

Влияние препарата Лаеннек на маркеры старения

1 | ВВЕДЕНИЕ

Благодаря работам по тканевой терапии выдающегося российского ученого В.П. Филатова гидролизаты плаценты используются в современной клинической медицине, уже начиная с первой четверти XX века. Систематический анализ клинической и экспериментальной фармакологии гидролизатов плаценты человека (ГПЧ) показал, что их эффективно применяют для иммунокоррекции, ранозаживле-

И. Торшин, кандидат физико-математических наук, доцент кафедры интеллектуальных систем, МФТИ

О. Громова, доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии, ИвГМА МЗ РФ

Е. Диброва, кандидат экономических наук, президент медицинской корпорации RHANA

Е. Марусич, кандидат биологических наук, заместитель заведующего лабораторией разработки инновационных лекарственных средств, Центр живых систем, МФТИ

А. Гильельс, директор департамента научного маркетинга медицинской корпорации RHANA.

Т. Гришина, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой фармакологии, ИвГМА МЗ РФ

О. Назаренко, кандидат медицинских наук, доцент кафедры фармакологии, ИвГМА МЗ РФ

В. Демидов, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник научно-исследовательского центра, ИвГМА МЗ РФ

Н. Жидоморов, кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры фармакологии, ИвГМА МЗ РФ

И. Каримова, доктор медицинских наук, профессор кафедры кожных и венерических болезней, МГМСУ

А. Кильчевский, студент 4 курса лечебного факультета, ИвГМА МЗ РФ
Долгопрудный, Иваново, Москва, Россия

ния, нейротрофической терапии, гепатопротекции и нормализации пигментации кожи [1]. Результаты экспериментальных и клинических исследований говорят о том, что ГПЧ стимулируют процессы регенерации тканей, способствуя, в частности, устранению дефектов кожи [2], ускорению заживления и улучшению качества рубцевания ран (в т.ч. длительно незаживающих [3]), восстановлению естественной пигментации кожи и волос [4], сохранению структуры и функции печени и др.

Выраженное регенеративное воздействие ГПЧ на ткани и клетки указывает на возможность использования препаратов на их основе для геропротекции. Показатели скорости заживления ран и соответствующие гистоморфологические показатели качества заживления могут использоваться как косвенные маркеры процесса старения, т.к. с возрастом и скорость, и качество заживления ран ухудшаются [5].

Регенеративное действие ГПЧ выражается в том, что их топическое применение прямо или косвенно приводит к увеличению синтеза трансформационного ростового фактора (TGF) и фактора роста фибробластов (FGF) [2], таким образом, они стимулируют естественные процессы репарации тканей. В составе препарата «Лаеннек», представляющего собой высокоочищенный ГПЧ, установлено присутствие значительного количества Zn (788 ± 114 мкг/кг [6]) – эссенциального микроэлемента, способствующего регенерации тканей [7]. Некоторый разброс значений содержания цинка (менее 15%) служит косвенным указанием на специфическое связывание цинка из состава «Лаеннека» с определенными цинкзависимыми пептидами в составе ГПЧ.

В работе [8] представлены результаты комплексного анализа пептидного состава препарата «Лаеннек». В «легкой фракции» препарата (до 3000 Да) были найдены активный пептид нейромедина

Н и фрагмент активного пептида кокальцигенина. Кроме того, в состав «Лаеннек» входят пептидные фрагменты многочисленных ростовых факторов: факторов роста фибробластов (FGF), инсулиноподобных факторов роста (IGF), фактора роста гепатоцитов (HGF), эпидермального фактора роста (EGF), фактора роста нервов (NGF), трансформирующего фактора роста клеток (TGF- β 1) [8]. Все эти пептиды способствуют регенерации тканей: пептиды факторов роста фибробластов стимулируют восстановление соединительнотканной основы органов, пептиды инсулиноподобных факторов роста стимулируют метаболизм клеток и их регенеративное деление, фактор роста гепатоцитов – гепатопротекцию и восстановление клеток печени.

В настоящей работе представлены результаты исследований геропротекторного действия препарата «Лаеннек» на маркеры старения *in vitro* и *in vivo*. *In vitro*-исследование проведено на клетках фибробластов человека линии «ЛЕЧ-Т». В качестве маркера старения использован уровень содержания в клетках фермента β -галактозидазы (SA- β -gal), т.к. SA- β -gal присутствует только в сенесцентных, т.е. стареющих (от англ. senescent), клетках и не обнаруживается в клетках, проходящих нормальные циклы клеточного деления [9]. Исследование *in vivo* проводили на моделях ран, ожогов и алкогольного повреждения различных органов (кожи, печени, почек, миокарда) с последующим гистоморфологическим исследованием поврежденных тканей.

2 | МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучение токсичности препарата «Лаеннек» на клетках фибробластов человека

Изучение показателей токсичности проводили на культуре клеток фибробластов человека линии «ЛЕЧ-Т» («Биолот», Россия) в 24-луночных планшетах. Данная клеточная линия имеет ограниченный жизненный цикл, и способна к прохождению 42–46 циклов деления до перехода в сенесцентное состояние. В анализе использовали клетки «ЛЕЧ-Т» после семи циклов пассирования, которые затем выращивали в присутствии «Лаеннека» в разных разведениях. В качестве контроля использовали фибробlastы человека, инкубированные без добавления «Лаеннека». Оценку токсичности прово-

дили на основе подсчета числа жизнеспособных клеток методом прокрашивания суспензии клеток реагентом Trypan Blue. Количество живых и мертвых клеток подсчитывали с помощью счетчика клеток Countess (Invitrogen, США).

Пассирование клеток для проведения тестов на накопление β -галактозидазы

Культивирование клеток «ЛЕЧ-Т» проводили в присутствии препарата «Лаеннек» в разведении 1:312500 (179 нг/мл), т.е. в дозе, примерно соответствующей 6 мл «Лаеннека», введенных человеку с массой тела 70 кг. Воздействие препарата привело к уменьшению содержания β -галактозидазы в фибробластах человека до 18,7% (в контроле – 26,6%, разница 7,9%, $p=0,01$ по тесту Данна).

Клетки пассировали 2 раза в неделю в 48-луночных планшетах. Для этого 1x10⁴ клеток «ЛЕЧ-Т» сажали в каждую ячейку 48-луночного планшета для образования монослоя 60%-ной конфлюентности (конфлюентность – степень покрытия клетками культуральной поверхности, выражается в процентах) и инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37° С в течение 12 ч (оставляли на ночь). На следующий день супернатант удаляли, добавляли 300 мкл культуральной среды DMEM, в которую был добавлен препарат «Лаеннек», и инкубировали в CO₂-инкубаторе также при 37° С. При достижении 100%-ной конфлюентности (на 3–4-е сут инкубации) клетки пассировали. Для этого удаляли супернатант из каждой ячейки, промывали монослой фибробластов в 200 мкл PBS, добавляли 100 мкл раствора трипсин-версена и инкубировали в CO₂ при 37° С в течение 3 мин. Затем добавляли к раствору 300 мкл среды DMEM, перемешивали, центрифugировали 5 мин при скорости 1200 об/мин. После удаления супернатанта, клетки ресуспендировали в 300 мкл свежей среды DMEM и переносили в ячейку нового 48-луночного планшета. В ячейки добавляли соответствующие количества «Лаеннека» и продолжали инкубирование культур в CO₂ до достижения 100%-ной конфлюентности в течение следующих 3–4 сут. Описанную выше процедуру пассирования клеток повторяли 4 раза.

Определение содержания β -галактозидазы

Оценку содержания β -галактозидазы проводили на 45-е сутки инкубирования фибробластов

«ЛЕЧ-Т», после проведения 13 циклов пассиравания культуры фибробластов. Внутриклеточную β -галактозидазу детектировали с помощью набора реагентов Cellular Senescence Assay Kit (Millipore, USA), позволяющего определять интенсивность гидролиза β -галактозидазой реагента «X-gal» (Br,Cl-индолил-галактопиранозида), в результате чего сенесцентные клетки окраиваются в голубой цвет. Для проведения теста приготавливали 1%-ый раствор PBS (рН 6,0) и фиксирующий раствор для прокрашивания. Прокрашивание клеток осуществляли после удаления среды DMEM и однократной промывки фибробластов в 200 мкл 1Х PBS (рН 6,0). Затем, добавляли 100 мкл фиксирующего раствора поверх клеток и инкубировали 10–15 мин при комнатной температуре. После удаления фиксирующего раствора и 2-кратной промывки в 200 мкл раствора PBS, добавляли 100 мкл раствора для прокрашивания и оставляли на ночь в сухом инкубаторе без CO_2 , при 37° С. На следующий день раствор удаляли и двукратно промывали фибробlastы в 200 мкл раствора PBS, затем добавляли 200 мкл красителя Hoechst-33342 (Thermo Scientific, USA) (рН 6,0), предназначенного для окрашивания ядер фибробластов, и оставляли инкубироваться при комнатной температуре в течение 10 минут. После окончания прокрашивания, добавляли 70%-ный раствор глицерина поверх клеток с предварительно удаленной средой (что необходимо для длительного хранения прокрашенных клеток при +40° С). Подсчет чисел прокрашенных клеток проводили под микроскопом.

Исследование *in vivo* на моделях заживления ран и ожогов

Эксперименты были проведены на 60 белых крысах-самцах линии «Вистар» с массой тела 200–300 г. Животных содержали в пластиковых клетках изолированно друг от друга при естественном освещении, температуре воздуха около 20–220 С, свободном доступе к пище и воде. Критериями отбора были общее состояние животных, активное поведение, гладкая блестящая шерсть и чистый кожный покров, отсутствие внешних признаков заболеваний. Все процедуры по уходу за экспериментальными животными осуществляли в соответствии с нормами и правилами обращения с лабораторными животными и с учетом требований Европейской конвенции по защите экспериментальных животных.

Для создания модели резаной раны под хлоралгидратным наркозом (400 мг/кг внутрибрюшинно)

на коже спины в межлопаточной области после депиляции удаляли полнослоистый участок кожи размером 1,5x1,5 см.

Ожоговую модель воспроизводили под хлоралгидратным наркозом (400 мг/кг внутрибрюшинно) на коже спины в межлопаточной области путем прикладывания к ограниченному круглому участку кожи диаметром 1,5 см тонкостенной резиновой емкости с водой температурой 90° С на 30 с (ожог IIБ-III-й степени). На всем протяжении эксперимента раны оставались открытыми.

Введение препаратов производили со дня воспроизведения патологии в течение 4 недель по 5 раз в неделю внутрибрюшинно, по 0,1 мл на 100 г массы тела. Доза «Солкосерила», который использовали в качестве препарата сравнения, составила 42,5 мг/1 кг массы тела. Препарат «Лаэнек» разводили в 5 раз стерильным физиологическим раствором хлористого натрия, таким образом, его доза составляла 0,2 мл неразведенного препарата на 1 кг массы тела, что примерно соответствует дозам, применяемым в клинике при лечении атопического дерматита.

Гистоморфологические исследования

Патогистологическое исследование секционного материала кожи, печени, почек, миокарда проводили после фиксации в 10%-ном растворе нейтрального формалина. Образцы фиксировали в нейтральном формалине и обезвоживали в спиртах восходящей концентрации. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм готовили в направлении поперек продольной оси межлопаточной области и окрашивали гематоксилином-эозином и резорцин-фуксином по Вейгерту. Микрофотографии получены с помощью исследовательского микроскопа Micros на анализаторе изображения BioVision (Австрия). Морфологические исследования проводили с помощью микроскопа «Биолам-Р-5» и анализатора видеозображений «ВидеоТест-Мастер».

Полученные результаты были подвергнуты математической обработке с помощью компьютерной программы Microsoft Excel. При стандартном анализе определяли среднее арифметическое, стандартное отклонение среднего арифметического, величину доверительных интервалов. Достоверность различий сравниваемых величин определяли с помощью t-критерия Стьюдента и непараметрического U-критерия Вилкоксона–Манна–Уитни. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

3 | РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты исследования содержания бета-галактозидазы в фибробластах человека

Результаты тестирования показали, что в изученных разведениях препарат «Лаеннек» не оказывает токсического действия на клетки человека. При добавлении его в разведении 1:312500 наблюдался максимальный положительный эффект: процент жизнеспособных клеток, инкубированных в его присутствии, возрос на 7,9%. Такое разведение было рассчитано с учетом того, чтобы распределение препарата в организме модели максимально приблизить к его распределению в организме человека массой 70 кг при введении ему 6 мл «Лаеннека».

Целью измерения содержания в культуре стареющих фибробластов бета-галактозидазы (SA- β -gal) было установление влияния препарата «Лаеннек» на скорость старения молодых фибробластов. Нормальные молодые клетки становятся стареющими, или сенесцентными, после прохождения определенного числа циклов клеточного деления (42–46 циклов для линии клеток «ЛЕЧ-Т»). Стареющие клетки теряют способность к дальнейшему делению, характеризуются увеличенным размером, накоплением pH-зависимой SA- β -gal и измененным профилем экспрессии генов. Фермент SA- β -gal присутствует только в стареющих клетках, и отсутствует в молодых (т.е. еще способных к делению), что делает SA- β -gal одним из важных маркеров клеточного старения [9].

Стареющие клетки фибробластов в культуре характеризуются утратой способности к синтезу ДНК (что принципиально необходимо для клеточного деления) и одновременно нарастанием экспрессии маркера SA- β -gal [10]. Нарастание экспрессии SA- β -gal в фибробластах обусловлено повышением экспрессии гена GLB1, кодирующего лизосомальную форму бета-D-галактозидазы GLB1, активную при pH=4,5–6,0. У пациентов с рецессивным G(M1)-гангиозидозом установлено наличие дефектной формы бета-D-галактозидазы GLB1, а сенесцентные фибробlastы, взятые от этих пациентов, не экспрессируют маркер старения SA- β -gal даже при длительном пассировании. Подавление экспрессии гена GLB1 в нормальных фибробластах посредством РНК-интерференции также приводит к отсутствию маркера SA- β -gal в стареющих фибробластах. Таким образом, SA- β -gal сама по себе не провоцирует про-

цессы клеточного старения, а просто является его информативным маркером [11].

Наличие в фибробластах маркера SA- β -gal указывает на увеличение количества лизосомальной бета-D-галактозидазы GLB1, что, в свою очередь, может свидетельствовать о возрастании в клетках числа лизосом и/или уровня лизосомальной активности [12]. Лизосомы необходимы для окислительной переработки всех типов макромолекул, в т.ч. аномальных форм белков, концентрация которых нарастает при старении клетки. Аномальные формы белков встречаются при таких патологиях, как болезнь Альцгеймера (бета-амилоид, тау-белок), болезнь Паркинсона (альфа-синуклеин, дардарин), диабет (гликированные белки) и др.

Одна из важнейших причин появления аномально измененных форм белков в клетке – гликарирование белков. Когда клетки не справляются с хронической перегрузкой простыми углеводами (глюкозой, фруктозой), у них развивается глюкозотолерантность и концентрация аномально гликрированных белков возрастает. Показано, что добавление конечных продуктов гликарирования белков в среду выращивания фибробластов приводит к появлению и в дальнейшем – увеличению экспрессии фибробластами маркера SA- β -gal [13].

Принимая во внимание, что фибробласты клеточной линии «ЛЕЧ-Т» переходит в стареющее состояние примерно после 40 пассажей, мы провели оценку различий между контрольными клетками линии «ЛЕЧ-Т» 6-го и 13-го пассажей. В результате было установлено, что между клетками этих пассажей существенных различий нет: содержание стареющих клеток в обоих случаях было достаточно невелико и составило всего 13,1% (рис. 1). Таким образом, исследуемая культура на 86,9% состоит именно из молодых клеток, что позволяет использовать ее

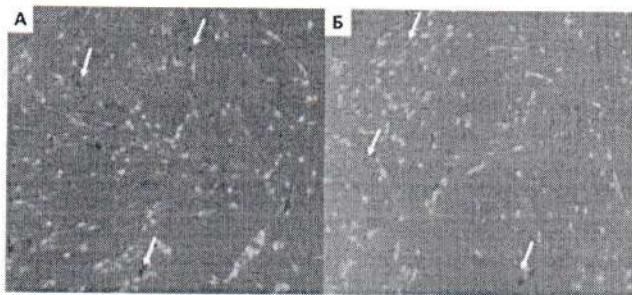


Рис. 1. Примеры изображений, использованных для количественной оценки содержания стареющих клеток в популяции фибробластов человека линии «ЛЕЧ-Т». А – клетки после 6-го пассажа, содержание клеток, прокрашенных X-gal, – 13,1%; Б – клетки после 13-го пассажа, содержание клеток, прокрашенных X-gal, также 13,1%

для изучения характера воздействия «Лаеннек» на процесс клеточного старения.

Общее количество анализируемых клеток подсчитывали по числу прокрашенных ядер живых клеток с использованием красителя Hoechst-33342. Затем на том же изображении подсчитывали количество клеток, прокрашенных X-gal (клеток темно-голубого цвета, указанных стрелками). На основании полученных данных подсчитывали процентное содержание сенесцентных клеток во всей популяции клеток, снятых с помощью флуоресцентного микроскопа. Проводили подсчеты по данным не менее чем 3 изображений, по которым определяли среднее значение.

Оценку экспрессии фибробластами маркера SA- β -gal проводили после 13-го пассажа, что по времени составило 45 сут. Содержание стареющих клеток в контрольной популяции фибробластов в этой серии экспериментов составило 26,6%.

При подсчете количества сенесцентных клеток в популяции фибробластов, пассированных на протяжении 45 сут в присутствии препарата «Лаеннек» в 321500-кратном разведении, было выяснено, что количество «стареющих» клеток снизилось до 18,7% против 26,6% в контроле (рис. 2) ($p=0,01$ по тесту Данна).

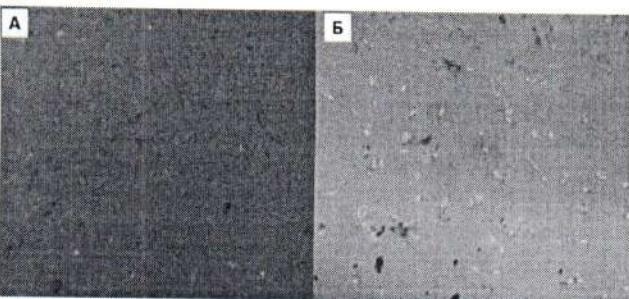


Рис. 2. Замедление старения клеток фибробластов человека линии «ЛЕЧ-Т» (клетки после 13 пассажа) под воздействием «Лаеннек». А – контроль: содержание клеток, прокрашенных X-gal, 26,6%. Б – «Лаеннек», разведение 1:312500, содержание клеток, прокрашенных X-gal, 18,7%

Таким образом, при культивировании молодых клеток фибробластов линии «ЛЕЧ-Т» в присутствии препарата «Лаеннек» (разведение 1:321500) достигнуто снижение содержания стареющих клеток на 7,9%.

Результаты *in vivo*-исследования по заживлению ран

Скорость и качество заживления повреждений кожи (резаных ран, операционных швов, ожогов

и др.) весьма сильно зависят от возраста. Именно поэтому используемые в клинической практике формулы для прогноза выживаемости пациентов с ранами и ожогами учитывают не только площадь раны или ожога, но и возраст пациента. Чем старше пациент, тем медленнее и менее качественно происходит эпителизация раневой поверхности в даже при малой площади поражения.

Проведенное нами экспериментальное исследование влияния ГПЧ (препарата «Лаеннек») на заживление ран и ожогов показало, что он существенно ускоряет и улучшает качество заживления резаной раны при сопоставлении как с контролем, так и с препаратом сравнения. Изучение динамики сокращения площади раневой поверхности, а также сроков завершения эпителизации в исследуемых группах выявило, что при использовании и исследуемого препарата, и препарата сравнения на 15-й день площадь струпа оказалась меньше, чем в контроле, при этом препарат сравнения ускорил эпителизацию в среднем на 7, а «Лаеннек» – на 15%.

Гистологические исследования показали, что в контрольной группе образуемый в процессе ранозаживления роговой слой кожи был тонким, а большинство кератиноцитов вакуолизированы; между коллагеновыми волокнами располагалось множество фибробластов. В фиброзной ткани наблюдалось большое количество стазированных капилляров. Эластические волокна (рис. 3) обнаружены только в глубине кожного регенерата, ближе к подкожной жировой клетчатке; они короткие и прямые, имеют небольшое количество разветвлений. По всему объему рубца эластические волокна находятся ближе к неповрежденной коже, а не к заживляемой поверхности.

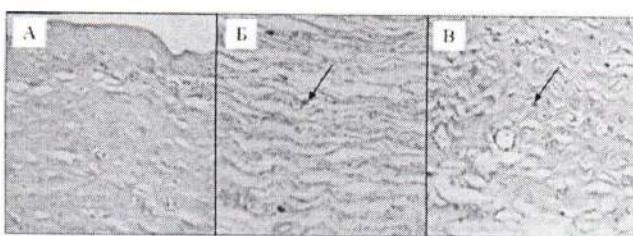


Рис. 3. Эластические волокна кожного регенерата. Контрольная группа, 30-е сутки после операции. Окраска орсein-фуксином по Вейгерту. Ув. X480. А – поверхностные слои, Б – средние слои, В – дно регенерата. Эластические волокна (указаны стрелками) обнаруживаются только в глубине кожного регенерата, ближе к подкожной жировой клетчатке; они короткие, имеют небольшое количество разветвлений

В результате применения «Лаеннека» поверхность эпидермиса имела гораздо более сложный микрорельеф: в базальном слое формировались многочисленные выпячивания (рис. 4), а клетки шиповатого и зернистого слоев были вакуолизированы. На отдельных участках эпидермиса отмечено формирование волоссяных фолликулов. Коллагеновые волокна фиброзной ткани в основном ориентированы параллельно поверхности кожи и разветвлены, что соответствует увеличению прочности регенерата.

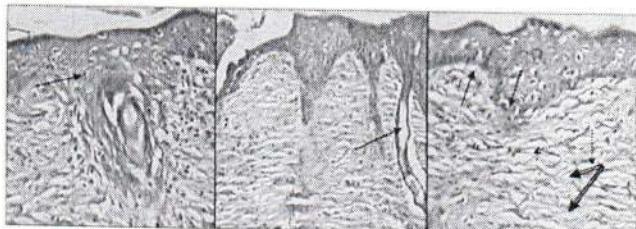


Рис. 4. Эпидермис и фиброзная ткань кожного регенерата. «Лаеннек», 30-е сутки после операции (A-B). Окраска гематоксилином-эозином. Ув. X480. Поверхность эпидермиса имеет сложный микрорельеф, базальный слой образует выпячивания (сплошные стрелки на рис. В). На отдельных участках эпидермиса начинают формироваться волоссяные фолликулы (стрелки на рис. А, В). Между коллагеновыми волокнами и клеточными элементами хорошо выражено основное аморфное вещество (пунктирные стрелки). Коллагеновые волокна имеют сложную архитектонику (двойные стрелки)

Кроме того, при использовании «Лаеннека» в верхней части рубца выявлены единичные эластические волокна, а по краям повреждения, в средней части и на дне регенерата эластические волокна были многочисленны, имели множество мелких ответвлений и формировали плотную, густую вязь (рис. 5).

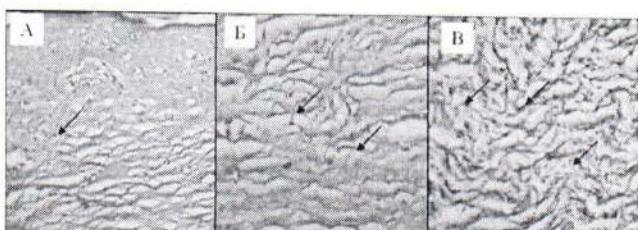


Рис. 5. Эластические волокна кожного регенерата. «Лаеннек» 30-е сутки после операции. Окраска орседин-фуксином по Вейгерту. Ув. X480. А – поверхностные слои, Б – средние слои, В – дно регенерата. Эластические волокна (указаны стрелками) под эпидермисом выявляются единично, но их много в средней части и на дне регенерата. Здесь имеются многочисленные мелкие ответвления, переплетенные друг с другом и образующие мелкую вязь

Результаты *in vivo*-исследования по заживлению ожогов

На 30-е сутки после нанесения ожога у контрольных животных на месте повреждения сформировалась зрелая фиброзная ткань. Эпидермис утолщен, все слои четко выражены, включают 7–10 рядов клеток. Базальный слой представлен 2–3 рядами клеток с умеренно гиперхромными ядрами, имеющими одно ядрышко. Цитоплазма клеток шиповатого слоя вакуолизирована. Отмечается гиперкератоз. На поверхности эпидермиса начинает формироваться микрорельеф, в то время как граница базального слоя ровная. Коллагеновые волокна рубца образуют сплошную массу, ориентированы хаотично, между ними включены фибробласти и фиброциты. Интенсивно развито микроциркуляторное русло, имеются открытые концы поперечно срезанных капилляров (по 7–8 в поле зрения). Эластические волокна выявляются только на дне регенерата и в подкожно-жировой клетчатке в виде коротких мелких фрагментов (рис. 6).

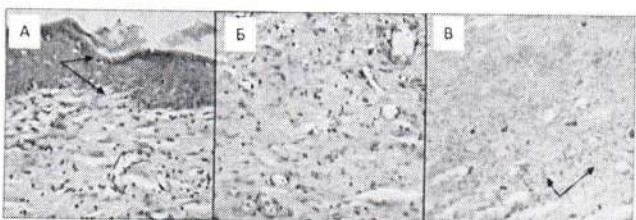


Рис. 6. Кожа на месте повреждения. Контроль, 30-е сутки эксперимента. Окраска гематоксилином-эозином (А, Б). Окраска орседин-фуксином по Вейгерту (В). Ув. X480. На поверхности эпидермиса начинает формироваться микрорельеф, в то время как граница базального слоя ровная (А). Коллагеновые волокна рубца образуют сплошную массу, ориентированы хаотично, между ними включены фибробласти и фиброциты (Б). На дне регенерата выявляются мелкие фрагменты эластических волокон (В)

В группе применения препарата «Лаеннек» на 30-й день после ожога эпидермис практически не утолщен, ровный, тонкий, имеет 5–6 четких слоев клеток, а на некоторых участках – 7–8 слоев (рис. 7). В нескольких местах произошла закладка сальных желез, в других наблюдаются небольшие выпячивания базального слоя. Ближе к краевой зоне рубца формируются мощные волоссяные фолликулы. Коллагеновые волокна лежат рыхло и параллельно поверхности регенерата. Между ними находится большое количество веретеновидных фибробластов, имеющих такую же ориентацию. Преобладают

капилляры, срезанные продольно и ориентированы перпендикулярно поверхности рубца, кровенаполнение обильное. Эластических волокон очень много на дне рубца, они мелкие, с очень короткими, едва заметными ответвлениями. Важно, что эластические волокна обнаружены как в области новообразованной фиброзной ткани под эпидермисом, так и в ее толще ближе к краевой зоне.

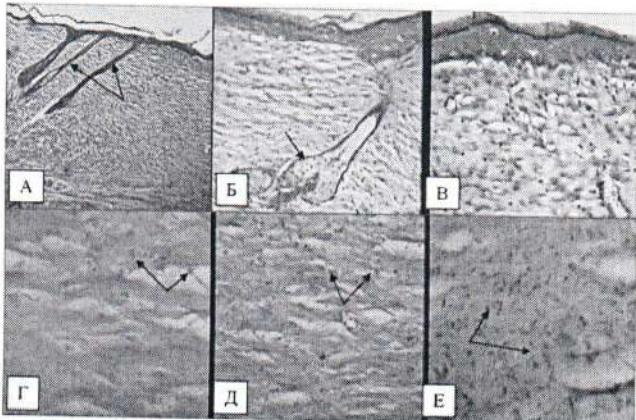


Рис. 7. Кожа на месте повреждения. «Лаеннек». 30-е сутки эксперимента. А – формирование волосяных фолликулов в рубцовой ткани недалеко от краевой зоны рубца. Ув. Х120. Б – закладка сальной железы. Ув. Х300. В – коллагеновые волокна лежат рыхло и параллельно поверхности регенерата, между ними большое количество веретеновидных фибробластов, имеющих такую же ориентацию. Преобладают капилляры, срезанные продольно и ориентированные перпендикулярно поверхности рубца (об. 40) (А–Б – окраска гематоксилином-эозином). Эластические волокна: в области новообразованной фиброзной ткани под эпидермисом (Г), в верхней части (Д) и на дне рубца (Е) (окраска орседин-фуксином по Вейгерту. Ув. Х480)

Таким образом, препарат «Лаеннек» проявляет выраженное регенераторное воздействие на ткани при заживлении ран и ожогов. При его применении наблюдается не только более быстрое, но и более полноценное заживление кожной раны, чем в контроле. Гистологические исследования указывают на более интенсивные процессы репарации тканей и, следовательно, на геропротекторное действие препарата.

Результаты *in vivo*-исследования на модели алкогольного поражения

Состояние печени во многом определяет темпы старения всего организма. При алкогольном повреж-

дении печени старение развивается быстрее. Патогистологическое исследование секционного материала печени, почек и миокарда, полученных в результате создания модели алкогольного поражения печени, подтверждает регенеративное воздействие «Лаеннека» на ткани различных органов. Модель алкогольного поражения воспроизводили посредством перорального введения животным раствора этилового спирта в течение 7 сут.

Гистологическое исследование ткани печени показало, что у интактных животных вены и синусоиды характеризуются обычным кровенаполнением, в портальных трактах наблюдаются лишь единичные клетки с признаками воспаления, единичные гепатоциты содержат вакуоли с цитоплазматической жидкостью.

В модели алкогольного поражения центральные вены и синусоиды центров печеночных долек расширены и полнокровны, в просветах сосудов отмечено краевое стояние нейтрофилов с инфильтрацией нейтрофилами портальных трактов и синусоидов перипортальной зоны (рис. 8А). Повреждение гепатоцитов проявляется в виде мелкокапельного ожирения гепатоцитов центральных отделов печеночных долек, в единичных дольках сформированы центролобулярные некрозы (рис. 8Б), единичные гепатоциты содержат эозинофильные включения, что позволяет расценивать их как тельца Маллори (рис. 8А), имеет место диффузно-очаговый внутриклеточный холестаз (который, заметим, так же характерен и для старения печени).

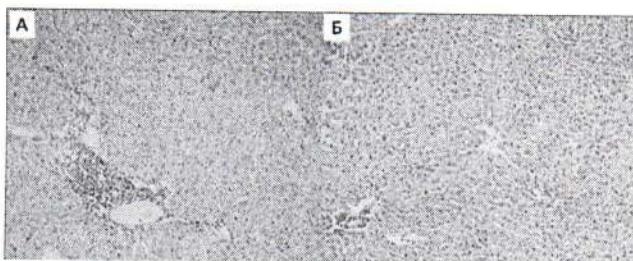


Рис. 8. Гистологические особенности алкогольного поражения печени. А – лейкоцитарная инфильтрация портального тракта, алкогольный гиалин (т. Маллори). Б – центролобулярный некроз гепатоцитов. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. Х120.

Применение препарата «Лаеннек» в течение 3 недель на фоне алкоголизации приводило к улучшению гистологической картины и приближению состояния тканей печени к таковому у интактных животных. Отмечено умеренно выраженное полнокровие центров печеночных долек, воспалительно-

клеточная инфильтрация от слабой до умеренной степени выраженности (единичные лимфоциты в составе клеточного инфильтрата) выявлена лишь в зонах портальных трактов. Жировая дистрофия гепатоцитов носит очаговый характер и сочетается с внутриклеточным холестазом.

Исследование тканей почек у интактных животных показало умеренное кровенаполнение капилляров клубочков и интерстициальной ткани; нефроциты без признаков повреждения.

В модели алкогольного поражения кора почек малокровна, в мозговом слое умеренно выраженное полнокровие и отек стромы почки, гиалиново-капельная дистрофия клеток эпителия проксимальных извитых канальцев. В одном наблюдении белковая дистрофия сопровождалась фокальным некрозом нефроцитов, в просветах отдельных дистальных канальцев эозинофильные массы (рис. 9А) в сочетании с пигментом билирубином (рис. 9Б).

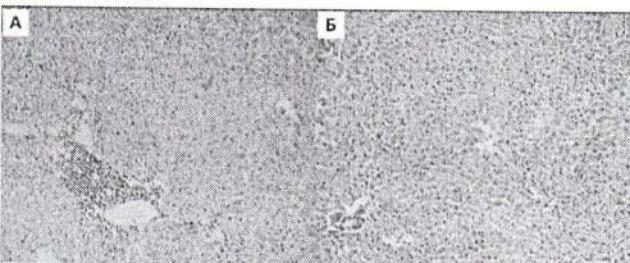


Рис. 9. Гистологические особенности алкогольного поражения почек. А – эозинофильные белковые массы в просвете канальца. Б – глыбки билирубина в просветах канальцев. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. X1200

При применении «Лаеннек» на фоне алкоголизации установлено, что клубочки умеренно полнокровны, сохраняются отек стромы и очаговая белковая дистрофия нефроцитов, в просветах дистальных канальцев эозинофильные белковые массы. Важно отметить, что наличие билирубина в эозинофильных массах заметно снижается. Билирубин образуется в результате переработки порфиринов (гема и др.), его содержание в тканях служит маркером не только функции печени, но также и т.н. «порфиринового» старения кожи [14]. Из имеющихся исследований известно, что ЭПЧ оказывают ревитализирующее воздействие на эпителий, а также являются индуктором нормализации пигментации кожи и волос [4].

Исследование тканей миокарда у интактных крыс показало незначительный отек стромы, сократительные волокна равномерно окрашены, поперечная исчерченность кардиомиоцитов сохранена. При алкогольной интоксикации наблюдаются умерен-

но выраженное полнокровие, гемо- и лимфостаз, отек стромы, диффузное пылевидное ожирение и фокальный некроз кардиомиоцитов. При применении «Лаеннек» выраженность этих маркеров старения тканей снижается.

Таким образом, сравнительная оценка результатов патогистологического исследования тканей печени, почек, миокарда позволяет выявить морфологические особенности, которые выражаются в разной степени повреждения паренхиматозных элементов и расстройстве кровообращения. Различия в структурных изменениях исследованных срезов тканей печени, почек и миокарда свидетельствуют о защитном действии препарата «Лаеннек» на ткани: в частности, выраженность патологического состояния гепатоцитов (дистрофии, некроза) оказалась существенно ниже, чем у модели алкогольной интоксикации.

В заключение отметим, что в геронтологии используют технологии цветового сканирования кожи, позволяющие установить упомянутые ранее «порфириновые» и «УФО-» пятна гиперпигментации [14]. Размер и количество этих пятен, наряду с показателями увлажненности и морщинистости кожи, служат маркерами старения. В клиническом исследовании с участием 20 женщин в возрасте 40–50 лет было показано, что под кожное введение плацентарных препаратов «Лаеннек» и «Курасен» способствовало выраженной гидратации кожных покровов, снижению количества морщин (на 29,2%), расширенных пор и сосудов (на 37,2%), а также порфириновых пятен [14].

4 | О МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМАХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА «ЛАЕННЕК» НА МАРКЕРЫ СТАРЕНИЯ

Методами иммуноферментного анализа и секвенирования аминокислотных последовательностей было показано, что в состав препарата «Лаеннек» входят дипептид JBP485 (цикло-транс-4-гидроксипролилсерин) [15], пептидные фрагменты факторов роста фибробластов (FGF), инсулиноподобных факторов роста (IGF), фактора роста гепатоцитов (HGF), эпидермального фактора роста (EGF), фактора роста нервов (NGF), трансформирующего фактора роста (TGF- β 1), нейромедина N и кокальцигенина [8]. Особый интерес среди них представляют пептид JBP485 и пептиды-фрагменты факторов роста фибробластов.

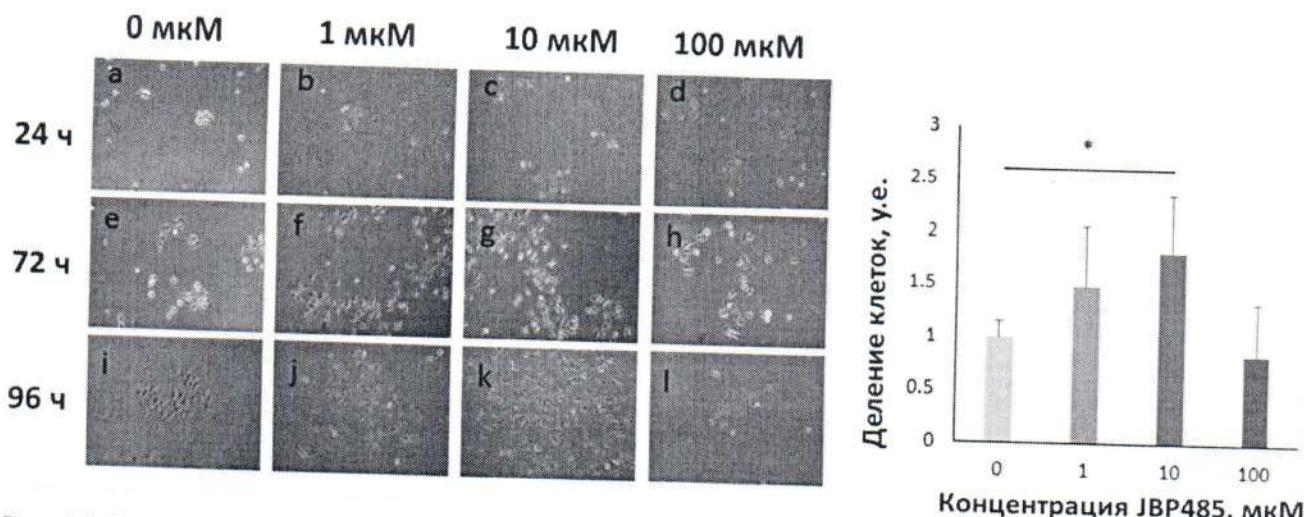


Рис. 10. Пептид JBP485 дозозависимо ускоряет деление эпителиальных клеток роговицы в культуре,
* $p < 0,05$, тест Данна, $n = 5$

В эксперименте показано, что имеющийся в составе «Лаеннека» пептид JBP485 принципиально важен для выживания эпителиальных клеток роговицы глаза и значительно увеличивает их способность к делению и миграции. Пептид JBP485 ускоряет заживление повреждений роговицы, не вызывая при этом избыточного воспаления и неоваскуляризации [16]. Очевидно, что наибольший эффект достигается в оптимальном диапазоне концентраций – 1–10 мкмоль/л (рис. 10). Кроме того, пептид JBP485 стимулирует слезоотделение и секрецию муцинов MucBas и Muc1/4/16, что дополнительно ускоряет заживление трещин и ран роговицы [17].

Хотя выраженный цитопротективный эффект от применения пептида JBP485 установлен, точные молекулярные механизмы его действия до сих пор неизвестны. Мы знаем, что пептид JBP485 повышает экспрессию белков-транспортеров органических анионов (гены OAT1, OAT3), которые необходимы для транспорта внутрь клеток короткоцепочечных органических кислот (глутаровой, кетоглутаровой и др.), участвующих в цикле Кребса (синтезе АТФ) [16] и выведения токсических веществ почками [18]. В эксперименте пептид JBP485 оказывал также антиапоптотическое действие, снижая содержание и активность каспазы-3 – фермента-активатора апоптоза клеток [19], уменьшая фрагментацию ДНК и увеличивая экспрессию гена антиапоптотического белка bcl-2 на фоне снижения экспрессии гена проапоптотического белка bax [20]. Возможные молекулярные механизмы действия данного пептида могут быть выяснены посредством хемореактомного анали-

за структуры молекулы JBP485 с использованием новейших методов хемоинформатики.

Найденные в составе «Лаеннека» пептидные фрагменты факторов роста фибробластов (ФРФ) могут оказывать непосредственное влияние на выживание фибробластов как *in vitro* (в культуре «стареющих» клеток линии «ЛЕЧ-Т»), так и *in vivo* (при заживлении ран в эксперименте). Соответствующий молекулярный механизм действия этих пептидов очевиден – это непосредственное взаимодействие и активация рецепторов факторов роста фибробластов, которые индуцируют клеточное деление фибробластов и поддерживают их выживание.

Пептидные фрагменты ФРФ могут связываться с рецепторами ФРФ (FGFR) 4 различных типов. Связываясь с одноименными рецепторами, ФРФ активируют несколько путей передачи сигнала, в т.ч. с участием таких широко известных сигнальных белков, как Mg-зависимые МАРК (митоген-активируемые протеинкиназы), ERK (внеклеточно регулируемые киназы), фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), фосфолипаза С-гамма, JNK (Jun N-терминальная киназа) и РКС (протеинкиназа-С). Активация рецепторов вызывает фосфорилирование определенного тирозинового остатка белка FRS2, который затем взаимодействует с сигнальными белками Grb2, SOS, GAB1 и др. Эти начальные события способствуют устойчивой активации сигнального белка Ras, который, в свою очередь, активирует МЕК-МАРК-путь (рис. 11), ведущий к изменениям в транскрипции генов, отвечающих, в частности, за деление и выживание фибробластов и, следовательно, за улучшение структуры соединительной ткани в процессе ранозаживления.

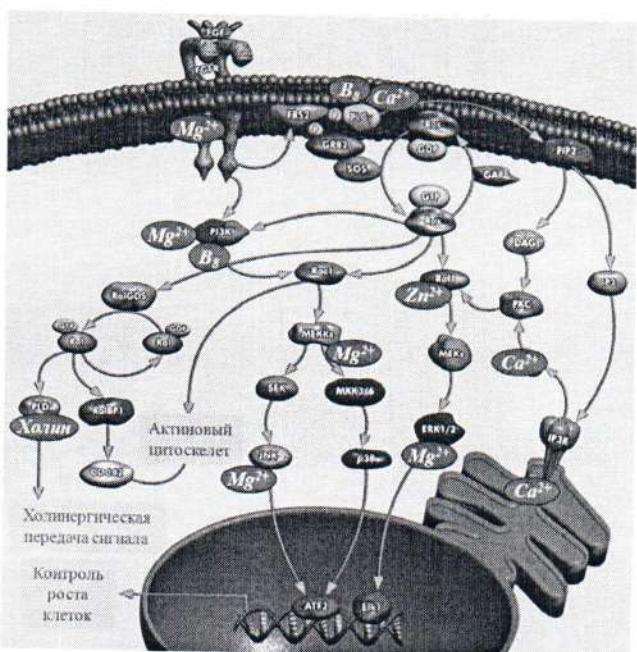


Рис. 11. Сигнальные каскады рецепторов факторов роста фибробластов и кофакторы соответствующих белков. Сигнальный каскад рецепторов ФРФ достаточно сложен и включает взаимодействие десятков ферментов и других белков, указанных на диаграмме с использованием международных обозначений белков/генов. Активность многих из этих ферментов зависит от определенных нутриентных кофакторов (показаны в зеленых овалах рядом с соответствующими белками), прежде всего магния, цинка, кальция, холина и витамина В8 (миоинозитола). Дефицит соответствующих нутриентов будет способствовать нарушению активности сигнального каскада ФРФ-рецепторов

5 | ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение геропротекторного действия препарата «Лаеннек» *in vitro* проводилось посредством оценки накопления маркера старения β -галактозидазы (SA- β -gal) в фибробlastах человека. Добавление препарата в разведении 1:321500 (179 нг/мл) приводило к уменьшению содержания SA- β -gal в фибробlastах на 7,9% ($p=0,01$). Экспериментальное исследование регенераторного действия «Лаеннека» *in vivo* (на моделях резаных ран, ожогов, алкогольного повреждения) показало существенное повышение скорости и качества регенерации: было отмечено увеличение количества эластиновых волокон, основного аморфного вещества соединительной ткани, снижение воспалительно-клеточной инфильтрации, отека стromы, жировой дистрофии, накопления били-

рубина. Таким образом, установлено положительное влияние препарата «Лаеннек» на маркеры старения *in vitro* и *in vivo*, что указывает на эффективность его использования как геропротектора (рис. 12).

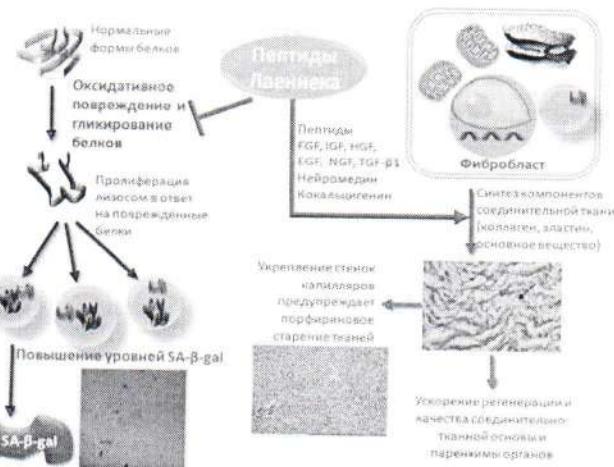


Рис. 12. Геропротекторные эффекты, установленные в настоящем исследовании

ЛИТЕРАТУРА

- Громова О, Торшин И, Гилельс А и др. Препараты плаценты человека: фундаментальные и клинические исследования. Врач. 2014;(4):67–72.
- Briguglio A. On 100 cases of surgical diseases treated with a cold-sterilized placental extract. Minerva Med. 1962;53:3118–3123.
- Shukla VK. A trial to determine the role of placental extract in the treatment of chronic non-healing wounds. J Wound Care. 2004;13(5):177–179.
- Maltsev VI. Experience in introducing the method of placental therapy in vitiligo in Ukraine. Lik Sprava. 1995;(7–8):123–125.
- Yanai H, Budovsky A, Tacutu R, Fraifeld VE. Is rate of skin wound healing associated with aging or longevity phenotype? Biogerontology. 2011;12(6):591–597.
- Громова ОА, Торшин ИЮ, Волков АЮ и др. Препарат Лаеннек: элементный состав и фармакологическое действие. Пластическая хирургия и косметология. 2010;(4):512–687.
- Ребров ВГ, Громова ОА. Витамины, макро- и микроэлементы. – М., ГЭОТАРМед. 2008.
- Торшин ИЮ, Згода ВГ, Громова ОА и др. Анализ легкой пептидной фракции Лаеннека методами современной протеомики: фармакокинетика и фармакодинамика. 2016;(4):18–26.

9. Dimri GP, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 1995;92(20):9363–9397.
10. Itahana K, Campisi J, Dimri GP. Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay. *Methods Mol Biol*, 2007;371:21–31.
11. Lee BY, Han JA, Im JS, et al. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*, 2006;5(2):187–195.
12. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated (β -galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*, 2000;113(Pt 20):3613–3622.
13. Ravellojaona V, Robert AM, Robert L. Expression of senescence-associated beta-galactosidase (SA- β -Gal) by human skin fibroblasts, effect of advanced glycation end-products and fucose or rhamnose-rich polysaccharides. *Arch Gerontol Geriatr*, 2009;48(2):151–154.
14. Гилельс АВ, Демидов ВИ, Жидоморов НЮ и др. Эффективность воздействия экстрактов плаценты человека на пигментообразование кожи на примере препаратов Лаенек и Курасен. Эффективная фармакотерапия. Акушерство и Гинекология, 2013;4(36):4–10.
15. Guo X, Meng Q, Liu Q, et al. JBP485 improves gentamicin-induced acute renal failure by regulating the expression and function of Oat1 and Oat3 in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013;271(2):285–295.
16. Nagata M, Nakamura T, Hata Y, et al. JBP485 promotes corneal epithelial wound healing. *Sci Rep*, 2015;5:14776.
17. Nakamura T, Hata Y, Nagata M, et al. JBP485 promotes tear and mucin secretion in ocular surface epithelia. *Sci Rep*, 2015;5:10248..
18. Liu T, Guo X, Meng Q, et al. Effect of JBP485 on obstructive jaundice is related to regulation of renal Oat1, Oat3 and Mrp2 expression in ANIT-treated rats. *Peptides*, 2012;36(1):78–85.
19. Wu J, Wang C, Liu Q, et al. Protective effect of JBP485 on concanavalin A-induced hepatocyte toxicity in primary cultured rat hepatocytes. *Eur J Pharmacol*, 2008;589(1–3):299–305.
20. Yang T1, Wu J, Wang C, et al. Protective effect of JBP485 on concanavalin A-induced liver injury in mice. *J Pharm Pharmacol*, 2009;61(6):767–74.