эластичность ткани кожи, но является основным субстратом, обеспечивающим адгезию, рост, дифференцировку клеток, упорядоченность их миграции и межклеточных взаимодействий [268]. Не удивительно, что коллагеносодержащие препараты, наряду с препаратами гиалуроновой кислоты нашли широкое применение для коррекции возрастных и других изменений кожи в качестве биоимплантата. По мнению различных авторов [39, 40, 52, 96, 138, 173, 200, 235], бычий коллаген по составу и структуре биосовместим и безопасен, характеризуется отсутствием или слабой иммуногенностью, и анализ результатов его использования для контурной пластики в инъекционной форме более, чем 750000 пациентов показал к появлению осложнений у небольшого количества пациентов [173]. Вместе с тем при коллагенотерапии возможны побочные эффекты: эритема, отек, папулы, болезненность в области инъекции, связанные, прежде всего, с реакцией на саму процедуру инъектирования [39].

Гистологические исследования кожи после двукратного введения коллаген-содержащего препарата у пациенток с возрастными изменениями показали в зоне инъекции выраженную макрофагальную реакцию вокруг белковых масс, не имеющих фибриллярного строения [52]. На развитие тканевого ответа в области введения нативной гиалуроновой кислоты, которая идентична по структуре и свойствам у различных видов животных, указывают и результаты целенаправленных исследований [66, 67]. Авторы при интрадермальной инъекции препаратов гиалуронана экспериментальным животным наблюдали развитие асептического воспаления с нейтрофильной инфильтрацией, которая позднее сменилась на лимфоцитарно-макрофагальную. Аналогичные результаты были получены и при внутридермальном введении экспериментальным животным препарата нестабилизированной ГК с молекулярной массой 1 млн Да [69].

Учитывая важную роль цитокинов и факторов роста в ответной реакции тканей на физиологические и патологические воздействия, процессы межклеточных и клеточно-матриксных взаимодействий, дифференцировки и пролиферации клеток и их синтетическую активность в следующей серии экспериментов в сыворотке крови у животных опытной группы изучали содержание интерлейкина-1 бета (ИЛ-1 $\beta$ ), фактора некрозы опухолей-альфа (ФНО- $\alpha$ ), инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1) и трансформирующего фактора роста бета 1 (ТФР- $\beta$ 1). Результаты исследования приведены в таблице 9. Содержание провоспалительных цитокинов – ИЛ-1 $\beta$  и ФНО- $\alpha$  в сыворотке крови повышается статистически значимо уже на следующие сутки после инъекции препарата.

Так, содержание ИЛ-1 $\beta$  на 2-7-е сутки эксперимента превышало исходный (контроль) на 36,4-47,8%, а содержание ФНО- $\alpha$  составляло на эти же сроки исследования 140,7-186,6% по сравнению с животными контрольной группы (рисунок 8). В более отдаленные сроки наблюдения после завершения инъекций препарата бычьего коллагена типа I уровень провоспалительных цитокинов снижался и не отличался от их концентрации в сыворотке животных контрольной группы.

Таблица 9 – Содержание провоспалительных цитокинов и системных факторов роста в сыворотке крови крыс при интрадермальном введении препарата немодифицированного коллагена типа I, Me [Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>]

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 $\beta$	25,3 [22,6-33,2]	35,4 [25,3-39,7] <b>P&lt;0,001</b>	34,5 [26,3-38,5] <b>P&lt;0,001</b>	37,4 [29,3-38,4] <b>P&lt;0,001</b>	25,9 [20,2-33,2] P=0,912	26,5 [19,9-33,2] P=0,902
ФНО- $\alpha$	11,8 [10,2-13,5]	16,6 [11,8-19,6] <b>P=0,007</b>	19,9 [14,5-24,7] <b>P&lt;0,001</b>	17,6 [11,9-19,4] <b>P=0,003</b>	12,9 [9,9-13,4] P=0,901	12,8 [9,9-15,4] P=0,911
ИФР- $\alpha$	152 [142-171]	163 [143-175] P=0,393	168 [142-184] P=0,314	180 [162-185] P=0,054	204 [169-198] <b>P&lt;0,001</b>	214 [172-226] <b>P&lt;0,001</b>
ТФР- $\beta$ 1	3093 [2663-3296]	3212 [3093-3648] P=0,475	3733 [3094-4005] <b>P&lt;0,001</b>	4091 [3693-4993] <b>P&lt;0,001</b>	3478 [3092-3906] <b>P&lt;0,001</b>	3682 [3193-4060] <b>P&lt;0,001</b>

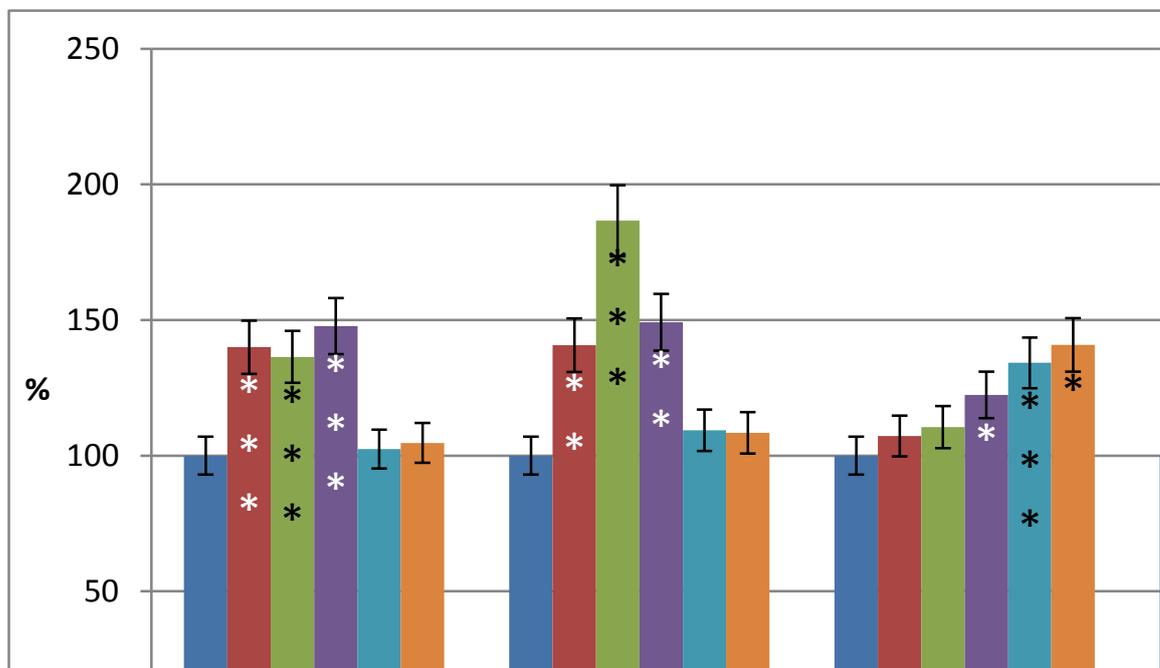


Рисунок 8 – Динамика изменений содержания провоспалительных цитокинов и факторов роста в сыворотке крови крыс при внутридермальном введении немодифицированного бычьего коллагена (в % к контролю, принятому за 100%), \*-

P<0,05, \*\*- P<0,01, \*\*\*- P<0,001

Иная динамика содержания в сыворотке крови опытной группы крыс наблюдалось при изучении таких системных факторов роста как ИФР-1 и ТФР- $\beta$ 1. Концентрация инсулиноподобного ростового фактора-1 статистически значимо повышалась, начиная с 7-х суток наблюдения, и оставалась на достоверно высоком уровне в отдаленные дни наблюдения (21-е и 37-е сутки) после введения препарата. Содержание трансформирующего ростового фактора бета 1 в сыворотке крови достоверно увеличивалось во все сроки наблюдения кроме 2-х суток.

Результаты изучения содержания ИЛ-1 $\beta$  и ФНО- $\alpha$  в первые дни эксперимента возможно связаны с воспалительным ответом ткани кожи на процедуру внутридермального введения препарата коллагена техникой мезотерапии. И ИЛ-1 $\beta$ , и ФНО- $\alpha$  являются плейотропными медиаторами воспаления, обладающими синергичным эффектом [108, 135, 136].

ИЛ-1 $\beta$  является важным фактором формирования цитокиновой сети на повреждение тканей. Он вырабатывается фибробластами, кератиноцитами, НК-лимфоцитами, дендритными и эндотелиальными клетками, но главными его продуцентами являются макрофаги/моноциты. Мишенями для ИЛ-1 $\beta$  являются эндотелиальные и эпителиальные клетки, фибробласты, иммунокомпетентные клетки и др. ИЛ-1 $\beta$  участвует в инициации и регуляции иммунных и воспалительных процессов, активирует продукцию ИЛ-2, -3, -6, ФНО- $\alpha$ , простагландинов, молекул адгезии, белков острой фазы, активных форм кислорода, стимулирует фагоцитоз [123, 135, 153].

ФНО- $\alpha$  также активно и достаточно быстро продуцируется активированными моноцитами/макрофагами. Его могут вырабатывать дендритные, гемопоэтические и эндотелиальные клетки, фибробласты, Т-лимфоциты [136, 143]. Рецепторы к ФНО- $\alpha$  экспрессируются большинством клеток в организме. В результате этот цитокин участвует в регуляции значительного ряда биологических процессов: пролиферации, дифференцировки и апоптоза клеток, врожденного и приобретенного иммунитета, реакции воспаления и др. [136]. Связываясь с рецептором, ФНО- $\alpha$  индуцирует сигнальные каскады, регулирующие экспрессию генов-

регуляторов воспаления, активирует синтез и секрецию ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, мембранно-ассоциированного ИЛ-1, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, моноцитарного хемотоксического белка, молекул межклеточной адгезии (ELAM-1, ICAM-1), простаглицина (ПГI2) и др. [136, 285, 293]. ФНО относится к основным воспалительным цитокинам, индуцирующим поляризацию M1-фенотип макрофагов, продуцирующих воспалительные сигнальные молекулы и активные формы кислорода [229, 254].

Таким образом, увеличение содержания в сыворотке крови опытной группы крыс после внутридермального введения препарата коллагена ИЛ-1 $\beta$  и ФНО- $\alpha$  позволяет с большой долей вероятности связать с воспалительной реакцией ткани кожи на процедуру инъекции техникой мезотерапии. Важно также отметить при этом, что эти провоспалительные цитокины являются индукторами синтеза ММП-1, -8, -13 и -14, наиболее интенсивно расщепляющие нативные коллагены I, II и III типов во внеклеточном матриксе дермы кожи [205, 253].

ИФР-1 и ТФР- $\beta$ 1 относятся к группе системных сигнальных молекул, основное действие которых связано со стимуляцией процессов пролиферации и роста клеток [286]. ИФР-1 имеет 43% гомологии первичной структуры с инсулином, синтезируется гепатоцитами, клетками соединительной ткани (фибробласты, хондробласты и др.), оказывает на клетки свое действие, связываясь с рецептором ИФР-1 и частично с рецептором инсулина и включая тирозинкиназный путь внутриклеточного распространения сигналов [252], индуцируя их пролиферацию и дифференцировку. Увеличение содержания в сыворотке крови животных опытной группы ИФР-1 в более отдаленные сроки наблюдения после введения препарата, таким образом, возможно, косвенно отражает стимуляцию процессов пролиферации и роста клеток кожи в зонах инъекции коллагенсодержащего препарата.

Данному предположению не противоречит и динамика уровня в сыворотке крови ТФР- $\beta$ 1. Он усиливает биосинтез компонентов внеклеточного матрикса, стимулирует ангиогенез и заживление ран [265], продуцируется многими клетка-

ми (активированные макрофаги/моноциты, Т-лимфоциты, фибробласты, фиброциты, эпителиальные и др.). Особо важно подчеркнуть тот факт, что клетки соединительной ткани не только способны секретировать ТФР- $\beta$ 1, но под его влиянием возможна активная дифференцировка циркулирующих фиброцитов в репаративные фибробласты [184], а также трансдифференциация (эпителиально-мизенхимальный переход) клеток эктодермального происхождения в репаративные фибробласты [139, 167], интенсивно продуцирующие коллаген и экспрессирующие ростовые сигнальные молекулы [252].

Кроме стимуляции пролиферации, роста клеток соединительной ткани, усиления биосинтетических функций фибробластов ТФР- $\beta$ 1 обладает противовоспалительным эффектом, подавляя секрецию провоспалительных цитокинов, цитокинпродуцирующую активность моноцитов/макрофагов [265]. При этом под влиянием ТФР- $\beta$ 1 происходит индукция М2-фенотипа макрофагов, необходимых для разрешения воспалительного процесса, заживления и восстановления и характеризующихся экспрессией ростовых факторов и ингибиторов воспаления [229, 276]. Возможно увеличение уровня ТФР- $\beta$ 1 в первые дни эксперимента (4-е и 7-е сутки) после начала инъекций коллагенсодержащего препарата связано с интенсификацией секреции данного противовоспалительного регуляторного фактора в ответ на развитие воспалительной реакции ткани кожи на процедуру инъекции препарата.

Подводя итоги данной серии экспериментов, следует отметить, что интрадермальное введение препарата немодифицированного бычьего коллагена типа I крысам зрелого возраста приводит в первые дни непосредственно после процедуры инъекций техникой мезотерапии увеличению уровня ИЛ-1 $\beta$ , ФНО- $\alpha$  и ТФР- $\beta$ 1, что может быть отражением воспалительной реакции кожи на нарушение целостности ткани. Повышение концентрации в сыворотке крови ИФР-1 и ТФР- $\beta$ 1 в отдаленные сроки после завершения курса терапии характеризует активацию процессов пролиферации и роста клеток кожи и сосудов в зоне инъекций коллагенсодержащего препарата.

Учитывая результаты данной серии экспериментов и предыдущих опытов, был изучен характер изменений гистологической структуры кожи животных опытной группы в зонах введения коллагенсодержащего препарата.

### **3.4. Гистологическая структура кожи экспериментальных животных в зоне внутридермального введения препарата нереконструированного коллагена**

В коже крыс контрольной группы в зоне внутридермального введения изотонического раствора глюкозы на вторые сутки опыта проявлялись признаки набухания тканей кожи, что приводило к разрыхлению пучков коллагеновых волокон и увеличению пространства между элементами тканей (приложение, рисунок 1). На 2-е сутки после интрадермального введения препарата нереконструированного бычьего коллагена типа I в коже животных опытной группы также были выявлены определенные изменения. На микроскопическом уровне коллагеносодержащий препарат представлялся в виде тонковолокнистых коротких структур, после внутридермального введения крысам он с трудом визуализировался в дермальной пластинке кожи среди толстых извитых пучков коллагеновых волокон. О действии препарата можно было судить в основном по косвенным признакам в виде сосудистой и клеточной реакции тканей. Поэтому мы обращали отдельное внимание на структуру сосудов и клеточный состав соединительнотканной пластинки, на некоторые морфофункциональные характеристики клеток, которые определялись иммуно-гистохимическим методом, а также на отдельные гистохимические изменения тканей кожи. На 2-е сутки воспалительная реакция на введение препарата была слабо выраженной в виде выхода в окружающие ткани из кровеносных сосудов небольшого количества клеток по ходу вкола инъекционной иглы (приложение, рисунок 2).

Коллагеновые волокна дермальной пластинки кожи в месте введения препарата были слабо отечны. При больших увеличениях микроскопа среди не столь многочисленных клеток (фибробласты, гистиоциты, лимфоциты) определялись моноциты, мигрирующие из слабо расширенных сосудов и дифференцирующиеся

в крупные отростчатые макрофаги с бобовидными ядрами и широкой цитоплазмой. Они выявлялись между волокнистыми структурами в соединительнотканной пластинке кожи (приложение, рисунок 3).

Структуру коллагенсодержащих волокон препарата «Коллост» можно было рассмотреть в случаях, когда часть коллагенового препарата попадала в гиподерму (подкожно-жировую клетчатку) среди жировых клеток (приложение, рисунок 4). Тонкие и часто короткие волокна препарата скручивались в извитые волокнистые элементы. В гиподерме и фасциальной прослойке кожи крыс на 2-е сутки опыта также определялись признаки умеренной клеточной реакции в виде инфильтрации слоя макрофагами, лимфоцитами и веретенновидными фибробластическими клетками (приложение, рисунок 5).

Слабая отечность после внутридермального введения коллагеносодержащего препарата проявлялась большей частью во внутренних слоях дермальной пластинки кожи, то есть именно в гиподерме. Местами отдельные волокна введенного коллагенового препарата вместе с инфильтрирующими их клетками как бы «плавали» в отечной жидкости (приложение, рисунок 6).

На 4-е сутки после интрадермального введения изотонического раствора глюкозы в коже крыс контрольной группы отечность тканей спадала. Общая гистологическая структура их большей частью приближалась к норме. Лишь в отдельных участках по ходу вкола инъекционной иглы выявлялись слабо выраженные клеточные инфильтраты (приложение, рисунок 7). Такие клеточные «дорожки», как реакция на травму тканей введенной иглой, выявлялась и в более глубоких слоях ближе к гиподерме, а в самой гиподерме местами сохранялся слабо выраженный отек (приложение, рисунок 8).

У животных опытной группы к 4-м суткам отдельные волокна введенного экзогенного коллагена при окраске препаратов по методу Ван-Гизона становились пикринофильными (желтое окрашивание), что свидетельствовало об их лизировании и резорбции макрофагальными клетками (приложение, рисунок 9).

Количество макрофагов в эти сроки несколько возрастало. В зоне введения

препарата наряду с макрофагами по сравнению с предыдущими сроками в дермальной пластинке увеличивалось количество фибробластических клеток, отличающихся от других клеток удлинённой веретеновидной формой (приложение, рисунок 10).

На 7-е сутки эксперимента и в последующие сроки исследования кожа крыс контрольной группы в зонах введения раствора глюкозы имела обычную структуру (приложение, рисунок 11). При проведении гистохимической реакции на всех сроках опыта гликозамингликаны хорошо дифференцировались в виде синего окрашивания в основном веществе между коллагеновыми волокнами дермальной пластинки, что типично для кожи. Характерной для регенерации кожи хорошо выраженной полосы тонковолокнистой грануляционной ткани под эпидермисом, содержащей большое количество гликозаминогликанов, не выявлялось ни на одном сроке эксперимента.

К 7-м суткам эксперимента соединительнотканная пластинка кожи крыс опытной группы имела несколько иную морфологическую картину. На уровне сосочкового слоя дермы под эпителиальным слоем четко выявлялись значительные очаги новообразованной грануляционной ткани. Они отличались по структуре от обычной ткани сосочкового слоя. Здесь выявлялось большое количество различных клеток: крупных гистиоцитов с большими округлыми ядрами, множество веретеновидных фибробластических клеток, светлых малодифференцированных клеток (приложение, рисунок 12).

При окраске гистологических препаратов специфичными методами для выявления коллагеновых волокон соединительной ткани (по Ван-Гизону и по Маллори) в этих зонах под эпидермисом на больших увеличениях микроскопа хорошо просматривались новообразованные очень тонкие нитеобразные коллагеновые волокна, между которыми выявлялись и регенерирующие мелкие капилляры (приложение, рисунок 13).

Новообразованные коллагеновые волокна отличались от «старых» зрелых волокон не только толщиной. При импрегнации препаратов по Футу новообразо-

ванные ретикулярные волокна в отличие от желто-коричневых зрелых волокон были черного цвета (аргирофильны, то есть импрегнировались серебром) (приложение, рисунок 14). Такие тонкие новообразованные волокна выявлялись и между некоторыми волокнистыми структурами и в сетчатом слое дермальной пластинки. Черное окрашивание свидетельствовало о содержании в новообразованных соединительнотканых волокнах «незрелого» коллагена. В контрольной группе такие волокна не выявлялись, все пучки коллагеновых волокон окрашивались в золотисто-коричневые цвета, что свидетельствовало о зрелости волокон и содержании в них коллагена I типа. В отдельных местах кожи такие зоны регенерации были довольно широкими, и они содержали больше мелкокалиберных новообразованных сосудов (приложение, рисунок 15). Глубже в сетчатом слое дермальной пластинки кожи также заметно увеличивалось количество мелких новообразованных кровеносных капилляров и фибробластических клеток, гистиоцитов между коллагеновыми волокнами.

В отдельных участках дермы обращали на себя внимание признаки расширения лимфатических сосудов кожи, несомненно, свидетельствующие об усилении в данный срок эксперимента дренажной функции кожи (приложение, рисунок 16).

В гиподерме, там, где встречались очаги введенного экзогенного препарата, между тонкими извитыми волокнистыми элементами препарата обнаруживалось множество клеток, в основном это были лизирующие и резорбирующие волокна препарата макрофаги и удлиненные веретеновидной формы фибробласты, синтезирующие тонкие новообразованные коллагеновые фибриллы (приложение, рисунок 17). Между ними встречалось небольшое количество округлых лимфоцитов с темными ядрами.

К 21-м суткам эксперимента после введения препарата бычьего коллагена дермальная пластинка кожи крыс становилась несколько плотнее за счет формирования более утолщенных коллагеновых пучков в зонах регенерации (приложение, рисунок 18).

При импрегнации препаратов по Футу данные волокна приобретали желто-коричневое окрашивание, свидетельствующее о зрелости коллагеновых волокон, то есть о преобладании в дерме характерного для нее коллагена I типа (приложение, рисунок 19). Выраженных клеточных инфильтратов воспалительного характера в тканях не выявлялось. Среди волокнистых пучков просматривалось умеренное количество фибробластических клеток и гистиоцитов. В сосочковом слое во многих участках выявлялись тонкостенные мелкокалиберные сосуды без каких-либо особенностей в строении (приложение, рисунок 20). В гиподерме волокнистые элементы экзогенного коллагена замещались небольшими по размерам участками рыхлой волокнистой соединительной ткани, которая встраивалась между жировыми клетками (приложение, рисунок 21).

На 37-е сутки после внутридермального введения крысам препарата экзогенный коллаген в свободном незамещенном виде не выявлялся в зоне введения ни в собственной дермальной пластинке, ни в гиподерме кожи. Кожа имела характерное для нее строение. Основную часть кожи составлял значительный слой дермы, состоящий из ровных пучков коллагеновых волокон, окрашивающихся по Ван-Гизону в ярко-красный цвет, свидетельствующий о зрелости волокнистых элементов соединительной ткани (приложение, рисунок 22).

В сосочковом слое коллагеновые волокна, переплетаясь в различных направлениях, лежали более рыхло и были тонкими. Ниже в сетчатом слое пучки коллагеновых волокон были толще и лежали более компактно. Каких-либо воспалительных клеточных инфильтратов не определялось. Между пучками коллагеновых волокон, формирующих сложную пространственную вязь, выявлялись удлиненные веретеновидной формы фибробласты и более крупные макрофаги соединительной ткани – гистиоциты (приложение, рисунок 23). На этом же рисунке видны мелкокалиберные тонкостенные капилляры, выявляющиеся большей частью в сосочковом слое, и расширенный лимфатический сосуд, лежащий несколько глубже.

Таким образом, гистологические исследования показали, что после внутри-

дермального введения экспериментальным животным коллагеновый препарат вызывает слабо выраженный воспалительный ответ в коже, проявляющийся отеком ткани дермы и гиподермы, диффузной инфильтрацией макрофагами. Волокнистые структуры препарата резорбируются макрофагами и замещаются коллагеновыми волокнами, встраивающимися в собственные ткани. Данные процессы сопровождаются стимуляцией регенерации сосудов и соединительной ткани непосредственно под эпидермисом. Были отмечены единичные факты усиления лимфодренажа кожи в виде расширения лимфатических сосудов.

Для характеристики изменений содержания гликозаминогликанов в коже крыс опытной группы после интрадермального введения препарата бычьего коллагена типа I были проведены гистохимические исследования с использованием качественной реакции Хейла. При проведении этой реакции ГАГ дифференцировались в виде синих вкраплений в основном веществе между коллагеновыми волокнами дермальной пластинки кожи крыс, что характерно для нормы (приложение, рисунок 24). Такая картина выявлялась в сроки 2-е и 4-е сутки после введения коллагеносодержащего препарата. Кроме того, на 4-е сутки в гиподерме, в период когда начиналась резорбция макрофагами волокнистых элементов введенного препарата, они также становились голубыми, давая положительную реакцию на гликозаминогликаны (приложение, рисунок 25). Самое большое количество гликозаминогликанов определялось на 7 сутки в зоне грануляционной ткани под эпидермисом, что характерно для зон регенерации соединительной ткани (приложение, рисунок 26). Грануляционная ткань диффузно окрашивалась в ярко синий цвет.

На 21-е сутки полоса грануляционной ткани становилась уже (приложение, рисунок 27). Однако на этом же рисунке видно, что в подлежащей дермальной пластинке количество гликозаминогликанов увеличивалось в основном веществе между пучками коллагеновых волокон.

Через 37 суток после внутридермального введения препарата гистохимический ответ тканей кожи крыс на проведение реакции по Хейлу соответствовал

большей частью норме. Синее окрашивание в виде вкраплений в дермальной пластинке проявлялось между коллагеновыми волокнами. Но местами продолжали встречаться участки, где под эпидермисом сосочковый слой, а частично и сетчатый, окрашивались более интенсивно, то есть в этих зонах гликозамингликаны выявлялись больше в сравнении с кожей в норме (приложение, рисунок 28).

Таким образом, результаты гистохимических исследований кожи крыс после внутридермального введения препарата немодифицированного бычьего коллагена типа I показали, что гликозаминогликаны в большом количестве выявляются в грануляционной ткани под эпидермисом, что является характерным признаком для процесса регенерации соединительной ткани.

Данные, полученные при биохимическом исследовании обмена коллагена и полисахаридов кожи, динамики изменений содержания в сыворотке крови таких системных ростовых факторов, как ИФР-1 и ТФР- $\beta$ 1, гистологического изучения структуры кожи в области интрадермального введения коллагеносодержащего препарата, гистохимической оценки содержания коллагена и гликозамингликанов указывают на интенсификацию процессов пролиферации фибробластов с активацией их биосинтетической функций и усиление неоангиогенеза.

В этой связи было проведено иммуногистохимические исследования на выявление известных маркеров пролиферации – антигена Ki-67 и фактора роста фибробластов-1 (ФРФ-1). Белок Ki-67 относится к широко используемым и высокоспецифичным маркерам пролиферации [36]. Антиген Ki-67 ассоциирован с хромосомами фазы митоза и представлен ядерным белком, состоящим из двух субъединиц. Его экспрессия наблюдается в ядрах клеток, которые находятся в активной фазе клеточного цикла на всем его протяжении [232].

Фактор роста фибробластов включает в свое семейство 19 белков, отличающихся молекулярной массой, которые являются митогенами для клеток мезенхимального и эктодермального происхождения. Они являются также стимуляторами ангиогенеза. Клетки – мишени экспрессируют 4 вида специфических рецепторов (ФРФР-1 – ФРФР-4), у которых внутриклеточные домены обладают тиро-

зинкиназной активностью. Фосфорилирование тирозиновых остатков рецептора при взаимодействии рецептора с лигандом приводит к активации некоторых интрацеллюлярных киназ и передаче сигнала к клеточному ядру [278]. ФРФ оказывает действие на основные внутриклеточные события (пролиферацию, дифференцировку, миграцию, апоптоз) [169], однако его действие преимущественно направлено на пролиферацию и дифференцировку.

В коже животных контрольной группы при проведении иммуногистохимической реакции на выявление в ядрах клеток цитокина Ki-67 – маркера пролиферации, начиная со 2-х суток после введения раствора глюкозы и включая 37 сутки эксперимента, положительно откликнулись лишь отдельные клетки в базальном слое эпидермиса, отражая слабо выраженное клеточное обновление в эпителиальном слое (приложение, рисунок 29). Большинство ядер клеток окрашивались гематоксилином в синий цвет. В дермальной пластинке, гиподерме и фасциальной прослойке кожи цитокина фактор роста фибробластов также слабо экспрессировался, лишь в цитоплазме отдельных клеток.

Таким образом, в коже крыс контрольной группы после внутридермального введения раствора глюкозы явных признаков регенерации тканей не было обнаружено. У животных опытной группы в коже после проведения иммуногистохимической реакции с применением моноклональных антител на выявление в клетках цитокина Ki-67, начиная с 4-х суток после введения препарата коллагена и включая 7-е сутки эксперимента, положительно метились многие клетки базального слоя и отдельные клетки щиповидного слоя эпидермиса, свидетельствуя об интенсификации клеточного обновления в эпителиальном слое (приложение, рисунок 30). Их ядра окрашивались в интенсивный коричневый цвет. Не участвующие в делении клетки ядра окрашивались гематоксилином в синий цвет.

На Ki-67-положительно метились многие фибробластические клетки в дермальной пластинке. В коричневый цвет окрашивались и ядра эндотелиальных клеток отдельных сосудов, подтверждая факт пролиферации клеток и новообразования сосудов (приложение, рисунок 31).

Довольно высокий уровень пролиферации клеток отмечался и в наружном эпителиальном корневом влагалище волосяных луковиц, также свидетельствуя об активной пролиферации клеток и участия их в регенерации эпителия кожи (приложение, рисунок 32). На 21-е сутки эксперимента темпы пролиферативных процессов клеток снижались, как в эпидермисе, так и дермальной пластинке кожи. На препаратах после проведения иммуногистохимической реакции на белок Ki-67 в коричневый цвет окрашивались ядра отдельных клеток базального слоя эпидермиса, ядра некоторых фибробластических клеток в дермальной пластинке, а также отдельные клетки в матрице волосяных фолликул (приложение, рисунок 33).

Примерно такая же картина наблюдалась на 37-е сутки после внутридермального введения коллагеносодержащего препарата, иммуногистохимически белок Ki-67 также выявлялся в отдельных клетках эпидермиса и в волосяных луковицах.

Результаты иммуногистохимической реакции с применением моноклональных антител на выявление фактора роста фибробластов-1 (ФРФ-1) показали, что в коже животных контрольной группы цитокин выявлялся в цитоплазме только отдельных клеток на протяжении всего эксперимента (приложение, рисунок 34).

При внутридермальном введении крысам коллагенового препарата определяется более интенсивная экспрессия клетками дермального слоя кожи белка – фактора роста фибробластов по сравнению с контрольной группой. Цитокин ФРФ – основной фактор роста фибробластов, стимулирующий пролиферацию фибробластических клеток, в коже крыс могут экспрессировать макрофаги, эндотелиальные клетки, перициты сосудов, а также отдельные фибробластические клетки.

При анализе результатов мы не дифференцировали клетки, а подсчитывали все цитокин-положительные клетки, так как при проведении данной реакции не представляется возможным точно определить морфологию клетки.

После иммуногистохимической реакции данный белок визуализируется на препаратах в виде ярко коричневого окрашивания в цитоплазме клеток. Наши исследования показали, что он интенсивно выявляется, начиная с 4-х суток опыта.

Экспрессия ФРФ-1 определялась во многих клетках сосочкового и поверхностного сетчатого слоев (приложение, рисунок 35).

Признаки выраженной экспрессии клетками цитокина ФРФ-1 выявлялись и в более глубоких слоях дермальной пластинки кожи крыс около волосяных луковиц (приложение, рисунок 36). В гиподерме или подкожно-жировой клетчатке, а также в фасциальной прослойке под ней, особенно вокруг слабо расширенных кровеносных сосудов определялись крупные звездчатой формы макрофаги, в цитоплазме которых также определялось ярко коричневое окрашивание, свидетельствующее об экспрессии белка клетками (приложение, рисунок 37).

После проведения иммуногистохимической реакции с использованием моноклональных антител на выявление фактора роста фибробластов подсчет меченых клеток в дермальной пластинке кожи крыс после введения коллагенсодержащего препарата показал, что в сравнении с показателями контрольной группы среднее количество клеток, экспрессирующих цитокин ФРФ-1, в опытной группе были достоверно выше почти на всех сроках эксперимента кроме вторых суток (таблица 10).

Таблица 10 – Результаты сравнительного анализа количества клеток кожи, экспрессирующих ФРФ-1 в зонах введения коллагенсодержащего препарата (в поле зрения при увеличении x400)

Время после введения	Группы крыс		P
	Контрольная (введение глюкозы)	Опытная (введение препарата)	
2 сутки	5,35±0,50	5,60±0,60	0,518
4 сутки	7,35±0,74	15,10±1,59	<b>0,002</b>
7 сутки	6,75±0,45	43,75±2,36	<b>0,001</b>
21 сутки	7,50±0,64	35,85±1,63	<b>0,001</b>
37 сутки	6,55±0,63	9,00±0,75	0,039

На диаграмме (рисунок 9) хорошо видно, что наиболее высокие показатели среднего количества клеток экспрессирующих цитокин ФРФ-1 были на 7-е и 21-е суток после введения препарата. К концу эксперимента на 37 -е сутки показатели

контрольной и опытной групп приближались друг к другу, но все же, при их сравнении, достоверно продолжали отличаться ( $P < 0,05$ ).

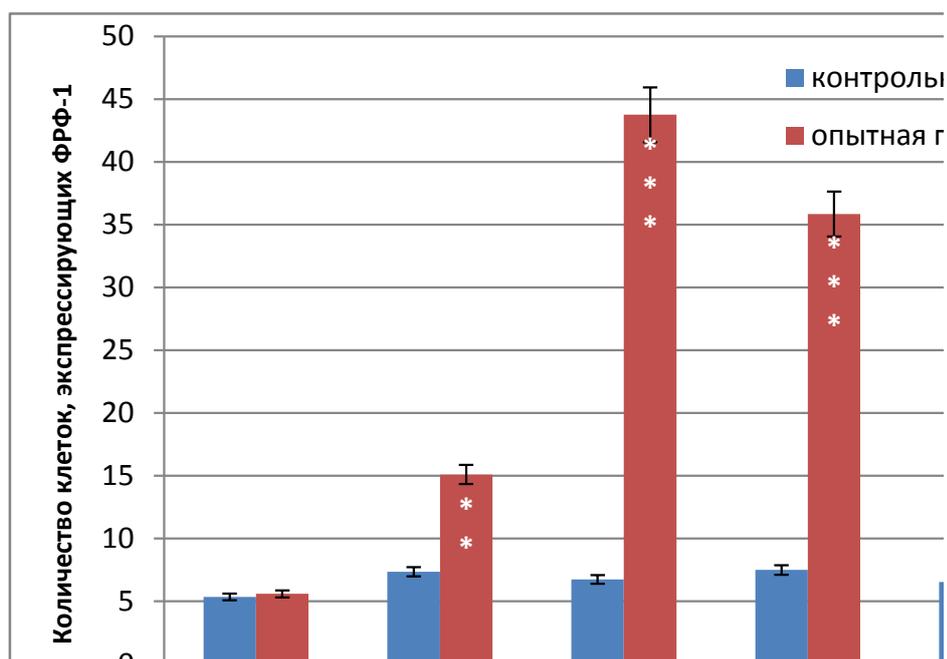


Рисунок 9 – Динамика количества клеток, экспрессирующих ФРФ-1, в коже крыс после инъекций препарата, содержащего коллаген типа I  
(\* –  $P < 0,05$ ; \*\* –  $P < 0,01$ ; \*\*\* –  $P < 0,001$ )

Таким образом, иммуногистохимические исследования с применением моноклональных антител на белок Ki-67 и ФРФ-1 показали, что после внутридермального введения крысам коллагенового препарата усиливаются процессы пролиферации клеток эпителия кожи, эндотелиальных клеток стенки сосудов, фибробластов, а также клеток в матрице волосяных фолликулов, участвующих в регенерации эпителия.

После введения в кожу препарата возросло среднее количество клеток экспрессирующих белок, усиливающего пролиферацию фибробластических клеток (главный источник синтеза нового коллагена кожи).

#### Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Биологическое старение – закономерный процесс развития живых организмов во времени, проявляющийся изменениями метаболизма, структуры и функции. Инволюционные сдвиги приводят к сокращению приспособительных возможностей организма, снижению надежности функционирования разных органов, тканей и систем, приближая их к порогу дисфункции с развитием патологии. Они нарастают с разной скоростью, характеризуются различием во времени и неодинаковой выраженностью в отдельных тканях [3, 137].

Старение населения является во всех экономически развитых странах закономерным демографическим показателем. Согласно заключению экспертов Всемирной Организации Здравоохранения в 1950 г. в возрасте старше 60 лет было лишь 8% мирового населения, в 2000 г. их доля составила 10%, а к 2050 г. они составят 21% [297], и к настоящему времени определяющим становится не столько продолжительность жизни, сколько ее содержание или качество. В этих условиях постарения населения важной задачей медицины является повышение качества жизни, и состояние кожных покровов имеет не только эстетическое, но и биологическое значение [77].

Возрастные изменения кожи подчинены общим закономерностям биологического старения, начинают проявляться у людей после 35 лет и вызываются комбинированным воздействием возраста (хронологическое или биологическое старение) и факторов внешней среды (фотоповреждение ультрафиолетовым излучением и др.) [102]. Внешние признаки старения кожи связаны с изменениями количества и функции клеток кожи, дезорганизацией компонентов внеклеточного матрикса, прежде всего коллагенового каркаса дермы и гликозаминопротеогликанов дермы [18, 32, 48, 52, 70, 116, 124, 266].

Коллагеновые волокна формируют остов, каркас дермы, обеспечивая прочность и эластичность кожи. Они обладают, кроме того, информационно-регуляторной функцией, участвуя в морфогенезе и дифференцировке фибробла-

стов, взаимодействуют со всеми компонентами внеклеточного матрикса дермы. С возрастом происходят структурные и функциональные изменения коллагеновых волокон, других фибриллярных и нефибриллярных белков внеклеточного матрикса. Ведущее значение при этом имеют процессы неэнзиматического гликирования с образованием AGE (advanced glycation endproducts) и свободнорадикального окисления под влиянием активных форм кислорода (АФК) [80, 148]. В результате развивается дисбаланс между синтезом и распадом коллагена, происходит накопление метаболически инертного коллагена, имеющего сниженные биомеханические характеристики, обладающего низкими функциональными достоинствами. АФК, образование которых в коже резко усиливается под влиянием ультрафиолетового излучения, инициируют процессы свободнорадикального окисления липидов и белков, вызывая окислительную модификацию структуры и свойств: изменения молекулярной массы, агрегацию или фрагментацию молекул, увеличение гидрофобности, снижение растворимости и устойчивости к протеолизу [47, 53, 132, 143, 242, 275].

Клинически возрастные изменения кожи проявляются как прогрессивное увеличение ее растяжимости, вязкости и потеря эластичности [35, 59, 86, 102].

Коррекция возрастных изменений кожи и других недостатков внешности является основным направлением эстетической медицины. При этом имеется значительный арсенал инъекционных методик и широкий спектр препаратов, однако основная их доля приходится на препараты, содержащие гиалуроновую кислоту и коллаген [52]. Препараты коллагена являются перспективным биоматериалом. Это обусловлено самой природой коллагена, как основного структурного белка, отвечающего за поддержание формы, стабильности ткани, создающего трехмерный каркас и механическую прочность, обеспечивающую, наряду с гиалуроном, гибкость, упругость и эластичность дермы, упорядоченность миграции, фиксации клеток и их межклеточные взаимодействия в коже. Особенно важен коллаген в репаративных процессах как естественный субстрат для адгезии, дифференцировки и роста клеток соединительной ткани [40, 52, 71].

Вместе с тем остается много нерешенных вопросов, касающихся показаний и противопоказаний, объективизации эффективности, частоты и кратности (оптимальности) применения коллагенотерапии в комплексной программе коррекции инволюционных изменений кожи, а также механизмов фармакологического эффекта, биохимических основ влияния на состояние и пролиферативную активность клеток, характера изменений метаболизма кожи в зонах введения коллагеносодержащих препаратов.

Целью настоящего исследования явилась характеристика изменений метаболизма коллагена и гликозаминогликанов в коже экспериментальных животных при введении коллагеносодержащего инъекционного препарата.

В качестве коллагеносодержащего препарата нами использовался отечественный продукт КОЛЛОСТ® гель 7%.

Препараты коллагена в медицине применяются более 50 лет [121, 190]. КОЛЛОСТ® гель производится ООО «Ниармедик плюс» (Россия), представляет собой натуральный коллагеновый комплекс, получаемый из кожи крупного рогатого скота на основе коллагена типа I. Способ получения препарата, процесс технологического производства позволяет сохранить трехспиральную нативную структуру волокна и обеспечивает высокую степень очистки от балластных веществ. При этом препарат относится к группе веществ с нулевым фактором риска передачи вирусных и микробных инфекций [52, 96].

Коллагеносодержащий препарат в наших экспериментах вводился дважды на 1-е и 6-е сутки эксперимента с учетом рекомендации курсового применения в клинических условиях для коррекции инволюционно-депрессивных изменений кожи [96], массы и площади поверхности тела экспериментальных животных согласно рекомендациям, представленным в «Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (М., 2012). Препарат вводился внутридермально методом мезотерапии на боковые поверхности туловища под эфирным рауш-наркозом.

Для достижения поставленной цели и задач при введении препарата изучали обмен коллагена по динамике изменений содержания в коже животных в области инъекций суммарного коллагена, его нейтральносолеорастворимой и цитратрастворимой фракции, свободного гидроксипролина, общей коллагенолитической активности. Кроме того, в коже животных оценивали уровень суммарных и сульфатированных гликозаминогликанов и гиалуроновой кислоты, активность ряда ферментов углеводного обмена (гексокиназа, лактатдегидрогеназа, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа), содержание молочной и пировиноградной кислот и гликогена. Для оценки инкубации изменений уровня ряда регуляторных компонентов функционирования зрелых фибробластов и интенсивности их пролиферации в сыворотке крови животных при курсовом введении коллагеносодержащего препарата определяли концентрации ИЛ-1 $\beta$ , ФНО- $\alpha$ , ИФР-1 и ТФР- $\beta$ 1. Эффективность действия коллагеносодержащего препарата при внутридермальном введении на синтетическую активность фибробластов и выраженность пролиферативных процессов клеточных элементов дермы оценивали также и с использованием гистологических, гистохимических и иммуногистохимических методов.

Исследования были проведены на инбредных белых крысах зрелого возраста (12-13 месяцев) [44, 54, 133]. Предварительно было установлено, что внутридермальное ведение методом мезотерапии препарата нативного бычьего коллагена типа I у экспериментальных животных не вызывает существенных изменений биохимических показателей сыворотки крови. Содержание общего белка, креатинина, мочевины, билирубина, глюкозы, триацилглицеролов, холестерина, активность аспартат- и аланинаминотрансфераз, щелочной фосфатазы в течение всего эксперимента (до 37-х суток) не выходили за пределы референсных значений [133].

Изучение содержания коллагена в коже крыс молодого и зрелого возраста выявило определенные различия. У животных молодого возраста по сравнению со зрелыми обнаружился более высокий уровень нейтральносолеорастворимой фракции ( $P < 0,02$ ), в то время как различия в содержании суммарного коллагена и его

сульфатированной фракции, свободного гидроксипролина не были столь существенны. Более высокая концентрация нейтральносолеорастворимой фракции коллагена, по всей вероятности, свидетельствует о более интенсивном течении процессов синтеза коллагена в коже животных молодого возраста. В процессе коллагеногенеза выделяют несколько этапов: рибосомальный синтез полипептидной цепи препро- $\alpha$ -цепей коллагена, их гидроксилирование, гликозилирование, формирование проколлагена, поступление во внеклеточный матрикс тропоколлагена с удалением N- и C- концевых доменов, формирование во внеклеточной среде микрофибрилл с предварительным окислительным дезаминированием некоторых радикалов лизина и, наконец, образование с участием гиалуроновой кислоты и протеогликанов сложных волокнистых структур-фибрилл, волокон и волокнистого каркаса ткани [80]. Нейтральносолеорастворимый коллаген представляет фракцию «молодых», вновь образованных волокнистых структур. Увеличение содержания данной фракции коллагена отражает более высокую биосинтетическую активность фибробластов дермы у молодых животных по сравнению с животными более старшего возраста.

Внутридермальное введение коллагенсодержащего препарата животным зрелого возраста показало закономерные изменения обмена коллагеновых белков кожи. В коже опытной группы животных наблюдалось увеличение суммарного коллагена во все сроки исследования. Если в течение первых дней эксперимента (2-е, 4-е, 7-е, сутки) его повышение можно связать с введением экзогенного бычьего коллагена и его суммацией с собственным коллагеном кожи, то в более отдаленные сроки (21-е и 37-е сутки), вероятно, является результатом активации биосинтетической функции фибробластов дермы. Об этом свидетельствует и повышение уровня в коже в области введения препарата в эти же сроки эксперимента нейтральносолеорастворимого и цитратрастворимого фракций коллагена, которые являются более ранними структурами этапов биосинтеза и созревания коллагеновых фибрилл и волокон.

При введении коллагеносодержащих препаратов в кожу животных опытной группы происходят изменения и процессов катаболизма коллагена. Коллагенолитическая активность кожи в опытной группе животных возрастает во все дни наблюдения, но наиболее интенсивно в начальные сроки после введения коллагеносодержащего препарата, характеризуя, с высокой долей вероятности, повышение деградации экзогенного коллагена.

Более высокая коллагенолитическая активность кожи в поздние сроки наблюдения после введения коллагеносодержащего препарата по сравнению с контрольным уровнем связана, вероятно, с активацией биосинтетических процессов в коже. Так, установлено, что интенсивность новообразования растворимых фракций коллагена значительно превышает уровень формирования коллагеновых фибрилл и волокон (нерастворимая фракция), они не успевают вовлекаться в этот процесс и частично подвергаются катаболическим процессам [57, 290, 291].

Одновременно в коже увеличивается и концентрация свободного гидроксипролина. Возможно, некоторое возрастание нейтрально-растворимой и цитрат-растворимой фракции коллагена кожи в местах инъекции коллагеносодержащего препарата связано с активной деградацией введённого экзогенного коллагена с его фрагментацией структуры, извлекаемые раствором 0,2М хлористого натрия, поскольку деградация коллагена происходит в две стадии. В начальной стадии осуществляется его фрагментация, а затем образовавшиеся во внеклеточной среде мелкие фрагменты захватываются фиброкластами и макрофагами и расщепляются до коротких пептидов и аминокислот [121, 195]. Важнейшую роль при этом играют цинкосодержащие матриксные протеиназы, которые вырабатываются фибробластами, макрофагами, тучными, эндотелиальными и другими клетками [205]. Индукция и секреция большинства из них осуществляется провоспалительными цитокинами – ИЛ-1 $\beta$ , ФНО- $\alpha$  и ростовыми факторами – ростовым фактором эпидермиса, ростовыми факторами тромбоцитов и др. Каталитическая активность этих протеиназ на посттрансляционном уровне регулируется специфическими тканевыми ингибиторами металлопротеиназ и некоторыми другими белками вне-

клеточного матрикса (интегрины, синдиканы, тромбоспондины) [241]. Таким образом, интенсивность катаболизма коллагена зависит от взаимодействия целого ряда факторов, и каталитическая активность матриксных металлопротеиназ регулируется динамически в соответствии с состоянием ткани.

Изучение тканевой реакции кожи крыс после внутридермального введения препарата немодифицированного бычьего коллагена с использованием гистологических и гистохимических методов показало, что он не вызывает выраженных воспалительных процессов, которые в итоге заканчиваются грубым рубцеванием тканей [55, 107, 127], а наблюдается макрофагальная реакция тканей кожи. Полученные результаты свидетельствуют о появлении признаков регенеративных процессов кожи в области внутридермального введения препарата. Волокнистые структуры введённого препарата в первые дни наблюдения подвергались активной резорбции макрофагами, небольшие диффузные скопления которых обнаруживались в тканях дермы и гиподермы. В последующем происходило образование собственных коллагеновых волокон *de novo*. Биохимические данные о новообразовании коллагеновых волокон в коже экспериментальных животных в более поздние сроки были подтверждены гистохимическими методами исследования с окраской на их выявление (окраска по Маллори, импрегнация по Футу). Образование волокнистых элементов соединительной ткани особенно хорошо демонстрировалось под эпителиальным слоем кожи.

Важно также, что процессы коллагеногенеза сопровождались стимуляцией регенерации мелких кровеносных сосудов, улучшая микроциркуляцию и дыхание ткани. Синхронно процессы роста микрососудов сопровождались пролиферацией фибробластов.

С позиции изменений энергетических и пластических процессов в коже при инъекции коллагеносодержащего препарата значительный интерес представляло изучение обмена углеводов. Определение содержания молочной и пировиноградной кислот с расчётом их соотношения, активность лактатдегидрогеназы позволяло оценить соотношение течения аэробного и анаэробного процессов окисления

углеводов. В первые дни после введения препарата в коже выявилось повышение процессов анаэробного окисления. Об этом свидетельствовали увеличение концентрации лактата и коэффициента лактат/пируват, активности лактатдегидрогеназы. При этом важно подчеркнуть, что изучение активности ферментов гликолиза в различных клетках выявило пропорциональность изменений скорости течения данного процесса как с ключевыми ферментами – гексокиназой, фосфофруктокиназой, пируваткиназой, так и с лактатдегидрогеназой [88]. Активность гексокиназы, характеризующей использование глюкозы клетками кожи, не подвергается существенным колебаниям, активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, начального фермента гексозомонофосфатного пути окисления, являющегося аэробным путём и приводящего к образованию в цитоплазме компонентов, используемых для биосинтетических (НАДФН, пентозофосфаты) целей и целей детоксикации, достоверно снижалась. На этом фоне в коже усиливается потребление гликогена. В более отдаленные сроки наблюдения (21-е, 37-е сутки эксперимента) обнаруживается снижение содержания лактата, индекса лактат/пируват, повышение активности гексокиназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы при достаточном уровне лактатдегидрогеназы, что можно интерпретировать как усиление аэробных путей использования углеводов на окислительные и биосинтетические цели. Полученные данные не противоречат результатам гистологических исследований кожи экспериментальных животных, свидетельствующим об усилении в эти же сроки наблюдения процессов неоангиогенеза, пролиферации фибробластов, новообразования коллагеновых фибрилл.

Усиление биосинтетических процессов в коже подтверждают результаты изучения содержания сульфатированных ГАГ, суммарных гликозаминогликанов и гиалуронана, содержание которых в коже опытной группы животных статистически значимо увеличивается на 21-е и 37-е сутки эксперимента. Результаты гистохимических исследований кожи крыс после внутридермального введения коллагенсодержащего препарата также показали, что в более поздние сроки эксперимента в грануляционной ткани под эпидермисом в большем количестве опреде-

ляются гликозаминогликаны, что характерно для процесса регенерации соединительной ткани [34]. Гликозаминогликаны и протеоглики участвуют в процессах фибриллогенеза и волокнообразования, а также оказывают влияние на пролиферацию клеток и синтез фибробластами коллагена, участвуют в воспалительных реакциях и репаративных процессах [71, 188, 224].

Формирование волокнистых структур во внеклеточной среде при фибриллогенезе начинается после секреции клеткой молекул тропоколлагена и отщепления концевых проколлагеновых фрагментов. При этом молекулы тропоколлагена образуют вблизи клеток молекулярные скопления или метафазы. В них молекулы располагаются параллельно друг другу и между ними сохраняются пространства, заполненные жидкостью. Такие системы получили название тактоиды или жидкие кристаллы [80]. Форма самих молекул с ассиметричной поверхностью играет важную роль в стабилизации жидкокристаллического состояния.

Несмотря на то, что параллельно ориентированные ассиметричные дисперсные молекулы тропоколлагена в тактоидах удалены друг от друга на десятки нанометров, взаимодействие между ними сохраняется, и образование надмолекулярных агрегатов из молекул тропоколлагена, находящихся в тактоидах, возможно только при сближении их до расстояния, при котором действуют межмолекулярные силы. Это возможно при увеличении содержания молекул коллагена у клеточной поверхности за счет их избыточного синтеза, а также синтеза ГАГ и их секреции во внеклеточное пространство в непосредственной близости от коллагеновых тактоидов. Гликозаминогликаны, имея более высокое сродство к воде, осмотическим путем отнимают воду из коллагеновых тактоидов, способствуя тем самым сближению молекул коллагена до расстояния межмолекулярных сил сцепления. Их возникновение между молекулами тропоколлагена сначала приводит к образованию протофибрилл, а затем микрофибрилл, образующиеся из 4-5 протофибрилл путем их латеральной агрегации с продольным смещением по отношению к друг другу, благодаря чередованию аминокислот в первичной структуре с преобладающим в отдельных участках положительных, либо отрицательных за-

рядов. Эти участки чередуются и, приближаясь друг к другу своими боковыми поверхностями, молекулы связываются разноименнозаряженными участками. Таким же образом, вероятно, происходит последующее наращивание толщины микрофибриллы. Образование надмолекулярного агрегата значительно меняет характер и распределение вдоль длинной оси совокупного заряда и приводит к избирательной адсорбции гликозаминогликанов на поверхности с преимущественно положительным зарядом. С помощью гликозаминогликанов происходит интеграция микрофибрилл в фибриллу. Интеграция фибрилл в волокна осуществляется с помощью тех же механизмов, что и объединение микрофибрилл в фибриллу, то есть с помощью гликозаминогликанов. Протеогликаны с большой молекулярной массой, гиалуронан, вероятно, участвуют в осмотическом удалении воды, которая разделяет образовавшиеся фибриллы, а протеогликаны с меньшей молекулярной массой, адсорбированные на поверхности коллагеновых фибрилл и образующие их протеогликановую оболочку, путём аутоадгезии связывают фибриллы в единый функциональный комплекс – волокно [80]. При обработке волокнистой соединительной ткани гликолитическими ферментами коллагеновые волокна распадаются на отдельные фибриллы, которые сохраняют при этом свои оболочки, представленные комплексом коллагенового белка и протеогликанов.

Таким образом, созревание коллагена, образование надмолекулярных структур требуют параллельно синтеза и продукции протеогликанов. Конечно очевидно, что формирование коллагеновых фибрилл и волокон осуществляется с участием волокнообразующих коллагенов типа III, V, ассоциированных с фибриллами коллагенов типа XII, XIV и XXII, а также коллагенов типа VII и VI [80] и некоторых других белков. В целом, в процессах образования грануляционной ткани и регенерации соединительной ткани, биосинтез коллагена, протеогликанов и гиалуроновой кислоты в фибробластах осуществляется синхронно, взаимно влияя друг на друга в формировании структур внеклеточного матрикса. Результаты определения содержания растворимых фракций и суммарного коллагена, гиалуроновой кислоты и сульфатированных гликозаминогликанов в более отдален-

ные сроки после внутридермального введения коллагенсодержащего препарата биохимическими и гистохимическими методами однозначно позволяют прийти к заключению об активации биосинтетических функций фибробластов дермы.

Важную роль в механизмах стимуляции фибробластов, вероятно, играют активированные макрофаги, обнаруживаемые в области введения коллагенсодержащего препарата. При этом макрофаги выделяют различные цитокины, ростовые факторы, факторы ангиогенеза [60]. Стимулирующим эффектом на макрофагальную активность, на пролиферативную активность фибробластов и регенерацию соединительной ткани обладают и продукты распада коллагена [50, 92, 289].

Пролиферация фибробластов, их функциональная активность регулируются многими компонентами, включая системные и локальные факторы. В группу «короткодистантных» или локальных регуляторов входят сигнальные молекулы, формирующие сеть коммуникационных сигналов между клетками иммунной системы и клетками других органов и тканей [89]. К началу 21-столетия было выделено около 200 индивидуальных веществ, входящих в группу данных регуляторов [123] и условно подразделяемых на ростовые факторы, цитокины, морфогены и нейропептиды. Для цитокинов и ростовых факторов присущ плеiotропный характер действия, близкое функциональное и структурное сходство, что большинству авторов позволяет использовать общий термин «цитокины» [108, 123, 201].

Имеются разные подходы к классификации цитокинов с учетом их биохимических и биологических свойств, типов рецепторов и др. Но они обладают рядом общих свойств: являются белками или полипептидами (молекулярная масса от 5 до 50 кДа); не имеют антигенной специфичности биологического действия; экспрессия генов большинства из них начинается в ответ на проникновение в организм патогенов, антигенное раздражение или повреждение тканей; могут продуцироваться различными по гистогенетическому происхождению клетками; обладают плеiotропностью биологического действия в зависимости от вида клеток-мишеней или типа рецепторов; индуцируют либо подавляют синтез самих себя, других цитокинов или их рецепторов, формируя цитокиновую цепь; обладают

взаимозаменяемостью биологического эффекта; влияют на пролиферацию, дифференцировку и функциональную активность клеток-мишеней путём аутокринного, паракринного и эндокринно-дистантного действия [123]. Роль цитокинов особенно велика в воспалительных реакциях, при развитии и регенерации тканей, иммунных процессах, стимуляции пролиферации и дифференцировки гемопоэтических клеток. Цитокины, обладающие эндокринно-дистантным (системным) действием, попадают в кровь и функционируют, напоминая гормоны.

Цитокины регулируют пролиферацию фибробластов и их функциональную активность. На рост фибробластов оказывают влияние интерлейкины, ростовые факторы и интерфероны. Сравнительно давно установлено [238] стимулирующее влияние на пролиферацию фибробластов и продукцию ими компонентов соединительной ткани ИЛ-1, ФНО- $\alpha$ , трансформирующего фактора роста (ТФР), тромбоцитарного фактора роста (ТцФР), фактора роста фибробластов (ФРФ), инсулиноподобного фактора роста (ИФР) и др. При этом показано что ТцФР и ТФР- $\beta$  стимулируют синтез и репликацию ДНК *in vitro*, ИЛ-1 индуцирует пролиферацию фибробластов путем усиления ими продукции А-цепи ТцФР. ТцФР индуцирует деление клеток и, в свою очередь, повышает функциональную активность рецепторов для ИЛ-1 на фибробластах [89]. ФНО- $\alpha$  в низких концентрациях оказывает стимулирующий пролиферацию фибробластов эффект, в высоких – ингибирующий. Наиболее активно продукцию компонентов внеклеточного матрикса стимулируют факторы роста, вызывая экспрессию соответствующих генов в фибробластах.

Изучение содержания в сыворотке крови крыс при интрадермальном введении препарата нереконструированного коллагена уровня некоторых цитокинов обнаружило определенную закономерность изменений в зависимости от времени инъекции. Непосредственно после введения препарата (2-е, 4-е и 7-е сутки) увеличивался уровень провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\beta$  и ФНО- $\alpha$ , а в отдаленные сроки (21-е, 37-е сутки) их содержание не различалось с результатами определения у интактных животных. Их увеличение после введения препарата, по

всей вероятности, отражает реакцию клеток кожи на процедуру внутридермального введения, приводящую к повреждению тканей, и раздражение клеточных элементов кожи в ответ на пропитывание ткани экзогенным коллагеном. Как показали гистологические исследования, в зонах введения препарата эти процессы приводят к диффузным скоплениям активных макрофагальных клеток, способных выделять во внеклеточную среду различные интерлейкины, ростовые факторы, факторы миграции фибробластов, факторы ангиогенеза [60]. Ряд этих медиаторов эффекторных клеток (макрофагов, лимфоцитов, фибробластов, дендритных клеток) поступают в кровоток.

ИЛ-1 – плеiotропный медиатор, обладающий разнообразными биологическими эффектами. Впервые был описан в 40-х годах как белок, выявленный в экссудате в острую фазу воспаления. После его введения животным и человеку повышалась температура тела. Позднее были обнаружены другие эффекты этого эндогенного пирогена: регуляция медленной фазы сна и синтеза печеночных белков острой фазы; пролиферация фибробластов; Т- и В-клеточная активация и активация стволовой кроветворной клетки; радиопротекция; индукция синтеза ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- $\alpha$ , молекул адгезии, образования активных форм кислорода; активация синовиальных и эндотелиальных клеток; экспрессия гена фосфолипиды А<sub>2</sub>, процессах бластной трансформации, развития когнитивных функций и др. [26, 48, 89, 108, 131]. ИЛ-1 синтезируется как предшественник (про-ИЛ-1) и превращается в зрелый цитокин при действии протеаз. Основными продуцентами ИЛ-1 $\beta$  являются макрофаги/моноциты, но синтезировать его могут также фибробласты, дендритные и эндотелиальные клетки, кератиноциты. Обнаружено два типа рецепторов для ИЛ-1: р80-рецептор (IL-1 Rt1) и р68-рецептор (IL-1 RtII). Рецептор типа I найден на Т-клетках, фибробластах, кератиноцитах, эндотелиальных и синовиальных клетках, хондроцитах и гепатоцитах, а типа II – на В-клетках, нейтрофилах и клетках костного мозга. Транскрипция и трансляция ИЛ-1 стимулируется другими цитокинами (ФНО- $\alpha$ , гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (ГМ-КФС) и др.), супрессируется ИЛ-4, ИЛ-6,

трансформирующим фактором роста бета (ТФР-β) [153, 185]. В целом, ИЛ-1β играет ведущую роль в формировании цитокиновой сети в ответ на повреждение тканей.

Другим важнейшим провоспалительным цитокином является ФНО-α. Он также сравнительно быстро и активно синтезируется мононуклеарными клетками. Его могут вырабатывать дендритные, тучные, эндотелиальные и гемопоэтические клетки, фибробласты, Т-лимфоциты [143]. ФНО-α и ФНО-β – родственные цитокины, впервые описанные по их способности убивать чувствительные клеточные типы (чаще опухолевые) в условиях *in vitro*. Позднее было установлено, что они подобно ИЛ-1 являются плеiotропными медиаторами воспаления [89], многие их функции идентичны функциям ИЛ-1, хотя в большинстве случаев требуется их большая концентрация и они проявляют противоопухолевую активность *in vivo* и *in vitro*. ФНО-α, известный как кахектин, является основным медиатором развития шока при сепсисе. Его повышенная экспрессия лежит в основе патогенеза аутоиммунных повреждений и повреждений тканей при воспалении. Он индуцирует экспрессию тканевых прокоагулянтных факторов, ряда адгезивных молекул (ELAM-1, ICAM-1), мембранно-ассоциированного ИЛ-1, протоонкогенов *c-myc*, *c-fos*, *c-jun*, усиливает секрецию ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ГМ-КФС, моноцитарного хемотаксического белка (MCP-1) и синтез простаглицлина и др. [21, 94].

Выделены два типа рецепторов к ФНО – ФНО R<sub>ц</sub> 1/55 и ФНО R<sub>ц</sub> 2/75, которые экспрессируются большинством клеток в организме. Помимо воспалительной и иммунологических реакций ФНО участвует в регуляции множества других процессов, включая пролиферацию, дифференцировку и гибель различных клеток, формирование структуры различных тканей. После связывания с рецептором ФНО-α индуцирует внутриклеточные сигнальные каскады, приводящие к активации митогенактивируемых протеинкиназ, транскрипционных факторов (NF-κB, AP-1 *fos*, *c-myc*, *c-fos*, *c-jun* и др.), которые регулируют экспрессию медиаторов воспаления [285, 293]. ФНО-α индуцирует поляризацию M1-фенотип макрофагов,

вырабатывающих воспалительные цитокины, активные формы кислорода и другие антимикробные молекулы [229, 254].

Важно, что действие ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  на различные клетки *in vivo* и *in vitro* часто неразличимы. Более того нередко отмечается синергизм их действия [135; 136]. Они синергично действуют на фибробласты, усиливают фагоцитоз, стимулируют пролиферацию фибробластов и эндотелиоцитов, активируют метаболизм соединительной ткани, индуцируя синтез ММП-1, -8, -13, -14, что необходимо для заживления и восстановления целостности ткани [108, 123, 136, 153].

Таким образом, увеличение содержания в сыворотке крови экспериментальных животных ИЛ-1 $\beta$  и ФНО- $\alpha$  в первые дни после внутридермального введения коллагеносодержащего препарата является результатом воспалительного ответа кожи. В реализации этого ответа на повреждение структуры ткани и ее пропитывания экзогенным коллагеном важная роль, как показывают результаты гистологических и гистохимических исследований, принадлежит макрофагам, активно участвующим в процессах резорбции экзогенного коллагена, что важно для последующего замещения их собственными коллагеновыми молекулами в результате неоколлагеногенеза.

Помимо изученных цитокинов совершенно очевидно, что в этих сложных процессах принимают участие и другие регуляторные факторы, в том числе и ростовые, поскольку поведение клеток в норме и патологии определяет совместная экспрессия этих факторов (цитокинов, факторов роста, онкогенов и антионкогенов, молекул адгезии и др.). Одним из факторов роста, продуцируемых многими типами клеток (макрофаги, Т-лимфоциты, фибробласты, фиброциты, эпителиальные и др.) является трансформирующий фактор роста-бета 1 (ТФР- $\beta$ 1). Он относится к суперсемейству трансформирующего ростового фактора, включающего около 100 представителей (ТФР- $\beta$ 1, 2, 3, 4; активины, ингибины, костные морфогенетические белки и др.). Все представители этого семейства имеют до 70% гомологий [89, 265].

Наиболее представленным трансформирующим ростовым фактором у различных видов животных является ТФР- $\beta$ 1. Внутриклеточный домен этого фактора обладает серин/треонинпротеинкиназной активностью и для интрацеллюлярного распространения сигналов использует SMAD-систему [265]. ТФР- $\beta$ 1 обладает противовоспалительным действием, подавляет синтез воспалительных цитокинов, снижает ответ лимфоцитов на действие интерлейкинов -2, -4, -7, цитотоксическую и цитокинпродуцирующую активность макрофагов М1-фенотипа. В то же время он служит хемоаттрактантом для фибробластов и моноцитов, продемонстрированы его ангиогенное действие и способность к индукции образования грануляционной ткани при заживлении ран [89]. Показано, что ТФР- $\beta$ 1 индуцирует формирование макрофагов М2-фенотипа, которые необходимы и участвуют в завершении воспалительной реакции, заживления и восстановления нормального метаболизма ткани, характеризуются экспрессией ингибиторов воспаления, ростовых факторов и других регуляторных молекул [229, 276].

Содержание ТФР- $\beta$ 1 после внутридермального введения коллагенсодержащего препарата увеличивалось в сыворотке крови на следующие сутки и оставалась на более высоком уровне вплоть до конца эксперимента. Увеличение его содержания в первые дни после проведения интрадермальной инъекции препарата можно связать с продукцией активированными макрофагами и другими клетками ткани кожи не только провоспалительных (ИЛ-1, ФНО- $\alpha$ ), но и противовоспалительных цитокинов, в частности ТФР- $\beta$ 1. В более отдаленные сроки исследования повышение его концентрации отражает течение процессов роста и пролиферацию дермальных фибробластов в зоне инъекции коллагенсодержащего препарата.

Данному положению не противоречат и результаты определения в сыворотке крови другого ростового фактора – ИФР-1, содержание которого тоже увеличивается на 7-е, 21-е и 37-е сутки эксперимента после введения изучаемого препарата. ИФР-1 также может вырабатываться клетками соединительной ткани, и его основное действие направлено на активацию процессов пролиферации и роста клеток [286]. Увеличение концентрации ИФР-1 в сыворотке крови опытной груп-

пы животных по срокам совпадало с наблюдаемыми при гистологическом исследовании кожи повышением под слоем эпидермиса количества фибробластических клеток, усиленной экспрессией в ядрах фибробластов в сосочком слое дермы, ядрах эндотелиальных клеток кровеносных сосудов и клеток волосяных фолликул белка Ki-67, а в цитоплазме – ФРФ-1, являющихся широко используемыми маркерами пролиферации [169, 278].

Иммуногистохимическими методами исследования с применением моноклональных антител на белок Ki-67, выявляющийся в ядрах делящихся клеток, было установлено, что после внутридермального введения крысам коллагеносодержащего препарата усиливаются процессы обновления клеток. Этот процесс затрагивает как фибробластические и эпителиальные клетки кожи, так и эндотелиальные клетки сосудов, а также клетки в матрице волосяных фолликул, которые являются не только источником развития эпителиальных клеток, но участвуют и в регенерации кожи и при повреждениях, и в норме [20, 193].

Другой иммуногистохимически изученный на препаратах кожи экспериментальных животных цитокин ФРФ-1, определяющийся в цитоплазме, выражено стимулирует пролиферацию и синтез ДНК в фибробластах, стимулирует ангиогенез, непосредственно воздействуя на эндотелиальные клетки [89]. Свободный ФРФ способен индуцировать рост новых сосудов в условиях повреждения клеток и тканей. В случаях заживления раны локальное увеличение содержания ФРФ происходит за счет продукции тромбоцитами, макрофагами и/или повреждения тканей, что служит стимулом роста новых сосудов [270] и пролиферации клеток соединительной ткани. Семейство ростового фактора фибробластов включает 23 члена, большинство из которых играют важнейшую роль в процессах дифференциации тканей в эмбриогенезе, участвуют помимо ангиогенеза в регуляции хондрогенеза и остеогенеза [114, 159, 258].

После введения в кожу экспериментальных животных коллагенсодержащего препарата возрастало среднее количество клеток, экспрессирующих ФРФ-1, в сравнении с показателями контрольной группы крыс, которым внутрикожно был

введен раствор глюкозы. Показатели среднего количества клеток, экспрессирующих цитокин ФРФ-1, в опытной группе были достоверно выше почти на всех сроках эксперимента. Наиболее высокие показатели были в сроки 7-е и 21-е сутки после введения препарата ( $43,75 \pm 2,36$  и  $35,10 \pm 1,59$  в поле зрения соответственно).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Интрадермальное введение препарата немодифицированного бычьего коллагена типа I (отечественный препарат «Коллост<sup>®</sup>ГЕЛЬ» ООО «Ниармедик плюс») в первые дни после инъекции техникой мезотерапии вызывает в коже животных пропитывание и невыраженный отек основного вещества ткани (дермы и гиподермы), некоторое разрыхление волокнистых структур и невыраженную диффузную инфильтрацию макрофагами, активно лизирующих и фагоцитирующих введенный препарат. Одновременно в коже происходят метаболические сдвиги. Наблюдаются повышение процессов анаэробного окисления углеводов с интенсификацией использования гликогена, усиление коллагенолитической активности, экспрессия провоспалительных цитокинов.

В более отдаленные сроки после введения коллагенсодержащего препарата в коже усиливаются процессы пролиферации с увеличением фибробластических клеток и ангиогенеза, что подтверждается гистологическими исследованиями с окраской препаратов гемоксилином и эозином, а также иммуногистохимическими методами с применением моноклональных антител на белок Ki-67 и ФРФ-1. Важную роль в развитии этих процессов играют ростовые факторы – ИФР-1, ТФР- $\beta$ 1, ФРФ-1, основными источниками которых являются макрофагальные и фибробластические клетки. Эти результаты не противоречат данным о том, что при имплантации коллагена в ткани активируются макрофаги, которые с помощью ферментов (коллагеназы, желатиназы, эластазы) лизируют его, а затем поддерживают образовавшиеся фрагменты фагоцитозу. При этом продукты распада коллагена стимулируют не только макрофагальную активность, но и регенерацию соединительной ткани [71, 103, 282]. Активированные макрофаги, в свою очередь, выделяют факторы миграции фибробластов, ростовые факторы, факторы ангиогенеза и др.

В коже одновременно наблюдаются биосинтез и увеличение количества коллагена, повышение содержания сульфатированных гликозаминогликанов, ги-

луронана и суммарных ГАГ, что обнаруживается и биохимическими и гистохимическими исследованиями. Изменения метаболизма углеводов – усиление фосфорилирования глюкозы с активацией аэробного окисления по дихотомическому и апотомическому путям способствуют энергетическому и пластическому обеспечению течения пролиферативных и биосинтетических процессов.

Полученные данные при определении обмена коллагена, содержания гликозаминогликанов биохимическими и гистохимическими методами свидетельствуют об активации метаболизма, связанного со стимуляцией биосинтетических процессов в коже крыс опытной группы с повышением содержания важнейших биополимеров межклеточного матрикса после курса мезотерапии коллагенсодержащим препаратом.

В целом, результаты проведенных исследований показывают, что внутридермальное введение отечественного коллагенсодержащего препарата «Коллост» приводит к развитию в коже в области инъекции реакции, приводящей опосредовано к активации фибробластов, усилению пролиферации, ангиогенеза и интенсификации синтеза основных биополимеров внеклеточного матрикса – коллагена и гликозаминогликанов.

## 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.
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 при этом в первые дни после инъекций препарата (1-7 суток) характеризуется активацией катаболизма, а в более отдалённые сроки (21-37 суток) – интенсификацией биосинтеза.
3. Внутридермальное введение препарата нереконструированного бычьего 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 $\beta$ , ФНО- $\alpha$  и ТФР- $\beta$ 1. В более отдалённые сроки наблюдается нормализация уровней ИЛ-1 $\beta$  и ФНО- $\alpha$ , сохранение повышенного содержания ТФР- $\beta$ 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 структуры препарата. В более отдалённые 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<sup>®</sup> ГЕЛЬ» (ООО «Ниарбмедик 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 СОКРАЩЕНИЙ**

- АЛАТ – аланинаминотрасфераза  
АСАТ – аспартатаминотрасфераза  
АТФ – аденозинтрифосфорная кислота  
АФК – активные формы кислорода  
Г-6-ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа  
ГАГ – гликозамингликаны  
ГК – гиалуроновая кислота  
ГП-гидроксипролин  
ГПО-глутатионпероксидаза  
ИЛ – интерлейкин  
ИФР – инсулиноподобный фактор роста  
КА – коллагенолитическая активность  
ЛДГ – лактатдегидрогеназа  
МКМ – межклеточный матрикс  
ММП – металлосодержащая матриксная протеаза  
НАД – никотинамидадениндинуклеотид  
НАДН – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный  
НАДФ - никотинамидадениндинуклеотидфосфат  
НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный  
НСРК – нейтральносоластворимый коллаген  
ОМБ – окислительная модификация белков  
ПОЛ – перекисное окисление липидов  
РАП- резервно-адаптационный потенциал  
СГП – свободный гидроксипролин  
СК – суммарный коллаген  
СОД – супероксиддисмутаза  
ТБК – тиобарбитуровая кислота

ТИМП – тканевой ингибитор металлопротеиназ

ТФР – трансформирующий фактор роста

ТХУ – трихлоруксусная кислота

ФБ – фибробласты

ФНО – фактор некроза опухолей

ФРФ – фактор роста фибробластов

ЦПК – цитратрастворимый коллаген

AGE – (advanced glucation endproducts) –конечные продукты завершеного неэнзиматического гликозилирования

BRAL – один из рецепторов гиалуронана

CD – (cluster или center differentiation)-кластер или центр дифференцировки

FGF – (epidermal growth factor)- ростовой фактор эпидермиса

ELAM – лейкоцитарные клеточно-адгезивные молекулы семейства  $\beta_2$ -интегринов

GFGER – “легкие” аминокислотные последовательности в трехспиральных доменах волокнообразующих коллагенов

HAS – гиалуронансинтаза

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Алексахина, Н.В. Солюбилизация, очистка и некоторые свойства гексокиназы митохондрий скелетных мышц крысы [Текст] / Н.В. Алексахина, Л.Н. Щербатых, Н.Ю. Ситнина // Биохимия. – 1973. – Т. 38, № 5. – С. 915-921.
2. Алиева, Е.Г. Роль дендритных клеток в поддержании структурного гомеостаза кожи [Текст] / Е.Г. Алиева, О.Н. Сулаева // Морфология. – 2016. – Т. 10, № 3. – С. 14-18.
3. Анисимов, В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения [Текст]: в 2 т. / В.Н. Анисимов. – СПб., 2008. – Т. 1. – 481 с.
4. Арутюнян, А.В. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма [Текст]: метод. рекомендации / А.В. Арутюнян, Е.Е. Дубинина, Н.Н. Зыбина; под ред. В.Х. Хавинсона. – СПб.: ИКФ "Фолиант, 2000. – 103 с.
5. Асатиани, В.С. Ферментные методы анализа [Текст] / В.С. Асатиани; АН ГССР. – М.: Наука, 1969. – 740 с.
6. 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.
7. Бакина, Е.В. Современные методы омоложения в эстетической медицине [Текст] / Е.В. Бакина // Международный научно-исследовательский журнал. – 2016. – № 4-5 (46). – С. 74-76.
8. Башкатов, С.А. Гликозаминогликаны в биохимических механизмах адаптации организма [Текст] / С.А. Башкатов. – Уфа: изд-во БашГУ, 1996. – 144 с.
9. Биологическая роль свободных радикалов в развитии патологических состояний [Текст] / А.О. Сыровая [и др.] // Международный медицинский журнал. – 2012. – № 3. – С. 98-104.
10. Биохимические методы анализа показателей обмена биополимеров соединительной ткани [Текст] / П.Н. Шараев [и др.]. – Ижевск, 1990. – 22 с.

11. Бурлуцкая, О.И. Деструктурированная гиалуроновая кислота и пептидный комплекс: возможности ANTI-AGE терапии [Текст] / О.И. Бурлуцкая, Р.Р. Рахматуллин, Т.И. Бурцева // Экспериментальная и клиническая дерматокосметология. – 2014. – № 2. – С. 47-51.
12. Вклад клеточно-ориентированных и биохимических механизмов в процессе геропрофилактики у пациентов с полиморбидной патологией [Текст] / В.Н. Мещанинов [и др.] // Аллергология и иммунология. – 2016. – Т. 17, № 1. – С. 83-86.
13. Влияние полипептидов на пролиферацию и апоптоз клеток при старении [Текст] / А.П. Рыжак [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2016. – № 4. – С. 221-225.
14. Влияние полипептидов на регенерацию клеток в культуре разных тканей молодых и старых крыс [Текст] / А.П. Рыжак [и др.] // Успехи геронтологии. – 2015. – Т. 28, № 1. – С. 97-103.
15. Возможности применения коллагена (коллоста) в качестве материала для sling-операций по поводу недержания мочи у женщин [Текст] / О.Б. Лоран [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2007. – № 1. – С. 57-60.
16. Возрастные изменения содержания ангиомотина и эндостатина в коже человека [Текст] / Н.Н. Голубцова [и др.] // Успехи геронтологии. – 2015. – Т. 28, № 4. – С. 762-768.
17. Возрастные изменения численности и пролиферации фибробластов в коже человека [Текст] / А.Г. Гунин [и др.] // Успехи геронтологии. – 2011. – Т. 24, № 1. – С. 43-47.
18. Возрастные характеристики показателей клеточных элементов кожи, как основа формирования технологий предупреждения старения [Текст] / Ю.Г. Суховой [и др.] // Российский иммунологический журнал. – 2016. – Т. 10, № 2(1) (19). – С. 526-527.
19. Волкова, О.В. Основы гистологии с гистологической техникой [Текст] / О.В. Волкова, Ю.К. Елецкий. – М.: Медицина, 1982. – 304 с.

- 20.Воротеляк, Е.А. Регенеративный потенциал волосяного фолликула. Обзор научных изысканий [Текст] / Е.А. Воротеляк // Пластическая хирургия и косметология. – 2010. – № 1. – С. 118-123.
- 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.Гланц, С. Медико-биологическая статистика [Текст]: пер. с англ. / С. Гланц; под ред. Н.Е. Бузикашвили, Д.В. Самойлова. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
- 23.Голубцова, Н.Н. Ламин а и ламин-ассоциированный полипептид 2 (Iap-2) в фибробластах кожи человека при старении [Текст] / Н.Н. Голубцова, Ф.Н. Филиппов, А.Г. Гунин // Успехи геронтологии. – 2016. – Т. 29, № 4. – С. 577-585.
- 24.Голубцова, Н.Н. Ламин В1 и ламин В2 в коже человека в процессе старения [Текст] / Н.Н. Голубцова, Ф.Н. Филиппов, А.Г. Гунин // Успехи геронтологии. – 2016. – Т. 29, № 2. – С. 222-228.
- 25.Гущина, Ю.Ю. Исследование влияния обводнения, рН и модуляторов протеогликанов на морфологию фибрилл и субволокон коллагена [Текст] / Ю.Ю. Гущина, Р.А. Плохов, А.В. Зевеке // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2007. – № 1. – С. 114-118.
- 26.Действие хронического введения низких доз интерлейкина-1β на исследовательское поведение и пространственную память крыс [Текст] / С.В. Калемев [и др.] // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2015. – Т. 101, № 5. – С. 550-558.
- 27.Дубинина, Е.Е. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения [Текст] / Е.Е. Дубинина, С.О. Бурмистров, Д.А. Ходов // Вопросы медицинской химии. – 1995. – Т. 41, № 1. – С. 24-26.
- 28.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.
- 29.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.
- 30.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.
- 31.Зорин, В. Дермальные фибробласты для лечения дефектов кожи [Текст] / В. Зорин, А. Зорина, В. Черкасов // Эстетическая медицина. – 2012. – Т.11, № 1. – С. 15-31.
- 32.Зорина, А. Дермальные фибробласты: разнообразие фенотипов и физиологических функций, роль в старении кожи [Текст] / А. Зорина, В. Зорин, В. Черкасов // Эстетическая медицина. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 15-31.
- 33.Игнатьева, И. Коллаген – основной белок соединительной ткани [Текст] / И. Игнатьева // Эстетическая медицина. – 2005. – Т. 6, № 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 (приложение 1). – С. 194-196.
- 35.Изучение возрастных особенностей эластичности кожи лба и шеи [Текст] / Т.Н. Королькова [и др.] // Клиническая дерматология и венерология. – 2017. – Т. 16, № 3. – С. 110-117.
- 36.Иммуногистохимические методы [Текст]: руководство: пер. с англ. / под ред. Г.А. Франка [и др.]. – М., 2011. – 224 с.
- 37.Использование олигопептидов в клеточно-ориентированных технологиях превентивной гериатрии [Текст] / В.Н. Мещанинов [и др.] // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2015. – Т. 55, № 4. – С. 116-122.

- 38.Калика, Е.П. Профилактика и коррекция возрастных изменений кожи шеи и области декольте [Текст] / Е.П. Калика // Пластическая хирургия и косметология. – 2012. – № 1. – С. 148.
- 39.Капулер, О.М. Прикладные аспекты коллагенотерапии в эстетической медицине [Текст] / О.М. Капулер, Е.Р. Курамшина // Экспериментальная и клиническая дерматокосметология. – 2013. – № 5. – С. 40-43.
- 40.Капулер, О.М. Теоретические аспекты и клинические принципы коллагенотерапии в косметологии [Текст] / О.М. Капулер // Инъекционные методы в косметологии. – 2013. – № 1. – С. 100-109.
- 41.Караулов, А.В. Иммунология, микробиология и иммунопатология кожи [Текст] / А.В. Караулов, С.А. Быков, А.С. Быков. – М., 2012. – 328 с.
- 42.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.
- 43.Катунина, О.Р. Современные представления об участии кожи в иммунных процессах [Текст] / О.Р. Катунина, А.В. Резайкина // Вестник дерматологии и венерологии. – 2009. – № 2. – С. 39-46.
- 44.Кигель, Т.Б. Отдельные показатели биологической нормы лабораторных крыс [Текст] : методическое руководство / Т.Б. Кигель. – М., 1982. – 165 с.
- 45.Кишкун, А.А. Биологический возраст и старение: возможности определения и пути коррекции [Текст] : руководство для врачей / А.А. Кишкун. – М., 2008. – 2000 с.
- 46.Клинико-экспериментальное обоснование применения препарата коллост и биорезорбируемых мембран диплен-гам и пародонкол при удалении ретеннированных и дистопированных нижних третьих моляров [Текст] / С.В. Сирак [и др.] // Стоматология. – 2008. – Т. 87, № 2. – С. 10-14.
- 47.Кольтовер, В.К. Свободнорадикальная теория старения: исторический очерк [Текст] / В.К. Кольтовер // Успехи геронтологии. – 2000. – № 4. – С. 89.

48. Комплексный анализ кинетики экспрессии мРНК цитокинов в реакции бластной трансформации с митогеном кона [Текст] / М.М. Чулкина [и др.] // Иммунология. – 2014. – Т. 35, № 6. – С. 306-312.
49. Кононский, А.И. Гистохимия [Текст] : учеб. пособие для студентов биол. специальностей вузов / А.И. Кононский. – Киев: Вища школа, 1976. – 278 с.
50. Короткие пептиды стимулируют клеточную регенерацию в коже при старении [Текст] / Н.И. Чалисова [и др.] // Успехи геронтологии. – 2014. – Т. 27, № 4. – С. 699-703.
51. Кошевенко, Ю.Н. Кожа человека [Текст] : в 2 т. / Ю.Н. Кошевенко. – М.: Медицина, 2006. – Т. 1. Структура, физиология и предназначение функциональных элементов кожного органа человека. – 300 с.
52. 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.
53. Куликов, В.Ю. Роль окислительного стресса в регуляции метаболической активности внеклеточного матрикса соединительной ткани (обзор) [Текст] / В.Ю. Куликов // Медицина и образование в Сибири. – 2009. – № 4. – С. 5.
54. 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.
55. 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.
56. 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.
57. Мазуров, В.И. Биохимия коллагеновых белков [Текст] / В.И. Мазуров. – М.: Медицина, 1974. – 275 с.

- 58.Макарчук, А.И. Общие свойства и гетерогенитет субпопуляций фибробластов кожи [Текст] / А.И. Макарчук // Морфология. – 2007. – Т. 1, № 3. – С. 12-20.
- 59.Мантурова, Н.Е. Старение кожи: механизмы формирования и структурные изменения [Текст] / Н.Е. Мантурова, Р.В. Городилов, А.В. Кононов // Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии. – 2010. – № 1. – С. 88-92.
- 60.Маянский, Д.Н. Мононуклеарное воспаление [Текст] / Д.Н. Маянский // Хроническое воспаление. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – С. 161-184.
- 61.Медицинские лабораторные технологии: справочник [Текст]: в 2 т. / под ред. А.И. Карпищенко. – СПб. : Интермедика, 2012. – Т. 2. – 656 с.
- 62.Метаболизм коллагеновых волокон на фоне возрастных изменений [Текст] / О. Капулер, Б. Сельская, А. Галеева, Ф. Камилов // Врач. - 2015. - № 8. - С. 64-69.
- 62а.Метод определения активности каталазы [Текст] / М.А. Королюк [и др.] // Лабораторное дело. – 1988. – №1. – С. 16-19.
- 63.Мещанинов, В.Н. Влияние нейромедиаторов на перекисное окисление липидов при иммобилизационном стресс-воздействии у крыс разного возраста [Текст] / В.Н. Мещанинов, Д.Л. Щербаков // Казанский медицинский журнал. – 2015. – Т. 96, № 5. – С. 843-849.
- 64.Мещанинов, В.Н. Метаболизм клеточных структур при старении и стрессе [Текст] / В.Н. Мещанинов, Д.Л. Щербаков, В.А. Лукаш. – Екатеринбург: Изд-во УГМУ, 2017. – 308 с.
- 65.Михайлов, А.Н. Химия и физика коллагена кожного покрова [Текст] / А.Н. Михайлов. – М.: Легкая индустрия, 1980. – 232 с.
- 66.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.
67. 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.
68. Молекулярные механизмы снижения функциональной активности клеток кожи при ее старении [Текст] / В.Х. Хавинсон [и др.] // Успехи физиологических наук. – 2016. – Т. 47, № 2. – С. 62-76.
69. Морфологические изменения кожи экспериментальных животных в области внутридермального введения высокомолекулярного гиалуронана [Текст] / А.Г. Галеева // Медицинский вестник Башкортостана. – 2017. – Т. 12, № 5 (71). – С. 95-99.
70. Морфофункциональная характеристика дермы кожи и ее изменения при старении (обзор литературы) [Текст] / С.С. Целуйко [и др.] // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2016. – № 60. – С. 111-116.
71. Муслимов, С.А. Морфологические аспекты регенеративной хирургии [Текст] / С.А. Муслимов. – Уфа: Башкортостан, 2000. – 166 с.
72. Мушкамбаров, Н.Н. Молекулярная биология [Текст] : учеб. пособие для студентов медицинских вузов / Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов. – М.: МИА, 2003. – 535 с.
73. Нативный нереконструированный коллаген «Коллост» – физиологическая матрица для коррекции дефектов кожи [Текст] / В.Г. Нестеренко [и др.] // Тезисы 2 Форума Медицины и Красоты НАДК / Санкт-Петербургский институт красоты, ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва. – М., 2009.
74. Никитина, Ю.В. Изменения окислительных процессов в ткани головного мозга и крови крыс в раннем онтогенезе [Текст] / Ю.В. Никитина, И.В. Мухина // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2009. – № 6-1. – С. 124-131.

75. Ноздрин, В.И. Гистофизиология кожи: учебное пособие для студентов медицинских вузов и сузов [Текст] / В.И. Ноздрин, С.А. Барашкова, В.В. Семченко. – Омск, 2008. – 279 с.
76. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования [Текст] / Л.Е. Муравлева [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2010. – № 1. – С. 74-78.
77. Окислительный стресс как причина системного старения. Роль препаратов  $\alpha$ -липоевой кислоты (эспа-липон) в лечении и профилактике возраст-ассоциированных заболеваний [Текст] / С.Ю. Калинченко [и др.] // Фарматека. – 2014. – № 6 (279). – С. 43-54.
78. Омеляненко, Н.П. Закономерности структурной организации волокнистой стромы некоторых органов человека [Текст] / Н.П. Омеляненко // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1984. – Т. 79, № 8. – С. 65-75.
79. Омеляненко, Н.П. Кожа и ее производные [Текст] / Н.П. Омеляненко, Л.Д. Жеребцов // Атлас сканирующей электронной микроскопии клеток, тканей и органов / под ред. О.В. Волкова, В.А. Шахламова, А.А. Миронова. – М.: Медицина, 1983. – 463 с.
80. Омеляненко, Н.П. Соединительная ткань (гистофизиология и биохимия) [Текст]: в 2 т. / Н.П. Омеляненко, Л.И. Слуцкий ; под ред. С.П. Миронова. – М.: Изд-во «Известия», 2009. – Т. 1. – 380 с.
81. Омеляненко, Н.П. Ультраструктура коллагеновых волокон и основного вещества дермы кожи человека [Текст] / Н.П. Омеляненко, Я.Д. Жеребцов, И.Н. Михайлов // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1977. – Т. 72, № 4. – С. 69-76.
82. Омеляненко, Н.П. Ультраструктурная организация основного вещества дермы кожи человека [Текст] / Н.П. Омеляненко // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1978. – Т. 74, № 4. – С. 101-107.
83. Онищенко, К. Внеклеточный матрикс [Текст] / К. Онищенко // Эстетическая медицина. – 2008. – Т. 7, № 4. – С. 449-456.

84. Определение свободного и пептидно-связанного гидроксипролина в сыворотке крови [Текст] / П.Н. Шараев [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2009. – № 1. – С. 7-9.
85. Оптимизация репаративных процессов миометрия после кесарева сечения (клинико-экспериментальное исследование) [Текст] / Э.К. Айламазян [и др.] // Журнал акушерства и женских болезней. – 2015. – Т. 64, № 4. – С. 4-12.
86. Орасмяэ-Медер, Т. Новые данные по старению кожи [Текст] / Т. Орасмяэ-Медер // Косметические средства. – 2016. – № 3. – С. 4-8.
87. Орехова, Э.М. Общебиологические процессы функционального изменения и возрастного старения кожи [Текст] / Э.М. Орехова, Е.С. Васильева // Новые медицинские технологии. Новое медицинское оборудование. – 2010. – № 11. – С. 22.
88. Основы биохимии [Текст] : пер. с англ.: в 3-х т. / А. Уайт [и др.]; под ред. Ю.А. Овчинникова. – М.: Мир, 1981. – Т. 2.
89. Пальцев, М.А. Межклеточные взаимодействия [Текст] / М.А. Пальцев, А.А. Иванов. – М.: Медицина, 1995. – 224 с.
90. Патогенез и гистоморфологические особенности рубцовых изменений кожи [Текст] / О.В. Жукова [и др.] // Клиническая дерматология и венерология. – 2009. – № 3. – С. 4-9.
91. Патофизиологические и молекулярные механизмы резорбции белков внеклеточного матрикса при старении кожи и пути их восстановления [Текст] / А.А. Горкун [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2016. – Т. 60, № 4. – С. 128-133.
92. Пептидная регуляция функций фибробластов кожи при их старении *invitro* [Текст] / Н.С. Линькова [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2016. – № 1. – С. 40-44.
93. Повышение механической прочности толстокишечных анастомозов посредством препарата «коллост» [Текст] / Н.М. Агарков [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. – 2009. – Т. 16, № 3. – С. 219-21.

- 94.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.
- 95.Потёмкина, М.В. Сочетание препаратов Stylage Hydromax и Stylage Hydro (Vivacy, Франция) в процедурах биоревитализации [Текст] / М.В. Потёмкина, Н.В. Броницына // Инъекционные методы в косметологии. – 2017. – № 2. – С. 120-122.
- 96.Применение коллагенового комплекса Коллост® гель 7% для коррекции инволюционно-депрессивных изменений кожи лица, области шеи, декольте, плеч [Текст] : методические рекомендации / О.С. Панова [и др.]. – М., 2014. – 15 с.
- 97.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.
- 98.Прохорова, М.И. Методы биохимических исследований : (Липидный и энергетический обмен) [Текст] : учеб. пособие / М.И. Прохорова, Л.А. Золотова, М.А. Флеров. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – 272 с.
- 99.Проценко, А.В. Наночастицы золота в борьбе против старения кожи: триггеры механизмов аутофагии [Текст] / А.В. Проценко // Инъекционные методы в косметологии. – 2017. – № 2. – С. 44-46.
100. Прошина, Л.Я. Исследование фракционного состава коллагена в ткани печени [Текст] / Л.Я. Прошина, М.Н. Приваленко // Вопросы мед. химии. – 1982. – Т. 28, вып. 1. – С. 115-119.
101. Райцева, С.С. Широкие эстетические возможности сочетанного применения векторного мезолифтинга и фотобиомодуляции при работе с кожным компонентом старения в анатомических областях с тонкой кожей [Текст] / С.С. Райцева // Метаморфозы. – 2016. – № 15. – С. 30-35.
102. Родионов, А.Н. Поражения кожи. Диагностика. Лечение. Профилактика [Текст] / А.Н. Родионов. – СПб.: Наука и техника, 2012. – 912 с.

103. Роль макрофагов в регенерации соединительной ткани при имплантации биоматериалов [Текст] / Л.А. Мусина [и др.] // Здравоохранение Башкортостана. – 2004. – № 4. – С. 146-149.
104. Саркисов, Д.С. Общая патология человека [Текст] : учеб. для студентов ст. курсов мед. вузов, интернов, клинич. ординаторов и слушателей фак. (ин-тов) усоверш. врачей / Д.С. Саркисов, М.А. Пальцев, Н.К. Хитров. – 2-е изд., перераб. и доп. – М : Медицина, 1997. – 608 с.
105. Свободнорадикальное окисление и старение [Текст] / В.Х. Хавинсон [и др.]. – СПб., 2003. – 327 с.
106. Свободнорадикальные процессы и воспаление (патогенетические, клинические и терапевтические аспекты) [Текст] : учеб. пособие для врачей / сост.: Т.В. Сологуб. – М., 2008.
107. Серов, В.В. Соединительная ткань: (Функциональная морфология и общая патология) [Текст] / В.В. Серов, А.Б. Шехтер. – М.: Медицина, 1981. – 312 с.
108. Симбирцев, А.С. Цитокины: классификация и биологические функции [Текст] / А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. – 2004. – Т. 3, № 2. – С. 16-23.
109. Слуцкий, Л.И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани [Текст] / Л.И. Слуцкий. – Л.: Медицина. Ленингр. отделение, 1969. – 375 с.
110. Смирнова, И.О. Функциональная морфология старения кожи [Текст] / И.О. Смирнова // Успехи геронтологии. – 2004. – Т. 13. – С. 44-51.
111. Современные представления об обмене коллагена и его регуляции [Текст] / Е.Г. Бутолин [и др.] // Биохимия соединительной ткани (норма и патология). – Ижевск, 2005. – С. 25-36.
112. Спектрофотометрическое определение конечных продуктов перекисного окисления липидов [Текст] / Е.И. Львовская [и др.] // Вопросы медицинской химии. – 1991. – Т. 37, № 4. – С. 92-93.

113. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях [Текст] / Ю.И. Губский [и др.] // Современные проблемы токсикологии. – 2005. – № 3. – С. 20-26.
114. Факторы роста фибробластов fgf19, fgf21, fgf23 как эндокринные регуляторы физиологических функций и геропротекторы. Эпигенетические механизмы регуляции [Текст] / Б.И. Кузник [и др.] // Успехи современной биологии. – 2017. – Т. 137, № 1. – С. 84-99.
115. 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.
116. Фибробласты дермы: особенности цитогенеза, цитофизиологии и возможности клинического применения [Текст] / А.И. Зорина [и др.] // Гены и клетки. – 2011. – Т. 6, № 2. – С. 15-26.
117. Фомина, М.А. Окислительная модификация белков тканей при изменении синтеза оксида азота [Текст] / М.А. Фомина, Ю.В. Абаленихина. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2018. – 192 с.
118. Фомина, М.А. Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях [Текст]: метод. рекомендации / М.А. Фомина, Ю.В. Абаленихина. – Рязань, 2014. – 60 с.
119. Функциональная морфология кожи: от основ гистологии [Текст] / Э.Ф. Баринов [и др.] // Клиническая дерматология и венерология. – 2012. – № 1. – С. 48.
120. Хабаров, В.Н. Гиалуроновая кислота [Текст] / В.Н. Хабаров, П.Я. Бойков, М.А. Селянин. – М.: Практическая медицина, 2012. – 224 с.
121. Хилькин, А.М. Коллаген и его применение в медицине [Текст] / А.М. Хилькин. – М.: Медицина, 1976. – 228 с.
122. Цепилов, Р.Н. Гиалуроновая кислота – «старая» молекула с «новыми» функциями: биосинтез и деполимеризация гиалуроновой кислоты у бакте-

- рий и в тканях позвоночных, в том числе в процессах канцерогенеза (обзор) [Текст] / Р.Н. Цепилов, А.В. Белодед // Биохимия. – 2015. – Т. 80, № 9. – С. 1315-1333.
123. Цитокиновая регуляция биотрансформации ксенобиотиков и эндогенных соединений [Текст] / С.В. Сибиряк [и др.]. – Екатеринбург, 2006. – 246 с.
124. 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.
125. Чайковская, Е.А. Гиалуроновая кислота:биологический контроль над воспалением и ранозаживлением / Е.А. Чайковская, Е.З. Парсагашвили // Инъекционные методы в косметологии. – 2011. – № 4. – С. 20-29.
126. Шараев, П.Н. Определение коллагенолитической активности плазмы крови [Текст] / П.Н. Шараев, В.Н. Пишков, Н.Г. Зворыгина // Лабораторное дело. – 1987. – № 1. – С. 60–62.
127. 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.
128. 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.
129. Шичкин, В.П. Патогенетическое значение цитокинов и перспективы цитокиновой/антицитокиновой терапии [Текст] : обзор / В.П. Шичкин // Иммунология. – 1998. – № 2. – С. 9-13.
130. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма [Текст] / И.А. Волчегорский [и др.]. – Челябинск, 2000.

131. Экспрессия генов *fgf2* и *timp1* в мозге взрослых крыс после введений интерлейкина-1 $\beta$  в раннем постнатальном онтогенезе [Текст] / А.Н. Трофимов [и др.] // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2014. – Т. 100, № 9. – С. 1025-1037.
132. Юсупова, Л.А. Современный взгляд на проблему старения кожи [Текст] / Л.А. Юсупова // Лечащий врач. – 2017. – № 6. – С. 75.
133. Юшков, Б.Г. Понятие нормы в физиологии (физиологические константы лабораторных животных) [Текст] : монография / Б.Г. Юшков, В.А. Черешнев; Ин-т иммунологии. – М.: НП Центр стратегического партнерства, 2016. – 616 с.
134. Ярилин, А.А. Кожа как часть иммунной системы [Текст] / А.А. Ярилин // *Materia medica*. – 1994. – № 2. – С. 7-36.
135. Ярилин, А.А. Система цитокинов и принципы ее функционирования в норме и при патологии [Текст]: обзор / А.А. Ярилин // *Иммунология*. – 1997. – № 5. – С. 7-14.
136. 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.
137. Ястребов, А.П. Старение, перекисное окисление липидов и биовозраст [Текст] / А.П. Ястребов, В.Н. Мещанинов. – Екатеринбург, 2005. – 217 с.
138. A composite dermal filler comprising cross-linked hyaluronic acid and human collagen for tissue reconstruction [Text] / Z.H. Kim [et al.] // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2015. – Vol. 25, № 3. – P. 399-406.
139. A proximal activator of transcription in epithelial-mesenchymal transition [Text] / C.D. Venkov [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2007. – Vol. 117, № 2. – P. 482-491.
140. 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.

141. 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.
142. Age-dependent depletion of human skin-derived progenitor cells [Text] / N. Gago [et al.] // *Stem Cells.* – 2009. – Vol. 27, № 5. – P. 1164-72.
143. 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. 745-756.
144. 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.
145. Aging-associated modifications of collagen affect its degradation by matrix metalloproteinases [Text] / P. Panwar [et al.] // *Matrix Biol.* – 2017. – Vol. 17. – pii: S0945-053X(17)30130-0. doi: 10.1016/j.matbio.2017.06.004.
146. Alpha 1(Xx) collagen, a new member of the collagen subfamily, fibril-associated collagens with interrupted triple helices [Text] / M. Koch [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276, № 25. – P. 23120-6.
147. Ameye, L. Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases [Text] / L. Ameye, M.F. Young // *Glycobiology.* – 2002. – Vol. 12, № 9. – P. 107R-16R.
148. 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.
149. Association between osteoporosis and periodontal disease [Text] / F.F. Lopes [et al.] // *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* – 2008. – Vol. 30, № 8. – P. 379-83.
150. Baker, A.H. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities [Text] / A.H. Baker, D.R. Edwards, G. Murphy // *J. Cell Sci.* – 2002. – Vol. 115 (Pt. 19). – P. 3719-27.

151. 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.
152. Basbaum, C.B. Focalized proteolysis: spatial and temporal regulation of extracellular matrix degradation at the cell surface [Text] / C.B. Basbaum, Z. Werb // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 1996. – Vol. 8, № 5. – P. 731-8.
153. Beutler, B. Innate immunity: an overview [Text] / B. Beutler // *Mol. Immunol.* – 2004. – Vol. 40, № 12. – P. 845-59.
154. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis [Text] / F. Li, B. Tiede [et al.] // *Cell Res.* – 2007. – Vol. 17, № 1. – P. 3-14.
155. 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.
156. Birk, D.E. Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly [Text] / D.E. Birk // *Micron.* – 2001. – Vol. 32, № 3. – P. 223-37.
157. Bisaccia, D. The esthetic correction of the aging mouth [Text] / D. Bisaccia, D. Scarborough // *Cosmetio Dermatol.* – 1992. – Vol. 11. – P. 8-11.
158. Bornstein, P. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function [Text] / P. Bornstein, E.H. Sage // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2002. – Vol. 14, № 5. – P. 608-16.
159. Böttcher, R.T. Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development [Text] / R.T. Böttcher, C. Niehrs // *Endocr. Rev.* – 2005. – Vol. 26, № 1. – P. 63-77.
160. Burgeson, R.E. Collagen types. Molecular structure and tissue distribution [Text] / R.E. Burgeson, M.E. Nimni // *Clin. Orthop. Relat. Res.* – 1992. – Vol. 282. – P. 250-72.

161. Burgess, C.M. Principles of soft tissue augmentation for the aging face [Text] / C.M. Burgess // *Clin. Interv. Aging.* – 2006. – Vol. 1, № 4. – P. 349-55.
162. Byers, P.H. Collagens: building blocks at the end of the development line [Text] / P.H. Byers // *Clin. Genet.* – 2000. – Vol. 58, № 4. – P. 270-9.
163. Canty, E.G. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis [Text] / E.G. Canty, K.E. Kadler // *J. Cell Sci.* – 2005. – Vol. 118 (Pt. 7). – P. 1341-53.
164. 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.
165. Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth [Text] / L. Schweigerer [et al.] // *Nature.* – 1987. – Vol. 325 (6101). – P. 257-9.
166. Cattaruzza, S. Approaching the proteoglycome: molecular interactions of proteoglycans and their functional output [Text] / S. Cattaruzza, R. Perris // *Macromol. Biosci.* – 2006. – Vol. 6, № 8. – P. 667-80.
167. 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.
168. Characterization of collagenous peptides bound to lysyl hydroxylase isoforms [Text] / M. Risteli [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, № 36. – P. 37535-43.
169. 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.
170. Cheng, J.T. Collagen and injectable fillers [Text] / J.T. Cheng, S.W. Perkins, M.M. Hamilton // *Otolaryngol. Clin. North Am.* – 2002. – Vol. 35, № 1. – P. 73-85.

171.  $\alpha$ -Krox binds to several sites in the promoter of both mouse type I collagen genes. Structure/function study and developmental expression analysis [Text] / P. Galéra [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1996. – Vol. 271, № 35. – P. 21331-9.
172. Clark, M.G. Regulation of Intermediary Carbohydrate metabolism [Text] / M.G. Clark // *MTP Int. Rev. Sci.* – 1975. – Vol. 5, № 1. – P. 301-426.
173. Clinical use of injectable bovine collagen: a decade of experience [Text] / J. Keefe [et al.] // *Clin. Mater.* – 1992. – Vol. 9, № 3-4. – P. 155-62.
174. 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.
175. Collagen fibril formation [Text] / K.E. Kadler [et al.] // *Biochem. J.* – 1996. – Vol. 316 (Pt. 1). – P. 1-11.
176. Comparative glycomics of connective tissue glycosaminoglycans [Text] / A.M. Hitchcock [et al.] // *Proteomics.* – 2008. – Vol. 8, № 7. – P. 1384-97.
177. 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.
178. Coupling of ER exit to microtubules through direct interaction of COPII with dynactin [Text] / P. Watson [et al.] // *Nat. Cell Biol.* – 2005. – Vol. 7, № 1. – P. 48-55.
179. 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.
180. 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.
181. Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation [Text] / J. Varani [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2006. – Vol. 168, № 6. – P. 1861-8.

182. Detection of fibrocytes in human skin wounds and its application for wound age determination [Text] / Y. Ishida [et al.] // *Int. J. Legal Med.* – 2009. – Vol. 123, № 4. – P. 299-304.
183. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins [Text] / R.L. Levine [et al.] // *Methods Enzymol.* – 1990. – Vol. 186. – P. 464-78.
184. 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.
185. Dinarello, C.A. Inflammatory cytokines: interleukin-1 and tumor necrosis factor as effector molecules in autoimmune diseases [Text] / C.A. Dinarello // *Curr. Opin. Immunol.* – 1991. – Vol. 3, № 6. – P. 941-8.
186. Diversity of fibroblasts--a review on implications for skin tissue engineering [Text] / S.V. Nolte [et al.] // *Cells Tissues Organs.* – 2008. – Vol. 187, № 3. – P. 165-76.
187. 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.
188. Effect of 3-hydroxyproline residues on collagen stability [Text] / C.L. Jenkins [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 2003. – Vol. 125, № 21. – P. 6422-7.
189. Effects of cysteine proteases on the structural and mechanical properties of collagen fibers [Text] / P. Panwar [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2013. – Vol. 288, № 8. – P. 5940-50.
190. 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.
191. Effects of Prisma® Skin dermal regeneration device containing glycosaminoglycans on human keratinocytes and fibroblasts [Text] / R. Belvedere [et al.] // *Cell Adh. Migr.* – 2017. – № 10. – P. 1-16.

192. Efficacy and safety of porcine collagen filler for nasolabial fold correction in Asians: a prospective multicenter, 12 months follow-up study [Text] / J.H. Lee [et al.] // *J. Korean Med. Sci.* – 2014. – Vol. 29 (Suppl. 3). – P. S217-21.
193. Elliott, K. Differences in hair follicle dermal papilla volume are due to extracellular matrix volume and cell number: implications for the control of hair follicle size and androgen responses [Text] / K. Elliott, T.J. Stephenson, A.G. Messenger // *J. Invest. Dermatol.* – 1999. – Vol. 113, № 6. – P. 873-7.
194. Elson, M. Soft tissue augmentation techniques: update on available materials [Text] / M. Elson // *Cosmetic Dermatol.* – 1999. – Vol. 12. – P. 13-15.
195. Etherington, D.J. Collagen degradation [Text] / D.J. Etherington // *Ann. Rheum. Dis.* – 1977. – Vol. 36 (Suppl.). – P. 14-17.
196. 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.
197. Expression of decorin and collagens I and III in different layers of human skin in vivo: a laser capture microdissection study [Text] / K. Lochner [et al.] // *Biogerontology.* – 2007. – Vol. 8, № 3. – P. 269-82.
198. 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.
199. Eyre, D.R. Collagen cross links [Text] / D.R. Eyre, J.-J. Wu // *Topics Curr. Chem.* – 2005. – Vol. 247. – P. 207-229.
200. Fagien, S. Facial soft-tissue augmentation with injectable autologous and allogeneic human tissue collagen matrix (autologen and dermalogen) [Text] / S. Fagien // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2000. – Vol. 105, № 1. – P. 362-73.
201. 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.

202. Fibromodulin gene transcription is induced by ultraviolet irradiation, and its regulation is impaired in senescent human fibroblasts [Text] / M.A. Bevilacqua [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280, № 36. – P. 31809-17.
203. Fibulin-5 deposition in human skin: decrease with ageing and ultraviolet B exposure and increase in solar elastosis [Text] / K. Kadoya [et al.] // *Br. J. Dermatol.* – 2005. – Vol. 153, № 3. – P. 607-12.
204. Fisher, G.J. The pathophysiology of photoaging of the skin [Text] / G.J. Fisher // *Cutis.* – 2005. – Vol. 75, № 2 (Suppl.). – P. 5-8.
205. Flannery, C.R. MMPs and ADAMTSs: functional studies [Text] / C.R. Flannery // *Front. Biosci.* – 2006. – № 11. – P. 544-69.
206. Flint, M.H. Relationship between the axial periodicity and staining of collagen by the masson trichrome procedure [Text] / M.H. Flint, M.J. Merrilless // *Histochem. J.* – 1977. – Vol. 9. – P. 1-13.
207. Franzke, C.W. Collagenous transmembrane proteins: recent insights into biology and pathology [Text] / C.W. Franzke, P. Bruckner, L. Bruckner-Tuderman // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280, № 6. – P. 4005-8.
208. 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.
209. Fukai, N. Nonfibrillar collagens [Text] / N. Fukai, S.S. Apte, B.R. Olsen // *Methods Enzymol.* – 1994. – Vol. 245. – P. 3-28.
210. Gall, Y. Hyaluronic acid: structure, metabolism and implication in cicatrisation [Text] / Y. Gall // *Ann. Dermatol. Venereol.* – 2010. – Vol. 137 (Suppl. 1). – P. S30-9.
211. Garg, H.G. Chemistry and biology of hyaluronan [Text] / H.G. Garg, C.A. Hales. – Amsterdam, 2004. – 540 p.
212. Ghosh, A.K. Factors involved in the regulation of type I collagen gene expression: implication in fibrosis [Text] / A.K. Ghosh // *Exp. Biol. Med.* (Maywood). – 2002. – Vol. 227, № 5. – P. 301-14.

213. Giacomoni, P.U. Factors of skin ageing share common mechanisms [Text] / P.U. Giacomoni, G. Rein // *Biogerontology*. – 2001. – Vol. 2, № 4. – P. 219-29.
214. Good, C. The determination of glycogen [Text] / C. Good, H. Cramer, M. Somogyi // *J. Biol. Chem.* – 1933. – Vol. 2. – P. 485-497.
215. HA metabolism in skin homeostasis and inflammatory disease [Text] / R.M. Kavasi [et al.] // *Food Chem. Toxicol.* – 2017. – Vol. 101. – P. 128-138.
216. Habuchi, H. Sulfation pattern in glycosaminoglycan: does it have a code? [Text] / H. Habuchi, O. Habuchi, K. Kimata // *Glycoconj J.* – 2004. – Vol. 21, № 1-2. – P. 47-52.
217. HCELL is the major E- and L-selectin ligand expressed in LS17 YT colon carcinoma cells [Text] / M.M. Burdick [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 276, № 10. – P. 29420-29434.
218. Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes [Text] / R. Zaidel-Bar [et al.] // *Biochem. Soc. Trans.* – 2004. – Vol. 32 (Pt. 3). – P. 416-20.
219. 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. 40. – P. 336-340.
220. Human skin stem cells and the ageing process [Text] / C.C. Zouboulis [et al.] // *Exp. Gerontol.* – 2008. – Vol. 43, № 11. – P. 986-97.
221. Hyaluronan chain conformation and dynamics [Text] / S. Furlan [et al.] // *Carbohydr. Res.* – 2005. – Vol. 340, № 5. – P. 959-70.
222. Hyaluronan oligosaccharides promote excisional wound healing through enhanced angiogenesis [Text] / F. Gao [et al.] // *Matrix Biol.* – 2010. – Vol. 29, № 2. – P. 107-16.
223. Hyaluronic acid in cutaneous intrinsic aging [Text] / I. Ghersetich [et al.] // *Int. J. Dermatol.* – 1994. – Vol. 33, № 2. – P. 119-22.
224. 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.

225. Identification, expression, and tissue distribution of the three rat lysyl hydroxylase isoforms [Text] / D.K. Mercer [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – Vol. 307, № 4. – P. 803-9.
226. Influence of aging on glycosaminoglycans and small leucine-rich proteoglycans production by skin fibroblasts [Text] / B. Vuillermoz [et al.] // *Mol. Cell Biochem.* – 2005. – Vol. 277, № 1-2. – P. 63-72.
227. Involvement of hyaluronan in regulation of fibroblast phenotype [Text] / S. Meran [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282, № 35. – P. 25687-97.
228. 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 // *Tsitologiya.* – 2008. – Vol. 50, № 10. – P. 861-7.
229. Ivashkiv, L.B. Epigenetic regulation of macrophage polarization and function / L.B. Ivashkiv // *Trends Immunol.* – 2013. – Vol. 34, № 5. – P. 216-23.
230. Jain, R.K. Molecular regulation of vessel maturation [Text] / R.K. Jain // *Nat. Med.* – 2003. – Vol. 9, № 6. – P. 685-93.
231. Juhlin, L. Hyaluronan in skin [Text] / L. Juhlin // *J. Intern. Med.* – 1997. – Vol. 242, № 1. – P. 61-6.
232. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential [Text] / R. Yerushalmi [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2010. – Vol. 11, № 2. – P. 174-83.
233. Kühn, K. The classical collagens: types I, II and III [Text] / K. Kühn // *Structure and function of collagen types* / eds.: R. Mayne, R.E. Burgeson. – Orlando: Academic Press, 1987. – P. 1-42.
234. Kjellén, L. Proteoglycans: structures and interactions [Text] / L. Kjellén, U. Lindahl // *Annu Rev. Biochem.* – 1991. – Vol. 60. – P. 443-75.
235. Klein, A.W. Collagen substitutes: bovine collagen [Text] / A.W. Klein // *Clin. Plast. Surg.* – 2001. – Vol. 28, № 1. – P. 53-62.
236. Klein, A.W. In favor of double testing [Text] / A.W. Klein // *J. Dermatol. Surg. Oncol.* – 1989. – Vol. 15, № 3. – P. 263.

237. Klein, A.W. The history of substances for soft tissue augmentation [Text] / A.W. Klein, M.L. Elson // *Dermatol. Surg.* – 2000. – Vol. 26, № 12. – P. 1096-105.
238. Kovacs, E.J. Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue [Text] / E.J. Kovacs // *Immunol. Today.* – 1991. – Vol. 12, № 1. – P. 17-23.
239. Kuo, J.W. Practical aspects of HA based medical products [Text] / J.W. Kuo. – N.Y.: CRC Press Taylor, 2005. – 240 p.
240. Lee, J.Y. Hyaluronan: multifunctional megaolation, stealth molecule [Text] / J.Y. Lee, P.A. Spicer // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2000. – Vol. 12. – P. 582-586.
241. Lee, M.H. Matrix metalloproteinases at a glance [Text] / M.H. Lee, G. Murphy // *J. Cell Sci.* – 2004. – Vol. 117 (Pt. 18). – P. 4015-6.
242. Levine, R.L. Oxidative modification of proteins during aging [Text] / R.L. Levine, E.R. Stadtman // *Exp. Gerontol.* – 2001. – Vol. 36, № 9. – P. 1495-502.
243. Long-term growth arrest of PUVA-treated fibroblasts in G2/M in the absence of p16(INK4a) p21(CIP1) or p53 [Text] / W. Ma, C. Hommel, P. Brenneisen [et al.] // *Exp. Dermatol.* – 2003. – Vol. 12, № 5. – P. 629-37.
244. 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.
245. Malone, J.P. Structure and assembly of the heterotrimeric and homotrimeric C-propeptides of type I collagen: significance of the alpha2(I) chain [Text] / J.P. Malone, K. Alvares, A. Veis // *Biochemistry.* – 2005. – Vol. 44, № 46. – P. 15269-79.
246. 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.

247. Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation [Text] / F.X. Maquart [et al.] // *Biochimie.* – 2005. – Vol. 87, № 3-4. – P. 353-60.
248. Matrix metalloproteinase dependent and independent collagen degradation [Text] / F. Song [et al.] // *Front. Biosci.* – 2006. – № 11. – P. 3100-20.
249. 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.
250. 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.
251. Montagna, W. Structural changes in ageing skin [Text] / W. Montagna, K. Carlisle // *Br. J. Dermatol.* – 1990. – Vol. 122 (Suppl. 35). – P. 61-70.
252. 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.
253. Mort, J.S. Articular cartilage and changes in arthritis: matrix degradation [Text] / J.S. Mort, C.J. Billington // *Arthritis Res.* – 2001. – Vol. 3, № 6. – P. 337-41.
254. 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.
255. 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.
256. Nagata, K. HSP47 as a collagen-specific molecular chaperone: function and expression in normal mouse development [Text] / K. Nagata // *Semin. Cell Dev. Biol.* – 2003. – Vol. 14, № 5. – P. 275-82.

257. 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.
258. Ornitz, D.M. Fibroblast growth factors [Text] / D.M. Ornitz, N. Itoh // *Genome Biol.* – 2001. – Vol. 2, № 3. – REV. S3005.
259. Ortega, T. Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint [Text] / T. Ortega // *Arch. Histol. Cytol.* – 2002. – Vol. 65, № 2. – P. 109-126.
260. 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.
261. 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.
262. Ramirez, F. The fibrillins [Text] / F. Ramirez, L. Pereira // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 1999. – Vol. 31, № 2. – P. 255-9.
263. 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.
264. Report of a WHO Consultation on Medicinal and other Products in Relation to Human and Animal Transmissible Spongiform Encephalopathies [Electronic Resurs]. – URL: [www.who.int/biologicals/publications/en/BTSE97mar24.pdf](http://www.who.int/biologicals/publications/en/BTSE97mar24.pdf)
265. 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.

266. Robert, L. An original approach to aging: an appreciation of Fritz Verzár's contribution in the light of the last 50 years of gerontological facts and thinking [Text] / L. Robert // *Gerontology*. – 2006. – Vol. 52, № 5. – P. 268-74.
267. 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.
268. Ruszczak, Z. Effect of collagen matrices on dermal wound healing [Text] / Z. Ruszczak // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2003. – Vol. 55, № 12. – P. 1595-611.
269. Safrankova, B. The potency of hyaluronan of different molecular weights in the stimulation of blood phagocytes [Text] / B. Safrankova, S.Gaidova, L.Kubala // *Mediators Inflamm.* – 2010. – № 9. – P. 380948. doi 10.1155/2010/380948. Epab 2011. Feb.9.
270. Saunders, K.B. FGF and TGF-beta: actions and interactions in biological systems [Text] / K.B. Saunders, P.A. D'Amore // *Crit. Rev. Eukaryot Gene Expr.* – 1991. – Vol. 1, № 3. – P. 157-72.
271. Schmid, F.X. Protein folding. Prolyl isomerases join the fold [Text] / F.X. Schmid // *Curr Biol.* – 1995. – Vol. 5, № 9. – P. 993-4.
272. 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.
273. Scott, J.E. Extracellular matrix, supramolecular organisation and shape [Text] / J.E. Scott // *J. Anat.* – 1995. – Vol. 187 (Pt. 2). – P. 259-69.
274. Scott, J.E. Structure and function in extracellular matrices depend on interactions between anionic glycosaminoglycans [Text] / J.E. Scott // *Pathol. Biol. (Paris)*. – 2001. – Vol. 49, № 4. – P. 284-9.
275. 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.

276. Sica, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas [Text] / A. Sica, A. Mantovani // *J. Clin. Invest.* – 2012. – Vol. 122, № 3. – P. 787-95.
277. Sorrell, J.M. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep [Text] / J.M. Sorrell, A.I. Caplan // *J. Cell Sci.* – 2004. – Vol. 117 (Pt. 5). – P. 667-75.
278. 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.
279. 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.
280. 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.
281. Structural correlation between collagen VI microfibrils and collagen VI banded aggregates [Text] / C. Knupp [et al.] // *J. Struct. Biol.* – 2006. – Vol. 154, № 3. – P. 312-26.
282. Sugahara, K. Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans [Text] / K. Sugahara, H. Kitagawa // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2000. – Vol. 10, № 5. – P. 518-27.
283. 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.
284. Tamura, M. An increase of mature type skin collagen cross-link, histidino-hydroxylysinonorleucine, in the sclerotic skin of morphea [Text] / M. Tamura, O. Ishikawa // *J. Dermatol. Sci.* – 2001. – Vol. 25, № 1. – P. 83-6.
285. Targeting TNF receptors in rheumatoid arthritis [Text] / S. Blüml [et al.] // *Int. Immunol.* – 2012. – Vol. 24, № 5. – P. 275-81.
286. 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.
287. The content and ratio of type I and III collagen in skin differ with age and injury [Text] / W. Cheng [et al.] // *African J. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 10, № 13. – P. 2524-2529.
288. The paradoxical role of thioredoxin on oxidative stress and aging [Text] / G.M. Cunningham [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2015. – Vol. 576. – P. 32-8.
289. The role of macrophages in the tissues regeneration stimulated by the bio-materials [Text] / E.R. Muldashev [et al.] // *Cell Tissue Bank.* – 2005. – Vol. 6, № 2. – P. 99-107.
290. The study of procollagens [Text] / V.N. Orekhovitch [et al.] // *Collagen.* – N. Y.: Inter-sci Publ., 1962. – 235 p.
291. Turnover of collagen labeled with praline-U-C 14 in young rats [Text] / G. Gerber [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1960. – Vol. 235. – P. 2653-2662.
292. 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 (Suppl.). – P. s12-6.
293. 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.
294. Versican, a major hyaluronan-binding component in the dermis, loses its hyaluronan-binding ability in solar elastosis [Text] / K. Hasegawa [et al.] // *J. Invest. Dermatol.* – 2007. – Vol. 127, № 7. – P. 1657-63.
295. Vranka, J.A. Prolyl 3-hydroxylase 1, enzyme characterization and identification of a novel family of enzymes [Text] / J.A. Vranka, L.Y. Sakai, H.P. Bächinger // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, № 22. – P. 23615-21.

296. Woessner Jr., J.F. That impish TIMP: the tissue inhibitor of metalloproteinases-3 [Text] / J.F. Woessner Jr. // J. Clin. Invest. – 2001. – Vol. 108, № 6. – P. 799-800.
297. World population ageing 1950-2050. Executive Summary. – N.Y.: United Nations Population Division, 2013.
298. Yan, L.J. Analysis of oxidative modification of proteins [Text] / L.J. Yan // Curr. Protoc. Protein Sci. – 2009. – Ch. 14.
299. 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.

**ПРИЛОЖЕНИЕ**  
**(микрофотографии)**

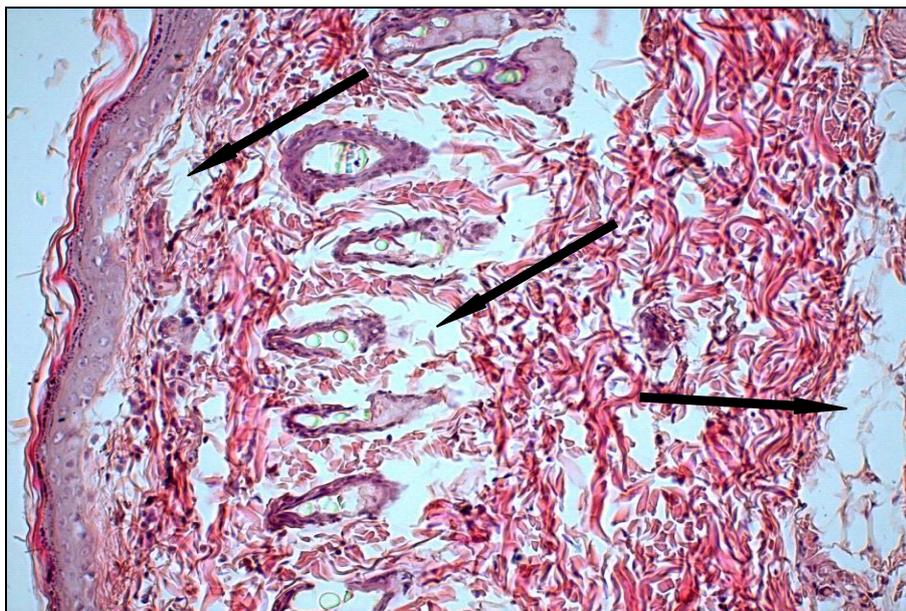


Рисунок 1 – Признаки набухания кожи в виде разрыхления волокнистых пучков и увеличения пространства между элементами тканей (↑) в дермальной пластинке кожи крыс на 2-е сутки после введения раствора глюкозы. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x100

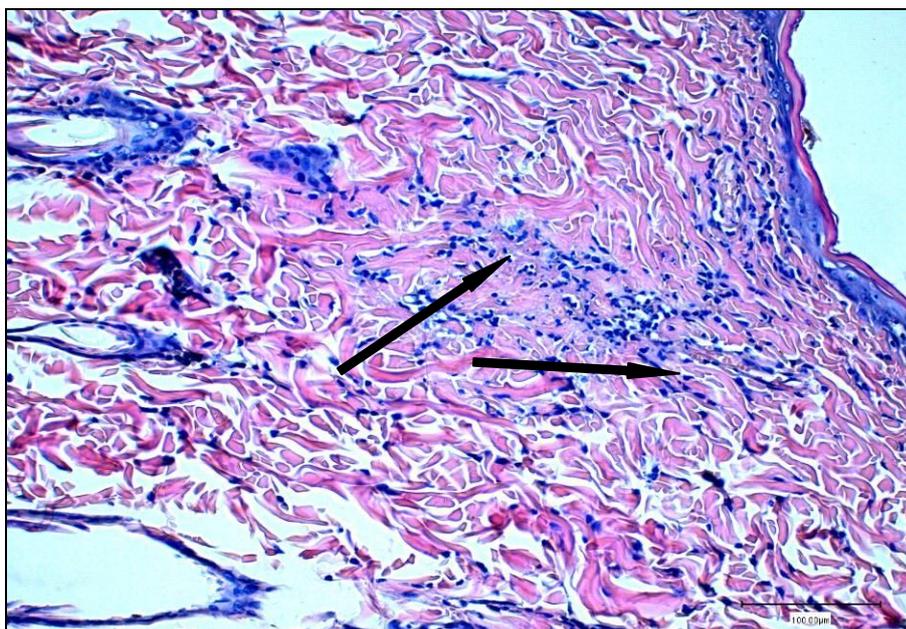


Рисунок 2 – Слабо выраженная клеточная реакция тканей (↑) кожи крысы опытной группы на 2-е сутки после внутридермального введения препарата. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x100

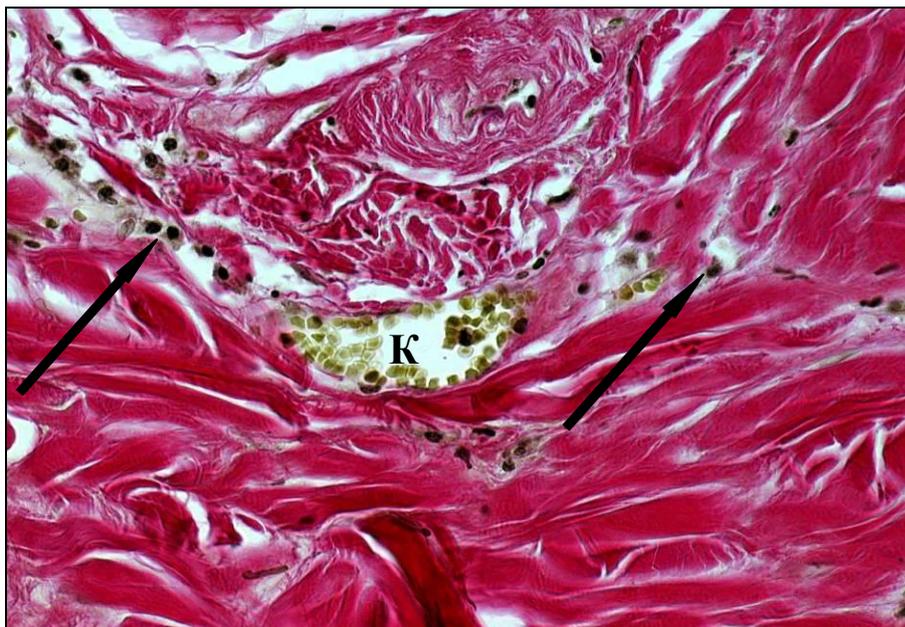


Рисунок 3 – Макрофаги (↑) между коллагеновыми волокнами на 2-е сутки после внутридермального введения препарата. Расширенный кровеносный капилляр – К. Окраска по Ван-Гизону. Увеличение x400

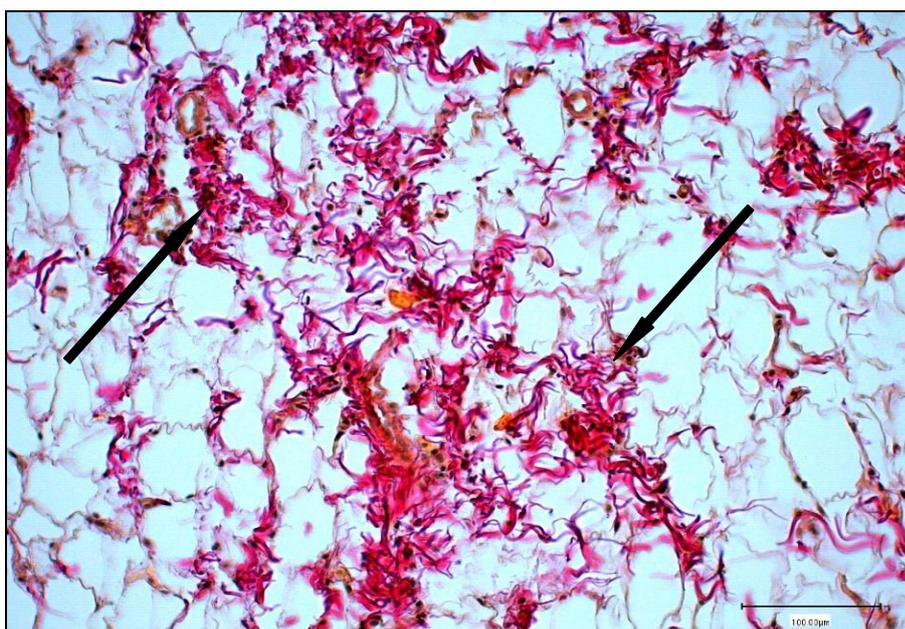


Рисунок 4 – Тонкие волокнистые элементы (↑) препарата нереконструированного коллагена в гиподерме на 2-е сутки после внутридермального введения. Окраска по Ван-Гизону. Увеличение x200

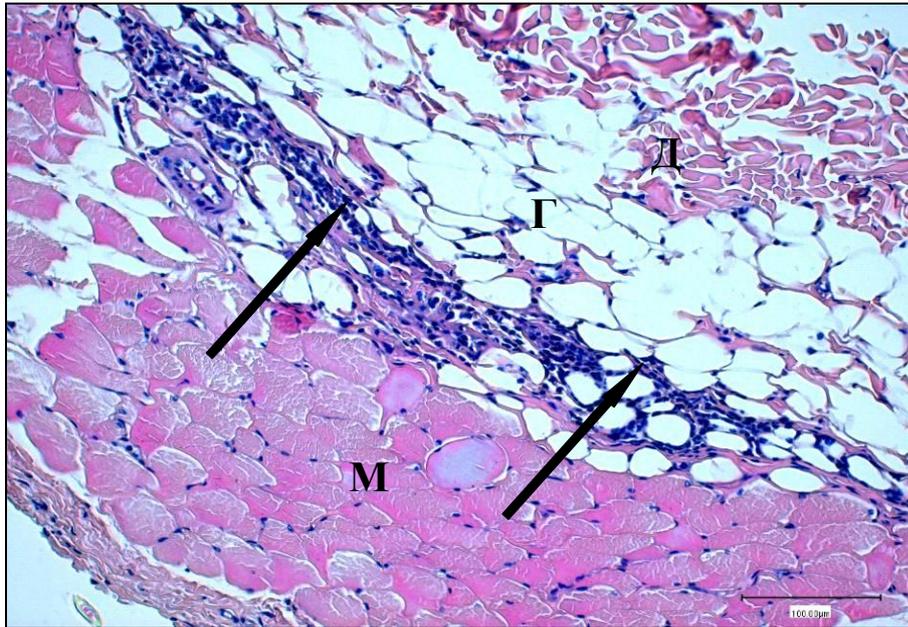


Рисунок 5 – Слабо выраженная клеточная реакция в фасциальной прослойке (↑) кожи крысы опытной группы на 2-е сутки после внутридермального введения препарата. Д – дермальный слой; Г – гиподерма; М – мышечная ткань. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x200

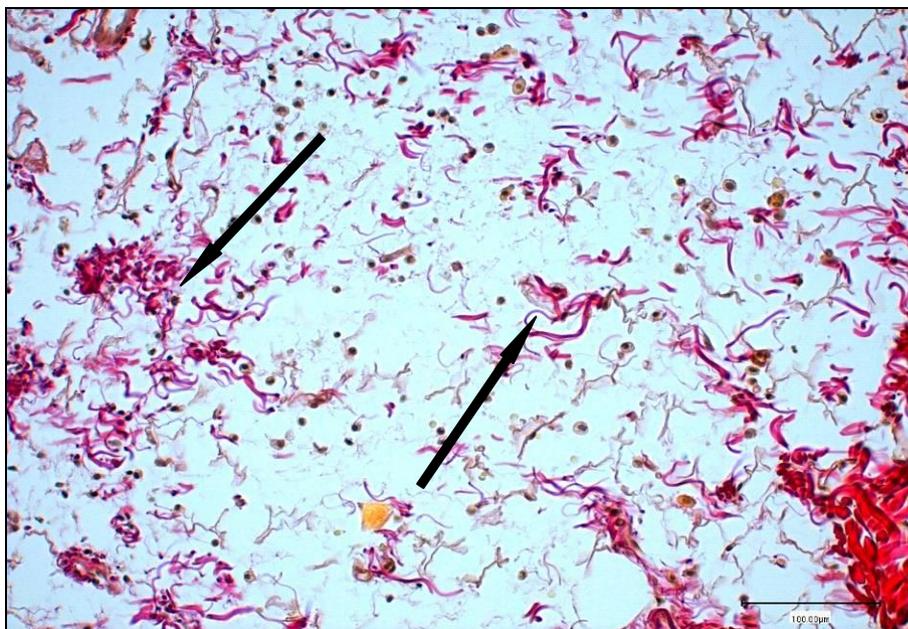


Рисунок 6 – Тонкие волокна препарата коллагена (↑) и клеточные элементы в отечной жидкости в гиподерме на 2-е сутки после внутридермального введения препарата. Окраска по Ван-Гизону. Увеличение x200

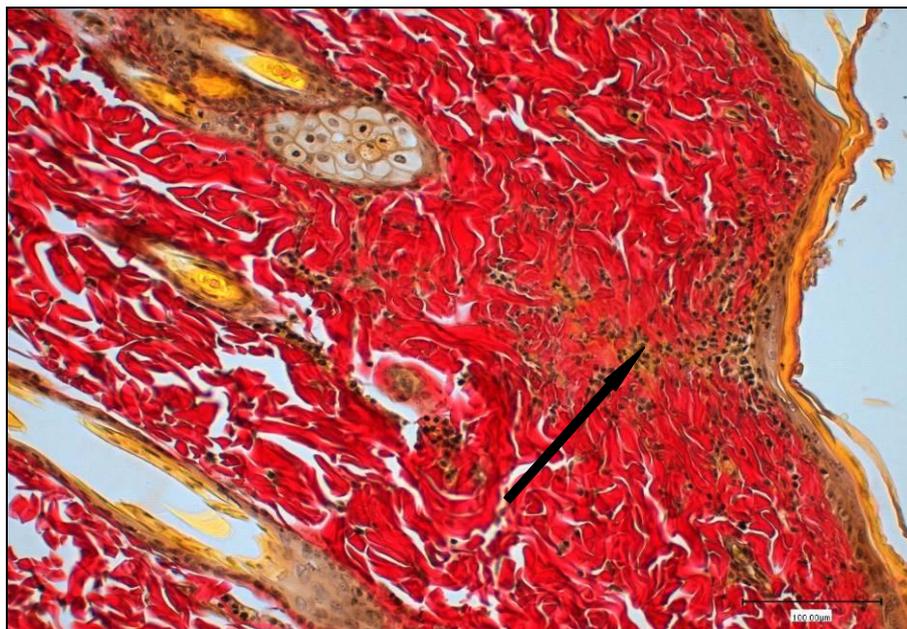


Рисунок 7 – Структура кожи крыс контрольной группы на 4-е сутки после внутридермального введения раствора глюкозы. Слабо выраженные клеточные инфильтраты (↑) по ходу вкола инъекционной иглы. Окраска по Ван-Гизону. Увеличение x100

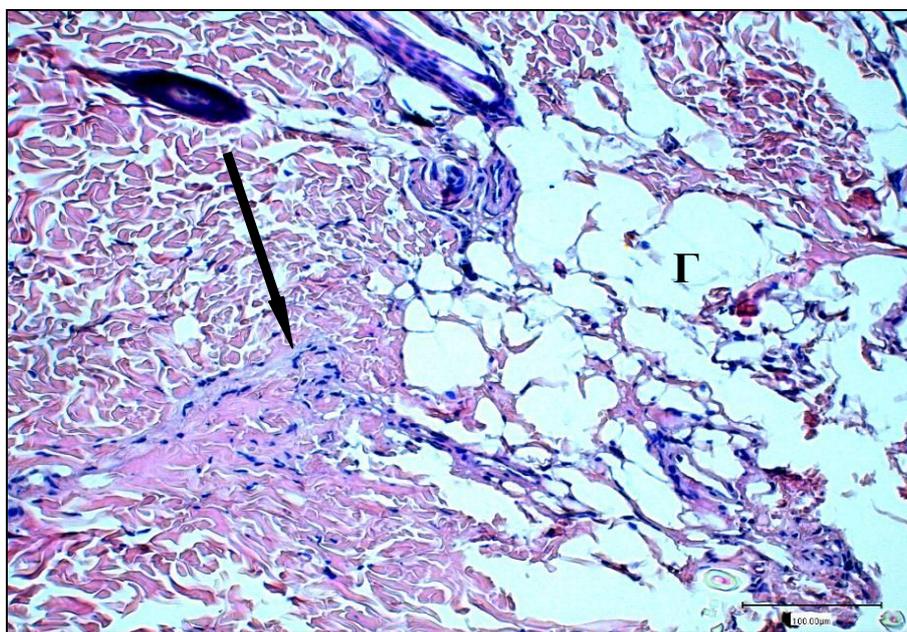


Рисунок 8 – Структура кожи крысы контрольной группы на 4-е сутки после внутридермального введения раствора глюкозы. Клеточные инфильтраты (↑) по ходу вкола инъекционной иглы. Отек гиподермы (Г). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x100

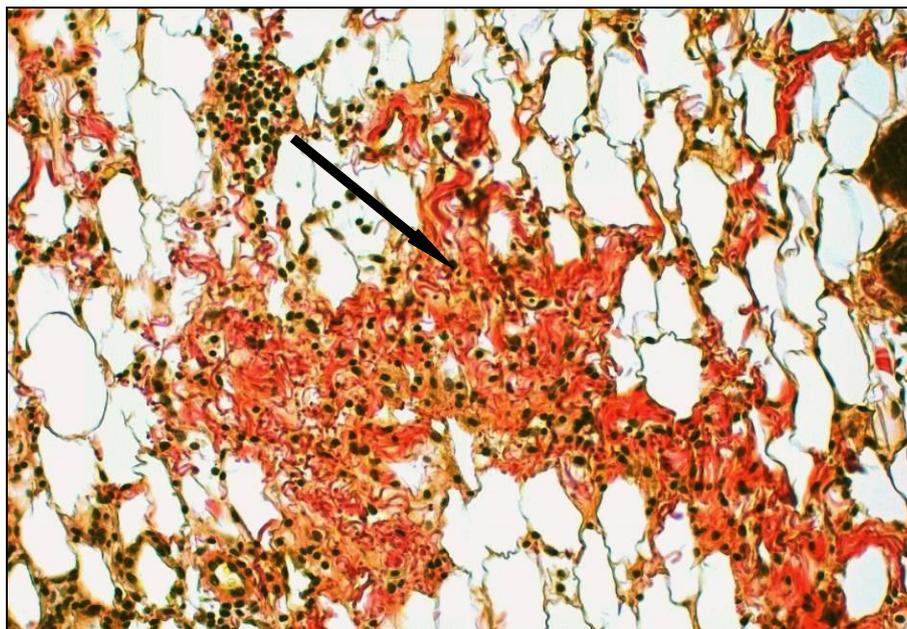


Рисунок 9 – Пикринофилия (желтое окрашивание) волокон экзогенного коллагена (↑) на 4-е сутки в гиподерме после внутридермального введения препарата. Окраска по Ван-Гизону. Увеличение x200

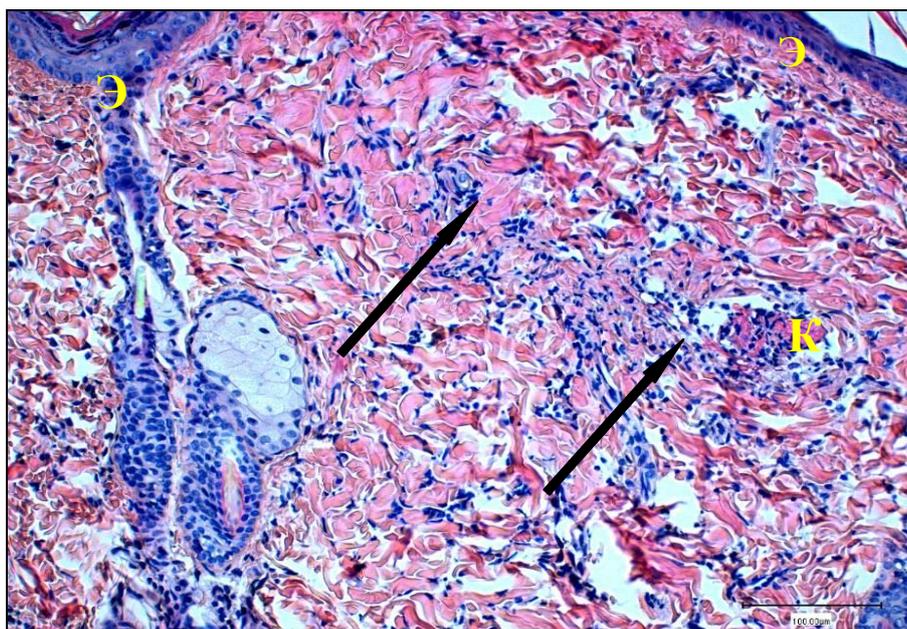


Рисунок 10 – Усиление клеточной реакции (↑) в дермальной пластинке кожи в зоне введения препарата на 4-е сутки. Э – эпидермис; К – «Коллост». Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x100

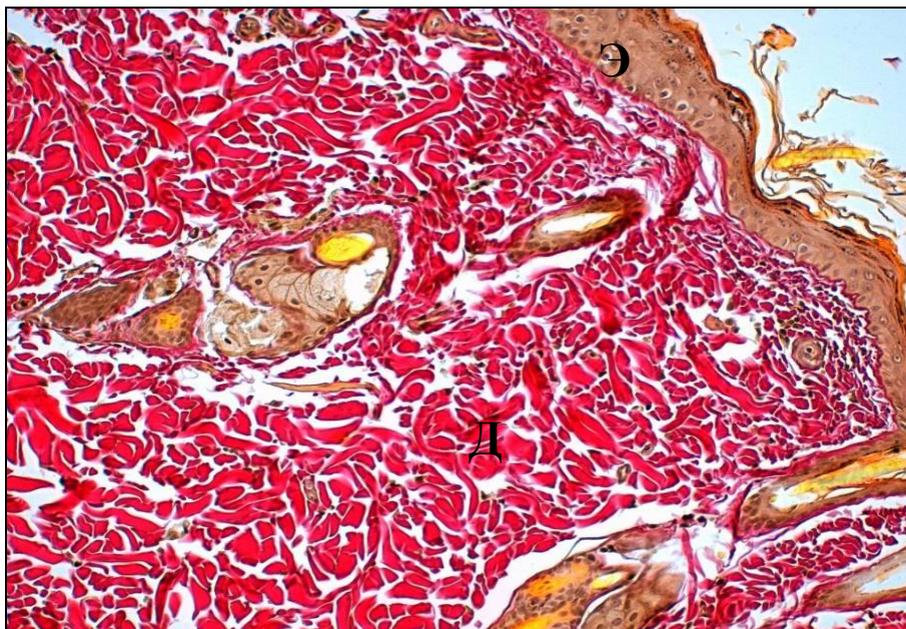


Рисунок 11 – Структура кожи крысы контрольной группы на 7-е сутки после внутридермального введения раствора глюкозы. Э – эпидермис; Д – дерма.

Окраска по Ван-Гизону. Увеличение x100

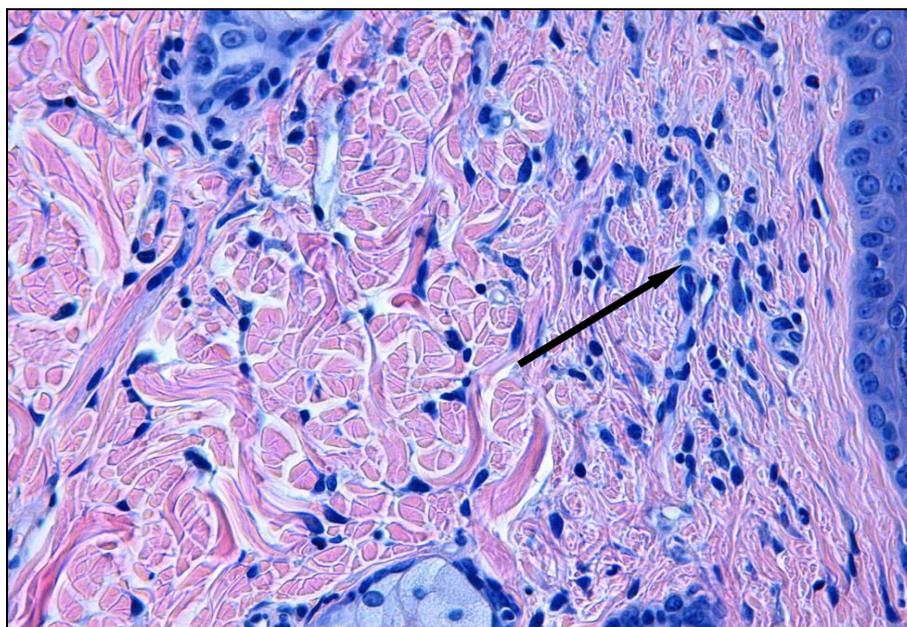


Рисунок 12 – Усиление клеточной реакции (↑) в дермальной пластинке кожи в зоне введения коллагеносодержащего препарата на 7-е сутки. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x400

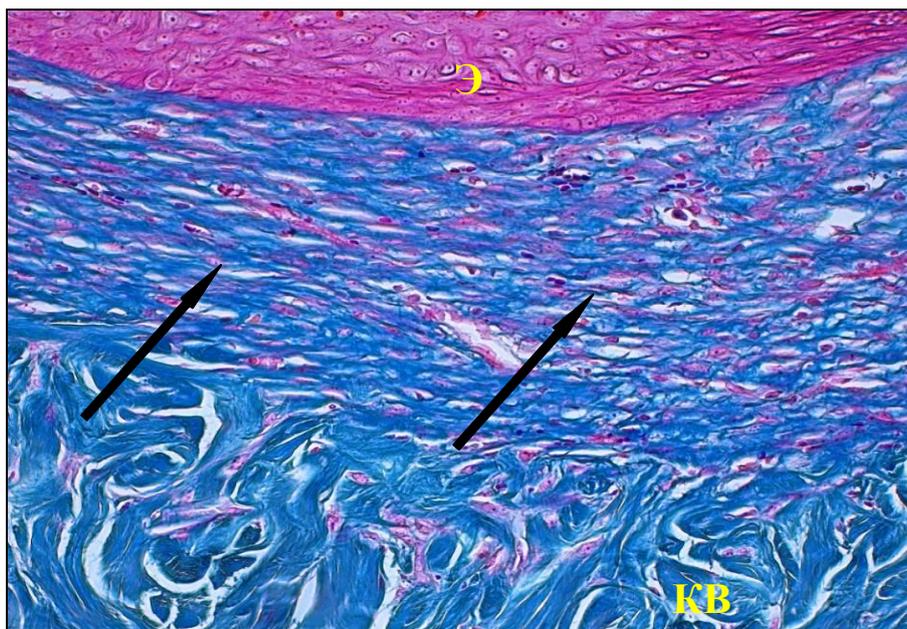


Рисунок 13 – Тонкие новообразованные коллагеновые волокна (↑) под эпидермисом (Э) на 7-е сутки после внутридермального введения препарата коллагена КВ – зрелые коллагеновые волокна. Окраска по Маллори. Увеличение x400



Рисунок 14 – Новообразованные незрелые коллагеновые волокна (↑) черного цвета под эпидермисом (Э) на 7-е сутки после внутридермального введения препарата. КВ – зрелые коллагеновые волокна. Импрегнация по Футу. Увеличение x400

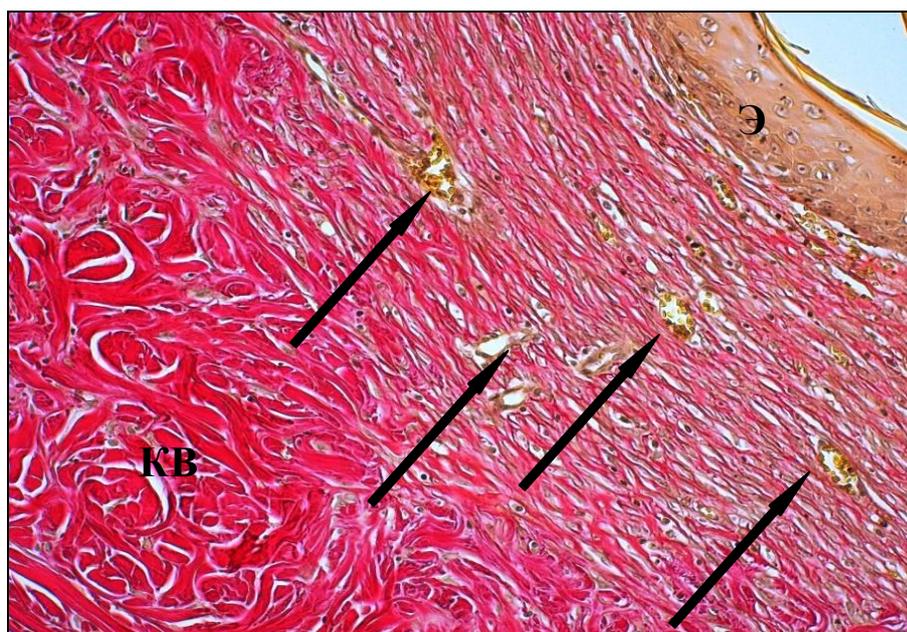


Рисунок 15 – Новообразованные коллагеновые волокна под эпидермисом (Э) на 7-е сутки после внутридермального введения коллагеносодержащего препарата. Новообразованные мелкие кровеносные сосуды (↑). КВ – зрелые коллагеновые волокна. Окраска по Ван-Гизону. Увеличение x200

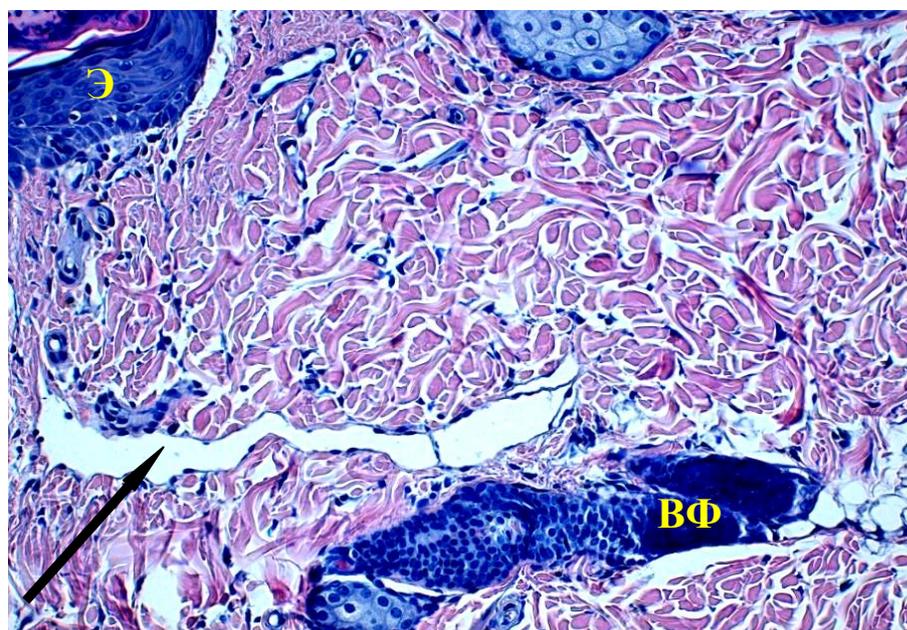


Рисунок 16 – Расширение лимфатического сосуда (↑) в дермальной пластинке кожи в зоне введения препарата на 7-е сутки. Э – эпидермис; ВФ – волосяные фолликулы. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x200

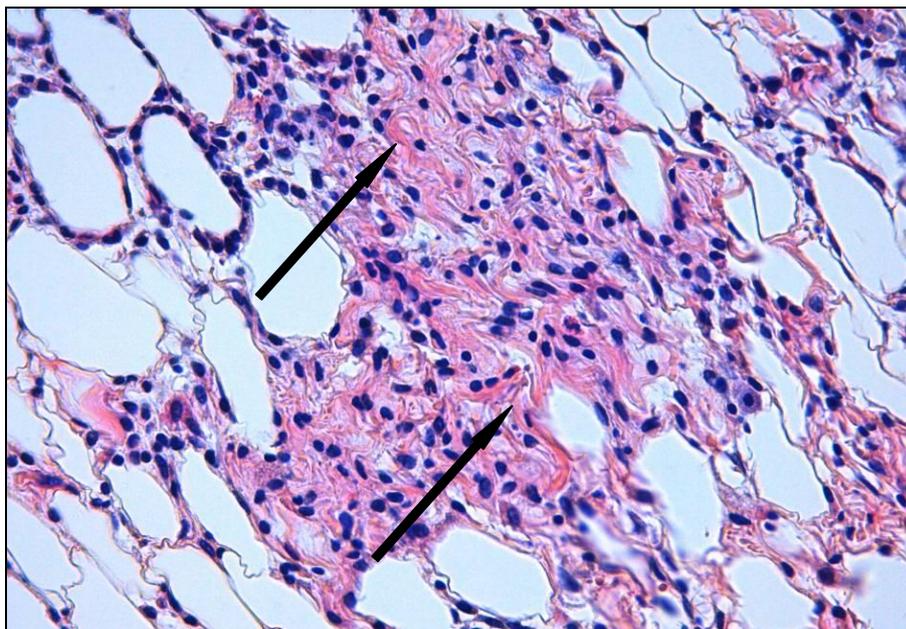


Рисунок 17 – Новообразованные коллагеновые фибриллы (↑) между волокнами препарата коллагена и инфильтрирующими их клетками в гиподерме после введения препарата на 7-е сутки. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x400

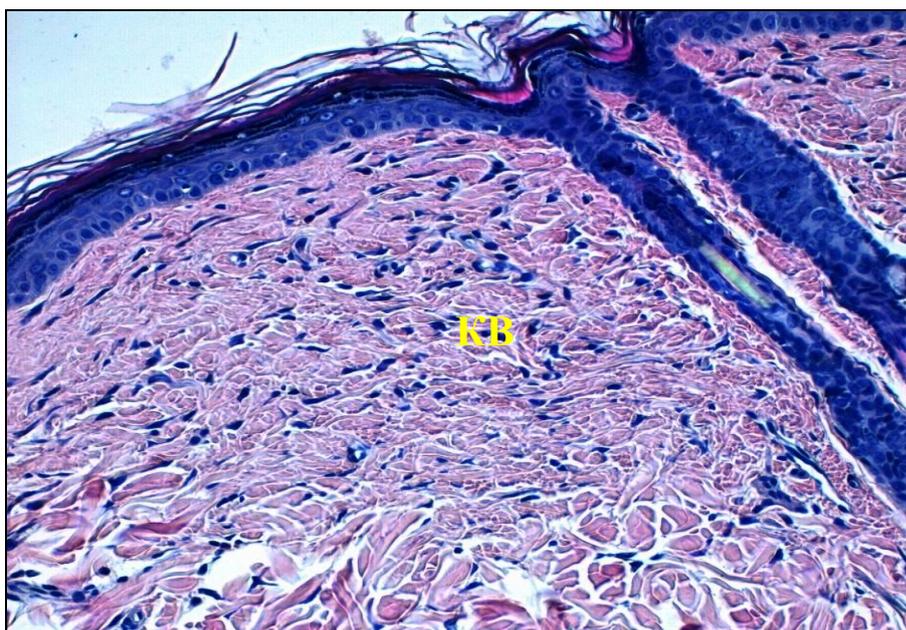


Рисунок 18 – Утолщение коллагеновых волокон (KB) в зоне регенерации дермальной пластинки на 21-е сутки после введения препарата коллагена. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x200

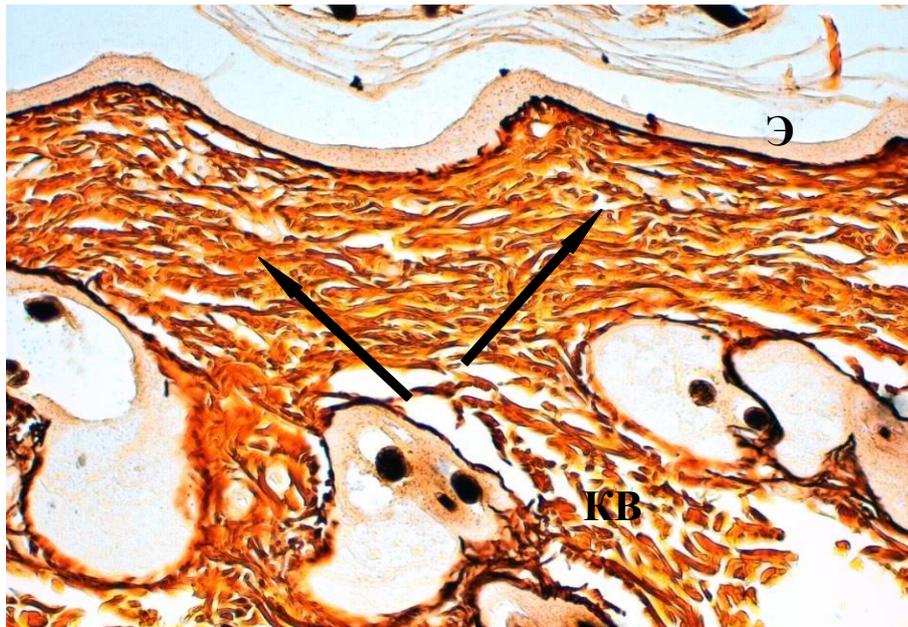


Рисунок 19 – Новообразованные коллагеновые пучки (↑) желто-коричневого цвета под эпидермисом (Э) на 21-е сутки после внутридермального введения препарата коллагена. КВ – зрелые коллагеновые волокна. Импрегнация по Футу. Увеличение x400

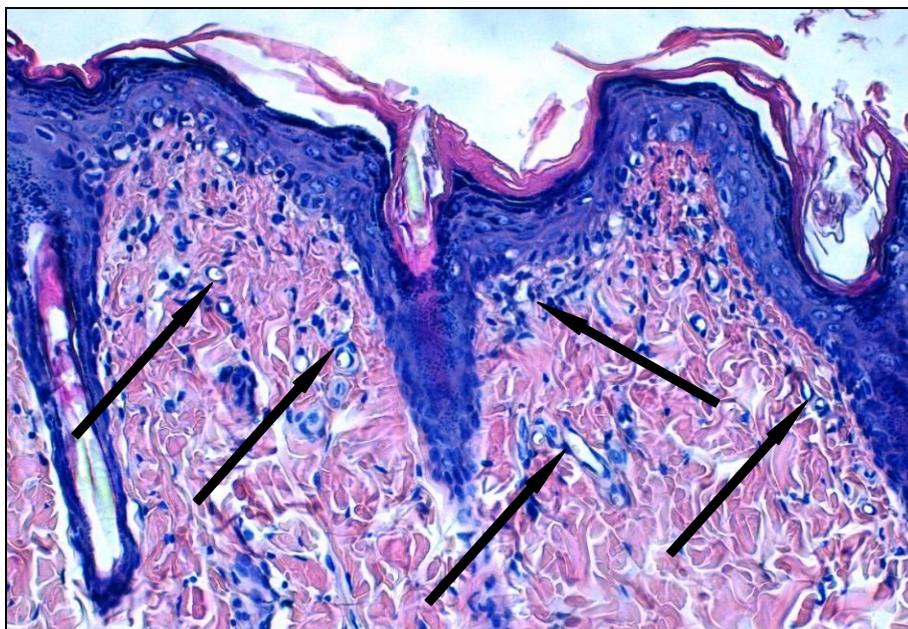


Рисунок 20 – Множество новообразованных мелких капилляров (↑) в дермальной пластинке кожи в зоне введения препарата коллагена на 21-е сутки. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x200

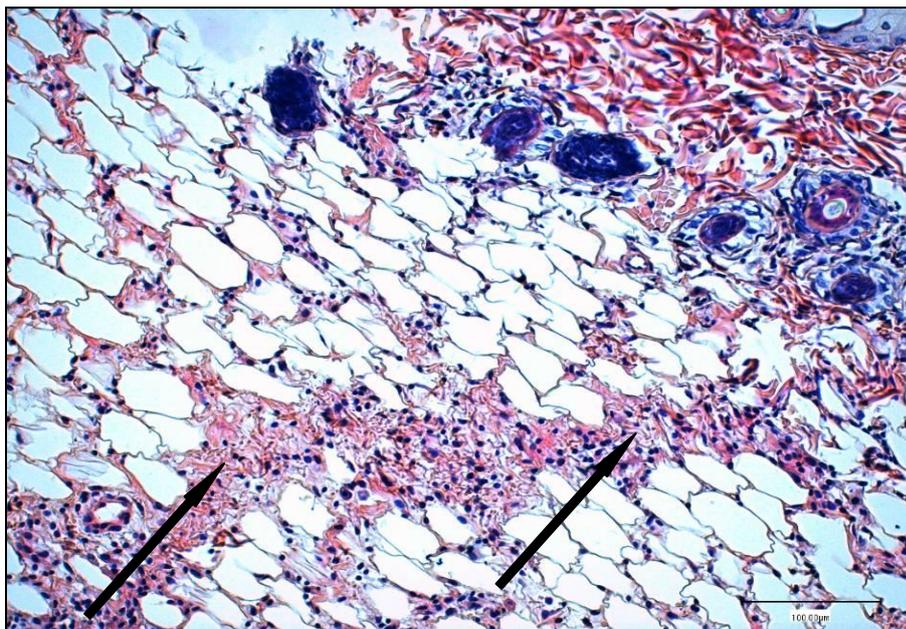


Рисунок 21 – Замещение волокнистых элементов препарата экзогенного коллагена типа I в гиподерме прослойками васкуляризированной рыхлой соединительной ткани (↑) в дермальной пластинке кожи на 21-е сутки. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x200

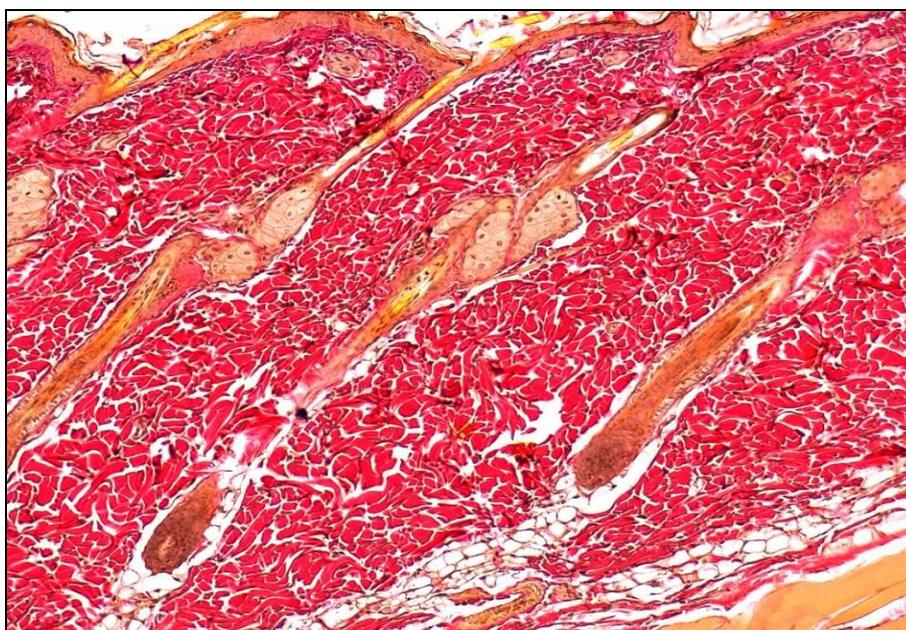


Рисунок 22 – Структура кожи крысы опытной группы на 37-е сутки после внутридермального введения препарата коллагена. Окраска по Ван-Гизону. Увеличение x400

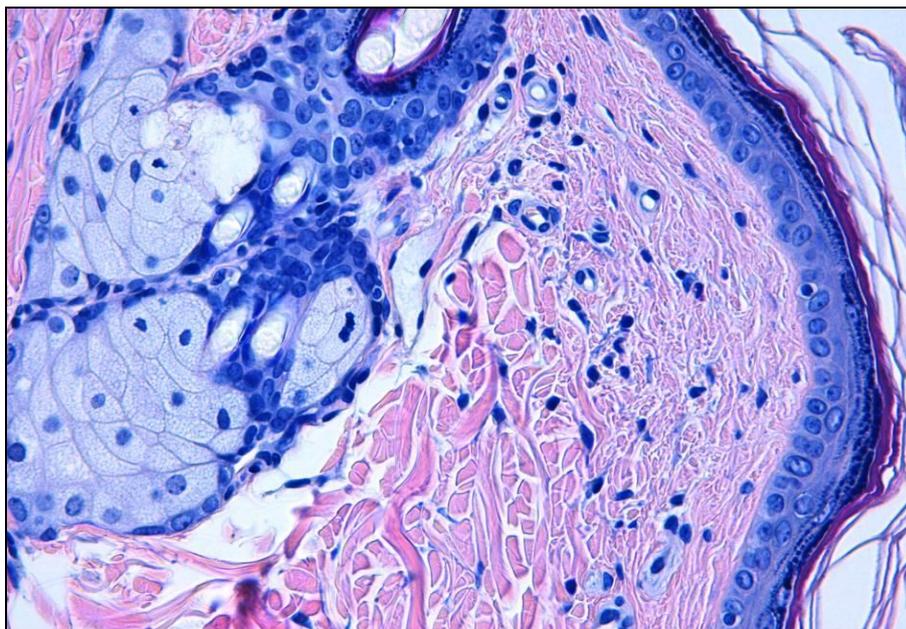


Рисунок 23 – Структура кожи крысы опытной после введения коллагеносодержащего препарата на 37-е сутки после. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x400

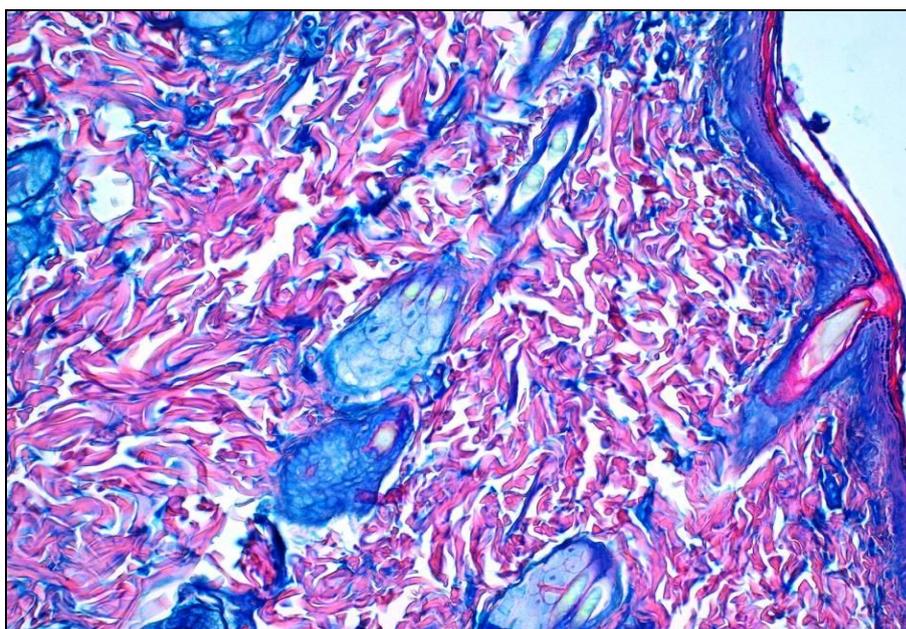


Рисунок 24 – Слабо положительная реакция на гликозаминогликаны между коллагеновыми волокнами в виде синего окрашивания на 2-е сутки после введения раствора глюкозы. Реакция по Хейлу. Увеличение x200

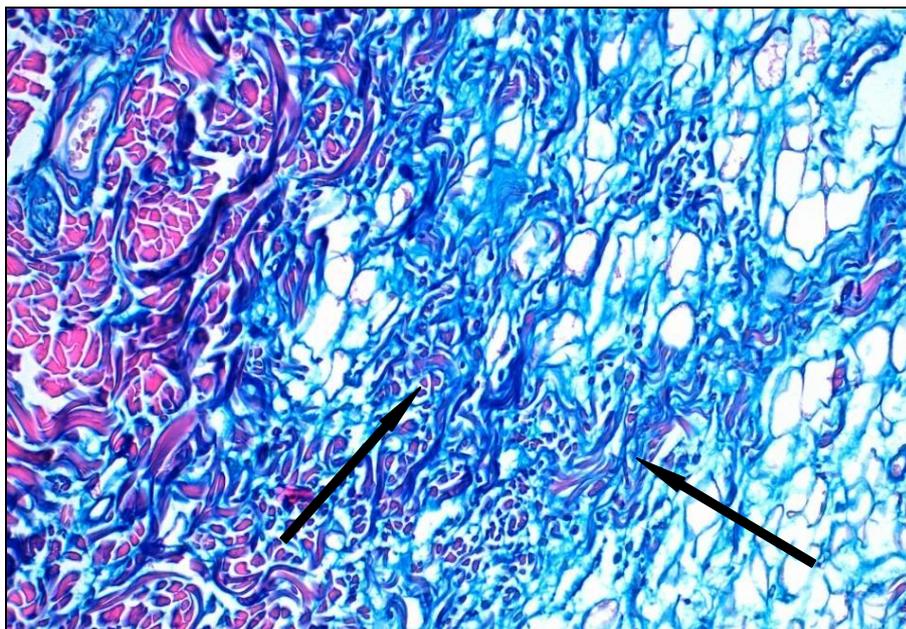


Рисунок 25 – Выявление гликозаминогликанов (↑) в зоне резорбции волокнистых структур на 4-е сутки после введения препарата. Реакция по Хейлу. Увеличение x200

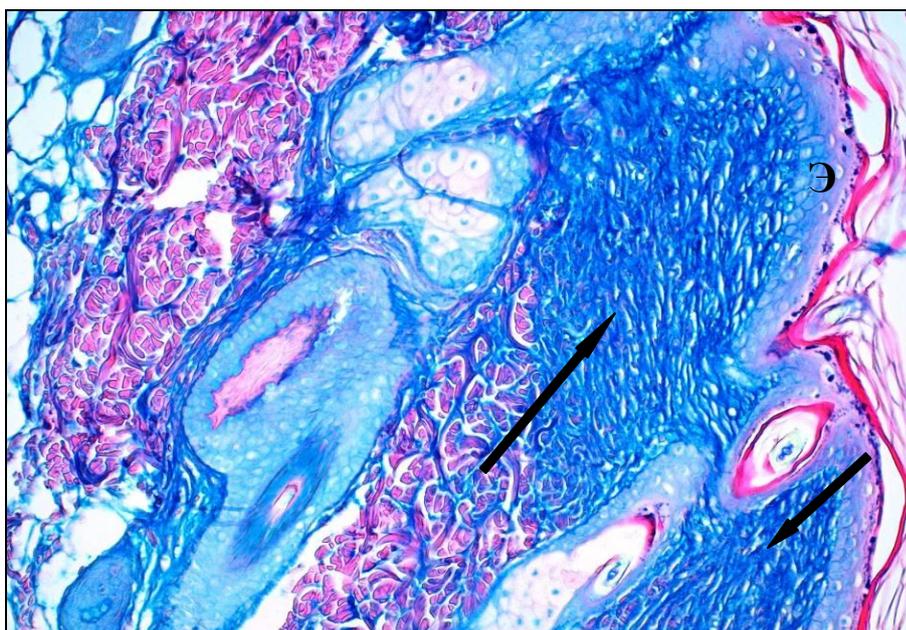


Рисунок 26 - Выявление гликозаминогликанов (↑) в виде синего окрашивания в грануляционной ткани под эпидермисом (Э) на 7 сутки после введения препарата коллагена. Реакция по Хейлу. Увеличение x100

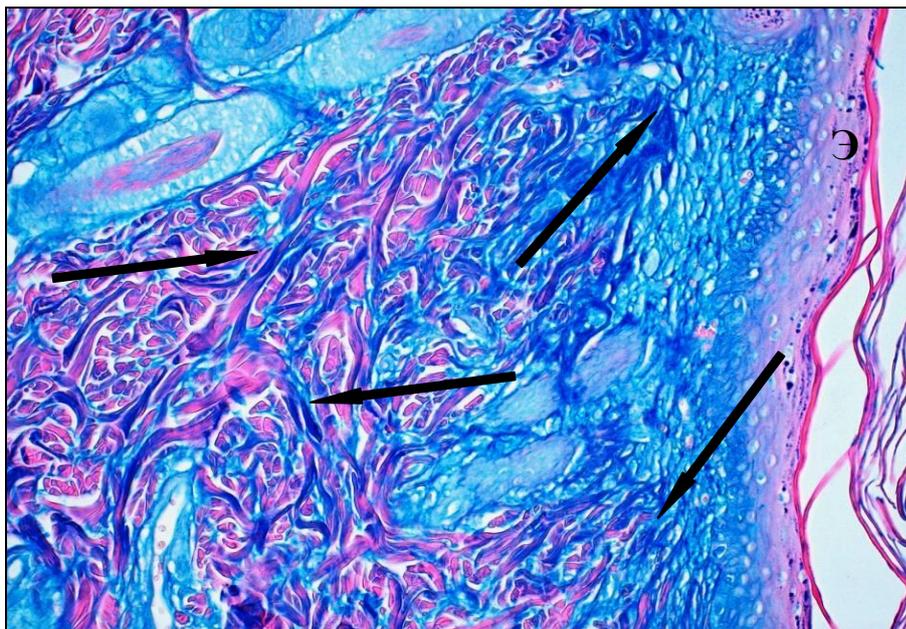


Рисунок 27 – Выявление гликозаминогликанов (↑) в виде синего окрашивания в грануляционной ткани под эпидермисом (Э) на 21-е сутки после введения препарата коллагена. Реакция по Хейлу. Увеличение x200

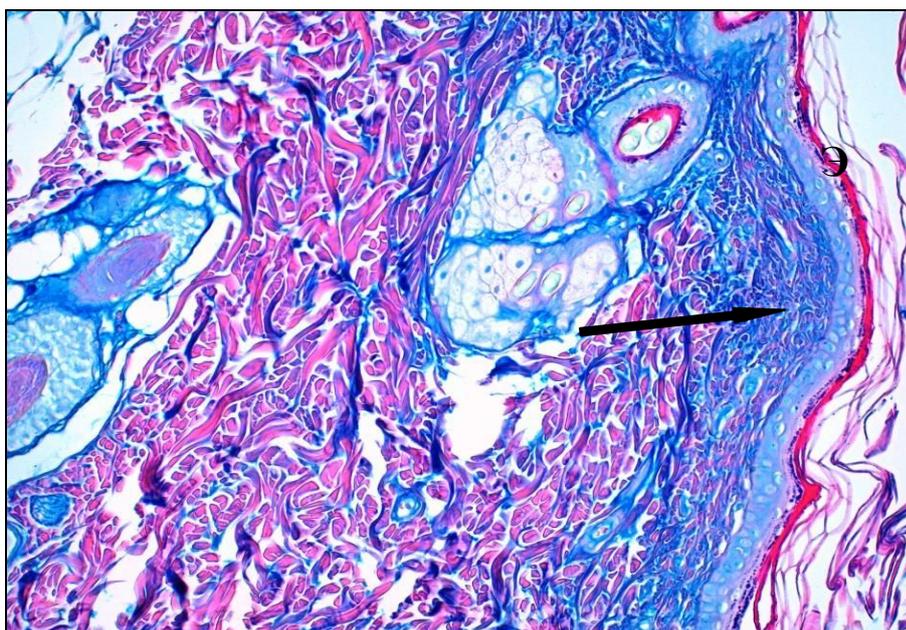


Рисунок 28 – Выявление гликозаминогликанов (↑) в виде синего окрашивания в дермальной пластинке под эпидермисом (Э) на 37-е сутки после введения препарата коллагена. Реакция по Хейлу. Увеличение x100

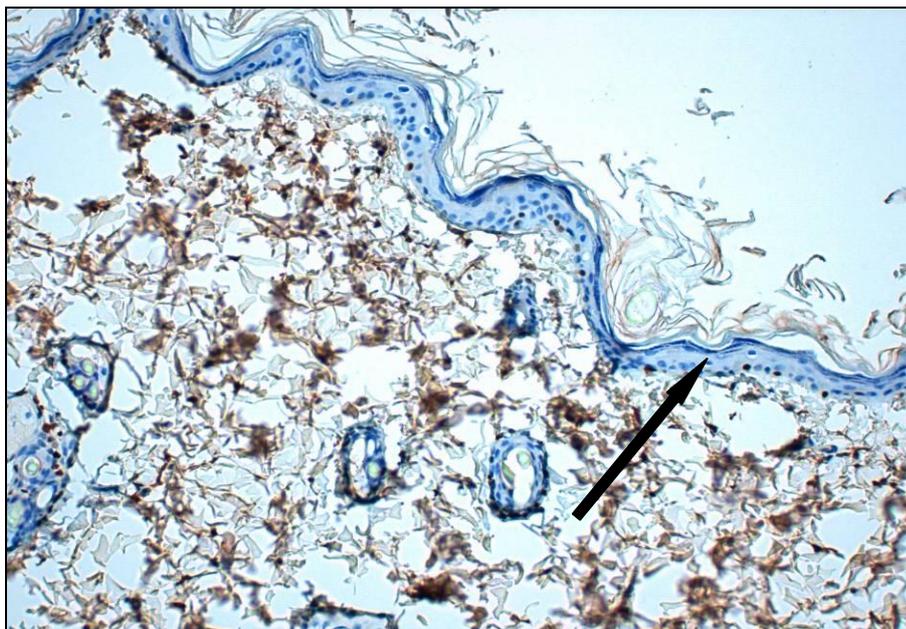


Рисунок 29 – Выявление белка Ki-67 (↑) в ядрах пролиферирующих клеток (коричневое окрашивание) в коже крыс на 7-е сутки после введения раствора глюкозы. Докраска гематоксилином. Увеличение x100

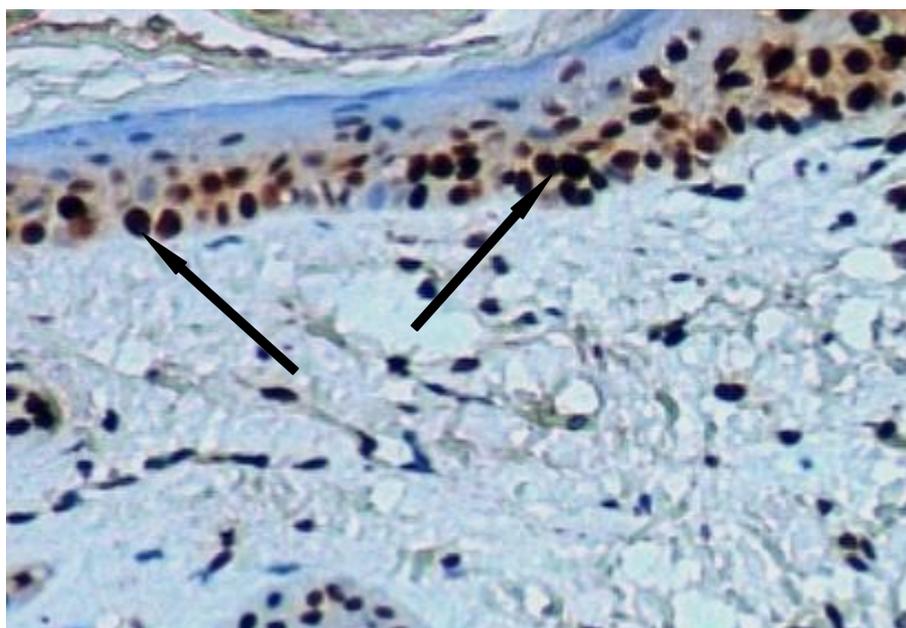


Рисунок 30 – Белок Ki-67 (↑) в ядрах пролиферирующих клеток (коричневое окрашивание) в коже крыс на 4-е сутки после введения препарата коллагена. Докраска гематоксилином. Увеличение x400

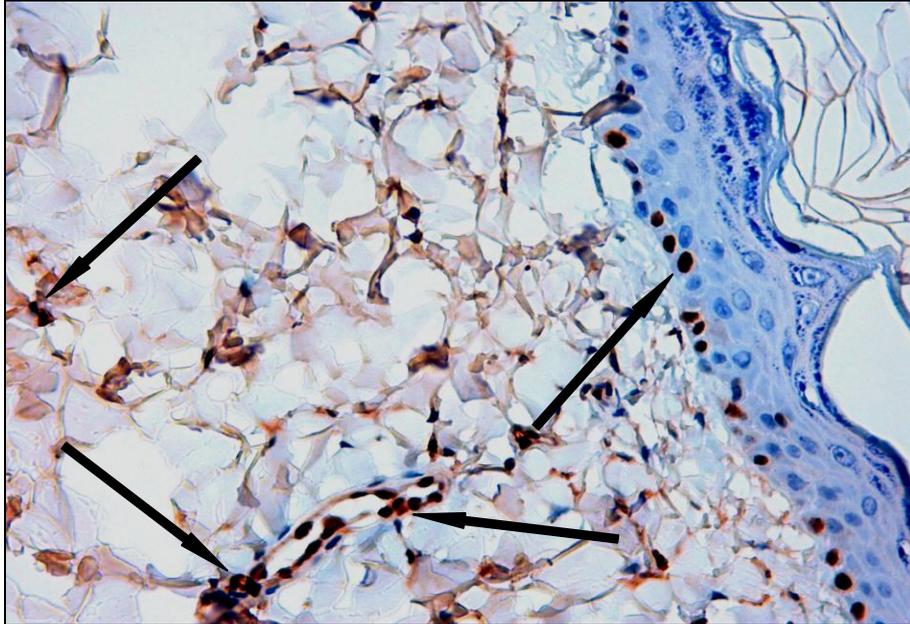


Рисунок 31 – Белок Ki-67 (↑) в ядрах пролиферирующих клеток (коричневое окрашивание) в коже крыс на 7-е сутки после введения препарата коллагена типа I. Докраска гематоксилином. Увеличение x400

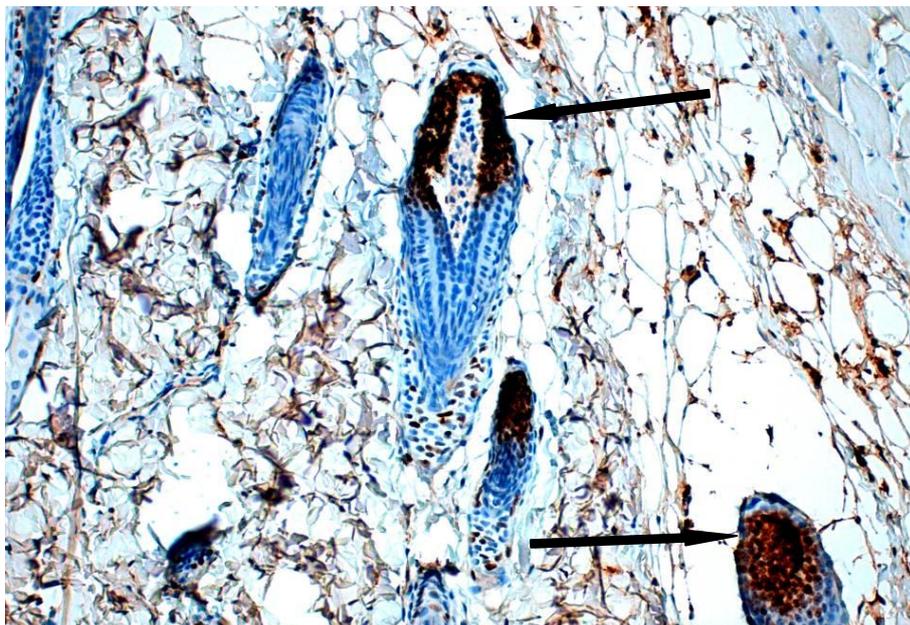


Рисунок 32 – Иммуногистохимическое выявление белка Ki-67 (↑) в ядрах пролиферирующих клеток (коричневое окрашивание) в корневом влагалище волосяных луковиц на 7 сутки после введения коллагенсодержащего препарата. Докраска гематоксилином. Увеличение x400

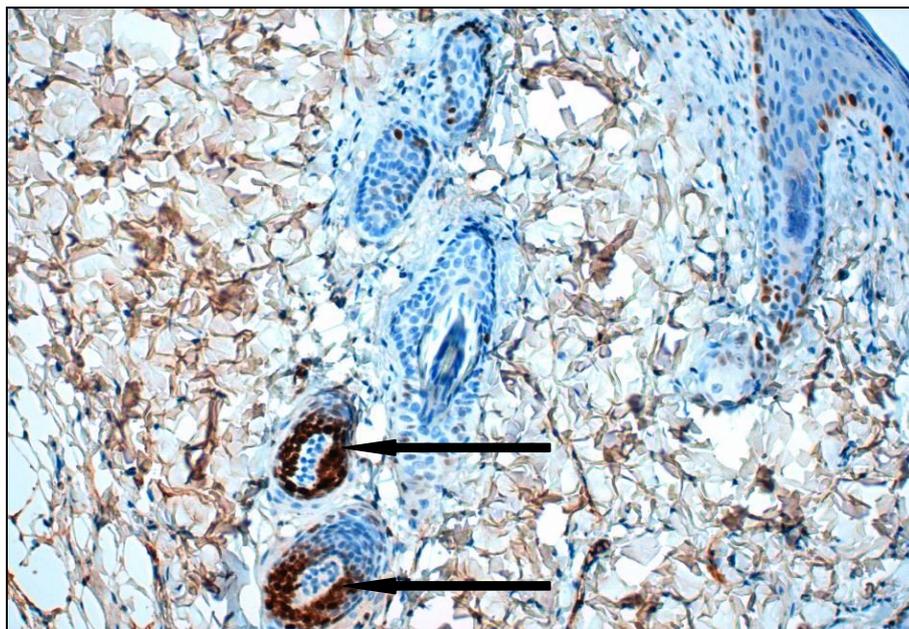


Рисунок 33 – Иммуногистохимическое выявление белка Ki-67 (↑) в ядрах пролиферирующих клеток (коричневое окрашивание) в коже крыс на 21-е сутки после введения препарата коллагена. Докраска гематоксилином. Увеличение x400

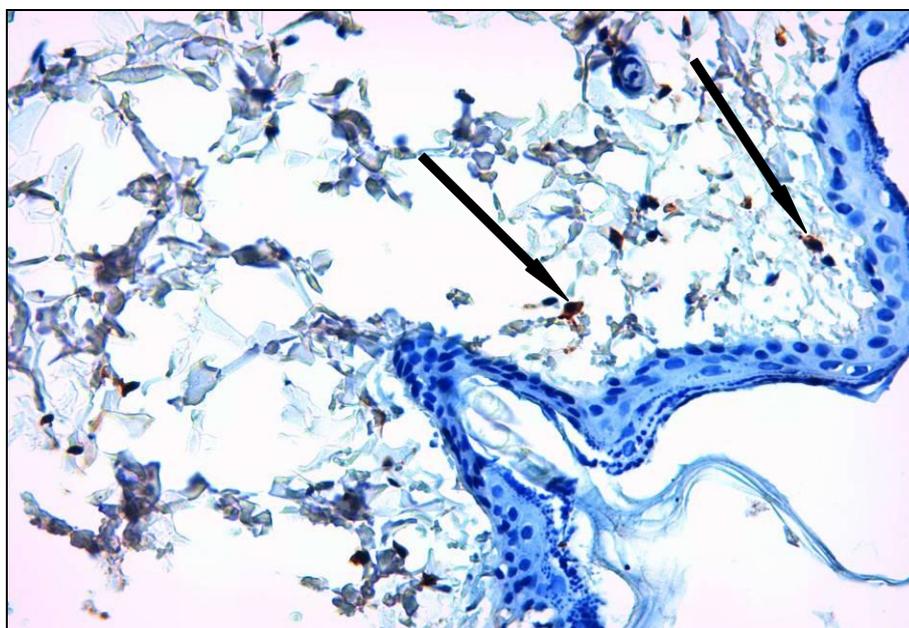


Рисунок 34 – Выявление белка ФРФ-1 (↑) в цитоплазме клеток (коричневое окрашивание) на 7 сутки после введения раствора глюкозы. Докраска гематоксилином. Увеличение x100

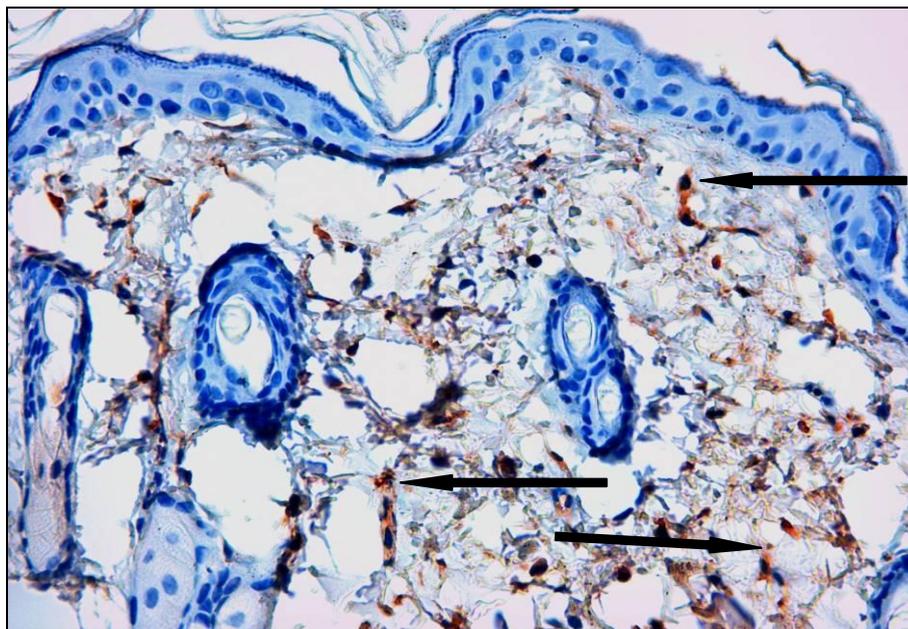


Рисунок 35 – Иммуногистохимическое выявление цитокина ФРФ-1 (↑) в клетках (коричневое окрашивание) сосочкового и сетчатого слоев кожи крыс на 4-е сутки после введения препарата коллагена. Докраска гематоксилином. Увеличение x400

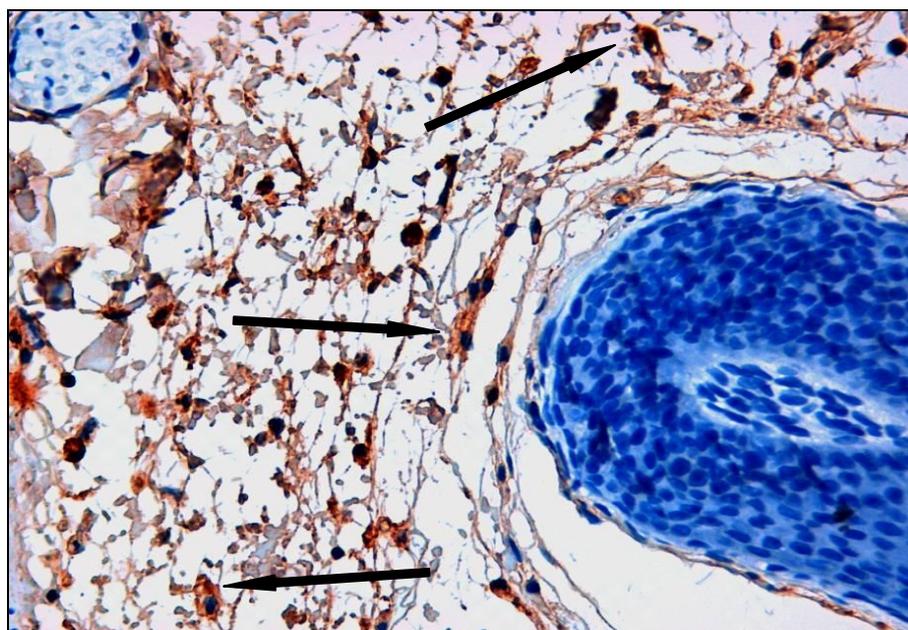


Рисунок 36 – Иммуногистохимическое выявление цитокина ФРФ-1 (↑) в клетках (коричневое окрашивание) дермальной пластинки кожи крыс на 7-е сутки после введения коллагенсодержащего препарата. Докраска гематоксилином. Увеличение x400

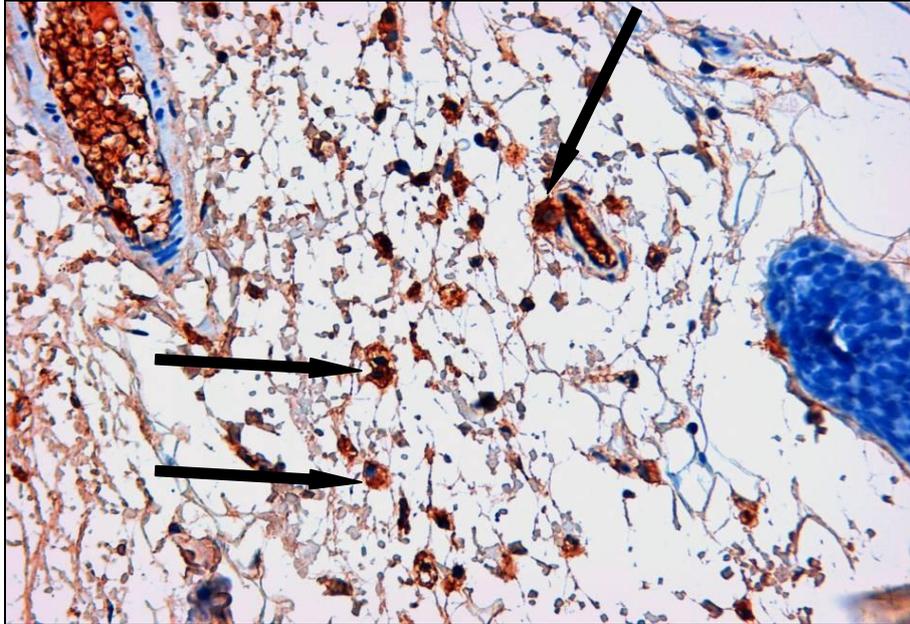


Рисунок 37 – Иммуногистохимическое выявление цитокина ФРФ-1 в клетках (коричневое окрашивание) кожи крыс на 7-е сутки после введения препарата коллагена. Макрофаги, экспрессирующие ФРФ-1 (↑). Докраска гематоксилином. Увеличение x400