

КОЖИНА КРИСТИНА ВИТАЛЬевна

**ВЛИЯНИЕ ОЛИГОПЕПТИДА P199 НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ
ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА В
ЭКСПЕРИМЕНТЕ IN VITRO**

14.03.03 - Патологическая физиология

Автореферат диссертации

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Москва - 2017

Работа выполнена в Лаборатории клеточной биологии и патологии развития Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Научные руководители:

Сабурова Ирина Николаевна

доктор биологических наук,

заведующая лабораторией клеточной биологии и патологии развития Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Волкова Елена Николаевна

доктор медицинских наук,

профессор, врач высшей категории, директор научно-образовательного департамента Компании «ПремьерФарм»

Официальные оппоненты:

1. Дубовая Татьяна Клеониковна

доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии лечебного факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

2. Ткаченко Сергей Борисович

доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой клинической физиологии и функциональной диагностики медико-биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов»

Защита диссертации состоится « _____ » 2017 года в часов _____ на _____ заседании

Диссертационного совета Д 001.003.01 ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», по адресу: 125315, г. Москва, ул. Балтийская, дом 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «НИИОПП».

Диссертация размещена на сайте института ФГБНУ «НИИОПП» www.niiopp.ru

Автореферат разослан « _____ » _____ 2017 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета Д 001.003.01

кандидат медицинских наук

Скупятовская Ляписа Николаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Возрастные изменения организма человека начинаются с клеточного уровня, когда клетки теряют свою функциональную активность, то есть способность к пролиферации, миграции, синтезу тканеспецифичных белков. Именно эти свойства клеток поддерживают нормальную физиологию всей ткани в целом (Helmo F.R. et al., 2013).

Наиболее видимые глазу изменения в первую очередь касаются кожи человека. Кожа является самым большим органом человека и участвует в дыхательной функции, терморегуляции, водно-солевом обмене, экскреторной, иммунной и рецепторной функциях организма, но основной функцией кожи является защита организма от внешних воздействий. Возрастные изменения приводят к потере кожей эластичности и снижению ее защитных свойств (Смирнова И.О., 2004). В результате снижается способность кожи к репарации после повреждения, что приводит к возникновению гипертрофических и келоидных рубцов в процессе заживления ран. Вызывая боль, зуд и контрактуры, чрезмерные рубцы влияют на качество жизни пациента. К сожалению, на сегодняшний день терапевтические подходы к сокращению рубцевания не увенчались успехом (Хуе М., Jackson С.Ж., 2015). Поэтому многие исследователи заинтересованы в поиске факторов, регулирующих безфиброзную репарацию.

Сравнительный анализ фетальной и постнатальной репарации выявил важные отличия, которые лежат в основе безрубцового заживления ран на ранних и средних сроках эмбрионального развития. К ним относят отсутствие воспаления, повышенную скорость миграции и высокий уровень пролиферации кератиноцитов и фибробластов, активный синтез цитокинов, таких как TGF- β , IGF, bFGF и других, стимулирующих заживление (Helmo F.R. et al., 2013). Но особую роль исследователи отводят количеству и компонентному составу внеклеточного матрикса (ВКМ), который активно участвует в клеточных и внеклеточных событиях, регулирующих формирование рубца (Хуе М., Jackson С.Ж., 2015). Поэтому наиболее перспективным методом терапии гипертрофических и келоидных рубцов рассматривают коррекцию компонентного состава ВКМ.

Известно, что основным источником ВКМ в коже человека являются фибробласты (Montagna W., 2012). Сравнительный анализ групп фибробластов, выделенных из разных тканей или локализаций в пределах одной ткани, показал, что фибробласты отличаются по уровню экспрессии белков ВКМ. Тип белка, который они синтезируют, можно изменять за счет перемены микроокружения (Werner S. et al., 2007). Следовательно, с помощью прямого воздействия на фибробласты можно регулировать синтез определенных компонентов ВКМ. Например, безфиброзному заживлению ран может способствовать обогащение внеклеточного матрикса коллагеном III типа, эластином и фибронектином (Хуе М., Jackson С.Ж., 2015).

В последние годы ведется активная разработка методик для прижизненного анализа возрастных изменений структурно-функциональных показателей кожи (эхогенности, толщины эпидермиса и дермы, микроциркуляции кожи, изменений

на клеточном уровне), которые возможно диагностировать с помощью эхографии, лазерной доплеровской флоуметрии и конфокальной лазерной микроскопии (Золотенкова Г.В. и др., 2015, Султанов Д.В., Хугаева В.К., 2014).

Однако, несмотря на многочисленные исследования, состав ВКМ, способствующий безфиброзному заживлению до конца не установлен. Это связано с тем, что проводить подобные исследования *in vivo* на пациентах представляется затруднительным, дорогостоящим и неприемлемым с этической точки зрения. Альтернативным методом исследования рассматривают культуры клеток. Именно *in vitro* можно изучать функциональную активность клеток, подвергшихся внешнему воздействию и исследовать изменения таких важных показателей, как пролиферация и миграция клеток, профиль синтеза белков ВКМ (Woodley D.T., 2017).

В работах многих исследователей было показано, что дермальные фибробласты при культивировании сохраняют диплоидный кариотип, не проявляют онкогенных свойств и имеют ограниченную продолжительность жизни (Zhao Y. et al., 2008, Varani J. et al., 2006). При этом клетки претерпевают значительные изменения как при увеличении числа пассажей («модель старения Хейфлика») (Gragnani A. et al., 2014), так и при увеличении времени культивирования в пределах одного и того же пассажа («старение покоящихся клеток») (Zang R. et al., 2012). Данные изменения носят, в основном, негативный характер, что и позволяет использовать клеточные культуры дермальных фибробластов для моделирования старения клеток *in vitro*.

При длительном культивировании в монослое клетки теряют одно из важнейших свойств функциональной активности - эпителио-мезенхимную пластичность (Сабурина И.Н., Репин В.С., 2010; Yamaguchi Y., 2005). Для сохранения тканеспецифичных свойств клеток предпочтительнее использовать 3D культуру - сфероиды, которые по своим свойствам более полно повторяют нативную ткань по пространственной организации, плотности клеток на единицу объема и представляет собой динамичную систему с организованным клеточным поведением - необходимым условием полноценного морфогенеза. Поэтому проведение исследований по изучению функциональной активности клеток, выращенных как в монослое, так и в 3D культуре, представляется актуальным.

Показано, что добавление биологически активных факторов в культуральную среду может регулировать секреторную активность фибробластов. Исследования, проведенные Ло с соавторами, показали, что сокультивирование фибробластов с мультипотентными мезенхимными стромальными клетками (ММСК) или добавление кондиционированной среды изменяет профиль синтеза белков ВКМ (Lo D.D. et al, 2012). К сожалению, вследствие того, что ММСК выделяют множество разных типов цитокинов, сложно определить и выявить ключевой фактор, регулирующий экспрессию того или иного компонента ВКМ. Поэтому в качестве внешнего воздействия, целесообразным будет использовать один синтетический фактор, потенциально влияющий на ВКМ.

Известно, что синтетические пептиды представляют собой соединения L- аминокислот и принимают участие во многих биологических процессах, включая регенерацию, пролиферацию, противовоспалительную реакцию организма и

процессы заживления повреждений (Коваленко А.А. и др., 2013, Хугаева В.К. и др, 2012, Zhang L. et al., 2009). Примером такого синтетического пептида является р199, который, как было показано в работах Петриковского и Юцковской, стимулирует пролиферацию фибробластов внеклеточного матрикса в коже человека (Юцковская ЯА., Данилова А.А., 2014; Петриковский Б.М., 2012). Также было показано, что инъекционное применение препарата, в состав которого входит р199, способствует коррекции атрофических рубцов (Стенько А. и др., 2016). Однако, отсутствие данных, каким образом олигопептид р199 оказывает действие на морфологию, пролиферацию, миграцию, формирование компонентов ВКМ и на регенерационные процессы, подчеркивает актуальность и целесообразность проведения данных исследований.

Цель исследования: изучить влияние олигопептида р199 на возрастные изменения и репарационную активность 2D и 3D культур дермальных фибробластов после повреждения в эксперименте *in vitro*.

Задачи исследования:

1. Получить и охарактеризовать культуру дермальных фибробластов человека на ранних и поздних пассажах.
2. Изучить влияние олигопептида р199 на функциональную активность дермальных фибробластов в стандартных условиях 2D культивирования.
3. Исследовать влияние олигопептида р199 на формирование сфероидов из дермальных фибробластов на ранних и поздних пассажах.
4. Оценить влияние олигопептида р199 на белковосинтетическую функцию фибробластов кожи человека в 2D и 3D культуре.
5. Выявить и изучить репарационные эффекты олигопептида р199 в экспериментах с повреждением дермальных фибробластов 2D и 3D культур.

Научная новизна. Получена новая культура дермальных фибробластов кожи человека ФЧ-2, обладающих стабильными культуральными и морфологическими характеристиками и отражающих свойства «молодых» и «стареющих» клеток на 4 и 18 пассажах в стандартных условиях монослойного культивирования.

Впервые для исследования функциональной активности молодых и «стареющих» фибробластов кожи человека была применена 3D культура (клеточные сфероиды).

Впервые показано, что фибробласты на поздних пассажах (после 18 пассажа) теряют способность формировать сфероиды, а добавление синтетического олигопептида р199 в ростовую среду приводит к восстановлению сфероидообразования.

Впервые на 3D культуре «стареющих» фибробластов установлено, что олигопептид р199 запускает механизмы, приводящие к активации и индукции синтеза коллагена IV типа, что имеет фундаментальное значение в области исследования процессов старения и безфиброзной репарации.

Для анализа репарационных эффектов изучаемого олигопептида впервые была применена 3D модель повреждения клеток с помощью микродиссекции

наносекундным лазерным скальпелем, что позволило получить новые данные о стимулирующем влиянии олигопептида p199 на процессы регенерации клеточных сфероидов.

Теоретическая и практическая значимость. Разработанные 2D и 3D клеточные модели повреждения дермальных фибробластов могут быть использованы для изучения механизмов регенерации и оценки эффективности новых стимуляторов кожной репарации.

Данные по индукции синтеза коллагена IV типа в 2D и 3D культуре «стареющих» фибробластов дермы человека с помощью олигопептида p199 имеют теоретическое значение для изучения активации генов, находящихся в неактивном состоянии, и могут быть использованы в разработке новых методов лечения повреждений кожи и коррекции процессов старения.

Данные о про-репарационных эффектах p199, приводящих к изменению синтеза белков внеклеточного матрикса и провоспалительных факторов, имеют теоретическое и практическое значение для исследований механизмов старения и безфиброзной репарации кожи.

Полученные данные свидетельствуют о том, что олигопептид p199 можно рекомендовать в качестве самостоятельного препарата как для борьбы с возрастными изменениями кожи, так и при ее повреждении.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Культура дермальных фибробластов человека после 18-20 пассажа формирует признаки «старения» кожи на уровне морфологии, пролиферации, миграции, формирования внеклеточного матрикса и потенциала репарации повреждений.
2. В отличие от «молодых» культур (4 пассаж) фибробласты поздних пассажей (после 18 пассажа) теряют потенциал к формированию сфероидов.
3. Олигопептид p199 оказывает дозозависимый эффект на синтез тканеспецифичных белков, что свидетельствует о комплексном воздействии на функциональную активность дермальных фибробластов в 2D и 3D культуре.
4. Олигопептид p199 влияет на механизмы активации синтеза в дермальных фибробластах коллагена IV типа, экспрессия генов которого утрачивается с возрастом.
5. Олигопептид p199 оказывает стимулирующее влияние на репарацию клеточных сфероидов, частично поврежденных наносекундным лазерным скальпелем.

Внедрение полученных результатов.

Результаты исследования используют для оценки биологической активности, биобезопасности, цитотоксичности и биологической активности сертифицированных коммерческих косметических препаратов в Компании «ПремьерФарм». Культура диплоидных фибробластов человека используется при проведении фундаментальных исследований физиологии клетки в культуре в лаборатории клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ «НИИОПП».

Апробация работы. Основные результаты работы доложены на следующих международных конференциях:

- Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016», (2016г, Москва)
- 12th International Congress of Cell Biology, (2016г, Прага)
- XVII конференция-школа с международным участием «Актуальные проблемы биологии развития», (2016г, Москва).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 5 работ в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, 1 статья в научно-практическом медицинском журнале и 3 тезисов докладов на международных конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения собственных результатов, их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 145 страницах машинописного текста, содержит 46 рисунков и 3 таблицы. Список литературы включает 135 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Выделение и культивирование фибробластов из дермы кожи человека

1.1. Получение 2D культуры дермальных фибробластов человека

Забор материала осуществляли строго с соблюдением правил этики, Закона об охране здоровья граждан (№ 5487-1 «Об охране здоровья граждан» от 22 июля 1993 (в ред. Указа Президента РФ от 24.12.1993 N 2288; Федеральных законов от 02.03.1998 N 30-ФЗ, от 20.12.1999 N 214-ФЗ) и при информированном согласии донора.

Для выделения фибробластов было исследовано 3 биоптата кожной ткани человека (1 образец - взрослый донор 45 лет, 2 образец - взрослый донор 54 лет, 3 образец - взрослый донор 52 лет). Первичную культуру дермальных фибробластов получали из биоптатов кожи путем механической дезагрегации и последующей ферментативной обработки. Культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 2мМ L-глутамина и 10% фетальной телячьей сыворотки, до 4 пассажа, охарактеризовывали по экспрессии характерных маркеров и криоконсервировали, создавая банк культуры дермальных фибробластов человека. Линии от разных

доноров были названы ФЧ-1, ФЧ-2, ФЧ-3. Использование культуры клеток ФЧ-2, отличавшейся стабильными культуральными и морфофункциональными характеристиками, а также отсутствием контаминации.

Для получения «старееющей» культуры клетки из полученного ранее банка культивировали до 18 пассажа (P18), в качестве контроля использовали культуру клеток 4 пассажа (P4).

Для исследования дозозависимого влияния олигопептида на 2D культуру, аликвоты (500мкл) пептида P199, растворенного в солевом буфере смешивали с полной ростовой средой в соотношении 1:2, 1:10, 1:100, 1:1000. Анализ цитотоксичности проводили на 2D культуре дермальных фибробластов 18 пассажа (P18). Клетки помещали на 12-луночные планшеты в плотности 1×10^4 клеток/см² на лунку. В качестве контроля исследовали поведение клеток в полной ростовой среде без добавления пептида. Клетки культивировали в присутствии пептида в течение 72 часов, далее проводили исследование на жизнеспособность.

Анализ биоактивности p199 проводили на 2D культуре дермальных фибробластов. Для этого клетки помещали на покровные стекла в чашки Петри (35мм) в плотности 1×10^4 клеток/см², после чего культивировали в присутствии пептида, смешанного с полной ростовой средой в соотношении 1:2, 1:10, 1:100, 1:1000 в течение 72 часов, далее проводили исследование морфологии и экспрессии специфических маркеров. В качестве контроля использовали культуру дермальных фибробластов 4 пассажа.

1.2. Контроль контаминации

Культуры фибробластов контролировали на отсутствие контаминантов. Данные исследования были проведены специализированным учреждением ООО «Лаборатория Литех».

Для оценки наличия микоплазм в лабораторных условиях, фиксированный монослой клеток в течение 10мин при +37°C окрашивали флюорохромом бис- бензимида (Hoechst - 33258), который связывается с двуцепочечной ДНК.

1.3. Криоконсервация клеток

Фибробласты культуры ФЧ-2, проверенные на отсутствие контаминантов, культивировали до 4 пассажа и замораживали для длительного хранения. В качестве среды для криоконсервирования использовали эмбриональную телячью сыворотку с 10% диметил-сульфоксида. Криопробирки с суспензией клеток в среде для криоконсервирования постепенно охлаждали со скоростью $\sim 1^\circ\text{C}$ в минуту до -70°C и через 24 часа переносили на хранение в жидкий азот (-196°C).

Всего было заморожено 30 ампул, которые и составили основу посевного банка новой культуры клеток фибробластов человека. Свободная от контаминантов и замороженная на ранних пассажах и достаточном количестве

ампул культура клеток в дальнейшем исследовалась по всем параметрам современного паспорта.

1.4. 3D культивирование дермальных фибробластов человека

Для изучения влияния олигопептида p199 на образование сфероидов из дермальных фибробластов монослойные клеточные культуры фибробластов P18, которые культивировали с добавлением в ростовую среду p199 и культуры фибробластов P18, культивируемые без добавления олигопептида, помещали на неадгезивные агарозные планшеты. Агарозные планшеты получали за счет полимеризации агарозы в специальных пластмассовых формах (3D Petri Dishes, Microtissue, США).

Для данного этапа исследования использовали аликвоты (500мкл) пептида p199, растворенного в солевом буфере, и смешанные с полной ростовой средой в соотношении 1:10. 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 суток. Положительным контролем считали формирование сфероидов из фибробластов четвертого пассажа (P4) в полной ростовой среде без добавления пептида. Полученные сфероиды фиксировали и производили иммуноцитохимический анализ.

2. Исследование влияние p199 на функциональную активность дермальных фибробластах в условиях патофизиологического процесса

2.1. Моделирование в монослое процесса заживления раневой поверхности путем миграции клеток

Для оценки миграционной активности фибробластов и моделирования раневой поверхности в 2D культуре клетки высевали в лунки 12-луночных культуральных планшетов (Corning, США) в полной ростовой среде в концентрации 1×10^4 клеток/см² и культивировали в присутствии препарата p199 в соотношении с культуральной средой 1:10 до 90-100% конfluenceности (полного монослоя). Контролем служили клеточные культуры в лунках в полной ростовой среде без добавления пептида. После достижения культурами 100% конfluenceности наносили царапину острой глазной хирургической иглой. После нанесения царапины в течение 5 сут вели прижизненное наблюдение в стандартных условиях (+37°C, 5% CO₂) камеры-инкубатора прибора Cell-IQ (СМ Technologies, Финляндия).

2.2. Моделирование повреждения ткани на 3D культуре дермальных фибробластов человека

Для изучения воздействия препарата на репарацию повреждения в 3D условиях на сфероиды наносили видимое повреждение, используя микродиссектор на основе наносекундного лазера. Исследование проводили на двух группах сфероидов: поврежденных и интактных. Для получения сфероидов из дермальных фибробластов на пассаже 18, клетки культивировали на агарозных неадгезивных планшетах (3DPetriDish) в присутствии пептида p199 в течение 7сут, далее образованные сфероиды разделяли на две группы: 1) интактные сфероиды, которые продолжали культивировать на агарозных планшетах в присутствии пептида p199 в течение 3сут; 2) поврежденные сфероиды, которым наносили повреждение с помощью наносекундного лазера и далее культивировали на агарозных планшетах в присутствии пептида p199 в течение 3сут. Контрольные сфероиды, полученные из культуры фибробластов на пассаже 4 без добавления пептида p199, также разделяли на две группы: поврежденные и неповрежденные сфероиды.

Облучение сфероидов проводили на установке Palm CombiSystem (Zeiss, Германия) с помощью наносекундного лазерного скальпеля (длина волны 355нм, частота импульсов 100 Гц, длительность импульсов 2нсек, максимальная энергия в импульсе 9мкДж). Эксперименты были проведены на базе ФГБУН «Объединенный институт высоких температур РАН» под руководством старшего научного сотрудника, кандидата физико-математических наук Ильиной Инны Вячеславовны. Путем воздействия наносекундных лазерных импульсов осуществляли повреждение поверхностных и внутренних слоев сфероида. Прямолинейную траекторию облучения сфероида от периферии к центру задавали вручную в программном обеспечении, траектория последовательно отрабатывалась в течение 6-8 циклов за 15-20сек.

После нанесения повреждения часть сфероидов продолжили культивировать в полной ростовой среде, смешанной с растворенным в солевом буфере пептидом p199 в соотношении 1:10, другую часть поврежденных сфероидов культивировали в полной ростовой среде, но без добавления пептида p199 в течение 3 сут в стандартных условиях (+37°C, 5% CO₂) камеры-инкубатора прибора для прижизненного наблюдения Cell-IQ [^]M Technologies, Финляндия).

3. Методы гистологии, иммуноцитохимии и молекулярной биологии

3.1. Подсчет и анализ жизнеспособности монослойной культуры дермальных фибробластов человека

Подсчет клеток производили после сбора клеток с культуральной поверхности с использованием автоматического счетчика клеток Countess (Invitrogen, США). Для оценки жизнеспособности клетки окрашивали красителями Hoechst 33258

(0,002мг/мл) и йодидом пропидия PI (0,001мг/мл), результат изучали под инвертированным флуоресцентным микроскопом Olympus CKX41 («Olympus», Япония). Подсчет тотального числа клеток производили с помощью программы Cell-IQ Analyzer в течение 48 часов культивирования в монослое. Индекс пролиферации (IP) вычисляли по формуле: $IP=N_{48}/N_0$, где N_{48} - количество клеток через 48ч культивирования, а N_0 - через 0ч культивирования.

3.2. Фиксация 2D и 3D культуры дермальных фибробластов человека

Все 2D культуры и 3D культуры клеток фиксировали в 4% растворе параформальдегида (+4°C, 20мин).

3.3. Морфологический анализ 2D культуры дермальных фибробластов

Для проведения морфологического анализа, зафиксированные предварительно на покровных стеклах клетки окрашивали по протоколу гематоксилин-эозин.

3.4. Иммуноцитохимический анализ дермальных фибробластов человека Анализ проводили с помощью лазерного сканирующего конфокального

микроскопа Olympus Fluoview FV10 («Olympus», Япония). Клетки и сфероиды инкубировали с первичными антителами к цитокератину 19, эластину, α - гладкомышечному актину (α SMA), PCNA (маркеру пролиферации), IL1 β , коллагенам I, III, IV типов и фибронектину. Результат визуализировали с помощью вторичных антител, конъюгированных с флуорохромами FITC (E=525нм) и DyLight594 (E=617нм). Ядра докрашивали флуоресцентным красителем бис-бензimid - Hoechst 33258 (0,002 мг/мл, 10 минут, 25°C).

3.5. Детекция провоспалительных белков методом иммуоблота

После облучения лазером и трехсуточной инкубации, сфероиды собирали в отдельные центрифужные пробирки типа эппендорф, экстракты клеток получали после обработки лизирующим буфером по инструкции производителя (Reporter Lysis Buffer, BDBioscience, США). Белки разделяли с помощью вертикального электрофореза в 18% полиакриламидном геле при 40мА, 29В 1,5 часа. После разделения белки из геля переносили на мембрану из поливинилденфторида методом полусухого переноса. Режим переноса: 2мА/см² (стабилизация по току) 2 часа напряжение не более 20В. Далее мембрану обрабатывали раствором бычьего сывороточного альбумина для предотвращения неспецифичной реакции антител и инкубировали с первичными антителами (12 часов, +4°C) к COX-1, PGE2 и β - актину (контрольному белку) и вторичными антителами (1 час, 25°C), конъюгированными с пероксидазой хрена. Результат визуализировали с использованием ECL-набора по инструкции производителя (Thermo Scientific). Данные регистрировали на станции регистрации изображений Kodak 440 CF (Kodak, США).

4. Статистический анализ

Исследования проводили с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 6.0. С использованием критериев Шапиро-Вилка и χ^2 Пирсона были проверены гипотезы о нормальности распределений исследуемых показателей. При сравнении параметров, имевших нормальное распределение, использовали однофакторный дисперсионный анализ с последующим применением метода множественных сравнений. В каждой экспериментальной серии было проведено не менее трех повторностей, одновременно в каждой группе проанализировано не менее 200 клеток при анализе 2D культур и не менее 50 сфероидов при анализе 3D культур.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение и характеристика 2D культуры дермальных фибробластов кожи человека

Фибробласты, в настоящее время, рассматриваются как одни из самых перспективных клеток для проведения исследований и понимания ряда процессов в современной биологии. Фибробласты остаются основной клеточной формой соединительной ткани. Они являются основным типом клеток дермы, ответственны за синтез и выделение всех компонентов дермальной матрицы, таких, как коллаген, эластин и гликозамингликаны. Коллаген обеспечивает прочность, эластин придает эластичность, а гликозамингликаны обеспечивают увлажненность и упругость кожи.

Важным аспектом в выборе экспериментальной культуры клеток является её соответствие основным целям. В рамках данного исследования в качестве критериев для выбора объекта были определены пролиферативная и синтетическая активность клеток. В начале работы предполагалось получение двух культур клеток от молодого и стареющего организма с разницей в возрасте в не менее двадцати лет. Однако, как показал анализ литературы, активность клеток *in vitro* строго индивидуальна, не коррелирует с возрастом донора, а значит сравнительный анализ культур клеток от различных доноров является недостоверным (Cristofalo V.J. et al., 2000). Даже в данном исследовании на первом этапе отбора была выведена из экспериментов культура от более молодого донора - ФЧ-1 (45 лет), как низкопролиферирующая, тогда как культуры ФЧ-2 и ФЧ-3 от доноров старше по возрасту (54 и 52 года) демонстрировали высокий пролиферативный и синтетический потенциал. Далее, при анализе культур на контаминанты, была выведена из эксперимента культура ФЧ-3, так как была заражена микоплазмой.

Таким образом, в ходе данного исследования была получена культура фибробластов кожи человека ФЧ-2, отличающаяся отсутствием контаминантов,

стабильностью морфологических и культуральных характеристик, а также стабильной экспрессией специфических маркеров на ранних пассажах. Именно культура ФЧ-2 стала объектом исследования для все последующих экспериментов.

При культивировании дермальных фибробластов ФЧ-2 было показано, что на 18 пассаже проявляются признаки «стареющих» клеток: происходило увеличение в размерах (рис.1), снижение пролиферативного потенциала (таблица 1) и синтеза белков ВКМ (рис.2). Перечисленные признаки соответствуют критериям «стареющих» клеток для использования их в предклинической оценки эффективности препаратов (Rattan S.I.S., 2010).

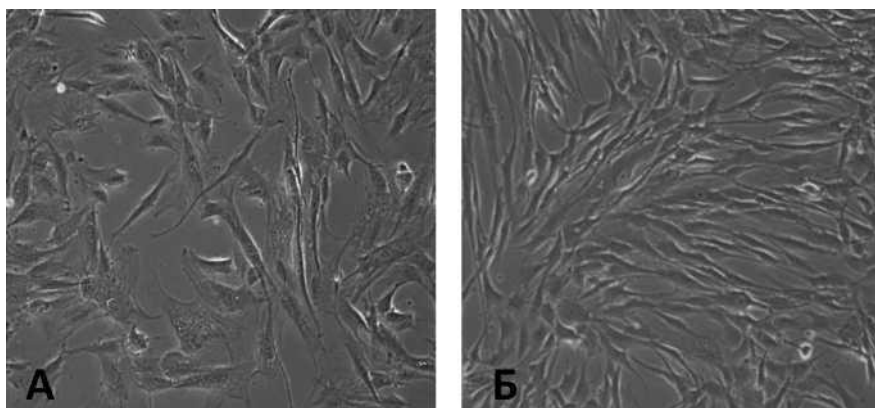


Рис. 1. А - опытная культура фибробластов (P18), Б - контрольная культура фибробластов (P4). Фазово-контрастная микроскопия

Таким образом, полученная 2D культура дермальных фибробластов на поздних пассажах может быть использована в качестве модели процессов старения кожи *in vitro*. В качестве фактора, потенциально подавляющего эти процессы, был выбран олигопептид p199, который, как было показано ранее (Юцковская Я.А., Данилова А.А., 2014; Петриковский Б.М., 2012), стимулирует пролиферацию фибробластов и увеличивает количество внеклеточного матрикса в коже человека. Этот олигопептид является уникальной разработкой, основанной на исследовании состава вартонова студня пупочного канатика человека - источника множества цитокинов, факторов роста и белков ВКМ (Петриковский Б.М., 2012).

Добавление к культуре p199 в разведениях 1:10, 1:50 и 1:100 не оказало на клетки цитотоксического эффекта. Увеличение соотношения раствора p199 с культуральной средой приводило к нарушению буферного баланса и вызывало гибель клеток, очевидно, не связанную с действием самого олигопептида. Поэтому для оценки биологического эффекта использовали данные разведения пептида (1:10, 1:50 и 1:100).

Присутствие олигопептида p199 в культуральной среде стимулировало пролиферацию клеток (таблица 1), что соответствует данным других авторов (Петриковский Б.М., 2012). Кроме того, олигопептид p199 стимулировал синтез эластина и цитокератина 19, коллагена IV и фибронектина (рис.3). Было также показано повышение экспрессии маркера пролиферирующих клеток PCNA, что указывает на рост пролиферации в культуре «стареющих» фибробластов. Как при

добавлении пептида p199, так и без него, уровень синтеза коллагенов I и III типов не изменялся в «стареющих» фибробластах, отсутствовала экспрессия aSMA, характерная для фиброзных тканей.

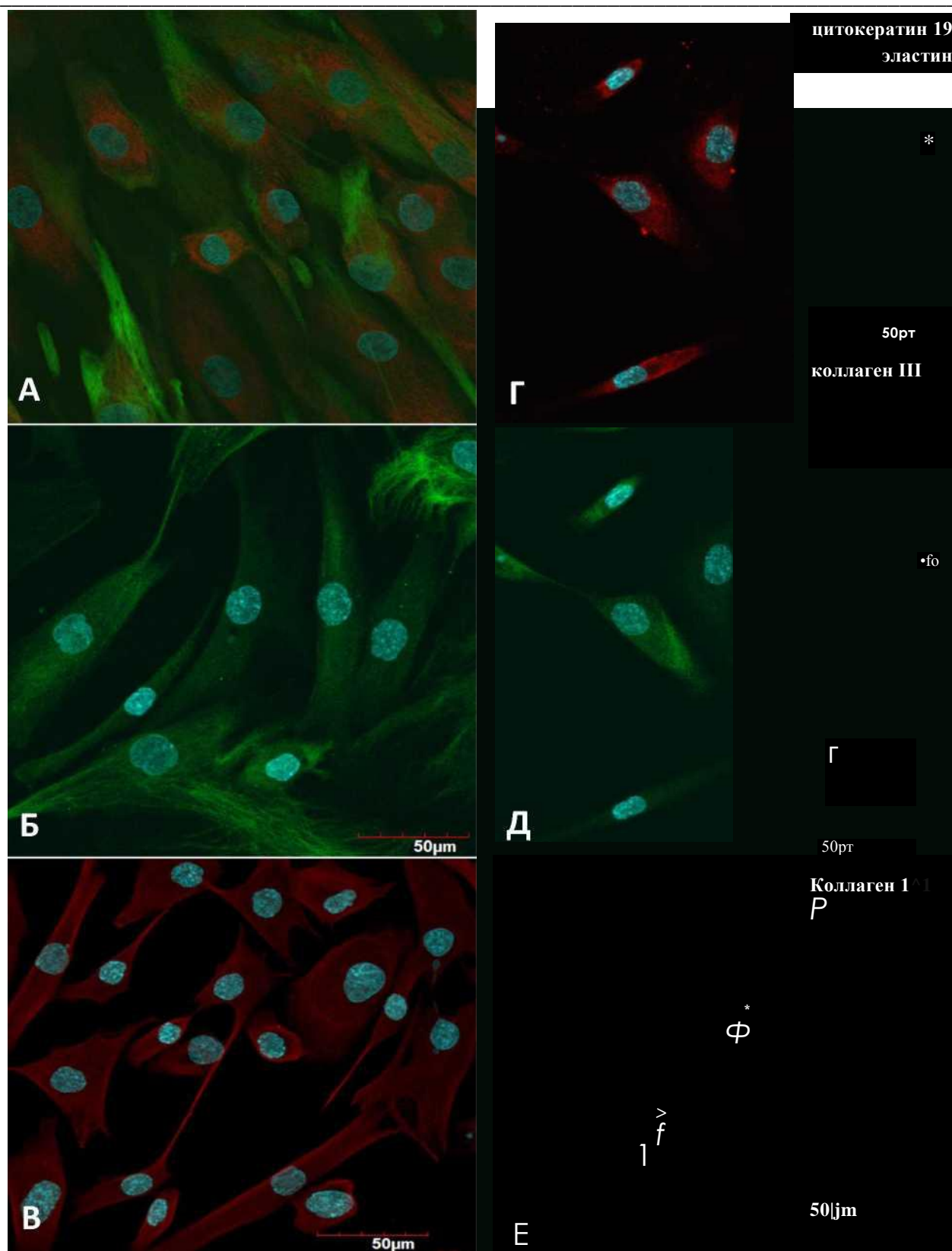


Рис. 2. Снижение экспрессии тканеспецифических маркеров в «стареющих» фибробластах P18 (Г-Е) по сравнению с «молодыми» фибробластами P4 (А-В): цитокератина 19 (зеленый), эластина (красный, А,Г), коллагена III типа (зеленый, Б, Д) и коллагена I типа (красный, В, Е). Ядра окрашены Hoechst 33258 (синий). Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

Таблица 1

Значения индекса пролиферации для контрольных и экспериментальных культур фибробластов кожи человека

	Культура клеток				
	P4	P18	P18+p199 (1:10)	P18+p199 (1:50)	P18+p199 (1:100)
Индекс пролиферации	3,25	1,86	3,5	2,3	1,7
	4,2	1,5	3,9	3	2,34
	3,8	2,9	4,6	3,3	2,5
Среднее значение	3,75	2,08667	4	2,866666667	2,18
Стандартное отклонение	0,47697	0,727	0,556776436	0,513160144	0,42332021

Полученные данные свидетельствуют об активации в клетках сигнальных путей, обеспечивающих нормальную физиологию кожи, связанную в том числе с активным синтезом белков ВКМ. Фибробласты за счет своей функциональной активности образуют волокна и основное вещество соединительной ткани, а также участвуют в восстановлении кожного покрова при заживлении ожоговых и других ран, что делает их применение чрезвычайно важным для восстановления повреждений кожи и терапии ран различной этиологии (Tracy L.E. et al., 2016). Эластин, объем которого составляет всего 2% от общего объема белков дермы, наряду с коллагеновыми волокнами придает ей упругость и эластичность. Увеличение его экспрессии свидетельствует о возможности восстановления эластичных свойств кожи (Olczyk P. et al., 2014). Фибронектин является важной составляющей матричного каркаса кожи - обеспечивает необходимое механическое натяжение фибробластов и таким образом влияет на их функциональную активность (Coolen N.A. et al., 2010). Коллагены I и III типов составляют основную часть матрикса дермы, постепенно с возрастом снижается их содержание и изменяется количественное соотношение (Coolen N.A. et al., 2010). Коллаген IV типа характерен только для эмбрионального периода и детского возраста, с годами его количество быстро уменьшается (Helmo F.R. et al., 2013). Так как синтез коллагенов I и III типов не изменялся под воздействием p199, можно предположить, что синтез коллагена IV типа активируется по независимому от них сигнальному пути и может быть самостоятельным критерием «молодости» клеток. Очевидно, что в результате данного исследования были получены уникальные данные об активации синтеза цепей коллагена IV типа, которые имеют фундаментальное значение в области фармакологии, косметологии и патофизиологии старения кожи.

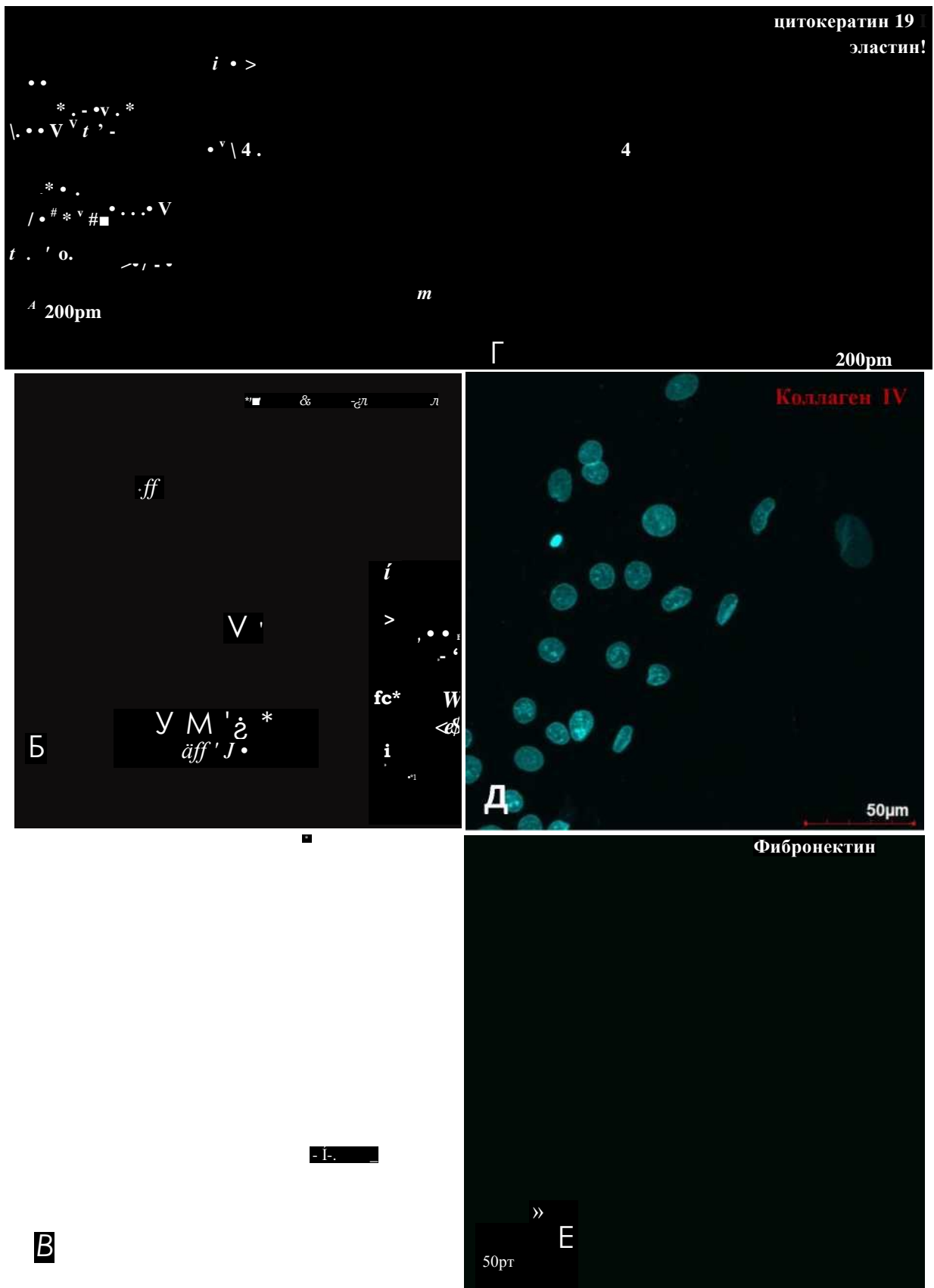


Рис. 3. Повышение синтеза тканеспецифичных маркеров в «стареющих» фибробластах в присутствии олигопептида p199 (А-В) по сравнению с культурой «стареющих» клеток без p199 (Г-Е): цитокератина 19 (зеленый), эластина (красный, А, Г), коллагена IV типа (красный, Б, Д) и фибронектина (зеленый, В, Е). Ядра окрашены Hoechst 33258 (синий). *Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия*

Так как фибробласты играют важную роль в процессах эпителизации и заживления ран, то оценивали влияние олигопептида p199 на миграционную активность «стареющих» клеток на модели механического повреждения монослойной культуры дермальных фибробластов. После нанесения царапины на монослой клеток, с помощью метода прижизненной цейтраферной микроскопии наблюдали, как фибробласты мигрируют в область «повреждения» и заполняют пустую поверхность в течение 24 ч (рис. 4). Олигопептид p199 ускорял миграцию клеток 18 пассажа до значения, сопоставимого со скоростью миграции клеток 4 пассажа. Таким образом, можно предположить, что олигопептид p199 способен усилить репарацию кожи при повреждениях через стимуляцию миграции клеток. Монослойная культура может помочь в понимании влияния исследуемого фактора на отдельные процессы, хотя, естественно, не способна отразить процесс заживления раны.

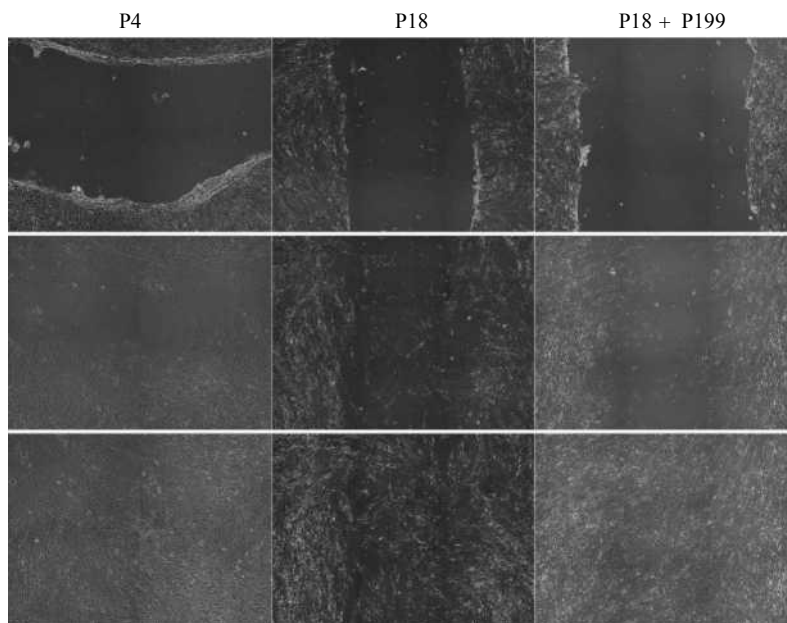


Рис.4. Миграция фибробластов в область «царапины» в течение 24 ч на пассажах 4 и 18 без и с добавлением пептида p199. *Световая фазово-контрастная прижизненная цейтраферная микроскопия*

Все органы и ткани, включая кожу, имеют трехмерную клеточную организацию в которой клетки образуют сложные комплексы контактов с другими клетками и внеклеточным матриксом, формируя, таким образом, уникальное микроокружение. Поэтому воспроизвести все возрастные изменения на монослойной культуре в полном объеме не удастся. Это приводит исследователей к переводу модельных систем из 2D в 3D условия культивирования. В данной работе были получены и предложены в качестве объекта исследования сфероиды из дермальных фибробластов. При этом было установлено, что не все клетки

могут образовывать сфероиды. «Стареющие» клетки формировали рыхлые сфероиды, окруженные множеством фрагментов погибших клеток. По данным работ других авторов, это может быть связано с низким уровнем синтеза фибронектина и интегринов (Salmenperä P. et al, 2008). Таким образом, сфероидообразование является уникальной простой тестовой системой для определения клеточной зрелости и оценки влияния на нее исследуемых препаратов. Олигопептид p199, вероятно за счет активации синтетического аппарата фибробластов, стимулировал сфероидообразование клеток 18 пассажа.

Результаты иммуноцитохимического исследования сформированных сфероидов подтвердили наше предположение о восстановлении синтеза компонентов внеклеточного матрикса (рис. 5). В результате воздействия олигопептида p199 увеличивался синтез эластина, цитокератина 19, коллагена IV и фибронектина. Незначительно повышалось количество коллагенов I и III типов. Отсутствовали α SMA и IL-1 β , что свидетельствует о том, что олигопептид не стимулирует спонтанное развитие фиброза и воспаления. Преимуществом сфероидов перед монослоем клеток стало то, что 3D культура позволила установить зависимость секреции коллагена IV типа и фибронектина от концентрации p199, а также оценить их структуру во внеклеточном пространстве: сетевидный каркас, который, вероятно, обеспечивает необходимые механические свойства сфероидов, аналогичные свойствам дермы.

Так как модель «раны» в монослое не способна воссоздать тканевые процессы, была применена модель повреждения сфероидов с помощью лазерной микродиссекции. Сразу после нанесения повреждения наносекундным лазерным скальпелем наблюдали спонтанное раскрытие краев раны. Клетки на границе поврежденной области округлялись (рис. 6). В сфероидах, культивированных без пептида p199, повреждение сильнее разрушало сфероиды, раскрытие поврежденной области было максимальным, поверхностный слой клеток практически полностью нарушался по всему периметру сфероида (рис. 7). Исследование воздействия пептида p199 на репарацию поврежденных сфероидов позволило оценить его стимулирующий эффект и показать его вероятную эффективность для применения уже *in vivo*. Пролиферации клеток в сфероиде после повреждения установлено не было, поэтому наиболее вероятно, что для восстановления сфероида, происходила активация миграционной активности «стареющих» фибробластов. Вероятно, это связано с повышением и индукцией синтеза белков внеклеточного матрикса фибронектина и коллагена IV типа, которые, как было показано в работах других авторов, ускоряют миграцию клеток (Pastar I. et al., 2014, O'toole E.A., 2001). Еще один из возможных механизмов влияния пептида p199 на активацию репарации был проверен в эксперименте, в котором полуколичественным методом определяли содержание

провоспалительных факторов циклооксигеназы (ЦОГ-1) и простагландина E2 (ПГЕ2) в клетках поврежденных и интактных сфероидов, культивированных в полной ростовой среде с добавлением олигопептида p199. Полученные данные показали, что содержание ЦОГ-1 и ПГЕ2 увеличивалось в присутствии олигопептида. Как было показано в различных исследованиях циклооксигеназа и простагландин E2 стимулируют ре-эпителизацию раневой поверхности, активируя миграцию и дифференцировку кератиноцитов и фибробластов (Peura M. et al., 2009; Futagami A. et al., 2002).

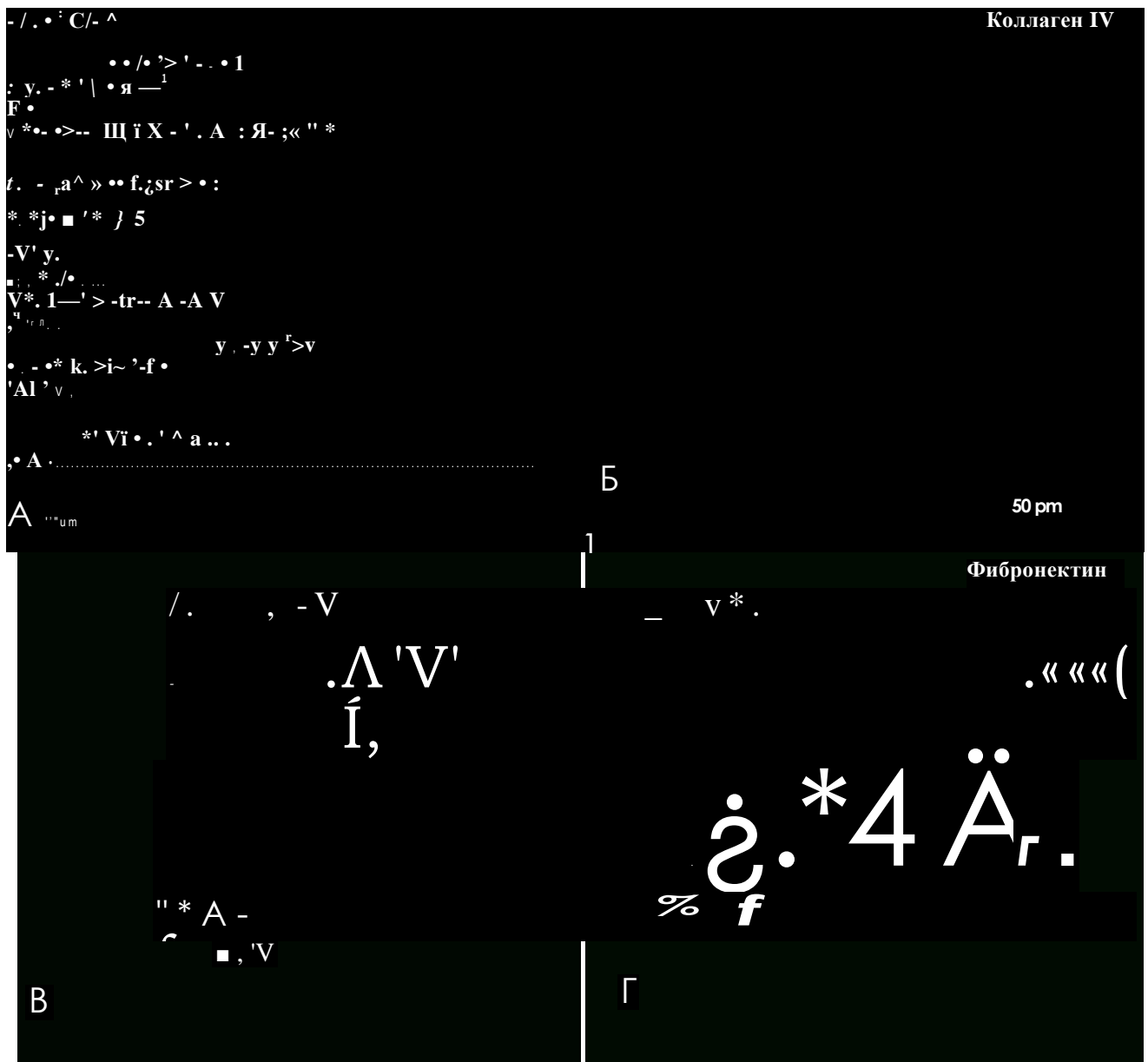


Рис. 5. Появление коллагена IV (красный) и повышение синтеза фибронектина (зеленый) в сфероидах, полученных из «стареющих» фибробластов p18 после добавления p199, смешанного с ростовой средой в соотношении 1:10 (А, В) и отсутствие синтеза в сфероидах из «молодых» фибробластах p4 без (Б, Г). Ядра докрасены Hoechst 33258 (синий). Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

Вероятно, активация миграционной и синтетической активности "стареющих" фибробластов 18 пассажа пептидом p199 позволила сфероидам эффективно репарировать повреждение и по показателю эффективности «заживления раны» превзойти культуру «молодых» фибробластов 4 пассажа.

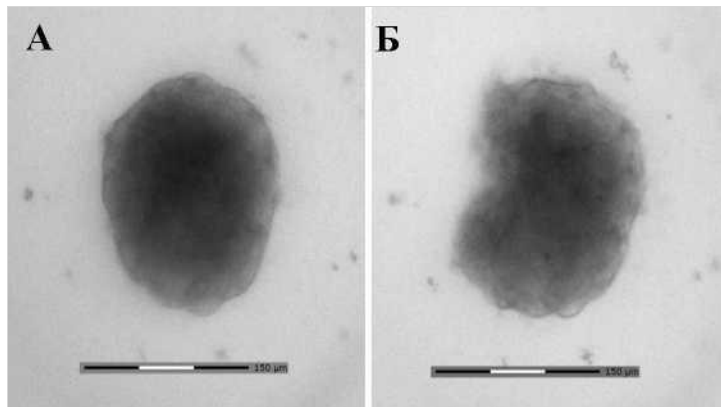


Рис. 6. До (А) и через 60 мин (Б) после нанесения повреждения наносекундным лазерным скальпелем сфероидам из фибробластов P18, сфероиды после повреждения культивировали в ростовой среде с добавлением препарата p199.

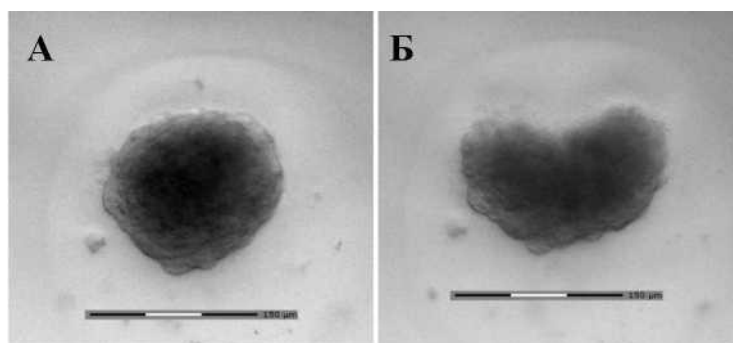


Рис.7. До (А) и через 60 мин (Б) после нанесения повреждения наносекундным лазерным скальпелем сфероидам из фибробластов P4, сфероиды после повреждения культивировали в ростовой среде без добавления пептида p199.

Таким образом, полученная культура дермальных фибробластов, отражающая признаки «молодых» и «стареющих» фибробластов, была использована в качестве модели процессов старения кожи. До настоящего времени отсутствовали данные о действии синтетического пептида p 199 на процесс репарации и на фибробласты из дермы кожи *in vitro*. Наше исследование было проведено, чтобы восполнить возникший пробел и на моделях 2D и 3D культур «молодых» и «стареющих» фибробластов и получить новые данные по механизмам действия p 199. Исследование влияния олигопептида p199 на возрастные изменения и репарационную активность 2D и 3D культур дермальных фибробластов после повреждения в эксперименте *in vitro* показало усиление пролиферативной и миграционной активности, изменение в экспрессии тканеспецифичных маркеров. Способность олигопептида p199 запускать механизмы, приводящие к активации и индукции синтеза коллагена IV типа, свидетельствует об активации генов,

находящихся в неактивном состоянии. Восстановление способности «стареющих» фибробластов кожи генерировать сфероиды и индукция в них синтеза белков внеклеточного матрикса, характерных для молодой кожи и способствующих безфиброзному заживлению ран, подтверждают про-регенерационный эффект олигопептида p199.

ВЫВОДЫ

1. Получена и охарактеризована культура дермальных фибробластов человека на ранних и поздних пассажах, отражающая характеристики «молодых» и «стареющих» фибробластов, что подтверждено различием морфологии, пролиферативной, миграционной активности, экспрессии специфических маркеров (цитокератина 19, эластина, коллагенов I, III и IV типов и фибронектина).
2. Впервые отмечено, что дермальные фибробласты 18 пассажа теряют потенциал к формированию сфероидов, а добавление олигопептида p199 приводит к его восстановлению.
3. Показан про-регенерационный эффект олигопептида p199 на 2D и 3D культуру фибробластов, что подтверждено увеличением синтеза цитокератина 19, эластина, фибронектина и коллагена III типа.
4. Впервые установлено, что олигопептид p199 оказывает индуцирующее влияние на механизмы активации экспрессии коллагена IV типа, способность к синтезу которого утрачивается в процессе старения дермальных фибробластов.
5. Впервые показан репаративный эффект олигопептида p199 в экспериментах с повреждением дермальных фибробластов 2D и 3D культур о чем свидетельствует быстрое восстановление монослоя клеток и структуры сфероида.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Полученные 2D и 3D клеточные модели могут быть использованы для проведения фундаментальных исследований по изучению механизмов клеточного старения и процессов репарации кожи.
2. Полученные культуры дермальных фибробластов кожи человека могут быть рекомендованы для использования для оценки биологической активности, биобезопасности и цитотоксичности косметических препаратов
3. Исследуемый олигопептид p199 можно рекомендовать в качестве самостоятельного препарата для борьбы как с возрастными изменениями кожи, так и при ее повреждении

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Кожина К.В.**, Сабурина И.Н., Горкун А.А. , Зурина И.М. , Кошелева Н.В. , Волкова Е.Н. , Морозов С.Г. Сравнительный анализ воздействия р199 на 2D и 3D культуру дермальных фибробластов человека // Патогенез, 2015. - №4.
- С.34-40.
2. **Кожина К.В.**, Волкова Е.Н., Сабурина И.Н., Зурина И.М., Кошелева Н.В., Горкун А.А. Омоложение кожи в 3D формате // Инъекционные методы в косметологии. - 2015. - №4. - С.40-47.
3. **Кожина К.В.**, Волкова Е.Н., Сабурина 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.
- Т. 19. - №. 1. - С. 58-63.
4. **Кожина К.В.**, Горкун А.А., Зурина И.М. Влияние пептида р199 на экспрессию белков внеклеточного матрикса в 2D и 3D культуре дермальных фибробластов человека // Тезисы международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых: секция «Биология», подсекция Биология развития, Москва, Российская Федерация - 11-15.04.2016. - С. 39-40.
5. Gorkun A.A., Zurina I.M., **Kozhina K.V.**, Kosheleva N.V., Saburina I.N. Spheroids from human dermal fibroblasts as a model for studying skin ageing and for drug screening tests in vitro // 12th International Congress of Cell Biology, Prague, Czech Republic. - 21-25.07.2016 - P.199.
6. **Кожина К.В.**, Горкун А.А., Кошелева Н.В., Зурина И.М., Сабурина И.Н. Исследование биологической активности олигопептида р199 на 2D и 3D модели фибробластов кожи человека // Сборник тезисов докладов XVII Конференции-школы с международным участием «Актуальные проблемы биологии развития». - 10-14.10.2016. - Москва. - С.19-20.
7. Горкун А.А., **Кожина К.В.**, Зурина И.М. , Сабурина И.Н. Патолофизиологические и молекулярные механизмы резорбции белков внеклеточного матрикса при старении кожи и пути их восстановления // Патологическая физиология и экспериментальная терапия, 2016 - Т.60, №4.
- С.128-133.
8. Кошелева Н.В. , Ильина И.В. , **Кожина К.В.** , Зурина И.М. , Роскова А.Е., Горкун А.А., Овчинников А.В., Агранат М.Б., Морозов С.Г., Сабурина И.Н. Разработка клеточной модели на основе лазерной микрохирургии для изучения процессов репарации // Онтогенез, 2017 - Т.48, №1. - С. 63-72.
9. Kosheleva N.V., Ilina I.V., **Kozhina K.V.**, Zurina I.M., Roskova A.E., Gorkun A.A., Ovchinnikov A.V., Agranat M.B., Morozov S.G., Saburina I.N. Cellular model based on laser microsurgery of cell spheroids to study the repair process // Russian Journal of Developmental Biology. - 2017. - Vol. 48. - № 1. - P. 56-64.

Список сокращений

2D - two-dimensional

3D - three-dimensional

α -SMA - гладкомышечный альфа-актин

IL-1 β - интерлейкин 1-бета

PCNA - ядерный антиген пролиферирующих клеток

ВКМ - внеклеточный матрикс

ПГЕ 2 - простагландин E 2

УФ - ультрафиолет

ФЧ - фибробласты человека

ЦОГ -1 - циклооксигеназа 1

Kozhina Kristina Vitalievna The effect of p199 oligopeptide on functional activity of human dermal fibroblasts in vitro

One of the key mechanisms of skin ageing is disorganization, degradation and lack of synthesis of extracellular matrix proteins, which results from oxidative stress, chronic inflammation and intrinsic factors. The balance between different collagen types (I, III and IV), elastin, and other extracellular matrix proteins, as well as their synthesis by skin fibroblasts and resulting spatial organization in extracellular space are of great importance for preservation of such skin characteristics as smoothness and elasticity. The most commonly used systems for studying processes of skin ageing and cosmetic drug screening tests are in vitro monolayer cultures of dermal fibroblast and skin explant cultures, and in vivo animal models. In vitro models are essential for initial drug screening, but monolayer cultures lack the 3D native structure, while explant cultures are not 100% reproducible, which leads to the high variability of results. Monolayer cultures can be effectively used to model replicative ageing in vitro by obtaining a fully characterized monolayer culture of dermal fibroblasts from one donor and maintaining it until late passages. In this case cells gradually undergo morphological and functional changes: cells acquire larger sizes and different phenotype, proliferate and migrate more slowly and, finally, are characterized with lower expression of extracellular matrix proteins. To overcome the main disadvantage of monolayer cultures—the absence of three-dimensional cell and matrix organization, we suggest using more reproducible 3D cell structures - spheroids - from cells of different passages (i.e. P4 and P18) to model young and ageing skin in vitro. Furthermore, the dynamics of spheroid formation from “old” cells is a little slower, they still maintain the structure and cell density close to that of native tissue.

It was shown in the research that the obtained cell culture can be used as a model for studying skin ageing processes both in 2D and 3D culture. During the research on the effect of p199 oligopeptide on mechanisms of extracellular matrix maintenance and “wound healing”, we obtained a new fundamental data on the fact that this oligopeptide not only is capable of inducing the synthesis of young skin proteins, but also provides the acceleration of wound healing processes due to active cell migration and secretion of cytokines that stimulate regeneration.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
v НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ ПАТОЛОГИИ И
ПАТОФИЗИОЛОГИИ

На правах рукописи

КОЖИНА КРИСТИНА ВИТАЛЬЕВНА

ВЛИЯНИЕ ОЛИГОПЕПТИДА P199 НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ДЕРМАЛЬНЫХ
ФИБРОБЛАСТОВ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ IN VITRO

14.03.03 - патологическая физиология Диссертация

На соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители -

доктор биологических наук,
И.Н. Сабурина доктор
медицинских наук, профессор, Е.Н.
Волкова

Москва - 2017