

А. Л. Загайко¹, В. П. Филимоненко¹, О. А. Красільнікова¹,
Л. М. Соловйова², Ю. О. Огай²
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ¹, ХАРКІВ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ ВІНОГРАДУ І ВИНА “МАГАРАЧ”², ЯЛТА

ВПЛИВ СУБСТАНЦІЇ “ПОЛІКАТЕХІН” НА ВМІСТ ГІАЛУРОНОВОЇ КИСЛОТИ У ШКІРІ ЩУРІВ ТА ПРОЛІФЕРАТИВНУ АКТИВНІСТЬ ФІБРОБЛАСТІВ

Застосування субстанції поліфенолів винограду “Полікатехін” збільшує вміст гіалуронової кислоти у шкірі та ізольованих фібробластах щурів. Зростання рівня гіалуронової кислоти супроводжується зниженням глюкозаміноглікангідролазної активності у шкірі та підвищенням проліферативної активності фібробластів. Гіалуронатотропний ефект полікатехіну більш виражений порівняно з камагелем.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: поліфеноли, гіалуронова кислота, фібробласти, естрогени, старіння шкіри.

ВСТУП. Старіння шкіри, невід’ємна складова старіння організму в цілому, становить одну з актуальних проблем сучасної дерматології та косметології [5, 12].

Головною віковою зміною сполучної тканини є зменшення вмісту води та співвідношення основна речовина/волокна, яке пов’язане зі зниженням концентрації глікозаміногліканів. Відомо, що перші вікові зміни асоційовані зі зменшенням вмісту гіалуронової кислоти – основного компонента екстраклітинного матриксу, що утворюється фібробластами шкіри [5].

Гіалуронова кислота має найбільшу молекулярну масу з глікозаміногліканів, завдяки чому за рахунок водневих зв’язків зв’язує та утримує велику кількість води (до 200–500 молекул). Даний протеоглікан настільки гідратує дерму, що в ній міститься 15–18 % від води всього організму. Утворюючи в’язкий гель, гіалуронова кислота забезпечує тургор тканин і нормальний перебіг фізіологічних процесів у клітинах та міжклітинному просторі (обмін речовин, міжклітинні взаємодії, регенерація тканин тощо). Гіалуронат проявляє також детоксикаційні властивості [9].

У процесі старіння гіалуронова кислота зазнає якісних та кількісних змін, що призводять до зменшення її вмісту в епідермісі та накопичення у глибоких шарах. Більше того, при старінні полісахарид щільніше зв’язується

з тканинами. Незворотне зв’язування гіалуронової кислоти з рецепторами спричиняє виснаження рецепторопосередкованої стимуляції клітин, зокрема фібробластів – головних “реставраторів” шкіри [4].

Відомо, що важливим ендогенним фактором старіння шкіри є стан ендокринної системи. Гормони, перш за все статеві (естрогени та андрогени), впливають на мітотичну активність епідермісу і дерми, стан сальних залоз та волосяних фолікулів [8, 11]. Зокрема, жіночі статеві гормони стимулюють поділ базальних клітин епідермісу, підсилюють синтез фібробластами колагенових, еластичних волокон і гіалуронової кислоти й тим самим підтримують пружність та еластичність шкіри. Починаючи приблизно з 35 років, продукування естрогенів поступово знижується, що відразу відбивається на стані шкіри: вона стає сухішою, тоншою, з’являються зморшки, шкіра легко пошкоджується і повільніше відновлюється [2, 10].

На сьогодні відомо декілька класів речовин рослинного походження, які в організмі людини можуть діяти як слабкі естрогени та антиестрогени [7, 8, 11]. Це перш за все поліфеноли, на які багаті Виноград культурний та продукти його переробки [13].

Метою даної роботи було дослідити вплив субстанції конденсованих поліфенолів винограду “Полікатехін” на вміст гіалуронової кислоти у шкірі щурів, а також на показники функціонального стану основних клітин сполучної тканини – фібробластів.

© А. Л. Загайко, В. П. Филимоненко, О. А. Красільнікова, Л. М. Соловйова, Ю. О. Огай, 2012.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Для визначення впливу поліфенолів винограду на вміст гіалуронової кислоти на спині експериментальних тварин (щурів-самиць) вищипували ділянку площею 1 см². Ділянку шкіри змащували полікатехіном або препаратом порівняння “Камагель” (концентрат поліфенолів ромашки, KRKA, Словенія) протягом 14 діб. Тварин декапітували під хлоразоло-уретановим наркозом. Ділянку шкіри вирізали, подрібнювали у трисбуфері на холоді. В гомогенаті визначали вміст гіалуронової кислоти за допомогою стандартних наборів реактивів. Активність глюкозаміноглікангідролазного ферментативного комплексу визначали за методом [3]. Дослідження на щурах проводили відповідно до національних Загальних етичних принципів експериментів на тваринах (Україна, 2001).

Експерименти з ізольованими фібробластами проводили на клітинах лінії MRC5, які інкубували в середовищі Ігла (10 % бичачий сироватковий альбумін, 100 од./мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину, 2 мМ глутамін). Фібробласти інкубували в концентрації $2 \cdot 10^5$ клітин/75 см² у контейнері для інкубації клітин. В окремих експериментах до інкубаційного середовища вносили 2 мкКи/ $2 \cdot 10^5$ клітин [³H]тимідин, а також камагель у дозі 2 мл/кг (контроль) та субстанцію “Полікатехін” (дослід), що містила поліфеноли в дозі 1 мг/100 мл суспензії. Через 48 год експерименту клітини осаджували шляхом центрифугування. У супернатанті визначали вміст гіалуронової кислоти. Осад ресуспендували в 0,5 мл середовища і відбирали аліквоту для визначення включення міченого тимідину. Радіоактивність визначали за допомогою лічильника радіоактивності БЕТА.

Результати експериментів обробляли статистично з використанням програми “Statistica 5,0 for Windows” для ПК, достовірність змін

оцінювали за допомогою критеріїв Стьюдента (t) і Вілкоксона–Манна–Уїтні (W) [1]. Розходження вважали статистично значущими, якщо $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Встановлено, що місцеве застосування субстанції “Полікатехін” та препарату порівняння “Камагель” підвищувало вміст гіалуронової кислоти на 35 і 21 % відповідно (табл. 1). Збільшення вмісту гіалуронату може бути зумовлене як підсиленням його синтезу, так і пригніченням процесів деградації. В нашому дослідженні зростання вмісту гіалуронової кислоти після застосування полікатехіну супроводжувалося зниженням глюкозаміноглікангідролазної (ГАГГ) активності у шкірі щурів на 38 % (табл. 1), тобто пов’язане з уповільненням розпаду. При дії препарату порівняння спостерігалась тенденція до зменшення ГАГГ-ферментативної активності, проте дані не були достовірними (табл. 1).

Дані літератури вказують на здатність біологічно активних сполук рослинного походження з фітоестрогенною активністю впливати й на синтез гіалуронової кислоти, а саме стимулювати утворення гіалуронової кислоти фібробластами [8].

Під контролем естрогенів перебуває не лише біосинтез гіалуронової кислоти, а й біологічна активність фібробластів у цілому [8, 11]. Тому наступним етапом нашого дослідження було вивчення впливу субстанції “Полікатехін” на вміст гіалуронової кислоти і проліферативну активність фібробластів за умов *in vitro*.

Інкубація фібробластів за присутності як поліфенолів ромашки “Камагелю”, так і субстанції поліфенолів винограду “Полікатехін” достовірно збільшувала вміст гіалуронату в середовищі інкубації на 50 і 81 % відповідно (табл. 2).

Таблиця 1 – Вплив субстанції “Полікатехін” на вміст гіалуронової кислоти і глюкозаміноглікангідролазну активність у шкірі щурів ($M \pm m$, $n=6$)

Умова дослідю	Показник	
	вміст гіалуронової кислоти, нг/мг білка	ГАГГ-активність, МЕ
Інтакт	0,73±0,06	14,32±2,82
Камагель	0,89±0,09*	12,42±1,39
Полікатехін	0,99±0,09*	8,74±1,22*

Примітка. Тут і в наступній таблиці: * – $p < 0,05$ відносно контролю.

Таблиця 2 – Вплив субстанції “Полікатехін” на вміст гіалуронової кислоти і проліферативну активність фібробластів ($M \pm m$, $n=6$)

Умова дослідю	Показник	
	вміст гіалуронової кислоти, нг/мг білка	включення [³ H]тимідину, імп/хв/ 10^5 клітин
Інтакт	0,59±0,08	4753±628
Камагель	0,89±0,09*	7329±811*
Полікатехін	1,07±0,09*	9984±926*

Вікове зменшення рівня естрогенів супроводжується змінами в структурі та біологічній активності фібробластів [6]. Клітини стають товстішими, спостерігається значне гальмування синтезу колагенових волокон. Дані процеси зумовлені, головним чином, зниженням проліферативної активності фібробластів [4]. Вивчення нами проліферативної активності фібробластів за допомогою радіоактивного тимідину показало, що присутність як поліфенолів ромашки, так і субстанції "Полікатехін" збільшує включення міченого тимідину на 77 та 89 % відповідно (табл. 2), тобто поліфеноли підсилюють мітотичну активність цих клітин.

Вищенаведені дані, а також дані про зниження ГАГГ-ферментативної активності за дії

полікатехіну свідчать про те, що підвищення вмісту гіалуронової кислоти у шкірі відбувається як за рахунок підсилення проліферації фібробластів, так і шляхом пригнічення деградації гіалуронату. Встановлені ефекти поліфенолів, імовірно, пов'язані зі здатністю зв'язуватися з рецепторами для естрадіолу та проявляти гормоноподібні ефекти завдяки подібності їх просторової структури до структури 17 β -естрадіолу.

ВИСНОВКИ. Субстанція поліфенолів винограду "Полікатехін" проявляє гіалуронатотропну властивість, що дозволяє рекомендувати її для подальшого вивчення з метою застосування в косметології для корекції вікових змін при старінні.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика : пер. с англ. / С. Гланц. – М. : Практика, 1998. – 459 с.
2. Орасмяэ-Медер Т. Пептидные технологии в косметике: тенденции и перспективы / Т. Орасмяэ-Медер, Е. Эрнандес // Косметические рецептуры и ингредиенты. – 2010. – № 2. – С. 46–53.
3. Тихонов О. І. Перспективи створення гомеопатичного лікарського засобу у формі мазі для лікування алергічних дерматитів / О. І. Тихонов, Н. А. Чорна, О. А. Красільнікова // Вісник фармації. – 2007. – **50**, № 2. – С. 24–28.
4. Age-related changes in pericellular hyaluronan organization leads to impaired dermal fibroblast to myofibroblast differentiation / R. M. Simpson, S. Meran, D. Thomas [et al.] // *Am J Pathol.* – 2009. – **175**, № 5. – P. 1915–1928.
5. Calleja-Agius J. Skin ageing / J. Calleja-Agius, Y. Muscat-Baron, M. P. Brincat // *Menopause Int.* – 2007. – **13**. – С. 60–64.
6. Collagen fragments inhibit hyaluronan synthesis in skin fibroblasts in response to UVB: New insights into mechanisms of matrix remodelling / K. Rock, M. Grandoch, M. Majora [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2011.
7. Estrogen receptor alpha as a key target of red wine polyphenols action on the endothelium / M. Chalopin, A. Tesse, M. C. Martinez [et al.] // *PLoS One.* – 2010. – **5**, № 2. – P. 8554.
8. Genistein and daidzein stimulate hyaluronan production in transformed human keratinocyte culture and hairless mouse skin / K. Miyazaki, T. Hanamizu, R. Iizuka, K. Chiba // *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* – 2002. – **15**, № 3. – P. 175–183.
9. Hyaluronan synthase induction in mouse epidermis following skin injury / R. Tammi, S. Pasonen-Seppanen, E. Kolehmainen, M. Tammi // *J. Invest. Dermatol.* – 2005. – **124**. – P. 895–905.
10. Shah M. G. Estrogen and skin. An overview / M. G. Shah, H. I. Maibach // *Am J Clin Dermatol.* – 2001. – **2**, № 3. – P. 143–150.
11. Stevenson S. Effect of estrogens on skin aging and the potential role of SERMs / S. Stevenson, J. Thornton // *Clin Interv Aging.* – 2007. – **2**, № 3. – P. 283–297.
12. Transcriptional regulation of proteoglycans and glycosaminoglycan chain-synthesizing glycosyltransferases by UV irradiation in cultured human dermal fibroblasts / J. E. Shin, J. H. Oh, Y. K. Kim [et al.] // *J. Korean Med. Sci.* – 2011. – **26**, № 3. – P. 417–424.
13. Wu C. D. Grape products and oral health / C. D. Wu // *J Nutr.* – 2009. – **139**, № 9. – P. 1818–1823.

А. Л. Загайко¹, В. П. Филимоненко¹, О. А. Красильникова¹,
Л. М. Соловьёва², Ю. А. Огай²
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ¹, ХАРЬКОВ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ ВИНОГРАДА И ВИНА "МАГАРАЧ", ЯЛТА

ВЛИЯНИЕ СУБСТАНЦИИ "ПОЛИКАТЕХИН" НА СОДЕРЖАНИЕ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ В КОЖЕ КРЫС И ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ФИБРОБЛАСТОВ

Резюме

Применение субстанции полифенолов винограда "Поликатехин" увеличивает содержание гиалуроновой кислоты в коже и изолированных фибробластах крыс. Возрастание уровня гиалуроновой кислоты сопровождается снижением глюкозаминогликангидролазной активности в коже и повышением пролиферативной активности фибробластов. Гиалуронатотропный эффект поликатехина более выражен по сравнению с камагелем.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: полифенолы, гиалуроновая кислота, фибробласты, эстрогены, старение кожи.

A. L. Zahayko¹, V. P. Fylymonenko¹, O. A. Krasilnikova¹,
L. M. Solovyova², Yu. O. Oghai²
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY¹, KHARKIV
NATIONAL INSTITUTE OF GRAPE AND WINE "MAGARACH"², YALTA

THE INFLUENCE OF POLYPHENOLIC EXTRACTS FROM GRAPE'S SEEDS ON PROOXIDANT-ANTIOXIDANT PARAMETERS IN RAT TISSUES UNDER STRESS

Summary

Application of essence of grape's polyphenols "Polykatehin" increases of hyaluronic acid content in rat skin and isolated fibroblasts. The increase of hyaluronic acid level is accompanied by the decrease of glucosaminoglycanhydrolase activity in skin and the elevation of proliferative activity of fibroblasts. Hyaluronatotropy effect of "Polykatehin" is more pronounced versus "Kamagel".

KEY WORDS: polyphenols, hyaluronic acid, fibroblasts, estrogens, skin ageing.

Отримано 05.04.12

Адреса для листування: А. Л. Загайко, Національний фармацевтичний університет, вул. Мельникова, 12, Харків, 61002, Україна,
e-mail: andrey.zagayko@gmail.com