

HYALURONIC ACID SUPPRESSES AGE RELATED SKIN CHANGES

S. A. Larkina, N. N. Oleynik, R. S. Vastyanov

Odessa National Medical University, Odessa

Abstract

Functioning of the skin with age leads to its changes under which the condition of the dermis fibers deteriorates, which affects the appearance of the person and causes a number of consecutive pathological processes in the skin deeper layers. The development of methods for the prevention and treatment of age-related involuntary changes in the skin, enhancement of repair processes in its various layers is relevant and has a scientific and practical significance. Morphological studies of rabbits skin after the exogenous hyaluronic acid (HA) administration in various concentrations were performed. Studies have shown that when HA various concentrations are injected intradermally into rabbits, the increase in the formation of connective tissue fibers in the dermis is manifested with an increase of HA concentration. An increase in the HA concentration in the compounds promotes an increase in the degree of compaction of the dermis of rabbits. Lower HA concentration (1.4% and 2%) after single administration causes stimulation of the processes inside the skin at earlier time (2 weeks), and a concentration of 4% - is more active at a later time (8 weeks). We can assume a connection between the HA concentration and the time of the manifestation of the most pronounced morphological changes in the skin. It is likely that the stimulating effect of HA is manifested when the optimal physiological concentration is reached. The obtained data are in favor of further studies of the influence of the concentration of exogenous HA on the processes of skin biorevitalization.

Key words: hyaluronic acid, skin, papillary layer, mesh layer, connective tissue, collagen, age-dependent changes.

ГИАЛУРОНОВАЯ КИСЛОТА ПОДАВЛЯЕТ СВЯЗАННЫЕ С ВОЗРАСТОМ ИЗМЕНЕНИЯ КОЖИ

С. А. Ларкина, Н. Н. Олейник, Р. С. Вастьянов

Одесский национальный медицинский университет, г. Одеса

Резюме

Функционирование кожи с возрастом приводит к ее изменениям, при которых существенно ухудшается состояние волокон дермы, что отражается на внешнем виде человека и вызывает ряд последовательных патологических процессов в более глубоко расположенных слоях кожи. Разработка методов профилактики и лечения связанных с возрастом инволютивных изменений кожи, усиления репарационных процессов в различных ее слоях актуальна и имеет научную и практическую значимость. Были проведены морфологические исследования кожи кроликов после введения экзогенной гиалуроновой кислоты (ГК) различной концентрации. Исследования показали, что при введении в кожу кроликов ГК различной концентрации проявляется зависимость усиления образования соединительнотканых волокон в дерме при повышении концентрации ГК. Повышение концентрации ГК в препаратах способствует увеличению степени уплотнения дермы кроликов. При однократном введении меньшая концентрация ГК (1,4% и 2%) вызывает стимуляцию процессов в коже в более ранние сроки (2 недели), а концентрация в 4% - проявляет большую активность в более поздние сроки (8 недель). Можно предположить связь между концентрацией ГК и временем проявления максимально выраженных морфологических изменений кожи. Вероятно, что стимулирующее действие ГК проявляется при достижении оптимальной физиологической концентрации. Полученные данные свидетельствуют в пользу дальнейших исследований влияния концентрации экзогенной ГК на процессы биоревитализации кожи.

Ключевые слова: гиалуроновая кислота, кожа, сосочковый слой, сетчатый слой, соединительная ткань, коллаген, связанные с возрастом изменения.

ГІАЛУРОНОВА КИСЛОТА ПРИГНІЧУЄ ПОВ'ЯЗАНІ З ВІКОМ ЗМІНИ ШКІРИ

С. О. Ларкіна, Н. М. Олійник, Р. С. Вастьянов

Одеський національний медичний університет, м. Одеса

Резюме

Функціонування шкіри з віком спричиняє її зміни, за умов яких суттєво погіршується стан волокон дерми, що віддзеркалюється на зовнішньому вигляді людини та спричиняє низку послідовних патологічних процесів у більш глибоко розташованих шарах шкіри. Розробка методів профілактики і лікування пов'язаних з віком інволютивних змін шкіри, підсилення репараційних процесів в різних її шарах є актуальною і має наукову і практичну значущість. Були проведені морфологічні дослідження шкіри кроликів після введення екзогенної гіалуронової кислоти (ГК) різної концентрації. Дослідження показали, що при введенні в шкіру кролів ГК різної концентрації виявляється залежність щодо посилення утворення сполучнотканинних волокон в дермі при підвищенні концентрації ГК. Підвищення концентрації ГК в препаратах веде до збільшення ступеня ущільнення дерми кроликів. При одноразовому введенні менша концентрація ГК (1,4% і 2%) викликає стимуляцію процесів в шкірі в більш ранні терміни (2 тижні), а концентрація в 4% - проявляє велику активність в більш пізні терміни (8 тижнів). Можна припустити зв'язок між концентрацією ГК і часом прояву максимально виражених морфологічних змін шкіри. Ймовірно, стимулюючу дію ГК проявляється при досягненні оптимальної фізіологічної концентрації. Отримані дані свідчать на користь подальших досліджень впливу концентрації екзогенної ГК на процеси біоревіталізації шкіри.

Ключові слова: гіалуронова кислота, шкіра, сосочковий шар, сітчастий шар, сполучна тканина, колаген, пов'язані з віком зміни.

Шкіра – багатофункціональний та найбільший в організмі орган, і його зовнішній вигляд відображає здоров'я організму в цілому і ефективну взаємодію його функціональних систем. Відомо багато функцій шкіри, але її основна роль полягає в створенні захисного шару між зовнішнім середовищем і тканинами людини [1],

забезпечуючи тим самим захист від механічних, хімічних, термічних та інших потенційно патологічних впливів, ультрафіолетового випромінювання, зневоднення [2]. Будучи в постійному контакті з зовнішнім середовищем, шкіра підлягає дії значної кількості патологічних альтеруючих впливів, ніж більшість інших органів, відповідно чому перші ознаки спричинених віком змін організму проявляються саме в шкірі [3].

Показано несприятливий вплив віку на зміни функціонального стану шкіри та підшкірного дермального шару [4]. Феномен старіння впливає на людське обличчя, викликаючи безліч мікро- і макроскопічних об'ємних змін. Ці зміни поглиблюються вираженим погіршенням функціонування тримірної об'ємної структурної будови шкіри, дією сили тяжіння, негативними впливами підшкірно-жирової клітковини зі значно збільшеними концентраціями жирового шару, шкідливих звичок і чинників навколишнього середовища [5].

За таких умов протягом віку та зважаючи на вплив несприятливих атмосферних чинників, а також супутніх патологічних змін в організмі людини суттєво погіршується стан волокон дерми, що віддзеркалюється на зовнішньому вигляді людини та спричиняє низку послідовних патологічних процесів у більш глибоко розташованих шарах шкіри [3, 6]. Відзначимо, що дерма складається переважно зі щільного багатого колагеном позаклітинного матриксу, який в свою чергу забезпечує нормальне функціонування шкіри та її пружність, а також забезпечення її міцності при розтягненні [7]. Показано також, що з віком суттєві зміни відбуваються в епідермісі, пов'язані переважно з потовщенням клітин рогового шару, внаслідок чого шкіра стає грубішою з більшою кількістю зморшок [8, 9]. До цього слід додати також зменшення кровопостачання до поверхневих шарів шкіри, що загалом спричиняє дезорганізацію синтезу колагену, потовщення колагенових фібрил та збільшення фрагментації його молекул [10].

У зв'язку з цим розробка методів профілактики і лікування пов'язаних з віком інволютивних змін шкіри, підсилення репараційних процесів в різних її шарах є актуальною і має наукову і практичну значущість. Зважаючи на це, нами були проведені експериментальні дослідження із застосуванням гіалуронової кислоти (ГК) – нессульфорованого глікозаміноглікану, який входить до складу різних тканин організму людини. Відомо, що ГК є фізіологічним середовищем для міграції, розподілу і диференціації клітин, активізує роботу фібробластів, стимулює регенерацію шкіри, сприяє підтримці водного балансу клітин, тощо [11, 12].

Мета роботи – дослідження ефективності застосування різних концентрацій ГК для відновлення функціональної структури та активності шкіри.

Матеріали та методи дослідження

Експериментальні дослідження проводили за умов хронічного експерименту на кролях обох статей умовно молодого та умовно старого віку. Досліди проводилися із дотриманням загальноприйнятих вимог стосовно використання лабораторних тварин у експериментальних дослідженнях (Конвенція Ради Європи, 1986; Закон України від 21.02.2006, №3447-IV), положень Закону України «Про захист тварин від жорсткого поводження» № 27, ст. 230, від 2006 р. із змінами, внесеними згідно із Законом 1759-VI (1759-17) від 15.12.2009, ВВР, 2010, № 9, ст. 76, а також загальними етичними принципами експериментів на тваринах (I-й Національний конгрес з біоетики, 20.09.2001 р., м. Київ) та Етичним кодексом вченого України (Національна академія наук України, 2009 р.). Всі протоколи експериментальних досліджень були узгоджені комісією по етиці ОНМедУ.

Кролям обох статей умовно молодого та умовно старого віку внутрішньодермально в ділянку міжлопаткової області і області стегна вводили 4 біоревіталізанта (0.1 мл), які містили розчин ГК різних концентрацій - 1.4%, 2%, 3% та 4% - сумісно з манітолом. В якості контролю застосовували тварин відповідного віку.

Забір матеріалів для морфологічного дослідження здійснювали через 2 тижні, 1 місяць та 2 місяця після внутрішньодермального введення препаратів. У вказані терміни під загальним наркозом - внутрішньовенне введення кетаміну (5.0% розчин, дозою 5.0 мг/кг) та седазину (5.% розчин, кожній тварини додавали 0.1 мл сполуки) у тварин на спині вирізали по 4 шматочки шкіри (по 2 шматочки з кожного боку, розмірами 20x10 мм), після чого рану обробляли антисептичним розчином та зашивали. Кожного кроля приводили до стану свідомості та потім віддавали до наступних експериментальних досліджень. До евтаназії не вдавалися.

Отримані шматочки шкіри спини фіксували в 10% нейтральному формаліні протягом 72 год, потім обробляли за загальноприйнятою методикою з заливкою в парафін. Гістологічні зрізи забарвлювали гематоксиліном і еозином, а також за Ван Гізоном. При аналізі морфологічних змін шкіри кролів використовували візуальну шестибальну шкалу оцінки волокон дерми: 0 балів – відсутність змін, 5 балів – максимально виражені зміни дерми.

Отримані результати та їх обговорення

Ефект від введення нестабілізованої ГК (1,4%, 2, 3 і 4%) в шкіру кролів спостерігається в гістологічних препаратах через 2 тижні (Рис. 1-6) і через 1 (Рис. 7-11) і 2 (Рис. 12-16) місяці після введення препарату.

При в/дермальному введенні кролям розчинів ГК концентрацією 1,4%, 2%, 3% і 4% в дермі не виявляли дегенеративних або атрофічних процесів. При застосуванні ГК концентрацією 1,4% і 2% дегенеративні зміни були більше виражені в сосочковому шарі шкіри. При застосуванні ГК концентрацією 3% і 4% зміни були виражені у всіх шарах дерми.

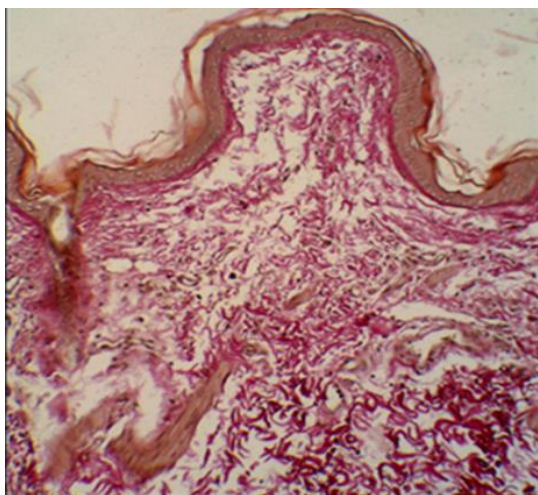


Рис. 1. Шкіра інтактного кроля. Забарвлення за Ван Гізоном. Збільшення x100

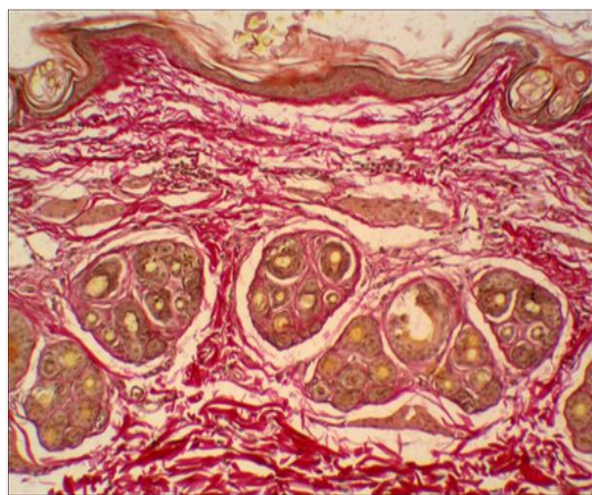


Рис. 2. Шкіра інтактного кроля через 2 тижня після введення 1,4% ГК. Забарвлення за Ван Гізоном. Збільшення x100

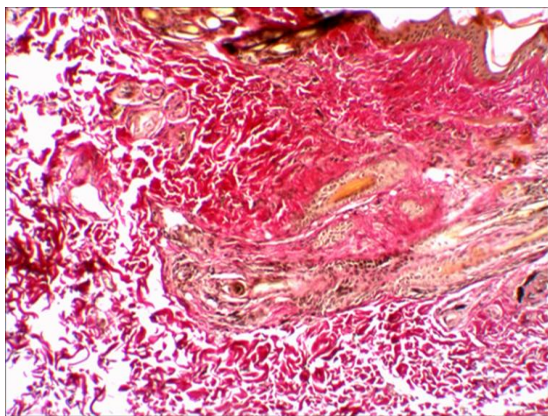


Рис. 3. Шкіра інтактного кроля через 2 тижня після введення 2% ГК. Забарвлення за Ван Гізоном. Збільшення x100

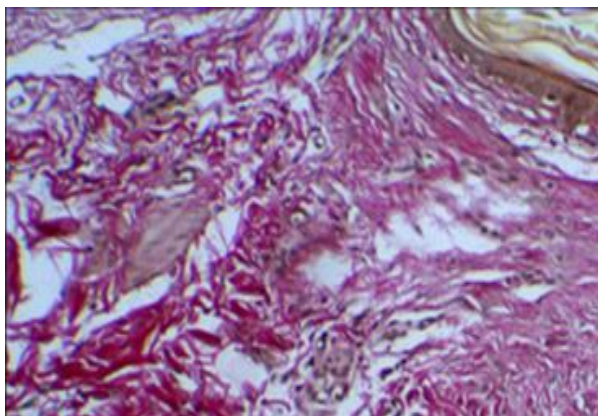


Рис. 4. Шкіра інтактного кроля через 2 тижня після введення 3% ГК. Забарвлення за Ван Гізоном. Збільшення x100

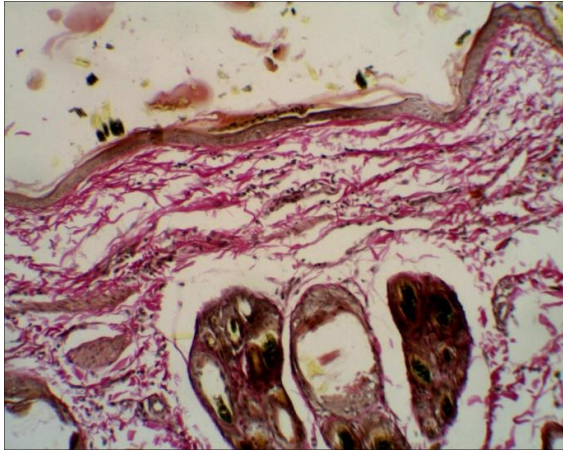


Рис. 5. Шкіра інтактного кроля через 2 тижня після введення 4% ГК. Забарвлення за Ван Гізоном. Збільшення x100

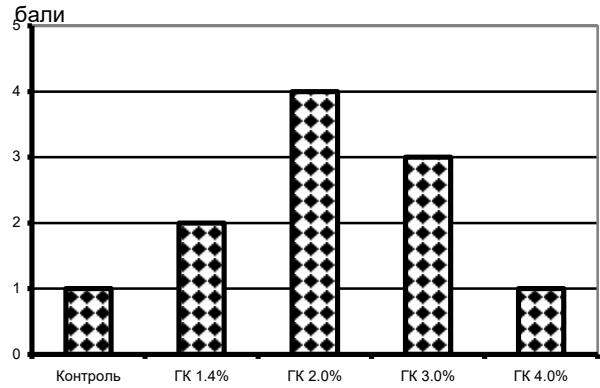


Рис. 6. Порівняльна дані візуальної оцінки зміни волокон дерми через 2 тижня з початку введення ГК різної концентрації

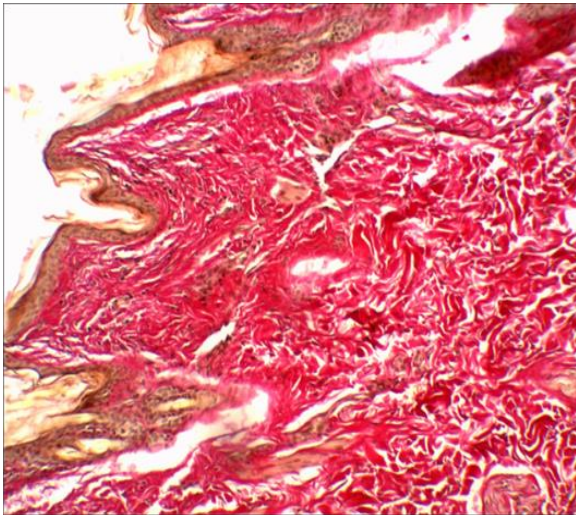


Рис. 7. Шкіра інтактного кроля через 1 місяць після введення 1.4% ГК. Забарвлення за Ван Гізоном. Збільшення x100

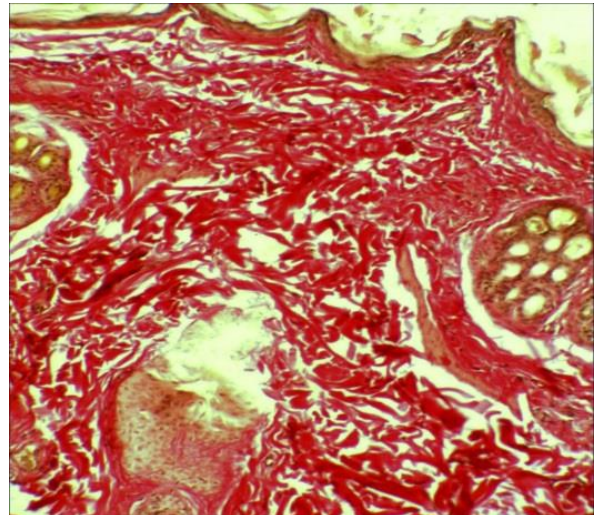


Рис. 8. Шкіра інтактного кроля через 1 місяць після введення 2% ГК. Забарвлення за Ван Гізоном. Збільшення x100

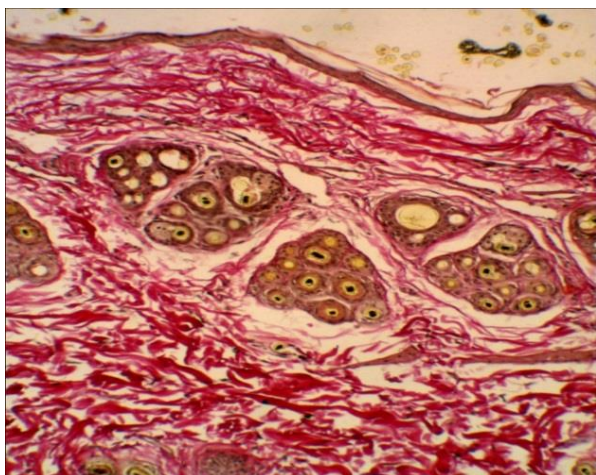


Рис. 9. Шкіра інтактного кроля через 1 місяць після введення 3% ГК. Забарвлення за Ван Гізоном. Збільшення x100

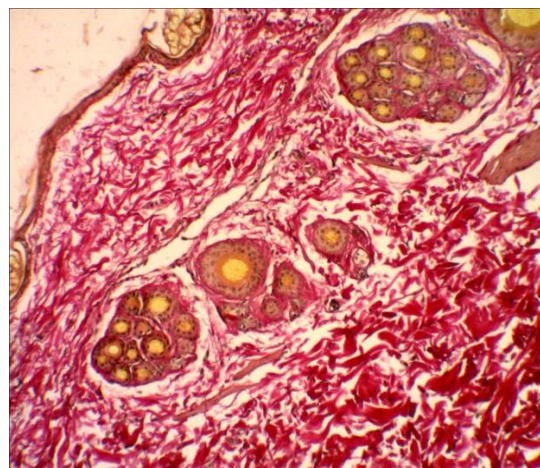


Рис. 10. Шкіра інтактного кроля через 1 місяць після введення 4% ГК. Забарвлення за Ван Гізоном. Збільшення x100

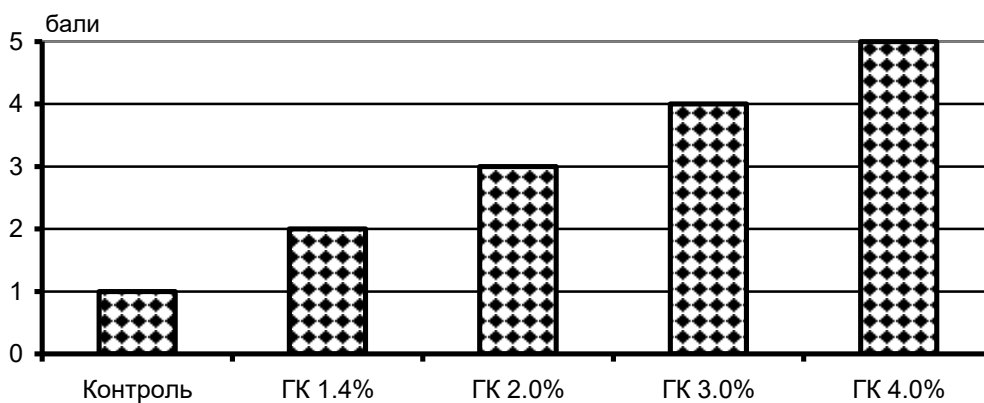


Рис. 11. Порівняльна дані візуальної оцінки зміни волокон дерми через 1 місяць з початку введення ГК різної концентрації

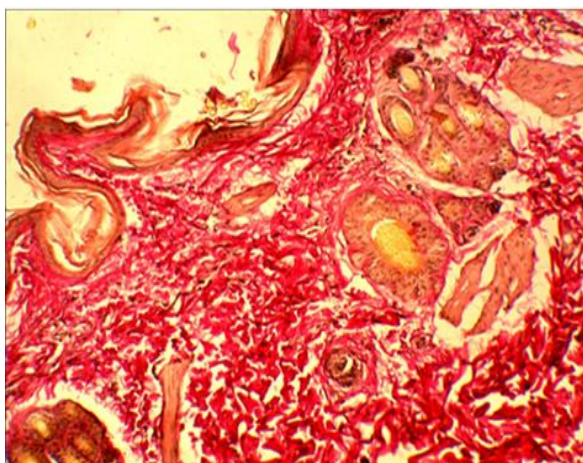


Рис. 12. Шкіра інтактного кроля через 2 місяці після введення 1.4% ГК. Забарвлення за Ван Гізоном. Збільшення x100

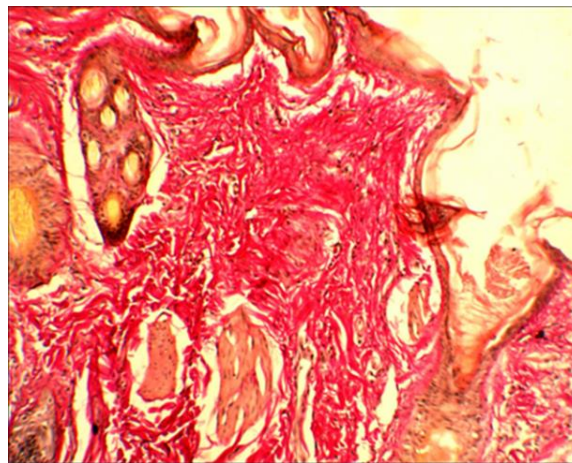


Рис. 13. Шкіра інтактного кроля через 2 місяці після введення 2% ГК. Забарвлення за Ван Гізоном. Збільшення x100

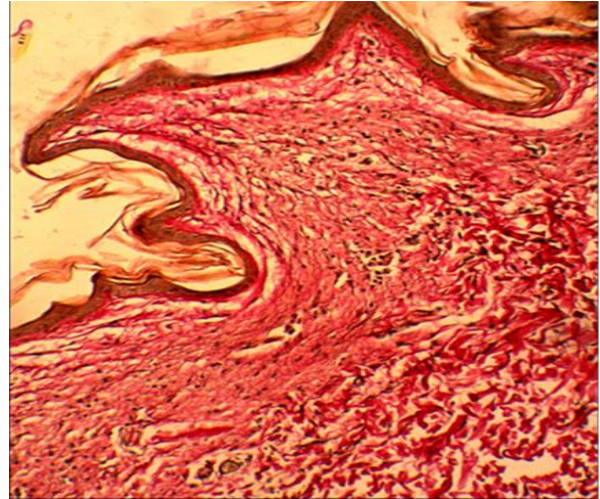
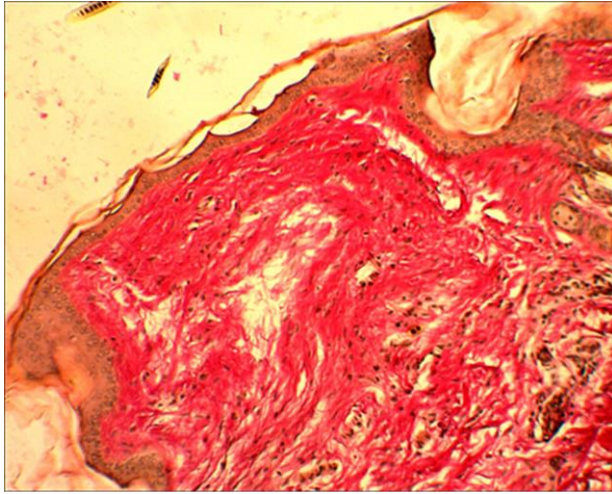


Рис. 14. Шкіра інтактного кроля через 2 місяці після введення 3% ГК. Забарвлення за Ван Гізоном. Збільшення x100

Рис. 15. Шкіра інтактного кроля через 2 місяці після введення 4% ГК. Забарвлення за Ван Гізоном. Збільшення x100

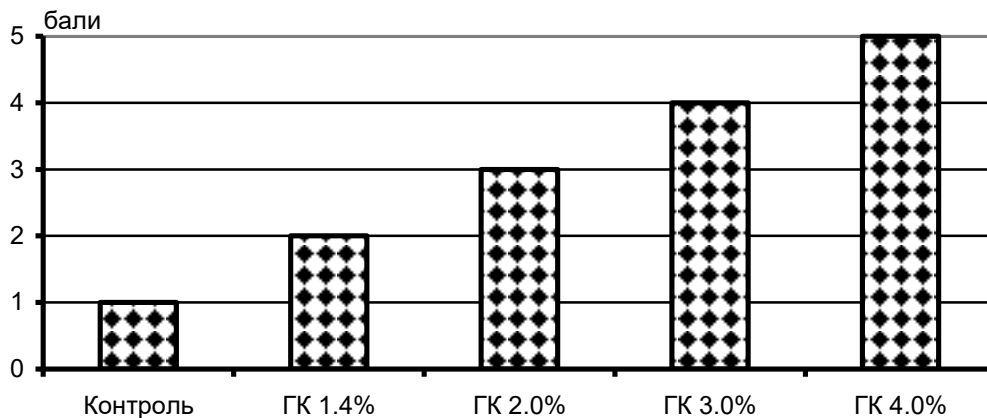


Рис. 16. Порівняльна дані візуальної оцінки зміни волокон дерми через 2 місяці з початку введення ГК різної концентрації

На всіх гістологічних препаратах кількість сполучнотканинних волокон в сосочковому та сітчастому шарах шкіри збільшена порівняно з такими показниками в контролі. У сітчастому шарі пучки волокон потовщені більшою мірою при застосуванні розчинів ГК концентрацією 3% і 4%.

Процеси утворення сполучнотканинних волокон дерми кроликів збільшуються при підвищенні концентрації ГК, що може свідчити про збільшення ступеня ущільнення дерми при підвищенні концентрації ГК.

При одноразовому введенні менша концентрація ГК (1,4% і 2%) спричиняє стимуляцію процесів колагенування в шкірі в більш ранні терміни - 2 тижні (Рис. 2 і 3). При застосуванні ГК в концентрації 4% сполука проявляє виражену активність через 2 місяці з початку введення (Рис. 15).

Таким чином, можна припустити зв'язок між концентрацією ГК і часом прояву максимально виражених морфологічних змін шарів шкіри. Ймовірно, стимулюючий вплив ГК проявляється при досягненні в тканинах її оптимальної фізіологічної концентрації. Це чітко проявляється при порівняльній оцінці зміни волокон дерми протягом всього досліджу – найбільша залежність активності ГК від її дози спостерігається вже на 1 місяці дослідження (Рис. 11) та триває до кінця спостереження (Рис. 16).

Збереження отриманих результатів морфологічних змін після одноразового введення ГК, в терміни через 1 і 2 місяці від початку досліджу, може бути також пов'язане з антиоксидантною активністю манітолу, що забезпечує уповільнення деградації ГК [13]. У зв'язку з цим застосування біоревіталізаторів, що містять нестабілізовану ГК в поєднанні з манітолом, сприятиме зменшенню кількості лікувальних процедур.

Отже, отримані дані свідчать про те, що через 2 тижні після введення 4% розчину ГК в шкіру кроликів кількість фібробластів в сосочковом шарі дерми збільшилася практично в 4 рази, в порівнянні з інтактним зразком: з 10 -15 фібробластів в поле зору контрольного зразка, до 40 - 50 фібробластів через 2 тижні після введення 4% розчину ГК.

Резюмуючи, зазначимо що необхідність подальших досліджень з впливу концентрації екзогенної ГК на процеси, що відбуваються в шкірі, є надзвичайно важливим для оцінки безпеки та ефективності біоревіталізаторів.

Таким чином, проведені дослідження визначили, що застосування розчинів ГК різної концентрації протягом двохмісячного терміну спричиняє розвиток відновлювального ефекту з точки зору функціональної активності волокон дерми. Отримані дані можуть слугувати експериментальним обґрунтуванням можливості тестування застосування розчинів ГК різної концентрації в клінічних умовах для профілактики розвитку або лікування індукованих віком змін шкіри.

Висновки

1. При одноразовому введенні меншої концентрації ГК (1,4% і 2%) стимулюються процеси в шкірі в більш ранні терміни (2 тижні).

2. Застосування ГК концентрацією 4% виявляє більшу активність протягом 2 місяців. Це слід враховувати при складанні комплексної схеми корекції інволютивних змін шкіри із додаванням ГК.

3. Зростання концентрації ГК підсилює вираженість процесів утворення сполучнотканинних волокон дерми кролів, що свідчатиме про збільшення ступеня ущільнення дерми при підвищенні концентрації ГК.

4. Отримані дані свідчать на користь подальших досліджень впливу концентрації екзогенної ГК на процеси біоревіталізації шкіри.

Перелік літератури:

1. Proksch E. The skin: An indispensable barrier / E. Proksch, J.M. Brandner, J.M. Jensen // *Exp. Dermatol.* – 2008. – Vol. 17. – P.1063–1072.
2. The Function and Structure of Skin / R.H. Weller, A. John, J. Savin, M. Dahl. - Massachusetts : Wiley-Blackwell, 2008. - 819 p.
3. Age-associated skin conditions and diseases: Current perspectives and future options / U. Blume-Peytavi, J. Kottner, W. Sterry [et al.] // *Gerontologist.* – 2016. – Vol. 56. – P. 230–242.
4. Marks R. The stratum corneum barrier: The final frontier / R. Marks // *J. Nutr.* 2004. – Vol. 134. – P. 2017–2021.
5. Quan T. Role of age-associated alterations of the dermal extracellular matrix microenvironment in human skin aging: a minireview / T. Quan, G.J. Fisher // *Gerontology.* – 2015. – Vol. 61, N 5. – P. 427–434.
6. Khavkin J. Aging skin: histology, physiology, and pathology / J. Khavkin, D.A. Ellis // *Facial Plast. Surg. Clin. North. Am.* – 2011. – Vol. 19, N 2. – P. 229–234.
7. Sherratt M.J. Tissue elasticity and the ageing elastic fibre / M.J. Sherratt // *Age (Dordr).* – 2009. – Vol. 31, N 4. – P. 305–325.
8. Baumann L. Skin ageing and its treatment / L. Baumann // *J. Pathol.* – 2007. – Vol. 211, N 2. – P. 241–251.
9. Rittie L. Natural and sun-induced aging of human skin / L. Rittie, G.J. Fisher // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* – 2015. – Vol. 5, N 1. a015370.
10. Uitto J. The role of elastin and collagen in cutaneous aging: intrinsic aging versus photoexposure / J. Uitto // *J. Drugs Dermatol.* – 2008. – Vol. 7, Suppl. 2. – S.12–16.
11. HA metabolism in skin homeostasis and inflammatory disease / R.M. Kavasi, A. Berdiaki, I. Spyridaki [et al.] // *Food Chem. Toxicol.* – 2017. – Vol. 101. – P.128-138.

12. Stern R. Hyaluronan fragments: an information-rich system / R. Stern, A.A. Asari, K. Sugahara // *Eur. J. Cell. Biol.* – 2006. – Vol. 85. – P. 699–715.

13. Hyaluronic acid plus mannitol treatment for improved skin hydration and elasticity / Taieb M., Gay C., Secnazi P., Sebban S. // *J. Cosmet. Dermatol.* – 2012. – Vol. 11, N 2. – P. 87-92.

References

1. Proksch E. The skin: An indispensable barrier / E. Proksch, J.M. Brandner, J.M. Jensen // *Exp. Dermatol.* – 2008. – Vol. 17. – P.1063–1072.

2. The Function and Structure of Skin / R.H. Weller, A. John, J. Savin, M. Dahl. - Massachusetts : Wiley-Blackwell, 2008. - 819 p.

3. Age-associated skin conditions and diseases: Current perspectives and future options / U. Blume-Peytavi, J. Kottner, W. Sterry [et al.] // *Gerontologist.* – 2016. – Vol. 56. – P. 230–242.

4. Marks R. The stratum corneum barrier: The final frontier / R. Marks // *J. Nutr.* 2004. – Vol. 134. – P. 2017–2021.

5. Quan T. Role of age-associated alterations of the dermal extracellular matrix microenvironment in human skin aging: a minireview / T. Quan, G.J. Fisher // *Gerontology.* – 2015. – Vol. 61, N 5. – P. 427–434.

6. Khavkin J. Aging skin: histology, physiology, and pathology / J. Khavkin, D.A. Ellis // *Facial Plast. Surg. Clin. North. Am.* – 2011. – Vol. 19, N 2. – P. 229–234.

7. Sherratt M.J. Tissue elasticity and the ageing elastic fibre / M.J. Sherratt // *Age (Dordr).* – 2009. – Vol. 31, N 4. – P. 305–325.

8. Baumann L. Skin ageing and its treatment / L. Baumann // *J. Pathol.* – 2007. – Vol. 211, N 2. – P. 241–251.

9. Rittie L. Natural and sun-induced aging of human skin / L. Rittie, G.J. Fisher // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* – 2015. – Vol. 5, N 1. a015370.

10. Uitto J. The role of elastin and collagen in cutaneous aging: intrinsic aging versus photoexposure / J. Uitto // *J. Drugs Dermatol.* – 2008. – Vol. 7, Suppl. 2. – S.12–16.

11. HA metabolism in skin homeostasis and inflammatory disease / R.M. Kavasi, A. Berdiaki, I. Spyridaki [et al.] // *Food Chem. Toxicol.* – 2017. – Vol. 101. – P.128-138.

12. Stern R. Hyaluronan fragments: an information-rich system / R. Stern, A.A. Asari, K. Sugahara // *Eur. J. Cell. Biol.* – 2006. – Vol. 85. – P. 699–715.

13. Hyaluronic acid plus mannitol treatment for improved skin hydration and elasticity / Taieb M., Gay C., Secnazi P., Sebban S. // J. Cosmet. Dermatol. – 2012. – Vol. 11, N 2. – P. 87-92.