

- mite-induced IgE responses in mice. *PLOS One*. 2014; 9(3): e91206.
8. Zhu Z., Stricker R., Li R., Zündorf G., Reiser G. The intracellular carboxyl tail of the PAR-2 receptor controls intracellular signaling and cell death. *Cell Tissue Res*. 2015; 359(3): 817–27.
 9. Botham A., Guo X., Xiao Y., Morice A., Compton S., Sadofsky L. Palmitoylation of human proteinase-activated receptor-2 differentially regulates receptor-triggered ERK1/2 activation, calcium signalling and endocytosis. *Biochem. J*. 2011; 438(2): 359–67.
 10. Zhao P., Lieu T., Barlow N., Sostegni S., Haerteis S., Korbmayer C., et al. Neutrophil elastase activates protease-activated receptor-2 (PAR2) and transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) to cause inflammation and pain. *J Biol. Chem*. 2015; 290(22): 13875–87.
 11. Helyes Z., Sándor K., Borbély E., Tékus V., Pintér E., Elekes K., et al. Involvement of transient receptor potential vanilloid 1 receptors in protease-activated receptor-2-induced joint inflammation and nociception. *Eur. J. Pain*. 2010; 14(4): 351–8.
 12. Dai Y., Wang S., Tominaga M., Yamamoto S., Fukuoka T., Higashi T., et al. Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. *J. Clin. Invest*. 2007; 117(7): 1979–87.
 13. Takei-Taniguchi R., Imai Y., Ishikawa C., Sakaguchi Y., Nakagawa N., Tsuda T., et al. Interleukin-17- and protease-activated receptor 2-mediated production of CXCL1 and CXCL8 modulated by cyclosporine A, vitamin D3 and glucocorticoids in human keratinocytes. *J. Dermatol*. 2012; 39(7): 625–31.
 14. Kim J., Kim do Y., Son H., Kim Y., Oh S. Protease-activated receptor-2 activates NQO-1 via Nrf2 stabilization in keratinocytes. *J. Dermatol. Sci*. 2014; 74(1): 48–55.
 15. St-Onge M., Lagarde S., Laflamme C., Rollet-Labelle E., Marois L., Naccache P., Pouliot M. Proteinase-activated receptor-2 up-regulation by Fcγ-receptor activation in human neutrophils. *FASEB J*. 2010; 24(6): 2116–25.
 16. Bzowska M., Hamczyk M., Skalniak A., Guzik K. Rapid decrease of CD16 (FcγRIII) expression on heat-shocked neutrophils and their recognition by macrophages. *J. Biomed. Biotechnol*. 2011; 2011: 284759.

Поступила 11.11.15
Принята к печати 20.01.16

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ДЕРМАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.45.03:616.5-007.23-053.9

Кожина К.В.¹, Волкова Е.Н.¹, Сабурова И.Н.^{2,3}, Морозов С.Г.², Зурина И.М.², Кошелева Н.В.^{2,4}, Горкун А.А.², Григорьева А.А.¹

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПЕПТИДНЫХ БИОРЕГУЛЯТОРОВ НА ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОЖИ В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ МОДЕЛИ В 3D-ФОРМАТЕ

¹ ООО Центр восстановительной медицины, 117997, г. Москва, Россия; ² ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии, 125315, г. Москва, Россия; ³ ГБОУ ДПО Российская медицинская академия последипломного образования Минздрава РФ, 125993, г. Москва, Россия; ⁴ Биологический факультет ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, г. Москва, Россия

Проведено изучение действия инъекционного препарата для мезотерапии (Meso-Wharton P199™) на культуры дермальных фибробластов, моделирующих состояние клеток в (зрелой) стареющей коже. Материал и методы. В работе использовали культуру фибробластов на 4-м пассаже (P4), которая соответствовала по своим характеристикам фибробластам молодой кожи (контроль) и культуру фибробластов после 18-го пассажа (P18), в которой все признаки старения дермальных фибробластов (преобладание крупных плащевидных и парусовидных клеток, снижение темпов клеточного деления) были хорошо заметны. Биоактивность оценивали по морфологии клеток, эпителио-мезенхимной пластичности и экспрессии характерных для фибробластов маркеров: цитокератина 19, эластина, α-гладкомышечного актина (αSMA), PCNA (маркера пролиферации), коллагенов типов I, III, IV и фибронектина.

Результаты. При культивировании фибробластов P18 с исследуемым инъекционным препаратом происходит формирование сфероидов, по срокам сопоставимое с формированием сфероидов из молодых фибробластов P4. Из культуры фибробластов P18, культивированных без препарата не происходит формирования полноценного сфероида, а наблюдается агрегация клеток и их постепенная гибель с некротической массой внутри агрегата. Присутствие в ростовой среде препарата стимулирует «омоложение» клеток и последующее восстановление мезенхимо-эпителиальной пластичности культивированных фибробластов за счет восстановленной способности синтезировать в достаточном для установления межклеточных контактов количестве компонентов внеклеточного матрикса (фибронектина и коллагенов), что влияет на способность формировать сфероиды. Культивирование образовавшихся сфероидов с препаратом стимулирует экспрессию эластина, коллагена IV типа, фибронектина, белка внеклеточного матрикса, поддерживающего упругость кожи, а поверхностные клетки активно экспрессируют цитокератин 19.

Для корреспонденции:

Морозов Сергей Георгиевич, доктор мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе и заведующий лабораторией Общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», 125315, г. Москва, Россия. E-mail: biopharm@list.ru

For correspondence:

Morozov Sergey G., Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member of Russian Academy of Sciences, deputy director for scientific work of Institute of General Pathology and Pathophysiology, 125315, Moscow, Russian Federation. E-mail: biopharm@list.ru

Information about authors:

Morozov S.G., <http://orcid.org/0000-0001-5822-5729>.
Volkova E.N., <http://orcid.org/0000-0002-1063-8345>.

Результаты исследования убедительно демонстрируют эффективность применения мезотерапевтического препарата для омоложения кожи.

Ключевые слова: запатентованные пептиды; дермальные фибробласты; сфероиды.

Для цитирования: Кошкина К.В., Волкова Е.Н., Сабурова И.Н., Морозов С.Г., Зурина И.М., Кошелева Н.В., Горкун А.А., Григорьева А.А. Изучение влияния пептидных биорегуляторов на возрастные изменения кожи в культуральной модели в 3D-формате. *Российский журнал кожных и венерических болезней*. 2016; 19(1): 58-63. DOI 10.18821/1560-9588-2016-19-1-58-63

Kozhina K.V.¹, Volkova E.N.¹, Saburina I.N.^{2,3}, Morozov S.G.², Zurina I.M.², Kosheleva N.V.^{2,4}, Gorkun A.A.², Grigorieva A.A.¹

THE INFLUENCE OF PEPTIDE BIOREGULATORS ON SKIN AGING IN 3D CULTURE MODEL

¹The Center for Restorative Medicine, 117997, Moscow, Russia; ²Institute of General Pathology and Pathophysiology, 125315, Moscow, Russia; ³Russian Medical Academy for Post-Graduate Education, 125993, Moscow, Russia; ⁴Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow, Russia

The effect of mesotherapy injection (Meso-Wharton R199TM) on the dermal fibroblasts culture, simulating condition of (mature) aging skin cells are studied.

Material and methods. The culture of 4th passage fibroblasts (P4), that corresponds to young skin fibroblasts (control) and the culture of 18th passage fibroblasts (P18), that has all the signs of aging dermal fibroblasts (predominance of large cells, slow cell division) were used. Bioactivity was assessed by cell morphology, epithelium-mesenchyme plasticity and expression of fibroblasts markers: cytokeratin 19, elastin, α -smooth muscle actin (α SMA), PCNA (proliferation marker), collagen types I, III, IV and fibronectin.

The formation of spheroids occur when fibroblasts P18 are cultivating with the injection medication, on terms comparable to the formation of spheroids from P4 young fibroblasts. From culture of fibroblasts P18, that was cultured without medication, does not form the full spheroid, but aggregation of cells and their gradual destruction with necrotic masses within the unit are observed. The presence of the medication stimulates the "rejuvenation" of cells and subsequent recovery of the mesenchyme-epithelial plasticity of cultured fibroblasts due to the reduced ability to synthesize sufficient to establish the amount of intercellular contacts the extracellular matrix components (fibronectin and collagen), which affects the ability to form spheroids. Culturing spheroids formed with the medication stimulates expression of elastin, collagen type IV, fibronectin extracellular matrix protein that supports the skin elasticity and superficial cells actively express cytokeratin 19. The study results clearly demonstrate the effectiveness of mesotherapeutic treatment for skin rejuvenation.

Key words: patented peptides; dermal fibroblasts; spheroids.

For citation: Kozhina K.V., Volkova E.N., Saburina I.N., Morozov S.G., Zurina I.M., Kosheleva N.V., Gorkun A.A., Grigorieva A.A. The influence of peptide bioregulators on skin aging in 3D culture model. *Russian Journal of Skin and Venereal Diseases (Rossiyskii Zhurnal Kozhnykh i Venericheskikh Bolezney)*. 2016; 19(1): 58-63. (in Russian). DOI 10.18821/1560-9588-2016-19-1-58-63

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 04 Desember 2015

Accepted 20 January 2016

Достижения в исследовании регуляции деления, созревания и жизнедеятельности клеток постоянно формируют новые знания о развитии процессов старения кожи и позволяют разрабатывать новые подходы и методы анти-возрастной терапии.

Снижение скорости клеточного обновления кожи – ключевой момент в развитии процессов ее старения. В последние годы показано, что клеточное обновление и восстановление кожных покровов осуществляются за счет постоянно протекающих процессов пролиферации и дифференцировки стволовых клеток, расположенных на базальной мембране эпидермиса и по границе волосяных фолликулов. Стволовые клетки (СК) базального эпидермиса поддерживают пул кератиноцитов, СК волосяного фолликула являются мультипотентными, способными дифференцироваться как в кератиноциты, так и в фибробласты и другие клетки дермы [1, 2].

Основной функцией СК является физиологическая замена отслуживших дифференцированных клеток кожи и восстановление клеточного пула. Стволовые клетки можно назвать «машинами регенерации», но для их активации необходимы цитокины, факторы роста и другие сигнальные молекулы, синтез которых регулируется как стволовыми клетками, так и их микроокружением («нишей»). Клеточное окружение («ниша») обеспечивает ключевые инструктивные сигналы для выбора «судьбы» клеток – сохранять идентичность стволовой клетке либо дифференцироваться в зрелые специализированные клетки [3].

В стареющей коже вследствие клеточного обеднения и снижения синтетической активности клеток развивается «дефицит» цитокинов, ростовых факторов, сигнальных, регуляторных молекул. Количество синтезируемых клетками информационных сигнальных молекул становится недостаточным для активации пролиферации стволовых клеток. Стволовые клетки не работают, не активизируются и не пролиферируют без активного микроокружения, то есть без достаточного количества ростовых факторов, цитокинов и сигнальных молекул. Возникает необходимость внесения «внешнего» стартового сигнала, чтобы дать толчок к началу пролиферации СК и последующему клеточному обновлению.

Известно, что изучаемый препарат способствует синтезу биологически активных молекул в различных клетках кожи: кератиноцитах, фибробластах, моноцитах. Все вместе они создают тот «каскад цитокинов», ростовых факторов и сигнальных молекул, которые активируют пролиферацию собственных стволовых клеток. Ключевой компонент препарата Wharton Jelly Peptide P199TM действует по отношению к собственным стволовым клеткам как сигнальный фактор. Именно этот пептид инициирует глубокие стойкие антивозрастные и регенерационные эффекты в коже.

Для подтверждения антивозрастной эффективности изучаемого мезотерапевтического препарата могут быть использованы разные объекты исследования – культуры клеток: кератиноциты, эндотелиальные клетки, меланоциты и дермальные фибробласты человека [3]. Дермаль-

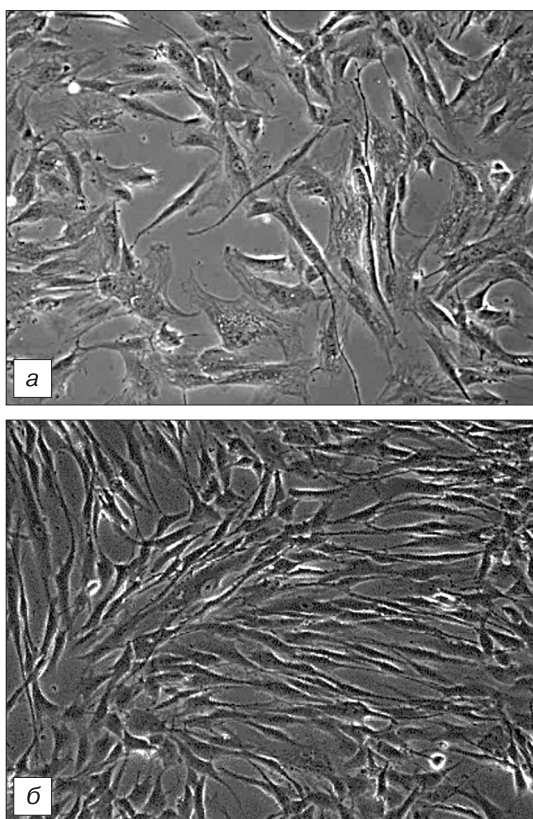


Рис. 1. Культуры дермальных фибробластов, используемые для дальнейшего исследования.

a – опытная культура фибробластов (P18) – соответствует зрелой (старейшей) кожи; *б* – контрольная культура фибробластов (P4) – соответствует молодой коже.

ные фибробласты представляют собой гетерогенную клеточную популяцию мезенхимного ряда и играют ключевую роль в регуляции процессов гомеостаза и восстановления кожного покрова. Они формируют оптимальные условия для пролиферации и функционирования других типов клеток (кератиноцитов, эндотелиальных, клеток волосных фолликулов), регулируя клеточные взаимодействия [4, 5]. Фибробласты продуцируют проколлаген, фибронектин, проэластин, гликозаминогликаны и ламинин, участвуют в формировании базальной мембраны кожи, продуцируют и выделяют в межклеточное пространство цитокины и факторы роста [6, 7]. Также фибробласты играют важную роль в процессах эпителизации и заживления ран [8, 9]. Поэтому они являются основной мишенью воздействия активных веществ, направленных как на омоложение кожи, так и на ее репарацию [10, 11].

При длительном культивировании фибробластов происходит репликативное старение культуры [12]. Старение культуры фибробластов *in vitro* максимально близко отражает изменения, присущие старению кожи *in vivo*. Вместе с тем, последние исследования показали, что при длительном культивировании в монослое клетки теряют не только способность синтезировать белки внеклеточного матрикса, но и возникает риск накопления в клетках хромосомных aberrаций. Кроме того, культивирование клеток в монослое не является естественным, изменяет характеристики клеток и не отражает реальные механизмы функционального состояния соматических клеток. При длительном культивировании в монослое клетки теряют одно из важнейших свойств своей функциональной активности – эпителио-мезенхимо-эпителиальную пластичность [13, 14, 15]. 3D культура (сфероиды) по своим свойствам более полно повторяет нативную ткань по плотности клеток на

единицу объема и представляет собой динамичную систему с организованным клеточным поведением – необходимым условием полноценного морфогенеза.

Цель нашего исследования заключалась в комплексном, многоплановом изучении влияния инъекционного препарата для мезотерапии Meso-Wharton P199™ как в 2D, так и в 3D культурах дермальных фибробластов человека.

Материал и методы

Первичную культуру дермальных фибробластов получали из биоптатов кожи посредством механической дезагрегации и последующей ферментативной обработки. Для этого биоптат промывали фосфатно-солевым буфером, содержащим антибиотик (гентамицин) и обрабатывали раствором трипсина. Затем пипетировали, в результате чего освобождали клетки от матрикса, центрифугировали, отмывали от раствора трипсина и ресуспендировали в культуральной среде DMEM/F12, содержащей 10% сыворотки. Высевали на чашки Петри в плотности 1×10^5 – 2×10^5 клеток/см² и помещали в стандартные условия инкубирования (37 °C, 5% CO₂). Культивировали до 4-го пассажа (P4), охарактеризовывали по экспрессии характерных маркеров и криоконсервировали, создавая банк первичной культуры дермальных фибробластов человека, на которой проводили все дальнейшие исследования. Использование в исследовании одной и той же первичной культуры клеток позволяет сопоставлять и сравнивать полученные данные.

Для получения «старейшей» культуры клетки из полученного ранее банка размораживали методом быстрого оттаивания при температуре 37 °C, отмывали от остатков сыворотки и диметилсульфоксид раствором Хенкса с помощью центрифугирования в течение 7 мин при 1000g. Супернатант удаляли, полученный осадок из клеток ресуспендировали в полной ростовой среде, высевали на чашки Петри и помещали в стандартные условия инкубирования (37 °C, 5% CO₂). Культивировали до 18-го пассажа (P18), когда становились хорошо заметны все признаки репликативного старения дермальных фибробластов. Размороженную, не пассированную культуру P4 считали контрольной, и она соответствовала по своим характеристикам фибробластам молодой кожи.

Для исследования дозозависимого эффекта изучаемого препарата на 2D культуре его смешивали с полной ростовой средой в соотношении 1:2, 1:10, 1:100, 1:1000. Анализ цитотоксичности проводили на 2D культуре дермальных фибробластов P18. Клетки помещали на 12-луночные планшеты в плотности 10 000 клеток на 1 лунку. В качестве контроля исследовали поведение клеток в полной ростовой среде без добавления препарата. Клетки культивировали в присутствии препарата в течение 72 ч, далее окрашивали растворами Hoechst 33258 (0,004 мг/мл) и йодида пропидия PI (0,001 мг/мл), с помощью которого оценивали жизнеспособность клеток по проникновению в их ядро PI под инвертированным флюоресцентным микроскопом Olympus CKX41 (“Olympus”, Япония).

Анализ биоактивности проводили на 2D культуре дермальных фибробластов помещали на покровные стекла в чашки Петри (35 мм). Исследовали морфологию клеток и экспрессию характерных для фибробластов маркеров: цитокератина 19, эластина, α -гладкомышечного актина (α SMA), PCNA (маркера пролиферации), коллагенов типов I, III и IV. В качестве контроля культивировали клетки 18-го пассажа в полной ростовой среде без добавления препарата. Для проведения иммуноцитохимического анализа клетки культивировали в присутствии препарата в течение 72 ч, далее фиксировали в 4% растворе параформальдегида (4 °C, 20 мин). Затем стекла инкубировали с первичными антителами к цитокератину 19, эластину, α -гладкомышечному актину (α SMA), PCNA (маркеру пролиферации), коллагену типов I, III и IV. Результат визуализировали с помощью вторичных антител, конъюгированных с флюорохромами FITC (E = 525 нм) и DyLight 594 (E = 617 нм). Ядра докрашивали раствором Hoechst 33258 (0,004 мг/мл). Анализ проводили с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Olympus Fluoview FV10 (“Olympus”, Япония).

Для изучения влияния мезотерапевтического препарата на образование сфероидов из дермальных фибробластов

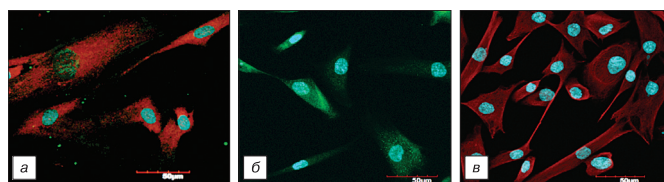


Рис. 2. Экспрессия маркеров контрольной культуры фибробластов (P4).

a – цитокератин 19, эластин; *б* – коллагена типа III; *в* – коллагена типа I.

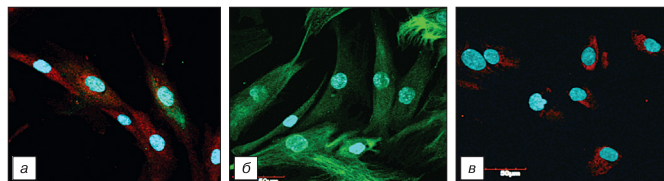


Рис. 3. Опытная культура фибробластов (P18).

a – экспрессия цитокератина 19, эластина; *б* – экспрессия коллагена типа III; *в* – экспрессия коллагена типа I.

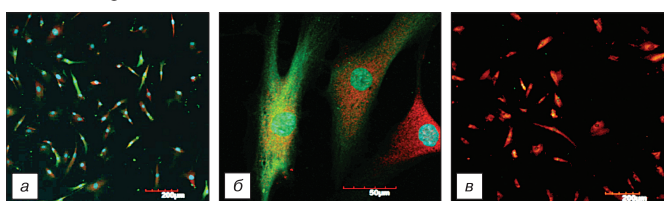


Рис. 4. Экспрессия цитокератина 19 и эластина в фибробластах (P18) после сокультивирования с препаратом. Ядра клеток докрасшены Hoechst 33258 (синий) (*a*, *б*) и без добавления препарата (*в*).

a – ув. 10; *б* – ув. 40; *в* – ув. 10.

исследовали монослойные клеточные культуры фибробластов P18, которые культивировали с добавлением в ростовую среду препарата и культуры фибробластов P18, культивируемые без добавления препарата для мезотерапии. Для данного этапа исследования использовали изучаемый инъекционный препарат, содержащий пептид P199, смешанный с полной ростовой средой в соотношении 1:10. Фибробласты культивировали в течение 72 ч, отмывали от ростовой среды раствором Версена, затем обрабатывали 0,25% раствором трипсина и снимали с чашек. Подсчитывали количество клеток в суспензии и центрифугировали. Осадок ресуспендировали в полной ростовой среде и помещали на агарозные планшеты в концентрации 1×10^3 клеток в лунку. Агарозные планшеты помещали в 12-луночные культуральные планшеты и вели прижизненное наблюдение в стандартных условиях камеры прибора Cell-IQ (“СМ Technologies”, Финляндия) в течение 7 дней. Фоторегистрацию осуществляли каждые 20 мин с помощью программы Cell-IQ Imagen, обработку изображений проводили в программном пакете Cell-IQ Analyzer. Положительным контролем считали формирование сфероидов из фибробластов четвертого пассажа (P4) в полной ростовой среде без добавления препарата.

Результаты и обсуждение

В культуре дермальных фибробластов P18, которую использовали для дальнейших исследований, как стареющую, были хорошо заметны все признаки репликативного старения: спонтанное увеличение размера клеток, преобладание крупных плащевидных и парусовидных клеток (рис. 1, *a*). Темпы клеточного деления резко снижались. Контрольная культура (P4) соответствовала по своим характеристикам фибробластам молодой кожи. В ней преобладали небольшие веретеновидные клетки, которые хорошо пролиферировали (рис. 1, *б*).

По экспрессии характерных для фибробластов маркеров культура P18 также соответствовала возрастным изменениям, наблюдаемым в коже *in vivo*. Контрольные клетки активно экспрессировали характерные для фибробластов маркеры (цитокератин 19, эластин, коллагены типов I, III

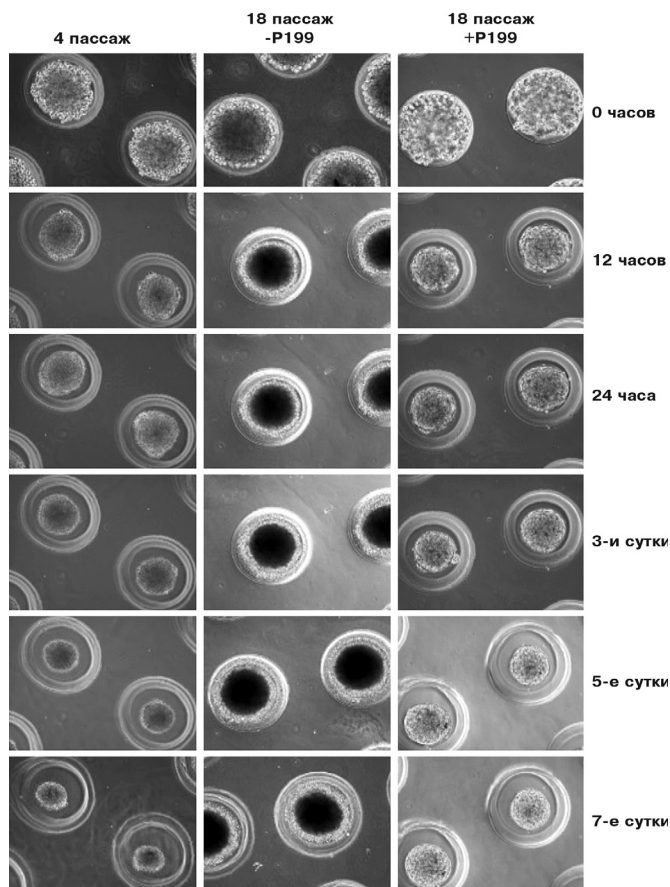


Рис. 5. Влияние препарата на образование сфероидов из дермальных фибробластов в условиях 3D культивирования. Световая фазово-контрастная прижизненная цейтраферная микроскопия.

и IV), отвечающие за основные биомеханические свойства кожи, такие как гладкость, упругость, эластичность (рис. 2, *a–в*), а в опытной культуре (P18) экспрессия этих маркеров заметно снижалась по сравнению с контрольной (рис. 3, *a–в*).

Результаты исследования дозозависимости препарата на 2D культуре показали, что предлагаемые разведения 1:10, 1:100 и 1:1000 не оказывали цитотоксического действия на культуру дермальных фибробластов человека. Учитывая отсутствие морфологических и цитотоксических различий эффекта препарата при разведениях, для исследования его биоактивности использовали разведение 1:10.

Эластин, объем которого составляет всего 2% от общего объема белков дермы, наряду с коллагеновыми волокнами придает коже упругость и эластичность. К 50-летнему возрасту в большинстве эластических волокон наблюдаются дегенеративные изменения за счет снижения синтеза эластина фибробластами. Поэтому экспрессия фибробластами эластина является одним из основных маркеров старения кожи.

Коллаген – фибриллярный секреторный белок, наиболее распространенный в организме человека. Он образует волокна, переплетающиеся как нити в ткани. Коллаген и эластин формируют волокнистый каркас, в который могут вращать новые клетки, и обеспечивают коже упругость и эластичность, а нарушение их синтеза приводит к потере этих свойств. По морфологии коллаген принято делить на три группы: фибриллярный коллаген: коллагены типов I, II, III, V; сетевидный коллаген – коллаген типа IV, образующий опорную сеть базальных мембран; нитевидный коллаген – коллаген типа VI.

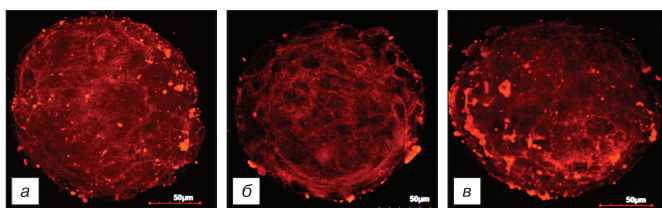


Рис. 6. Экспрессия эластина.

a – сфероид из фибробластов P18 после сокультивирования с препаратом; *b* – сфероид из фибробластов P18 без препарата; *v* – сфероид из фибробластов P4 (контроль).

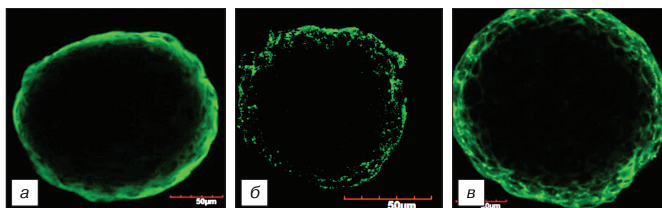


Рис. 7. Экспрессия цитокератина 19.

a – сфероид из фибробластов P18 после сокультивирования с препаратом; *b* – сфероид из фибробластов P18 без препарата; *v* – сфероид из фибробластов P4 (контроль).

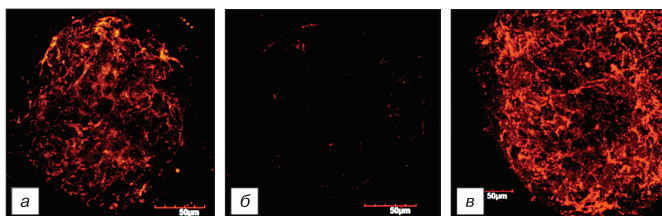


Рис. 8. Экспрессия коллагена типа IV.

a – сфероид из фибробластов P18 после сокультивирования с препаратом; *b* – сфероид из фибробластов P18 без препарата; *v* – сфероид из фибробластов P4 (контроль).

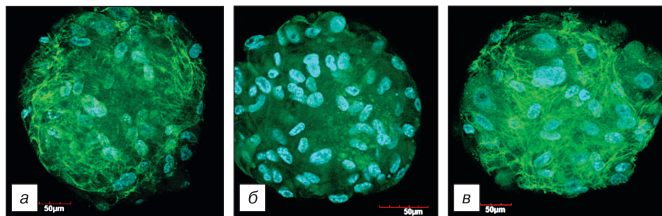


Рис. 9. Экспрессия фибронектина (зеленый).

a – сфероид из фибробластов P18 после сокультивирования с препаратом; *b* – сфероид из фибробластов P18 без препарата; *v* – сфероид из фибробластов P4 (контроль).

В дерме взрослого человека интерстициальный фибриллярный коллаген (тип I и III) является самой большой фракцией коллагена и составляет 70% от сухой массы дермы. При этом содержание коллагена типа I составляет 80%, а типа III – приблизительно 15% от всего объема коллагена. На протяжении всей жизни человека содержание коллагенов уменьшается примерно на 1% в год.

Иммуноцитохимическое окрашивание на характерные для фибробластов маркеры в нашем исследовании показало, что экспрессия цитокератина 19 и эластина в культуре дермальных фибробластов человека P18, отвечающих за упругость и эластичность кожи увеличивается после сокультивирования с мезотерапевтическим препаратом, по сравнению с контрольной группой (рис. 4, *a-v*).

Монослойные клеточные культуры являются признанной модельной системой, используемой в разработке и исследованиях лекарственных средств. Однако, такая 2D клеточная модель отличается от естественных условий. Обычная адгезивная культура представляет собой растущие двумерным (2D) монослоем клетки на плоской поверхности. Клетки, прикрепленные

к искусственной пластиковой или стеклянной подложке, контактируют с другими клетками с образованием межклеточных контактов только в одной плоскости, что препятствует формированию многомерной структуры. Все органы и ткани, включая кожу, имеют трехмерную клеточную организацию, в которой клетки взаимодействуют друг с другом, образуя сложные комплексы контактов с другими клетками и внеклеточным матриксом, формируя, таким образом, уникальное микроокружение. Поэтому «старение» монослойной культуры фибробластов *in vitro* во многом сходно, но не полностью эквивалентно старению кожи *in vivo*. Воспроизвести все возрастные изменения на монослойной культуре в полном объеме не удается. Это приводит исследователей к переводу модельных систем из 2D в 3D условия культивирования. Одним из вариантов 3D клеточных культур являются сфероиды. Они представляют собой трехмерные самоорганизующиеся в силу природных адгезивных свойств сферические кластеры клеток. При формировании сфероидов клетки могут восстановить межклеточные контакты и создать микроокружение, поддерживающее их нативный фенотип. Однако не все клетки могут образовывать сфероиды. Низкодифференцированные клетки человека, включая «незрелые» фибробласты, в условиях отсутствия адгезии способны агрегировать друг с другом, формируя новую многоклеточную структуру – сфероид, содержащий эпителиальный и мезенхимный компоненты. Стареющие культуры фибробластов способны к сфероидообразованию утрачивают. Для сфероидообразования важен определенный уровень экспрессии фибронектина и интегринов $\alpha 5$ и $\beta 1$ фибробластами. Дифференцировка и последующее старение клеток сопровождается утратой способности к мезенхимо-эпителиальному переходу, без которого невозможно формирование сфероидов. Таким образом, сфероидообразование является уникальной простой количественной тестовой системой для определения клеточной зрелости и оценки влияния на нее исследуемых препаратов.

Кроме того, 3D клеточные культуры более стабильны, чем 2D клеточные культуры. Их можно поддерживать в культуре в течение длительного времени – более 3 мес, в отличие от монослойных культур, которые быстро достигают конфлюентного состояния и требуют постоянного пересева или при отсутствии пролиферации («старые» культуры) погибают. Поэтому именно 3D культуры стали активно использовать при изучении отсроченных эффектов лекарственных препаратов.

На рис. 5 представлена сборка отдельных фотографий на сроках 12 ч, 24 ч, 3, 5 и 7 сут. после помещения культур в ростовую среду с целью изучения их способности образовывать сфероиды. Видно, что при сокультивировании культуры фибробластов P18 с препаратом, смешанного с ростовой средой, уже через 12 ч наблюдается образование рыхлого сфероиды. В течение последующих дней происходит компактизация клеток и уплотнение сфероиды, которое заканчивается к 7-м суткам культивирования. В отличие от сфероидов, образованных из фибробластов P4, размеры образованных сфероидов из фибробластов P18 через 7 суток немного больше, даже после компактизации. Вероятно, это связано с большим размером клеток в культуре фибробластов P18. Из культуры фибробластов P18, культивированных без препарата, через 12 ч образуется рыхлый агрегат, который при дальнейшем культивировании не компактизуется, а остается рыхлым с темной некротической зоной внутри сфероиды и рыхлым наружным слоем, состоящим из дебриса. Возможно, клетки не могут синтезировать достаточное количество

внеклеточного матрикса для образования межклеточных контактов и последующего образования сфероидов.

Исследование способности образовывать сфероиды показало, что присутствие в ростовой среде исследуемого препарата стимулирует «омоложение» клеток и последующее восстановление мезенхимо-эпителиальной пластичности культивированных фибробластов за счет восстановленной способности синтезировать в достаточном для установления межклеточных контактов количестве компонентов внеклеточного матрикса (фибронектина и коллагенов), что влияет на способность формировать сфероиды. Результаты иммуноцитохимического исследования сформированных сфероидов, представленные далее, подтвердили наше предположение по восстановлению экспрессии компонентов внеклеточного матрикса. Было показано, что в сфероиде, культивированном в ростовой среде с добавлением препарата практически все клетки экспрессировали эластин (рис. 6, а–в), а поверхностные клетки активно экспрессировали цитокератин 19 (рис. 7, а–в).

Препарат не оказывал ключевого влияния на экспрессию коллагенов типов I и III. Практически все клетки сфероидов экспрессировали эти коллагены. Однако при исследовании влияния на экспрессию коллагена типа IV было обнаружено, что после сокультивирования с исследуемым препаратом практически все клетки в сфероиде экспрессировали этот коллаген. Очевидно, анализируемый препарат активно стимулирует в фибробластах выработку коллагена типа IV – основного компонента базальной мембраны эпидермиса, дефицит которого приводит к старению кожи и развитию в ней патологических процессов (рис. 8, а–в). Также было установлено, что данный мезотерапевтический препарат положительно влияет на уровень экспрессии фибронектина (рис. 9, а–в), который вместе с гликозаминогликанами составляют аморфный (основной) компонент межклеточного матрикса. Кроме того, фибронектин отвечает за адгезию, подвижность, дифференцировку и взаимную ориентацию клеток [6].

Результаты данного исследования убедительно продемонстрировали эффективность применения исследуемого препарата для омоложения кожи.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.
Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Смирнова И.О. Функциональная морфология старения кожи. *Успехи геронтологии*. 2004; 13: 44–51.
6. Златопольский А.Д., Чубкина А.Н., Зайденберг М.А. Влияние ферментов фибронектина на пролиферативную активность фибробластов. *Биохимия*. 1989; 1: 74–9.

8. Вялов С.П., Пшенистов К.П., Куиндоз П. Современные представления о регуляции процесса заживления ран. *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии*. 1999; 1: 49–58.
13. Сабурова И.Н., Репин В.С. 3D-культивирование: от отдельных клеток к регенерационной ткани (К вопросу о феномене эпителио-мезенхимальной пластичности). *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2010; 5(2): 75–86.

Остальные источники литературы см. в References

REFERENCES

1. Smirnova I.O. Functional morphology of skin aging. *Advances in Gerontology (Uspehi gerontologii)*. 2004; 13: 44–51. (in Russian)
2. Benedetto A.V. The environment and the skin aging. *Clin. Dermatol.* 1998; 16(1): 129–39.
3. Ramata-Stunda A., Boroduskis M., Vorobjeva V., Ancans J. Cell and tissue culture-based in vitro test systems for evaluation of natural skin care product ingredients. *Environ. Exper. Biol.* 2013; 11: 159–77. http://in-cell.eu/uploads/files/file_14.pdf
4. Maas-Szabowski N., Shimotoyodome A., Fusenig N.E. Keratinocyte growth regulation in fibroblast cocultures via a double paracrine mechanism. *J. Cell Sci.* 1999; 112(12): 1843–53.
5. Trompezinski S., Berthier-Vergnes O., Denis A., Schmitt D., Viac J. Comparative expression of vascular endothelial growth factor family members, VEGF-B, -C and -D, by normal human keratinocytes and fibroblasts. *Exp. Dermatol.* 2004; 13(2): 98–105.
6. Zlatopolskiy A.D., Chubkina A.N., Zaydenberg M.A. The influence of enzymes of fibronectin on the proliferative activity of fibroblasts. *Biochemistry (Biokhimiya)*. 1989; 1: 74–9. (in Russian)
7. Sorrel J.M., Baber M.A., Caplan A.I. Site-matched papillary and reticular human dermal fibroblasts differ in their release of specific growth factors/cytokines and in their interaction with keratinocytes. *J. Cell Physiol.* 2004; 200(1): 134–45.
8. Vyalov S.P., Pshenistov K.P., Kuindoz P. Modern ideas about regulation of wound healing process. *Annals of plastic, reconstructive and aesthetic surgery (Annaly plasticheskoy, rekonstruktivnoy i esteticheskoy khirurgii)*. 1999; 1: 49–58. (in Russian)
9. Werner S., Krieg T., Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J. Invest. Dermatol.* 2007; 127(5): 998–1008.
10. Sorrel J.M., Caplan A.I. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J. Cell Sci.* 2004; 117(Pt 5): 667–75.
11. Zhao Y., Wang J., Yan X. Preliminary survival studies on autologous cultured skin fibroblasts transplantation by injection. *Cell Transplant.* 2008; 17(7): 775–83.
12. Freedland M., Karmiol S., Rodriguez J., Normolle D., Smith D. Jr., Garner W. Fibroblast responses to cytokines are maintained during aging. *Ann. Plast. Surg.* 1995; 35(3): 290–6.
13. Saburina I.N., Repin V.S. 3D-cultivation: from single cells to tissue regeneration (on the phenomenon of epithelio-mesenchymal plasticity). *Cell Transplantation and tissue engineering (Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya)*. 2010; 5(2): 75–86. (in Russian)
14. Yamaguchi Y., Hearing V.J., Itami S., Yoshikawa K., Katayama I. Mesenchymal-epithelial interactions in the skin: aiming for site-specific tissue regeneration. *J. Dermatol. Sci.* 2005; 40(1): 1–9.
15. Desmouliere A., Chaponnier C., Gabbiani G. Tissue repair, contraction the myofibroblast. *Wound Repair Regen.* 2005; 13(1): 7–12.

Поступила 04.12.15
Принята к печати 20.01.16