ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГИБРИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ НИЗКОЙ И ВЫСОКОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ В ПРЕПАРАТЕ PROFHILO

Суханова Александра Сергеевна

врач-косметолог, научный консультант НОЦ «Эксперт», Москва

Если мы обратимся к статистическим данным ASAPS (American Society for Aesthetic Plastic Surgery) за 2017 г., то увидим, что инъекции гиалуроновой кислоты (ГК) занимают второе место в топе пяти нехирургических процедур. За период с 2012 по 2017 г. количество проводимых процедур увеличилось на 85%. Среди женщин введение ГК получило наибольшее распространение по сравнению с другими методиками и составило 93,6% [1]. К сожалению, нет возможности привести статистические данные по проводимым косметологическим процедурам в России, однако на данный момент популярность препаратов на основе ГК может подтвердить каждый доктор. Такую широкую распространенность ГК получила благодаря своим свойствам ремоделировать ткани и то, что основным показанием к ее внутрикожному введению является коррекция возрастных изменений лица.

С каждым годом мы видим увеличение количества препаратов на рынке индустрии красоты. Производители стараются «улучшить» формулу ГК, добавляя аминокислоты, пептиды, витамины; изменяют вес молекулы; при стабилизации кислоты стараются минимизировать количество сшивающих агентов (например, 1,4-бутандиолдиглицидилового эфира – BDDE) и т.д. Всегда ли это приводит к физиологичному ответу кожи на введение препарата и получаем ли мы качественный результат проводимой процедуры? Давайте более подробно разберем эти вопросы.

Биологические свойства гиалуроновой кислоты разных молекулярных масс

Более половины имеющейся в организме ГК распределено в коже, где она составляет основную внеклеточную структуру – внеклеточный матрикс (ВКМ). ВКМ дермы, а также его основные компоненты – клеточные элементы, коллагеновые и эластиновые волокна выполняют структурообразующую функцию, участвуют в реализации иммунных процессов, микроциркуляции и сенсорной перцепции [2]. Синтез молекул ГК осуществляется главной клеткой дермы – фибробластом. Молекулярный вес при этом составляет от 50 кДа (низкомолекулярная ГК – L-HA) до 2 млн Да (высокомолекулярная ГК – H-HA). Вновь образованная ГК взаимодействует со специфическими рецепторами, расположенными на клеточных структурах – CD44, RHAMM, LYVE-1 **(рис.)**, активируя при этом противовоспалительные и биостимулирующие реакции [3]. Кроме того, в работах Hiramoto K. и соавт. была показана способность гиалуронана предотвращать повреждения, вызванные окислительными реакциями [7].

Говоря о ГК разной молекулярной массы, нам необходимо понимать биологические свойства каждой из них **(табл.)**.

Известно, что низкомолекулярная ГК необходима для выполнения трофометаболической функции и поддержания гомеостаза в коже. Вместе с

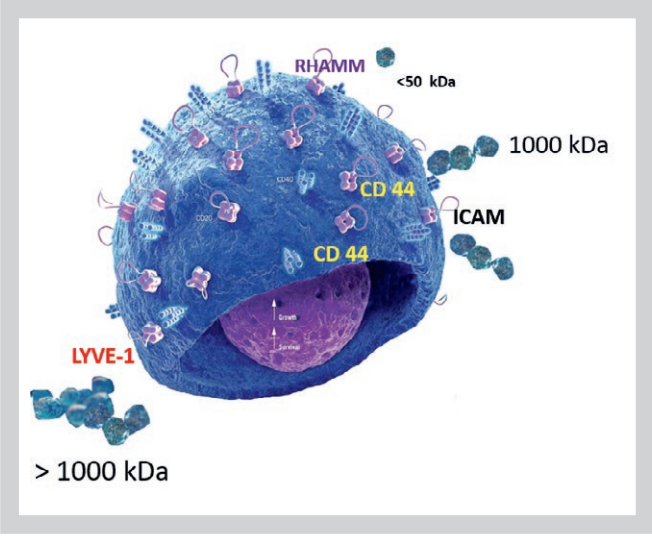

Рис. Схематичное изображение взаимодействия молекул ГК разной молекулярной массы с рецепторами CD44, RHAMM, LYVE-1

Таблица. Сравнительное действие ГК низкой и высокой молекулярной массы

	Свойства
L-HA	• Участвует в процессах воспаления: взаимодействие через рецепторы с иммунокомпетентными клетками (моноциты, лимфоциты, макрофаги и пр.), запуск синтеза провоспалительных цитокинов (оказывает провоспалительное действие) • Стимулирует ангиогенез • Повышает синтетическую активность фибробластов • Препятствует окислительным процессам в тканях • Стимулирует дифференцировку фиброцитов в фибробласты
H-HA	• Накапливается в области воспалительного процесса: например, аккумулирует и связывает фибриноген, необходимый для формирования кровяного сгустка • Создает условия в очаге воспаления, облегчающие доступ для полиморфноядерных лейкоцитов с целью удаления некротизированной ткани, детрита • Оказывает противовоспалительное действие: снижает уровень провоспалительных цитокинов, способствует выработке регуляторных Т-клеток и т.д. • Создает в тканях «каркас» (лифтинговый эффект)

тем многочисленные научные работы доказали ее роль в процессах воспаления. Так, накопление ГК низкой молекулярной массы вследствие деградации высокомолекулярной ГК стимулирует реакцию цитокинов и ангиогенез [4]. А именно молекулы ГК в месте повреждения связываются с рецепторами CD44, RHAMM, LYVE-1, TLR2 и TLR4, расположенными на поверхности различных иммунокомпетентных клеток (моноцитов, Т-лимфоцитов, макрофагов и др.), что приводит к внутриклеточному запуску синтеза провоспалительных цитокинов (макрофагальные воспалительные белки, интерлейкины, фактор некроза опухоли) и развитию каскада воспалительных реакций [10].

В дополнение в своих исследованиях McKee и соавт. показали, что ГК низкой молекулярной массы (от 35 до 280 кДа) стимулирует работу макрофагальных клеток и хемокинов [5]. В работах Termeer C. и соавт. было показано, что тетра- и гексасахара ГК вызывают иммунофенотипическое созревание моноцитарных дендритных антигенпрезентирующих клеток кожи [11].

В то же время высокомолекулярная ГК оказывает противовоспалительный эффект. Она приводит к снижению уровня провоспалительных цитокинов, участвует в поддержании иммунной толерантности [12], способствует выработке регуляторных Т-клеток [13], подавляет фагоцитарную активность моноцитов и реакцию антиген-антитело, препятствует активации лимфоцитов [14].

Новая технология стабилизации гиалуроновой кислоты

Накопление информации о низко- и высокомолекулярной ГК приводит к созданию инъекционных препаратов с различными свойствами. Но особенно актуальным является вопрос о длительности действия гиалуронана в тканях. Это и понятно, ведь, например, нативная ГК вследствие быстрого разрушения тканевой гиалуронидазой и активными формами кислорода наравне с биостимулирующей функцией не может выполнять волюметрическую функцию. С этой целью в косметологической практике используются препараты ГК, стабилизированной при помощи различных сшивающих агентов. Наиболее безопасным реагентом считается BDDE [3]. Однако существуют литературные данные о возникновении нежелательных явлений после проведения инъекционных процедур с использованием препаратов ГК, сшивающим агентом в которых был BDDE [6, 8, 9]. Идея использования препаратов на основе гиалуронана, стабилизация которых исключает добавление сшивающего агента, на наш взгляд, является весьма перспективной и привлекательной как для врача-косметолога, так и для пациента. И в первую очередь это будет связано с еще более высокой степенью безопасности препарата.

Абсолютно новая технология пролонгации действия гиалуроновой кислоты в тканях представлена в препарате Profhilo (патент WO2011EP65633), в состав которого входит немодифицированная ГК низкой и высокой молекулярных масс. Гиалуроновая кислота получена путем микробной ферментации от *Streptococcus equi ssp. equi*, фармацевтической степени чистоты (чистота >95%, содержание воды <10%, ЕЭ/мг <0,05 – очень низкое содержание тяжелых металлов), в качестве стабилизатора используется не сшивающий агент (BDDE), а термическое воздействие. Отсутствие токсического действия на ткани было

показано в исследованиях Laurino C. и соавт. [3]. Согласно Международной номенклатуре каждый шприц содержит по 32 мг H-HA (1100–1400 кДа) и L-HA (80–100 кДа) в 2 мл буферного физиологического раствора. Запатентованная технология NAHYCO™ основана на термическом воздействии на молекулы гиалуронана разной молекулярной массы с последующим созданием стабильных гибридных комплексов. К преимуществам такой технологии можно отнести стабильность препарата, отсутствие химической модификации, высокую биологическую совместимость, содержание ГК в гибридных комплексах большее, чем в препаратах на основе немодифицированной гиалуроновой кислоты. Кроме того, методика NAHYCO™ позволила снизить вязкость препарата примерно в семь раз по сравнению с высокомолекулярной ГК, несмотря на его большую концентрацию – 64 мг/2 мл. Это позволяет врачу не только комфортно проводить процедуру, но и обеспечивает равномерное распределение препарата во всех анатомических структурах. Данный эффект отсутствует даже у филлеров с низким показателем вязкости, часто на месте введения формируются неровности. Такими свойствами препарат обладает благодаря увеличению показателя текучести над пластичностью, чего нет у стабилизированной ГК. Сравнительные данные по препаратам Profhilo, Belotero Balance, Aliaxin EV, Restylane Lido и Volift XC были представлены в 2016 г. Sundaram H. с соавт. в стендовом докладе на ежегодном заседании Американского общества дерматологической хирургии (ASDS).

Длительность действия гибридных комплексов

Что касается длительности действия гибридных комплексов ГК, то здесь были получены следующие результаты. В исследовании Stellavato A. и соавт. было проанализировано несколько образцов ГК в присутствии тестикулярной бычьей гиалуронидазы, а именно сравнивались гибридные комплексы H-HA/L-HA с молекулами линейной H-HA в присутствии фермента при инкубации от 0,5 ч до 10 дней [15]. Гибридные комплексы ГК показали более высокую устойчивость к действию гиалуронидазы, а именно через 10 дней инкубации *in vitro* в образцах еще присутствовало 35% начальной фракции H-HA, в то время как содержание линейной H-HA уже через день было меньше 10%. Данные, полученные в исследовании Stellavato A. и соавт., дополнительно подтверждаются результатами еще одного исследования D'Agostino A. и соавт., в котором также было выявлено, что гибридные комплексы ГК показали лучшую устойчивость к тестикулярной гиалуронидазе [16].

Тканевые реакции препарата Profhilo

Весьма интересны тканевые реакции, запускаемые препаратом Profhilo. Воздействие гиалуронана на процессы воспаления, стимуляции, а также увлажнения кожи подтверждаются многочисленными исследованиями [17–20]. Особенно акцентируется внимание на ГК низкой молекулярной массы (от 35 до 280 кДа), о чем выше мы говорили. Кроме того, существует достаточно исследований, подтверждающих стимулирующую роль молекул гиалуроната на процессы синтеза коллагена I, III, IV и VII типов. Это особенно актуально, так как именно снижение выработки данных волокон, а также изменение соотношения между ними приводит к возрастным изменениям в коже. Так, в работах Varani J. и соавт., [21] а также Baumann L. и соавт. [22] было показано, что у пожилых женщин наблюдается изменение соотношения коллагенов III и I типов преимущественно за счет снижения последнего. В то же время Wang T.W. и соавт. выявили, что коллаген IV типа играет ключевую роль в поддержании механической плотности кожи, основное место его обнаружения – базальная мембрана, а коллаген VII типа участвует в формировании якорных фибрилл и фиксации базальной мембраны к подлежащей дерме [23].

В исследовании D'Agostino A. и соавт. было показано более быстрое восстановление монослоя клеток кератиноцитов в присутствии ГК [16]. Что касается гибридных комплексов L-HA/H-HA, то репарация клеточной культуры была в 1,5–1,4 раза выше по сравнению с контролем. Также гибридные комплексы показали более высокие результаты в сравнении с отдельно взятыми образцами H-HA и L-HA. Аналогичные исследования были проведены Stellavato A. и соавт., которые подтвердили, что добавление комплексов L-HA/H-HA к монокультурам кератиноцитов и фибробластов стимулирует экспрессию гена мРНК коллагена и эластина [15]. Исследовался коллаген I, III, IV и VII типов. Причем изменения со стороны кератиноцитов наблюдались уже через четыре часа, а в клетках фибробластов – через 24 часа инкубации. Уже на данном этапе мы можем сделать вывод о том, что препарат прекрасно подходит для пациентов с признаками дерматопороза кожи (снижение тургора, эластичности, появление признаков дряблости, сухости, возникновение телеангиэктазий, медленное заживление раневой поверхности). Надо отметить, что область применения не заканчивается лицом, это и зона шеи, внутренняя поверхность плеча, бедер, тыльная поверхность кистей рук, передняя брюшная стенка.

Наравне с влиянием гиалуроната на кератиноциты и фибробласты было показано воздействие ГК на стволовые клетки жировой ткани (ASC). В последнее время все большее внимание уделяется участию жировой ткани в процессах заживления и старения. По данным, обнародованным Кругликовым И., клетки жировой ткани принимают участие в заживлении ран, формировании рубцовой ткани, являются необходимым условием для полноценного цикла развития волоса, старения кожи, регулируют ее температуру, а также являются иммунной «обороной» [24]. В исследованиях Stellavato A. и соавт. изучалось влияние нескольких образцов ГК на пролиферацию стволовых клеток жировой ткани, а именно гибридные комплексы H-HA/L-HA, отдельно взятые образцы L-HA и H-HA, а также ГК с высокой и средней степенью ретикуляции [25]. Были получены следующие результаты: увеличение пролиферации ASC при обработке клеток гибридными комплексами H-HA/L-HA в сравнении с образцами с необработанными

клетками, обработанными L-HA, а также H-HA. Интересные данные были получены при обработке культуры клеток ГК средней и высокой степени ретикуляции, а именно прекращение процессов роста ASC с уменьшением скорости пролиферации. Таким образом, препарат на основе гибридных комплексов H-HA/L-HA может влиять на морфологию и гомеостаз жировой ткани. Что это дает практикующему врачу? Возрастные изменения – это совокупность патоморфологических изменений. Резорбция жировых компартментов – один из характерных процессов, свойственных старению. Препятствие истощению жировой ткани рассматривается как одно из перспективных направлений в эстетической медицине.

В заключение хочется добавить, что препарат Profhilo показал себя как препарат с минимальными ощущениями дискомфорта. Так, например, в исследовании Laurino C. лишь у 12,1% (всего в исследовании участвовало 33 человека) респондентов были выявлены небольшие гематомы, которые исчезли в течение нескольких дней [3]. Также со стороны пациентов в 87,9% случаев была дана высокая оценка удовлетворенности результатами проведенной инъекционной терапии. Ни один из испытуемых не дал отрицательную оценку лечению. Кроме того, ни один из респондентов не предъявлял жалобы на болевые ощущения во время и после процедуры. Со стороны врача хотелось бы подчеркнуть тот факт, что отмечалась легкость выполнения инъекций. Целесообразность применения препарата была расценена как оптимальная в 51,5% случаев и в 45,5% – как хорошая. Также в качестве примера можно привести данные Sundaram H. и соавт., в которых показано, что у пациентов после введения препарата в микроболюсах отмечалось улучшение состояние кожи от умеренной степени до выраженной (стендовый доклад на ежегодном заседании Американского общества дерматологической хирургии (ASDS) в 2016 г.). Помимо этого в данном наблюдении у 50% респондентов наблюдалось подтягивание субментальной области.

И в заключение

Подводя итоги, нам хотелось бы еще раз обратить внимание практикующих врачей на безопасность препарата, отсутствие сшивающего агента (BDDE и др.), что значительно снижает риск развития таких нежелательных реакций, как аллергия, формирование гранулематозного воспаления, стимуляция рубцовой ткани. Пролонгированный эффект ГК в тканях, стимулирующее действие затрагивает не только клеточные элементы дермы, а также волокнистые структуры, но и стволовые клетки жировой ткани.

Еще раз повторимся, что это новое перспективное направление в эстетической косметологии. И наконец, удобство в применении, легкость выполнения процедур, отсутствие нежелательных явлений в виде длительно не проходящих гематом, а также получение качественного, физиологичного и выраженного результата после проведения курса инъекционных процедур. ■

ЛИТЕРАТУРА

[1] *https://www.surgery.org/media/statistics*

[2] *Чайковская Е.А. Препараты на основе стабилизированной гиалуроновой кислоты: молекулярно-клеточные механизмы влияния на кожу // Инъекционные методы в косметологии. – 2014. – № 1. – С. 3–12.*

[3] *Лаурино К., Пальмиери Б., Коаччи А. Новый гибридный комплекс, состоящий из низко- и высокомолекулярной гиалуроновой кислоты, в коррекции возрастных изменений кожи: эффективность, безопасность, переносимость // Инъекционные методы в косметологии. – 2016. – № 1. – С. 50–56.*

[4] *Stern R., Asari A.A., Sugahara K.N. Hyaluronan fragments: an information-rich system. Eur J Cell Biol 2006; 85 (8 Suppl): 699–715.*

[5] *McKee C.M., Penno M.B., Cowman M., Burdick M.D., Strieter R.M., Bao C., Noble P.W. Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. J Clin Invest 1996; 98 (10 Suppl): 2403–2413.*

[6] *Yeom J.I., Bhang S.H., Kim B.S., Seo M.S., Hwang E.J., Cho I.H., Park J.K., Hahn S.K. Effect of cross-linking reagents for hyaluronic acid hydrogel dermal fillers on tissue augmentation and regeneration. Bioconjug Chem. 2010 Feb 17; 21(2): 240–247.*

[7] *Hiramoto K., Kobayashi H., Yamate Y., Ishii M., Sato E.F. Intercellular pathway through hyaluronic acid in UVB-induced inflammation. Exp Dermatol 2012; 21(12): 911–914.*

[8] *Fakhari A, Berkland C. Applications and emerging trends of hyaluronic acid in tissue engineering, as a dermal filler and in osteoarthritis treatment. Acta Biomater 2013; 9(7): 7081–7092.*

[9] *Schanteâ C.E., Zuber G., Herlin C., Vandamme T.F. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. Carbohydrate Polymers 2011; 85(3): 469–489.*

[10] *Goueffic Y., Guilluy C., Guerin P. et al. Hyaluronan induces vascular smooth muscle cell migration through RHAMM-mediated PI3K-dependent Rac activation // Cardiovasc Res. – 2006. – № 72. – P. 339–348.*

[11] *Termeer C., Benedix F., Sleeman J. et al. Oligosaccharides of hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4 // J Exp Med. – 2002. – № 195. – P. 99–111.*

[12] *Bollyky P.L., Falk B.A., Wu R.P. et al. Intact extracellular matrix and the maintenance of immune tolerance: high molecular weight hyaluronan promotes persistence of induced CD4+CD25+ regulatory T cells // J Leukoc Biol. – 2009. – № 86. – P. 567–572.*

[13] *Bollyky P.L., Wu R.P., Falk B.A. et al. ECM components guide IL-10 producing regulatory T-cell (TR1) induction from effector memory T-cell precursors // Proc Natl Acad Sci, USA. – 2011. – № 108. – P. 7938–7943.*

[14] *Day A.J., de la Motte C.A. Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation? // Trends Immunol. – 2005. – № 26. – P. 637–643.*

[15] *Stellavato A., Corsuto L., D'Agostino A., La Gatta A., Diana P., Bernini P., et al. (2016) Hyaluronan Hybrid Cooperative Complexes as a Novel Frontier for Cellular Bioprocesses Re-Activation. PLOS ONE 11(10): e0163510.doi: 10.1371/journal.pone.0163510.*

[16] *D'Agostino A., Stellavato A., Busico T.: In vitro analysis of the effects on wound healing of high- and low-molecular weight chains of hyaluronan and their hybrid HHA/ L-HA complexes. BCM Cell Biology (2015) 16; 19.*

[17] *Chen W.Y.J., Abatangelo G. Functions of hyaluronan in wound repair. Wound repair and Regen 1999 (7): 79–89.*

[18] *Zhao J., Hu L., Liu J., Gong N., Chen L. The effects of cytokines in adipose stem cell-conditioned medium on the migration and proliferation of skin fibroblasts in vitro. Biomed Res Int. 2013; 2013: 578479. doi:10.1155/2013/578479.*

[19] *Safferling K., Sütterlin T., Westphal K., Ernst C., Breuhahn K., James M., Jäger D., Halama N., Grabe N. Wound healing revised: a novel reepithelialization mechanism revealed by in vitro and in silico models. J Cell Biol. 2013; 203(4): 691–709.*

[20] *Hettler A., Werner S., Eick S., Laufer S., Weise F. A new in vitro model to study cellular responses after thermomechanical damage in monolayer cultures. PLoS One 2013; 8 (12): e82635.*

[21] *Varani J., Dame M.K., Rittie L., Fligiel S.E., Kang S., Fisher G.J. et al. Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. Am J. Pathol 2006; 168 (6): 1861–1868.*

[22] *Baumann L. Skin ageing and its treatment. J Pathol 2007; 211(2): 241–251.*

[23] *Wang T.W., Sun J.S., Huang Y.C., Wu H.C., Chen L.T., Lin F.H. Skin basement membrane and extracellular matrix proteins characterization and quantification by real time RT-PCR. Biomaterials 2006; 27(29): 5059–5068.*

[24] *Кругликов И. Дермальные адипоциты в дерматологии и эстетической медицине: факты и гипотезы // Эстетическая медицина. – 2016. – № 3 (15). – С. 281–287.*

[25] *Stellavato A., et all. Hybrid complexes of high and low molecular weight hyaluronans highly enhance HASCs differentiation: implication for facial bioremodelling. // Cell Physiol Biochem 2017; 44:1078-1092.*