Систематический анализ молекулярных механизмов воздействия стандартизированных экстрактов плаценты человека на регуляцию пигментообразования кожи

Громова О.А. [1,2], Торшин И.Ю.[1], Диброва Е.А.[3],
Керимкулова Н.В.[2], Гилельс А.В.[3].

1- Российский сателлитный центр института Микроэлементов ЮНЕСКО, Москва
2 – ГБОУ ВПО « Ивановская государственная медицинская академия»
Минсоцздравразвития России
3 - Корпорация RHANA

Для корреспонденции:
Громова Ольга Алексеевна
e-mail: unesco.gromova@gmail.com

Абстракт

Утрата регуляции пигментообразования в меланоцитах является характерной составляющей старения кожи. Гиперпигментация кожи сопровождает нарушения меланинового обмена, заболевания печени, почек и др. Гиперпигментация является следствием не только т.н. «ультрафиолетового старения», но и гормональной дизрегуляции. В настоящей работе рассмотрены наиболее вероятные молекулярные механизмы воздействия молекулярных компонентов экстрактов плаценты человека на пигментообразование. Приведены данные экспериментальных и клинических исследований указывающих на перспективность использования стандартизированных экстрактов плаценты в эстетической медицине.

Введение

Нарушения пигментации кожи, которые являются характерным компонентом процесса старения, весьма разнообразны. У людей старше 45-50 лет усиливается «веснушчатость» кожи лица, плеч, верхней части спины и тыльной поверхности кистей рук. Зачастую, эти феномены у женщин сопровождаются падением уровней эстрогенов. И у женщин, и у мужчин, с возрастом снижается толерантность кожи к УФО, что приводит к появлению пигментных пятен (пятен гиперпигментации). При беременности, у женщин с очень светлой кожей может наблюдаться появление участков гиперпигментированной кожи в гормонозависимых зонах (область ареолы, внутреняя поверхность бедер и прямая линия живота), отмечено появление пигментных пятен неправильной формы в области щек, скул, лба, шеи и т.д. [1].

Многие заболевания (алкоголизм, гепатит, нарушение выделительной функции почек, недостаточность адреналовых желез, гемохроматоз, различные интоксикации и др. [2, 3]) провоцируют старение кожи по типу «равномерной» гиперпигментации (потемнение кожи). Курение снижает антиоксидантный потенциал кожи и приводит к ускорению видимых проявлений старения кожи в виде потери влаги, эластичности и гиперпигментации кожи. Вследствие меньшей толщины кожи, у курящих женщин этот феномен развивается на 10-12 лет быстрее чем у курящих мужчин.

Нарушения пигментации трудно поддаются лечению, особенно у пациентов с исходно более темным цветом кожи лица. Первая линия терапии обычно состоит из депигментирующих средств в дополнение к защите кожи от избытка солнечного излучения. В качестве депигментирующих средств используются такие *ингибиторы тирозиназы как гидрохинон, азелаиновая кислота, койевая кислоты, арбутин, экстракт солодки, ретиноиды, аскорбиновая кислота, ниацинамид и экстракты сои* [4]. Идеально, целью терапии является уменьшение гиперпигментации отдельных участков без того,

чтобы вызывать нежелательную гипопигментацию или раздражение в окружении нормально пигментированной кожи.

Например, самым распространенным средством лечения является топическое применение мазей на основе гидрохинона. Тем не менее, существуют определенные побочные эффекты от использования гидрохинона: раздражение, аллергический контактный дерматит, обесцвечивание ногтей и гипопигментация нормально окрашенных участков кожи [5].

Таким образом, поддержка нормального, равномерного окрашивания кожи является насущной проблемой эстетической медицины. В настоящей статье рассмотрено весьма перспективное направление терапии нарушений пигментации кожи – применение стандартизованных экстрактов плаценты человека, которые содержат многочисленные ростовые факторы и другие биологически активные компоненты. Рассмотрены результаты фундаментальных и клинических исследований, сформулированы наиболее вероятные механизмы воздействия молекулярных компонентов стандартизированных экстрактов плаценты на нормализацию процессов пигментации кожи.

Использование аппаратных методик для объективной оценки пигментации кожи

Дерматологи и специалисты по эстетической медицине борятся с нарушениями структуры и окраски кожи, прежде всего, в области лица, шеи и кистей рук. До недавнего времени, оценка пигментации кожи проводилось визульно, по специальным визуальным шкалам. В настоящее время, цветовые шкалы успешно дополняются новыми аппаратными методиками. В настоящем разделе кратко рассмотрены современные аппаратные методы для количественной оценки колористики кожи.

Окраска кожи обусловлена ограниченным количеством красителей или «пигментов» в слоях кожи. Основными пигментами являются меланин и порфирины (прежде всего, гемоглобин) [6, 7]. Высокие концентрации меланина и гемоглобина являются маркерами различных заболеваний кожи и основными факторами, которые нарушают рисунок кожи.

Меланин залегает на разных глубинах в пределах эпидермиса. В нормальной, здоровой коже, частицы меланина очень малы и равномерно распределены, в результате чего формируется гладкий, ровный тон кожи. Увеличение отложений меланина может быть вызвано либо длительным воздействии УФО или же кожными заболеваниями (например, угревой сыпью). Т.н. гиперпигментированные «УФО пятна» отражают общее количество повреждений кожи вследствие УФО облучения - меньшее количество, площадь и интенсивность окрашивания пятен соответствуют меньшей степени повреждения кожи.

Повышенное содержание *порфиринов (т.е. гемоглобина)* приводит к появлению красных пятен гиперпигментации кожи. При *микротравматизации кожи*, гемоглобин перемещается из сосудистых структур в сосочковый слой дермы. Некоторые кожные заболевания, такие, как акне, розацеа, телеангиэктазии приводят к органическим изменениям в структуре сосудистых пациентов и повышают уровень гемоглобина в коже. «Порфириновые пятна» также могут рассматриваться как косвенный показатель *бактериальной активности* на поверхности кожи (уровни порфиринов выше при большем числе бактерий) - сниженные уровни бактерий соответствуют уменьшению воспаления и микротрещин в кожи.

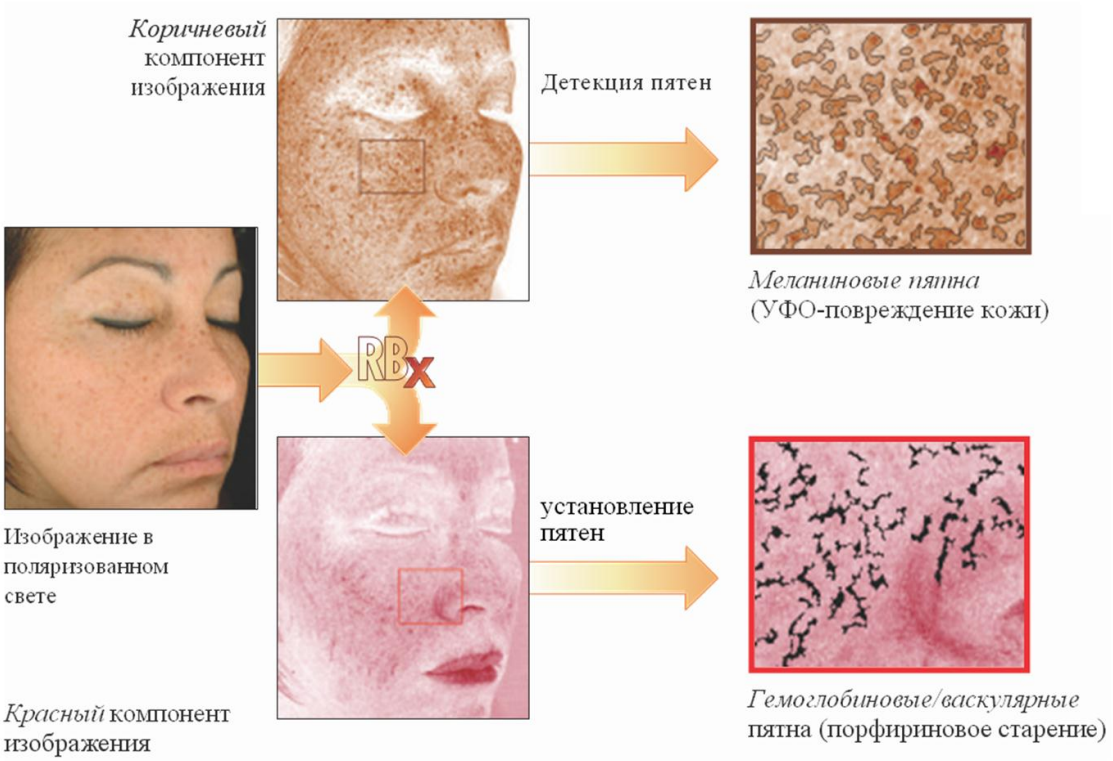
Пигментация кожи не может быть оценена только через исследование кожи на обычных фотографиях, даже с высоким разрешением. Поэтому, для более объективного анализа необходима съемка при различных условиях освещения [8]. В частности, *технология VISIA – сравнительно новая комплексная программно-аппаратная система*, позволяющая делать цифровые фотографии при различных условиях освещения (поляризованный свет, УФО и др.) и проводить их анализ посредством специальных компьютерных алгоритмов. Данная технология (известна также как RBX, от англ.

«Red/Brown/X» т.е. красный/коричневый/X-спектр) все шире используется в дерматологии и эстетической медицине для изучения терапевтического отклика на использование препаратов и процедур [9-11].

Автоматизированное определение числа, площади и интенсивности «меланиновых» («УФО») и «порфириновых» пятен позволяет дать объективную оценку состояния кожи лица с подробным описанием по нескольким параметрам: морщины, пигментация кожи, размер пор, цвет кожи, оценку содержания бактерий, скрытую пигментацию кожи, вызванную воздействием солнца [12-14]. Информация о распределении меланина и порфиринов в коже получается в результате мультиспектральных методов визуализации, которые включают раздельный анализ фундаментальных цветовых компонентов изображения (красного, зеленого и синего) [15, 16]

Съемка кожи пациента при различных условиях освещения позволяет провести сравнительный анализ полученных изображений на основе которого, в последующем, распознаются меланиновые и порфириновые пятна гиперпигментации, дефекты структуры кожи и др. На основании анализа изображения вычисляются балльные оценки состояния кожи лица по количеству морщин, пигментации, размеру пор, содержанию бактерий (порфириновые пятна), УФО пигментации кожи (меланиновые пятна) и др (Рис. 1).

Рис. 1. Установление различных типов гиперпигментации при анализе изображений кожи пациента, полученных при различных условиях освещения (здесь и далее представлены наблюдения клиники RHANA).



Таким образом, современные аппаратно-программные методики позволяют объективно оценивать результаты эстетической терапии. Описанная выше технология может использоваться для оценки эффективности различных подходов к эстетической терапии, в том числе применения стандартизованных экстрактов плаценты человека.

Клинические и экспериментальные исследования экстрактов плаценты

Благодаря работам по тканевой терапии выдающегося российского ученого В.П. Филатова, экстракты плаценты используются в современной клинической медицине уже начиная с первой четверти 20-го века. Систематический анализ клинической и экспериментальной фармакологии экстрактов плаценты человека (ЭПЧ) показал, что экстракты плаценты эффективно применяются для иммунокоррекции, ранозаживления, нейротрофической терапии, гепатопротекции и нормализации пигментации кожи [17].

ЭПЧ способствуют *заживлению ран и устранению дефектов кожи*, особенно в послеоперационный период [18]. Важно заметить, что топическое применение ЭПЧ прямо или косвенно приводит к увеличению уровней трансформационного ростового фактора (TGF), фактора роста фибробластов (FGF), фактора роста эндотелия (VEGF). Отдельно следует упомянуть антиагрегантные свойства: использование ЭПЧ приводит к статистически значимому ($P < 0,01$) дозо-зависимому торможению агрегации тромбоцитов.

В одном из исследований эффектов ЭПЧ на состояние кожи, пациенты с длительно незаживающими ранами (более шести недель) были разделены на две группы: 40 человек в группе лечения ЭПЧ и 30 в контрольной группе. Использование ЭПЧ в течение 8 недель приводило к тому, что 27 пациентов (67,5%) в группе лечения показали более 50% эпителизации, в то время как в группе контроля всего лишь 7 пациентов (23%) показали сравнимое по динамике заживление ран [19].

Проведенное нами экспериментальное исследование эффектов ЭПЧ на заживаление ран и ожогов (препарат «Лаеннек») показало, что «Лаеннек» существенно улучшил качество заживления ожоговой раны при сопоставлении и с контролем, и с препаратами сравнения («Солкосерил», «Магнерот») [20]. В группе применения препарата, на 30 день после ожога эпидермис практически не утолщен, ровный, тонкий, имеет 5-6 четких слоев клеток, а в некоторых участках – 7-8 слоев (рис.). В нескольких участках произошли закладки сальных желез, в других участках наблюдаются небольшие выпячивания по базальному слою. Ближе к краевой зоне рубца формируются мощные волосяные 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 ориентированные перпендикулярно поверхности рубца, кровенаполнение обильное. Эластических волокон очень много на дне рубца, они мелкие, с очень короткими, едва заметными ответвлениями.

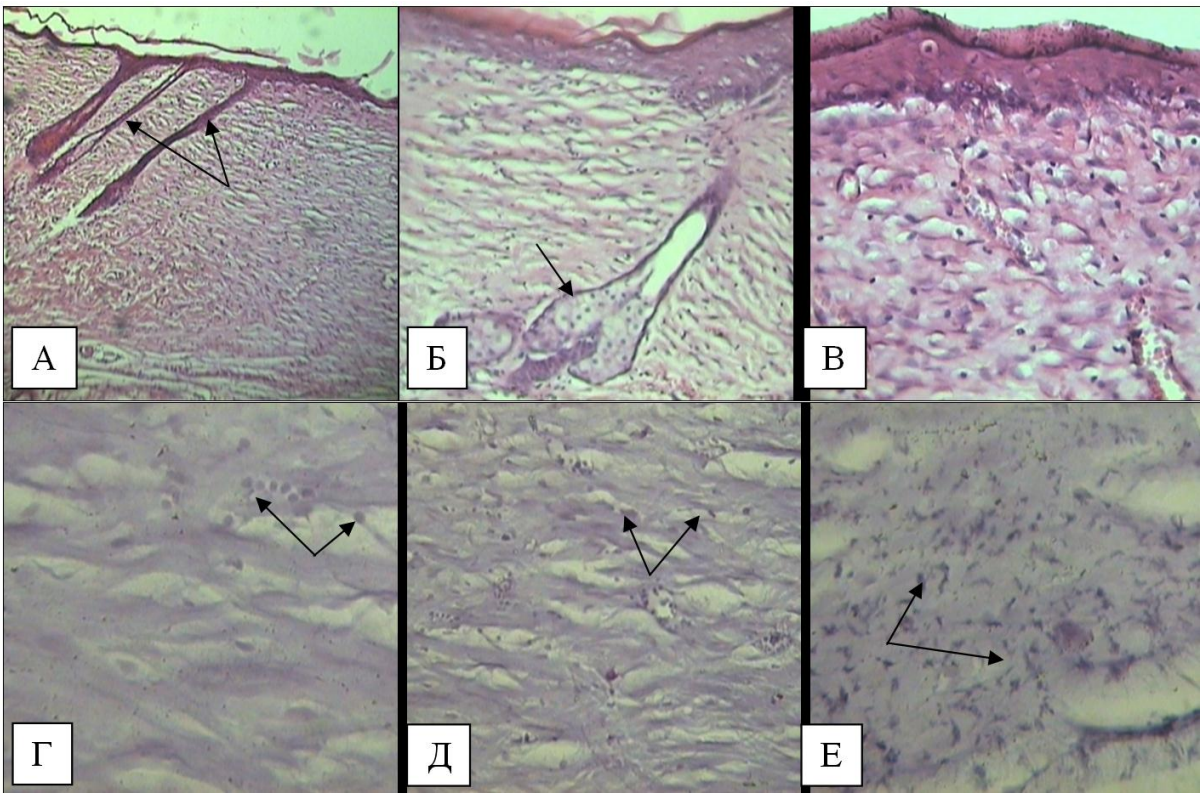


Рис. 2. Кожа на месте повреждения. «Лаеннек», 30 сутки эксперимента. Об.10, гом. 1,1. Окраска гематоксилином-эозином. Формирование волосяных фолликулов в рубцовой ткани недалеко от краевой зоны рубца (А). Об.25, гом. 1,1. Окраска гематоксилином-эозином. Закладка сальной железы (Б). Об.40, гом. 1,1. Окраска гематоксилином-эозином. Коллагеновые волокна лежат рыхло и параллельно поверхности регенерата. Между ними находится большое количество веретеновидных фибробластов, имеющих такую же ориентацию. Преобладают капилляры, срезанные продольно и ориентированные перпендикулярно поверхности рубца (В). Об.40, гом. 1,1. Окраска орсеин-фуксином по Вейгерту. Эластические волокна в области новообразованной фиброзной ткани под эпидермисом (Г), в верхней части (Д) и на дне рубца (Е).

Помимо ревитализирующего воздействия на эпителий, ЭПЧ являются индуктором восстановления естественной пигментации кожи и волос. Важно отметить, что в цитируемом выше исследовании пигментообразование кожи, вновь образовавшейся над поверхностью раны/ожога соответствовало по цвету соседним, неповрежденным участкам кожи. Это воздействие ЭПЧ на пигментообразование важно для терапии витилиго и раннего поседения. Обнадёживающие результаты ЭПЧ получены при лечении витилиго у детей и подростков. Группа из 366 пациентов с витилиго 4-15 лет находилась под наблюдением в течение 1 года. У 62 пациентов наблюдалась тяжелая форма витилиго - области депигментации кожи составляли более 70%. Лечение ЭПЧ доказало свою эффективность у 83% пациентов, в т.ч. с тяжелыми формами витилиго [21].

Молекулярные механизмы воздействия воздействия ЭПЧ на структуру и функцию кожи

Разносторонние клинические эффекты ЭПЧ являются следствием весьма сложного молекулярного состава экстрактов: в составе плаценты найдено более 4000 различных белков, включая различные факторы роста, гормоны, цитохромы, факторы фибринолиза, ферменты энергетического метаболизма и т. д. По данным фирмы-производителя, в состав препаратов Лаеннек/Курасен входят многочисленные ростовые факторы (англ. «growth factor», GF): инсулиноподобные факторы (IGF), роста гепатоцитов (HGF), факторы роста

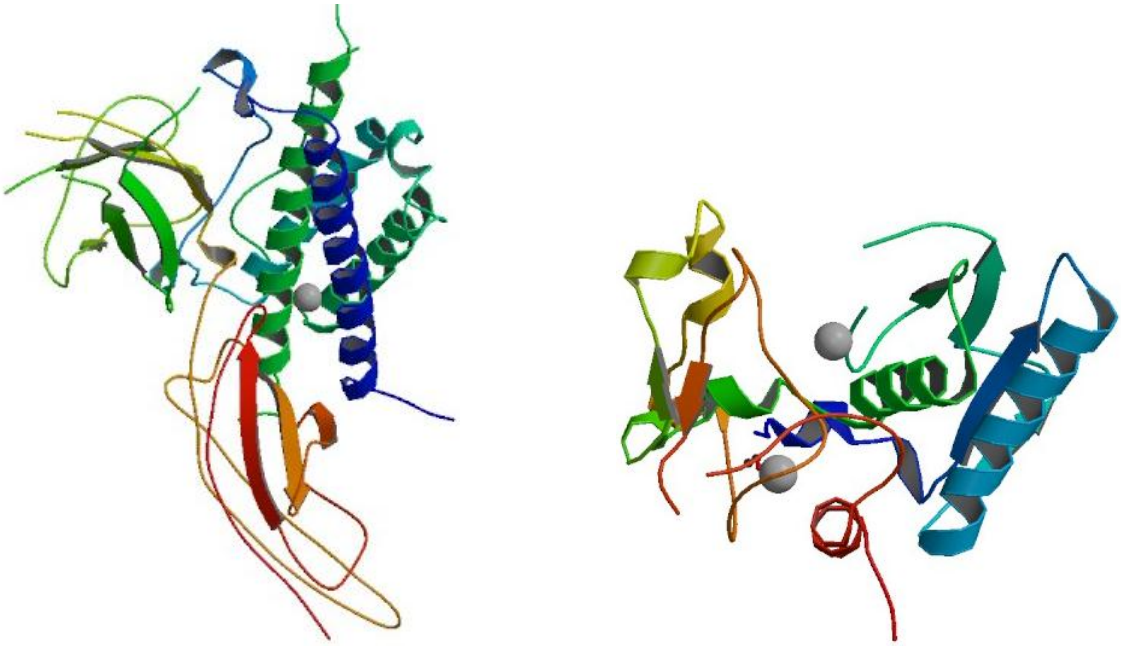
фибробластов (FGF), эпидермальный (EGF), фактор роста нервов (NGF), фактор роста колоний гранулоцитов (G-CSF) и макрофагов (M-CSF), трансформирующий фактор роста клеток (TGF-B1), ростовые факторы PDGF-BB, VEGF, эритропоэтин, интерферон-гамма IFN-Y, лептин [22].

Хотя точного анализа белкового состава препаратов Лаеннек/Курасен пока не было проведено, в составе препарата Лаеннек установлено присутствие значительного количества *эссенциального микроэлемента цинка*: 788±114 мкг/кг [23]. Следует отметить, что разброс значений уровней цинка был достаточно узок (114/788=15%), что является косвенным указанием на специфическое связывание цинка в составе Лаеннека определенными цинк-зависимыми белками гидролизатов плаценты.

Эссенциальный элемент цинк является обязательным кофактором многочисленных белков - факторов транскрипции, ростовых факторов и др. Среди Zn-содержащих плацентарных белков следует особо выделить *соматотропин и толлоидный белок* (известный также как белок морфогенеза кости 1, БМК-1), экспрессия которых в плаценте значительна [24, 25]. Несмотря на то, что соматотропин обычно считается фактором роста всего организма, имеющиеся данных фундаментальных исследований показывают, что соматотропин необходим для деления и миграции фибробластов и кератиноцитов, что важно для ранозаживления [26].

Белок БМК-1, который является коллагеназой и отщепляет С-концевые пептиды проколлагена, способствует созреванию коллагеновых фибрилл и также может иметь важное значение для заживления ран [27]. Ионы цинка стабилизируют биологически активные конфигурации этих плацентарных белков (Рис. 3).

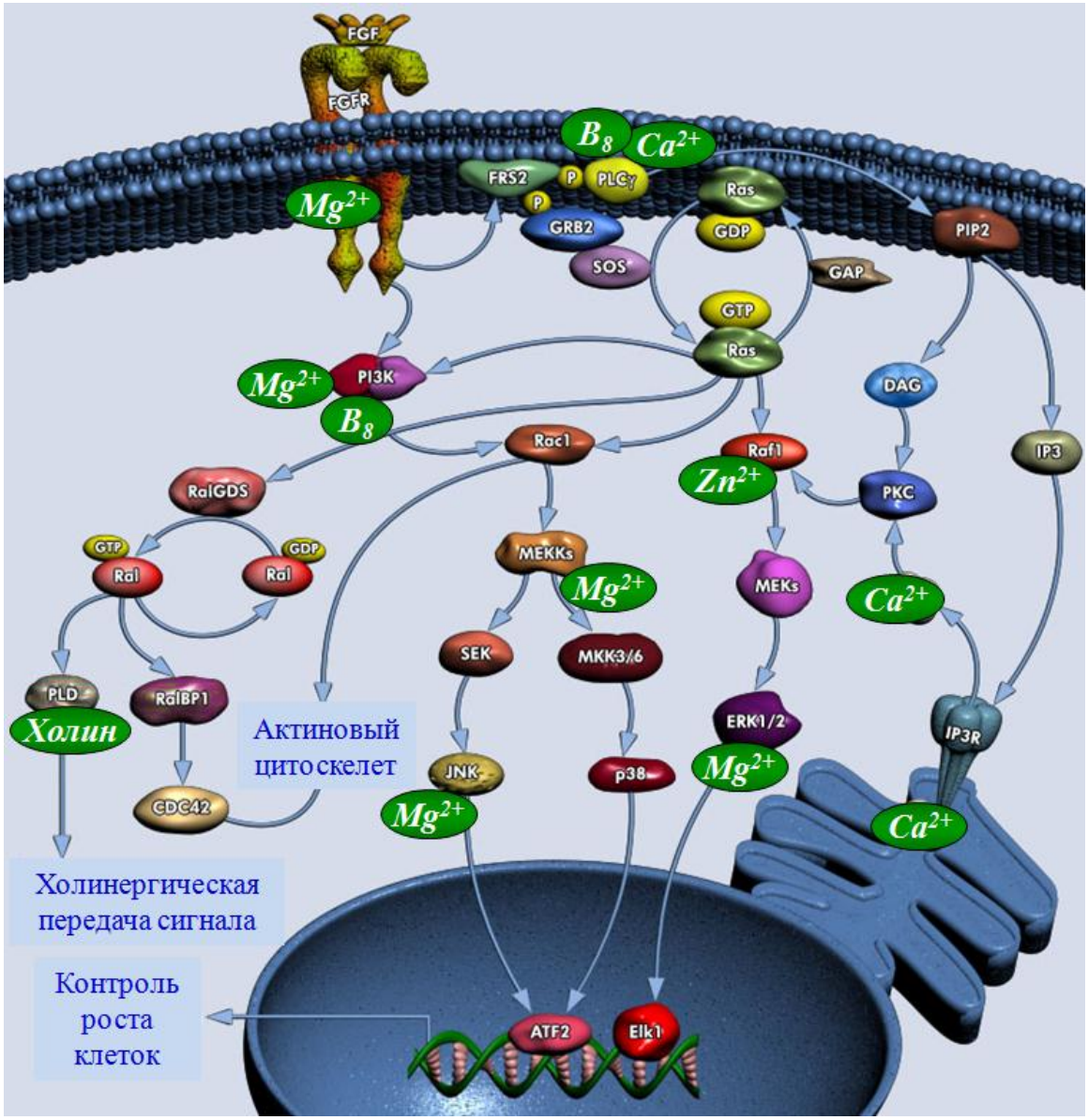
Рис. 3. Пространственные структуры Zn-содержащих плацентарных белков соматотропина (PDB 1bp3, слева) и толлоидного белка (белок морфогенеза кости-1, PDB 3edg, справа). Ион цинка является интегральной составляющей каждой структуры, обязательной для стабилизации этих белков.



Найденные в составе ЭПЧ факторы роста (прежде всего, факторы роста фибробластов, FGF и трансформирующий фактор роста клеток, TGF-B1) оказывают непосредственное влияние на процессы роста и восстановления соединительно-тканной основы кожи. Более равномерное распределение коллагеновых волокон в соединительной ткани способствует более равномерному распределению меланоцитов по поверхности кожи и позволяет ослабить гиперпигментацию.

Рецепторы факторов роста фибробластов. Факторы роста фибробластов (ФРФ) индуцируют клеточное деление фибробластов и кератиноцитов. Белки ФРФ связываются рецепторами ФРФ (FGFR) 4-х 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 MAPK (митоген-активируемые протеинкиназы), ERK (внеклеточно регулируемые киназы), фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), фосфолипаза-С-гамма, JNK (Jun N-терминальная киназа) и PKC (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, ведущий к изменениям в транскрипции генов, отвечающих, в частности, за структуру соединительной ткани (Рис. 4).

Рис. 4. Сигнальные каскады рецепторов факторов роста фибробластов и кофакторы соответствующих белков. Сигнальный каскад рецепторов ФРФ достаточно сложен и включает взаимодействия 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 на рисунке в зеленых овалах рядом с соответствующими белками) – прежде всего, магния, цинка, кальция, холина и витамина В8 (миоинозитол). Дефициты соответствующих нутриентов в диете беременной будут способствовать нарушениям активности сигнального каскада ФРФ рецепторов.



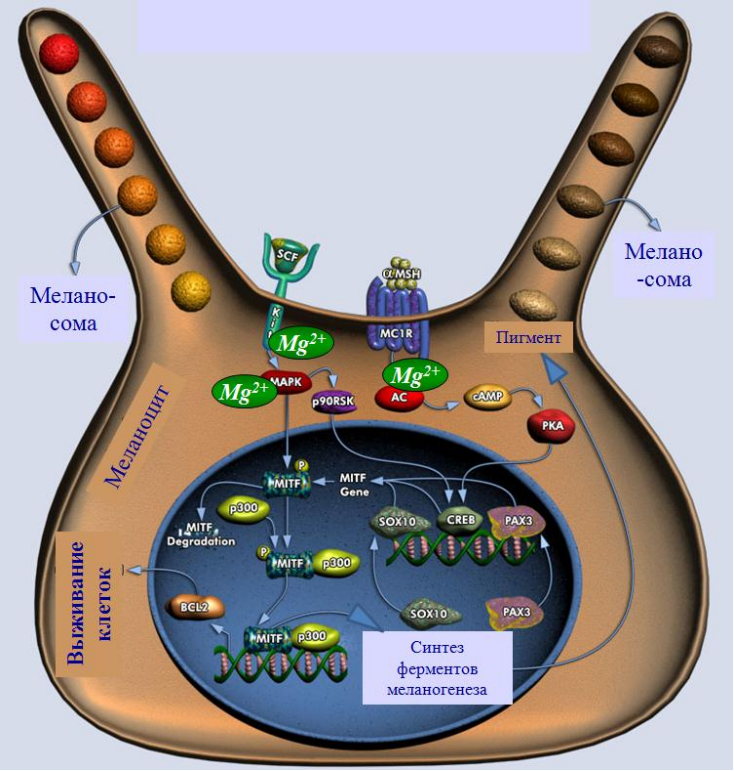
Важно отметить, что, как видно из диаграммы сигнального каскада ФРФ-рецепторов (Рис.), дефициты ряда макро- и микронутриентов (магния, кальция, цинка, витамина В8 и, холина) будут неизбежно прерывать передачу сигнала по сигнальному каскаду ФРФ. При этом, происходит нарушение работы каскада как согласованного сигнального механизма. Замедление передачи сигнала (вследствие, например, дефицита магния) будет способствовать формированию резистентности клеток кожи к ФРФ и, соответственно, ослаблять терапевтический эффект ЭПЧ.

Трансформирующий фактор роста бета-2. TGF-рецепторы экспрессируются в различных тканях, в т.ч. в клетках кожи. Как значительное снижение, так и чрезмерная активность TGF сигнальных каскадов (вследствие дефектов в генах рецепторов, дефицитов определенных микронутриентов или других причин) нарушают деление, дифференцировку и апоптоз клеток [28]. Рецепторы TGFBR1 связывают трансформирующие факторы роста бета и, передавая сигнал от поверхности клетки в цитоплазму посредством путей, схожих с описанными ранее сигнальными путями рецепторов ФРФ, регулируют множество физиологических и патологических процессов, в т.ч.: цикл клеточного деления эпителиальных и кроветворных клеток, контроль деления и дифференциацию клеток мезенхимы, заживление ран, структуру внеклеточного матрикса соединительной ткани, иммуномодуляцию [29] и, возможно, пигментообразование.

Рецепторы гормональных факторов в меланоцитах. Пигментация кожных покровов регулируется сложной сетью взаимодействий между цитокинами и факторами роста кератиноцитов/фибробластов. Можно предположить, что упоминаемые ранее факторы роста фибробластов и трансформирующий фактор роста могут также непосредственно воздействовать и на гиперпигментацию, активируя меланоциты. Однако, данный вопрос довольно сложен и требует проведения отдельного систематического анализа.

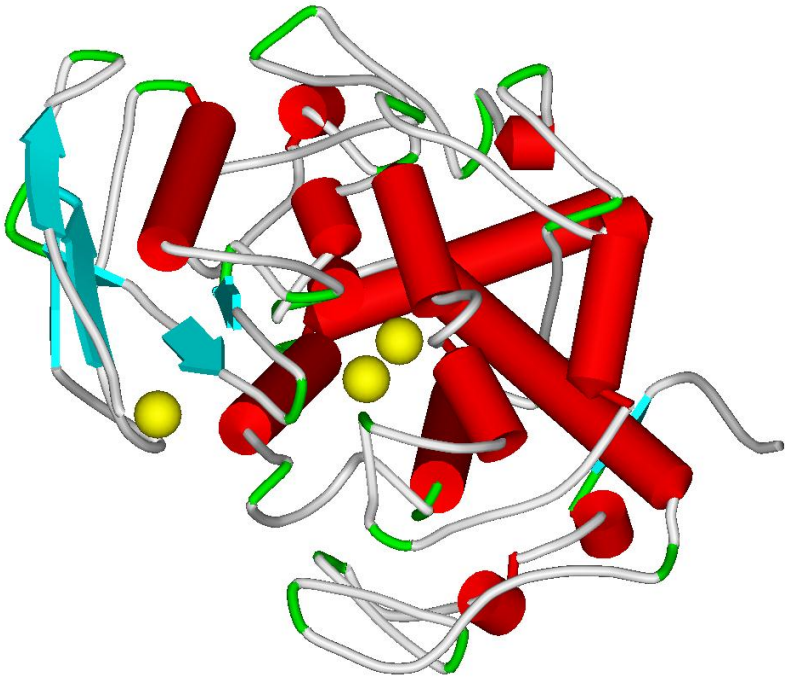
При биопсии в участках кожи с гиперпигментацией были найдены повышенные концентрации фактора роста гепатоцитов (HGF), фактора роста кератиноцитов (KGF) и фактора стволовых клеток (SCF) [30]. Меланоциты активируются белковым фактором меланоцит-стимулирующим гормоном альфа (MSH) и меланоцит-модулирующими пептидами, мимикрирующими активность этого гормона. Процессы синтеза и секреции меланина (Рис.) зависят от активации меланоцитов и адекватного содержания магния внутри клетки.

Рис. 5. Молекулярные механизмы активации меланоцитов. Процессы меланогенеза нарушаются при дефиците магния, поэтому эффективность терапии ростовыми факторами может быть значительно повышено при использовании препаратов магния.



Эффекты ЭПЧ на пигментацию кожи обусловлены тем, что ЭПЧ индуцируют меланогенез путем увеличения экспрессии медь-зависимого фермента тирозиназы (Рис. 6) и тирозиназа-связанных белков 1 и 2 (TRP1 и TRP2) [31]. Активными компонентами ЭПЧ в данном случае, наиболее вероятно, являются сфинголипиды и меланоцит-модулирующие пептиды [32].

Рис. 6. Пространственная структура тирозиназы – фермента, необходимого для синтеза меланина (PDB 1WX3). Сферы желтого цвета указывают расположение атомов меди в активном центре фермента.

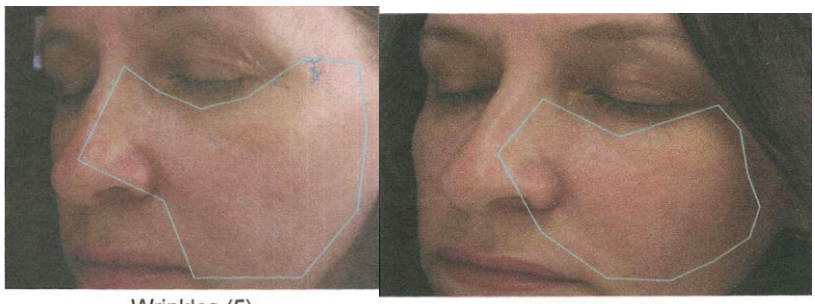


Как отмечено ранее, цвет кожи определяется типом и количеством синтезируемого меланоцитами меланина и характером распределения меланина в окружающих кератиноцитах. Меланин синтезируется посредством ряда окислительных реакций с участием аминокислоты тирозина в присутствии фермента тирозиназы. Тирозиназа катализирует по меньшей мере две различные реакции биосинтеза меланина в меланоцитах: *гидроксилирование тирозины в ДОФА и окисление ДОФА в ДОФАхинон* [33]. Индукция меланогенеза молекулярными компонентами ЭПЧ позволяет достичь равномерной активации меланогенеза в коже и устранить, тем самым, одну из основных причин гиперпигментации кожи.

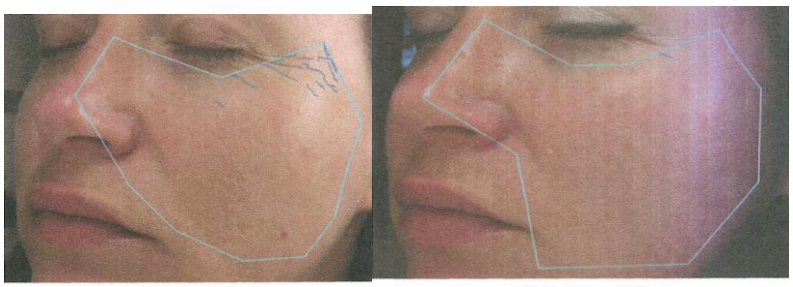
Клиническое применение препарата Лаеннек/Курасен в эстетической терапии. Для изучения эффективности препарата и обоснования длительности курса в рамках противовозрастных программ на базе клиник RHANA было проведено клиническое исследование с участием 20 пациентов женского пола в возрасте 40-50 лет. Для проведения инструментальных исследований использовалась, в частности, описанная выше технология цветового сканирования кожи с целью установления «порфириновых» и «УФО» пятен гиперпигментаци. Процедуры проводили с периодичностью 1 раз в неделю. Препарат вводили микропапульной и линейной техникой, в процедуре использовали 2 мл препарата [34].

По результатам инструментальных методов исследования было отмечено, что препарат Курасен способствует выраженной гидратации кожных покровов. При обследовании на аппарате Visia I по окончании курса терапии отмечено достоверное снижение всех изученных параметров: количество морщин в исследуемом поле уменьшалось в среднем с 12,4 до 8,9, т.е. на 29,2 %, количество расширенных пор и сосудов снизилось в среднем на 37,2 %, снижался уровень порфирина в коже, а также уровни скрытой и явной пигментации (Рис. 7.).

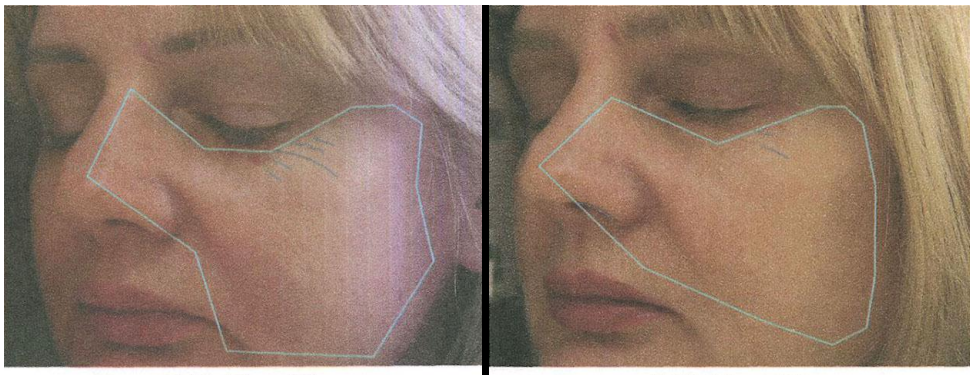
Рис. 7. Иллюстрации применения препарата Курасен в рамках мезотерапии. А) Морщины



Wrinkles (5) Wrinkles (1)

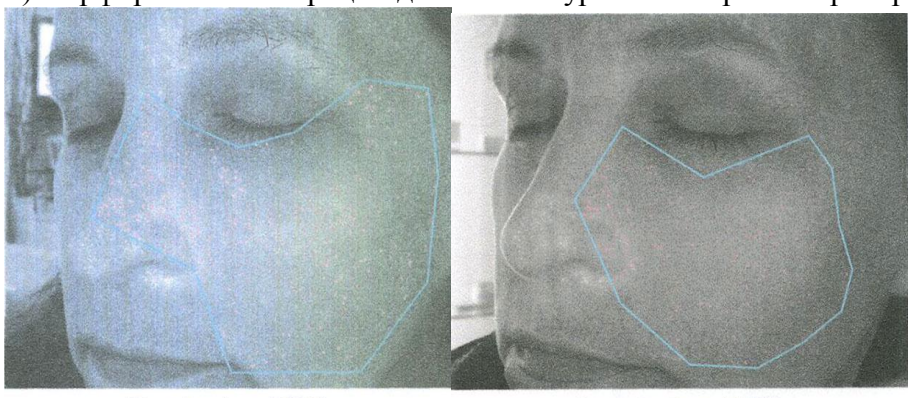


Wrinkles (13) Wrinkles (2)



Wrinkles (5) Wrinkles (3)

Б) Порфирин. Иллюстрации до и после курса мезотерапии препаратом Курасен



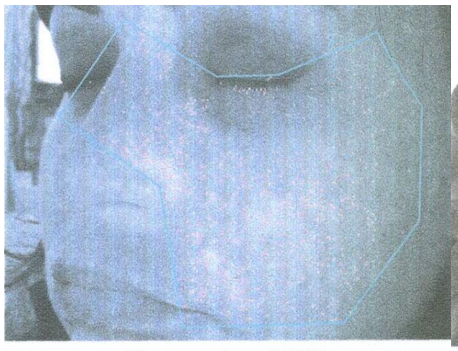
Porphyrins (498) Porphyrins (158)



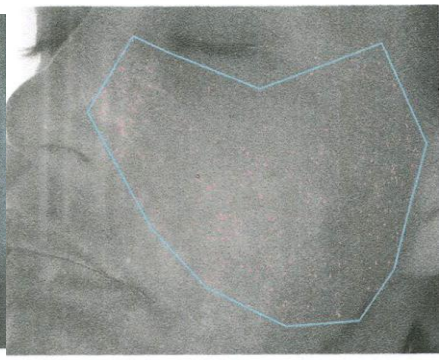
Porphyrins (975)



Porphyrins (628)

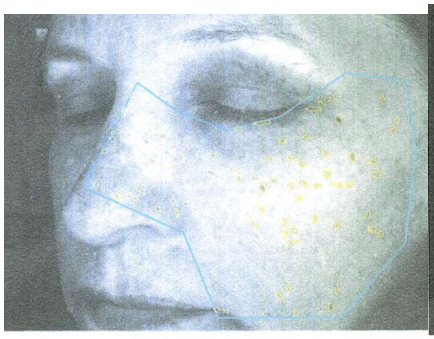


Porphyrins (786)

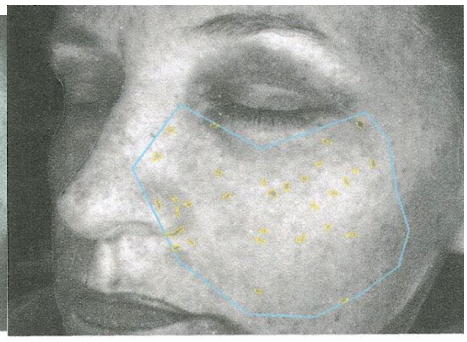


Porphyrins (297)

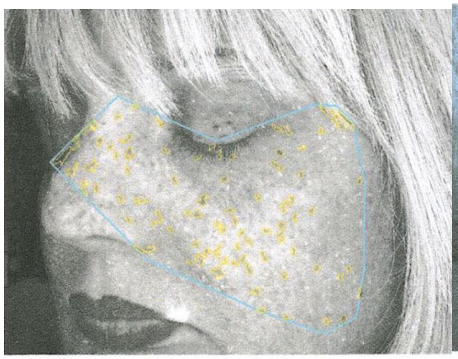
В) Явная и скрытая пигментация (до и после курса мезотерапии препаратом Курасен)



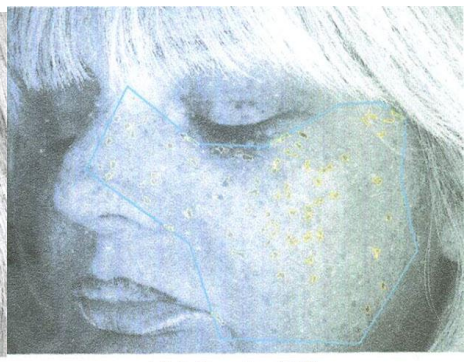
UV Spots (71)



UV Spots (31)

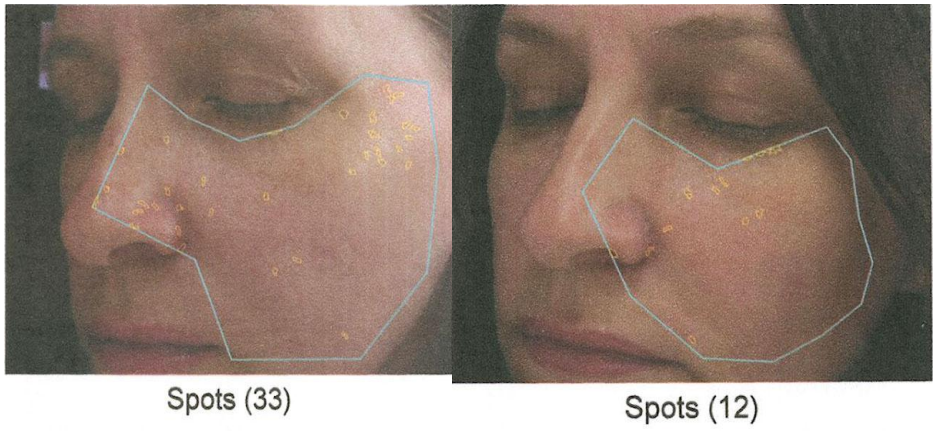


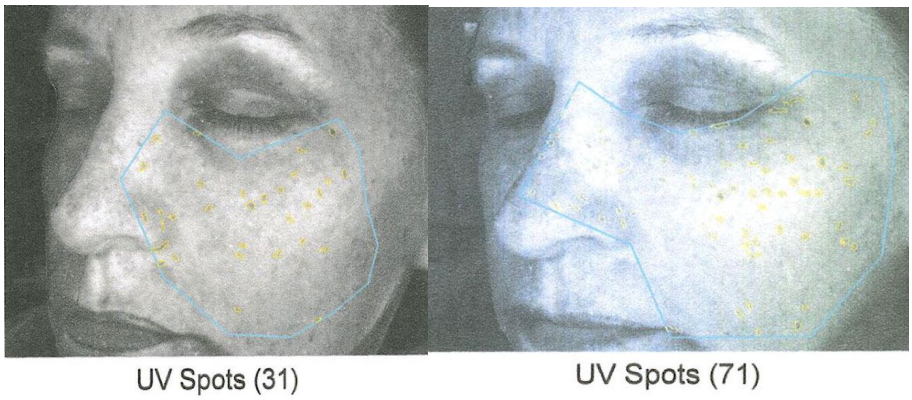
UV Spots (90)



UV Spots (72)

Г) Явная и скрытая пигментация (до и после курса терапии препаратом Лаеннек)





Таким образом, данные аппаратно-инструментальных исследований эффектов применения стандартизованного ЭПЧ (Курасен, Лаеннек) в эстетической практике [34] показывают (1) улучшение структуры соединительной ткани (увеличение гидратации кожи, рост числа коллагеновых и эластиновых волокон, уплотнение дермы, уменьшение числа и глубины морщин) и (2) устранение пятен как «порфириновой», так и «УФО» гиперпигментации (нормализация распределения пигментов в коже), что свидетельствует о стимулирующем влиянии компонентов препарата на функциональную и синтетическую активность фибробластов и меланоцитов.

Заключение

Насущной проблемой современной эстетической медицины является установление процедур для нормализации тона кожи и устранения гиперпигментации, которые бы не имели побочных эффектов. Перспективным направлением исследований в данном направлении является подход, направленный на коррекцию метаболизма кожи, соединительной ткани и пигментообразования. В настоящей работе представлены результаты анализа воздействия стандартизованных экстрактов плаценты человека на физиологические процессы формирования равномерной окраски кожи: формирование и поддержка соединительно-тканной основы кожи и меланогенез (Рис. 8). Непосредственное воздействие молекулярных компонентов ЭПЧ на эти процессы указывает на важные перспективы применения ЭПЧ в эстетической медицине.

Рис. 8. Физиологические процессы формирования равномерной окраски кожи.



Литература

1. Szamkolowicz G, Mierzecki A, Zaluga E. Physiological skin changes during pregnancy. Ginekol Pol. 2005;76(11):926-930.
2. Schurer N, Zumdick M, Goerz G. Hyperpigmentation in primary adrenal cortex insufficiency: Addison disease. Hautarzt. 1993;44(5):300-305.
3. Rendon M, Gaviria J. "Skin Lightening Agents." Ed. Zoe Draelos. Philadelphia: Elsevier, 2005. 103-4.
4. Nishidate I, Aizu Y, Mishina H. “Estimation of melanin and hemoglobin in skin tissue using multiple regression analysis aided by Monte Carlo simulation”, J. Biomed. Optics, 9(4): 700-710, 2004.
5. Grimes PE. Melasma. Etiologic and therapeutic considerations. Arch Dermatol. 1995;131(12):1453-1457.
6. Brunsting LA, Sheard C., “The color of the skin as analyzed by spectrophotometric methods: II.The role of pigmentation”, J. Clin. Invest., 7: 559–574, 1929.
7. Edwards EA, Duntley SQ., “The pigments and color of living human skin”, Am. J. Anatomy, 65: 1–33, 1939.
8. Stamatas GN, Zmudzka BZ, Kollias N and Beer J Z, “Non- invasive measurements of skin pigmentation in-situ”, Review: Inno- vative Technology, Pigment Cell Res., 17: 618–626, 2004.
9.Demirli R, Otto P, Viswanathan R, Patwardhan MS, Larkey J. RBX™ Technology Overview. http://www.canfieldsci.com/imaging_systems/facial_systems/VISIA_Complexion_Analysis.html
10. Pootongkam S, Asawanonda P. Purpura-free treatment of lentigines using a long-pulsed 595 nm pulsed dye laser with compression handpiece: a randomized, controlled study. J Drugs Dermatol. 2009;8(11 Suppl:s18-s24.
11. Taub AF, Devita EC. Successful treatment of erythematotelangiectatic rosacea with pulsed light and radiofrequency. J Clin Aesthet Dermatol. 2008;1(1):37-40.
12. Michaels BM, Csank GA, Ryb GE, Eko FN, Rubin A. Prospective randomized comparison of onabotulinumtoxinA (Botox) and abobotulinumtoxinA (Dysport) in the treatment of forehead, glabellar, and periorbital wrinkles. Aesthet Surg J. 2012;32(1):96-102.
13. Herane MI, Orlandi C, Zegpi E, Valdes P, Ancic X. Clinical efficacy of adapalene (differin((R))) 0.3% gel in Chilean women with cutaneous photoaging. J Dermatolog Treat. 2012;23(1):57-64 Epub 2011 Dec.

14. Arjinpathana N, Asawanonda P. Glutathione as an oral whitening agent: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. J Dermatolog Treat. 2012;23(2):97-102 Epub 2010 Ju.
15. Woolery-Lloyd H, Kammer JN. Treatment of hyperpigmentation. Semin Cutan Med Surg. 2011;30(3):171-5 doi.
16. Davis EC, Callender VD. Postinflammatory hyperpigmentation: a review of the epidemiology, clinical features, and treatment options in skin of color. J Clin Aesthet Dermatol. 2010;3(7):20-31.
17. Громова О.А., Торшин И.Ю., Диброва Е.А., Каримова И.М., Гилельс А.В., Кустова Е.В. Мировой опыт применения препаратов из плаценты человека: результаты клинических и экспериментальных исследований. Пластическая хирургия и косметология, 2011 (3) 385–576.
18. BRIGUGLIO A. On 100 cases of surgical diseases treated with a cold-sterilized placental extract. Minerva Med. 1962;53:3118-3123.
19.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.
20. Жидоморов Н., Суракова Т., Гришина Т., Громова О. Экспериментальное исследование влияния препарата Лаеннек на процессы регененрации, Les Nouvelles Esthetiques, 2001 (3).
21. Mal'tsev VI. Experience in introducing the method of placental therapy in vitiligo in Ukraine. Lik Sprava. 1995;(7-8):123-125.
22. Ярилин А.А. Механизмы гепатопротекторной, иммуномодулирующей, регуляторной и регенеративной функций ЛАЕННЕК®. Доклад от 23.06.2010, Savoy Hotel, Москва. http://www.rhanaopt.ru/news/ID_1.html
23. Громова О.А., Торшин И.Ю., Волков А.Ю., Смарыгин С.Н., Назаренко О.А., Препарат Лаеннек: элементный состав и фармакологическое действие, Пластическая хирургия и косметология, 2010(4) 512–687.
24. Su AI. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(16):6062-7 Epub 2004 Ap.
25.Janitz M. Three alternatively spliced variants of the gene coding for the human bone morphogenetic protein-1. J Mol Med (Berl). 1998;76(2):141-146.
26. Lee SW. The effect of growth hormone on fibroblast proliferation and keratinocyte migration. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2010;63(4):e364-9 Epub 2009 De.
27. Rattenholl A. Proteinases of the bone morphogenetic protein-1 family convert procollagen VII to mature anchoring fibril collagen. J Biol Chem. 2002;277(29):26372-8.
28. Yang T. E-selectin ligand-1 regulates growth plate homeostasis in mice by inhibiting the intracellular processing and secretion of mature TGF-beta. J Clin Invest. 2010;120(7):2474-85.
29. Loeys BL. A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. Nat Genet. 2005;37(3):275-81.
30. Kovacs D, Cardinali G, Aspite N, Cota C, Luzi F, Bellei B, Briganti S, Amantea A, Torrisi MR, Picardo M. Role of fibroblast-derived growth factors in regulating hyperpigmentation of solar lentigo. Br J Dermatol. 2010;163(5):1020-7 doi.
31. Mallick S. Human placental lipid induces melanogenesis by increasing the expression of tyrosinase and its related proteins in vitro. Pigment Cell Res. 2005;18(1):25-33.
32. Pal P. A human placental extract: in vivo and in vitro assessments of its melanocyte growth and pigment-inducing activities. Int J Dermatol. 2002;41(11):760-767.
33. Каримова И., Кустова Е., Гилельс А. Плацентарный препарат CURACEN в мезотерапии стареющей кожи. Инъекционные методы в косметологии, № 3-2011.
34. Parvez S, Kang M, Chung HS, Cho C, Hong MC, Shin MK, Bae H. Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. Phytother Res. 2006;20(11):921-934.