

На правах рукописи

ДЖУССОЕВА ЕКАТЕРИНА ВИТАЛЬЕВНА

**ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МЕЛАНОЦИТОВ,
КУЛЬТИВИРОВАННЫХ IN VITRO В 2D И 3D УСЛОВИЯХ**

14.03.03 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2020

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

Научный руководитель:

Колокольцова Тамара Дмитриевна
доктор биологических наук,

ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и патологии развития Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Официальные оппоненты:

1. 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

2. Борзенко Сергей Анатольевич

доктор медицинских наук, профессор, академик РАЕН, руководитель Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем Федерального государственного автономного учреждения Национального медицинского исследовательского центра «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» им. академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «___» _____ 2020 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.niiorp.ru

Автореферат разослан

«___» _____ 2020 г.

И.о. ученого секретаря

Диссертационного совета Д 001.003.01

доктор биологических наук

Крупина Наталия Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Меланоциты – это высокодифференцированные, долгоживущие клетки с длительным клеточным циклом, локализованные в нижнем слое эпидермиса кожного покрова человека. Меланоциты играют ведущую роль в защите кожи от повреждающего воздействия ультрафиолета (УФ), обеспечивая в процессе сложного и многоэтапного процесса меланогенеза продукцию фотозащитного пигмента меланина. Меланин накапливается в специализированных органеллах меланосомах, которые через дендритные отростки меланоцитов передаются в кератиноциты эпидермиса, где выполняют защитную функцию.

Сбой нормальной пигментации кожи может быть причиной или следствием многих патогенетических и патофизиологических заболеваний. Изменение пигментации может быть вызвано гормональным сбоем, при этом меланоциты получают химические сигналы, стимулирующие меланогенез. Так, например, беременность или продолжительный прием лекарственных препаратов оказывают влияние на гипофиз, что вызывает продолжительный выброс меланоцит-стимулирующих гормонов (МСГ, меланотропин). Меланоциты в ответ на избыток МСГ непрерывно вырабатывают пигментсодержащие меланосомы. Встречается генетическая предрасположенность к нарушению меланогенеза, связанная с активностью гена рецептора меланокортина-1 (*MC1R*). Основным повреждающим фактором является УФ, под воздействием которого активируются УФ-чувствительные белки (Slominski et al., 2004), и усиливается экспрессия транскрипционного фактора регуляции пигментации (Yamaguchi et al., 2007), что стимулирует синтез меланина в отдельных участках кожи и может привести к потере пигментации или формированию пигментных пятен.

Возрастные изменения также являются причиной нарушения общего состояния и пигментации кожи. С возрастом под воздействием многих факторов меняется распределение меланоцитов, нарушения гормонального фона приводят к уменьшению количества меланоцитов. Кроме того, замедляются процессы регенерации, в результате чего кожа становится тоньше и чувствительнее к воздействию окружающих факторов, что также приводит к повреждению меланоцитов и нарушению пигментации.

В связи с этим актуальным является поиск новых препаратов для подавления аномального меланогенеза, способных оказывать воздействие на разных этапах и уровнях регуляции синтеза меланина. Культуры клеток являются уникальной моделью для исследования эффективности таких препаратов (Колокольцова и др., 2017; Сабурина и др., 2018). В настоящее время для этих целей используют монослойные первичные культуры меланоцитов и кератиноцитов (Lei et al., 2002) или индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) (Gledhill et al.,

2015), а также коммерческие тканевые эквиваленты, содержащие нормальные меланоциты (например, MelanoDerm) (Costin et al., 2013) или полученные из иПСК (Gledhill et al., 2015). Использование для исследований тканевых эквивалентов имеет ряд недостатков, прежде всего их высокая стоимость. Кроме того, при исследовании перед анализом образец проходит этап разрушающей пробоподготовки, что ограничивает его использование из-за невозможности анализа одного и того же образца тканевого эквивалента в динамике.

Для изучения эффективности и механизмов воздействия новых препаратов, потенциально пригодных для терапии нарушений пигментации, связанных с изменением функциональной активности меланоцитов, требуются новые доступные воспроизводимые высокочувствительные, простые для манипулирования, а также соответствующие нормам биоэтики модели для биоаналитического и доклинического исследования. Анализ влияния условий культивирования на функциональную активность клеток и выбор модели, позволяющей получать данные о патофизиологии клеток или об изменении их функциональной активности, взаимодействии, механизмах реагирования клеток на возрастные изменения, включая изменение экспрессии генов, представляется целесообразным, актуальным, научно и практически значимым.

Цель исследования

Изучить изменение функциональной активности меланоцитов кожи человека *in vitro* в разных условиях культивирования.

Задачи исследования

1. Исследовать культуральные и морфологические характеристики меланоцитов человека, культивированных в 2D условиях *in vitro* на разных пассажных уровнях.
2. Изучить пигмент-продуцирующую активность меланоцитов, культивированных в составе тканевого эквивалента Меланодерм.
3. Разработать методику культивирования меланоцитов в 3D условиях и охарактеризовать их функциональную активность.
4. Изучить функциональную активность меланоцитов, культивированных в составе тканевого эквивалента Меланодерм и в 3D культуре при добавлении фукоксантина.
5. Провести сравнительное исследование экспрессии ключевых транскрипционных факторов меланогенеза в меланоцитах кожи человека, культивированных в разных моделях: в составе тканевого эквивалента Меланодерм и в 3D культуре при добавлении фукоксантина.
6. Изучить экспрессию специфических генов *MC1R* и *TYR* в меланоцитах кожи человека, культивированных в составе тканевого эквивалента Меланодерм и в 3D культуре при добавлении фукоксантина.

Научная новизна работы

Исследование продукции транскрипционных факторов и экспрессии специфических генов тирозиназы (TYR) и рецептора к меланокортину 1 (MC1R) в меланоцитах в составе тканевых эквивалентов Меланодерм и в сфероидов позволило получить новые фундаментальные данные о влиянии условий культивирования клеток *in vitro* на их функциональную активность.

Впервые отработана уникальная воспроизводимая методика культивирования меланоцитов кожи человека в 3D условиях. Показана способность меланоцитов формировать плотные сфероиды в условиях 3D культуры. Впервые выявлено, что усиление пигмент-продуцирующей активности клеток в сфероидов выражено в большей степени, чем в тканевых эквивалентах, что свидетельствует о восстановлении и поддержании их фенотипа и функциональной активности в процессе сфероидогенеза.

Впервые получены фундаментальные данные об ингибирующем действии фукоксантина на функциональную активность меланоцитов в составе тканевых эквивалентов Меланодерм и сфероидов не только на уровне синтеза ключевых белков, но и на уровне активности генов. Это подтверждено результатами иммуноцитохимического анализа экспрессии транскрипционных факторов меланогенеза *gp100*, *MITF* и *Sox10*, а также снижением активности генов *MC1R* и *TYR* в меланоцитарных клетках в тканевой конструкции Меланодерм и в сфероидов. При этом максимальное воздействие препарата достигается к 7 дню культивирования *in vitro*, что может свидетельствовать о накопительном эффекте. На модели сфероидов из меланоцитов впервые показано, что фукоксантин способен подавлять экспрессию фактора регуляции созревания меланосом *gp100*.

Сохранение высокой жизнеспособности клеток в сфероидов в течение длительного времени в отличие от тканевых эквивалентов, а также более высокая чувствительность к воздействию активного вещества подчеркивает перспективность использования 3D культуры меланоцитов в качестве модели для проведения фундаментальных и прикладных исследований.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Фундаментальные данные, полученные в результате исследований, позволяют лучше идентифицировать и понимать процесс меланогенеза, а также механизмы изменения функциональной активности меланоцитов кожи человека, что важно для понимания патогенеза нарушений пигментации.

Выявленные закономерности влияния условий культивирования меланоцитов кожи человека на их функциональную активность позволяют рекомендовать методы 2D и 3D культивирования меланоцитов для применения в качестве модели или тест-системы для контроля токсичности и безопасности лекарственных и профилактических препаратов.

Данные по изменению ключевых факторов меланогенеза в пигмент-продуцирующих клетках кожи человека станут основой для разработки новых высокоэффективных препаратов для профилактики и терапии заболеваний и коррекции возрастных изменений, связанных с нарушением пигментации, а дерматологам и косметологам дадут возможность разработать продукты, позволяющие снизить риск развития рака кожи.

Результаты проведенных исследований позволяют утверждать, что фукоксантин может быть использован в качестве высокоэффективного, влияющего на процессы меланогенеза средства для коррекции или лечения патологических изменений пигментации кожи человека.

Новые фундаментальные знания о процессе меланогенеза, а также о роли условий 2D и 3D культивирования на функциональную активность меланоцитов могут быть использованы для разработки новых уникальных методов клеточной терапии при дефектах пигментной системы, а также при создании ткане-инженерных конструкций кожи для регенеративной медицины.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Меланоциты в неадгезивных условиях 3D культивирования формируют длительно живущие, жизнеспособные 3D структуры — сфероиды.
2. Компактизация меланоцитов в процессе сфероидогенеза приводит к восстановлению и сохранению клеточного фенотипа и синтезу тканеспецифичных маркеров, подтверждающих их высокую функциональную активность.
3. Снижение продукции транскрипционных факторов и экспрессии специфических генов тирозиназы (*TYR*) и рецептора меланокортина-1 (*MC1R*) в меланоцитах, культивированных в составе тканевого эквивалента Меланодерм и в сфероидах при воздействии фукоксантина подтверждает, что ингибирование процесса меланогенеза происходит как на уровне синтеза ключевых белков, так и на генном уровне.
4. Сравнительное исследование влияния условий культивирования на свойства меланоцитов кожи человека показало, что сфероиды из меланоцитов являются более высокочувствительной моделью для контроля токсичности и эффективности косметических и лечебных препаратов, влияющих на регуляцию нормальной или патологической пигментации кожи.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены на межлабораторном семинаре в ФГБНУ «НИИ Общей патологии и патофизиологии». Основные результаты диссертационного исследования были доложены на международных научных конференциях и конгрессах: Международной научной конференции «Termis EU», (2019г., Родос, Греция); Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных

«Ломоносов-2019» (2019г., Москва, Россия); XXVII Международной конференции «Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (2019г., Гурзуф, Крым), IV Национальном конгрессе по регенеративной медицине (2019 г., Москва, Россия).

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ, включая 4 статьи, в том числе 3 работы в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, 1 статья в рецензируемом журнале, входящем в список Web of Science, и 4 тезисов докладов на международных конференциях; 1 Российский патент.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 112 страницах машинописного текста, содержит 39 рисунков и 1 таблицу. Список литературы включает 131 источник, 13 из которых отечественных и 118 зарубежных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клеточные культуры

Исследование было проведено на тканевых эквивалентах Меланодерм (MEL-300, MatTek Corporation) и первичной культуре меланоцитов человека (104-05N, CELL Applications, Inc).

Культивирование меланоцитов кожи человека в монослое (2D культура).

Первичную культуру меланоцитов кожи человека (CELL Applications Inc.), поступившую в лабораторию в криоконсервированном состоянии, быстро размораживали при 37°C, переносили в 15-мл центрифужные пробирки, центрифугировали (7 мин, 1000об/мин). Супернатант удаляли, осадок клеток ресуспендировали в полной ростовой среде для меланоцитов (CELL Applications Inc.) и высевали на чашки Петри в плотности 10^4 кл/см². После достижения 80-85% плотности монослоя клетки снимали с поверхности чашки с помощью растворов версена (ПанЭко, РФ) и 0,25%-ного раствора трипсина (ПанЭко, РФ) и высевали на новые чашки Петри. Замену среды производили через каждые 2 суток. В экспериментальных исследованиях использовали культуру меланоцитов 3 и 4 пассажей.

Морфологический анализ культуры меланоцитов проводили методами световой микроскопии, наблюдая под инвертированным фазово-контрастным микроскопом в процессе культивирования, и фоторегистрации с использованием прижизненной цейтраферной световой фазово-контрастной микроскопии.

Контроль пролиферативной активности меланоцитов человека в 2D культуре. Прижизненный контроль пролиферативной активности клеток проводили, наблюдая изменение их количества в поле зрения на приборе Cell-IQ

(CM Technologies, Финляндия) в течение 3-х суток, и фоторегистрировали с интервалом 20 минут. Для оценки динамики изменения количества клеток в процессе культивирования анализировали полученные в течение 72 часов культивирования фотоматериалы. В программе Cell-IQ Analyzer производили автоматический подсчет количества клеток в десяти полях зрения, по результатам анализа в программе строили график зависимости числа клеток в поле зрения от времени культивирования.

Определение индекса пролиферации в 2D культуре меланоцитов человека.

Через 72 часа культивирования и наблюдения на приборе клетки снимали с поверхности с помощью растворов версена и 0,25% трипсина и разводили в свежей порции питательной среды. 10 мкл суспензии клеток переносили в счетную камеру и помещали в автоматический счетчик клеток Countess (Invitrogen, США), с помощью которого определяли общее количество клеток в суспензии. Для снижения ошибки подсчета процедуру производили трижды. Индекс пролиферации культуры (ИП) вычисляли по формуле: $ИП = N_{72}/N_0$, где N_{72} – количество клеток через 72 часа культивирования, а N_0 – исходное число клеток.

Получение маточного и рабочего растворов фукоксантина. Порошок фукоксантина (Anhui, China) растворяли в питательной среде DMEM/F12 (Биолот, Россия) до концентрации 500 мкМ (маточный раствор), стерилизовали фильтрованием через фильтр (0,22 мкм, Millipore). Для исследования использовали рабочий раствор, который получали путем разведения маточного раствора фукоксантина до концентрации 250 мкМ, 50 мкМ и 5 мкМ в ростовой среде.

Исследование влияния фукоксантина на 2D культуру меланоцитов человека. Для оценки влияния фукоксантина меланоциты 3-го пассажа высевали на 12-луночные культуральные планшеты в плотности 10^4 кл/см². Для получения рабочего раствора фукоксантина маточный раствор (500 мкМ) разводили полной ростовой средой в 2, 10 и 100 раз. Клетки культивировали в присутствии препарата в течение 72 часов, прижизненное наблюдение проводили с помощью прибора Cell-IQ (CM Technologies, Финляндия) с фоторегистрацией каждые 20 минут. В качестве контроля использовали клетки, культивированные в полной ростовой среде без добавления фукоксантина.

Культивирование тканевых эквивалентов Меланодерм

Набор коммерческих тканевых эквивалентов, состоящий из 24 образцов, поступил в лабораторию в охлажденном виде (при +4°C). Полученные образцы помещали на специальных подставках (MEL-STND, MatTek Corporation) в лунки культуральных 6-луночных планшетов на разделе водной и воздушной фаз. Тканевые эквиваленты культивировали в ростовой среде, предоставленной компанией вместе с образцами (EPI-100-NMM-113, MatTek Corporation) в

стандартных условиях (37°C, 5% CO₂), замену среды производили ежедневно. Для изучения биологического эффекта фукоксантина к экспериментальным образцам добавляли разведенный в питательной среде препарат, к контрольным образцам добавляли эквивалентное количество питательной среды без препарата. Образцы для дальнейшего анализа фиксировали на 1, 3 и 7 сутки.

3D культивирование меланоцитов кожи человека

Суспензию меланоцитов 3-4 пассажа в концентрации $3,3 \times 10^6$ кл/мл в 150 мкл полной ростовой среды помещали на неадгезивные агарозные планшеты, которые предварительно получали из 0,2% раствора агарозы на смеси DMEM/F12 с использованием силиконовых форм 3D Petri Dishes (Microtissue™, США). Агарозные планшеты с суспензией клеток помещали в 12-луночные культуральные планшеты, добавляли к ним 2 мл полной ростовой среды с добавлением фукоксантина или без него. Динамику формирования сфероидов наблюдали методом прижизненной цейтраферной фазово-контрастной микроскопии в камере прибора Cell-IQ («CM Technologies», Финляндия). Фоторегистрацию проводили в автоматическом режиме каждые 20 минут. Полученные сфероиды фиксировали на 1, 3 и 7 сутки для дальнейшего анализа.

Анализ тканевых эквивалентов Меланодерм и сфероидов из меланоцитов человека

Фотометрический анализ концентрации меланина в тканевых эквивалентах Меланодерм и сфероидах из меланоцитов человека. Перед фотометрическим анализом образцы Меланодерм и сфероиды отмывали от остатков среды троекратной сменой фосфатно-солевого буфера (pH=7,4), после чего хранили при температуре -20°C. Для экстракции меланина образцы размораживали, высушивали и к каждому образцу добавляли 250 мкл раствора Solvable (6NE9100, PerkinElmer) для выделения пигмента, образцы инкубировали в течение 18 часов на водяной бане при +60°C. Далее образцы тщательно перемешивали на вортексе, осаждали нерастворенные частицы с помощью центрифугирования (5 мин, 13000 об/мин), супернатант разделяли по 100 мкл, вносили в 96-луночный планшет и анализировали оптическую плотность на планшетном фотометре Multiscan GO (Thermo Scientific, США). Калибровочную кривую получали при анализе стандартных растворов с известной концентрацией меланина, приготовленных из сухого вещества (M863, Sigma-Aldrich).

Фиксация образцов для гистологического и иммуноцитохимического анализа. Сфероиды для фиксации собирали в 15-мл пробирку и осаждали их путем центрифугирования (1 мин, 600 об/мин), сливали супернатант и трижды отмывали сфероиды раствором фосфатно-солевого буфера (pH=7,4) от остатков питательной среды. После этого к сфероидам добавляли 4%-ный раствор параформальдегида, и фиксировали образцы в течение 20 минут при +4°C.

Тканевые эквиваленты Меланодерм отмывали от остатков культуральной среды путем троекратной смены раствора фосфатно-солевого буфера (5мин, рН=7,4). Материал фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида (+4°C, 1сут).

Гистологический анализ тканевых эквивалентов Меланодерм. После фиксации образцы подвергали дегидратации в растворе для гистологической проводки Изопреп (06-002/S, Бювитрум) и заключали в парафин (01-007/1, Бювитрум). Далее на микротоме готовили серию срезов толщиной не более 9 мкм, срезы помещали на предметные стекла. Для удаления парафина, стекла проводили через три смены ксилола и затем по нисходящему ряду спиртов.

Препараты окрашивали гематоксилин-эозином для проведения общего морфологического анализа. Для этого стекла помещали в раствор гематоксилина (5 мин), дифференцировали под проточной водой в течение 10 мин. Далее стекла со срезами помещали в раствор эозина (1 мин), и после проводки окрашенных препаратов по восходящему ряду спиртов заключали их в монтирующую среду витрогель (12-001, Бювитрум).

Для выявления меланина срезы окрашивали по методу Фонтана-Массона. Для этого использовали готовый набор растворов (КТФМА, American MasterTech Scientific Incorporated), стекла инкубировали в растворе серебра в течение 30 мин в водяной бане при +60°C. Далее в течение 5 мин – в растворе хлорида золота, и в течение 2 мин – в растворе тиосульфата натрия. Ядра окрашивали ядерным красителем «быстрый красный». После окрашивания образцы накрывали покровными стеклами и заключали в монтирующую среду витрогель (12-001, Бювитрум).

Иммуноцитохимический анализ. Стекла со срезами предварительно проводили через три смены ксилола (по 5 мин) и затем по нисходящему ряду спиртов (по 1 мин) для удаления парафина, после проводили демаскирование антигенов в цитратном буфере (рН=6,0, 06-014, Бювитрум) в течение 3 мин при +100°C под давлением. Сфероиды окрашивали в пробирках типа эппендорф.

После предварительной обработки срезы и сфероиды инкубировали с растворами первичных антител, состоящих из фосфатно-солевого буфера, 1% бычьего сывороточного альбумина, 0,1% детергента Tween-20 и антител к следующим белкам: gr 100 (ab137078, Abcam, 1/250), Sox10 (ab155279, Abcam, 1/500) и MITF (ab122982, Abcam, 1/300). Инкубацию осуществляли в течение 18-24 часов при +4°C. После этого сфероиды и срезы отмывали от первичных антител в трех сменах PBS (по 5 мин).

Далее образцы инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромами FITC (E=525нм) и DyLight594 (E=617нм), в темноте при комнатной температуре в течение 2 часов и отмывали от вторичных антител в трех сменах PBS (по 5 мин). Ядра клеток окрашивали флуоресцентным

красителем бис-бензимида - Hoechst 33258 (0,002 мг/мл на PBS, 20 минут, 25°C). После окрашивания избыток красителя удаляли трехкратной сменой фосфатно-солевого буфера (pH=7,4). Полученные препараты заключали в монтирующую среду витрогель (12-001, Бiovитрум) и анализировали в видимом и ультрафиолетовом световых диапазонах с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Olympus Fluoview FV10 («Olympus», Япония).

Для каждого маркера в опытной и контрольной группах на 1, 3 и 7 сутки производили оценку интенсивности флуоресценции на трех полученных изображениях. Для этого изображения импортировали в программу ImageJ (NIH, США) и преобразовывали в 16-битный формат. Параметры «интегрированная интенсивность площади» и «среднее значение серого» измерялись в области, ограниченной настраиваемым порогом. Скорректированную общую флуоресценцию клеток (ОФК) рассчитывали по формуле: ОФК = интегральная плотность – (площадь выбранной области × средняя флуоресценция фоновых показаний).

Полимеразная цепная реакция в реальном времени. Для анализа экспрессии генов брали по 3 фрагмента тканевых эквивалентов Меланодерм и по 3 планшета со сфероидом (в каждом планшете по 256 сфероидов) на 1, 3 и 7 сутки культивирования в опытной и контрольной группах. Тотальную РНК выделяли, используя TRIreagent (Sigma, США), обрабатывали ее ДНКазой I типа (Fermentas, Германия), чтобы избавиться от контаминации ДНК, и осаждали в 4М растворе LiCl. Концентрацию выделенной РНК измеряли на спектрофотометре Nanodrop 8000 (Thermo Scientific, США). С использованием обратной транскриптазы М-MLV (Евроген, Россия) и рандомных гексануклеотидов (Силекс, Россия) проводили синтез кДНК. На полученных образцах анализировали экспрессию генов тирозиназы (TYR) рецептора 1 к меланокортину (MC1R). Последовательности использованных праймеров приведены в Таблице 1.

Таблица 1. Последовательности использованных в исследовании праймеров

Праймер	Последовательность праймера (5'-3')	Описание праймера
MC1R_For	GTGGTCTTCTTCCTGGCTATGC	MC1R
MC1R_Rev	GGATGGTGAGGGTGACAGCG	
TYR_For	TTCAAGAAGTTTATCCAGAAGCC	TYR
TYR_Rev	CTTAATGTAAGTCTTGAAAAGAGTC	
TBP_For	CATGACTCCCGGAATCCCTATCTTT	TBP
TBP_Rev	TGTTGCTGCTGCTGCCTTTGTT	

Анализ проводили на автоматическом амплификаторе 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) с использованием смеси qPCRMix-HSSYBR+ROX (Евроген, Россия). Расчет относительной экспрессии гена, нормированной по TBP (TATA-binding protein), выполняли методом $\Delta\Delta C_t$ с

учетом эффективности реакции, определенной методом построения стандартных кривых.

Статистический анализ данных

Анализ данных 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. При сравнении параметров, имевших ненормальное распределение, использовали критерий Крускала-Уоллиса.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика 2D культуры меланоцитов человека

Культура меланоцитов кожи человека на первых пассажах была представлена мелкими биполярными клетками, формирующими неплотный сетчатый монослой. Клетки активно секретировали темный пигмент меланин. На втором и третьем пассажах морфология клеток не отличалась, они сохраняли фенотип длинных биполярных клеток с характерным разветвлением дендритных отростков, в которых наблюдалась локализация пигмента (Рис. 1А, Б). На втором пассаже активно продуцирующие пигмент клетки группировались в островки со значительным накоплением пигмента (Рис. 1А), на третьем пассаже появления таких островков не наблюдали, что, вероятно, связано с постепенным снижением функциональной активности меланоцитов в монослойной культуре. На четвертом пассаже количество многоотростчатых клеток преобладало над количеством биполярных (Рис. 1В). Для дальнейшего исследования использовали монослойные культуры 3 и 4 пассажа с пониженной функциональной активностью.

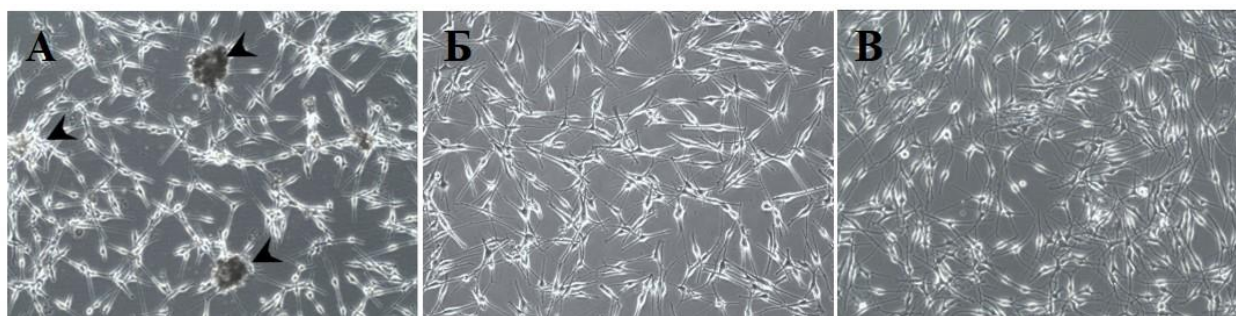


Рисунок 1. Морфология меланоцитов через 72 часа культивирования в монослое. А – 2 пассаж, Б – 3 пассаж. В – 4 пассаж. Стрелками отмечены скопления клеток и пигмента. *Фазово-контрастная микроскопия, увеличение $\times 10$*

Анализ количества клеток в поле зрения в приборе для цейтраферной микроскопии Cell-IQ и построение кривых роста клеток показали, что пролиферативная активность клеток 4-го пассажа по сравнению с третьим снижалась. Оценка количества клеток в поле зрения в результате обработки

нескольких изображений ($n=10$) для четырех временных точек показала, что итоговый прирост клеток на 3 пассаже относительно первых часов культивирования был выше, чем на 4 пассаже (Рис. 2А). Подсчет общего количества клеток 3 и 4 пассажей после 72-х часов культивирования в монослое после снятия их с культуральной поверхности и расчёт индекса пролиферации меланоцитов подтвердили достоверное значимое снижение пролиферативной активности клеток с ростом числа пассажей *in vitro* (Рис. 2Б).

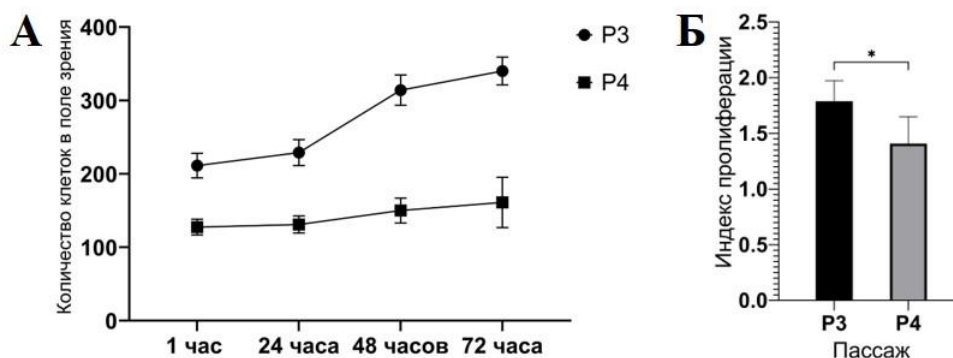


Рисунок 2. Анализ пролиферативной активности меланоцитов на 3 и 4 пассажах. А – кривые роста меланоцитов в монослойной культуре 3 и 4 пассажей (на основании данных световой фазово-контрастной прижизненной цейтраферной микроскопии), $n=10$; Б – индексы пролиферации меланоцитов в монослойной культуре 3 и 4 пассажа. $n=3$, * $p < 0.05$

Согласно данным литературы, меланоциты, как высокодифференцированные клетки, трудно культивировать длительное время *in vitro*. Их удается поддерживать не более 7-8 пассажей, после чего они достаточно быстро «стареют» и погибают (Tang et al., 2014). Полученные нами результаты сравнения культуральных характеристик клеток третьего и четвертого пассажей, показавшие достоверное снижение пролиферативной активности клеток, а также изменение их морфологии и снижение пигмент-продуктивной активности, вероятно, свидетельствует о постепенном процессе старения культуры меланоцитов. Для дальнейшего исследования использовали меланоциты 3 пассажа.

Влияние фукоксантина на культуру меланоцитов человека в 2D условиях *in vitro*

Анализ морфологии и пролиферативной активности 2D культуры меланоцитов 3 пассажа в присутствии фукоксантина. Меланоциты 3 пассажа высаживали в планшеты с плоским дном для культивирования в монослое в питательной среде с добавлением разных концентраций фукоксантина и помещали в камеру прибора Cell IQ. Изменение морфологии клеток и характера их роста фоторегистрировали в автоматическом режиме. Как показали результаты эксперимента, культивирование клеток в присутствии фукоксантина в низкой концентрации 5 мкМ не оказывало токсичного действия, не влияло существенно

на рост и жизнеспособность клеток *in vitro* (Рис. 3Б). Морфология клеток и характер формирования монослоя не отличались от контроля (Рис 3А, Б).

Значительного изменения морфологии клеток при добавлении препарата в концентрации 50 мкМ также не наблюдали. Однако активность роста клеток снижалась: темпы роста культуры замедлялись и плотность монослоя через 72 часа была ниже, чем в контроле или при добавлении фукоксантина в концентрации 5 мкМ (Рис. 3В). Добавление в питательную среду 250мкМ фукоксантина показало, что высокая концентрация препарата оказывает сильное токсическое действие. Клетки выбрасывали пигмент, прекращали рост и погибали (Рис. 3Г).

Анализ пролиферативной активности меланоцитов 3 пассажа (Рис. 3Д) показал, что увеличение числа меланоцитов происходило примерно с одинаковой скоростью в контроле и в присутствии препарата в низкой концентрации 5 мкМ. При этом наблюдали увеличение количества клеток к концу 3-х суток культивирования примерно в 2 раза. При добавлении фукоксантина в концентрации 50 мкМ скорость роста меланоцитов снижалась, прирост количества клеток составил около 50%. Индекс пролиферации клеток в этом случае достоверно отличался от контрольной группы. Полученные данные согласуются с данными литературы – антипролиферативный эффект фукоксантина в концентрации 20 μM и более показан и другими авторами (Mei et al., 2017; Takahashi et al., 2015)

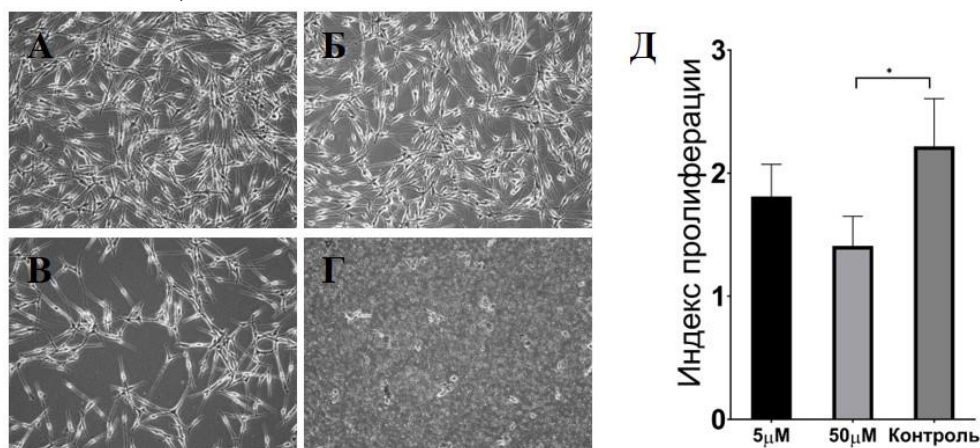


Рисунок 3. Морфология и характер роста 2D культуры меланоцитов 3 пассажа в монослойной культуре в присутствии фукоксантина, после 72 часов культивирования *in vitro*. А – контроль; Б – 5 μM фукоксантина; В – 50 μM фукоксантина; Г – 250 μM фукоксантина. Фазово-контрастная микроскопия, увеличение $\times 10$. Д – значения индексов пролиферации культуры меланоцитов на 3 пассаже в контроле и экспериментальных культурах с добавлением 5мкМ или 50мкМ фукоксантина. $n=5$, * $p<0,05$

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что добавление в питательную среду фукоксантина в концентрации 5мкМ не влияет значительно на скорость роста и морфологию клеток, в то время, как более высокие концентрации препарата (50 мкМ и более) снижают индекс

пролиферации и оказывают токсический эффект на пигмент-продуцирующие клетки кожи человека, приводя к их полной гибели. Полученные результаты подтверждают, что модель 2D культуры может быть использована для контроля эффективности действия препаратов, а фукоксантин оказывает антипролиферативный эффект на культуру меланоцитов.

Культура меланоцитов в составе тканевого эквивалента Меланодерм

Влияние фукоксантина на пигмент-продуцирующую активность меланоцитов в тканевых эквивалентах Меланодерм. Тканевые эквиваленты Меланодерм представляют собой искусственно созданные многослойные образцы ткани, состоящие из пористой мембраны, эпидермальных кератиноцитов и меланоцитов.

В данном исследовании визуальный анализ степени пигментации тканевого эквивалента показал, что на первые сутки Меланодерм выглядел светлым, выявлялись лишь незначительные островки легкого потемнения из-за начала продукции пигмента в меланоцитах при их культивировании в специальной питательной среде. В дальнейшем наблюдалось усиление пигмент-продуцирующей активности клеток, и к концу 7 суток тканевой эквивалент становился темнее, то есть в клетках эквивалента накапливался пигмент меланин (Рис. 4А).

При добавлении 5мкМ фукоксантина в питательную среду при культивировании эквивалентов визуально было отмечено их потемнение к 7 суткам по сравнению с началом культивирования, однако следует отметить, что пигментация была менее выраженной по сравнению с контрольными образцами (Рис. 4Б). Результаты визуального наблюдения были проверены с помощью спектрофотометрии. Данные по динамике накопления меланина в разные сроки в тканевых эквивалентах Меланодерм в присутствии фукоксантина (опыт) и без него (контроль) представлены на рисунке 4В. Как видно из гистограммы, в первые сутки культивирования интенсивность окрашивания опытного и контрольного образцов не различалась, и концентрация меланина составляла 3-4 мкг/мл.

При дальнейшем культивировании эквивалентов в присутствии фукоксантина уровень пигментации по данным спектрофотометрии оставался неизменным. В контрольных образцах наблюдали небольшой рост концентрации меланина, однако статистический анализ полученных данных не выявил достоверных различий ни в пределах каждой из исследуемой группы, ни при их сравнении (Рис. 4В).

Снижение продукции меланина клетками в тканевом эквиваленте Меланодерм позволяет полагать, что фукоксантин в невысоких и нетоксичных концентрациях тормозит их функциональную активность по продукции и накоплению пигмента меланина. Полученные данные могут свидетельствовать о

мягком ингибирующем воздействии фукоксантина на пигмент-продуцирующую активность меланоцитов в тканевом эквиваленте Меланодерм.

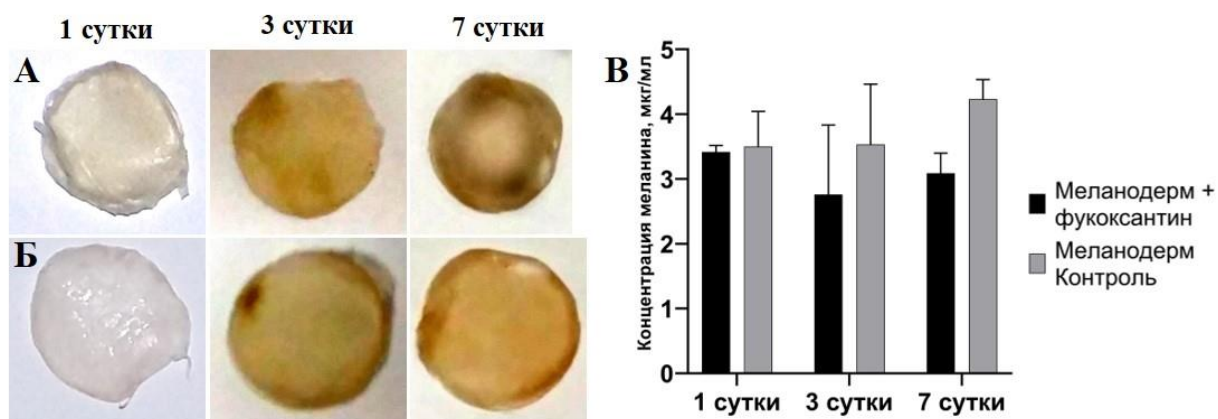


Рисунок 4. Анализ пигмент-продуцирующей активности меланоцитов в составе тканевых эквивалентов Меланодерм. А, Б – визуальный анализ накопления пигмента в тканевых эквивалентах Меланодерм в контрольной группе (А) и в группе с добавлением 5 мкМ фукоксантина (Б) на 1, 3 и 7 сутки культивирования. В – динамика накопления меланина в тканевых эквивалентах Меланодерм в присутствии 5 μМ фукоксантина (опыт) и без него (контроль). Спектрофотометрия, $n=3$

Гистологический анализ тканевых эквивалентов Меланодерм в опыте и контроле. Результаты гистологического анализа образцов Меланодерм показали, что происходит увеличение количества меланоцитов, располагающихся в базальном слое эквивалента. Однако следует отметить, что количество меланоцитов к 7 суткам культивирования в контроле было выше. В опытной группе количество меланоцитов не изменялось, однако происходило перераспределение клеток в пределах ткани. Так, если на 1 и 3 сутки меланоциты располагались в один ряд, то к 7 суткам наблюдали перераспределение и скопление пигмент-продуцирующих клеток в отдельно расположенные островки. Изменение характера роста клеток при культивировании и неравномерность их расположения, а также невозможность длительного культивирования без изменения функциональных характеристик свидетельствуют о недостатках данной модели.

Иммуноцитохимический анализ экспрессии ключевых факторов меланогенеза клетками тканевых эквивалентов Меланодерм в контрольной и опытной группах. Для оценки влияния препарата на продукцию ключевых факторов меланогенеза *gp100*, *MITF* и *Sox10*, был проведен иммуноцитохимический анализ срезов тканевых эквивалентов Меланодерм, культивированных в питательной среде с добавлением 5мкМ фукоксантина (опыт) и без него (контроль) (Рис. 5).

Результаты визуального анализа показали низкий уровень экспрессии меланоцитами фактора *gp100*, отвечающего за созревание меланосом, в первые 3 дня культивирования как в контроле, так и в опыте (при добавлении 5мкМ

фукоксантина). Однако на 7 сутки присутствие фактора gp100 было более выраженным в контрольных образцах по сравнению с опытной группой, что свидетельствует об ингибирующем влиянии препарата на процесс созревания меланосом.

MITF является главным молекулярным фактором индукции дифференцировки и функциональной активности меланоцитов, определяет их идентичность и тесно связан с их развитием (Watanabe et al., 2002), то есть является одним из ключевых регуляторов процессов меланогенеза. Именно продукция MITF увеличивается в ответ на воздействие разрушающего фактора УФ, который активирует УФ-чувствительные белки (Yamaguchi et al., 2007). Иммуноцитохимический анализ показал полное отсутствие экспрессии MITF в опытных образцах на 1 сутки культивирования, в то время, как в контрольных образцах была выявлена его активная экспрессия. После 3 и 7 суток культивирования наблюдали незначительное увеличение уровня экспрессии MITF в опытных образцах, культивированных с фукоксантином. Отсутствие MITF в опытной культуре в первые сутки и появление на третьи сутки позволяет предполагать, что при добавлении фукоксантина происходило торможение синтеза MITF, и процесс меланогенеза запускался с опозданием на 3 дня, т.е. начинался активно лишь на 3 и 7 сутки. В отличие от опыта, в контроле наблюдали более высокий уровень экспрессии транскрипционного фактора MITF на всех сроках наблюдения.

Из литературы известно, что образование бипотентных глиально-меланоцитарных клеток в значительной степени зависит от действия трех белков – Pax3, Sox10 и Wnt (Hou et al., 2008). Кроме того, Sox10 является одним из основных факторов транскрипции, участвующих в регуляции меланогенеза, поэтому его экспрессия может свидетельствовать о зрелости и функциональной активности меланоцитов (D’Orazio et al., 2013). Результаты нашего исследования показали, что фактор Sox10 на 1 сутки культивирования экспрессировался в контрольных образцах и в меньшей степени выявлялся в опытных. Такую же закономерность наблюдали на 3 и 7 сутки культивирования.

Для подтверждения достоверности разницы в экспрессии факторов gp100, MITF и Sox10 интенсивность флуоресценции на полученных изображениях анализировали в программе ImageJ. Проведенный анализ показал, что на 3 сутки достоверной была разница только в экспрессии Sox10, в то время как на 7 сутки в контрольной группе интенсивность флуоресценции Sox10 и MITF была достоверно выше, чем в опытной (Рис. 6).

Таким образом, результаты иммуноцитохимического анализа показали, что меланоциты в тканевом эквиваленте сохраняют функциональную активность по продукции пигмента, а ингибирующее действие фукоксантина на

функциональную или пигмент-продуцирующую активность меланоцитов опосредовано снижением экспрессии таких транскрипционных факторов меланогенеза, как MITF и Sox10.

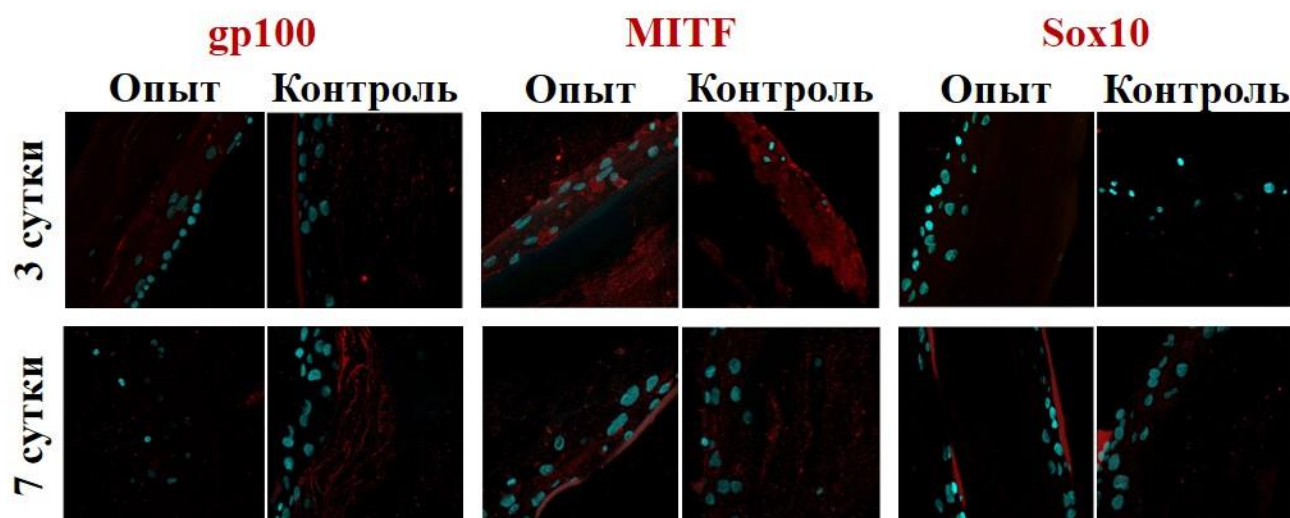


Рисунок 5. Экспрессия факторов gp100, MITF и Sox10 (красный) на срезах тканевых эквивалентов опытной и контрольной группы на 3 и 7 сутки культивирования. Иммуноцитохимическое окрашивание, ядра докрашены красителем Hoechst 33258 (синий). Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

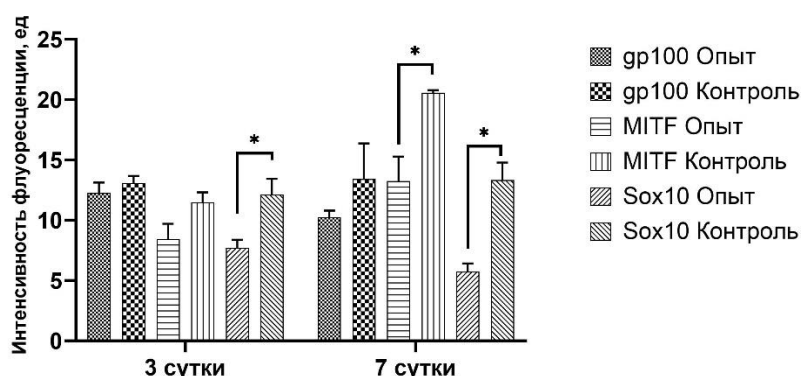


Рисунок 6. Количественная оценка флуоресценции на препаратах после иммуноцитохимического окрашивания срезов тканевых эквивалентов Меланодерм опытной и контрольной групп на 3 и 7 сутки культивирования. $n=3$, $*p<0.05$

Исследование экспрессии генов MC1R и TYR клетками в составе Меланодерма в контроле и в опыте с добавлением фукоксантина. В нашем исследовании, результаты которого представлены на рисунке 7, видно, что в контрольной группе уровень экспрессии двух ключевых генов меланогенеза MC1R и TYR ходе культивирования меланоцитов увеличивался к 7 дню, по сравнению с 1 сутками. В контроле экспрессия гена MC1 повышалась почти в 20 раз к концу культивирования, в опытной культуре активность гена оставалась практически неизменной (Рис. 7А). Экспрессия гена TYR в контрольной группе усиливалась при увеличении сроков культивирования, в то время как в опытной группе при культивировании в присутствии фукоксантина повышения уровня экспрессии не

наблюдали, однако достоверной разницы между контрольной и опытной группами не выявлено (Рис. 7Б).

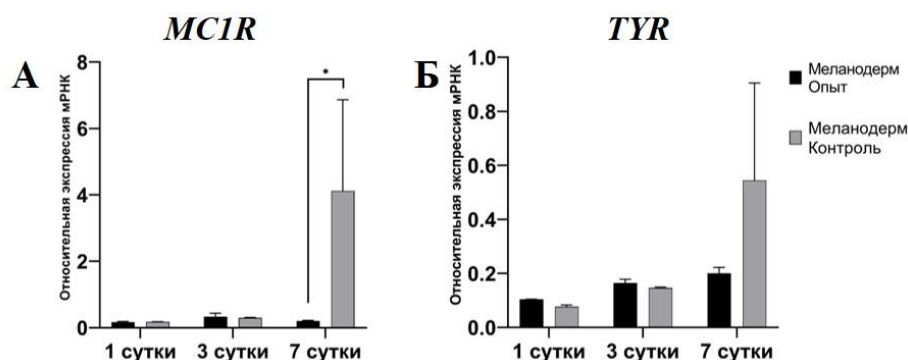


Рисунок 7. Экспрессия генов *MC1R* (А) и *TYR* (Б) в тканевых эквивалентах Меланодерм в опытной группе с добавлением 5μМ фукоксантина и в контрольной группе. Метод ПЦР в реальном времени, $n=3$, $*p<0,05$

Известно, что одним из ключевых уровней активации и регуляции меланогенеза в клетке является связывание меланоцит-стимулирующего гормона с рецептором меланокортина-1 (*MC1R*) на мембране меланоцитов, который через цАМФ запускает транскрипцию гена *MITF*, который, как транскрипционный фактор, активирует экспрессию генов ключевого фермента меланогенеза – тирозиназы *TYR*, белка премеланосом *Pmel 17 (gp100)* и антиапоптотического фактора *Bcl-2*, что стимулирует синтез меланина на отдельных участках кожи (Lin et al., 2007). Полученные результаты об отсутствии роста активности генов *MC1R* и *TYR* в процессе культивирования опытной группы тканевых эквивалентов позволяют предположить, что фукоксантин влияет на процесс меланогенеза в первую очередь на уровне ключевых факторов транскрипции, в результате чего в дальнейшем подавляется транскрипция и синтез белков *MC1R* и *TYR* и, таким образом, снижает пигмент продуцирующую активность меланоцитов. Кроме того, данные экспериментального исследования свидетельствуют о том, что пигмент-продуцирующая активность меланоцитов в составе тканевого эквивалента сохраняется, а подавление экспрессии генов *TYR* и *MC1R* при добавлении фукоксантина подтверждает, что Меланодерм можно использовать в качестве модели для исследования разных факторов или препаратов, влияющих на меланогенез, но только в ограниченных по времени экспериментах.

3D культура меланоцитов в сфероиде

Формирование сфероидов из меланоцитов кожи человека в 3D культуре и исследование динамики меланогенеза. В процессе культивирования меланоцитов в неадгезивных 3D условиях уже в первые сутки культивирования наблюдались агрегация клеток и дальнейшая их компактизация в течение 7 суток. При этом визуальная оценка показала, что в сфероиде контрольной группы (в ростовой

среде без добавления препарата) происходило немного более выраженное накопление меланина в центральной зоне сфероидов (Рис. 8).

Данные спектрофотометрии подтвердили визуальную оценку динамики синтеза меланина в контрольных и опытных сфероидах. В 1 сутки 3D культивирования средняя концентрация меланина была одинаковой в обеих группах, однако при дальнейшем 3D культивировании (3 и 7 сутки) уровень синтеза меланина в опытных сфероидах был достоверно ниже, чем в контрольной группе (Рис. 8).

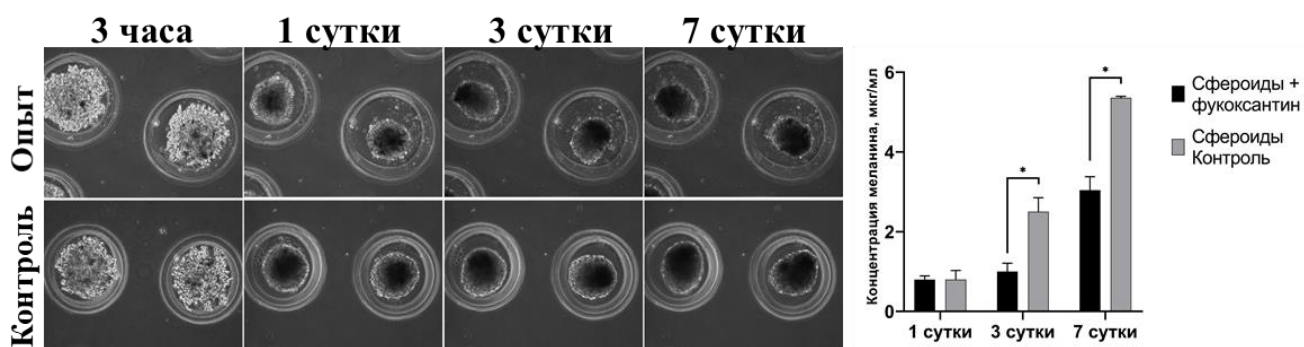


Рисунок 8. Динамика формирования сфероидов из суспензии меланоцитов в неадгезивных 3D условиях в стандартной ростовой среде (контроль) и в среде с добавлением фукоксантина в концентрации 5мкМ (опыт). Фазово-контрастная прижизненная цейтраферная микроскопия (Cell-IQ, SM Technologies, Финляндия). Динамика накопления меланина в сфероидах из меланоцитов в присутствии 5мкМ фукоксантина (опыт) и без него (контроль). Спектрофотометрия, $n=3$, $*p<0,05$

Полученные данные позволяют предположить, что компактизация меланоцитов в процессе формирования сфероидов способствует сохранению пигмент-продуцирующей активности клеток и, как следствие, накоплению меланина. Добавление же препарата фукоксантин в невысокой (нетоксичной) дозе не влияет на процесс компактизации клеток, на их жизнеспособность, однако достоверно подавляет в них процесс синтеза меланина.

Иммуноцитохимический анализ сфероидов из меланоцитов контрольной и опытной групп. При визуальном анализе экспрессии транскрипционных факторов меланогенеза, было установлено, что в контрольной группе экспрессия grp100, MITF и Sox10 постепенно увеличивалась, достигая максимума к 7 суткам культивирования. В опытных сфероидов под воздействием фукоксантина экспрессия этих факторов на протяжении всего периода культивирования выявлялась на более низком уровне (Рис. 9). Однако разница в экспрессии Sox10 была менее выражена.

Количественный анализ экспрессии ключевых факторов меланогенеза по интенсивности флуоресценции показал, что достоверная разница между опытом и контролем была выявлена для всех трех факторов только на 7 сутки культивирования (Рис. 10).

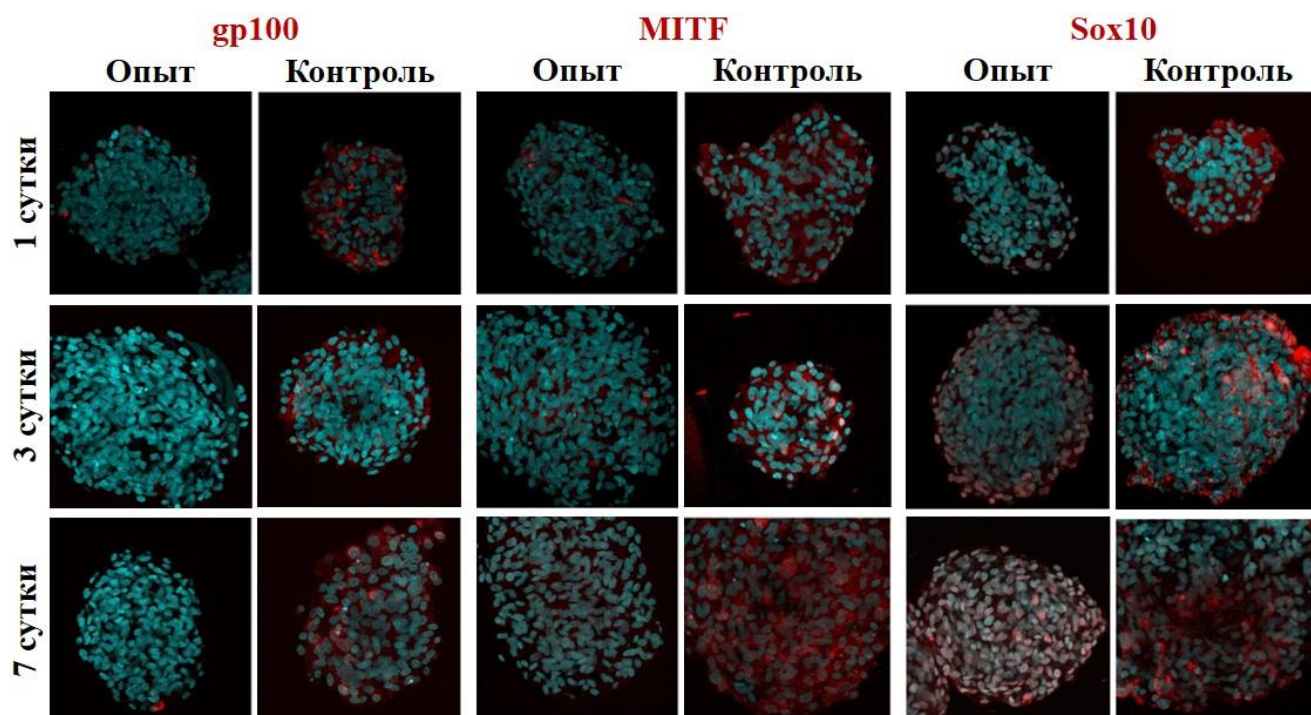


Рисунок 9. Экспрессия факторов gp100, MITF и Sox10 (красный) в сфероиды из меланоцитов человека опытной и контрольной группы на 1, 3 и 7 сутки культивирования. Иммуноцитохимическое окрашивание, ядра докрашены красителем Hoechst 33258 (синий). Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

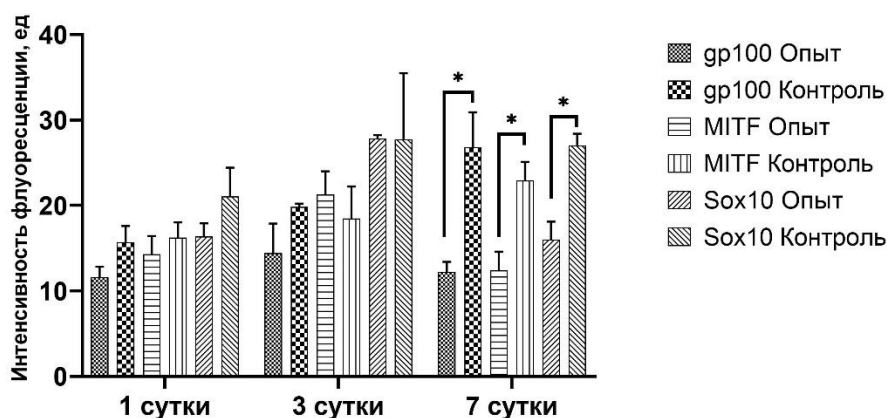


Рисунок 10. Количественная оценка флуоресценции после иммуноцитохимического окрашивания сфероидов из меланоцитов человека опытной и контрольной групп на 1, 3 и 7 сутки культивирования. $n=3$, * $p<0.05$

Анализируя полученные данные, следует отметить, что иммуноцитохимический анализ подтвердил высокую функциональную активность клеток контрольной группы по экспрессии специфических маркеров меланоцитов: gp100, MITF и Sox10 в течение всего времени культивирования. Однако, в отличие от данных, полученных на модели культивирования меланоцитов в составе тканевого эквивалента Меланодерм, при культивировании клеток в виде сфероидов в присутствии фукоксантина (опыт) наблюдалось достоверное снижение экспрессии всех трех транскрипционных факторов меланогенеза: gp100, MITF и Sox10. Более того, на 3D культуре меланоцитов (сфероиды) впервые

показано, что фукоксантин может ингибировать созревание меланосом, значительно снижая синтез белка gp100. Белок gp100 рассматривается, как белок промеланосом и увеличение его экспрессии приводит к повышенному синтезу меланина в отдельных областях кожи. Согласно полученным нами данным снижение уровня экспрессии gp100 может свидетельствовать, в том числе, и о влиянии препарата фукоксантина даже в низкой концентрации не только на функциональную активность, но и снижение готовности к меланогенезу и формированию зрелых меланосом, что согласуется с ранее описанными данными по снижению продукции меланина в опытных образцах сфероидов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что 3D культура меланоцитов в виде сфероидов показала себя как более чувствительная модель, при которой сохраняется функциональная активность меланоцитов в процессе культивирования, клетки высокочувствительны и адекватно реагируют на добавление ингибирующего фактора.

Исследование экспрессии генов *MC1R* и *TYR* меланоцитами человека в контрольных и опытных сфероидов. Результаты исследования экспрессии генов *MC1R* и *TYR* в клетках опытной и контрольной групп представлены на рисунке 11. Экспрессия гена *MC1R* в клетках контрольной и опытной культуры достоверно не отличалась на всех сроках культивирования (Рис.11А), в отличие от результатов, полученных на тканевом эквиваленте Меланодерм, где наблюдалось значительное снижение уровня экспрессии гена *MC1R* при добавлении фукоксантина.

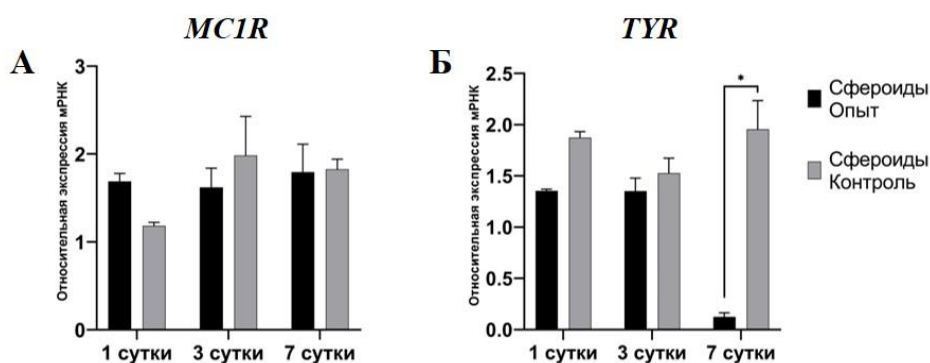


Рисунок 11. Экспрессия генов *MC1R* (А) и *TYR* (Б) в сфероидов из меланоцитов в опытной группе с добавлением 5μМ фукоксантина и в контрольной группе. Метод ПЦР в реальном времени, $n=3$, $*p<0,05$

Иную картину наблюдали при контроле активности гена тирозиназы (*TYR*) в меланоцитах, культивируемых в сфероидов (Рис. 11Б). Его активность под влиянием фукоксантина значительно и статистически значимо снижалась к 7 суткам культивирования ($*p<0,05$). Имело место значительное подавление экспрессии гена *TYR* в опыте на 7 сутки, тогда как в контроле она сохранялась примерно на одном уровне в течение всего срока 3D культивирования. Полученные данные еще раз подтверждают высокую биологическую активность

действия препарата на клетки, влияя на меланогенез в том числе и на генном уровне, подавляя экспрессию гена тирозиназы – ключевого фермента в процессе меланогенеза. При этом максимальный эффект воздействия препарата достигается к 7 дню культивирования *in vitro*, что свидетельствует о накопительном эффекте.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пигментация – одно из самых малопонятных заболеваний кожи, сложных в лечении и получении хорошего результата. Необходимо глубокое понимание процессов, происходящих на клеточном и молекулярном уровне. Сравнительный анализ меланоцитов, культивированных в монослое разное число пассажей, показал значительные изменения морфологических характеристик, пролиферативной активности клеток и признаки снижения продукции пигмента, что может свидетельствовать о процессах старения клеток в монослойной культуре.

Для более полного изучения и понимания патологических и репарационных процессов на клеточном уровне часто применяют факторы, ингибирующие или индуцирующие данные процессы. В качестве такого активного вещества мы использовали каротиноид фукоксантин, который считается одним из многообещающих протекторов кожи, способным оказывать защитное действие при разных патологиях кожи (Peng et al., 2011). В литературе мало данных по влиянию фукоксантина на меланогенез, в основном полученных на монослойных культурах меланоцитов. В то же время показано, что каротиноиды и производные ретиноевой кислоты могут быть использованы в качестве солнцезащитных и отбеливающих средств. Японскими исследователями установлено, что у мышей после воздействия УФ фукоксантин подавляет активность тирозиназы и снижает экспрессию мРНК *MC1R* и тирозиназа-зависимого рецептора 1, а также оказывает противовоспалительное воздействие – снижает экспрессию мРНК циклооксигеназы 2 (COX-2) и рецептора к простагландину 1 (EP1) (Shimoda et al., 2010).

Результаты исследования по монослойному культивированию клеток в присутствии фукоксантина показали, что препарат, однако, в высоких концентрациях цитотоксичен – тормозит пролиферацию (50мкМ) и даже вызывает гибель клеток (250мкМ). При использовании низкой концентрации фукоксантина (5мкМ) пролиферация клеток достоверно не отличалась от контрольной группы.

В отличие от монослойного культивирования клеток, как правило, сопряженного с изменением морфологии и потерей тканеспецифичных маркеров, при 3D культивировании клеток в виде тканевых эквивалентов или сфероидов происходит восстановление межклеточных контактов, а также формирование специфического микроокружения, что способствует восстановлению их фенотипа и функциональной активности. Сравнительное исследование на двух видах

трехмерных культур, содержащих меланоциты человека – тканевом эквиваленте Меланодерм и сфероидов из меланоцитов позволило получить уникальные данные как на клеточном, так и на молекулярном уровне и проанализировать экспрессию ключевых факторов меланогенеза. В сфероидов контрольной группы наблюдали поддержание на высоком уровне экспрессии специфических генов *TYR* и *MC1R*, а также синтеза белков, участвующих в меланогенезе — *gp100*, *MITF* и *Sox10*. Эти данные доказывают, что меланоциты *in vitro* способны формировать длительно живущие, жизнеспособные 3D структуры — сфероиды, с сохранением фенотипа и синтеза тканеспецифичных маркеров, подтверждающих их высокую функциональную активность. При этом в тканевом эквиваленте Меланодерм общий уровень экспрессии исследуемых маркеров был ниже, чем в сфероидов. Это, по всей видимости, связано с тем, что сфероиды состоят только из исследуемого типа клеток — меланоцитов, в то время как в составе тканевого эквивалента содержатся, как минимум, два типа клеток. Кроме того, клеточные сфероиды характеризовались более высокой и длительной жизнеспособностью. Это делает сфероиды более доступной и функциональной моделью, которую можно успешно использовать как тест-систему для оценки эффективности препаратов, направленных на регуляцию уровня пигментации кожи.

Так, было показано, что ингибирующее влияние фукоксантина на процесс меланогенеза связано со снижением активности гена основного фермента, обеспечивающего синтез меланина, – тирозиназы в сфероидов и *MC1R* в тканевых эквивалентах. А подавление синтеза тирозиназы, по-видимому, происходило в результате ингибирования транскрипционного фактора *MITF*. Кроме того, на модели сфероидов из меланоцитов было впервые показано, что фукоксантин способен подавлять экспрессию фактора регуляции созревания меланосом *gp100*. При этом максимальное воздействие препарата достигалось к 7 дню культивирования *in vitro*, что свидетельствует о накопительном эффекте.

Полученные результаты подтверждают избирательность действия фукоксантина, что имеет большое научное и практическое значение. Использование модели культуры клеток для контроля эффективности разных препаратов поможет в исследовании ключевых факторов, участвующих в процессе меланогенеза, а также механизмов изменения функциональной активности меланоцитов кожи человека и позволит получить новые данные о патогенезе нарушений пигментации. Кроме того, даст возможность разработать и протестировать новые высокоэффективные препараты для профилактики и лечения кожных заболеваний, в том числе рака кожи.

ВЫВОДЫ

1. 3D культура меланоцитов человека в виде сфероидов позволяет сохранять и поддерживать исходный фенотип и функциональную активность клеток в течение длительного времени культивирования.
2. Пигмент-продуцирующая активность меланоцитов наблюдается при культивировании их в составе тканевых эквивалентов и сфероидов, в отличие от 2D культуры. Однако при сравнительном исследовании более выраженный рост продукции меланина и достоверный ингибирующий эффект фукоксантина на пигмент-продуцирующую активность меланоцитов отмечается только в сфероидах.
3. Меланоциты в составе тканевых эквивалентов Меланодерм и в сфероидах продуцируют ключевые транскрипционные факторы меланогенеза *grp100*, *MITF* и *Sox10*. Сравнительный анализ продукции этих факторов при добавлении фукоксантина показал достоверное снижение синтеза *MITF* и *Sox10* в исследуемых системах. Однако, только на сфероидах впервые показано, что фукоксантин способен подавлять экспрессию фактора регуляции созревания меланосом *grp100*.
4. Экспрессия специфических генов меланогенеза *MC1R* и *TYR*, наблюдаемая в контрольных группах, изменялась под воздействием фукоксантина. Снижение уровня экспрессии *MC1R* в меланоцитах в составе тканевых эквивалентов и ингибирующий эффект фукоксантина на экспрессию тирозиназы в сфероидах свидетельствуют о регуляции процесса меланогенеза как на уровне синтеза ключевых белков, так и на генном уровне.
5. Различия в ингибирующем эффекте фукоксантина, выявленные при разных условиях культивирования меланоцитов человека, свидетельствуют о разной чувствительности использованных клеточных систем и подтверждают преимущества сфероидов как модели *in vitro*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Сабурина И.Н., Джусоева Е.В., Горкун А.А., Зурина И.М., Кошелева Н.В., Колокольцова Т.Д., Скуратовская Л.Н., Репин В.С. 3D культура меланоцитов как тест-система и клеточная модель для изучения патологии меланогенеза // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2018. – Т.62. – № 4. – С. 236-229.
2. Джусоева Е.В., Колокольцова Т.Д., Сабурина И.Н. Меланоциты кожи человека: их роль в норме и патологии // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2019. – Т. 63. – № 3. – С. 110-117.
3. Джусоева Е.В., Горкун А.А., Зурина И.М., Кошелева Н.В., Колокольцова Т.Д., Сабурина И.Н. Влияние фукоксантина на пролиферативную активность

культуры меланоцитов человека // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2020. – № 2. – С. 139-142.

4. Irina M. Zurina, Anastasiya A. Gorkun, Ekaterina V. Dzhussoeva, Tamara D. Kolokoltsova, Dmitriy D. Markov, Nastasia V. Kosheleva, Sergey G. Morozov, Irina N. Saburina. Human melanocyte-derived spheroids: a precise test system for drug screening and a cellular module for tissue engineering // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2020. — V. 8. – Article 540. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00540

5. Джусоева Е.В., Колокольцова Т.Д., Устинова Е.Е., Сабурина И.Н. Исследование функциональной активности меланоцитов, выращенных в микрокани, под воздействием фукоксантина. // Информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. Материалы Международной конференции NT + M&Ec`2019. Весенняя сессия. – С. 108-111.

6. Зурина И.М., Горкун А.А., Джусоева Е.В., Кошелева Н.В., Колокольцова Т. Д., Сабурина И.Н.. Перспектива использования сфероидов из меланоцитов в качестве тест-системы *in vitro* // Гены и Клетки. – 2019. – Т. XIV. Приложение «Сборник материалов IV Национального конгресса по регенеративной медицине. Москва, 20–23 Ноября 2019 г.». – С. 100.

7. E.V. Dzhussoeva, I.N. Saburina, A.A. Gorkun, I.M. Zurina, N.V. Kosheleva, T.D. Kolokoltsova, S.G. Morozov. Spheroids from human melanocytes as a test-system for drug screening and as a cellular module for tissue engineering // Сборник материалов TERMIS European Chapter Meeting – 2019. – P. 1504.

8. Джусоева Е.В., Зурина И.М. Влияние фукоксантина на функциональную активность меланоцитов *in vitro* // Материалы Международного молодежного форума «Ломоносов 2019». Секция «Клеточная биология и гистология». – М: МАКС Пресс, 2019. – электронный оптический диск [Электронный ресурс].

9. Сабурина И.Н., Горкун А.А., Колокольцова Т.Д., Кошелева Н.В., Зурина И.М., Джусоева Е.В. «Тест-система и способ ее получения» Патент RU 2 706 071 Бюл. № 32 от 13 ноября 2019. (Приоритет от 24 августа 2018 года.)

Список сокращений

2D – двумерный (two-dimensional); **3D** – трехмерный (three-dimensional); **MC1R** – рецептор меланокортина-1; **MITF** – микрофталма транскрипционный фактор; **Sox10** – фактор транскрипции (sex-determining region Y (SRY)-box 10); **TYR** – тирозиназа; **ДНК** – дезоксирибонуклеиновая кислота; **иПСК** – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; **МСГ** – меланоцит-стимулирующий гормон; **УФ** – ультрафиолет.

The study of functional activity of melanocytes cultured in vitro under 2D and 3D conditions

Pigmentation is the result of melanin synthesis, which takes place in melanocytes, and its further distribution. A dysregulation in melanocytes' functionality can result in the loss of pigmentation, the appearance of pigment spots and melanoma development. Tissue engineering and the screening of new skin-lightening drugs require the development of simple and reproducible in vitro models with maintained functional activity. The aim of the study was to obtain and characterize spheroids from normal human melanocytes as a three-dimensional multicellular structure and as a test system for skin-lightening drug screening. Melanocytes are known to lose their ability to synthesize melanin in monolayer culture. When transferred under non-adhesive conditions in agarose multi-well plates, melanocytes aggregated and formed spheroids. As a result, the amount of melanin elevated almost two times within seven days. MelanoDerm™ (MatTek) skin equivalents were used as a comparison system. Cells in spheroids expressed transcription factors that regulate melanogenesis: MITF and Sox10, the marker of developed melanosomes—gp100, as well as tyrosinase (TYR)—the melanogenesis enzyme and melanocortin receptor 1 (MC1R)—the main receptor regulating melanin synthesis. Expression was maintained during 3D culturing. Thus, it can be stated that spheroids maintain melanocytes' functional activity compared to that in the multi-layered MelanoDerm™ skin equivalents. Culturing both spheroids and MelanoDerm™ for seven days in the presence of the skin-lightening agent fucoxanthin resulted in a more significant lowering of melanin levels in spheroids. Significant down-regulation of gp100, MITF, and Sox10 transcription factors, as well as 10-fold down-regulation of TYR expression, was observed in spheroids by day 7 in the presence of fucoxanthin, thus inhibiting the maturation of melanosomes and the synthesis of melanin. MelanoDerm™ samples were characterized by significant down-regulation of only MITF, Sox10 indicating that spheroids formed a more sensitive system allowed for quantitative assays. Collectively, these data illustrate that normal melanocytes can assemble themselves into spheroids—the viable structures that are able to accumulate melanin and maintain the initial functional activity of melanocytes. These spheroids can be used as a more affordable and easy-to-use test system than commercial skin equivalents for drug screening.