

УДК: 591.823

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВОЛОКНИСТОГО КОМПОНЕНТА СТАРЕЮЩЕЙ КОЖИ КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СПИРОСОЧЛЕНЕННОГО 1,2,3-ТРИАЗОЛО-[5,1-*b*]-1,3,4-ТИАДИАЗИНА

Чебанова Софья Юрьевна¹, Ануфриева Вероника Павловна², Петрова Ирина Михайловна¹, Хацко Сергей Леонидович¹, Калинина Татьяна Андреевна², Глухарева Татьяна Владимировна²

¹Институт естественных наук и математики

²Химико-технологический институт

ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»

Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Старение кожи прежде всего связано с ослаблением функциональной активности фибробластов. Одним из проявлений старения в коже является дезорганизация компонентов межклеточного вещества, в частности коллагеновых волокон. **Цель исследования** – дать морфологическую характеристику волокнистому компоненту кожи при воздействии производного 1,2,3-триазоло-[5,1-*b*]-1,3,4-тиадиазина (STT). **Материал и методы.** Проведена овариэктомия у 15 самок белых лабораторных крыс для создания экспериментальной модели стареющей кожи. После операции на кожу крыс наносилась мазь, содержащая STT. С помощью анализатора кожи измеряли уровни себума и коллагена. Проводили морфологическое описание препаратов кожи с оценкой диаметра пучков коллагеновых волокон. **Результаты.** При воздействии STT на кожу отмечается активация синтетической деятельности фибробластов, что проявляется в увеличении количества коллагеновых волокон и улучшении их структуры в сравнении с контрольной группой. **Выводы.** Показано, что использование STT приводит к менее выраженным возрастным изменениям кожи, в частности ее волокнистого компонента. Вероятно, это связано со стимулирующим влиянием STT на активность фибробластов. Полученные результаты обосновывают дальнейшее изучение STT в качестве средства, корректирующего возрастные изменения кожи.

Ключевые слова: кожа, овариэктомия, старение, коллаген, фибробласты, триазолы.

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE AGING SKIN FIBROUS COMPONENT IN RATS UNDER SPIROCONJUGATED 1,2,3-TRIAZOLO-[5,1-*b*]-1,3,4-THIADIAZINE INFLUENCE

Chebanova Sofia Iurievna¹, Anufrieva Veronika Pavlovna², Petrova Irina Mikhailovna¹, Khatsko Sergei Leonidovich¹, Kalinina Tatiana Andreevna², Glukhareva Tatiana Vladimirovna²

¹Institute of Natural Sciences and Mathematics

²Institute of Chemical Engineering

Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Eltsin

Yekaterinburg, Russia

Abstract

Introduction. Skin aging is associated with a weakening of the fibroblasts functional activity. One of the reasons for skin aging is the disorganization of the intercellular substance components, in particular collagen fibers. **The aim of this study** is the morphological characterization of the skin fibrous component under STT applying. **Material and methods.** Ovariectomy was performed on 15 female white laboratory rats for an experimental model of aging skin. After surgery, an ointment containing STT was applied. Sebum and collagen levels were measured using a skin analyzer. A morphological description of skin preparations was carried out with an assessment of the collagen fibers diameter. **Results.** STT applying leads to activation of the fibroblasts synthetic activity, which shows an increase in the number of collagen fibers and an improvement in their structure. **Conclusion.** STT applying leads to less pronounced age-related skin changes, in particular its fibrous component. This is probably connecting with the STT stimulating effect on fibroblast activity. The results obtained justify further study of STT as a means of correcting age-related skin changes.

Keywords: skin, ovariectomy, aging, collagen, fibroblasts, triazoles.

ВВЕДЕНИЕ

Старение – процесс, затрагивающий все органы и ткани, однако заметнее всего он проявляется на коже. Возрастные изменения кожи проявляются в виде истончения эпидермиса и дермы, сглаживания дермально-эпидермального соединения, потери эластичности, нарушения гидробаланса, а также микроциркуляции [1,2]. Наблюдаемые сдвиги во многом связаны с уменьшением количества фибробластов – функционально ведущих клеток соединительной ткани. Возрастные изменения дермальных фибробластов проявляются и в угнетении их синтетической активности. Ослабление функциональной активности

фибробластов сопровождается дезорганизацией компонентов межклеточного вещества, в том числе его волокон [3,4]. Многие исследователи определяют нарушение гомеостаза коллагенового матрикса как отличительную характеристику стареющей кожи. По мнению ведущих исследователей, нарушение гомеостаза коллагенового матрикса является отличительной характеристикой стареющей кожи [2-4].

Коллагеновые волокна – основной межклеточный компонент дермального слоя, роль которого состоит в обеспечении кожи прочностными характеристиками, а также определении её архитектоники. В процессе старения наблюдается не только снижение количества коллагеновых волокон, но также их химическая и пространственная модификация. С возрастом структура коллагена меняется, он становится жестким и теряет упорядоченную организацию. Кроме того, в возрастной коже имеет место фрагментация коллагенового матрикса, приводящая к дезорганизации межклеточного вещества. В свою очередь, такие изменения нарушают деятельность фибробластов, что проявляется в угнетении синтеза коллагена и увеличении продукции металлопротеиназ. Последние также играют важную роль в деградации коллагеновых волокон [3].

Фенотипически эти возрастные изменения характеризуются прежде всего снижением тургора кожи и образованием морщин. В связи с этим большинство методик и препаратов, направленных на коррекцию возрастных изменений ставят своей целью стимуляцию синтеза коллагена.

Ранее было показано [5], что синтетическое соединение этиловый эфир 5-(4-этоксibenзоил)-5,7-дигидроspиро[циклопентан-1,6-[1,2,3]триазоло[5,1-*b*][1,3,4]тиадиазин]-3-карбоновой кислоты (STT) оказывает стимулирующий эффект на пролиферацию и синтетическую активность фибробластов. Исходя из описанных выше закономерностей, связывающих возрастные изменения кожи с угнетением функций фибробластов и деградацией коллагена, можно выдвинуть гипотезу о потенциальном антивозрастном эффекте данного вещества.

Таким образом, целью данного исследования является морфологическая характеристика волокнистого компонента стареющей кожи при воздействии производного 1,2,3-триазоло-[5,1-*b*]-1,3,4-тиадиазина.

Цель исследования – дать морфологическую характеристику волокнистому компоненту кожи при воздействии производного 1,2,3-триазоло-[5,1-*b*]-1,3,4-тиадиазина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведен эксперимент по изучению эффекта STT на замедление возрастных изменений кожи крыс, в частности ее волокнистого компонента. Исследование выполнено на модели двусторонней овариэктомии у крыс, широко используемой для моделирования возрастных изменений [6].

В эксперименте использовали мазь, содержащую исследуемое вещество – STT – спиросочлененный 1,2,3-триазоло[5,1-*b*]1,3,4-тиадиазин. Синтез STT и приготовление мази осуществлены согласно разработанным ранее методам. Мазь для кожного нанесения животным, содержащую 0,4% (масс.) действующего вещества готовили путем растворения 800 мг 1,2,3-триазола в 800 мкл диметилсульфоксида и добавления к раствору 100 г ланолина, расплавленного при 50 °С на водяной бане и 100 г стерильной воды [5].

Исследование проведено на 15 самках беспородных белых крыс 3-х месячного возраста. Критериями отбора служили общее состояние животных, здоровый вид и поведение, отсутствие признаков заболеваний. Животные были рандомизированы и разбиты на группы по 5 особей в каждой:

- 1) INT – интактные крысы;
- 2) OV_CONTR – крысы с овариэктомией без применения мази с STT;
- 3) OV_STT – крысы с овариэктомией с последующим применением мази с STT.

Животным опытных групп в возрасте 3-х месяцев проводилась двусторонняя овариэктомия. Через 60 суток после операции опытным крысам ежедневно в течение 15 суток на депилированную кожу межлопаточной области наносилась мазь, содержащая STT в

количестве 0,2 г. На 15-е сутки эксперимента с помощью анализатора ЕН 900 U измеряли уровень себума на поверхности кожи, а также уровень коллагена [7], после чего животных выводили из эксперимента передозировкой диэтилового эфира.

Хирургическое вмешательство и болезненные манипуляции проводили под эфирным наркозом. Условия работы с животными соответствовали правилам Европейской Конвенции ЕТ/S 129 (1986) и директивам 2010/63/EU.

С межлопаточной области крыс производился забор образца кожи. Фиксацию образцов осуществляли в 10% нейтральном формалине, затем промывали в проточной воде, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации. Для гистологического исследования использовали стандартные методы гистологической техники с изготовлением парафиновых срезов толщиной 3 мкм.

Срезы окрашивались гематоксилином и эозином для оценки общей морфологической картины, а также пикрофуксином по Ван-Гизону и по методу Маллори для характеристики коллагеновых волокон. Для морфологического исследования использовали микроскоп Zeiss Primo Star с подключаемой камерой. С помощью программы TourView измеряли толщину пучков коллагеновых волокон. Подсчёт осуществляли в 10 полях зрения.

Статистическую обработку результатов проводили в компьютерных программах «Microsoft Excel» и «Статистика 12.0». Вычислялось среднее значение, стандартное отклонение и ошибка среднего. Для оценки значимости различий между группами использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса. При вероятности ошибки $(p) < 0,05$ различия между средними значениями считались достоверными.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате исследования был выявлен ряд морфологических особенностей, свидетельствующих о процессах старения кожи крыс с овариэктомией. При окрашивании препаратов кожи гематоксилином и эозином (Рис.1А) в группе OV_CONTR были выявлены участки с ослаблением эпидермально-дермального перехода, истончение сосочкового слоя дермы. В группе с применением STT эти процессы выражены в меньшей степени.

В коже крыс, подвергшихся овариэктомии заметно снижена клеточная плотность. Однако, в группе OV_STT, напротив, отмечается повышенное число клеток, что особенно характерно для сосочкового слоя кожи.

Кроме того, после овариэктомии в коже увеличивается число сальных желез. При этом, однако, не наблюдается увеличения их секреторной активности, о чем свидетельствует уровень себума, измеренный с помощью анализатора кожи. Так, уровень себума у интактных крыс составил $31 \pm 2,30\%$, у крыс с овариэктомией без применения STT и после воздействия мастью с STT – $31,87 \pm 1,87\%$ и $30 \pm 0,76\%$ соответственно. Эти показатели соотносятся с данными литературы о возрастных изменениях кожных дериватов [2].

При окрашивании препаратов кожи по Маллори (Рис.1Б) в группе OV_CONTR были выявлены изменения в волокнистом компоненте. Отмечалось разрыхление коллагеновой сети, нарушение структуры коллагеновых пучков и их фрагментация. У крыс, на кожу которых после овариэктомии наносилась мазь с STT, подобных изменений выражено не было.

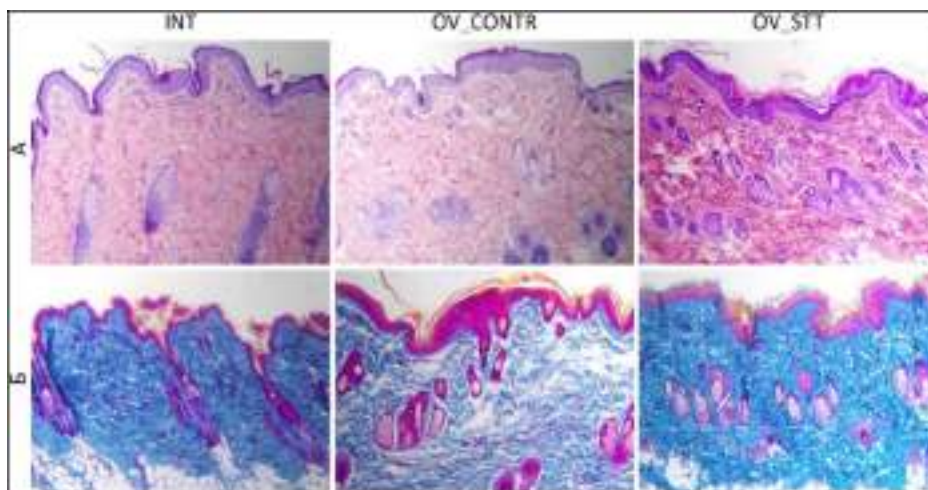


Рис.1 Морфологическая структура кожи крыс с овариэктомией: А – окрашивание гематоксилином и эозином, Б – окрашивание по Маллори. Ув.100х

Измерение с помощью анализатора кожи показателя уровня коллагена достоверных различий между группами не выявило. Так, уровень коллагена у интактных животных составил $25 \pm 2,35\%$, у крыс групп OV_CONTR и OV_STT – $25 \pm 0,27\%$ и $25,83 \pm 0,68\%$ соответственно.

Тем не менее при измерении толщины пучков коллагеновых волокон на препаратах, окрашенных по Ван-Гизону были установлены достоверные различия. В группе OV_CONTR наблюдается уменьшение толщины коллагеновых пучков по сравнению с интактными животными, а после использования мази, содержащей STT, наблюдается тенденция к увеличению толщины волокон (Рис.2).

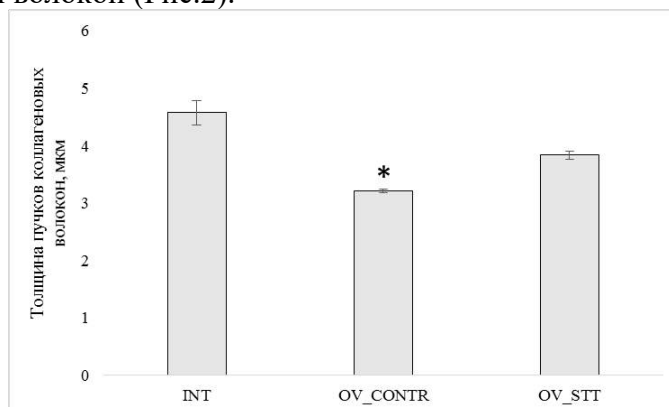


Рис.2 Толщина пучков коллагеновых волокон

Примечание: *различия показателей статистически значимы при сравнении с группой INT ($p < 0,05$)

На препаратах, окрашенных по Ван-Гизону (Рис.3) также заметна дезорганизация коллагеновых волокон и их фрагментация, а также снижение площади, занимаемой ими. Окраска коллагеновых волокон менее интенсивная. В группе OV_STT волокон определяется больше, они расположены плотнее, имеют более яркую окраску и упорядоченную структуру.



Рис.3 Морфологическая структура коллагенового компонента кожи крыс с овариэктомией, окрашивание по Ван-Гизону. Ув.400х

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты соотносятся с литературными данными о возрастных изменениях кожи. Уменьшение количества фибробластических клеток характерно для группы с овариэктомией без последующего воздействия на кожу мази, содержащей STT, что подтверждает связь ослабления функциональной активности этих клеток и возрастных изменений. Волокнистый компонент претерпевает наибольшие изменения в группе животных с овариэктомией без применения STT. Снижение активности клеток, вероятно, приводит к снижению продукции компонентов межклеточного вещества и, как следствие, к дезорганизации последнего. Применение STT обеспечивает коррекцию возрастных изменений, что отражается на состоянии коллагеновых волокон. Тем не менее, механизмы, за счет которых STT оказывает благоприятный эффект на состояние кожи в условиях ее старения, остаются неизвестными и требуют дальнейшего изучения.

ВЫВОДЫ

1. Овариэктомия у крыс ассоциирована с возрастными изменениями в коже, проявляющимися в истончении эпидермиса и дермы, уменьшении числа фибробластов и деградации компонентов межклеточного вещества, в частности коллагеновых волокон.

2. Применение STT приводит к сохранению структуры волокнистого компонента кожи в условиях овариэктомии. Толщина коллагеновых волокон и их структура соотносятся с таковыми в интактной коже.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Мантурова, Н. Е. Старение кожи: механизмы формирования и структурные изменения / Н. Е. Мантурова, Р. В. Гордилов, А. В. Кононов // *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии*. – 2010. – №1. – С. 88–92.
2. Морфофункциональная характеристика дермы кожи и ее изменения при старении / С. С. Целуйко, Е. А. Малюк, Л. С. Корнеева, Н. П. Красавина // *Бюллетень физиологии и патологии дыхания*. – 2016. – №.60 – С. 111–116.
3. Зорина, А. И. Дермальные фибробласты: разнообразие фенотипов и физиологических функций, роль в старении кожи / А. И. Зорина, В. Л. Зорин, В. Р. Черкасов // *Эстетическая медицина*. – 2012. – № 2. – С. 15-31.
4. Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of agedependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation / J. Varani, M. K Dame, L. Rittie [et al.] // *The American Journal of Pathology*. – 2006. – Vol. 168, № 6. – P. 1861–1868.
5. Оценка ранозаживляющего действия спиросочлененного 1,2,3-триазоло[5,1-b][1,3,4]тиадиазина на модели линейной кожной раны / О.А. Высокова, А. В. Жданова, И. М. Петрова [и др.] // *Химико-фармацевтический журнал*. – 2019. – №7. – С. 41–44.
6. Estrogen protects against oxidative multiorgan damage in rats with chronic renal failure / O. Kasimay, G. Sener, B. Cakir [et al.] // *Renal failure*. – 2009. – Vol. 31, № 8. – P. 711–725.
7. Anti-Aging Effectiveness of Red Spinach Extract Ointment (*Amaranthus Tricolor L.*) Against Collagen, Elasticity, Hydration, Sebum, and Pigment Levels in Wistar Rats / Amélia, E. Girsang, A. N. Nasution [et al.] // *2021 IEEE International Conference on Health, Instrumentation & Measurement, and Natural Sciences (InHeNce)*. – 2021. – P. 1–6.

Сведения об авторах

С.Ю. Чебанова* – студент магистратуры Института естественных наук и математики

В.П. Ануфриева – студент магистратуры Химико-технологического института

И.М. Петрова – старший преподаватель

С.Л. Хацко – заведующий анатомо-физиологической экспериментальной лабораторией

Т.А. Калинина – кандидат химических наук, доцент

Т.В. Глухарева – кандидат химических наук, доцент

Information about the authors

S.Iu. Chebanova* – M.S. student

V.P. Anufrieva – M.S. student

I.M. Petrova – Senior Lecturer

S.L. Khatsko – Head of the Anatomical and physiological experimental laboratory

T.A. Kalinina – Associate Professor, PhD (Chemistry)

T.V. Glukhareva – Associate Professor, PhD (Chemistry)

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

Chebanovason@mail.ru