

УДК 615.26.017: 616-008.853.2:57.082.26
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-1-63-67>

Оценка функций культивированных лимфоцитов при воздействии препаратов, используемых в косметологической практике

Кудревич Ю.В.¹, Кузнецова Е.К.², Долгушин И.И.¹, Зиганшин О.Р.¹

¹ Южно-Уральский государственный медицинский университет (ЮУГМУ)
Россия, 454092, г. Челябинск, ул. Воровского, 64

² Оренбургский государственный медицинский университет (ОГМУ)
Россия, 460000, г. Оренбург, ул. Советская, 6

РЕЗЮМЕ

Цель – определить количество лимфоцитов, внутриклеточных лимфоцитарных цитокинов, клеточный цикл лимфоцитов, выделенных из крови пациентов при воздействии различных препаратов, оценить функции культивированных лимфоцитов при воздействии препаратов *in vivo* и *in vitro*.

Материалы и методы. Исследованию подвергались лимфоциты, выделенные из крови здоровых женщин при различных условиях. На первом этапе исследования выделялись Т-лимфоциты из крови пациентов до воздействия препарата. Определялись: абсолютное и относительное количество лимфоцитов, внутриклеточные цитокины, клеточный цикл.

На втором этапе в питательную среду, где культивировались лимфоциты, выделенные из крови пациентов, которые не получали системно препараты, добавлялись препараты. К лимфоцитам первой группы пациентов в питательную среду добавлялся препарат экстракта плаценты, к лимфоцитам второй группы пациентов – препарат гиалуроновой кислоты.

На третьем этапе выделялись и культивировались лимфоциты, которые были выделены из крови пациентов после системного воздействия на организм препарата экстракта плаценты или препарата гиалуроновой кислоты, после чего определялись те же показатели лимфоцитов.

Результаты. Количество Т-лимфоцитов увеличивалось при системном использовании препаратов экстракта плаценты и гиалуроновой кислоты и практически не менялось по сравнению с исходными данными при добавлении этих препаратов в питательную среду. Экстракт плаценты и гиалуроновая кислота положительно влияют на митотическую активность клеток, экстракт плаценты в большей степени, чем гиалуроновая кислота. Оба препарата не оказывают негативного влияния на процессы апоптоза Т-лимфоцитов. При действии экстракта плаценты лимфоциты выделяют больше интерлейкинов, которые способствуют пролиферации кератиноцитов.

Заключение. Препараты экстракта плаценты и гиалуроновой кислоты оказывают стимулирующее действие на кератиноциты. Препарат экстракта плаценты оказывают стимулирующее действие на Т-лимфоциты при системном воздействии на организм.

Ключевые слова: культивация лимфоцитов, внутриклеточные цитокины, экстракт плаценты, гиалуроновая кислота

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Для цитирования: Кудревич Ю.В., Кузнецова Е.К., Долгушин И.И., Зиганшин О.Р. Оценка функций культивированных лимфоцитов при воздействии препаратов, используемых в косметологической практике. *Бюллетень сибирской медицины*. 2022;21(1):63–67. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-1-63-67>.

✉ Кудревич Юлия Валерьевна, cyton@mail.ru

Assessment of the functions of cultured lymphocytes when exposed to drugs used in cosmetology

Kudrevich Y.V.¹, Kuznetsova E.K.², Dolgushin I.I.¹, Ziganshin O.R.¹

¹ South Ural State Medical University (SUSMU)
64, Vorovskogo Str., Chelyabinsk, 454092, Russian Federation

² Orenburg State Medical University (OSMU)
6, Sovetskaya Str., Orenburg, 460000, Russian Federation

ABSTRACT

The aim of the study was to determine the number of lymphocytes, intracellular cytokines produced by lymphocytes, and the cell cycle of lymphocytes isolated from the blood of patients when exposed to various drugs, as well as to assess the functions of cultured lymphocytes when exposed to drugs *in vivo* and *in vitro*.

Materials and methods. The study involved lymphocytes isolated from the blood of healthy women under various conditions. At the first stage of the study, T-lymphocytes were isolated from the blood of patients before exposure to the drug. The absolute and relative lymphocyte count, the number of intracellular cytokines, and the cell cycle were determined.

At the second stage, the drugs were added to the nutrient medium, where lymphocytes isolated from the blood of patients who did not receive systemic drugs were cultured. The placental extract preparation was added to the lymphocytes isolated from the first group of patients, while the hyaluronic acid preparation was added to the lymphocytes isolated from the second group of patients.

At the third stage, the lymphocytes isolated from the blood of patients after systemic exposure to the placental extract preparation or hyaluronic acid preparation were isolated and cultured, after which the same lymphocyte parameters were determined.

Results. The number of T-lymphocytes increased with the systemic use of the placental extract and hyaluronic acid preparations and practically did not change compared with the baseline data, when these drugs were added to the nutrient medium. Placental extract and hyaluronic acid had a positive effect on the mitotic activity of cells; it is worth noting that the effect of placental extract was greater than that of hyaluronic acid. Both drugs did not have a negative effect on apoptosis of T-lymphocytes. Under the effect of placental extract, lymphocytes secreted more interleukins, which contributed to proliferation of keratinocytes.

Conclusion. The placental extract and hyaluronic acid preparations have a stimulating effect on keratinocytes. The placental extract preparation has a stimulating effect on T-lymphocytes after systemic exposure of the body to it.

Keywords: lymphocyte culture, intracellular cytokines, placental extract, hyaluronic acid

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious or potential conflict of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The authors state that they received no funding for the study.

For citation: Kudrevich Y.V., Kuznetsova E.K., Dolgushin I.I., Ziganshin O.R. Assessment of the functions of cultured lymphocytes when exposed to drugs used in cosmetology. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2022;21(1):63–67. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-1-63-67>.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из активно изучаемых и развивающихся направлений в медицине эстетической и не только является применение препаратов, в основе которых лежит экстракт плаценты человека, представляющий собой активный комплекс, включающий аминокислоты, ферменты, в том числе и антиоксидантной защиты, витамины, минералы, факторы роста, иммуностропные вещества и т.д. В научных источниках опубликованы данные о стимуляции препаратами

экстракта плаценты регенерации разных тканей [1, 2], о регулирующем влиянии экстракта плаценты на процессы воспаления [3].

В косметологической практике для улучшения качества кожи широко используются препараты гиалуроновой кислоты. Гиалуроновая кислота способствует задержке воды в дерме, оказывает стимулирующее влияние на фибробласты, что приводит к увеличению количества коллагеновых волокон в дерме, нейтрализует действие провоспалительных интерлейкинов в коже, играющих роль в старении кожи [4–7].

В литературных источниках появляется все больше информации об изменениях в коже после воздействия препаратов, способствующих омоложению, но данных о реакциях иммунной системы на введение таких препаратов практически нет. Целью нашего исследования явилось определение количества лимфоцитов, внутриклеточных лимфоцитарных цитокинов, клеточного цикла лимфоцитов, выделенных из крови пациентов при воздействии различных препаратов, а также оценка функции культивированных лимфоцитов при воздействии препаратов *in vivo* и *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованию подвергались лимфоциты, выделенные и культивированные из крови здоровых женщин при различных условиях. На первом этапе исследования были выделены Т-лимфоциты из крови пациентов до введения им препарата экстракта плаценты и гиалуроновой кислоты. Эти лимфоциты культивировались в питательной среде, после чего определялись абсолютное и относительное количество лимфоцитов, количество лимфоцитов, находящихся в апоптозе, внутриклеточные лимфоцитарные цитокины, клеточный цикл.

На втором этапе в питательную среду, где культивировались лимфоциты, выделенные из крови пациентов, которые не получали препараты системно, добавлялись препараты. К лимфоцитам первой группы пациентов в питательную среду добавлялся препарат экстракта плаценты, к лимфоцитам второй группы пациентов – препарат гиалуроновой кислоты (воздействие препаратов *in vitro*). После определенного инкубационного периода определялись те же показатели, что и на первом этапе исследования.

На третьем этапе выделялись и культивировались лимфоциты, которые были выделены из крови пациентов после системного воздействия на организм препарата экстракта плаценты или препарата гиалуроновой кислоты (воздействие препаратов *in vivo*), после чего определялись те же показатели лимфоцитов.

Полученные данные подвергались статистической обработке. Согласно критерию Колмогорова – Смирнова, распределение выборки было неправильным, поэтому использовались непараметрические методы статистической обработки полученного материала. Определяли моду *Mo*, медиану, 25-й и 75-й процентиля *Me* (25/75). Расчет проводился с помощью пакетов прикладных программ IBM SPSS Statistics 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе исходное среднее абсолютное количество Т-лимфоцитов, выделенных из крови пациенток, не получавших никакого воздействия, со-

ставляло 15 448 клеток, а относительное количество – 97,2%. После воздействия препарата экстракта плаценты *in vitro* эти показатели практически не изменились и составили 15 749 клеток и 97,0% соответственно, а при воздействии препарата экстракта плаценты *in vivo* абсолютное количество Т-лимфоцитов значительно увеличилось и стало составлять 19402 клеток в среде.

При воздействии гиалуроновой кислоты абсолютное и относительное количество Т-лимфоцитов как при *in vivo*, так и при *in vitro* воздействии снижалось. Так, *in vitro* количество Т-лимфоцитов стало составлять 14 888 клеток, *in vivo* – 12 349, т. е. при системном воздействии на организм препарата гиалуроновой кислоты произошло более выраженное снижение количества лимфоцитов. Такая же тенденция была и в изменении относительного количества лимфоцитов: 95,3 и 95,1% при *in vitro* и *in vivo* воздействии соответственно.

Оценивая количество пролиферирующих клеток, которые находились в стадии G2 и стадии M клеточного цикла (это синтетическая и митотическая фазы, свидетельствующие об активной пролиферации клеток), мы обнаружили увеличение этого показателя у пациентов обеих групп, получивших экстракт плаценты и препарат гиалуроновой кислоты. Причем увеличение происходило при воздействии препаратов как *in vitro*, так и *in vivo*. При воздействии экстракта плаценты абсолютное количество пролиферирующих клеток увеличилось со 143 до 276 *in vitro* и до 887 *in vivo*, а при воздействии гиалуроновой кислоты до 396 и 194 клеток соответственно. Таким образом, степень увеличения количества клеток более выражена при воздействии экстракта плаценты, что, вероятно, объясняется иммуностропными свойствами этого препарата.

Относительное количество пролиферирующих клеток также увеличивалось. Тенденция была такой же, как и при увеличении абсолютного количества пролиферирующих Т-лимфоцитов. На количество апоптотических клеток препараты практически не оказывали влияния. Абсолютное и относительное количество лимфоцитов, находящихся в апоптозе, практически не менялось ни при воздействии обоих препаратов *in vitro*, ни *in vivo*. Это может свидетельствовать о том, что препараты экстракта плаценты и гиалуроновой кислоты не оказывали негативного влияния на организм.

ДНК-индекс, т. е. соотношение клеток, клеточный цикл которых находился в стадии G1 и G2, практически не менялся при воздействии разных препаратов. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Количество культивированных лимфоцитов, показатели клеточного цикла лимфоцитов до и после воздействия препаратов <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>						
Показатель	Статистические показатели	Культивация лимфоцитов				
		без воздействия, <i>n</i> = 12	с добавлением экстракта плаценты <i>in vitro</i> , <i>n</i> = 12	после системного воздействия экстракта плаценты <i>in vivo</i> , <i>n</i> = 12	с добавлением гиалуроновой кислоты <i>in vitro</i> , <i>n</i> = 12	после системного воздействия гиалуроновой кислоты <i>in vivo</i> , <i>n</i> = 12
Нормальные клетки (G0/G1)	<i>Mo</i>	2 480	15 874	8 708	11 153	14 333
	<i>Me</i> (25/75)	15 448 (1476,0/1570,0)	15 749 (13704,0/17169,0)	19 402 (12184,0/46790,0)**	14 888 (9321/16291)	12 349 (6765/14223)**
Пролиферирующие клетки (G2, M)	<i>Mo</i>	28	31	18	6	70
	<i>Me</i> (25/75)	143 (26,25/443,7)	276 (83,7/415,5)*	887 (242,0/1556,0)**	396 (119,7/586,0)**	194 (80,2/432,7)
Апоптотические клетки	<i>Mo</i>	10,0	4,0	0,8	42,0	4,0
	<i>Me</i> (25/75)	37 (3,75/55,7)	31,5 (10/53)	42 (4,5/81,5)	19,5 (4,5/42,5)	37,5 (14/66)
Нормальные клетки (G0/G1)	<i>Mo</i>	95,2	97,8	82,7	62,3	82,1
	<i>Me</i> (25/75)	97,2 (95,2/98,7)	97 (93,6/97,8)	96,4 (85,6/99,2)	95,3 (90,7/97,3)	95,1 (89,0/97,2)
Пролиферирующие клетки G2, M)	<i>Mo</i>	0,1	0,2	0,1	0,2	0,51
	<i>Me</i> (25/75)	0,15 (0,1/0,91)	0,58 (0,17/1,62)**	1,4 (0,42/4,35)**	0,64 (0,31/1,22)**	0,87 (0,62/1,32)**
Апоптотические клетки	<i>Mo</i>	0,1	0,1	0,3	0,3	0,4
	<i>Me</i> (25/75)	0,3 (0,1/2,3)	0,4 (0,1/1,67)	0,3 (0,15/1,45)	0,35 (0,3/0,55)	0,55 (0,32/0,9)
ДНК-индекс (G1/G2)	<i>Mo</i>	1,93	1,96	1,67	1,96	0,97
	<i>Me</i> (25/75)	1,93 (1,84/2,08)	1,97 (1,91/2,11)	2,01 (1,9/6,52)	1,97 (1,96/2)	1,96 (1,85/2)

***p* < 0,01, **p* < 0,05 – достоверность отличий между показателями до воздействия и после воздействия препаратов *in vitro* и *in vivo* (здесь и в табл. 2).

При оценке количества внутриклеточных цитокинов, которые культивированные Т-лимфоциты выделяли в питательную среду, мы обнаружили снижение количества интерлейкина (IL) 1b, вырабатываемого субпопуляцией CD4+. Его уменьшение наблюдалось при добавлении в питательную среду как экстракта плаценты, так и гиалуроновой кислоты.

Субпопуляция лимфоцитов с фенотипом CD8+ этот цитокин выделяла в большей степени при до-

бавлении экстракта плаценты, чем при добавлении гиалуроновой кислоты.

Уровень IL-17A увеличивался в среде, где культивировались лимфоциты с фенотипом CD4+ с добавлением экстракта плаценты, и снижался при добавлении к этим лимфоцитам гиалуроновой кислоты. Количество IL-17A, вырабатываемого лимфоцитами с фенотипом CD8+, увеличивалось при добавлении экстракта плаценты и гиалуроновой кислоты. Данные представлены в табл. 2.

Таблица 2

Количество внутриклеточных цитокинов до воздействия препаратов и после добавлении препаратов в питательную среду				
Показатель	Статистические показатели	Продукция цитокинов лимфоцитами		
		спонтанная, <i>n</i> = 12	с добавлением в среду экстракта плаценты, <i>n</i> = 12	с добавлением в среду гиалуроновой кислоты, <i>n</i> = 12
CD4+(IL1b)	<i>Mo</i>	4,0	25,0	3,0
	<i>Me</i> (25/75)	12,0 (4,0/61,25)	8,0 (3,75/26,75)**	8,5 (4,5/56,0)**
CD8+(IL1b)	<i>Mo</i>	7,0	17,0	7,0
	<i>Me</i> (25/75)	8,5 (2,0/20,25)	10,5 (6,25/17,0)**	7,0 (6,0/7,5)
CD4+(IL-17A)	<i>Mo</i>	1,0	2,0	4,0
	<i>Me</i> (25/75)	6,0 (1,0/19,0)	9,0 (6,5/24,0)**	4,0 (3,0/4,0)**
CD8+(IL-17A)	<i>Mo</i>	4,0	8,0	9,0
	<i>Me</i> (25/75)	6,0 (4,0/10,0)	8,5 (7,75/18,0)*	9,0 (9,0/12,0)*

ОБСУЖДЕНИЕ

Количество Т-лимфоцитов при воздействии экстракта плаценты увеличивалось *in vivo* и практически не менялось *in vitro*. Это, вероятно, свидетельствует о том, что описанное иммуностропное действие экстракта плаценты будет реализовываться при условии комплексного действия на иммунную систему организма, где все звенья иммунной системы связаны друг с другом и находятся в тесном взаимодействии и взаимовлиянии.

Количество лимфоцитов при воздействии гиалуроновой кислоты, напротив, снижалось *in vivo* и не менялось *in vitro*. Этот факт, видимо, обусловлен необходимостью элиминировать чужеродное вещество, которым является гиалуроновая кислота, вводимая внутридермально, и лимфоциты расходуются на этот процесс.

И экстракт плаценты, и гиалуроновая кислота стимулируют митоз и пролиферацию клеток. При системном действии экстракта плаценты этот процесс идет более активно по сравнению с системным влиянием гиалуроновой кислоты, что, возможно, объясняется более выраженным положительным влиянием экстракта плаценты на иммунную систему и организм в целом. На процессы апоптоза лимфоцитов эти препараты никакого влияния не оказывают, что может говорить о безопасности их применения препаратов для иммунной системы.

Оценивая количество интерлейкинов, которые оказывают стимулирующее влияние на пролиферацию кератиноцитов, можно говорить о том, что общее количество интерлейкинов 1b и 17A увеличивается в большей степени при действии экстракта плаценты, чем гиалуроновой кислоты. На этом основании можно рассуждать о большей эффективности экстракта плаценты в отношении обновления клеток кожи, хотя и гиалуроновая кислота обладает подобным действием.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экстракт плаценты оказывает стимулирующее влияние на лимфоциты при системном действии препарата на организм. Также результаты исследования позволяют рассуждать о стимулирующем действии экстракта плаценты и гиалуроновой кислоты не только на иммунную систему, но и на качество кожи.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Pal P., Mallick S., Mandal S.K., Das M., Dutta A.K., Datta P.K. et al. Human placental extract: *in vivo* and *in vitro* assessments of its melanocyte growth and pigment-inducing activities. *International Journal of Dermatology*. 2002;41:760–767. DOI: 10.1046/j.1365-4362.2002.01524.x.
2. Seo T., Han I., Yoon J., Seol I., Kim Y., Jo H. et al. Growth-promoting activity of Hominis Placenta extract on regenerating sciatic nerve. *Acta Pharmacol. Sin*. 2006;27(1):50–58. DOI: 10.1111/j.1745-7254.2006.00252.x.
3. Lee K., Kim T., Lee W., Rim S., Lee S. Anti-inflammatory and analgesic effects of human placenta extract. *Nat. Prod. Res.* 2011;25(11):1090–1100. DOI: 10.1080/14786419.2010.489050.
4. Arora G., Arora S., Sadoughifar R., Batra N. Biorevitalization of the skin with skin boosters: Concepts, variables, and limitations. *J. Cosmet. Dermatol.* 2021;20(8):2458–2462. DOI: 10.1111/jocd.13871.
5. Sparavigna F., Tenconi B., De Ponti I. Antiaging, photoprotective, and brightening activity in biorevitalization: a new solution for aging skin. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* 2015;10(8):57–65. DOI: 10.2147/CCID.S77742.
6. Zerbinati N., Sommatis S., Maccario C., Capillo M., Francesco S., Rauso R. et al. *In vitro* evaluation of the effect of a not cross-linked hyaluronic acid hydrogel on human keratinocytes for mesotherapy. *Gels*. 2021;7(1):15. DOI: 10.3390/gels7010015.
7. Avantaggiato A., Girardi A., Palmieri A., Pascali M., Carinci F. Comparison of bio-revitalizing injective products: a study on skin fibroblast cultures. *Rejuvenation Res.* 2015;18(3):270–276. DOI: 10.1089/rej.2014.1654.

Информация об авторах

Кудревич Юлия Валерьевна – канд. мед. наук, доцент, кафедра дерматовенерологии, ЮУГМУ, г. Челябинск, cyton@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-8867-0775>

Кузнецова Евгения Константиновна – канд. мед. наук, доцент, кафедра дерматовенерологии, ОГМУ, г. Оренбург, estroukova@ya.ru, <http://orcid.org/0000-0001-8670-2828>

Долгушин Илья Ильич – д-р мед. наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии, ЮУГМУ, г. Челябинск, dol-ii@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-0901-8042>

Зиганшин Олег Раисович – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой дерматовенерологии, ЮУГМУ, г. Челябинск, ziganshin_oleg@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-5857-0319>

(✉) Кудревич Юлия Валерьевна, cyton@mail.ru

Поступила в редакцию 19.04.2021;
одобрена после рецензирования 28.05.2021;
принята к публикации 24.09.2021