

ПОРІВНЯЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТИЗГОРТАННОЇ АКТИВНОСТІ КОМБІНОВАНИХ РОЗЧИНІВ ДИГІДРОКВЕРЦЕТИНУ З ГІАЛУРОНОВОЮ КИСЛОТОЮ

Семенова К.М.¹, Носальська Т.М.²

¹Національний фармацевтичний університет

²Інститут мікробіології та імунології ім. І. І.
Мечникова НАМН України

Потреба косметологічних процедур зростає з кожним роком, особливо це стосується ін'єкційних та апаратних методик. Сьогодні існує безліч методів «стирання слідів віку з особи». Це ін'єкційні методики, біоревіталізація, редермалізація, запровадження ботулотоксину, контурна пластика тощо. Значна кількість дерматокосметологічних процедур пов'язана з первинним ушкодженням епідермісу, дерми та кровоносних судин. Більшість ускладнень, що розвиваються в результаті косметологічних втручань, є неспецифічними і формуються як внаслідок безпосереднього пошкодження цілісності шкірного покриву, так і внаслідок запальної реакції та гематом. В останні роки значно зросла кількість процедур об'ємної пластики, проведених косметологами з метою омолодження обличчя. Дермальні філери на основі стабілізованої гіалуронової кислоти є найбільш популярним ін'єкційним матеріалом, який є в даний час для корекції недостатніх об'ємів м'яких тканин обличчя [1]. В естетичній корекції, серед малоінвазивних процедур, за популярністю контурна пластика посідає друге місце після ботулінотерапії [2].

Одними з найчастіших явищ після ін'єкційних процедур, які зазвичай не становлять суттєвої загрози, проте є естетично небажаними, є крововилив у м'які тканини. Дані явища виникають у зв'язку з ушкодженням (внаслідок прямої травми чи компресії) кровоносних судин. Згідно з даними літератури, крововиливи частіше розвиваються при більш поверхневому (підшкірному) введенні матеріалу з використанням віялової та лінійної техніки, ніж при ін'єкції у глибокі шари [3-5]. Залежно від поширеності виділяють петехії, екхімози, геморагічні просочування та гематоми. Терміном «гематома» позначають організоване скупчення згорнутої або рідкої крові в м'яких тканинах, яка може розташовуватися як поверхнево - під шкірою або зовнішніми слизовими оболонками, так і в глибині м'язів.

Серед факторів, що підвищують ризик виникнення крововиливів, виділено нестероїдні протизапальні засоби (НПЗЗ), антикоагулянти,

антиагреганти, також потенційно здатні вплинути на тонус кровоносних судин топічні глюкокортикостероїди, топічні інгібітори кальциневрину. Артеріальний тиск крові, що перевищує 150/100 мм рт. ст., у 2,6 рази збільшує частоту утворення гематом [6]. Як правило, гематома в підшкірній клітковині пов'язана з утворенням обмеженої, щільної, болісночутливої набряклості. У перші хвилини шкіра над місцем ушкодження може червоніти, потім стає багряно-синюшною. Через 2-3 дні область гематоми стає жовтуватою, а через 4-5 днів набуває зеленого відтінку. Одночасно гематома може зміщуватись вниз під дією сили тяжіння.

Для усунення розсмоктування та відцвітання гематом використовують різні засоби: креми, примочки, мазі тощо. Враховуючи літературні дані про властивості гіалуронової кислоти (ГК) та потужного природного антиоксиданту – біофлавоноїду дигідрокверцетину (ДГК) нами було проведено дослідження щодо створення ін'єкційного препарату на їх основі для швидкого впливу на підшкірні гематоми [7-9].

Дигідрокверцетин (ДГК) відноситься до групи фенольних сполук, що мають високу антиоксидантну активність. ДГК гальмує процеси перекисного окислення ліпідів клітинних мембран, перешкоджає дії вільних радикалів, що ушкоджує, уповільнює передчасне старіння клітин і розвиток різних захворювань. ДГК працює на рівні клітинних мембран, сприяє покращенню мікроциркуляції за рахунок розвитку колатерального кровообігу. Він також пригнічує генерацію специфічних цитотоксичних Т-лімфоцитів, запобігаючи розвитку посттравматичних запальних процесів. ДГК зміцнює стінки кровоносних судин та капілярів, оберігає стінки судин від пошкодження, нормалізує проникність судинної стінки, знижує в'язкість крові, відновлює мікроциркуляцію, знижує тромбоутворення. Він має виражену капіляророзміцнювальну дію і перевершує кверцетин і рутин. При введенні в інтерстиціальний матрикс наповнений ексудатом ВГК спільно з ДГК виступають інгібіторами запалення, є повністю фізіологічними по відношенню до організму людини, на відміну від синтетичних лікарських засобів.

Гіалуронова кислота, в свою чергу, є «золотим» стандартом біоревіталізації і anti-age (анти вікової) мезотерапії. Більшість препаратів для контурної пластики вироблені на основі ГК, крім того, велика кількість зовнішніх засобів для догляду за шкірою (сироватки, креми, маски і навіть засоби для очищення шкіри) містять її в своєму складі. В організмі ГК (глікозаміноглікан) представлена в різних органах, у шкірі входить до складу екстрацелюлярного матриксу дерми, забезпечуючи гідrataцію, тургор і «наповненість» дерми. Гіалуронова кислота здатна утримувати велику

кількість молекул води, забезпечуючи свій внесок у формування механічних властивостей дерми.

Сьогодні препарати ГК стали базовими в галузі естетичної медицини та основними терапевтичними засобами для омолодження шкіри. Основною метою введення ГК у шкіру є поповнення гідратаційного резерву тканин, відтворення в ній природних умов для функціонування клітин та, таким чином, активації механізму авторегуляції синтезу ендогенної нативної гіалуронової кислоти та інших компонентів позаклітинного матриксу дерми. При введенні ГК у шкіру відбувається відновлення міжклітинної речовини та таких її властивостей, які забезпечують пластичність та тургор тканин, водного балансу в тканинах, зв'язування та виведення токсинів та шлаків, забезпечення рецептор-опосередкованої стимуляції клітин шкіри, у тому числі фібробластів, підвищення ендогенного синтезу молекул ГК. У результаті запускається механізм ауторегуляції за принципом зворотного зв'язку: стимуляція диференціювання мезенхімальних клітин у фібробласти фіброцитами, опосередкована стимуляція колагено- та еластиногенезу, стимуляція ангиогенезу. Таким чином, ГК дозволяє фізіологічним шляхом максимально відновити і простимулювати структури шкіри, що тривалий час піддавалися шкідливим факторам, що пошкоджують впливу, на тлі постійних процесів природного (генетично запрограмованого) старіння [10,11].

Крім того, суттєве зниження природного вмісту в організмі кількості та якості ГК з віком підтверджує необхідність застосування препаратів для заміщення та заповнення втрачених фізико-біохімічних властивостей шкіри [12].

Метою роботи – було порівняльне дослідження протизгортанної активності розчинів ДГК з ГК.

Експериментально знайдені співвідношення компонентів комбінованого препарату, які в

визначених межах забезпечують отримання стабільних при зберіганні розчинів.

Дуже важливим для таких розчинів є значення рН. Саме кількісним і якісним складом діючих та допоміжних речовин досягається значення рН розчину, що знаходиться в інтервалі 6,6-7,6.

Матеріали та методи

Дослідження проведено *in vitro* за методом Моравиця. Метод Моравиця полягає в тому, що на скло наносять краплю крові діаметром 4-6 мм, потім поверхню краплі проводять скляним капіляром через кожні 30 с. Час згортання фіксують з появою перших фібринових ниток, які тягнуться за капіляром.

Об'єктом дослідження були зразки ін'єкційних розчинів ДГК з ГК:

- ДГК із ПВП (Повідон К-17) 5%, рН 7,28 (серія 1020919);

- ДГК із ГК та L-аргініном, рН 7,42 (серія 2160220).

З цією метою на годинне скло №1 - наносили до 2 крапель крові щурів (приблизно 0,1 мл) не додавали ніяких речовин (інтактний контроль), №2 – до крові додавали 0,05 мл фізіологічного розчину (контроль №2) №3 – до крові додавали 0,05 мл ДГК (серія 1020919), №4 – до крові додавали 0,05 мл ДГК з ГК та L-аргініном (серія 2160220). По поверхні краплі кожні 30 з проводили тонкою голкою. Час згортання визначали з моменту появи перших фібринових ниток, що тягнуться за голкою.

Результати та обговорення

В результаті проведеного дослідження (таблиця 1) встановлено, що час згортання крові (інтактний контроль) за відсутності її контакту з будь-якою речовиною становив у середньому 3,63 с.

Таблиця 1. Вплив розчинів ДГК і ДГК з ГК на систему згортання крові

Досліджувані речовини	Час згортання, с
Інтактний контроль	3,63 ± 0,22
Фізіологічний розчин	4,93 ± 0,23
ДГК з 5% ПВП	6,92 ± 0,16 * **
ДГК з ГК та L-аргініном	13,34 ± 0,45 * ** *

Примітка: * - достовірність відмінностей ($P < 0,001$) порівняно з контролем; ** - достовірність відмінностей ($P < 0,001$) проти фізіологічного розчину; *** - достовірність відмінностей ($P < 0,001$) порівняно з ДГК із 5% ПВП

Додавання до крові фізіологічного розчину на 35% збільшувало час зсідання крові, можливо, за рахунок її розведення. Додавання розчину ДГК з 5% ПВП достовірно збільшувало час згортання крові на 40,36% порівняно з фізіологічним розчином та майже в 2 рази порівняно з інтактним контролем. При додаванні до крові розчину ДГК з ГК та L-аргініном час згортання збільшувався значно – у 2,7 рази

порівняно з таким при додаванні фізіологічного розчину та у 2 рази – порівняно з розчином ДГК з 5% ПВП.

Таким чином, у дослідах *in vitro* встановлено, що розчин ДГК з ГК значно збільшує час згортання крові. Зазначене свідчить про вплив комбінованого розчину (ДГК, ГК, L-аргінін) на реологічні властивості крові.

Висновки

Проведене in vitro порівняльне дослідження протизгортанної активності комбінованих розчинів показало, що найбільш виражено на гемостаз впливає комбінований розчин (ДГК, ГК L-аргінін) (серія 2160220). Проведені дослідження важливі для подальшого вивчення властивостей композиції на основі дигідрокверцетину, гіалуронової кислоти та L-аргініну.

Comparative study of the anticoagulant activity of combined solutions of dihydroquercetin with hyaluronic acid

Semenova K.M., Nosalskaya T.M.

Introduction. The need for cosmetology procedures grows every year, especially for injection and hardware techniques. In aesthetic correction, among minimally invasive procedures, contour plastic ranks second in popularity after botulinum therapy. One of the most frequent phenomena after injection procedures, which usually do not pose a significant threat, but are aesthetically undesirable, is hemorrhage into soft tissues. Various means are used to eliminate resorption and fading of hematomas: creams, lotions, ointments, etc. Taking into account the literature data on the properties of hyaluronic acid (HA) and a powerful natural antioxidant - the bioflavonoid dihydroquercetin (DHA), we conducted a study on the creation of an injectable drug based on them for a quick effect on subcutaneous hematomas. **Materials and methods.** The study was carried out in vitro according to the Moravyts method. The object of the study were samples of injection solutions of DHA with HA: - DHA with PVP (Povidone K-17) 5%, pH 7.28; - DHA with HA and L-arginine, pH 7.42. Up to 2 drops of rat blood (approximately 0.1 ml) were applied to the hour glass, no substances were added (intact control), 0.05 ml of physiological solution was added to the blood (control No. 2), 0.05 ml of DHA was added to the blood (experiment 1), 0.05 ml of DHA with HA and L-arginine was added to the blood (experiment 2). **Results and discussion.** As a result of the conducted research, it was established that the blood clotting time (intact control) in the absence of its contact with any substance was an average of 3.63 seconds. Addition of saline solution to blood by 35% increased blood clotting time, possibly due to its dilution. Addition of DHA solution with 5% PVP significantly increased blood clotting time by 40.36% compared to saline and almost 2 times compared to the intact control. When adding a DHA solution with HA and L-arginine to the blood, the coagulation time increased significantly - 2.7 times compared to that when adding a physiological solution

and 2 times - compared to a DHA solution with 5% PVP

Conclusion. An in vitro comparative study of the anticoagulation activity of combined solutions showed that the combined solution (DHA, HA L-arginine) has the most pronounced effect on hemostasis. The conducted studies are important for the further study of the properties of the composition based on dihydroquercetin, hyaluronic acid and L-arginine.

Keywords: solution, anticoagulant activity, dihydroquercetin, hyaluronic acid, hematoma.

References

1. Andre, P., Lowe, N. J., Parc, A., Clerici, T. H., Zimmermann, U. Adverse reactions to dermal fillers: a review of European experiences. *J. Cosmetic Laser Ther.* 2005. 7. 3-4. P. 171-176.
2. Zhao, P., Zhao, W., Zhang, K., Lin, H., Zhang, X. Polymeric injectable fillers for cosmetology: current status, future trends, and regulatory perspectives. *J. Appl. Polymer Sci.* 2020. 137. 25. P.1-14.
3. Funt, D., Pavicic, T. Dermal fillers in aesthetics: an overview of adverse events and treatment approaches. *Clin. cosmetic invest. dermatol.* 2013. 295-316.
4. Klein, A. W. Complications and adverse reactions with the use of botulinum toxin. *Disease-A-Month.* 2002. 48. 5. H. 336-356.
5. Lowe, P. L., Patnaik, R., Lowe, N. J. comparison of two botulinum type A toxin preparations for the treatment of glabellar lines: double-blind, randomized, pilot study. *Dermatol. Surg.* 2013. 31, 12. P. 1651-1654.
6. Zhuchkov, M. V., Bolshakova, E. E., Sonin, D. B., Zhuchkova, U. V. Prevention of hematomas in the induction of injection cosmetology interventions. *Vestnik dermatol. venerol.* 2018. 94. 6. P. 31-36.
7. Papakonstantinou, E., Roth, M., Karakiulakis, G. Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. *Dermato-endocrinol.* 2012. 4. 3. P.253-258.
8. Price, R. D., Berry, M. G., Navsaria, H. A. Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *J Plastic, Reconstruct. Aesthetic Surg.* 2007. 60. 10. P. 1110-1119.
9. Weidmann, A. E. Dihydroquercetin: More than just an impurity? *European J.Pharmacol.* 2012. 684. 1-3. P. 19-26.
10. Farwick, M., Lersch, P., Strutz, G. Low molecular weight hyaluronic acid: its effects on epidermal gene expression & skin ageing. *SÖFW J.* 2008. 134. 11, P. 2-6.
11. Korkunda, S. V., Grigoryeva, T. G. Pathogenetic aspects of drug provision in plastic surgery. *Journal. "Emergency Medicine",* 2014. 8 (63). P. 64-73.
12. Dangoisse, C. Dermo-cosmetics and prevention of skin aging. *Rev. Med. Bruxell.* 2004. 25. 4. A. 365-370.