



В.А. Березовский¹, О.В. Богомолец²,
Н.Н. Деркач³, И.Г. Литовка¹, С.П. Весельский⁴,
Л.Л. Лукаш⁵, Т.А. Рубан⁵, Р.В. Янко¹

¹Институт физиологии имени А.А. Богомольца
НАН Украины, Киев

²Институт дерматокосметологии
доктора Богомолец, Киев

³Национальный институт фтизиатрии и пульмонологии
имени Ф.Г. Яновского, Киев

⁴Научно-исследовательский институт физиологии
имени академика Петра Богача, Киев

⁵Институт молекулярной биологии и генетики НАН
Украины, Киев

К вопросу об экзогенной регуляции физиологической регенерации кожи человека

Ключевые слова

Кожа, экзогенная регуляция, физиологическая регенерация, «Гиалуаль».

Проблема борьбы с преждевременным старением организма имеет большую историю и будет беспокоить умы еще многих поколений исследователей. Уместно вспомнить, что говорил об этом один из первых исследователей А.А. Богомолец.

«...Еще в расцвете сил умственные способности, по-прежнему нормален состав желудочного сока, почки дают достаточно концентрированную мочу. Еще нет ни одышки, ни головокружений, а около глаз уже появилась предательская лучистость и обозначились печальные складки у углов рта: парабола жизни прошла через свою вершину. Приходит старость. Старение соединительной ткани наступает раньше, нежели старческие изменения клеток нервной системы, печени, почек и других органов. Эти изменения являются в значительной степени последствием нарушения трофической функции физиологической системы соединительной ткани. Эта система является как бы корнем организма. Подобно тому, как от состояния корня в значительной степени зависит жизнь и долголетие растения, так и состояние клеток физиологической системы соединительной ткани имеет аналогичное влияние на организм животного и человека» [1].

Но если во времена И.И. Мечникова соединительную ткань рассматривали как «неблаго-

родную», призванную лишь защищать организм от вторжения в его внутреннюю среду инородных частиц и микробных тел, то А.А. Богомолец придавал ей гораздо более разнообразные функции и весьма важную роль. В частности он предположил, что по аналогии с другими системами имеет смысл говорить о физиологической системе соединительной ткани (ФССТ), которой присущи следующие важные для всего организма свойства:

а) трофическая функция, нарушение которой может быть причиной различных болезненных состояний и особенно одной из причин преждевременного старения организма. «Я высказал положение: «Человек имеет возраст своей соединительной ткани»;

б) пластическая функция, то есть активное участие клеток соединительной ткани в заживлении ран и язв, срастании переломов, в процессах физиологической и репаративной регенерации тканей;

в) указанная еще Мечниковым защитная функция — выработка веществ, способствующих уничтожению проникших в организм микробов и поглощение микробов клетками соединительнотканного происхождения — фагоцитами;

г) антибластомная реакция, то есть противодействие организма развитию в органах и тканях злокачественных новообразований. Эта роль

столь важна, что ученый высказал тезис: «Рак не может развиваться в организме, физиологическая система соединительной ткани которого сохранила достаточную реактивность» [2].

Исследования последних десятилетий, посвященные молекулярным структурам соединительной ткани, показали, что ее клеточные элементы представлены фибробластами, миофибробластами, фиброкластами, механоцитами, лейомиоцитами, макрофагами (гистиоцитами) Т- и В-лимфоцитами, тучными клетками (лаброцитами). Кроме того, ФССТ содержит внеклеточно расположенные волокнистые элементы. Они представлены коллагеновыми и эластиновыми волокнами, погруженными в основное вещество. При исследовании в световом микроскопе оно имело вид гомогенной, аморфной полупрозрачной структуры. Только при рассмотрении на электронном микроскопе обнаружена структурированность основного вещества. Оно состоит из мельчайшей сети микроволокон и мелких гранул.

Основное вещество ФССТ состоит из мукополисахаридно-белковых комплексов. В него входят гликопротеины, мукопротеины, мукопротеиды, протеогликаны (гликозаминогликаны). Они создают определенную, но достаточно изменчивую динамическую вязкость, зависящую от формы и степени межмолекулярных взаимосвязей. В каждом органе существует своеобразный каркас, представленный элементами соединительной ткани — основным веществом, внеклеточными волокнистыми структурами и клетками. Их соотношение в каждом органе неодинаково. Часть органов практически полностью представлена структурами ФССТ. Это селезенка, трахея, кости, связки, суставы, роговица. В общей массе белков организма на долю ФССТ приходится 65 %. Она также содержит 75 % общей массы воды, 85 % общей массы тела и 90 % массы запасов кальция в организме [6].

Фибробласты (ФБ) являются основным клеточным элементом среднего слоя кожи, называемого собственно дермой. Кроме ФБ, дерма содержит и другие типы клеток, коллагеновые и эластиновые волокна, а также гликозаминогликаны, формирующие основное межклеточное вещество. Двойная капиллярная сеть дермы, потовые и сальные железы кожи обеспечивают полноценное ее функционирование как барьерного, терморегуляторного и иммунного органа.

Основная функция ФБ — синтезировать и воссоздавать межклеточное вещество, а также большое количество биологически активных веществ [3]. Среди них можно выделить несколько

факторов роста, компоненты внеклеточного матрикса и ферменты, с помощью которых осуществляется деструкция и реновация коллагена, и гиалуроновую кислоту. Эти же биохимические системы, используя соответствующие субстраты, синтезируют эти молекулы заново. Процесс физиологической реновации кожи происходит непрерывно, благодаря чему межклеточное вещество постоянно обновляется. Важную роль в этом процессе играет метаболизм гиалуроновой кислоты. Являясь одним из наиболее распространенных компонентов различных видов соединительной ткани, она имеет исключительное значение в развитии дистрофических процессов при старении. Гиалуроновая кислота одновременно осуществляет две функции:

- структурную — взаимодействует с другими гликозаминогликанами экстрацеллюлярного матрикса;
- регуляторную — связывает воду и соли, взаимодействует с биомакромолекулами: белками, липидами, липопротеидами, рецепторами клеточной поверхности [8].

Способность гиалуроновой кислоты образовывать высоковязкие водные растворы, комплексы с белками, участвовать в транспорте и распределении воды, в ионном обмене, образовании внеклеточного матрикса, обеспечивать избирательную проницаемость тканей, поддерживать мигрирующие клетки в диспергированном состоянии свидетельствует о ее важной роли в поддержании межклеточного и клеточного гомеостаза [5, 10]. Таким образом, возрастные изменения степени гидратации, определяющей тургор кожи, во многом определяются активностью и фазовым состоянием гиалуроновой кислоты.

Как и во всех органах и тканях организма человека, в коже происходят возрастные изменения структуры и функции. Одной из первых утрачивается способность к синтезу коллагена, что влияет на степень полимеризации гликозаминогликанов и синтез гиалуроновой кислоты. При старении кожи снижается пролиферативная и биосинтетическая активность ФБ. В то же время катаболические процессы долгое время остаются на прежнем уровне. В течение репродуктивного возраста содержание коллагена ежегодно уменьшается на 1 %. В постменопаузальный период процесс идет интенсивнее, что приводит к снижению коллагена кожи до 30 % в течение первых пяти лет [9]. Поэтому в стареющей коже постепенно уменьшается толщина дермы, содержание влаги. Кожа теряет тургор, упругость и эластичность. Вследствие этого увеличивается ее поверхность, появляются складки, образуются морщины [4].

Цель работы — исследование возможности экзогенной регуляции темпов физиологической регенерации фибробластов кожи человека, культивируемых *in vitro*, с различными сочетаниями сукцината и гиалуроновой кислоты.

Материалы и методы

Получение и культивирование ФБ, выделенных из биоптата кожи человека, проводили по стандартной методике. Клетки выращивали в режимах, описанных и опубликованных ранее [9]. На пластиковые чашки Петри (диаметром 40 мм) в среде ДМЕМ + 10 % FBS (Sigma) высевали по 50 тыс. клеток на чашку и инкубировали в условиях насыщающей влажности при 37 °С в атмосфере воздуха с добавлением 5 % CO₂. Количество клеток в чашках Петри определяли на 4-е и 6-е сутки после их посева. Клетки снимали при помощи версена (ЭДТА) и трипсина (0,25 %) в соотношении 1 : 1. Подсчет живых клеток проводили в камере Горяева после окрашивания 0,1 % трипановым синим.

Эффективность воздействия различных регуляторов пролиферации определяли, подсчитывая количество ФБ в чашках Петри с различными добавками к стандартной ростовой среде ДМЕМ с 10 % фетальной сыворотки быка: сукцинат, гиалуроновой кислоты (субстрат 1), «Гиалуаль» (2,2 %, субстрат 1), «Гиалуаль» (1,8 %, субстрат 1). В качестве контроля использовали культуру фибробластов, выращенных в среде ДМЕМ + 10 % FBS.

В культуральной жидкости методом тонко-слойной хроматографии определяли концентрацию свободных аминокислот. Для этого к 1 мл бесклеточной среды добавляли 2 мл спирт-ацетона (1:3), перемешивали и через 30 мин центрифугировали. Супернатант собирали в пробирку и упаривали до 1 мл. Для определения свободных аминокислот на хроматографическую бумагу наносили по 20 мкл супернатанта. Для разгонки использовали систему растворителей, которая включала изоамиловый спирт — бутиловый спирт — уксусную кислоту — муравьиную кислоту — воду (9 : 7 : 4 : 2 : 5) по объему.

В среде, кондиционированной ФБ, определяли С-терминальные пропептиды коллагена I типа (CICP, фирма Quidel, США) и СТХ-I терминальные телопептиды коллагена I типа (фирма IDS, США) методом иммуноферментного анализа.

Цифровые данные обрабатывали с использованием программного обеспечения Magellan, Microsoft Excell. Для определения вероятности различий между двумя выборками использовали t-критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

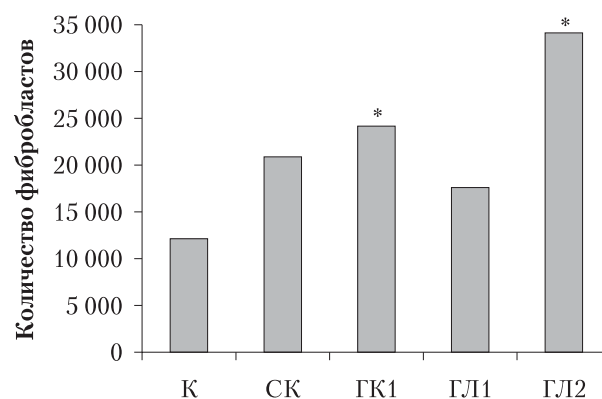
Сравнительный анализ подсчета культивируемых ФБ на третьи сутки после посева в контрольной (К) и экспериментальных (СК, ГК1, ГЛ1, ГЛ2) чашках Петри позволил выявить существенные различия по количеству клеток:

- 1) контроль (К) — 12 100
- 2) сукцинат + ростовая среда (СК) — 20 900
- 3) гиалуроновая кислота (субстрат 1) + ростовая среда (ГК1) — 24 200
- 4) «Гиалуаль» (2,2 %, субстрат 1) + ростовая среда (ГЛ1) — 17 600
- 5) «Гиалуаль» (1,8 %, субстрат 1) + ростовая среда (ГЛ2) — 34 100 (рис. 1).

Таким образом, количество фибробластов во второй пробе увеличилось на 73 %, в третьей — на 100 %, в четвертой — на 45 %, в пятой — на 182 % по сравнению с контролем. Иными словами, четыре стимулятора пролиферации ФБ произвели ожидаемый положительный эффект.

Для полной уверенности в репрезентативности полученных данных и соблюдения требований двойного контроля были подсчитаны клетки в ФБ человека на шестые сутки инкубации. Результаты второго эксперимента практически аналогичны предыдущему. В присутствии каждой исследуемой добавки интенсивность пролиферации возрастала, достигая максимума в группе ГЛ2.

Кроме чисто морфологического исследования, проведено также биохимическое исследование метаболической активности культуры ФБ, позволяющее судить о степени напряженности внутриклеточных процессов. Установлено, что концентрация свободных аминокислот, наиболее значимых для соединительной ткани, синтеза коллагена изменялась по-разному в эксперимен-



* p < 0,05 по сравнению с контролем

Рис. 1. Пролиферация фибробластов человека под влиянием стимуляторов роста в контрольном (К) и опытных образцах (СК, ГК1, ГЛ1, ГЛ2). Подсчет клеток осуществлен на 3-и сутки инкубации

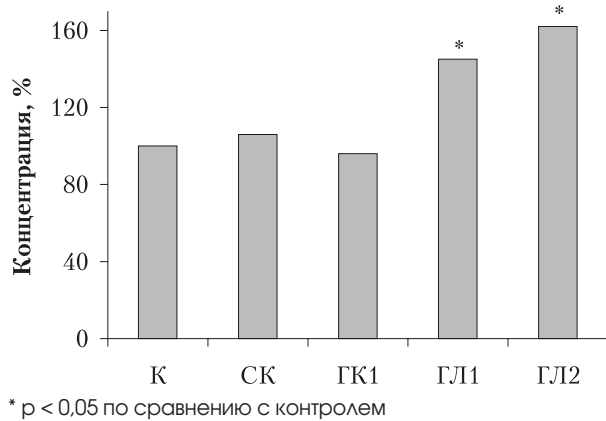


Рис. 2. Концентрация цистина в культуре клеток фибробластов в контрольном (К) и опытных образцах (СК, ГК1, ГЛ1, ГЛ2)

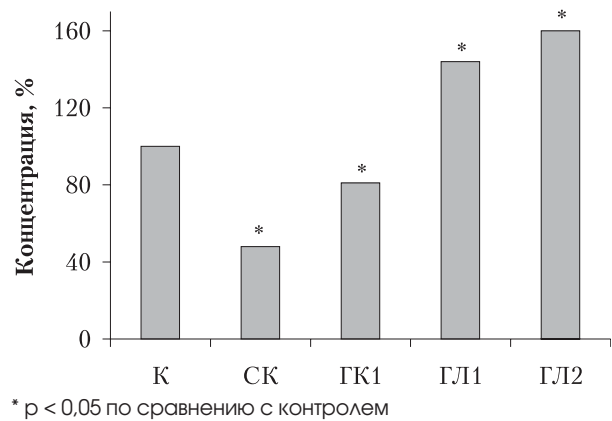


Рис. 3. Концентрация аргинина в культуре клеток фибробластов в контрольном (К) и опытных образцах (СК, ГК1, ГЛ1, ГЛ2)

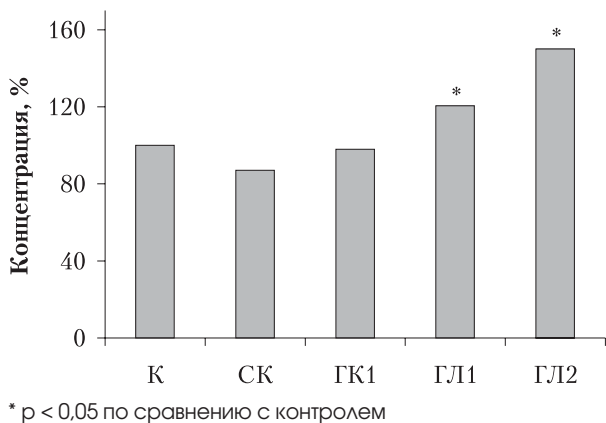


Рис. 4. Концентрация лизина в культуре клеток фибробластов в контрольном (К) и опытных образцах (СК, ГК1, ГЛ1, ГЛ2)

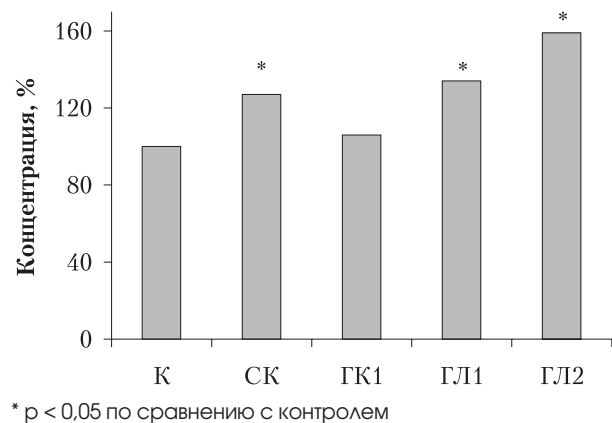


Рис. 5. Концентрация глицина и метионина в культуре клеток фибробластов в контрольном (К) и опытных образцах (СК, ГК1, ГЛ1, ГЛ2)

тальных образцах. Содержание цистина (укрепляет соединительную ткань) во второй пробе повысилось на 9 %. В третьей — практически не отличалось от контроля. В четвертой и пятой увеличилось на 45 и 64 % соответственно (рис. 2).

Концентрация аргинина (участвует в образовании коллагена) снизилась на 52 и 19 % соответственно во 2-й и 3-й пробах по сравнению с контрольными данными. Наиболее значимо возросла на 44 и 60 % в 4-й и 5-й (рис. 3).

Содержание лизина (дефицит замедляет синтез белка в соединительной ткани, участвует в образовании коллагена) во 2-й, 3-й пробах практически не отличалось от контроля. В 4-й и 5-й — увеличивалось на 20 и 50 % соответственно по сравнению с контрольными величинами (рис. 4).

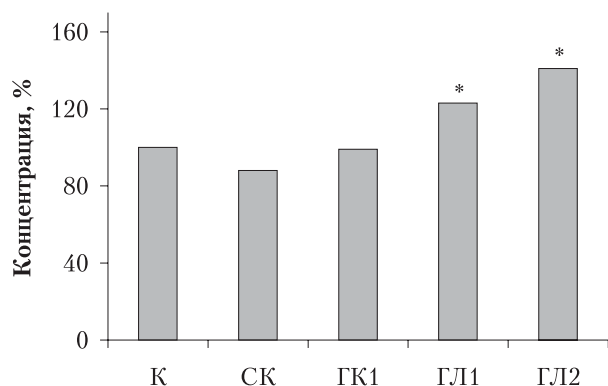
Концентрация глицина, дефицит которого приводит к нарушениям структуры соединительной ткани, и концентрация метионина — предшественника цистина и креатина — изменя-

лась однонаправленно в культуре клеток фибробластов. И первый, и второй показатели увеличивались во 2-й, 4-й и 5-й пробах на 27; 34; 59 % соответственно и практически не изменялись по сравнению с контролем в 3-й пробе (рис. 5). Эти данные практически соответствуют морфологическим показателям — подсчетам интенсивности пролиферации фибробластов при добавлении в среду инкубации различных стимуляторов физиологической активности клеток.

Содержание треонина (важная составляющая коллагена) во 2-й и 3-й пробах практически не отличалось от значений контроля и повышалось в 4-й и 5-й — на 23 и 41 % соответственно (рис. 6).

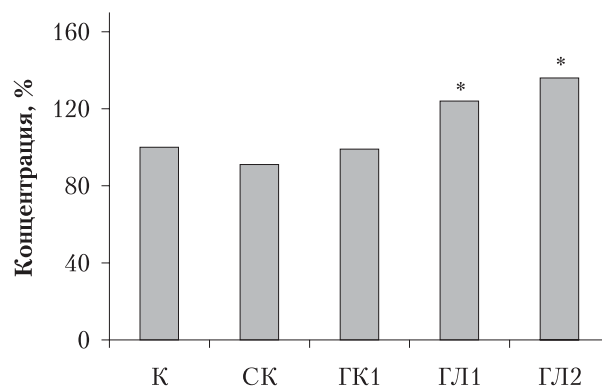
Концентрация пролина (основной элемент коллагена) и оксипролина во всех исследуемых образцах практически не отличалась от значений контроля.

Содержание фенилаланина (основного элемента в синтезе коллагена) во 2-й и 3-й пробах



* p < 0,05 по сравнению с контролем

Рис. 6. Концентрация треонина в культуре клеток фибробластов в контрольном (К) и опытных образцах (СК, ГК1, ГЛ1, ГЛ2)



* p < 0,05 по сравнению с контролем

Рис. 7. Концентрация фенилаланина в культуре клеток фибробластов в контрольном (К) и опытных образцах (СК, ГК1, ГЛ1, ГЛ2)

не отличалось от данных контроля. Повышение концентрации наблюдали в 4-й и 5-й пробах на 24 и 36 % соответственно (рис. 7).

Таким образом, препараты «Гиалуаль» (2,2 %) и «Гиалуаль» (1,8 %) при добавлении в культуру клеток ФБ способствовали достоверному повышению концентрации свободных аминокислот: цистина (укрепляет соединительную ткань) — на 45 и 64 % соответственно, аргинина (участвует в образовании коллагена) — на 44 и 60 %, лизина (дефицит замедляет синтез белка в соединительной ткани, участвует в образовании коллагена) — на 20 и 50 %, глицина (дефицит приводит к нарушениям структуры соединительной ткани) и метионина (предшественник цистина и креатина) — на 34 и 59 %, треонина (важная составляющая коллагена) — на 23 и 41 %, фенилаланина — на 24 и 36 %.

Выводы

Таким образом, исходя из полученных данных, добавление в культуру клеток фибробластов препаратов «Гиалуаль» (1,8 %) и «Гиалуаль» (2,2 %) способствует значительному росту клеток, синтезу коллагена и аминокислот неструктурированного матрикса основного вещества соединительной ткани кожи. Наиболее выраженный, стимулирующий метаболизм, эффект и рост фибробластов выявлен при добавлении комплекса ГЛ2, состоящего из 1,8 % гиалуроновой кислоты и сукцината натрия. Полученные результаты позволяют направить основное внимание дерматологов на максимально высокие потенциальные возможности комплекса ГЛ2 как для физиологического восстановления и омоложения стареющей кожи — редермализации, так и для профилактики старения.

Список литературы

1. Богомолец А.А. Продление жизни.— К.: Изд-во АН УРСР, 1938.— 92 с.
2. Богомолец А.А. Основные направления моих работ. Избранные труды в трех томах.— К.: Изд-во АН УРСР, 1958.— Т. 3.— С. 295—305.
3. Бозо И.Я., Деев Р.В., Пинаев Г.П. «Фибробласт» — специализированная клетка или функциональное состояние клеток мезенхимного происхождения? // Цитология.— 2010.— Т. 52, № 2.— С. 99—109.
4. Деркач Н.Н., Коржов М.В., Коржов В.И. О возможности коррекции некоторых биохимических процессов в коже при старении // Укр. журн. дерматол., венерол., косметол.— 2009.— № 3.— С. 45—49.
5. Кольман Я., Рем К.— Г. Наглядная биохимия.— М.: Мир, 2000.— 460 с.

6. Серов В.В., Шехтер А.Б. Соединительная ткань.— М.: Медицина, 1981.— 312 с.
7. Терехов С.М. Усовершенствованный метод клонирования диплоидных фибробластов человека // Цитология.— 1981.— Т. 23, № 6.— С. 717—718.
8. Camenisch T.D., McDonald J.A. Hyaluronan: is bigger better? // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.— 2000.— Vol. 23, N 4.— P. 431—433.
9. Patriarca M.T., Goldman K.Z., Santos J.M. et al. Effects of topical estradiol on the facial skin collagen of postmenopausal women under oral hormone therapy: A pilot study // Eur. J. Obstet. Gynec. Reprod. Biol.— 2007.— Vol. 130.— P. 202—205.
10. Tammi M.I., Day A.J., Turley E.A. Hyaluronan and homeostasis: a balancing act // J. Biol. Chem.— 2002.— Vol. 277, N 7.— P. 4581—4584.

В.Я. Березовський, О.В. Богомолець, Н.М. Деркач, І.Г. Литовка,
С.П. Весельський, Л.Л. Лукаш, Т.О. Рубан, Р.В. Янко

До питання про екзогенну регуляцію фізіологічної регенерації шкіри людини

Досліджено можливість екзогенної регуляції темпів фізіологічної регенерації фібробластів (ФБ) шкіри людини, що культивуються *in vitro*, з різними поєднаннями сукцинату і гіалуронової кислоти. Спостерігалось вірогідне збільшення кількості ФБ у культурі на 45 % «Гіалуаль» (2,2 %) та на 182 % «Гіалуаль» (1,8 %) порівняно з контролем. Препарати «Гіалуаль» (2,2 %) і «Гіалуаль» (1,8 %) при додаванні в культуру клітин ФБ сприяли достовірному підвищенню концентрації вільних амінокислот: цистину – на 45 і 64 % відповідно, аргініну – на 44 і 60 %, лізину – на 20 і 50 %, гліцину і метіоніну – на 34 і 59 %, треоніну – на 23 і 41 %, фенілаланіну – на 24 і 36 %. Результати дають підстави акцентувати увагу дерматологів на максимально високих потенційних можливостях комплексу «Гіалуаль» (1,8 %) як для фізіологічного відновлення та омолодження постарілої шкіри – редермалізації, так і для профілактики старіння.

V.A. Berezovsky, O.V. Bogomolets, N.N. Derkach, I.G. Lytovka,
S.P. Veselsky, L.L. Lykash, T.A. Ruban, R.V. Yanko

About the exogenous regulation of physiological regeneration of the human skin

Possibility of the exogenous regulation of rate of physiological regeneration of fibroblasts of the human skin that are cultivated *in vitro* with a different compounds of succine and hyaluronic acid are described. Probable increasing of fibroblasts in the culture of 45 % of *Hyalual* (2.2 %) and 182 % of *Hyalyal* (1.8 %) in comparison with control. *Hyalual* (2.2 %) after the adding of fibroblasts to the culture assisted to the valid increasing of the free amino acids concentration: cystine on 45 % and 64 %, arginine – 44 % and 60 %, lysine – 20 % and 50 %, glycine and metionine – 34 % and 59 %, treonine – 23 % and 41 %, phenyl and alanine – 24 % and 36 %. On the grounds of these results dermatologists should pay attention to the high potential of the *Hyalual* complex (1.8 %) for physiological skin renovation and aging prevention.