Биостимуляция и биоревитализация: влияние различных препаратов на фибробласты кожи человека

А. Авантажиато (A. Avantaggiato)

магистр эстетической медицины, Университет Тор Вергата (Рим, Италия)

А. Палмьери (A. Palmieri)

отделение экспериментальной, диагностической и специализированной медицины Болонского университета (Италия)

Ф. Каринчи (F. Carinci)

отделение морфологии, хирургии и экспериментальной медицины Университета Феррары (Италия)

М. Пасин (M. Pasin)

магистр эстетической медицины, Университет Тор Вергата (Рим, Италия)

Дж. Л. Бертуччи (G.L. Bertuzzi)

магистр эстетической медицины, Университет Тор Вергата (Рим, Италия)

Введение

Термином **«биостимуляция»** (БС) обозначают процесс (и процедуру) стимуляции функций фибробластов дермы, включая репликацию, синтез белка и продукцию компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ). Биостимуляцию можно индуцировать с помощью химического и/или физического воздействия. Для проведения химической (фармакологической) БС используется два протокола [1]:

- препарат 1 — полидезоксирибонуклеотиды (ПДРН) в сочетании с глюкозамина сульфатом (Gluc). Назначаются множественные интрадермальные инъекции по 0,05–1 мл коктейля, содержащего 5,623 мг (3 мл) ПДРН, 400 мг (3 мл) Gluc, 1 мл лидокаина и 0,5–1 мл раствора бикарбоната натрия. Процедуру повторяют каждые 7, 14, 21 и 28 дней.
- препарат 2 — Bio-NAC — содержит N-ацетилцистеин (NAC) и комплекс аминокислот (АК). Используется для проведения множественных интрадермальных инъекций: АК 8,5% (3 мл), NAC (0,4–0,8 мл), 1 мл лидокаина и 0,5–1 мл раствора бикарбоната натрия. Инъекции повторяются каждые 15 или 30 дней.

Препараты, содержащие комбинацию ПДРН и Gluc, оказывают противовоспалительный эффект. В клинической практике ПДРН применяются при заживлении ран, функции этих соединений опосредованы аденозиновыми рецепторами А2. Глюкозамина сульфат относится к нестероидным противовоспалительным средствам. Совмещение РДРН и Gluc в одном препарате обосновано тем, что заживление ран является крайне важным гомеостатическим процессом, который включает несколько фаз, перекрывающихся во времени: воспаление, ангиогенез, образование новой ткани и реорганизация.

Цель назначения комплекса Bio-NAC — стимуляция синтеза белка и обеспечение организма предшественником глутатиона (а именно NAC), являющимся важнейшим эндогенным антиоксидантом.

При проведении **биоревитализации** (БР) используется та же техника инъекций, однако другие препараты. Суть этого метода заключается в интрадермальном введении монопрепаратов гиалуроновой кислоты (ГК) или комплексных препаратов, включающих помимо ГК другие соединения (например, витамины).

Учитывая тот факт, что БС и БР положительно влияют на разные аспекты функционирования клеток кожи, было проведено экспериментальное исследование на клеточной культуре фибробластов с целью выяснения нюансов фармакологического действия препаратов (синтез и деградация ВКМ, метаболическая сигнализация), используемых в данных методах.

Материалы и методы

Исследование проводилось в соответствии с принципами Хельсинкской декларации (1964 г.). Протокол исследования был одобрен этическим комитетом, работающим с институтом, где проводилось исследование. Все участники подписали протокол добровольного информированного согласия на участие.

Первичная культура фибробластов дермы человека (ФДЧ)

Во время хирургических операций были взяты фрагменты кожи (дермы) здоровых добровольцев. Образцы переносили в колбы для клеточных культур площадью 75 см2, содержащие среду Игла, модифицированную по способу Дульбекко (DMEM) (Sigma-Aldrich Inc., США), с добавлением 20% фетальной телячьей сыворотки и антибиотиков: пенициллина 100 ЕД/мл и стрептомицина 100 мкг/мл (Sigma-Aldrich Inc.).

Клетки инкубировали во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2, при температуре 37°C. Среду заменяли на следующий день, затем дважды в неделю. Через 15 дней фрагменты ткани удаляли из колбы. Через 24 ч инкубации проводили сбор клеток.

Клеточные культуры

Для изучения механизмов действия препаратов для БС на втором этапе производили посев ФДЧ на слои, включающие:

- ПДРН 5,625 мг (Placentex integro, Mastelli, Италия) и Gluc 400 мг (Dona Rottapharm, Италия);
- NAC (Almus s.r.l., Pomezia, Италия) и 8,5% раствор АК. Последний препарат содержит ряд незаменимых аминокислот (изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, треонин, триптофан и валин) и несколько заменимых аминокислот (аланин, аргинин, гистидин, пролин, серин и цистеин) (Freamine III Baxter S.p.A., Италия) в концентрации 20 мг/мл.

Для исследования механизма действия препаратов для БР на втором этапе проводили посев фибробластов на три слоя с разным содержанием ГК:

- раствор нативной ГК 6,2 мг/мл с АК и витаминами (препарат Skinko E Viscoderm, Ibsa/Revitacare, Франция);
- гель на основе нативной ГК 10 мг/мл с полинуклеотидами (препарат Newest, Mastelli, Италия),
- гель на основе стабилизированной ГК 20 мг/мл в растворе хлорида натрия (препарат Restylane® Vital, Q-med, Швеция).

В качестве контроля использовали необработанные клетки, которые оставляли во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2 при температуре 37°C на 24 ч. По окончании этого времени проводили трипсинизацию и лизис клеток для экстракции РНК.

Процессинг РНК и полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени

Обратная транскрипция кодирующих ДНК (кДНК) проводилась непосредственно на лизате культуры клеток при помощи набора для исследования экспрессии генов TaqMan Gene Expression Cells-to-Ct (Ambion Inc., США), в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, при помощи специального буфера проводился лизис культуры клеток, и в этом растворе высвобождалась РНК. Лизат клеток подвергали обратной транскрипции в кДНК с помощью ферментов RT Enzyme Mix и соответствующего буфера для обратной транскрипции (RT-буфера) (Ambion Inc.).

В заключении проводилась амплификация (накопление копий) кДНК при помощи ПЦР в режиме реальном времени. Для этого использовался набор Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems,США), а для исследования генов был разработан специальный анализ. Реакции с красителем SYBR проводились в объеме 20 мкл на анализаторе ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems). Для каждой

Праймеры — короткие одноцепочечные ДНК, которые добавляют в избытке в реакционную смесь при проведении ПЦР. Они специфично (по принципу комплементарного спаривания) присоединяются к коротким участкам, ограничивающим выбранную мишень.

реакции использовались 10 мкл 2x Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), праймеры в концентрации 400 нмоль каждый и кДНК.

Во всех проводимых экспериментах использовался отрицательный контроль (вода), чтобы исключить влияние контаминации реагентов. Полимеразная цепная реакция проводилась в двух повторах.

Для количественной оценки экспрессии генов применялся метод ПЦР в режиме реального времени. Уровни экспрессии генов нормировались в соответствии с экспрессией конститутивного гена *Homo sapiens* — гена рецептора трансферрина 1 (TRFC). Экспрессия оценивалась по кратным изменениям в сравнении с экспрессией в необработанных ФДЧ. Для количественного анализа использовался метод дельта/дельта. Прямой и обратный праймеры для выбранных генов создавались при помощи программы Primer express (Applied Biosystems) и приведены в **таблице**.

Результаты

После 24 ч инкубации в клетках под действием препаратов для БС и, в меньшей степени, для БР происходила активация гена эластина (ELN) (**рис. 1**). С другой стороны, гиалуронатсинтаза 1 (HAS 1) в большей степени активизировалась под действием препаратов для БР, особенно при использовании препарата с наименьшей концентрацией ГК (Skinko E Viscoderm).

Таблица

Последовательности праймеров при анализе SYBR® Green		
Обозначение гена	**Название гена *Homo sapiens***	**Последовательность праймеров (5'>3')**
DSP	Десмоплакин	F-ATGACCTGAGGAGAGGACGAA R-AGGCTCTCTCTTTCCTGTACCAC
ELN	Эластин	F-CTAAATACGGTGCTGCTGGC R-CATGGGATGGGGTTACAAAG
HAS 1	Гиалуронатсинтаза 1	F-CTCGGAGATTCGGTGGACTA R-CGCTGATGCAGGATACACAG
GDF 6	Фактор роста и дифференцировки 6	F-CCCCACGAGTACATGCTGTC R-GAGCATGGACACATCAAACAA
IGF 1	Инсулиноподобный фактор роста 1	F-GCGCAATGGAATAAAGTCCT R-ACAGCGCCAGGTAGAAGAGA
ELANE	Нейтрофильная эластаза	F-CTACGACCCCGTAAACTTGCT R-CCTCACGAGAGTGCAGACGTT
HYAL 1	Гиалуроноглюкозаминидаза 1	F-ACAGATGTATGTGCAACACCG R-AAGGGCCCCAGTGTAGTGTC
MMP 13	Матриксная металлопротеиназа 13	F-AGTTCGGCCACTCCTTAGGT R-TGGTAATGGCATCAAGGGAT
MMP 2	Матриксная металлопротеиназа 2	F-TACGATGGAGGCGCTAATGG R-CGCATGGTCTCGATGGTATT
MMP 3	Матриксная металлопротеиназа 3	F-TTTCCCAAGCAAATAGCTGAA R-AGTTCCCTTGAGTGTGACTCG
TFRC 1	Рецептор трансферрина 1	F-CGCTGGTCAGTTCGTGATTA R-GCATTCCCGAAATCTGTTGT

На **рис. 2** показано влияние препаратов на экспрессию фактора роста и дифференцировки 6 (GDF 6), инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1) и десмоплакина (DSP). Фактор роста и дифференцировки в максимальной степени активировался под действием NAC/AK и PDRN/Gluc. Инсулиноподобный фактор роста в значительной степени ингибировался PDRN/Gluc и стимулировался остальными препаратами. Экспрессия DSP стимулировалась всеми изученными препаратами.

На **рис. 3** показаны эффект активизации гиалуронидазы 1 (HYAL 1) под действием изучаемых препаратов. Нейтрофильная эластаза (ELANE) — фермент, отвечающий за деградацию одного из волокнистых компонентов ВКМ — эластина, в меньшей степени активировалась ПДРН/Gluc.

На **рис. 4** показано влияние исследуемых препаратов на активность матриксных металлопротеиназ (ММП), ферментов, отвечающих за деградацию компонентов ВКМ. Все препараты усиливали их активность; только в отношении MMP13 было выявлено ингибирующее действие ПДРН/Gluc и слабое активирующее NAC/AK.

Десмоплакин — внутриклеточный белок, участвующий в формировании **десмосома**, межклеточных контактов, обеспечивающих прочное соединение клеток (как правило, эпителиальной или мышечной ткани).

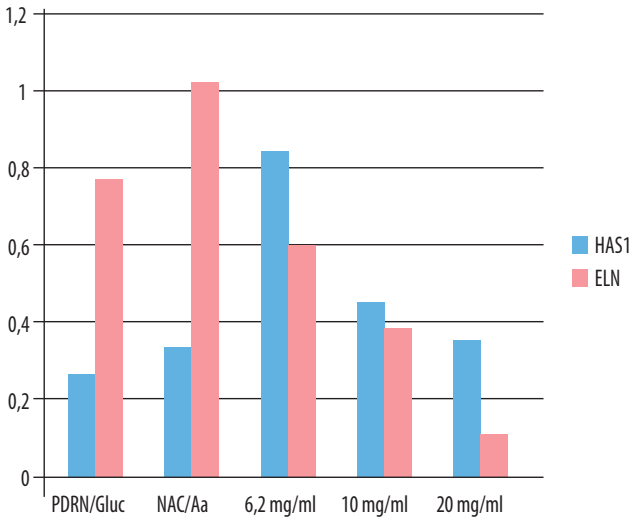


Рис. 1. Влияние препаратов для БР и БС на экспрессию гиалуронатсинтазы 1 и гена эластина после 24 ч инкубации

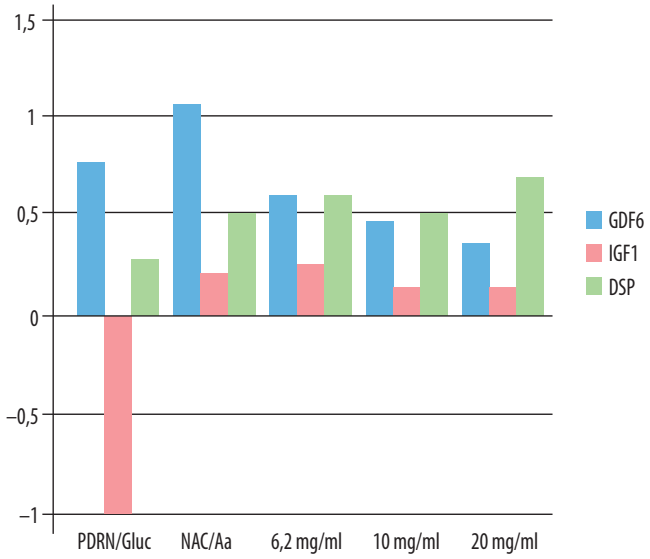


Рис. 2. Влияние препаратов для БР и БС на некоторые гены — фактора роста и дифференцировки 6 (GDF6), инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1) и десмоплакина (DSP)

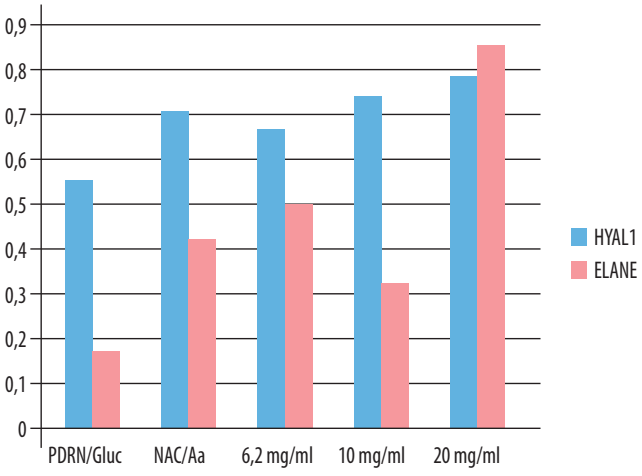


Рис. 3. Эффекты активации гиалуронидазы 1 (HYAL1) и нейтрофильной эластазы при всех видах воздействия

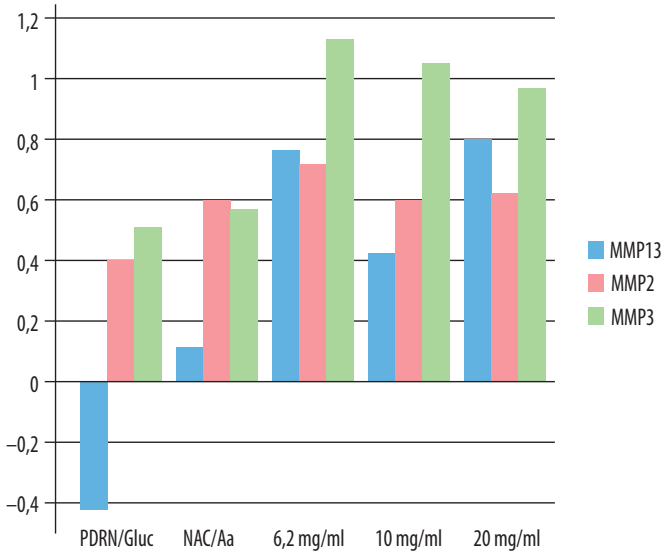


Рис. 4. Влияние препаратов для БР и БС на экспрессию матриксных металлопротеиназ

CD31 — гликопротеин, мембранный белок из суперсемейства иммуноглобулинов.

Трансглутаминаза — один из факторов свертывания крови.

Ангиопоэтин-1 — фактор роста, стимулирующий ангиогенез.

Обсуждение

Целесообразность использования препаратов ПДРН в процедурах БС обусловлена их ранозаживляющим действием, которое связано со способностью пуриновых нуклеозидов и дезоксирибонуклеотидов в микромолярных концентрациях стимулировать пролиферацию клеток и повышать внутриклеточный уровень цАМФ за счет увеличения внеклеточной концентрации аденозина [2]. Аденозин является продуктом катаболизма АТФ и выступает регулятором клеточных функций. На поверхности клетки располагается, по меньшей мере, четыре вида аденозиновых рецепторов. Они относятся к семейству 7-трансмембранных, сопряженных с G-белками рецепторов [3]. Подтип А2 участвует во многих адаптивных физиологических процессах [4]. По некоторым сообщениям, повышение содержания дезоксирибонуклеотидов и дезоксирибонуклеозидов оказывает митогенный эффект на фибробласты в культуре, и этот эффект управляется путем активации пуринергических рецепторов подтипа А2 [5].

После инъекции ПДРН у мышей с диабетом наблюдалась активация фактора роста эндотелия сосудов и повышение содержания белка в ране. Более того, у них отмечалось увеличение прочности тканей заживающей раны на разрыв, повышение CD31 и индукция экспрессии трансглутаминазы II и ангиопоэтина-1 [6]. Показано, что ПДРН стимулируют биосинтез нуклеиновых кислот и усиливают как пролиферацию клеток, так и синтез белка. В действительности, нуклеотиды и нуклеозиды, полученные в результате деградации ПДРН, могут либо играть роль передатчиков сигнала во внеклеточной среде, либо поглощаться клеткой в качестве субстрата. Во внутриклеточной среде они становятся поставщиками пуриновых и пиримидиновых колец для синтеза нуклеиновых кислот: использование таких «полуфабрикатов» позволяет в значительной степени повысить скорость и сэкономить энергию для синтеза НК по сравнению с реализацией *de novo* традиционных метаболических путей [7].

Глюкозамина сульфат относится к нестероидным противовоспалительным средствам, которые используются при лечении артроза коленных суставов. Он является одним из основных субстратов при синтезе гликозаминогликанов. Глюкозамин и уксусная кислота образуют N-ацетилглюкозамин, сополимеризация которого с глюкуроновой кислотой приводит к образованию ГК.

По данным литературы, в результате проведения БС гены, ответственные за формирование и деградацию волокнистого и аморфного компонентов ВКМ, активируются противоположным образом (см. рис. 1 и 3). В описываемом эксперименте наблюдали незначительную активацию HAS 1 (деградация ГК), но повышение в 2 раза активности HYAL 1 (синтез ГК), выраженную активацию ELN (синтез эластина) и очень слабую активацию ELANE (деградация эластина). Таким образом, на фоне проведения БС увеличивает синтез одного из волокнистых компонентов ВКМ — эластина и ускоряется деградация аморфного компонента — ГК. Т.е. происходит ремодуляция матрикса.

Цель использования второго препарата для БС — NAC/AK — повышение синтеза белка и одновременное обеспечение поступление предшественника глутатиона. Таким образом реализуется непрямой способ повышения уровня эндогенного антиоксиданта без вмешательства в гомеостаз. N-ацетилцистеин является предшественником аминокислоты цистеина, одного из трех компонентов глутатиона (гамма-глутамил-цистеин-глицин) [8]. Глутатион представляет собой антиоксидантную систему, работающую как внутри клетки, так и во внеклеточном пространстве. В клинической практике N-ацетилцистеин используется для проведения детоксикации при отравлении ацетаминофеном (парацетамолом), а также в качестве муколитика [9], он проявляет множество других видов биологической активности. N-ацетилцистеин является антиоксидантом, гепатопротектором, усиливает действие нитроглицерина, способствует синтезу глутатиона и угнетает синтез липопротеинов и гомоцистеина (антиатеросклеротическое действие) [10]. N-ацетилцистеин может защищать нервные клетки от апоптоза [11]. Эффект действия на фибробласты комплекса NAC/AK во многом похож на действие комплекса PDRN/Gluc, но в случае

NAC/AK не наблюдалось столь выраженного ингибирования IGF 1. Причины такой ингибирующей активности PDRN/Gluc на сегодняшний день неизвестны, хотя в некоторых исследованиях на животных и людях-долгожителях проводятся параллели между снижением уровня гормона роста или IGF 1 и длительностью и качеством жизни [12, 13].

При проведении БР используется та же техника инъекций, что и при БС, однако препараты для БР являются, как правило, изделиями медицинского назначения и содержат ГК различных типов и в разной концентрации. Гиалуроновая кислота представляет собой высокомолекулярный полисахарид, который входит в состав внеклеточного матрикса, в особенности рыхлой соединительной ткани. Гиалуроновая кислота синтезируется на плазматической мембране фибробластов путем присоединения сахаридных остатков к восстанавливающемуся концу цепи, в то время как невосстанавливающийся конец выступает во внеклеточное пространство. Полимерная цепь состоит из повторяющихся дисахаридов, которые включают N-ацетилглюкозамин и глюкуроновую кислоту [14]. Биологические функции ГК включают регуляцию пролиферации, миграции и дифференцировки клеток, поддержание гидробаланса во внеклеточном пространстве и гомеостаза белков. Препараты ГК широко используются в эстетической медицине благодаря своим гидратирующим свойствам, но надо уточнить — ГК выполняет не только роль филлера и гидратанта. Известны два вида рецепторов ГК: кластер дифференцировки 44 (CD 44), располагающийся на плазматической мембране, и рецептор гиалуронан-опосредованной подвижности клеток, расположенный в цитоплазме. Взаимодействием с данными рецепторами опосредовано участие ГК в движении клеток, пролиферации и ангиогенезе [15]. Некоторые авторы полагают, что взаимодействие ГК с рецепторами различается в зависимости от размера молекулы [16, 17]. Однако другие исследователи отмечают, что добавление ГК к культуре фибробластов приводит к ингибированию клеточной пролиферации, причем этот эффект находится в прямой зависимости от концентрации ГК, но не зависит от ее молекулярной массы. Возможное объяснение этого феномена: после взаимодействия с рецептором CD 44 и попадания внутрь клетки ГК всегда находится во фрагментированном состоянии [18].

В проведенных экспериментах ГК присутствовала либо в качестве препарата для БР, либо в роли праймера для HAS 1 и HYAL 1. По результатам исследования, при использовании препарата с наименьшей концентрацией ГК (Skinko E Viscoderm) наблюдалась мощная стимуляция HAS 1, т.е. активизация синтеза этого биополимера (см. рис. 1). Все тестируемые препараты вызывали стимуляцию гиалуронидазы (HYAL 1).

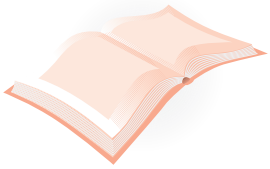
Деградация ВКМ является важным элементом репаративных процессов. Она регулируется матриксными металлопротеиназами (ММП) и их тканевыми ингибиторами. В организме человека имеется 24 подтипа ММП. В описанном эксперименте ММП 3 активировалась только в процедурах БР, ММР 2 активировалась в одинаковой степени во всех случаях, а ММР13 в значительной мере ингибировалась комбинацией ПДРН/Gluc и несколько активировалась комплексом NAC/AK (см. рис. 2).

Выводы

Препараты для биостимуляции и биоревитализации оказывают различные метаболические эффекты в отношении культуры фибробластов, инкубированных в течение 24 ч, из чего можно заключить, что и по клиническим эффектам эти методы должны отличаться друг от друга.

Чтобы глубже изучить ранние стадии ответа фибробластов на процедуры БС и БР необходимо проведение дальнейших экспериментов с большим числом временных точек (не только через 24 ч культивирования клеток, но и через 12, 48 и 72 ч).

Лучшее понимание биологии фибробластов позволит более правильно применять БС и БР в клинике.



Литература

1. Bertuzzi G. Medicina anti-aging. Milan: Academia Universa Press; 2010.
2. Rathbone M.P., Deforge S., Deluca B., Gabel B., Laurenssen C., Middlemiss P. et al. Purinergic stimulation of cell division and differentiation: mechanisms and pharmacological implications. Med Hypotheses. 1992; 37 (4): 213–219.
3. Cronstein B.N. Adenosine receptors and wound healing. Scientific World J. 2004; 16 (4): 1–8.
4. Montesinos M.C., Desai A., Chen J.., Yee H., Schwarzschild M.A., Fink J.S. et al. Adenosine promotes wound healing and mediates angiogenesis in response to tissue injury via occupancy of A(2A) receptors. Am J Pathol. 2002; 160 (6): 2009–2018.
5. Thellung S., Florio T., Maragliano A., Cattarini G., Schettini G. Polydeoxyribonucleotides enhance the proliferation of human skin fibroblasts: involvement of A2 purinergic receptor subtypes. Life Sci. 1999; 64 (18): 1661–1674.
6. Galeano M., Bitto A., Altavilla D., Minutoli L., Polito F., Calo M. et al. Polydeoxyribonucleotide stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse. Wound Repair Regen. 2008; 16(2): 208–217.
7. Sini P., Denti A., Cattarini G., Daglio M., Tira M.E., Balduini C. Effect of Polydeoxyribonucleotides on human fibroblasts in primary culture. Cell Biochem Funct. 1999; 17 (2): 107–114.
8. Kang S., Chung J.H., Lee J.H., Fisher G.J., Wan Y.S., Duell E.A. et al. Topical N-acetyl cysteine and genistein prevent ultraviolet-light-induced signaling that leads to photoaging in human skin in vivo. J Invest Dermatol. 2003; 120 (5): 835–841.
9. De Flora S., Izzotti A., D'Agostini F., Balansky R.M. Mechanisms of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points. Carcinogenesis. 2001; 22 (7): 999–1013.
10. Kelly G.S. Clinical applications of N-acetylcysteine. Altern Med Rev. 1998; 3 (2): 114–127.
11. Sun L., Gu L., Wang S., Yuan J., Yang H., Zhu J. et al. N-acetylcysteine protects against apoptosis through modulation of group I metabotropic glutamate receptor activity. PLoS One. 2012; 7: (3) e32503.
12. Berryman D.E., Christiansen J.S., Johannsson G., Thorner M.O., Kopchick J.J. Role of the GH/IGF-1 axis in lifespan and healthspan: lessons from animal models. Growth Horm IGF Res. 2008; 18 (6): 455–471.
13. Suh Y., Atzmon G., Cho M.O., Hwang D., Liu B., Leahy D.J. et al. Functionally significant insulin-like growth factor I receptor mutations in centenarians. Proc Natl Acad Sci USA. 2008; 105 (9): 3438–3442.
14. Laurent T.C., Fraser J.R. Hyaluronan. Faseb J. 1992; 6 (7): 2397–2404.
15. Tammi M.I., Day A.J., Turley E.A. Hyaluronan and homeostasis: a balancing act. J Biol Chem. 2002; 277 (7): 4581–4584.
16. Yoneda M., Shimizu S., Nishi Y., Yamagata M., Suzuki S., Kimata K. Hyaluronic acid-dependent change in the extracellular matrix of mouse dermal fibroblasts that is conducive to cell proliferation. J Cell Sci. 1988; 90 (Pt 2): 275–286.
17. Wang Y.Z., Cao M.., Liu Y.W., He Y.Q., Yang C.X., Gao F. CD44 mediates oligosaccharides of hyaluronan-induced proliferation, tube formation and signal transduction in endothelial cells. Exp Biol Med (Maywood). 2011; 236 (1): 84–90.
18. Croce M.A., Boraldi F., Quaglino D., Tiozzo R., Pasquali-Ronchetti I. Hyaluronan uptake by adult human skin fibroblasts in vitro. Eur J Histochem. 2003; 47 (1): 63–73.