

## ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ НЕКОТОРЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ ВНУТРИДЕРМАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ НАТИВНОЙ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ЖИВОТНЫМ

Галеева А.Г.<sup>1</sup>, Капулер О.М.<sup>2</sup>, Камилев Ф.Х.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Министерства здравоохранения Российской Федерации «Башкирский государственный медицинский университет», Уфа, e-mail: galeevmt@mail.ru;

<sup>2</sup>ЗАО «Косметологическая лечебница», Уфа

При интродермальном курсовом введении препарата нативной высокомолекулярной гиалуроновой кислоты (мол. масса 1 млн Да) методом мезотерапии изучена динамика изменений содержания в сыворотке крови самок белых крыс зрелого возраста (11-12 месяцев) интерлейкина – 1 бета (IL-1 $\beta$ ), фактора некроза опухолей – альфа (TNF- $\alpha$ ), инсулиноподобного ростового фактора – 1 (IGF-1) и трансформирующего ростового фактора – бета 1 (TGF- $\beta$ 1). Установлено, что в первые дни непосредственно после инъекций наблюдается повышение уровней IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , и TGF- $\beta$ 1, что может отражать воспалительную ответную реакцию тканей кожи на процедуру введения. В более отдаленные сроки эксперимента через 2-4 недели после завершения инъекций препарата уровень провоспалительных цитокинов снижается, увеличивается содержание IGF-1, а TGF- $\beta$ 1 сохраняется повышенной, характеризуя усиление процессов пролиферации и активации биосинтетических процессов в области введения гиалуроновой кислоты.

Ключевые слова: гиалуроновая кислота; интродермальное введение; интерлейкин - 1 $\beta$ ; фактор некроза опухолей –  $\alpha$ ; инсулиноподобный ростовой фактор – 1; трансформирующий ростовой фактор –  $\beta$ 1.

## MAINTENANCE DYNAMICS OF SOME CYTOKINE AT INTRADERMAL ADMINISTRATION OF NATIVE HIGH-MOLECULAR HYALURONIC ACID TO EXPERIMENTAL ANIMAL

Galeeva A.G.<sup>1</sup>, Kapuler O.M.<sup>2</sup>, Kamilov F.H.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>State Federal-Funded Educational Institution of Higher Professional Training of the Ministry of Health of the Russian Federation, "Bashkir State Medical University", Ufa, e-mail: galeevmt@mail.ru;

<sup>2</sup>ZAO Kosmetologicheskaya lechebnitsa, Ufa

At intradermal course administration of medicine of native high-molecular hyaluronic acid (a mol.mass of 1 million.da) the method of a mesotherapy has studied dynamics of changes of content in serum of blood of females of white rats of mature age (11-12 months) of interleukine – 1 beta (IL-1 $\beta$ ), a factor of a necrosis of tumors – an alpha (TNF- $\alpha$ ), an insulinlike growth factor – 1 (IGF-1) and the transforming growth factor – a beta 1 (TGF- $\beta$ 1). It is established that in the first days directly after injections increase in the IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  levels, and TGF- $\beta$ 1 is observed that can reflect inflammatory response of tissues of skin to the procedure of introduction. In more remote terms of an experiment in 2-4 weeks after end of injections of medicine the level of pro-inflammatory cytokine decreases, increases the maintenance of IGF-1, and TGF- $\beta$ 1 remains raised, characterizing strengthening of processes of proliferation and activation of biosynthetic processes in the field of hyaluronic acid introduction.

Keywords: Hyaluronic acid; intradermal introduction; Interleukine - 1 $\beta$ ; a factor of a necrosis of tumors –  $\alpha$ ; insulinlike growth a factor – 1; transforming growth a factor –  $\beta$ 1.

Старение – закономерный биологический процесс, сопровождающийся сложными метаболическими, функциональными и структурными изменениями, характеризующийся неуклонным прогрессирующим и затрагивающий все уровни биологической организации. Процесс старения нарастает во времени и сопровождается формированием сцепленных с ним болезней и увеличением вероятности смерти. Эти изменения у лиц одного и того же возраста имеют существенные, индивидуальные различия, связанные с особенностями генетического

аппарата и его фенотипической реализацией, своеобразием биохимического гомеостаза и нейроэндокринной регуляции, образом жизни, физической активностью, вредными привычками, стрессами, условиями окружающей среды и др.

Население большинства стран Земли быстро стареет: в 1950 г. в возрасте старше 60 лет было лишь 8% мирового населения, в 2000 г. – 10%, а к 2050 г., согласно прогнозу ООН, будет 21% [1], и к настоящему времени становится важным не только продолжительность жизни, но и её качество. Особое влияние на качество жизни оказывает состояние кожи. В отличие от внутренних органов, инволюционные изменения которых происходят достаточно скрытно, возрастные изменения кожи человека обнаруживаются относительно рано. С возрастом кожа дрябнет, она истончается, становится сухой, тусклой, снижаются её тургор и эластичность, появляются морщины, пигментация и другие изменения.

В дерме наблюдается снижение васкуляризации уровня прогениторных мезенхимальных стволовых клеток, что приводит к уменьшению численности биосинтетически активных фибробластов [2]. Как результат понижается продукция таких структурных компонентов внеклеточного матрикса, как гиалуроновая кислота, протеогликаны и фибриллярные белки, необходимых для поддержания тургора, упругости, эластичности, микрорельефа кожи и её устойчивости к возрастным изменениям. В возрастных изменениях кожи особое внимание привлекает гиалуронан, количество которого в стареющей коже уменьшается [3]. Гиалуронан, благодаря особенностям структуры, связывает воду в межклеточном пространстве, формируя высокогидрофильную среду, определяя тургор, влажность и тонус кожи, обеспечивая диффузию нутриентов и кислорода из дермы в эпидермис [4; 5].

Уникальные физико-химические свойства гиалуроновой кислоты, её биологические функции, биосовместимость и способность взаимодействовать с другими компонентами экстрацеллюлярного матрикса, фибробластами привлекли внимание к возможности использования для коррекции возрастных изменений кожи. Гиалуроновая кислота в дерме не только определяет ряд биомеханических характеристик кожи, но участвует в процессах регуляции деления, дифференцировки, миграции, апоптоза клеток, синтеза и секреции медиаторов воспаления, защиты от окислительного повреждения [4-6]. Не случайно инъекционные и косметические средства на основе гиалуроновой кислоты нашли широкое применение в эстетической медицине. Однако значительный практический опыт их применения основан на констатации визуализируемых изменений кожи, и биохимические механизмы действия препаратов на основе гиалуронана требуют дальнейших исследований.

### **Цель исследования**

Определить динамику изменений интерлейкина – 1 бета, фактора некроза опухолей – альфа, инсулиноподобного ростового фактора 1 и трансформирующего ростового фактора – бета 1 в сыворотке крови при внутридермальном введении экспериментальным животным зрелого возраста нативного высокомолекулярного гиалуронана.

### **Материал и методы исследования**

Исследования проведены на 72 самках белых крыс зрелого возраста (11-12 месяцев) массой 280-320 г с соблюдением международных требований этических норм и рекомендаций по гуманному отношению к животным, используемым в экспериментальных и других научных целях. Крысам опытной группы под лёгким эфирным наркозом вводили препарат Juvederm Hydrate™ (Франция), содержащий 13,5 мг геля гиалуроновой кислоты молекулярной массы 1 млн дальтон и 9 мг маннитола в 1 мл фосфатного буфера pH 7,4, из расчета 0,06 мг на 100 г массы тела. Контрольной группе крыс вводили стерильный физиологический раствор хлористого натрия. Инъекции проводили внутридермально техникой мезотерапии на боковые поверхности туловища (площадь 3x3 см) после удаления шерстяного покрова трижды на 1, 3 и 6-е сутки эксперимента. Животных на 2, 4, 7, 21 и 37-е сутки после первой инъекции выводили из опыта декапитацией под лёгким эфирным наркозом. В сыворотке крови определяли содержание интерлейкина – 1 –бета (IL-1 $\beta$ ), фактора некроза опухолей – альфа (TNF- $\alpha$ ) с использованием наборов реагентов «ИФА-ИЛ-1  $\beta$ » и «ИФА-ФНО-альфа» ТОО «Протеиновый контур», а также инсулиноподобного ростового фактора 1 (IGF -1) – реагенты IGF ELISA (Mediagnost), трансформирующего ростового фактора бета 1 (TGF- $\beta$ 1) – реагенты TGF- $\beta$ 1 ELISA (Affimetrix Bioscience), методом твердофазного иммуноферментного анализа на анализаторе Stat Fox 2100 согласно протоколу производителя.

Статистическую обработку результатов осуществили с использованием пакета программы Statistica 6 for Windows с расчетом медианы, верхнего и нижнего квартилей. Межгрупповые различия показателей оценивали по U-критерию Манна-Уитни.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

Содержание определяемых в сыворотке крови животных изучаемых цитокинов представлено в таблице. Уровень провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  в первую неделю опыта на следующие дни после введения препарата гиалуроновой кислоты (2, 4 и 7-е сутки) повышался, а в более отдаленные сроки, через 2-4 недели после завершения курсовой инъекции, не отличался от контрольных значений.

Содержание цитокинов в сыворотке крови самок крыс зрелого возраста при  
внутридермальном введении препарата гиалуронана

Цитокины	Контрольная группа, n=14	Опытная группа				
		2-е сут., n=8	4-е сут., n=10	7-е сут., n=10	21-е сут., n=10	37-е сут., n=10
IL-1 $\beta$ , пг/мл	28,3 [25,6-34,3]	35,4* [30,3-47,6]	34,6* [31,0-41,4]	36,2* [28,6-45,4]	30,8 [28,6-45,4]	27,5 [22,7-29,7]
TNF- $\alpha$ , пг/мл	13,3 [10,6-17,2]	16,8* [15,4-23,6]	16,4* [114,9-25,1]	16,5* [15,0-24,1]	14,1 [11,2-18,5]	14,5 [12,3-20,4]
IGF-1, пг/мл	124 [88-153]	118 [85-136]	142 [98-152]	158 [125-164]	184* [166-188]	202* [171-223]
TGF- $\beta$ 1, пг/мл	3,25 [2,56-4,01]	4,8** [4,21-4,93]	3,95* [3,61-4,12]	4,78** [4,6-4,99]	3,99* [3,52-4,3]	4,08* [3,87-4,48]

Примечание: \* - P<0,05; \*\* - P<0,01 по сравнению с контролем.

IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  являются плейотропными медиаторами воспаления. IL-1 $\beta$  многофункциональный цитокин с широким спектром действия, играет роль в развитии и регуляции неспецифической защиты и специфического иммунитета, включается одним из первых в ответную защитную реакцию при действии стрессорных факторов. Основными продуцентами IL-1 $\beta$  являются макрофаги и моноциты, хотя может вырабатываться иммунокомпонентными, эпителиальными и эндотелиальными клетками, фибробластами и др. Клетками-мишенями являются иммунокомпетентные, эндотелиальные и эпителиальные клетки, кератиноциты, гепатоциты, фибробласты и др. Он инициирует и регулирует воспалительные и иммунные процессы, активизирует нейтрофилы, лимфоциты, стимулирует синтез провоспалительных цитокинов (IL-2,-3,-6, TNF- $\alpha$ ), молекул адгезии, простагландитов, белков острой фазы, индуцирует образование активных форм кислорода, повышает проницаемость сосудистой стенки [7-12].

Многие функции TNF- $\alpha$  идентичны функциям IL-1. Особенно интенсивно и достаточно быстро вырабатывается активированными мононуклеарными фагоцитами. Его могут продуцировать также фибробласты, дендритные клетки, тучные клетки, Т-лимфоциты, гемопоэтические и эндотелиальные клетки [13]. Он индуцирует синтез простагландина (простагландина I<sub>2</sub>), экспрессию молекул адгезии (ELAM-1, ICAM-1) и мембранно-ассоциированного IL-1, повышает секрецию IL-2, IL-6, IL-8, гранулоцито-макрофагального колонийстимулирующего фактора (GM-CSF), моноцитарного хемотоксического белка и др. [7; 14]. TNF участвует и регулирует множество биологических процессов, включая

воспалительную реакцию, пролиферацию, дифференцировку и гибель различных клеток, врожденный и приобретенный иммунитет. Рецепторы к TNF – TNFR 1/p55 и TNFR2/p75 экспрессируются большинством клеток. Связывание цитокина с рецепторами включает сигнальные каскады, ведущие к активации митогенактивируемых протеинкиназ и транскрипционных факторов, включая ядерный фактор каппа би (NFκB) активирующий протеин, которые регулируют экспрессию генов – медиаторов воспаления [15; 16], вызывает также экспрессию протоонкогенов *c-myc*, *c-fos* и *c-jun* [7]. TNF-α индуцирует поляризацию M1-фенотипа макрофагов, вырабатывающих воспалительные цитокины, простагландин, антимикробные молекулы и активные формы кислорода [17; 18]. IL-1β и TNF-α действуют синергично на фибробласты, стимулируя их пролиферацию, активируя метаболические процессы в соединительной ткани, что важно для восстановления целостности ткани после повреждений [14].

Повышение уровня IL-1β и TNF-α в первые дни после введения гиалуроновой кислоты, вероятно, связано с развитием воспалительной реакции ткани кожи на процедуру внутридермальной инъекции. При субдермальном введении экспериментальным животным нативной и модифицированных форм гиалуроновой кислоты наблюдался воспалительный ответ на повреждение, который сопровождался умеренной нейтрофильной инфильтрацией, сменяющейся в динамике на лимфоцитарно-макрофагальную [19].

Увеличение содержания TGF-β1, установленного в первые дни наших экспериментов, по всей вероятности, тоже связано с реакцией воспалительного ответа кожи на внутридермальное введение препарата гиалуроновой кислоты. TGF-β1 является членом суперсемейства трансформирующего ростового фактора, насчитывающего около 100 представителей, действует на клетки через рецепторы – серин/треонинпротеинкиназы, использует SMAD – синтез внутриклеточного распространения сигналов [20]. Он также продуцируется активированными макрофагами, T-лимфоцитами, фибробластами, фиброцитами [21]. Однако при этом TGF-β1 оказывает противовоспалительный эффект, подавляя синтез провоспалительных цитокинов и ответ лимфоцитов на действие IL-2,-4,-7, формирование цитотоксических NK-и T-клеток, снижает цитотоксическую и цитокинпродуцирующую активность моноцитов/макрофагов. TGF-β1 индуцирует макрофаги M2-фенотипа, экспрессирующие ростовые факторы и ингибиторы воспаления, необходимые для разрешения воспаления, восстановления и заживления [22]. Несмотря на плеiotропный характер эффектов, основное действие TGF-β1 направлено на стимулирование пролиферации и роста клеток.

К группе сигнальных молекул, основное действие которых направлено на стимулирование пролиферации и роста клеток, хотя также обладает плеiotропным

характером эффекта, относится IGF-1 [23]. По структуре IGF-1 близок к инсулину (43% гомологии), продуцируется гепатоцитами, клетками соединительной и других тканей (в основном под контролем гормона роста), обладает прямым эффектом *in vivo* и *in vitro*, относится к аутокринно–парокринным факторам. Своё действие оказывает через рецептор IGFR-1 и частично через рецептор инсулина IR. Его взаимодействие с рецептором, обладающим тирозинкиназной активностью, включает в дальнейшем активацию (фосфоримирование) допинг–белков нескольких путей интерцеллюлярного распространения сигналов, приводящих к стимуляции клеточной дифференцировки и пролиферации [24]. Уровень IGF-1 в сыворотке крови в первые дни эксперимента (2, 4, 7-е сутки) не подвергался статически значимым колебаниям, и повышение его содержания обнаруживалось в более отдалённые сроки – на 21-е и 37-е сутки опыта, и его увеличение может быть косвенным отражением стимуляции процессов пролиферации и роста клеток кожи в зоне введения гиалуронана.

Об этом свидетельствует и сохранение повышенного содержания в сыворотке крови TGF- $\beta$ 1 на 21-е и 37-е сутки эксперимента. Под влиянием TGF- $\beta$ 1 происходит активная дифференциация циркулирующих фиброцитов в репаративные фибробласты [25], трансдифференциация клеток эктодермального происхождения также в репаративные фибробласты [26], интенсивно продуцирующие коллаген и другие компоненты внеклеточного матрикса. При введении геля гиалуроновой кислоты в кожу экспериментальных животных на фоне интенсивной резорбции гиалуроновой кислоты активизировалась пролиферация фибробластов и процессы неоангиогенеза [19], увеличение содержания в коже нейтральносолеорастворимой фракции и суммарного коллагена [27].

### **Заключение**

Внутридермальное введение высокомолекулярной нативной гиалуроновой кислоты методом мезотерапии приводит у животных зрелого возраста в первые дни после процедуры инъекций к усилению секреции IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  и TGF- $\beta$ 1, что может отражать воспалительную ответную реакцию ткани кожи. В отдаленные сроки, через 2-4 недели после мезотерапии, уровень провоспалительных цитокинов в сыворотке крови снижается, увеличивается продукция IGF-1, а TGF- $\beta$ 1 сохраняется повышенным, характеризуя усиление процессов пролиферации и активации биосинтетических процессов в области инъекции препарата гиалуронана.

### **Список литературы**

1. Калинин С.Ю., Ворслов Л.О., Тюзиков И.А., Тишова Ю.А. Окислительный стресс как

причина системного старения. Роль препаратов  $\alpha$ -липовой кислоты (эспа-лимон) в лечении и профилактике возраст-ассоциированных заболеваний // Фарматека. – 2014. - № 6 (279). – С. 43-54.

2. Гунин А.Г., Корнилова Н.К., Петров В.В., Васильева О.В. Возрастные изменения численности и пролиферации фибробластов в коже человека // Успехи геронтологии. – 2011. – Т. 24, № 1. – С. 43-47.

3. Campisi J. Molecular mechanisms of intrinsic aging // Ann.DermatdVenereol. – 2002. – Vol. 129. – P. 110-114.

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

5. Чайковская Е.А., Шарова А.А. Гиалуроновая кислота и её фрагменты. Биологические функции // Инъекционные методы и композиции. – 2012. – № 1. – С. 9-16.

6. Капулер О., Галеева А., Сельская Б., Камилов Ф. Гиалуронан: свойства и биологическая роль // Врач. – 2015. – № 2. – С. 25-27.

7. Пальцев М.А., Иванов А.А. Межклеточные взаимодействия. – М.: Медицина, 1995. – 224 с.

8. Ярилин А.А. Система цитокинов и принципы её функционирования в норме и при патологии: обзор // Иммунология. – 1997. – № 5. – С. 7-14.

9. Шичкин В.П. Патогенетическое значение цитокинов и перспективы цитокиновой/антицитокиновой терапии: обзор // Иммунология. – 1998. – № 2. – С. 9-13.

10. Сибиряк С.В., Черешнев В.А., Симбирцев А.С. и др. Цитокиновая регуляция биотрансформации ксенобиотиков и эндогенной соединений. – Екатеринбург: УрОРАН, 2006. – 160 с.

11. Симбирцев А.С. Цитокины: классификация и биологическая функция // Цитокины и воспаление. – 2004. – Т. 3, № 2. – С. 16-23.

12. Beutler B. Innate immunity: an overview // Mol. Immunol. – 2004. – Vol. 40, № 12. – P. 845-859.

13. Aggarwal B.B. Signaling pathways of the TNF superfamily: a double – edged sword // Nat. Rev. Immunol. – 2003. – Vol. 3, № 9. – P. 745-756.

14. Ярилин Д.А. Роль фактора некроза опухолей в регуляции воспалительного ответа моноцитов и макрофагов // Иммунология. – 2014. – № 4. – С. 195-201.

15. Vallabhapurapu S. Regulation and function of NF – kappa B transcription factors in the immune system // Ann. Rev. Immunol. – 2009. – Vol. 27. – P. 693-733.

16. Bluml S., Scheinecker C., Smolen Y.S., Redlich K. Targeting TNF receptors in rheumatoid arthritis // Int. Immunol. – 2012. – Vol. 24, № 5. – P. 275-281.

17. Murray P.Y., Wynn T.A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets // *Nat. Rev. Immunolog.* – 2011. – Vol. 11, № 11. – P. 723-737.
18. Ivashkiv L.B. Epigenetic regulation of macrophage polarization and function // *Trends Immunol.* – 2013. – Vol. 34. – P. 216-223.
19. Михайлова Н.П., Шехтер А.Б. Сравнительное исследование взаимодействия инъекционных гелей немодифицированной и модифицированной гиалуроновой кислоты с биотканью // *Вестник эстетической медицины.* – 2014. – Т. 13, № 3-4. – С. 55-62.
20. Rifkin D.B. Latent transforming growth factor – beta (TGF – beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability // *Y. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280, № 9. – P. 7409-7412.
21. Compets B.N., Strieter R.M. Fibrocytes in ung diseases // *J. Leukoc. Biol.* – 2007. – Vol. 82, № 3. – P. 449-456.
22. Sica A., Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas // *Y. Clin. Invest.* – 2012. – Vol. 122, № 3. - P. 787-795.
23. Monzani R., Cohen P. IGFs and IGFbps: role in health and disease. // *Best. Pract. Res. Clin. Endocrin. Metab.* – 2002. – Vol. 16. – P. 433-447.
24. Planque N. Nuclear trafficking of secreted factors and cell-surface receptors: new pathways to regulate cell proliferation and differentiation, and involvement in cancers // *Cell Commun. Signal.* - 2006. – № 4. – P. 7-14.
25. Hong K.M., Belperla J.A., Keano M.P. Differentiation of human circulating fibrocytes as mediated by transforming growth factor –  $\beta$  and peroxisome proliferator – activated receptor  $\gamma$  // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282, № 31. – P. 22910-22920.
26. Fan L., Sebe A., Peterfi Z. et al. Cell contract-dependent regulation of epithelial – mesenchymal transition via the Rho-Rho kinase – phosphomyosin pathway // *Mol. Biol. Cell.* – 2007. – Vol. 18. № 3 – P. 1083-1097.
27. Галеева А.Г. Влияние внутридермального введения экспериментальным животным гиалуронана на содержание коллагена в коже // *Наука молодых.* – 2016. – № 1. – С. 23-27.