

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

На правах рукописи

ДЖУССОЕВА ЕКАТЕРИНА ВИТАЛЬЕВНА

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

14.03.03 – патологическая физиология

Диссертация

На соискание ученой степени кандидата медицинских наук

**Научный руководитель –
доктор биологических наук Т.Д. Колокольцова**

Москва – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ	5
Актуальность темы	5
Степень разработанности темы исследования.....	8
Цель исследования	9
Задачи исследования.....	9
Научная новизна работы	9
Теоретическая и практическая значимость	10
Основные положения, выносимые на защиту.....	11
Степень достоверности и апробация результатов	12
Структура и объем диссертации	12
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Меланоциты: их роль, морфология и локализация в организме	14
1.2. Источники клеток-предшественников в эмбриогенезе и взрослом организме	18
1.3. Меланогенез	23
1.4. Проблема нарушения пигментации кожи.....	28
1.5. Старение и патологические изменения пигментации кожи.....	30
1.6. Культура клеток как модель для исследования.....	33
1.7. Сравнение 2D и 3D культур клеток.....	39
1.8. Поиск природных соединений, влияющих на пигментацию кожи в норме и патологии	42
1.9. Заключение к обзору литературы	44
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	46

2.1. Культивирование меланоцитов кожи человека в монослое (2D культура)	46
2.2. Культивирование тканевых эквивалентов Меланодерм	46
2.3. Получение маточного и рабочего растворов фукоксантина	47
2.4. Исследование влияния фукоксантина на 2D культуру меланоцитов человека	47
2.5 Морфологический анализ культуры меланоцитов	47
2.6. Контроль пролиферативной активности меланоцитов человека в 2D культуре	48
2.7. Определение индекса пролиферации в 2D культуре меланоцитов человека	48
2.8. 3D культивирование меланоцитов кожи человека	48
2.9. Фиксация тканевых эквивалентов Меланодерм и сфероидов из меланоцитов человека для гистологического и иммуноцитохимического анализа	49
2.10. Гистологический анализ тканевых эквивалентов Меланодерм	49
2.11 Иммуноцитохимический анализ	50
2.12. Фотометрический анализ концентрации меланина в тканевых эквивалентах Меланодерм и сфероидах из меланоцитов человека	51
2.13. Полимеразная цепная реакция в реальном времени	52
2.14. Статистический анализ данных	53
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	54
3.1. 2D культура меланоцитов	54
3.1.1. Характеристики 2D культуры меланоцитов на 3 и 4 пассажах <i>in vitro</i>	54
3.1.2. Влияние фукоксантина на культуру меланоцитов человека в 2D условиях <i>in vitro</i>	58
3.2. Культура меланоцитов в тканевом эквиваленте Меланодерм	62

3.2.1. Влияние фукоксантина на пигмент-продуцирующую активность меланоцитов в тканевых эквивалентах Меланодерм	62
3.2.2. Гистологический анализ тканевых эквивалентов Меланодерм в опыте и контроле	65
3.2.3. Иммуноцитохимический анализ экспрессии ключевых факторов меланогенеза клетками тканевых эквивалентов Меланодерм в контрольной и опытной группах	66
3.2.4. Исследование экспрессии генов MC1R и TYR клетками Меланодерма в контроле и опыте с добавлением фукоксантина.....	74
3.3. 3D культура меланоцитов в сфероидах	77
3.3.1. Формирование сфероидов из меланоцитов кожи человека в 3D культуре и исследование динамики накопления в них меланина в контроле или в присутствии препарата	77
3.3.2. Иммуноцитохимический анализ сфероидов из меланоцитов контрольной и опытной групп	79
3.3.3. Исследование экспрессии генов MC1R и TYR в контрольных и опытных сфероидах из меланоцитов человека	86
3.4. Сравнительный анализ данных, полученных на моделях тканевого эквивалента Меланодерм и сфероидов из меланоцитов человека.....	89
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	93
ВЫВОДЫ	96
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	97
СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	99

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Кожный покров человека представляет собой сложную, многоуровневую, взаимосвязанную систему. Кожа является жизненно важным органом, который, главным образом, создает физический барьер, защищающий внутренние органы от патогенов, обезвоживания и агрессивного влияния окружающей среды.

Кожа является самым крупным органом тела, который постоянно находится под воздействием внешних и внутренних факторов, на которые она может реагировать изменениями в пигментации. Среди этих факторов основными являются влияние ультрафиолета (УФ), некоторых лекарственных препаратов и химических соединений, а также изменения в эндокринной системе, которые могут стимулировать временные (при беременности) или постоянные (при старении организма) изменения цвета кожи. Защита от стресса, вызванного воздействием УФ, зависит от нормальной пигментации кожи, обусловленной синтезом меланина, фотозащитного пигмента, вырабатываемого в специализированных клетках – меланоцитах и переносом его из меланоцитов в кератиноциты с помощью меланосом.

Меланоциты – это высокодифференцированные, долгоживущие клетки с длительным клеточным циклом, локализованные в нижнем слое эпидермиса. Пигментация кожи зависит от большого количества факторов: миграции предшественников меланоцитов – меланобластов в ткани в период эмбриогенеза, поддержания их жизнеспособности и дифференцировки в меланоциты, распределения меланоцитов в коже, созревания меланосом, их миграции в дендритные отростки меланоцитов и дальнейшей транспортировки в кератиноциты, и, как результат, от распределения меланина в коже [114, 124].

Меланоциты синтезируют два типа меланина: эумеланин (черно-коричневый) и феомеланин (желто-красный), которые отвечают за цвет глаз, кожи и волос. Меланин накапливается в специализированных органеллах меланосомах, которые через дендритные отростки меланоцитов передаются в кератиноциты

эпидермиса, где выполняют защитную функцию от воздействия УФ. Синтез меланина и его транспорт в эпителиальные клетки регулируются меланоцит-стимулирующим гормоном (МСГ) и аденокортикотропным гормоном (АКТГ), а также действием солнечных лучей.

Пигментация кожи является результатом взаимодействия разных типов клеток, главным образом, меланоцитов и соседних клеток – кератиноцитов и фибробластов [17, 59, 110]. Нарушение их взаимодействия может привести к изменению цвета кожи (потере пигментации или формированию пигментных пятен) и появлению опухолей. УФ является основным повреждающим фактором, под воздействием которого активируются УФ-чувствительные белки [103, 117] и усиливается экспрессия транскрипционного фактора регуляции пигментации [124], что стимулирует синтез меланина в отдельных участках кожи. Более того, в ответ на УФ воздействие меланоциты выбрасывают внеклеточные везикулы, содержащие факторы, регулирующие рост и пролиферацию кератиноцитов в коже человека [117].

Встречается и генетическая предрасположенность к нарушению меланогенеза, обусловленная присутствием гена рецептора меланокортина-1 (*MC1R*). Пигментация может быть вызвана 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.

Возрастные изменения также являются причиной нарушения общего состояния и пигментации кожи. С возрастом под воздействием многих факторов меняется распределение меланоцитов – они группируются, что приводит к появлению пигментных пятен. Нарушения гормонального фона, которые проявляются с возрастом, приводят к уменьшению количества меланоцитов. УФ излучение, проникая через кожу и повреждая ДНК меланоцитов, стимулирует группировку меланоцитов, а также синтез ими кожного пигмента. 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.

При некоторых видах пигментации (обычно у людей в возрасте после 40 лет) меланоциты в пораженных зонах приобретают признаки клеточного старения. В клетках происходят изменения, проявляющиеся в выработке большего или меньшего количества меланосом, что приводит к нарушениям передачи пигмента кератиноцитам. Процессы старения, обусловленные генетическими и эпигенетическими механизмами, характеризуются широкой вариабельностью из-за многообразия плейотропных генов.

Основным проявлением антагонистической плейотропии является то, что один и тот же ген может оказывать противоположные эффекты у молодых и пожилых людей. Кроме того, при старении наблюдается нарушение гормональной регуляции, на клеточном уровне могут происходить изменения в сигнальных и метаболических путях, что обусловлено нарушением работы генов, а также укорочение теломер. Старение запускается индивидуальными генетически запрограммированными «биологическими часами», которые тоже могут подвергаться влиянию внешних факторов [13]. Главную роль в их работе отводят белку p53, регулирующему клеточный цикл, и белку, взаимодействующему с циклин-зависимой киназой (CIP1) [13].

Сложность процесса пигментообразования и множество факторов, влияющих на меланогенез, а также многие пробелы в понимании патогенеза и нарушения пигментации кожи подчеркивают необходимость проведения исследований процесса функционирования меланоцитов, создания моделей для исследования и испытания лекарственных и профилактических препаратов, позволяющих корректировать или предупреждать нарушения пигментации кожи.

Для устранения последствий усиленного или нарушенного синтеза меланина разрабатываются различные препараты. Одним из многообещающих протекторов кожи является фукоксантин, который относится к семейству каротиноидов, выделяемых из морских бурых водорослей. Было показано, что

фукоксантин или препараты, его содержащие, могут оказывать защитное действие при разных патологиях кожи [88].

В литературе мало данных по влиянию фукоксантина на меланогенез. 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) [102].

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.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время для исследования *in vitro* эффективности препаратов, влияющих на пигментацию, используют монослойные первичные культуры меланоцитов и кератиноцитов [72] или индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) [43], а также коммерческие тканевые эквиваленты, содержащие нормальные меланоциты (например, MelanoDerm) [29] или полученные из иПСК [43]. Использование для исследований тканевых эквивалентов имеет ряд недостатков. Это прежде всего их высокая цена, 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 (гипер- или

гипопигментации), связанных с изменением функциональной активности меланоцитов, требуются новые высокочувствительные, но при этом недорогие, простые для манипулирования и соответствующие нормам биоэтики модели для биоаналитического и доклинического анализа.

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 сфероидных

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 сфероидах 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 сфероидах. При этом максимальное воздействие препарата достигается к 7 дню культивирования *in vitro*, что может свидетельствовать о накопительном эффекте. При этом на модели сфероидов из меланоцитов впервые было показано, что фукоксантин способен подавлять экспрессию фактора регуляции созревания меланосом *gp100*.

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

Теоретическая и практическая значимость

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 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 (*MCR1*) 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.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность выводов и положений, выносимых на защиту, обеспечена применением комплексного подхода к исследованию с использованием современных взаимодополняющих методик, обширного экспериментального материала, и его качественного и количественного анализа, а также методов статистической обработки.

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).

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 38 рисунков и 1 таблицу. Список литературы включает 131 источник.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Одним из важных органов, защищающих организм от агрессивного воздействия физических, химических и биологических факторов окружающей среды, является кожа. На различные внутренние и внешние воздействия, кожа часто реагирует, изменяя пигментацию, которая зависит от активности меланоцитов – клеток кожи человека, которые не только определяют цвет кожи, но и защищают ее от ультрафиолетового излучения и других внешних повреждающих факторов. В связи с этим актуальным является изучение источников предшественников меланоцитов и факторов, влияющих на их дифференцировку, а также понимание механизмов меланогенеза.

В свете современных постановлений правительства для улучшения жизни пожилых людей понимание процессов старения кожи и нарушений ее пигментации также подчеркивает актуальность изучения механизмов возрастных изменений в норме и патологии.

Целью настоящего обзора является анализ данных современной литературы о меланоцитах кожи человека, источниках их происхождения в эмбриогенезе и во взрослом организме, процессах их дифференцировки и регуляции функциональной активности в норме и патологии.

1.1. Меланоциты: их роль, морфология и локализация в организме

Высокоспециализированные меланоциты продуцируют пигмент меланин, определяющий цвет кожи и ее защиту. В коже человека они локализованы, главным образом, в базальном слое эпидермиса, а также в дерме и волосяных фолликулах. Кроме того, данный тип клеток встречается во внутреннем ухе, пигментированной части эпителия сетчатки и сосудистого слоя глаза, и в других органах систем, включая сердце и центральную нервную систему. В коже мышечной, например, меланоциты расположены только в волосяных фолликулах и в голых областях эпидермиса или дермы, таких как хвост, ухо и лапки [81].

Меланоциты по морфологии – разветвлённые (древообразные) клетки, тело которых расположено в базальном слое эпидермиса, а отростки идут в шиповатый

[2]. Меланоциты имеют множество дендритных отростков, через которые передают пигмент меланин окружающим кератиноцитам [108]. Эпидермальные меланоциты прикрепляются к базальной мембране с помощью рецепторов интегринов, а к окружающим кератиноцитам – с помощью E-кадгерин-опосредованных адгезионных контактов эпителиального типа [40].

Хотя размер клеток может варьировать, обычно они имеют длину около 7 мкм. Как правило, на квадратный миллиметр кожи приходится от 1000 до 2000 меланоцитов, что составляет примерно 5-10% клеток базального слоя эпидермиса, и это число примерно одинаково и не зависит от пола или расы. Поэтому различия в окраске кожи определяются не количеством меланоцитов, а их пигмент-продуцирующей активностью [40]. Отдельная популяция меланоцитов, которые производят пигмент для волос, находится в волосяных фолликулах.

Меланоциты синтезируют два типа пигмента: черно-коричневый эумеланин и желто-красный феомеланин, отвечающие за цвет кожи и волос. Эумеланин представляет собой сложный гетерополимер, который поглощает свет по всему ультрафиолетовому и видимому спектру и, таким образом, обеспечивает эффективную защиту кожи от солнечного излучения. Кроме того, существует третий вид меланина – нейромеланин, который продуцируется в больших количествах в катехоламинергических клетках чёрной субстанции (точнее, в отделе *pars compacta*) и голубого пятна, придавая этим структурам характерный цвет. Меланины встречаются в кутикуле насекомых и в глазах большинства животных, черная окраска чернил кальмаров и других головоногих моллюсков. Они действуют как защитные агенты в некоторых микроскопических организмах.

Меланоциты отличаются высокой тирозиназной активностью, наличием специальных органелл – меланосом и дендритных отростков, локализуясь в базальном слое эпидермиса и волосяной луковицы. Меланоцитстимулирующий гормон (МСГ) является одним из основных регуляторов дифференцировки меланоцитов в эпидермисе и волосяных фолликулах. Он регулирует синтез меланина при участии фермента тирозиназы, образование и транспорт меланосом, а также стимулирует дендритогенез. Показано, что пролиферативная активность

эпидермальных меланоцитов новорожденных мышей во время заживления кожных ран регулируется полудоминантными генами [51].

В условиях *in vitro* показано, что при совместном культивировании меланобластов с кератиноцитами в бессывороточной среде фактор роста фибробластов (FGF) в присутствии дибутирил аденозин 3'-5'-циклического монофосфата стимулирует пролиферацию меланобластов, а МСГ – их дифференцировку. Кроме того, стимулировать дифференцировку и пролиферацию меланобластов человека может полученный из кератиноцитов KGF (фактор роста кератиноцитов) совместно с цАМФ, FGF, трансформирующим фактором роста (TGF), эндотелином-1 (ЕТ-1), и другими неопределенными факторами, происходящими от кератиноцитов. Таким образом, данные литературы свидетельствуют о том, что структура и функциональная активность меланобластов и меланоцитов регулируются не только генетическими, но и другими факторами, такими как факторы роста и гормоны [51].

Пигментация кожи тесно связана с переносом меланина из меланоцитов в соседние кератиноциты. В течение десятилетий клеточные механизмы, лежащие в основе переноса пигмента, оставались неустановленными. В последние годы показано, что кератиноциты участвуют в регуляции многих аспектов функционирования меланоцитов, включая активность ферментов, участвующих в синтезе меланина и транспортеров, биогенез и транспорт меланосом [125], перенос пигмента [23] и упаковку эпидермального меланина [120].

В настоящее время известно, что пигмент-продуцирующая активность меланоцитов в коже человека сложным образом регулируется кератиноцитами и окружающей стромой [97]. Меланин накапливается в меланосомах, которые транспортируются в отростки клеток, а затем, при контакте меланосомосодержащих цитоплазматических кончиков дендритных отростков меланоцитов с кератиноцитами, переносятся в них [35]. Каждый меланоцит имеет контакт через разветвленные дендритные отростки с более чем 40 кератиноцитами [35]. Показано, что в переносе меланосом важную роль играет миозин. В экспериментах с клетками мышей, дефектных по миозину, Wu с

соавторами показали, что в культуре клеток *in vitro* перенос пигмента происходит за счет скопления меланосом в центре клетки и их последующего фагоцитоза кератиноцитами [122]. В кератиноцитах эпидермиса меланосомы защищают ядерный аппарат клеток от повреждения ультрафиолетовыми лучами, а в дальнейшем разрушаются лизосомами.

Китайскими учеными показано, что в фетальных клетках кожи человека разрушение меланосом и меланина, происходит не только в фагосомах кератиноцитов при участии эндоплазматического ретикулума, но и в аутофагосомах меланоцитов [123].

Исследователями из французского института Кюри на модели культуры клеток подтверждено, что значительное влияние на активность меланоцитов оказывают кератиноциты, но не фибробласты [35]. Tarafder A. с соавторами идентифицировали «свободный» меланин во внеклеточном пространстве образцов кожи человека и полагают, что кератиноциты «тонко настраивают» экзоцитоз меланина меланоцитами до его поглощения [109]. Эти ценные наблюдения позволяют лучше понимать механизмы переноса пигмента.

Согласно современным представлениям синтез меланина и его транспорт в эпителиальные клетки активируется меланоцит-стимулирующим гормоном (МСГ) и аденокортикотропным гормоном (АКТГ), а также действием солнечных лучей. Ультрафиолетовое (УФ) излучение стимулирует образование меланосом и ускоряет процесс их доставки транспортировки в кератиноциты [89, 129]. На процесс меланогенеза активно влияют факторы воспаления. Показано, что интерлейкины 18 и 33, гранулоцитарный макрофагальный колониестимулирующий фактор, интерферон- γ , простагландин E2 способствуют меланогенезу, тогда как интерлейкины 1, 4, 6, 17 и фактор некроза опухоли могут ингибировать меланогенез [41]. Кроме того, показана роль меланоцитов в иммунной защите организма [54].

1.2. Источники клеток-предшественников в эмбриогенезе и взрослом организме

Клетками-предшественниками меланоцитов в эмбриогенезе являются меланобласты, которые формируются в процессе гаструляции на дорсальном краю нервного гребня (НГ) эмбриона [111]. Клетки НГ активно мигрируют и дают начало множеству разных клеточных популяций, включая меланоциты, которые затем мигрируют в разные места назначения, в том числе в базальный слой эпидермиса и волосяные фолликулы [28, 38]. Показано, что эмбриональный меланобласт высокопластичен. Даже полностью дифференцированные и продуцирующие пигмент клетки при воздействии различных условий могут дифференцироваться в другие линии, происходящие из нервного гребня, такие как нейрональные клетки, и наоборот [114]

Клетки дорсальной нервной трубки и эктодермы, а также кератиноциты выделяют медиаторы, которые влияют на миграцию, пролиферацию и дифференцировку меланин-продуцирующих клеток. В качестве медиаторов выступают белки семейства WNT, эндотелин 3 (EDN3) и фактор стволовых клеток (SCF), который связывает тирозинкиназу с рецептором c-kit в меланоцитах и меланобластах [28, 83, 98]. Кроме того, образование бипотентных глиально-меланоцитарных клеток зависит от действия Pax3, Sox10 и комплекса Wnt белков [55]. Показано, что мутации в генах c-kit и SCF приводят к развитию таких патологий как пьебалдизм и генодерматоз с депигментированными макулами [28].

Во взрослом организме меланоциты представляют собой популяцию долгоживущих дендритных клеток с медленным клеточным циклом, которые не имеют значительного источника стволовых клеток. Это означает, что при повреждении или изменении функциональной активности меланоцитов, например, при старении, нарушаются процессы синтеза, хранения и передачи меланосом, содержащих пигмент, в кератиноциты. Это приводит к изменению цвета кожи и, как следствие, к местной гипо- или гиперпигментации.

Наличие пулов стволовых и прогениторных клеток необходимо для длительного существования организма и его защиты от повреждающих факторов. Многие исследования показали, что для поддержания и восстановления популяции меланоцитов во взрослой коже существует небольшая популяция стволовых клеток меланоцитов (СКМц), локализованная в волосяных фолликулах [74, 83].

СКМц в ответ на разные виды повреждений могут генерировать зрелые меланоциты, способные восстановить пигментацию волос и кожи. Группой ученых показано, что СКМц мышей после эпиляции восстанавливают популяцию фолликулярных и эпидермальных меланоцитов, что в итоге приводит к гиперпигментации кожи и волос. Авторы подтвердили, что при эпиляции в каждом сосочке, вторичных зародышевых клетках волос и эпидермисе происходит эндогенная активация EDN3 [74].

О молекулярных факторах индукции дифференцировки и функционирования пигмент-продуцирующих клеток известно немного. Микрофталма транскрипционный фактор (MITF) является маркером меланоцитов и участвует в регуляции их развития. Как результат, мутации в гене MITF являются причиной развития синдрома Ваарденбурга типа 2 (WS2) и синдрома Титца – наследственных заболеваний, которые проявляются в виде гипопигментации и потери слуха [20].

Рядом исследователей отмечается, что экспрессия MITF в процессе дифференцировки меланоцитов, также регулируется факторами транскрипции. Так известно, например, что PAX3 (paired-box 3) и SOX10 (sex-determining region Y (SRY)-box 10) участвуют в регуляции процесса трансактивации гена MITF [27, 90, 118]. Показано, что транскрипционные факторы FOXD3 и SOX2 подавляют экспрессию гена MITF, активированного PAX3 и SOX10 в клетках нервного гребня, благодаря чему их дифференцировка смещается в сторону нейрональной линии. В регуляции развития меланоцитов кроме WNT3A участвуют и факторы роста, например, SCF, лиганд KIT, эндотелины, эфрин и костный морфогенетический белок 4 (BMP4) [44, 52, 104]. Использование модели клеток,

культивированных *in vitro*, дает новые возможности для изучения молекулярно-биологических механизмов, включая процессы дифференцировки и функционирования клеток [10].

Большинство млекопитающих покрыты пигментированными волосами. Описанная выше популяция СКМц, ранее известная как «амеланотические меланоциты», играют важную роль в понимании механизма пигментации волос. СКМц впервые были обнаружены в области выпуклости волосяного фолликула, которая считается их главной нишей [73, 83]. В зрелом волосяном фолликуле выделяют 3 группы анатомически и функционально различимых меланоцитов: стволовые клетки меланоцитов (СКМц), клетки-предшественники меланоцитов и терминально дифференцированные меланоциты.

Меланобласты могут дифференцироваться в меланоциты или оставаться в состоянии стволовости. Отмечено, что высокие уровни TGF β и активность Notch и низкая концентрация Pax10, подавляют дифференцировку СКМц в меланоциты [71]. Кроме СКМц, в волосяном фолликуле находятся стволовые клетки волосяного фолликула. Они, как и СКМц, мигрируют к основанию волосяного фолликула, способны дифференцироваться в кератиноциты и меланоциты и участвуют в формировании пигментированного волоса. СКМц из волосяного фолликула в определенных условиях могут мигрировать вверх и дифференцироваться в меланоциты базального слоя эпидермиса [83].

Меланоциты формируются в волосяном фолликуле в начале цикла роста волос (фаза анагена), а в конце цикла (фаза катагена) подвергаются клеточной смерти по типу апоптоза. Меланобласты, локализованные в области выпуклости волосяного фолликула, могут трансформироваться в стволовые клетки меланоцитов или дифференцированные меланоциты, продуцирующие меланин, который транспортируется в соседние кератиноциты, что придает цвет волосам.

Согласно данным Sarin K.Y. и Artandi S.E. СКМц и предшественники меланоцитов, которые локализуются в области выпуклости волосяного фолликула, экспрессируют допахром тауроменазу (Dct) и родственную тирозиназе белок 1 (TRP1), но не имеют фермента тирозиназы (Tyr),

регулирующего синтез пигмента, поэтому они не продуцируют меланин [98]. Zocco M. и Blanpain C. утверждают, что именно клетки волосяного стержня являются основным источником фактора SCF, стимулирующего терминальную дифференцировку меланоцитов [131].

В начальной стадии цикла роста волос прогениторные клетки дифференцируются в зрелые меланоциты, в которых активны ферменты TRP1, Dct и TYR, необходимые для синтеза меланина. Дифференцированные пигментные клетки мигрируют в волосяные луковицы и обеспечивают пигментацию новообразованных волос [131].

Японские авторы подчеркивают важнейшую роль кератиноцитов в развитии меланоцитов. Они отмечают, что пролиферация, дифференцировка, меланогенез и дендритогенез меланоцитов в эпидермисе и волосяных фолликулах кожи млекопитающих, а также гомеостаз эпидермиса и волосяных фолликулов в целом, в основном регулируются паракринными факторами, происходящими из кератиноцитов [53].

В результате согласованного поведения популяций этих стволовых и прогениторных клеток, кератиноциты волосяного матрикса после транспортировки в них меланина, формируют пигментированные стержни волос. Повреждение или воздействие УФ могут стимулировать миграцию СКМц в базальный слой эпидермиса, где они дифференцируются в эпидермальные меланоциты [26].

Таким образом, данные литературы убедительно доказывают, что основным источником клеток-предшественников меланоцитов являются стволовые клетки волосяного фолликула. Дополнительным аргументом в пользу этого является гипопигментация шрамов на коже, обусловленная разрушением клеток волосяных фолликулов.

Однако есть данные, которые позволяют полагать о существовании иных источников СКМц. Показано, что мультипотентные дермальные стволовые клетки, выделенные из крайней плоти человека, где отсутствуют волосяные фолликулы, способны дифференцироваться в меланоциты. В работе Mull A.N. и

др. отмечено, что кожа человека содержит большие межфолликулярные области, которые заселены меланоцитами в базальном слое эпидермиса [83]. Авторы полагают, что эти данные и анатомические особенности кожи человека позволяют предположить, что существуют другие уникальные популяции стволовых клеток, не связанные со СКМц в волосяных фолликулах и способные пополнять пул меланоцитов в межфолликулярном эпидермисе.

Уникальные исследования Li L. с соавторами на трехмерных моделях *in vitro*, имитирующих строение кожи, показали, что сферообразующие клетки дифференцировались в меланоциты, экспрессирующие маркер клеток меланомы человека HMB45, которые затем мигрировали из дермы в эпидермис и распределялись в базальном слое среди кератиноцитов, что характерно для пигментированных меланоцитов, выделенных из эпидермиса [74, 75, 76]. Эти данные позволяют значительно изменить наше понимание влияния ранних эпигенетических или генетических факторов на трансформацию меланоцитов и получить новые данные о факторах, влияющих на дифференцировку клеток и причинах нарушения их функциональной активности, приводящей к изменению пигментации кожи.

Обнаруженные выше открытия пролили свет на многие потенциальные возможности управления СКМц в фундаментальных исследованиях или для клинического применения. Дополнительное исследование взаимодействия между меланоцитарными стволовыми клетками волосяного фолликула и другими типами клеток в конкретном микроокружении могут дать новое представление о том, как разные клеточные линии взаимодействуют друг с другом, чтобы обеспечить образование пигментированных волос и кожи. Эти исследования важны для дальнейшего понимания молекулярных механизмов, регулирующих содержание стволовых меланоцитарных клеток в фолликуле и сигналов, активирующих эти клетки в каждом цикле роста волос в норме и патологии. А также понимать механизмы регуляции миграции предшественников меланоцитов, прежде, чем они достигнут волосяного стержня, где и происходит их окончательное созревание.

Понимание механизмов функционирования и взаимодействия популяций разных типов клеток в коже как в норме, так и при регенерации представляет особый интерес для регенеративной медицины, поскольку для создания полноценных тканевых эквивалентов кожи необходимо решать не только проблемы восстановления кожного покрова, но и решать проблемы нарушения меланогенеза и коррекции пигментации.

1.3. Меланогенез

Пигментация кожи обеспечивается меланогенезом – процессом синтеза меланина в меланоцитах. Последние взаимодействуют с эндокринной, иммунной и центральной нервной системами, которые регулируют его пигмент-продуцирующую активность наравне с внешними факторами, такими как УФ излучение и лекарственные средства [40, 41, 115, 127]. Помимо защитной меланин выполняет и иммунорегуляторную функцию. Перенос меланосом, содержащих пигмент, из меланоцитов в кератиноциты может играть роль в подкислении рогового слоя пигментированной кожи, что не только обеспечивает целостность/плотность рогового слоя и усиливает барьерную функцию кожи, но и оказывает антимикробное действие [54].

В научной литературе представлено множество исследований, однако механизмы управления пигментацией кожи и волос до сих пор не раскрыты полностью. Важным является то, что УФ излучение активирует факторы роста и цитокины, а также рецепторы к ним на поверхности клеток, что запускает разные сигнальные каскады, которые регулируют экспрессию множества генов [93].

Меланогенез – это сложный биохимический процесс, который контролируется тремя основными ферментами: тирозиназой, которая окисляет тирозин до 3,4-дигидроксифенилаланина (DOPA) (стадия, ограничивающая скорость); родственной тирозиназе белок 1 (TyRP-1) (катализирует окисление 5,6-гидроксииндол-2-карбоновой кислоты, может участвовать в регуляции выбора синтеза типа меланина); и родственной тирозиназе белок 2 (TyRP-2) (катализирует превращение L-DOPA в 5,6-гидроксииндол-2-карбоновую кислоту).

Показано, что пигментация кожи контролируется на генетическом уровне с участием более 150 генов [40].

Типы и количество пигмента, продуцируемого меланоцитами, определяются генетически и зависят от различных внешних и внутренних факторов, таких как гормональные изменения, воспаление, возраст и воздействие УФ [33, 41, 61]. Важнейшую роль в запуске процесса меланогенеза отводится микрофталма транскрипционному фактору MITF [82, 124].

Транскрипционные и посттранскрипционные механизмы, управляющие сигнальными путями меланогенеза, остаются неопределенными. Транскрипционная стимуляция в основном достигается посредством цАМФ-зависимой активации транскрипционного фактора MITF и нескольких других специфических генов. Фосфорилирование MITF с участием MAP-зависимой киназы MAPK-ERK и рибосомных S6 киназ запускается при активации KIT или MC1R. MC1R-зависимый сигнальный путь включает активацию цАМФ и транскрипционного фактора CREB, который индуцирует экспрессию MITF. Wnt-зависимый сигнальный путь также может стимулировать экспрессию MITF [33].

MITF как транскрипционный фактор инициирует транскрипцию гена тирозиназы (TYR), что приводит к усилению синтеза белка тирозиназы. Показано, что кроме того, в клетках работают посттранскрипционные регуляторные механизмы для индукции белка MITF. Так, например, на клетках мыши показано, что α -MSH не только запускает транскрипцию тирозиназы, но также стимулирует посттрансляционное повышение активности тирозиназы [33].

На рисунке 1 представлена схема регуляции меланогенеза в меланоцитах. Воздействие солнечных лучей, цитокинов, факторов роста и гормонов активирует внутренние процессы в клетке. Одним из основных событий, запускающих сигнальные каскады меланогенеза и транскрипцию гена MITF, является связывание MСГ с рецептором меланокортина-1 (MC1R) на мембране меланоцитов и запуск цАМФ- и/или Wnt-зависимых сигнальных путей. MITF, в свою очередь, регулирует активность генов TyRP1, TyRP2 и TYR – ключевых ферментов меланогенеза (Рисунок 1).

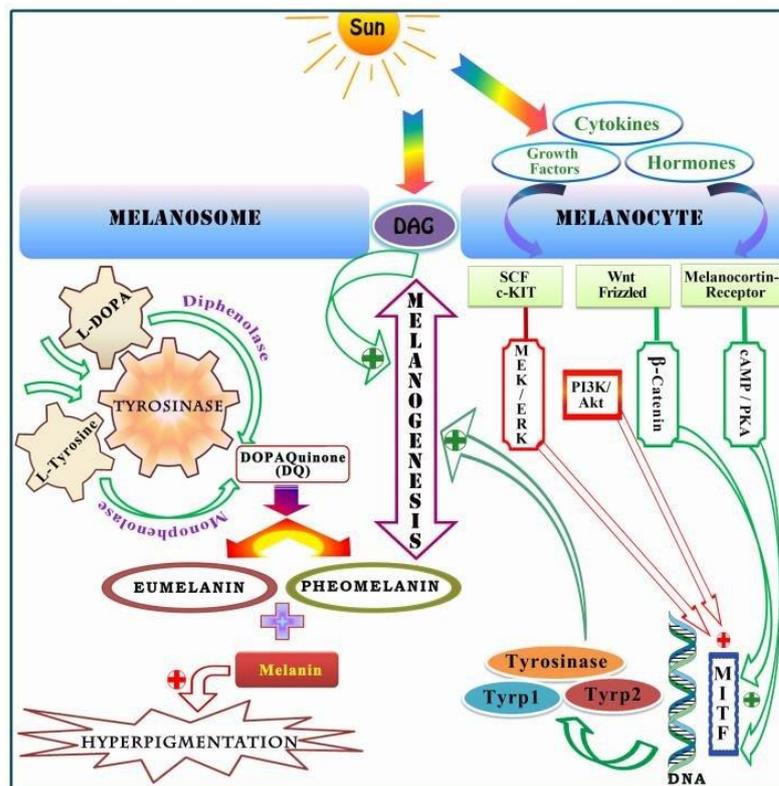


Рисунок 1. Роль разных факторов в активации меланогенеза в меланоцитах. По Mukherjee et al., 2018 [82].

Показано также, что основной разрушающий фактор УФ активирует УФ-чувствительные белки [103] и увеличивает экспрессию мастера транскрипционной регуляции пигментации – MITF [124] – основного регулятора процессов, описанных выше. В частности, MITF активирует экспрессию гена *TYR* (тирозиназа), премеланосомного белка *PMEL 17* (или gp100 - белок премеланосом) и *Bcl-2* (антиапоптотический фактор), которые регулируют синтез меланина [77] (Рисунок 1).

Ферменты, обеспечивающие меланогенез, транспортируются в меланосомы, где синтез меланина происходит в защищенной среде. Центральная роль в процессе меланогенеза отводится ферменту тирозиназе тесно связанному с 6ВН4-зависимой фенилаланингидроксилазой (phenylalanine hydroxylase, PAH) и изоформой тирозингидроксилазы I (tyrosine hydroxylase isoform, THI), что свидетельствует о старой концепции работы трех ферментов для инициирования пигментации [99].

Продукция пигмента происходит в меланосомах, лизосомоподобных органеллах, где меланин синтезируется и хранится до момента передачи его окружающим кератиноцитам [33]. На рисунке 2 представлена схема запуска ключевых моментов продукции меланина и упаковки в меланосомы.

В синтезе меланина и упаковке его в меланосомы участвует ряд специфических ферментов и структурных белков. TYR и TYRP2 являются ключевыми ферментами и влияют на качество и количество меланина. К важным структурным белкам относят PMEL17 и MART1. AP-3, BLOC-1 и OCA2 играют ведущую роль в сортировке и переносе меланосом (Цит. По [30]). Отмечается ведущая роль белка grp100 в формировании полноценных меланосом (См. Рисунок 3) [31]. В последующем меланосомы транспортируются в кератиноциты и создают защитный «зонтик» над ядром.

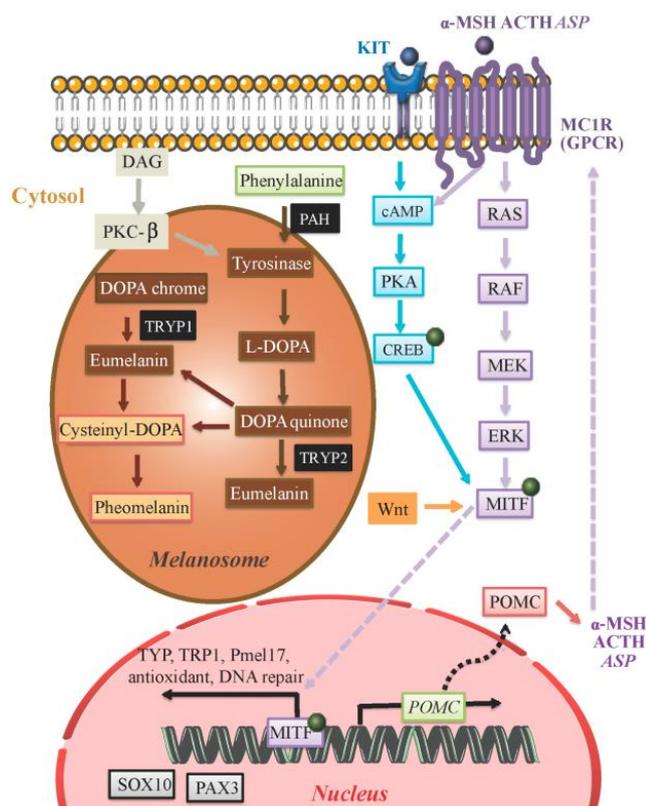


Рисунок 2. Меланогенез: продукция пигмента меланина. По D'Mello et al., 2016 [33].

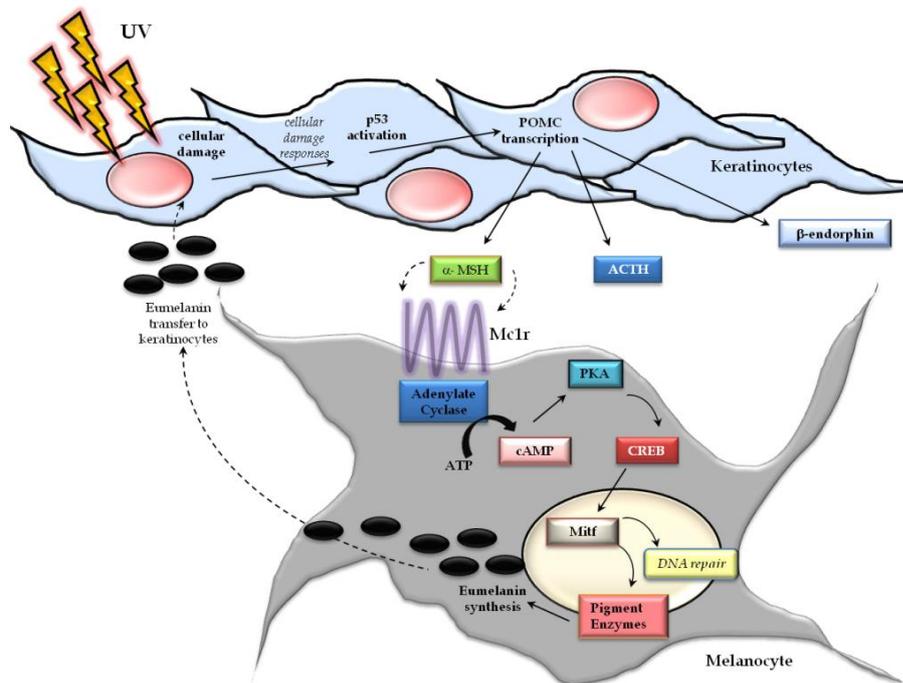


Рисунок 3. Влияние УФ и кератиноцитов на функциональную активность меланоцитов по продукции меланина и формированию меланосом. По D’Orazio et al., 2013 [34].

Снижение активности ферментов TyRP-1 и TyRP-2 приводит к переключению синтеза с эумеланина на феомеланин, коричнево-красного пигмента, который обладает низкими фотозащитными свойствами. Наличие этого типа пигмента, который наблюдается у рыжеволосых людей, приводит к снижению защиты от УФ излучения и, как результат, ускоренному фотостарению кожи и более высокому риску возникновения меланомы и других типов рака кожи [30].

Другим важным рецептором на мембране эпидермальных меланоцитов человека является NMDA-рецептор 1 (N-methyl-D-aspartate), связывание которого с лигандом увеличивает, а добавление антагониста, блокирующего NMDA-рецептор 1, уменьшает количество филоподий у меланоцитов. Эти морфологические изменения, кроме того, сопровождаются дезорганизацией микрофиламентов β -тубулина – компонента цитоскелета. Авторы полагают, что NMDA стимулирует перенос меланосом в кератиноциты, в то время как антагонист NMDA-рецептора МК-801 (dizocilpine maleate) блокирует приток кальция в меланоциты, а также влияет на перестройку β -тубулина и формирование отростков между меланоцитами и кератиноцитами [85]. Более

детальное знание механизмов переноса меланосом имеет важное значение для разработки методов профилактики и коррекции гипер- и гипопигментных нарушений в коже человека.

Нарушение любого из этапов регуляции синтеза меланина может привести к потере пигментации, формированию участка кожи измененного цвета, появлению пигментных пятен и опухолей. Прямую регуляцию экспрессии MITF синергически осуществляют транскрипционные факторы Sox10 и PAX3 (Рисунок 3) [20, 34, 55]. После воздействия УФ синтез АФК приводит к нарушению окислительно-восстановительного баланса в меланосомах и переключает синтез с феомеланина на эумеланин [103].

Анализ данных литературы показал, что меланогенез является сложным и многофакторным процессом, регулируемым как внешними факторами (например, воздействие УФ), так и на генетическом и молекулярном уровнях. Полностью механизм запуска и продукции пигмента не определен. Ключевые функции в регуляции меланогенеза отводят следующим группам белков: ферментам, осуществляющим синтез меланина, структурным белкам меланосом, и белкам, обеспечивающим транспорт и распределение меланосом [125, 126]. Нарушения на любом из этих этапов могут приводить к пигментным расстройствам, список которых регулярно обновляется и публикуется на сайте Европейского общества исследований пигментных клеток. Для лечения или профилактики нарушений пигментации необходим поиск новых препаратов, способных корректировать процессы меланогенеза.

1.4. Проблема нарушения пигментации кожи

Как уже отмечалось выше, меланогенез – сложный процесс, нарушения которого выражаются в дефектах пигментации, которые можно разделить на два основных типа – гипо- или гиперпигментация. Они либо обусловлены изменением количества меланоцитов, либо развиваются независимо от этого фактора [115]. Известно, что цвет кожи определяется не количеством

меланоцитов, а количеством, размером и распределением меланосом в кератиноцитах [40].

Серьезным нарушением является и увеличение продукции пигмента. Известно, что усиленный синтез меланина при обычном количестве меланоцитов является причиной появления веснушек. Черные «солнечные ожоги» или «чернильные пятна» являются результатом базальной гиперпигментации и повышенного содержания меланина в роговом слое кожи. Приобретенные нарушения гиперпигментации включают в себя старческие лентиго, меланоз Риля, губную меланозную макулу, эритромеланоз фолликулярной фасции Китамуры, пигментацию, вызванную ультрафиолетовым излучением, химическая или лекарственная пигментация и многие другие [126]. Невусы являются результатом доброкачественной активной пролиферации меланоцитов, в то время как меланомы являются уже злокачественными новообразованиями [57].

Серьезной проблемой остается патология меланогенеза, вызванная генетическими нарушениями. Альбинизм может быть следствием нарушений в функционировании ряде генов, таких как *OCA2*, *SLC45A2*, *TYRP1*, и *HPS1*. поэтому по данным литературы существует 17 типов окуло-кожного альбинизма. У людей с синдромом Хедиака-Хигаси накопление гранул меланина происходит из-за нарушения функции микротрубочек [28].

Причиной гиперпигментации могут быть системные расстройства. Примером этого могут служить нарушения обмена веществ или ферментов (гемохроматоз, болезнь Вильсона, болезнь Гоше, болезнь Нимана-Пика, амилоидоз), эндокринные расстройства (болезнь Аддисона, синдром Кушинга и гипертиреоз), нарушения питания (пеллагра, дефицит витамина B12, дефицит фолиевой кислоты, болезнь бродяги и др.), мастоцитоз, нарушения в продукции коллагена, дисфункция печени или почек. Гиперпигментация также может быть следствием инфекционных заболеваний (кори, сифилиса) и иных разнообразных синдромов: болезнь фон Реклингхаузена, синдром Сотоса, синдром ПОЭМС, который включает полинейропатию, органомегалию, эндокринопатию, изменения в коже, и др [126].

Как уже отмечалось выше, причиной серьезных изменений функциональной активности меланоцитов, включая процессы, способствующие развитию опухолей, могут стать любые нарушения процесса дифференцировки клеток, их функционирования или меланогенеза. Основными факторами риска развития меланом являются УФ излучение [61], фенотип (белая кожа, светлые (голубые) глаза), наличие в анамнезе солнечных ожогов, невусы, наследственность (семейный анамнез меланомы), возраст старше 50 лет и другие [57].

Повреждение ДНК меланоцитов следует отнести к категории наибольшей опасности, которая возникает вследствие воздействия избытка ультрафиолета, особенно, УФ-В [32, 89]. Избыточная инсоляция может спровоцировать неконтролируемое деление меланоцитов и привести к неравномерному распределению повышенной концентрации пигментов в верхнем слое кожи, что способствует появлению доброкачественного новообразования в виде пигментных пятен (Лентиго), либо формированию меланомы [61].

Меланома (меланобластома) — опухоль, развивающаяся из меланоцитов. Считается, что нарушение гомеостаза меланоцитов способствует развитию меланомы [46, 97], которая, наряду с плоскоклеточным и базальноклеточным раком кожи относится к злокачественным опухолям кожи. По данным ВОЗ, в 2000г. во всем мире было диагностировано более 200 000 случаев заболевания меланомой, среди которых 65 000 случаев смерти, связанных с меланомой. В программе SEER (The Surveillance, Epidemiology, and End Results) отмечается, что заболеваемость меланомой возросла в 6 раз с 1950 по 2000 гг.

Таким образом, вышеизложенное еще раз подчеркивает актуальность проведения исследований механизмов регуляции и нарушения процесса пигментации кожи человека для понимания и выбора профилактических или лекарственных препаратов.

1.5. Старение и патологические изменения пигментации кожи

Старение — комплексный биологический процесс, связанный с метаболическими и структурно-функциональными изменениями организма.

Процесс старения затрагивает не только внутренние органы и системы, но и ткани, составляющие внешний облик человека [13]. Так и старение кожи, свойства и функции которой с возрастом ухудшаются, является частью необратимых биологических процессов, которые обусловлены генетическими нарушениями, сокращением теломер, снижением устойчивости клеток к окислительному стрессу (повреждению свободными радикалами), а также агрессивным воздействием внешней среды. Эти нарушения связаны с большим количеством факторов, таких как избыточная инсоляция, курение, особенности питания и гормональные нарушения [13].

Одним из признаков старения кожи являются возрастные пятна. Они возникают из-за того, что с возрастом активность меланоцитов снижается, они склонны группироваться, что может приводить к развитию патологических изменений в коже.

Существует предположение о том, что нарушение функции митохондрий в фибробластах кожи может оказывать значительное влияние на процесс старения кожи и функции кератиноцитов и меланоцитов [25]. При этом происходит изменение скорости аутофагии, которая в норме способствует «очищению клетки», а также снижение скорости протеолиза в клетках [113].

Причиной возникновения возрастных пятен являются многие факторы. Так, гормональный дисбаланс приводит к уменьшению количества меланоцитов и избыточной выработке ими меланина. Снижение активности меланоцитов в выработке пигмента приводит к тому, что УФ может проникать через кожу и повреждать ДНК меланоцитов, что в свою очередь стимулирует группировку меланоцитов.

Любые типы клеток обладают конечной репликативной способностью (от 50 до 100 удвоений), а затем прекращают деление в ответ на факторы роста. Клетки, культивируемые до конца их «репликативной жизни» *in vitro*, демонстрируют изменения, схожие с таковыми при старении *in vivo*. Например, стареющие дермальные фибробласты сверхэкспрессируют активные

металлопротеиназы, что приводит к возрастной атрофии внеклеточного матрикса [121].

Существует два основных независимых друг от друга механизма старения кожи: фотостарение, которое происходит в результате воздействия УФ излучения, и хронологическое (возраст-ассоциированное) старение. При втором типе старения происходит истончение слоя эпидермиса, появление мелких морщин, вялости овала лица и доброкачественных новообразований. Это процесс, главным образом, зависящий от времени и при котором накопление клеточных повреждений постулируется как причина старения. Однако клеточное повреждение может иногда приводить к изменению клеток и способствовать развитию рака. В целом, рак и старение являются двумя проявлениями накопления повреждений в клетках [119, 129].

Фотостарение, в отличие от возрастного, вызывает утолщение и атрофию эпидермального слоя, которые происходят в результате нарушения организации и накопления компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ) – коллагена и эластина. Данный процесс выражается в появлении глубоких морщин и пигментных пятен, пожелтении, сухости и дряблости кожи, а также таких состояний как телеангиоэктазия, предопухолевые поражения, атрофия, эластоз и актиническая пурпура [50].

Солнечное излучение является основной причиной фотостарения и фотоканцерогенеза. Солнце излучает свет разных длин волн, некоторые из которых проходят через атмосферу и достигают уровня земли. Из них ультрафиолетовый (УФ) свет является основной причиной индукции или повреждения клеток, хотя инфракрасный (ИК) и видимый свет может также способствовать развитию патологических состояний [61, 100]. Хотя солнечный свет на уровне поверхности земли составляет до 44% видимого света (400-700нм), он оказывает серьезное биологическое воздействие на кожу, включая образование эритемы, изменение пигментации, термический ожог и образование свободных радикалов, которые в свою очередь, воздействуют и повреждают ДНК. Кроме того, показано, что ряд фотодерматозов вызываются лучами видимого света [79].

Повышенный синтез активных форм кислорода (АФК) является основой обоих механизмов старения. АФК повышают уровень пептида-активатора 1, стимулирующего активность матричных металлопротеиназ, которые разрушают основной компонент внеклеточного матрикса (ВКМ) кожи – коллаген. Помимо этого, рост АФК приводит к снижению содержания трансформирующего фактора роста β (TGF- β 2), регулирующего синтез нового коллагена. Таким образом, в основе старения кожи лежит дисбаланс белков ВКМ эпидермиса [50].

В процессы старения вовлечены различные генетические и эпигенетические механизмы, обусловленные явлением плейотропии генов [130]. В настоящее время известно, что более 350 локусов генов связаны с процессами старения у мышей. Мутации во многих из этих генов приводят к расстройствам пигментации у человека [126]. Регуляция процесса меланогенеза зависит от множества факторов, влияющих на развитие, регенерацию и старение меланоцитов и их предшественников, а также факторов, которые принимают участие в синтезе меланина, формировании, транспортировке и распределении меланосом, регулируют экспрессию важнейших факторов транскрипции, контролирующих синтез и функцию генов, специфических для меланоцитов.

Таким образом, поддержание пигментации молодой или стареющей кожи – это сложный многоэтапный процесс, который находится под контролем как эндогенных, так и экзогенных факторов. Поэтому для подавления гиперпигментации и аномального меланогенеза требуется применение комбинированных препаратов, способных оказать воздействие на разных этапах и уровнях регуляции синтеза меланина.

1.6. Культура клеток как модель для исследования

Попытки поддерживать фрагменты тканей вне организма известны давно. Наиболее активное развитие метода культивирования отдельных клеток тканей и органов животных в условиях *in vitro* относят к началу XX века. Особенно актуальным считалось применение данного метода в качестве модельной системы для исследования впервые открытых мельчайших живых организмов- вирусов.

Бурное развитие метода связано с появлением искусственных питательных сред, а также с внедрением ферментов для диссоциации тканей и появлением антибиотиков. Это позволило получить ряд известных культур клеток. Основным применением большинства известных штаммов диплоидных культур клеток и иммортализованных линий клеток человека или животных было создание модельных объектов для изучения вирусов и использование клеток в качестве субстрата для наработки вакцинных препаратов [4, 6, 128].

В настоящее время культуры клеток дают большие возможности для изучения морфологии, ультраструктуры, культуральных и молекулярно-биологических характеристик клеток, что делает их уникальной моделью для исследования токсичности или испытания специфической активности разнообразных препаратов [10, 14]. Кроме того, использование культур позволяет значительно сократить число экспериментальных лабораторных животных.

Культивирование *in vitro* клеток на разных стадиях дифференцировки открывает широкие возможности для получения новых данных об особенностях функционирования, метаболизма и дифференцировки клеток, а также выявления ранних признаков изменения их состояния. Исследования, связанные с трансформацией клеток, позволяют создавать системы скриннинга и диагностики опухолевых клеток, оценивать эффективность препаратов, блокирующих развитие опухолей и тормозящих их рост. Возможность поддерживать *in vitro* жизнеспособные клетки разных тканей и органов сделало перспективным применение их в стремительно развивающейся области регенеративной медицины и тканевой инженерии с целью реконструкции и/или поддержания функции тканей и органов, с учетом современных этических, религиозных и правовых норм [60, 86].

Поскольку клетки, выращиваемые *in vitro*, свободны от влияния контролирующих систем организма, они представляют особый интерес для ученых в плане исследования их метаболизма, поведения и взаимодействия клеток разных типов и изменения их дифференцировочного статуса [3, 10]. В настоящее время клеточная культура стала незаменимым инструментом,

помогающим раскрыть фундаментальные механизмы, регулирующие организацию клеток в тканях и органов, функционирование этих тканей и нарушение этих функций при различных заболеваниях.

Так, например, показано, что первичные ворсинчатые трофобласты, культивируемые в условиях гипоксии или реоксигенации, представляют собой уникальную экспериментальную систему, позволяющую лучше понять механизмы и сигнальные пути, которые происходят в плаценте человека, и облегчить поиск эффективных лекарств, защищающих от определенных нарушений беременности. На модели культуры первичных цитотрофобластов показано, что мелатонин не влияет на клетки трофобласта в норме, но восстанавливает окислительно-восстановительный баланс синцитиотрофобластов, нарушенный гипоксией/реоксигенацией [96].

Усовершенствование методов и технологий выделения и поддержания в культуре разных типов клеток привело к росту числа исследований с их использованием. Одним из основных применений культур клеток в последние годы стало использование их в качестве модели для исследования цитотоксичности или эффективности разных типов лекарственных средств [4, 6, 66]. Стремительное развитие методов генетической инженерии стимулировало использование культур клеток для создания высокопродуктивных штаммов-продуцентов биологически активных и лекарственных продуктов [6, 7, 10].

Все вышеизложенное и обусловило развитие метода культивирования клеток и применение его в качестве модели для исследования во многих аспектах и направлениях науки: цитологии, генетики, клеточной биологии, регенеративной медицине и косметологии. Клеточная культура в настоящее время широко используется в биомедицинских исследованиях, тканевой инженерии, регенеративной медицине, а также в качестве тест-системы для контроля вирусных агентов, лекарственных препаратов или в производстве вакцин и генно-инженерных продуктов [37].

По мнению Parul Kumar в настоящее время можно выделить девять областей применения культивированных клеток животных. Это прежде всего,

создание новых модельных систем, вирусология, тест-система определения токсичности, производство препаратов на основе клеток, генная инженерия, генная терапия, а также разработка и тестирование лекарственных препаратов, исследование генов человека и животных. В последние годы бурно развивается направление исследования раковых клеток, механизмов их трансформации, поиск ранних маркеров изменения клеток и подбора препаратов [68].

Использование культур клеток, в особенности с появлением подходов 3D культивирования, позволило значительно сократить количество экспериментальных животных для проведения фундаментальных исследований. Эксперименты, ранее требовавшие большого числа животных, теперь могут быть частично или полностью заменены работами *in vitro* на культурах клеток. Экспресс-тесты с использованием культур клеток позволяют не только сократить затраты на эксперименты, но при этом обходить серьезные проблемы этического, религиозного, философского и морального порядка, связанные с использованием животных [8].

Открытие стволовых клеток позволило значительно расширить наши знания о поведении клеток *in vitro* и *in vivo* и представляет уникальный инструмент как для понимания развития клеток и тканей, их дифференцировки, так и разработки технологий применения их в качестве терапевтических агентов или создания тканеинженерных конструкций, включая и кожные эквиваленты [14, 42]. Исследования на модели культивированных *in vitro* стволовых клеток разных тканей и органов позволяет ученым изучить сходство и различие механизмов регуляции самообновления и дифференцировки, получать новые данные по контролю клеточного цикла, контролю процесса асимметричного деления дифференцировки, механизмам клеточной защиты и репарации ДНК, а также связанным с этим механизмам клеточной смерти [78]. Ведутся исследования и по исследованию механизмов патологии меланогенеза на модели культуры клеток меланоцитов *in vitro* [45, 87]

Развитие методов клеточной биологии, а также открытие большого разнообразия стволовых и соматических типов клеток привели к появлению

новых направлений – клеточной терапии и тканевой инженерии, основанных на использовании культивированных клеток для коррекции и лечения многочисленных патологических состояний разной степени тяжести [1, 5, 7, 22, 49, 65, 69]. Способность стволовых клеток при трансплантации интегрироваться в окружающие ткани и участвовать в паракринной регуляции в организме реципиента делает их использование идеальным подходом для клеточной заместительной терапии [22].

За последние годы в связи с развитием лабораторных методов исследований накоплено значительное количество экспериментальных данных в области биологии стволовых клеток и их применения в клинической практике. Однако вопросы о механизмах взаимодействия трансплантированных клеток с микроокружением реципиента и их выживаемости все еще остаются до конца не изученными.

Для моделирования процессов взаимодействия трансплантированных клеток с тканями реципиента используют так называемые органотипические культуры клеток. Так, например, эксплантационные культуры сетчатки новорожденных крыс Wistar использовали для моделирования развивающейся нейросетчатки. Добавление к ним ксеногенных мышечных клеток разного типа (мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК), нейтральных стволовых/прогениторных клеток (НСПК), клеток пигментного эпителия сетчатки), позволило авторам выявить отличия в выживаемости и миграционной активности разных типов клеток в новом микроокружении [11].

Как известно из литературы, постоянно ведется поиск новых препаратов, способных блокировать токсическое воздействие УФ излучения на меланоциты кожи человека. Из-за сложности регуляции меланогенеза (наличия нескольких сигнальных путей) для коррекции патологий пигментации требуется разработка комбинированных препаратов, способных оказать воздействие на разных этапах и уровнях регуляции синтеза меланина. Чтобы изучить эффективность и механизмы воздействия комбинированных препаратов требуются и новые высокочувствительные, но при этом простые для исполнения методы и модели

проведения экспериментальных исследований с ограниченным использованием лабораторных животных, а также соответствующие нормам биоэтики.

В настоящее время для исследования препаратов против гиперпигментации в условиях *in vitro* используют первичные культуры меланоцитов и кератиноцитов [72, 108, 116], а также тканевые эквиваленты, полученные с использованием клеток с индуцированной плюрипотентностью (иПСК) [42, 43].

Для тестирования соединений на предмет потенциального воздействия на пигментацию в более физиологически значимом контексте учеными из национального института здоровья США был разработан протокол совместного культивирования меланоцитов и кератиноцитов. Эта чувствительная, воспроизводимая и надежная модель для тестирования меланогенных регуляторов позволяет проводить широкомасштабный скрининг соединений-кандидатов, обеспечивает более физиологически релевантную систему для изучения взаимодействий меланоцитов с кератиноцитами, а также для выяснения регуляторных механизмов меланогенных соединений [73].

Культуры соматических клеток представляют собой генетически однородную популяцию клеток, которые поддерживают *in vitro* в постоянных условиях, и могут использоваться для контроля токсичности различных веществ, таких как лекарственные препараты, детергенты, косметические средства и другие. Изменяя условия культивирования и концентрации исследуемых веществ, можно оценивать влияние различных факторов на рост клеток [7, 67].

Однако в конце 90-х годов было поставлено под сомнение соответствие результатов, полученных на монослойных культурах, процессам *in vivo*, а в качестве более подходящей модели были предложены тканевые эквиваленты [15]. Кроме того, масштабные исследования с анализом культур клеток более, чем от 100 пациентов, выявили отсутствие прямой зависимости пролиферативной активности клеток от возраста пациента [31].

В связи с этим, в качестве моделей в настоящее время используют не только монослойные, но и органотипические культуры, которые состоят из клеток разного типа. Хорошо известной культурой такого типа является эквивалент

кожи, разработанный в 1980х годах и используемый до сих пор [19, 64, 101]. Данные эквиваленты, состоящие из аутологичных фибробластов, иммобилизованных в коллагене, и кератиноцитов на его поверхности, были успешно трансплантированы для замещения и восстановления разных дефектов кожи. Исследования с целью создания заменителей кожи с применением клеток человека ведутся достаточно активно. Некоторые из таких образцов «биоискусственной» кожи успешно используются в клинике для временного закрытия глубоких ран [42]. С 1990-х годов эквиваленты кожи используют в качестве объекта для изучения методов антиоксидантной защиты против фотостарения, метаболизма лекарственных препаратов, процессов дифференцировки, иммунной и генной терапии [15]. Проводятся исследования по созданию органотипических эквивалентов и других тканей [1, 7, 9, 14, 24, 91, 92].

Однако создание и поддержание *in vitro* тканевых эквивалентов представляет собой дорогой и трудоемкий процесс [92]. Тогда как для скрининга модель должна быть воспроизводимой давать быстрый результат при применении относительно простых и недорогих аналитических методов.

1.7. Сравнение 2D и 3D культур клеток

Методы культивирования клеток постоянно развиваются. Достаточно стандартной рассматривается практика 2D культуры или монослойное культивирование. Метод используется для выращивания многих типов клеток. Уникальность метода заключается в том, что позволяет производить наблюдение под микроскопом изменение морфологии, характера роста клеток, активности их функционирования и изменения их характеристик под влиянием факторов среды. Кроме того, выращивание клеток в монослой позволило получить значительные результаты в вирусологии и разработать технологии производства вакцинных и генно-инженерных препаратов.

Монослойные культуры позволяют быстро и легко получить результат, в то же время они не воссоздают реального трехмерного микроокружения, межклеточных взаимодействий и взаимодействий между клетками и ВКМ, в

результате чего полученные результаты могут не соответствовать нормальной физиологии ткани. Вместе с тем, именно монослойные культуры являются более эффективными, например, для исследования цитотоксичности или антимикобактериальной активности препаратов [107]. Однако 2D культуры не всегда способны поддержать функциональную активность разных типов клеток, характер их взаимодействия и особенности поведения в ткани.

Для изучения поведения клеток и их реакции на биофизические или молекулярные сигналы чаще всего используют монослойные или 2D культуры клеток. Расшифровка механизмов, стоящих за этим поведением, жизненно важна для понимания процессов *in vivo*, которые обуславливают формирование и функционирование тканей и органов. Хотя такой метод наиболее принят, работы последних лет показали различие реакций или поведения клеток в 2D культуре и их поведением *in vivo*. Использование 3D культур позволяет более точно исследовать механизмы влияния микроокружения, контроля пространственно-временных градиентов кислорода и углекислого газа, питательных веществ и отходов [58].

Модель 3D культуры клеток обладает рядом преимуществ по сравнению с монослойной 2D системой, поскольку более адекватно отражает процессы клеточной дифференцировки и тканевой организации. Использование 3D культуры позволяет лучше понимать влияние микроокружения, биофизические, биохимические и молекулярные процессы в ткани и создавать модели патологий или заболеваний, которые могут служить для тестирования лекарственных препаратов или их токсичности вместо экспериментальных животных [14, 36, 70].

Одним из основных методов 3D культивирования клеток является их выращивание в виде многоклеточных сфероидов, которые по биоструктурным и биофункциональным свойствам ближе к живым тканям *in vivo* по сравнению с обычными монослойными 2D культурами. Клетки в сфероидах часто имеют другие характеристики, как, например, синтез белков внеклеточного матрикса, секреция факторов роста и профили экспрессии генов [16, 21].

Метод культивирования клеток в виде сфероидов представляет интерес для исследователей благодаря своей простоте, воспроизводимости и сходству с тканями. Этот подход был разработан в исследованиях рака [105], стволовых клеток и клеток многих органов (таких как печень, почка, сердце и т.д.) [18, 70]. Трудность выращивания физиологически сходных трехмерных культур тканей или органов связана с поиском условий поддержания жизнеспособных типов клеток, подбором биосовместимых материалов и конструкции скаффолдов, которые поддержат синтез и организацию внеклеточного матрикса (ВКМ) и васкуляризацию [39, 47, 48].

Таким образом, современное развитие клеточных технологий позволяет заменить животные модели на культуры клеток при разработке и тестировании лекарственных препаратов, так как они являются высокочувствительными, простыми в применении и более предпочтительными с точки зрения норм биоэтики.

Развитие методов клеточной биологии привело к активному использованию культур клеток млекопитающих в качестве моделей для оценки фармакологических препаратов в 80-х годах XX века. Многие типы клеток, такие как эндотелиальные клетки, фибробласты, кератиноциты тогда рассматривали как перспективную альтернативу животным моделям. В настоящее время культуры клеток активно используются для проведения широкого спектра фундаментальных исследований, а также при производстве или испытаниях лечебных, иммунобиологических или косметических препаратов. Активно ведутся исследования и по поиску противораковых препаратов [63].

Появление метода цейтраферной микроскопии делает культуры клеток *in vitro* незаменимой моделью для проведения исследований в биологии, медицине, фармакологии или токсикологии. Для изучения нормального и измененного фенотипа клеток, их ультраструктуры, организации межклеточного пространства существует широкий ряд уникального оборудования: световые, люминесцентные и электронные микроскопы.

Развитие молекулярно-биологических методов позволило изучать особенности функциональной активности и метаболизма клеток, выявлять ранние признаки изменения их функционального состояния. Широкий спектр специализированных красителей и антител, меченных флюорохромами, позволяет наглядно демонстрировать процессы изменения внутри- и внеклеточного пространства клеток, а также изменения экспрессии специфических маркеров.

1.8. Поиск природных соединений, влияющих на пигментацию кожи в норме и патологии

Поиск природных соединений, которые улучшают или стимулируют регенерацию кожи, а также могут быть использованы для профилактики ее возрастных изменений является важной задачей в дерматологии. С этой целью постоянно ведется поиск новых препаратов. Природные соединения рассматриваются как наиболее перспективные кандидаты.

Анализ литературы показал большое число работ по поиску растительных препаратов. Папоротник *Polypodium leucotomos*, растущий в Центральной Америке, традиционно используется для лечения воспалительных кожных заболеваний, таких как псориаз или атопический дерматит. Натуральный экстракт из листьев *Polypodium leucotomos*, обладает антиоксидантными, фотозащитными и иммунорегуляторными свойствами, которые способны предотвращать мутации в ДНК клеток кожи. Этот экстракт проявляет сильный омолаживающий эффект, поскольку он предотвращает морфологические изменения, вызванные повышенным окислительным стрессом [12]. Препарат куркумин рассматривается как высокоэффективный для осветления кожи. На культуре меланоцитов человека показано, что этот полифенол растительного происхождения оказывает антимеланогенный эффект [112]. Исследователями из Кореи показан антимеланогенный эффект экстрактов черного, зеленого и белого чая [62]. Результаты показали, что эффект подавления продукции меланина обусловлен снижением как активности тирозиназы, так и экспрессии белков TRP-1 и TRP-2, но не влияя на транскрипцию мРНК. При этом экстракт ферментированного чая

обладал меньшей токсичностью и оказывал больший эффект как депигментирующий агент. Кроме того, экстракты чаев снижали не только накопление меланина, но и формирование дендритных отростков. Авторы указывают на возможность использования данных экстрактов для отбеливания и профилактики гиперпигментации [62].

Постоянно ведется поиск новых препаратов, способных блокировать токсическое воздействие УФ излучения на меланоциты кожи человека. Для устранения последствий усиленного или нарушенного синтеза меланина разрабатываются различные препараты. Одним из многообещающих протекторов кожи является фукоксантин, который относится к семейству каротиноидов, выделяемых из морских водорослей. Было показано, что фукоксантин или препараты, его содержащие, могут оказывать защитное действие при разных патологиях [88].

В литературе мало данных по влиянию фукоксантина на меланогенез. В то же время каротиноиды и производные ретиноевой кислоты используют в качестве солнцезащитных и отбеливающих средств. Японскими исследователями установлено, что после УФ-воздействия на мышей, фукоксантин ингибирует тирозинкиназу и снижает экспрессию мРНК MCR1 и тирозиназа-зависимого рецептора 1, а также оказывает противовоспалительное воздействие – снижает экспрессию мРНК циклооксигеназы 2 (COX-2) и рецептора к простагландину 1 (EP1) [102].

Анализ современной литературы показал, что фукоксантин, выделенный из морских водорослей, обладает уникальными свойствами. Он ингибирует рост раковых клеток кишечника, линий клеток рака груди и кусочков опухолевых тканей [80, 94, 95, 106]. Фукоксантин рассматривается, кроме того, как перспективный препарат для профилактики рака, оказывая антинеопластический эффект на клетки [84]. При этом авторы отмечают дозозависимый эффект препарата. Показана возможность использования фукоксантина в качестве препарата, влияющего на пигментные клетки кожи человека, что делает его

перспективным для лечения нарушений пигментации кожи, включая старческие пигментные пятна.

1.9. Заключение к обзору литературы

Таким образом, меланоциты являются важными клетками кожи, сложным образом регулируемые кератиноцитами и окружающей стромой, играющие незаменимую роль в пигментации кожи и волос, и совместно с кератиноцитами в защите от ультрафиолетового излучения и других факторов внешнего воздействия. Основным источником меланоцитов во взрослом организме являются стволовые клетки волосяных луковиц. Однако, несмотря на множество исследований, остается вопрос о возможном существовании других ниш клеток-предшественников меланоцитов.

Анализ литературы показал, что многоэтапный процесс синтеза меланина (меланогенез), так же как и дальнейшие упаковка и транспортировка пигмента в эпителиальные клетки зависит от множества внешних и внутренних факторов, в том числе работы генов, ферментов, влияния гормонов и лекарственных средств.

Возрастные изменения, которые проявляются на разных уровнях организации и обусловлены генетическими и эпигенетическими факторами, в значительной степени являются причиной снижения защитной функции меланоцитов. Многочисленные исследования отечественных и зарубежных авторов свидетельствуют о влиянии разных факторов на дифференцировку меланоцитов, меланогенез и процессы старения, однако детальный механизм их функционирования в норме и патологии до сих пор не ясен. Понимание же процессов меланогенеза, а также механизмов изменения функциональной активности меланоцитов кожи человека облегчит понимание патогенеза нарушений пигментации и позволит бороться с проблемами возрастных изменений, а также разработать новые высокоэффективные препараты для профилактики и терапии заболеваний.

Для подавления гиперпигментации и аномального меланогенеза требуется применение комбинированных препаратов, способных оказать воздействие на

разных этапах и уровнях регуляции синтеза меланина. Одним из таких препаратов является пигмент бурых водорослей фукоксантин, который входит в состав ряда косметических препаратов в качестве протектора кожного покрова, так как он обладает противовоспалительными свойствами.

В настоящее время для исследования эффективности препаратов в условиях *in vitro* используют монослойные первичные культуры меланоцитов и кератиноцитов или иПСК [43], коммерческие тканевые эквиваленты с нормальными меланоцитами, как например, MelanoDerm [29] или тканевые эквиваленты с иПСК [43]. Последние обладают рядом существенных недостатков, ограничивающих их использование в качестве систем для скрининга лекарственных средств.

В связи с этим, для изучения эффективности и механизмов воздействия новых препаратов, потенциально пригодных для терапии нарушений пигментации, связанных с изменением функциональной активности меланоцитов, требуются новые высокочувствительные, но при этом недорогие, простые для манипулирования и соответствующие нормам биоэтики модели для биоаналитического и доклинического анализа.

Анализ литературы показал, что использование метода культур клеток является наиболее целесообразным для проведения исследований влияния препаратов на функциональную активность клеток. При этом использование 3D культур клеток позволит получить более полные фундаментальные и прикладные данные по сравнению с 2D культурами. Создание условий культивирования меланоцитов в виде 3D структуры (или микроткани), позволяющей получать данные о патофизиологии клеток или об изменении их функциональной активности, взаимодействии, механизмах реагирования клеток на возрастные изменения, включая изменение активности генов представляется целесообразным, актуальным, научно и практически значимым.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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

2.1. 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 центрифужные пробирки (объемом 15мл), в суспензию клеток для разведения консервирующего раствора добавляли капельно раствор Хенкса (ПанЭко, РФ) до объема 5-7 мл, 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 плотности монослоя 80-85% клетки снимали с поверхности чашки с помощью растворов версена (ПанЭко, РФ) и 0,25%-ного раствора трипсина (ПанЭко, РФ), доводили посевную концентрацию клеток в полной ростовой среде и высевали на новую чашку Петри. Замену среды производили через каждые 2 суток. В экспериментальных исследованиях использовали культуру меланоцитов 3 и 4 пассажей.

2.2. Культивирование тканевых эквивалентов Меланодерм

Набор коммерческих тканевых эквивалентов, состоящий из 24 образцов, поступил в лабораторию в охлажденном виде (при +4°C), после чего образцы, расположенные в специальных держателях, были перенесены в культуральные шестилуночные планшеты в индивидуальные лунки. Каждый образец был помещен на специальную подставку (MEL-STND, MatTek Corporation) в лунки 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.

2.3. Получение маточного и рабочего растворов фукоксантина

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

2.4. Исследование влияния фукоксантина на 2D культуру меланоцитов человека

Для оценки влияния фукоксантина меланоциты 3 пассажа высевали на 12-луночные культуральные планшеты в плотности 10^4 кл/см². Для получения рабочего раствора фукоксантина маточный раствор (500 μM) 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.

2.5 Морфологический анализ культуры меланоцитов

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

2.6. 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 фотофиксировали с интервалом 20 минут. Для анализа изменения количества клеток в процессе культивирования в контроле или с добавлением препарата 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.

2.7. 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%-ного раствора трипсина и разводили в свежей порции питательной среды. Небольшой объем суспензии для подсчета клеток смешивали в соотношении 1:1 с 0,4% раствором красителя трипанового синего для визуализации мертвых клеток.

10мкл суспензии клеток, окрашенных трипановым синим, 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 подсчет производили трижды. Индекс пролиферации культуры (ИП) вычисляли по формуле: $ИП = N_{72}/N_0$, где N_{72} – количество клеток через 72ч культивирования, а N_0 – исходное число клеток.

2.8. 3D культивирование меланоцитов кожи человека

Для получения культуры меланоцитов человека, более приближенной к условиям нативной ткани, суспензию меланоцитов 3-4 пассажа в концентрации $3,3 \times 10^6$ кл/мл в 150мкл полной ростовой среде помещали на неадгезивные

агарозные планшеты с 256 лунками диаметром 400 мкм. Агарозные планшеты получали из 0,2% раствора агарозы на смеси DMEM/F12 с использованием силиконовых молдов 3D Petri Dishes (Microtissue™, США).

Для исследования 3D культуры использовали раствор фукоксантина с концентрацией 50 мМ. 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 («СМ Technologies», Финляндия). Фоторегистрацию проводили в автоматическом режиме каждые 20 минут. Полученные сфероиды фиксировали на 1, 3 и 7 сутки для дальнейшего анализа.

2.9. Фиксация тканевых эквивалентов Меланодерм и сфероидов из меланоцитов человека 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 трехкратной смены раствора фосфатно-солевого буфера (5 мин, pH=7,4). Материал фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида (+4°C, 1 сут).

2.10. 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, Биовитрум).

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, Биовитрум).

2.11 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 (pH=6,0, 06-014, Биовитрум) 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: gp 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-бензimid - 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, Бювитрум) 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 (НИН, США) и преобразованы 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).

2.12. Фотометрический анализ концентрации меланина в тканевых эквивалентах Меланодерм и сфероидов из меланоцитов человека

Перед фотометрическим анализом, образцы Меланодерм и сфероиды отмывали от остатков среды трехкратной 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.

После инкубации, образцы тщательно перемешивали на вортексе, осаждали нерастворенные частицы с помощью центрифугирования (5мин, 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).

2.13. Полимеразная цепная реакция в реальном времени

Для анализа экспрессии генов брали по 3 фрагмента тканевых эквивалентов Melanoderm и по 3 планшета сфероидов (в одном планшете 256 сфероидов) на 1, 3 и 7 сутки культивирования в опыте и контроле. Тотальную РНК выделяли, используя TRIReagent (Sigma, США), обрабатывали ее ДНКазой I типа (Fermentas, Германия), чтобы избавиться от контаминации ДНК, и осаждали в 4М-ном 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.

Таблица 1. Последовательности использованных в исследовании праймеров

Праймер	Последовательность праймера (5'-3')	Описание праймера
MC1R_For	GTGGTCTTCTTCCTGGCTATGC	<i>MC1R</i>
MC1R_Rev	GGATGGTGAGGGTGACAGCG	
TYR_For	TTCAAGAAGTTTATCCAGAAGCC	<i>TYR</i>
TYR_Rev	CTTAATGTAGTCTTGAAAAGAGTC	
TBP_For	CATGACTCCCGGAATCCSTATCTTT	<i>TBP</i>
TBP_Rev	TGTTGCTGCTGCTGCCTTTGTT	

На полученных образцах анализировали экспрессию генов тирозиназы (TYR) рецептора 1 к меланокортину (MC1R). Последовательности использованных праймеров приведены в Таблице 1. 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 по ТВР (TATA-binding protein), выполняли методом $\Delta\Delta Ct$ с учетом эффективности реакции, определенной методом построения стандартных кривых.

2.14. 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.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1. 2D культура меланоцитов

3.1.1. Характеристики 2D культуры меланоцитов на 3 и 4 пассажах *in vitro*

Культура меланоцитов кожи человека на первых пассажах была представлена мелкими биполярными клетками, формирующими неплотный сетчатый монослой. Клетки активно секретировали темный пигмент меланин, что совпадает с данными литературы [97, 108, 116].

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 (Рисунок 4А, Б). На втором пассаже активно продуцирующие пигмент клетки группировались в островки со значительным накоплением пигмента (Рисунок 4А), на третьем пассаже появления таких островков не наблюдали, что, вероятно, связано с постепенным снижением функциональной активности меланоцитов в монослойной культуре. На четвертом пассаже морфология клеток немного изменялась – в культуре количество многоотростчатых клеток стало преобладать над количеством биполярных (Рисунок 4В).

Для дальнейшего исследования использовали монослойные культуры 3 и 4 пассажа, в которых не наблюдали спонтанной тенденции к формированию агрегатов, в которых накапливался пигмент, то есть с пониженной функциональной активностью.

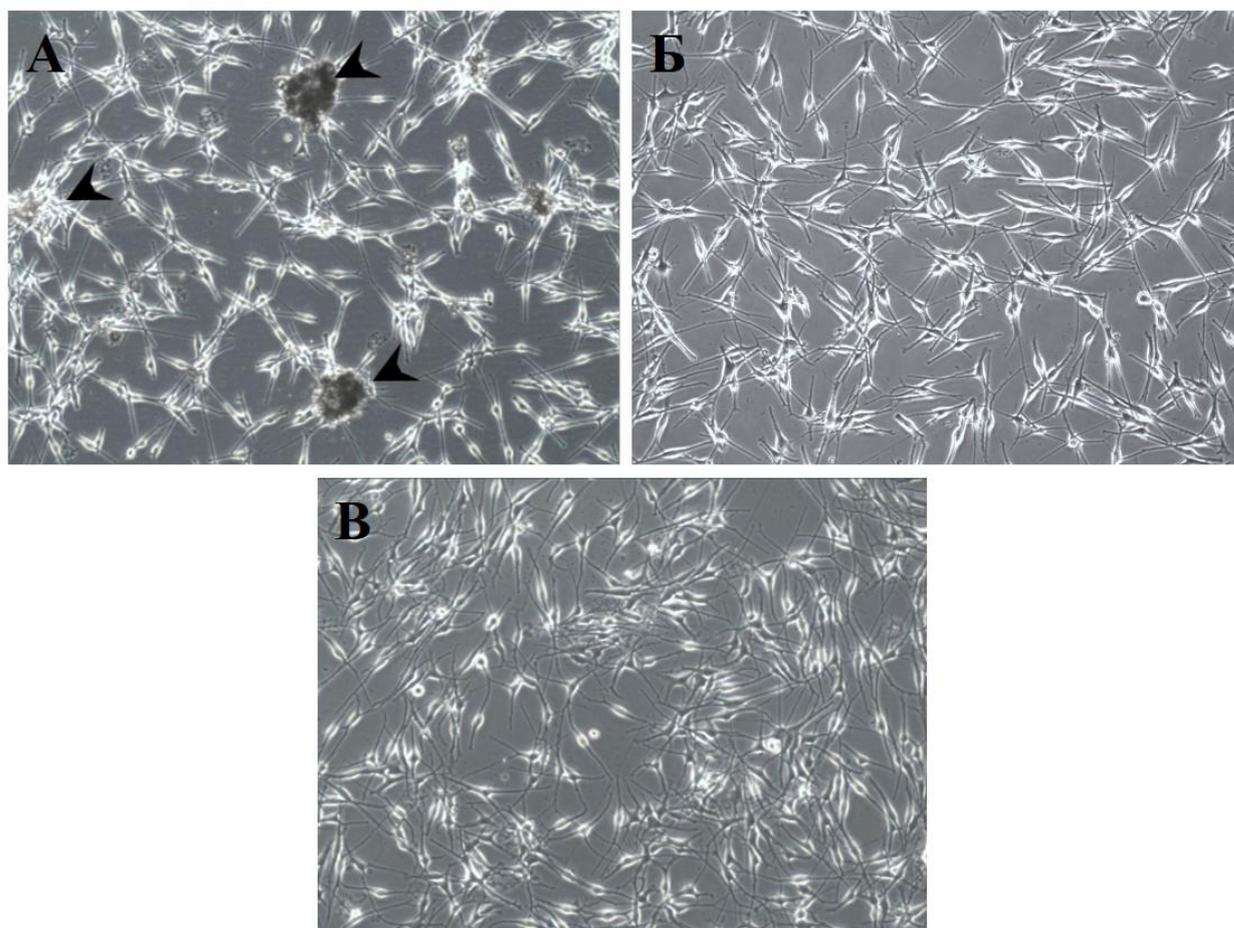


Рисунок 4. Морфология меланоцитов через 72 часа культивирования в монослое. А – 2 пассаж, Б – 3 пассаж. В – 4 пассаж. Стрелками отмечены скопления клеток и пигмента. *Фазово-контрастная микроскопия, увеличение $\times 10$*

Анализ количества клеток в поле зрения в приборе для цейтраферной микроскопии Cell-IQ и построение кривых роста клеток показал, что пролиферативная активность клеток 4 пассажа по сравнению с третьим снижалась (Рисунок 5). Меланоциты четвертого пассажа вели себя менее активно, в первые часы культивирования не наблюдалось значительного прироста клеток, как на третьем пассаже. Колебания в количестве клеток, отображенные на кривых, вероятно, связаны с миграционной активностью клеток. Оценка количества клеток в поле зрения в результате обработки нескольких изображений ($n=5$) для четырех временных точек показала, что итоговый прирост клеток на 3 пассаже относительно первых часов культивирования был выше, чем на 4 пассаже (Рисунок 6).

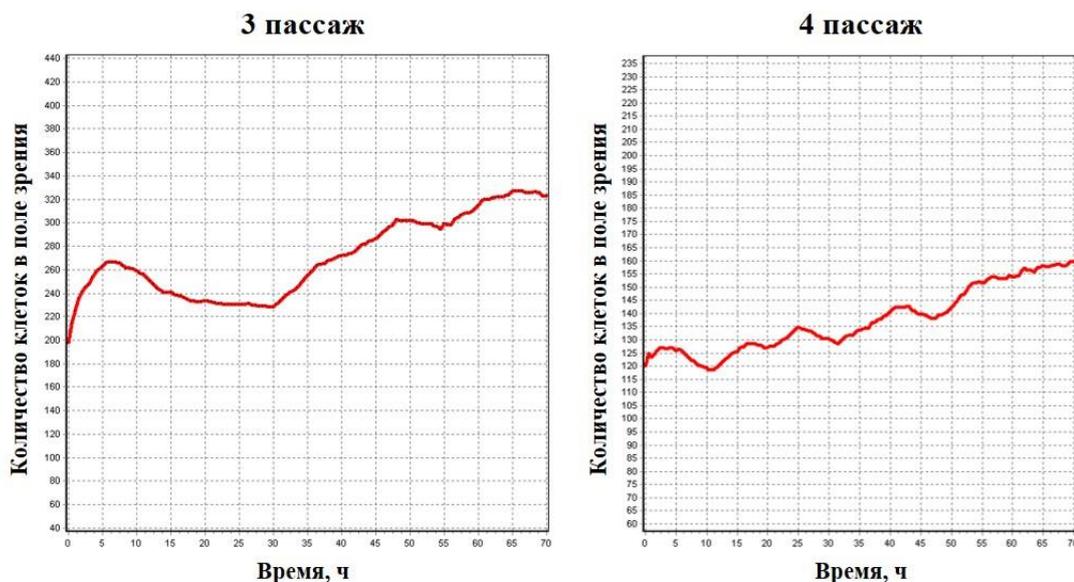


Рисунок 5. Примеры кривых роста меланоцитов в монослойной культуре на 3 и 4 пассажах. На основе обработки изображений в программе Cell-IQ Analyzer

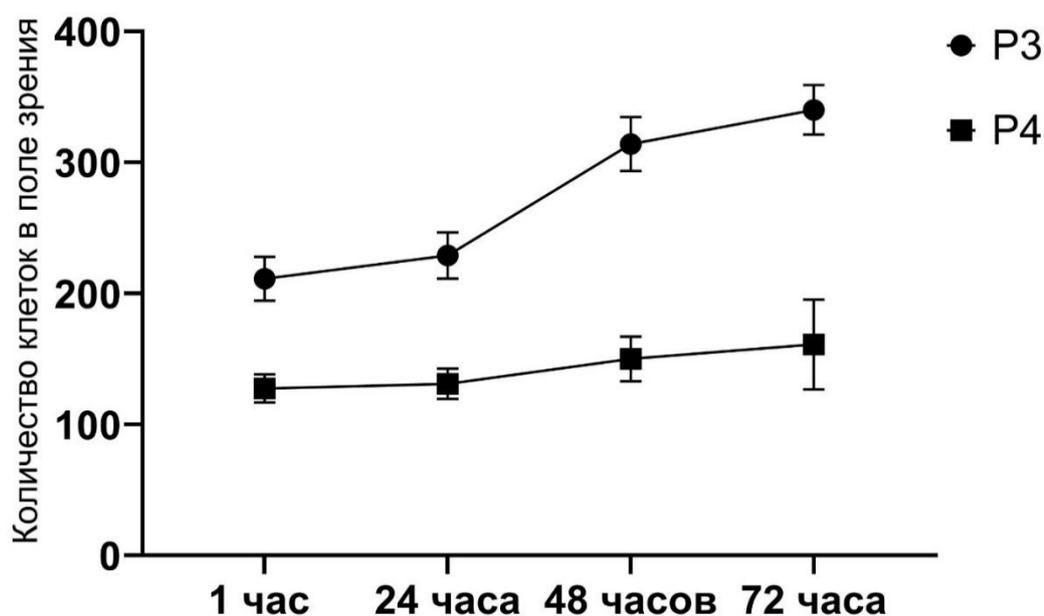


Рисунок 6. Кривые роста меланоцитов в монослойной культуре 3 и 4 пассажей (на основании данных световой фазово-контрастной прижизненной цейтраферной микроскопии). $n=5$

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 подтвердил снижение пролиферативной активности клеток с ростом числа пассажей *in vitro* (Рисунок 7).

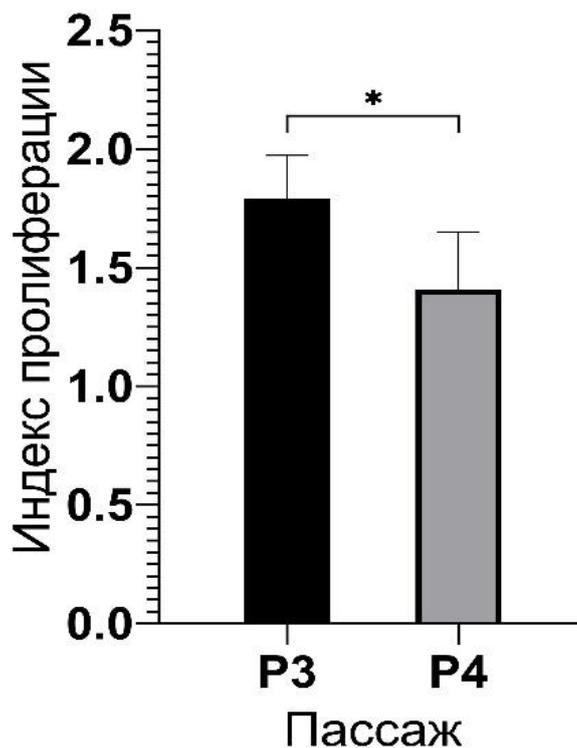


Рисунок 7. Индексы пролиферации меланоцитов на монослойной культуре 3 и 4 пассаже. $n=5$, $*p < 0.05$

Анализ данных литературы показал, что 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 [108]. Полученные нами результаты сравнения культуральных характеристик клеток третьего и четвертого пассажей, показавшие ли достоверное снижение пролиферативной активности клеток и ростовых характеристик, а также изменение их морфологии и снижение пигмент-продуктивной активности свидетельствуют, по-нашему мнению, о постепенном процессе старения культуры меланоцитов. Для дальнейшего исследования использовали меланоциты 3 пассажа.

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

3.1.2.1. Анализ морфологии и характера роста 2D культуры меланоцитов 3 пассажа в присутствии фукоксантина

Меланоциты 3 пассажа высаживали в культуральные планшеты с плоским дном для культивирования в монослое в питательной среде с добавлением разных концентраций фукоксантина и помещали в специальную камеру с поддержанием температуры и газового состояния в приборе Cell IQ. Изменение морфологии клеток и характера их роста фоторегистрировали в автоматическом режиме. Состояние культуры меланоцитов через 72 часа представлено на рисунке 8.

Как показали результаты эксперимента, культивирование клеток в присутствии фукоксантина в низкой концентрации 5 μM не оказывало токсичного действия, не влияло существенно на рост и жизнеспособность клеток *in vitro* (Рисунок 8Б). Морфология клеток и характер формирования монослоя не отличались от контроля (Рисунок 8А, Б).

Значительного изменения морфологии клеток при добавлении препарата в концентрации 50 μM так же 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 μM (Рисунок 8В). Добавление в питательную среду 250 μM фукоксантина показало, что высокая концентрации препарата оказывает сильное токсическое действие. Клетки выбрасывали пигмент, прекращали рост и погибали (Рисунок 8Г).

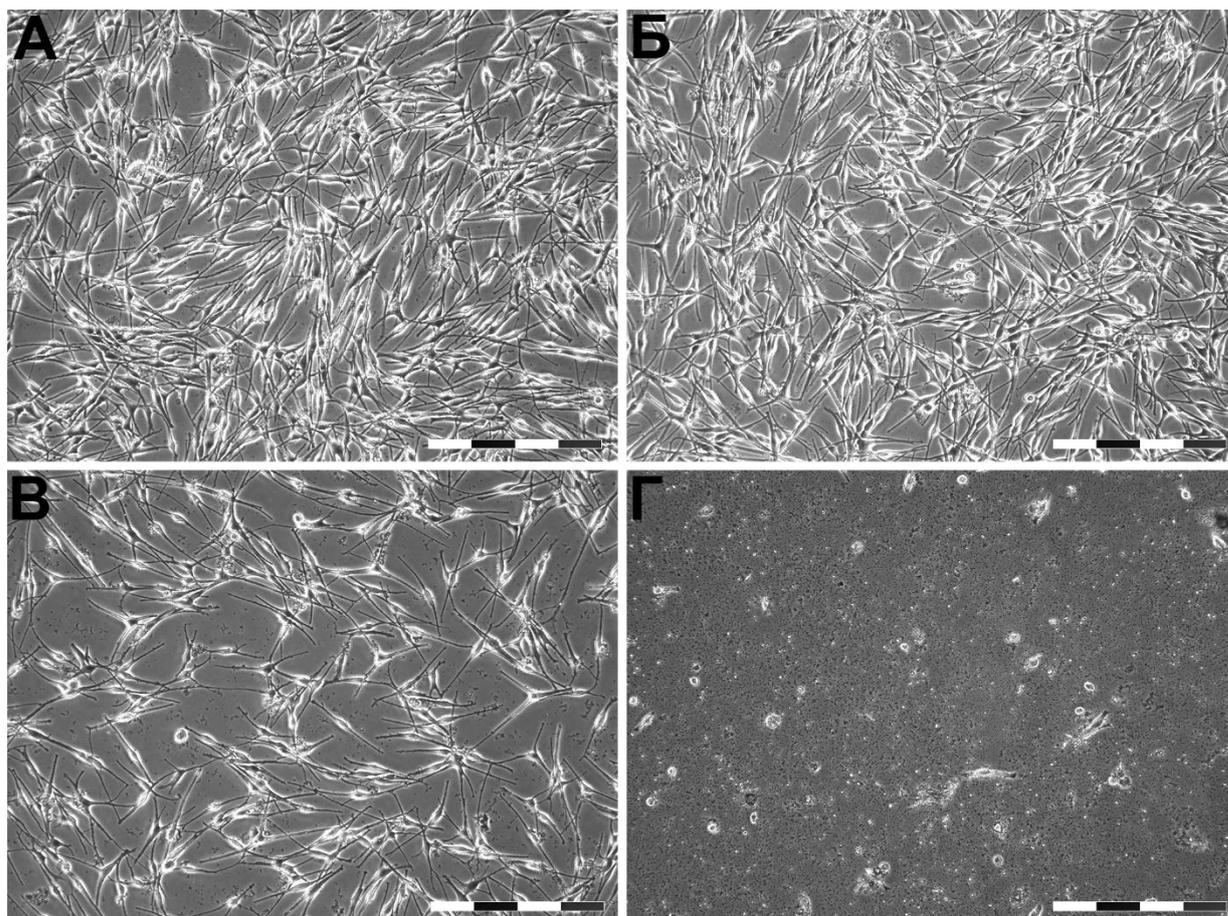


Рисунок 8. Влияние разных концентраций фукоксантина на морфологию и характер роста меланоцитов в монослойной культуре, после 72 часов культивирования *in vitro*. А – контроль; Б – 5 μM фукоксантина; В – 50 μM фукоксантина; Г – 250 μM фукоксантина. Фазово-контрастная микроскопия. Измерительный отрезок 200 мкм

Таким образом, результаты исследования по монослойному культивированию клеток в присутствии фукоксантина показали, что препарат в высокой концентрации (250 μM) оказывал токсический эффект на культуру меланоцитов кожи человека, приводя к их полной гибели. Применение средней концентрации фукоксантина (50 μM) не приводило к гибели клеток, однако значительно снижало их пролиферативную активность. В низкой концентрации (5 μM) препарат не оказывал заметного влияния на поведение меланоцитов в монослойной культуре. Антипролиферативный эффект пигмента в концентрации 20 μM и более показан и другими авторами [80, 94, 95, 106].

3.1.2.2. Анализ пролиферативной активности меланоцитов 3 пассажа в контроле и опыте

Анализ пролиферативной активности меланоцитов 3 пассажа проводили в течение 72 часов культивирования клеток в присутствии препарата в разных концентрациях, наблюдая за клетками и осуществляя их автоматическую фоторегистрацию каждые 20 минут. Контрольные клетки выращивали в стандартной ростовой среде. Результаты обработки изображений, полученных методом цейтраферной микроскопии, в виде кривых роста меланоцитов по числу клеток, наблюдаемых в поле зрения, представлены на рисунке 9.

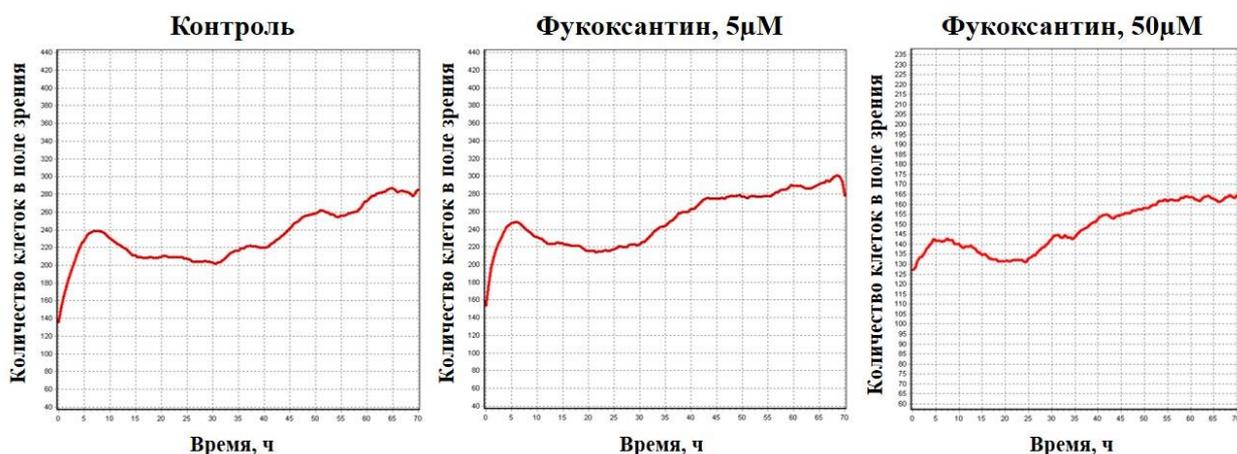


Рисунок 9. Динамика изменения количества клеток в поле зрения прибора Cell-IQ в 2D культуре меланоцитов 3 пассажа в контроле и при добавлении разных концентраций фукоксантина: А – контроль; Б – 5 μМ фукоксантина; В – 50 μМ фукоксантина.

Как видно из рисунка 9, увеличение числа меланоцитов, находящихся в поле зрения прибора, происходило примерно с одинаковой скоростью в контроле и в присутствии препарата в низкой концентрации 5 μМ. При этом наблюдали увеличение количества клеток в поле зрения к концу 3-х суток культивирования примерно в 2 раза (Рисунок 9А, Б). При добавлении фукоксантина в концентрации 50 μМ скорость роста меланоцитов снижалась, прирост количества клеток составлял около 50% (Рисунок 9В).

Подсчет общего количества клеток, снятых с культуральных планшетов, позволил рассчитать индексы пролиферации меланоцитов, данные по которым представлены на рисунке 10. Как следует из проведенного анализа, индексы

пролиферации культуры меланоцитов в контроле и в опыте с добавлением 5 μM препарата достоверно не различались.

Добавление к культуре меланоцитов фукоксантина в более высокой концентрации (50 μM) оказывало ингибирующее влияние на рост клеток. Индекс пролиферации клеток в этом случае достоверно отличался от контрольной группы, что согласуется с ранее описанными данными, полученными при оценке количества клеток на основе данных, полученных методом цейтраферной микроскопии.

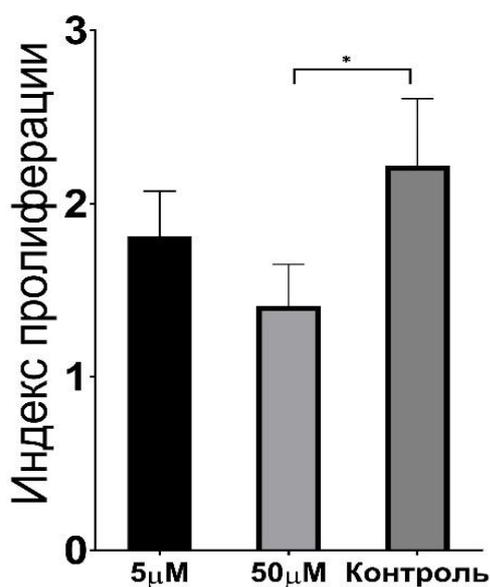


Рисунок 10. Значение индекса пролиферации культуры меланоцитов на 3 пассаже в контроле и опытной культурах с добавлением 5 μM или 50 μM фукоксантина. $n=5$, * $p<0,05$

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что добавление в питательную среду фукоксантина в концентрации 5 μM не влияет значительно на скорость роста и морфологию клеток, в то время, как более высокие концентрации препарата (50 μM 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 цитотоксичности препаратов, а фукоксантин оказывает антипролиферативный эффект на культуру меланоцитов.

3.2. Культура меланоцитов в тканевом эквиваленте Меланодерм

3.2.1. Влияние фукоксантина на пигмент-продуцирующую активность меланоцитов в тканевых эквивалентах Меланодерм

Тканевые эквиваленты Меланодерм представляют собой искусственно созданные многослойные образцы ткани. В основе используется пористая мембрана, на которой культивируются эпидермальные кератиноциты и меланоциты. После формирования многослойной конструкции с меланоцитами, расположенными в базальном слое, тканевой эквивалент готов для проведения экспериментальных исследований. По мере культивирования образцы накапливают меланин за счет синтетической активности меланоцитов и перераспределения пигмента.

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 (Рисунок 11А).

При добавлении 5μМ фукоксантина в питательную среду при культивировании эквивалентов также 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 (Рисунок 11Б).

Таким образом, если в 1 сутки культивирования контроль и опыт выглядели одинаково светлыми, то к 7 суткам культивирования образцы различались по степени пигментации. В отличие от контроля, опытный образец, культивированный в присутствии фукоксантина, выглядел более светлым (Рисунок 11 А, Б)

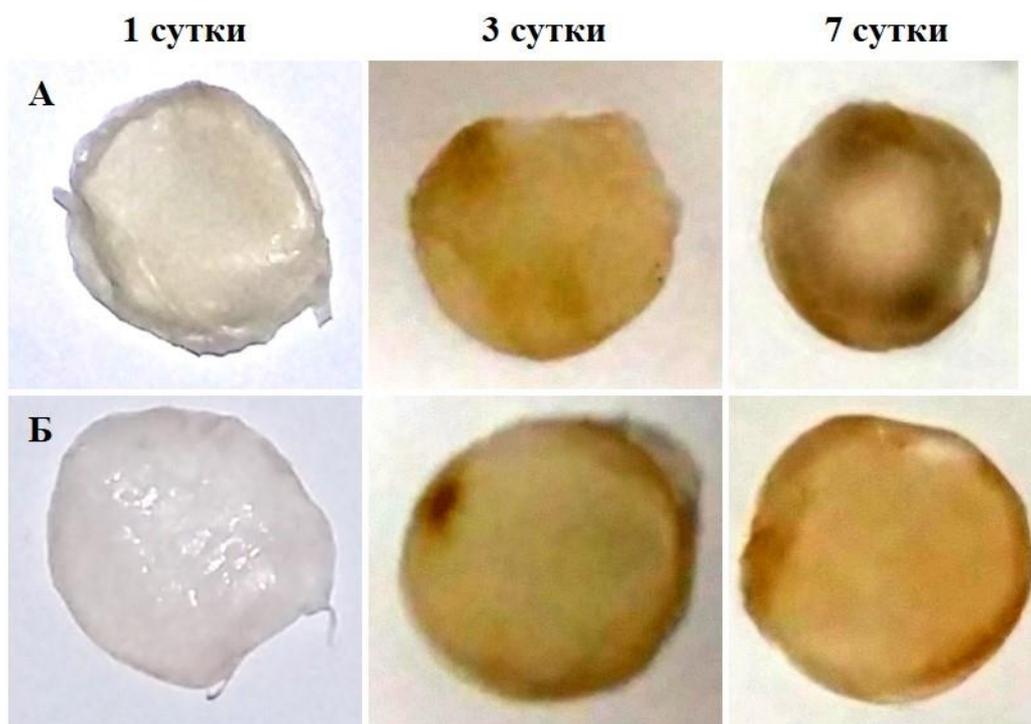


Рисунок 11. Визуальный анализ накопления пигмента в тканевых эквивалентах Меланодерм в контрольной группе (А) и в группе с добавлением 5 μM фукоксантина (Б) на 1, 3 и 7 сутки культивирования. Фотографии образцов, высушенных перед фотометрическим анализом содержания меланина

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 12. Как видно из гистограммы, в первые сутки культивирования интенсивность окрашивания опытного и контрольного образцов не различалась, и концентрация меланина составляла 3-4 $\mu\text{g}/\text{мл}$.

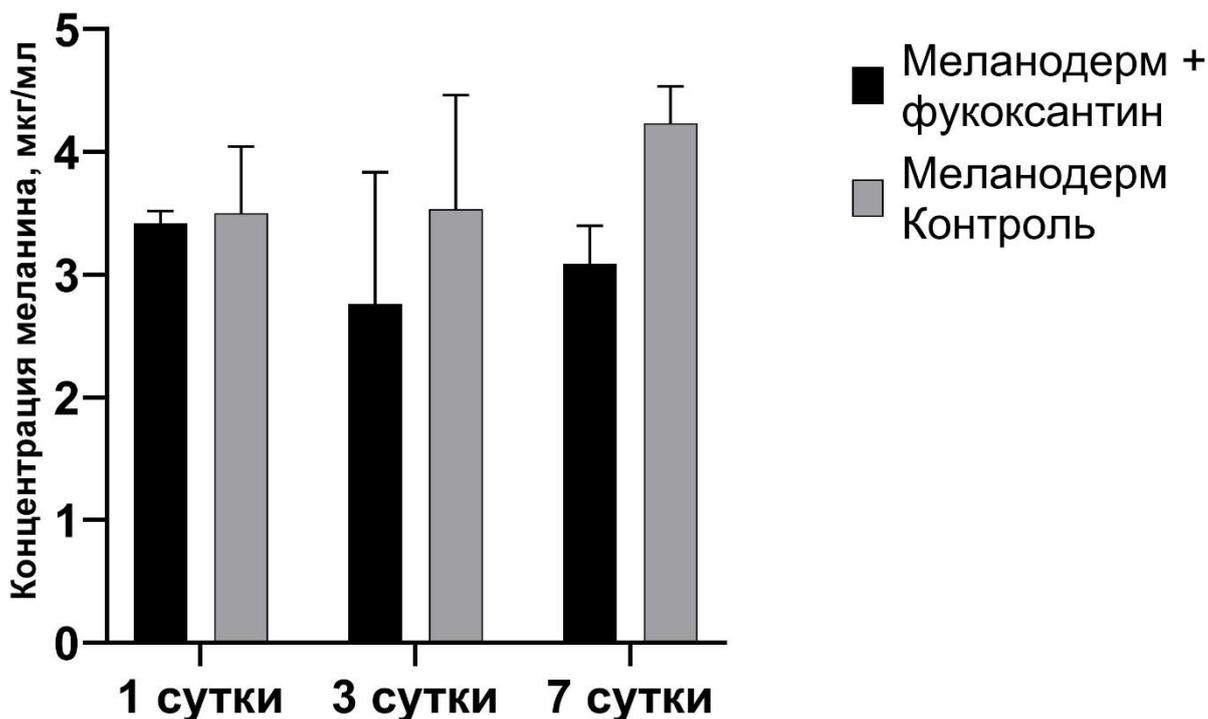


Рисунок 12. Динамика накопления меланина в тканевых эквивалентах Меланодерм в присутствии 5 μM фукоксантина (опыт) и без него (контроль). $n=3$

При дальнейшем культивировании эквивалента 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.

Снижение продукции меланина клетками на 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.

Таким образом, меланоциты, культивируемые в составе искусственно созданного тканевого эквивалента Меланодерм могут быть использованы в качестве альтернативы 2D культуры меланоцитов для исследований процессов, связанных с меланогенезом. А снижение уровня меланина в клетках,

культивированных в присутствии фукоксантина подтверждает адекватность модели.

3.2.2. Гистологический анализ тканевых эквивалентов Меланодерм в опыте и контроле

Результаты гистологического анализа образцов Меланодерм подтвердили, что меланоциты располагались в базальном слое эквивалента. В процессе культивирования в тканевых эквивалентах Меланодерм происходит увеличение количества меланоцитов (Рисунок 13А-В).

Однако, следует отметить, что количество меланоцитов к 7 суткам культивирования в контроле было выше. В опытной группе количество меланоцитов не изменялось, однако наблюдали перераспределение клеток в пределах ткани. Так если на 1 и 3 сутки меланоциты располагались в один ряд (Рисунок 13 Г, Д), то к 7 суткам наблюдали группировку пигмент-продуцирующих клеток в отдельно расположенные островки (Рисунок 13Е).

Полученные данные согласуются с ранее описанными и позволяют утверждать, что фукоксантин в невысоких и нетоксичных концентрациях не только тормозит рост меланоцитов на тканевом эквиваленте Меланодерм, но и снижает их функциональную активность по продукции и накоплению пигмента меланина. Изменение характера роста клеток при длительном культивировании и неравномерность их расположения, а также невозможность длительного культивирования без изменения функциональных характеристик может свидетельствовать о недостатках модели.

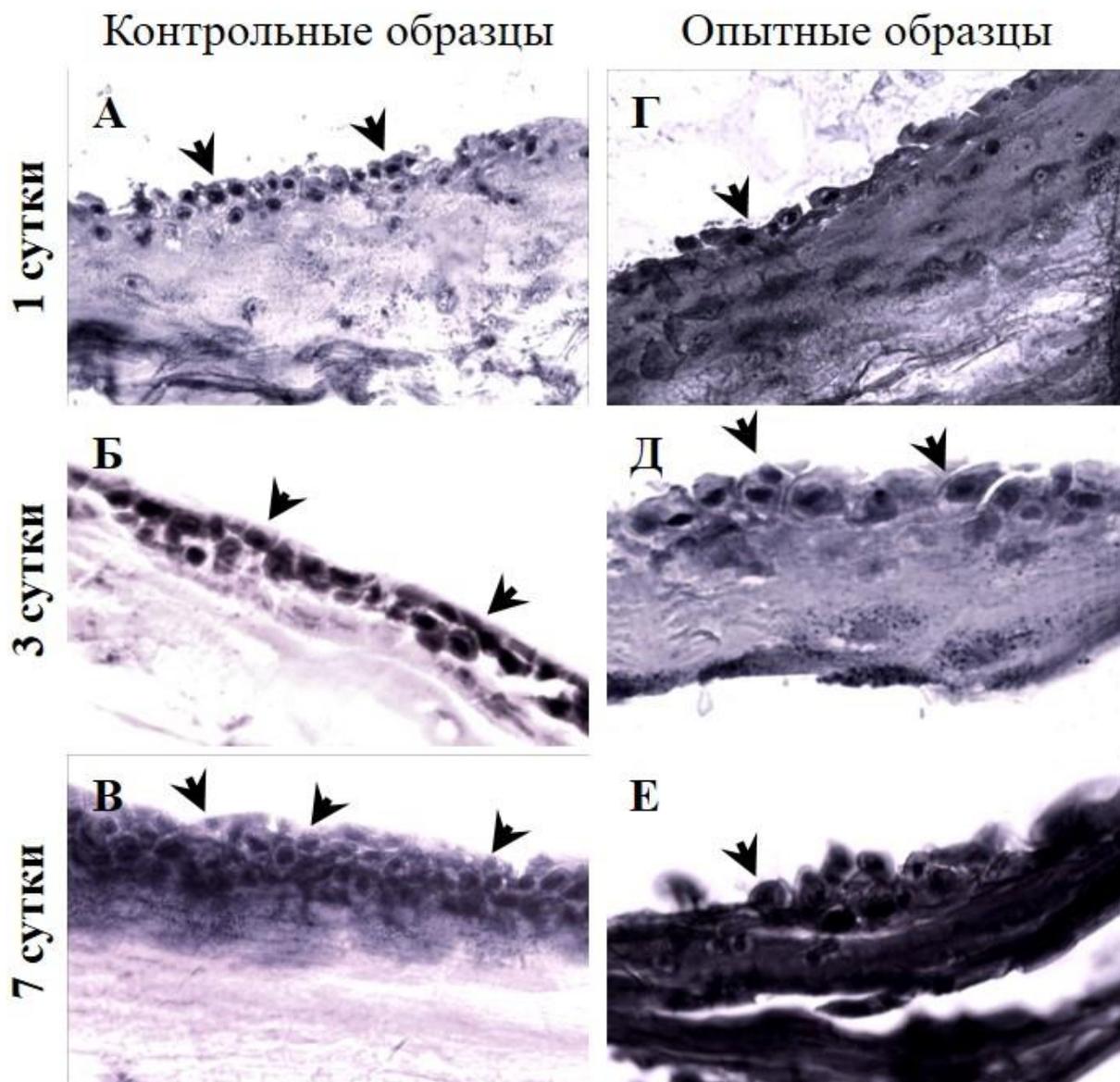


Рисунок 13. Гистологический анализ тканевых эквивалентов Меланодерм контрольной (А-В) и опытной (Г-Е) групп на 1, 3 и 7 сутки культивирования. Стрелками отмечены меланоциты. *Световая микроскопия, окрашивание гематоксилин-эозином*

3.2.3. Иммуноцитохимический анализ экспрессии ключевых факторов меланогенеза клетками тканевых эквивалентов Меланодерм в контрольной и опытной группах

Для оценки влияния препарата на экспрессию ключевых факторов меланогенеза *gp100*, *MITF* и *Sox10*, был проведен иммуноцитохимический анализ срезов тканевых эквивалентов Меланодерм, культивированных в питательной среде с добавлением $5\mu\text{M}$ фукоксантина (опыт) и без него (контроль).

Микрофотографии иммуноцитохимически окрашенных препаратов тканей на 1, 3 и 7 сутки культивирования представлены на рисунках 14-22.

3.2.3.1. Анализ экспрессии фактора gp100

Результаты визуального анализа показали, что различия в экспрессии меланоцитами фактора gp100, отвечающего за созревание меланосом, в первые 3 дня культивирования в контроле и в опыте не наблюдалось (Рисунок 14, 15). В обоих случаях отмечали низкий уровень его экспрессии. Однако на 7 сутки было выявлено значительное различие картин в опыте и контроле (Рисунок 16). Присутствие фактора gp100 было значительно более выраженным в контрольных образцах по сравнению с опытной группой.

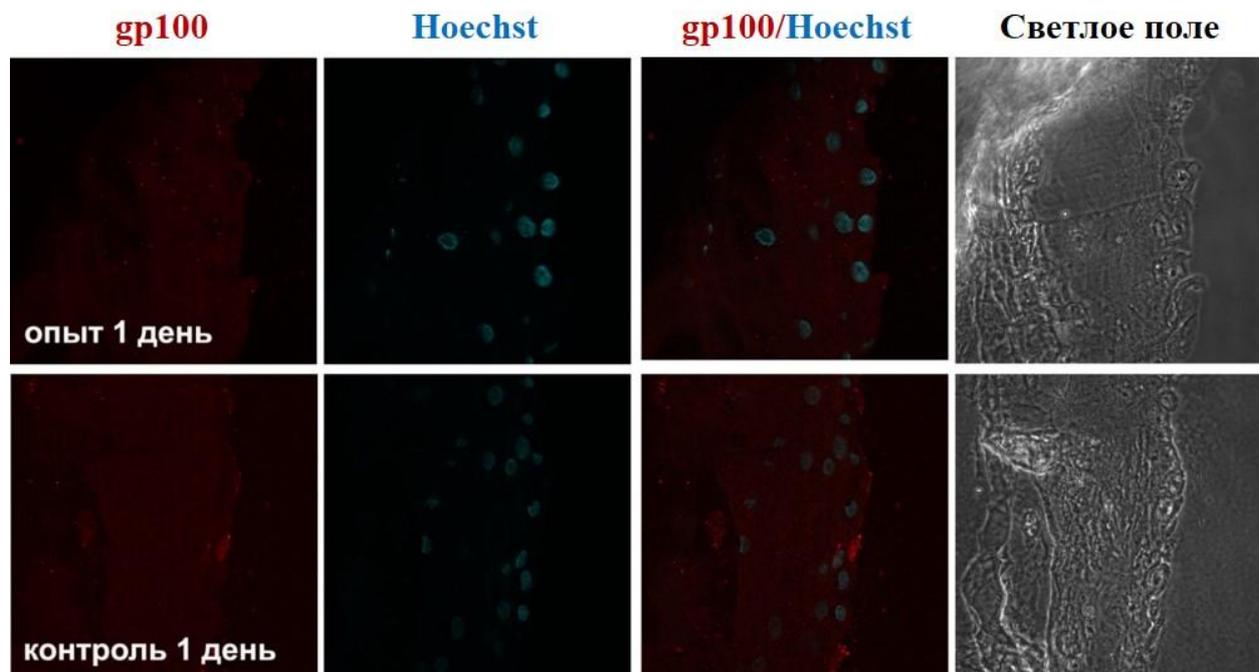


Рисунок 14. Экспрессия фактора gp100 (красный) на срезах тканевых эквивалентов опытной (5μМ фукоксантина) и контрольной групп на 1 сутки культивирования. Иммуноцитохимическое окрашивание, ядра докрашены красителем Hoechst 33258 (синий). Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

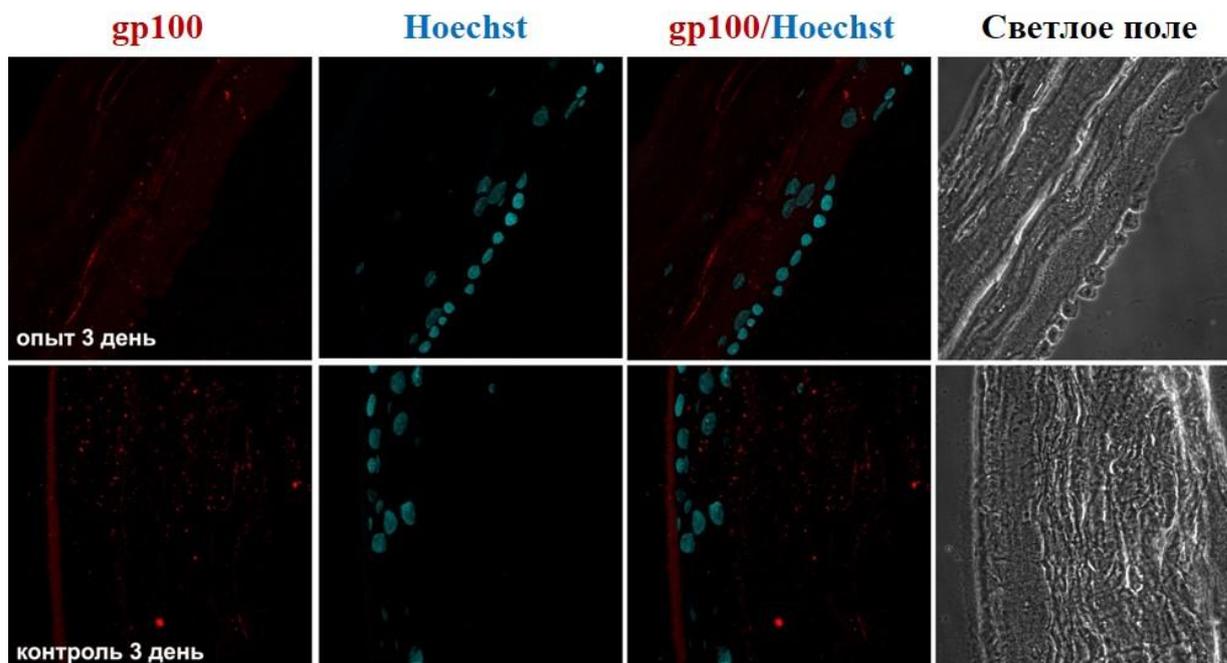


Рисунок 15. Экспрессия фактора gp100 (красный) на срезах тканевых эквивалентов опытной (5 μ M фукоксантина) и контрольной групп на 3 сутки культивирования. Иммуноцитохимическое окрашивание, ядра докрашены красителем Hoechst 33258 (синий). Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

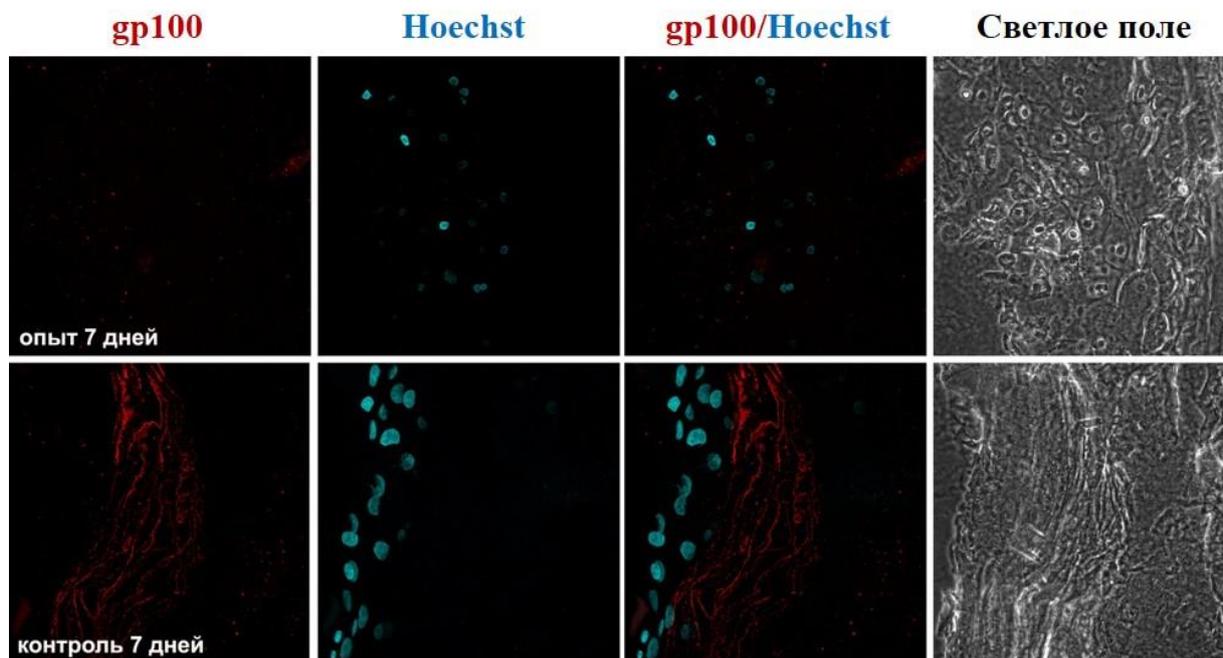


Рисунок 16. Экспрессия фактора gp100 (красный) на срезах тканевых эквивалентов опытной (5 μ M фукоксантина) и контрольной групп на 7 сутки культивирования. Иммуноцитохимическое окрашивание, ядра докрашены красителем Hoechst 33258 (синий). Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия.

Значительно менее выраженная экспрессия фактора gp100 на срезах тканевых эквивалентов Меланодерм, культивированных в течение 7 суток в присутствии 5μМ фукоксантина свидетельствует, по-нашему мнению, об ингибирующем влиянии препарата на процесс созревания меланосом.

3.2.3.2. Анализ экспрессии микрофталма транскрипционного фактора (MITF)

MITF является главным молекулярным фактором индукции дифференцировки и функциональной активности меланоцитов, определяет их идентичность и тесно связан с их развитием [118], 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 [124].

Как показали результаты иммуноцитохимического анализа, экспрессия MITF полностью отсутствовала в опытных образцах ткани на 1 сутки культивирования, поэтому на рисунке 17 представлены результаты только для контрольной группы, в которой уже на 1 сутки культивирования была выявлена активная экспрессия MITF.

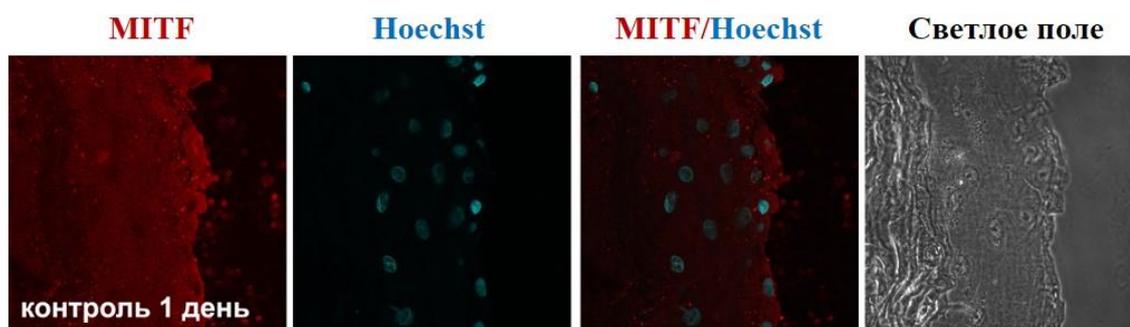


Рисунок 17. Экспрессия фактора MITF (красный) на срезах тканевых эквивалентов контрольной группы на 1 сутки культивирования. Иммуноцитохимическое окрашивание, ядра докрашены красителем Hoechst 33258 (синий). Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

Анализ препаратов Меланодерм после 3 и 7 суток культивирования показал, что в опытных образцах, культивированных с фукоксантином, на срезах выявлено незначительное увеличение уровня экспрессии MITF (Рисунок 18, 19).

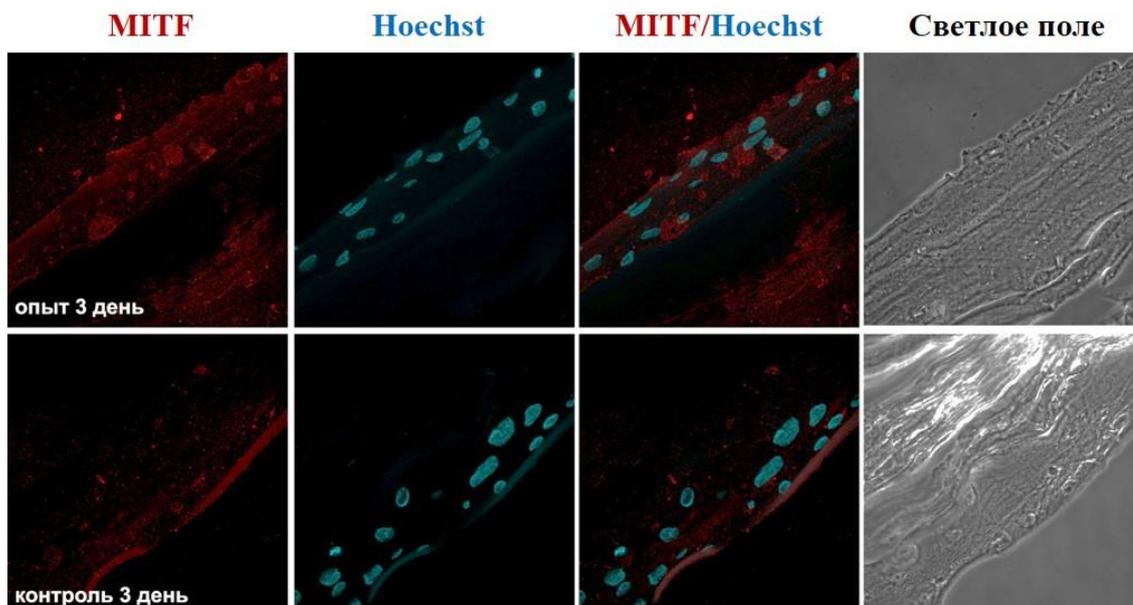


Рисунок 18. Экспрессия фактора MITF (красный) на срезах тканевых эквивалентов опытной (5μM фукоксантина) и контрольной групп на 3 сутки культивирования. Иммуноцитохимическое окрашивание, ядра докрашены красителем Hoechst 33258 (синий). Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

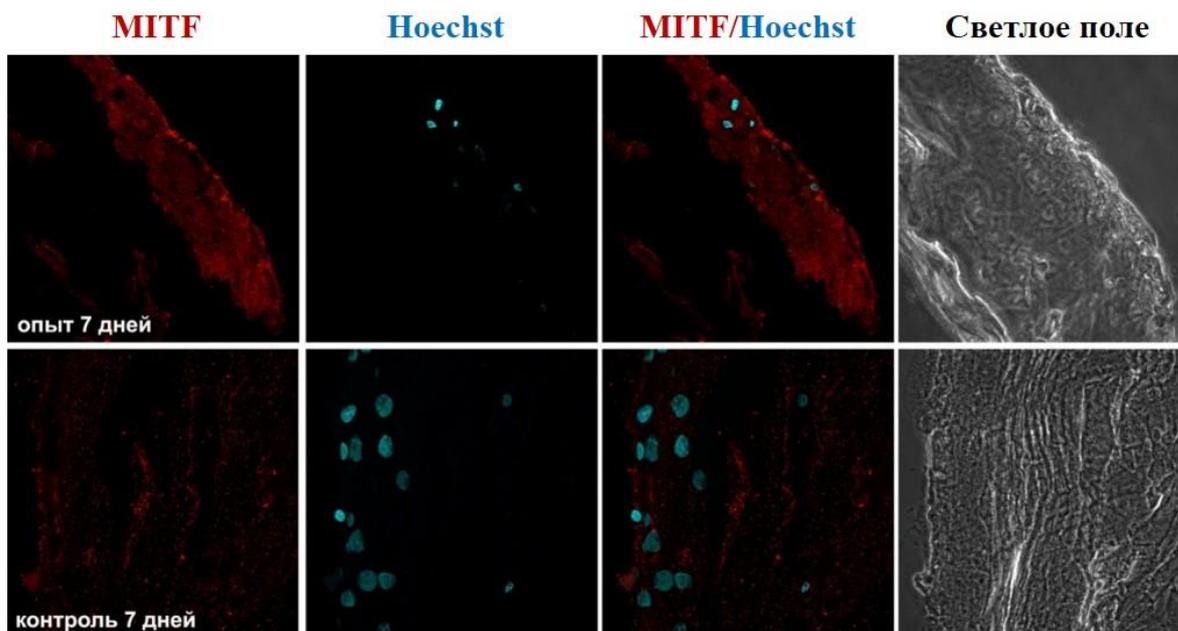


Рисунок 19. Экспрессия фактора MITF (красный) на срезах тканевых эквивалентов опытной (5μM фукоксантина) и контрольной групп на 7 сутки культивирования. Иммуноцитохимическое окрашивание, ядра клеток докрашены красителем Hoechst 33258 (синий). Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

Отсутствие MITF в опытной культуре в первые сутки и появление на третьи сутки позволяет предполагать, что при воздействии фукоксантином в опытной культуре 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.

3.2.3.3. Анализ экспрессии транскрипционного фактора Sox10

Из литературы известно, что образование бипотентных глиально-меланоцитарных клеток в значительной степени зависит от действия трех белков – Pax3, Sox10 и Wnt [56]. Кроме того, Sox10 является одним из основных факторов транскрипции, участвующих в регуляции меланогенеза, поэтому его экспрессия может свидетельствовать о зрелости и функциональной активности меланоцитов [34].

Результаты исследования уровня экспрессии Sox10 меланоцитами в контроле и в опытных образцах представлены на рисунках 20-22. Sox10 на 1 сутки культивирования экспрессировался в контрольных образцах и практически не выявлялся в опытных (Рисунок 20). Такую же закономерность наблюдали на 3 и 7 сутки культивирования (Рисунок 21 и 22).

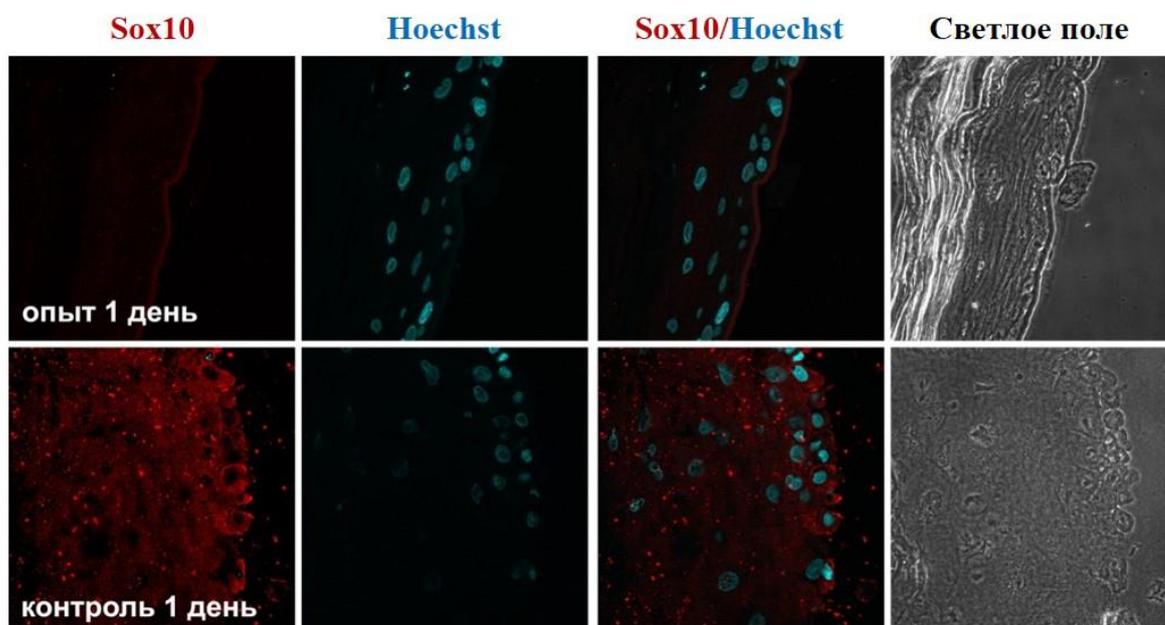


Рисунок 20. Экспрессия фактора Sox10 (красный) на срезах тканевых эквивалентов опытной (5μМ фукоксантина) и контрольной групп на 1 сутки культивирования. Иммуноцитохимическое окрашивание, ядра клеток докрашены красителем Hoechst 33258 (синий). Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

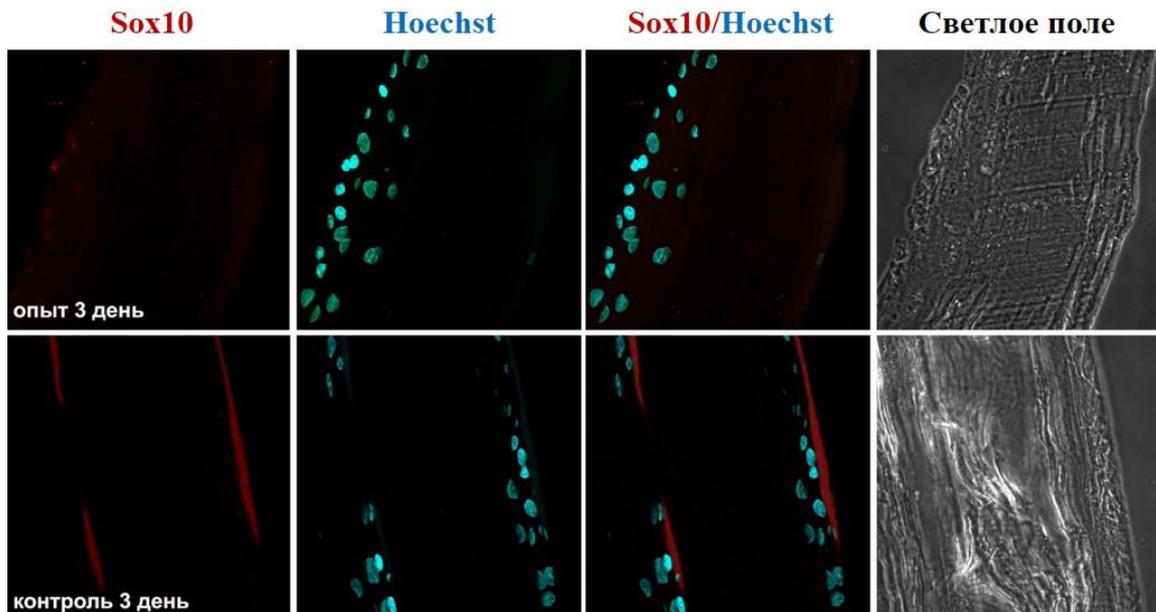


Рисунок 21. Экспрессия фактора Sox10 (красный) на срезах тканевых эквивалентов опытной (5 μ M фукоксантина) и контрольной групп на 3 сутки культивирования. Иммуноцитохимическое окрашивание, ядра клеток докрашены красителем Hoechst 33258 (синий). Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

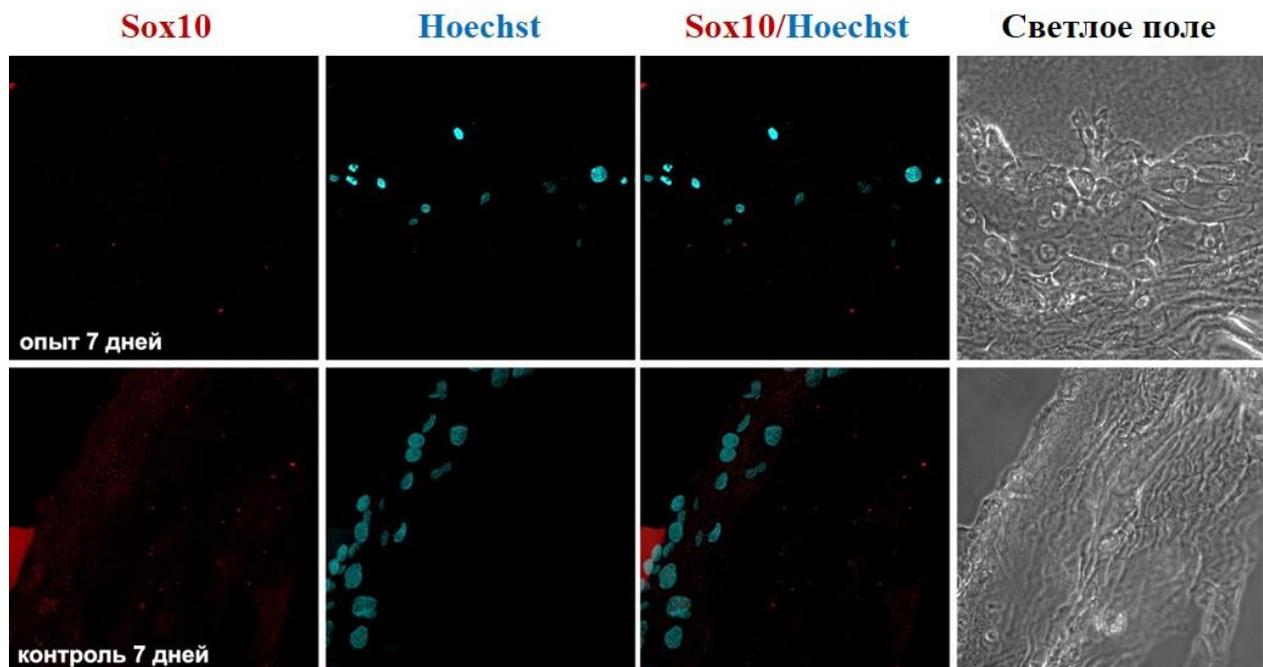


Рисунок 22. Экспрессия фактора Sox10 (красный) на срезах тканевых эквивалентов опытной (5 μ M фукоксантина) и контрольной групп на 7 сутки культивирования. Иммуноцитохимическое окрашивание, ядра клеток докрашены красителем Hoechst 33258 (синий). Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

Для подтверждения визуальной оценки экспрессии факторов gp100, MITF и Sox10 интенсивность флуоресценции на полученных изображениях анализировали в программе ImageJ. Проведенный обсчет 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 группе с добавлением 5μМ фукоксантина (Рисунок 23).

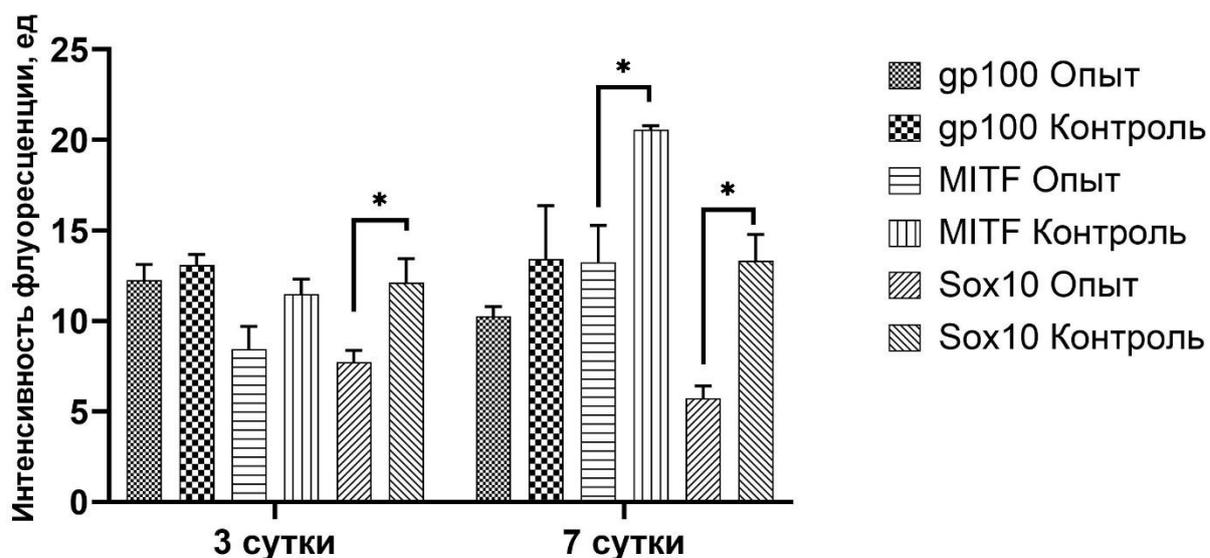


Рисунок 23. Количественная оценка флуоресценции на препаратах после иммуноцитохимического окрашивания срезов тканевых эквивалентов Меланодерм опытной и контрольной групп на 3 и 7 сутки культивирования. $n=3$, $*p<0.05$

Сложный многоэтапный процесс меланогенеза находится под контролем как эндогенных, так и экзогенных внешних факторов. Прямую регуляцию экспрессии MITF синергически осуществляют транскрипционные факторы Sox10 и PAX3 [20, 55]. Кроме того, как отмечено выше, Sox10 является одним из основных факторов транскрипции, поэтому снижение его экспрессии в присутствии фукоксантина может свидетельствовать о подавлении процесса меланогенеза.

Таким образом, результаты иммуноцитохимического анализа показали, что меланоциты в ткане-инженерном эквиваленте сохраняют функциональную активность по продукции пигмента, а снижение экспрессии таких транскрипционных факторов меланогенеза, как MITF и Sox10 подтверждают

ингибирующее действие фукоксантина на функциональную или пигмент-продуцирующую активность меланоцитов при длительном культивировании.

3.2.4. Исследование экспрессии генов MC1R и TYR клетками Меланодерма в контроле и опыте с добавлением фукоксантина

Известно, что MITF, как транскрипционный фактор, активирует экспрессию генов тирозиназы *TYR*, белка премеланосом PMEL 17 (gp100) и антиапоптотического фактора Bcl-2, что стимулирует синтез меланина на отдельных участках кожи [77].

Пигментный фенотип кожи в основном определяет рецептор к меланокортину 1 (MC1R). Активация гена этого рецептора его агонистами α -меланоцит-стимулирующим гормоном (α МСГ) и адренкортикотропным гормоном (АКТГ) стимулирует меланогенный каскад, приводящий к синтезу эумеланина. Таким образом, исследование экспрессии генов MC1R и TYR меланоцитами в тканевом эквиваленте в опыте и контроле позволяет получить новые данные о функциональной активности клеток и влиянию фукоксантина на таковую.

Результаты исследования экспрессии генов MC1R и TYR меланоцитами в тканевых эквивалентах Меланодерм представлены на рисунках 24 и 25. Как видно из рисунков, уровень экспрессии генов в ходе культивирования меланоцитов увеличивался к 7 дню, по сравнению с первыми сутками. В контроле экспрессия гена MC1R повышалась почти в 20 раз к концу культивирования, разница между контрольной и опытной группой была достоверна. В опытной культуре активность гена оставалась практически неизменной (Рисунок 24).

Экспрессия MC1R

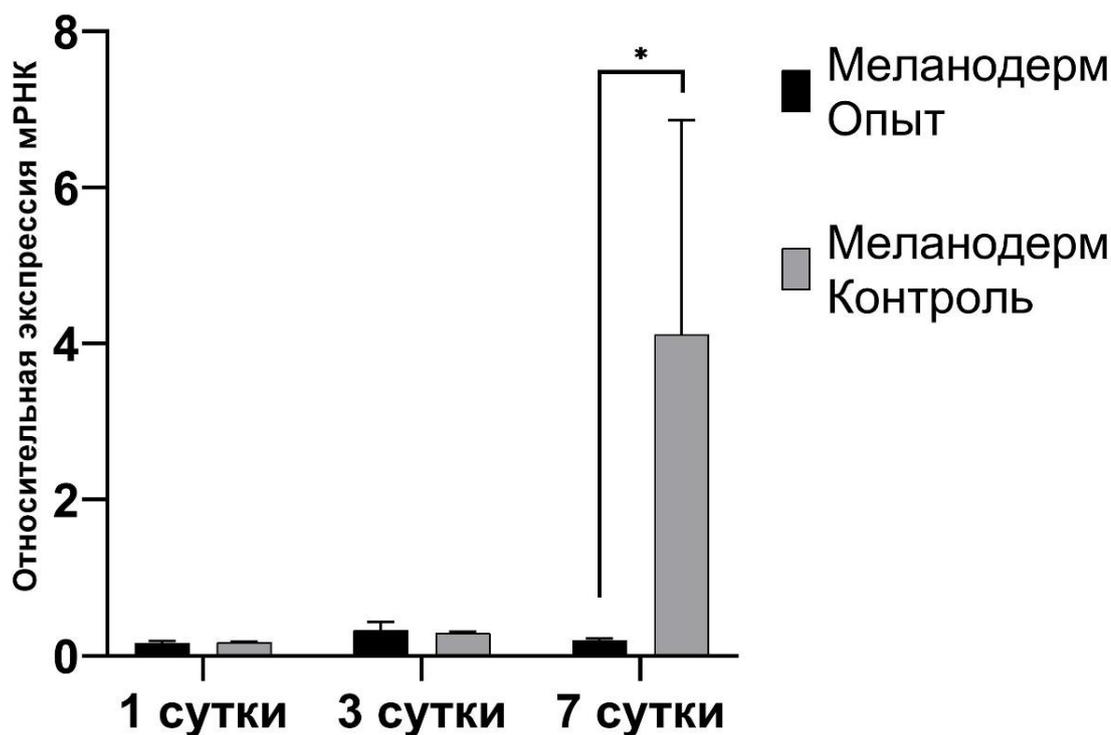


Рисунок 24. Экспрессия гена MC1R в тканевых эквивалентах Меланодерм в опытной группе с добавлением 5μМ фукоксантина и в контрольной группе. Метод ПЦР в реальном времени, $n=3$ * $p<0,05$ в сравнении с контрольной группой.

Аналогичную картину наблюдали и при анализе экспрессии гена тирозиназы (TYR). Как видно из рисунка 25 экспрессия гена TYR в контрольной группе усиливалась при увеличении сроков культивирования, в то время как в опытной группе оставалась практически неизменной при культивировании в присутствии фукоксантина (Рисунок 25). Однако достоверной разницы в экспрессии гена тирозиназы в опытной и контрольной группах выявлено не было.

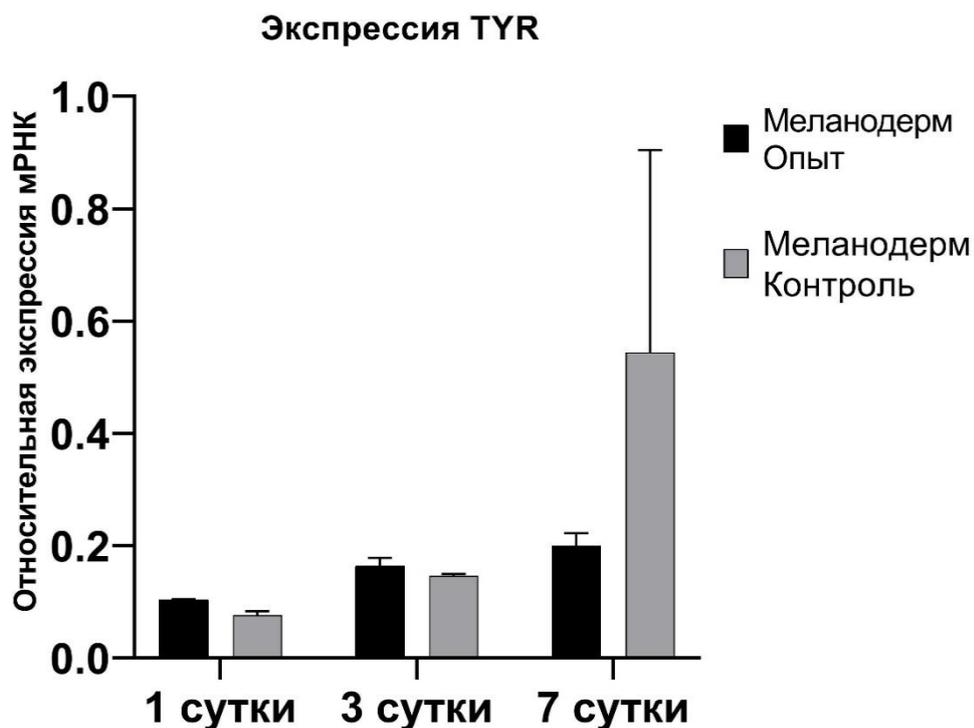


Рисунок 25. Экспрессия гена TYR в тканевых эквивалентах Меланодерм в опытной группе с добавлением 5 μ M фукоксантина и в контрольной группе. Метод ПЦР в реальном времени, $n=3$

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. Указанные выше факторы активируют комплекс Wnt белков, влияющих также на транскрипцию мастера MITF, который, в свою очередь, регулирует активность генов TyRP1, TyRP2 и TYR, кодирующих ключевые ферменты, которые участвуют в процессе меланогенеза. 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, снижается пигмент-продуцирующую активность меланоцитов.

Таким образом, данные экспериментального исследования свидетельствуют о том, что пигмент-продуцирующая активность меланоцитов в тканеинженерной конструкции сохраняется. А подавление экспрессии генов TYR и MC1R при применении фукоксантина подтверждает пригодность Меланодерма в качестве модели для исследования разных факторов или препаратов, влияющих на меланогез.

3.3. 3D культура меланоцитов в сфероидях

3.3.1. Формирование сфероидов из меланоцитов кожи человека в 3D культуре и исследование динамики накопления в них меланина в контроле или в присутствии препарата

Клетки третьего пассажа помещали на неадгезивные агарозные планшеты с лунками диаметром 400 мкм для получения 3D культуры меланоцитов в виде сфероидов. С использованием метода прижизненной цейтраферной микроскопии на приборе Cell IQ (СМ Technologies, Финляндия) наблюдали за динамикой формирования сфероидов из меланоцитов в присутствии препарата и без него.

Данные фоторегистрации этапов формирования сфероидов из суспензии меланоцитов в неадгезивных 3D условиях в стандартной ростовой среде (контроль) и в среде с добавлением фукоксантина в концентрации 5μМ (опыт) представлены на рисунке 26.

Как видно из рисунка 26, в процессе культивирования меланоцитов в 3D условиях наблюдались общие закономерности процесса сфероидогенеза. Первоначальная компактизация клеток происходила уже в первые сутки культивирования, уплотнение продолжалось до 7 суток. При этом визуальная оценка показала, что в сфероидях контрольной группы (в ростовой среде без добавления препарата) происходило более выраженное накопление меланина в центральной зоне сфероидов.

Сфероиды опытной группы (с добавлением препарата фукоксантин) к седьмым суткам культивирования также становились более компактными. Разность интенсивности пигментации визуально определялась не четко, однако

при наблюдении под микроскопом можно было отметить более темную окраску контрольных сфероидов.

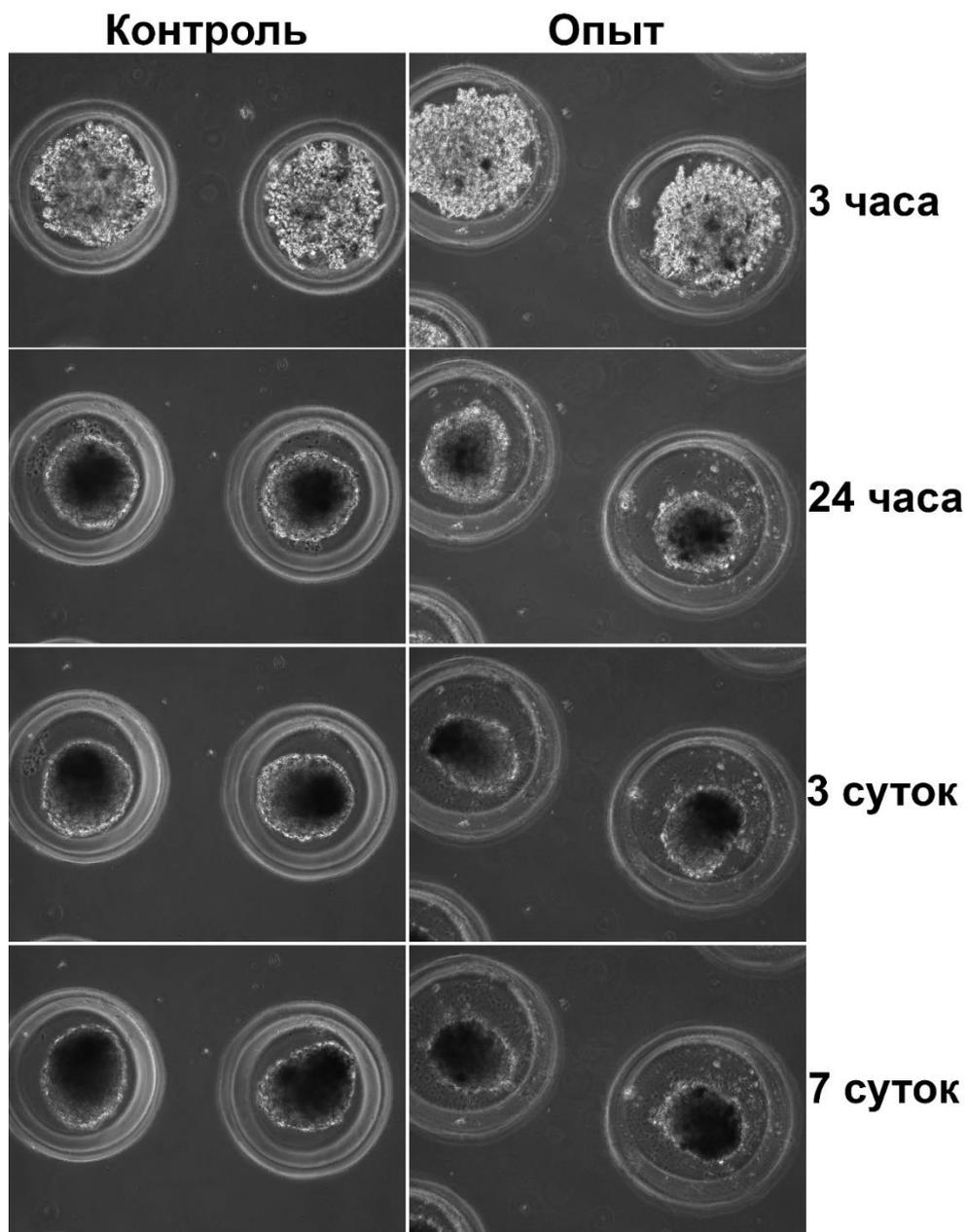


Рисунок 26. Динамика формирования сфероидов из суспензии меланоцитов в неадгезивных 3D условиях в стандартной ростовой среде (контроль) и в среде с добавлением фукоксантина в концентрации $5\mu\text{M}$ (опыт). Фазово-контрастная прижизненная цейтраферная микроскопия (Cell-IQ, CM Technologies, Финляндия).

Данные спектрофотометрии подтвердили визуальную оценку интенсивности синтеза меланина в контрольных и экспериментальных сфероидах. Как показано на рисунке 27, 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 сфероиды был достоверно ниже, чем в контрольной группе (Рисунок 27).

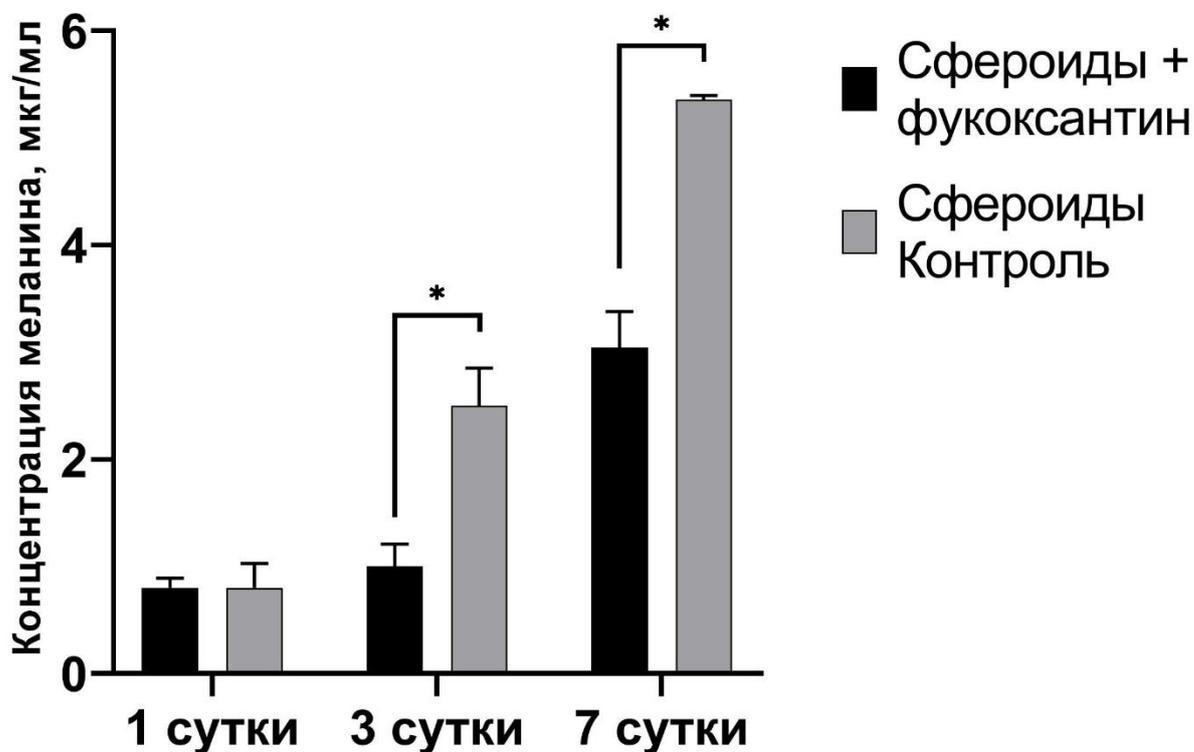


Рисунок 27. Динамика накопления меланина в сфероиды из меланоцитов в присутствии 5μМ фукоксантина (опыт) и без него (контроль). *Спектрофотометрия, n=3, *p<0,05*

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, их жизнеспособность, однако достоверно подавляет в них процесс синтеза меланина.

3.3.2. Иммуноцитохимический анализ сфероидов из меланоцитов контрольной и опытной групп

При анализе экспрессии транскрипционных факторов меланогенеза, было установлено, что в контрольной группе экспрессия gp100 (Рисунок 28-30), как и транскрипционного фактора MITF (Рисунок 31-33) увеличивалась уже к 3 суткам культивирования, достигая максимума к 7 суткам культивирования. В сфероиды

же под воздействием фукоксантина экспрессия gp100 и MITF на протяжении всего периода культивирования выявлялась на невысоком уровне и только в отдельных клетках.

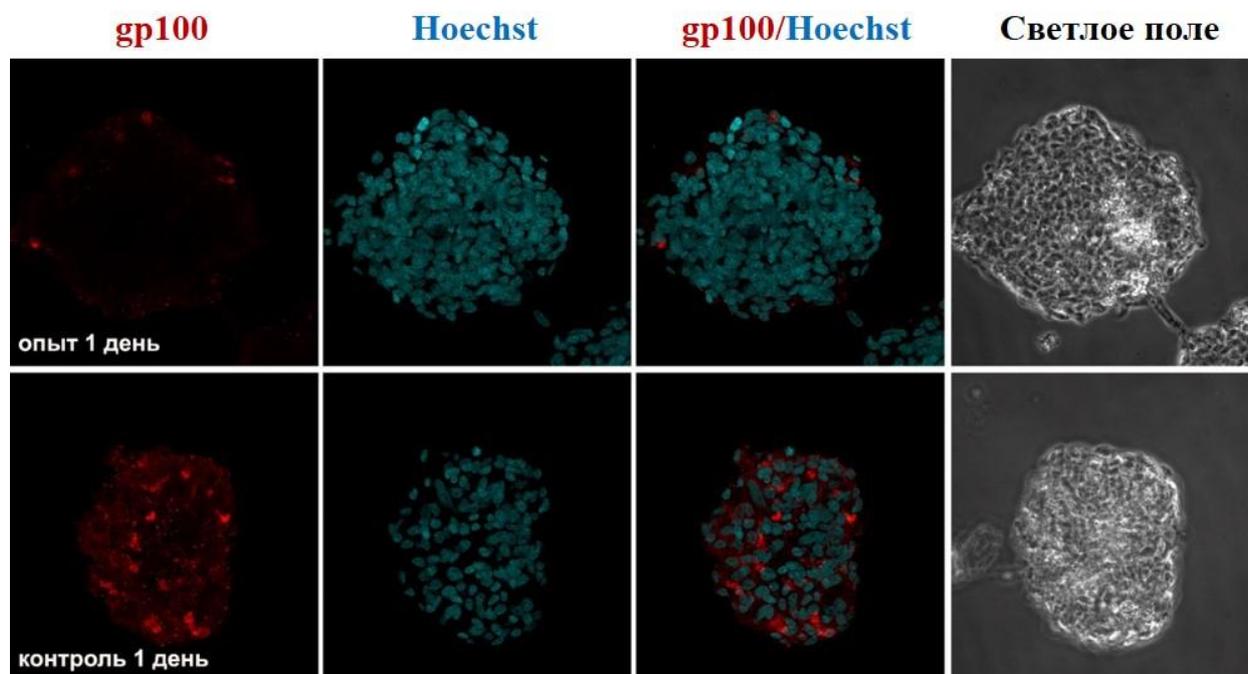


Рисунок 28. Экспрессия фактора gp100 (красный) в сфероидах из меланоцитов человека опытной (5 μ M фукоксантина) и контрольной групп на 1 сутки культивирования. Иммуноцитохимическое окрашивание, ядра клеток докрашены красителем Hoechst 33258 (синий). Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

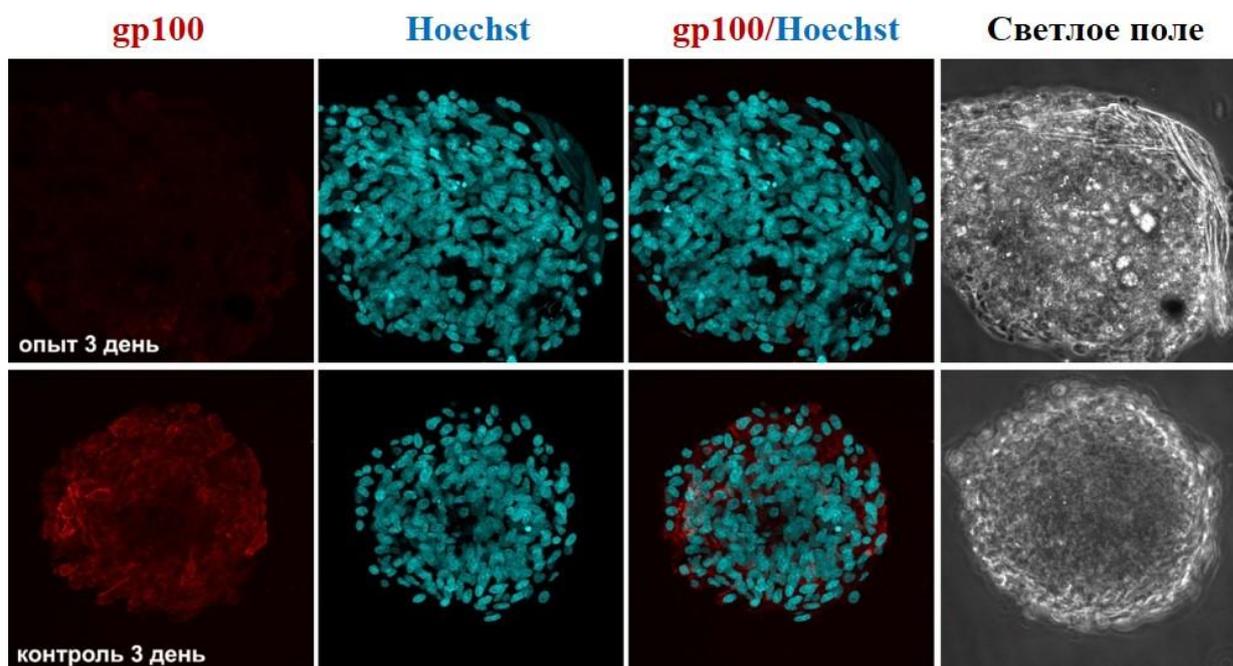


Рисунок 29. Экспрессия фактора gp100 (красный) в сфероидах из меланоцитов человека опытной (5µМ фукоксантина) и контрольной групп на 3 сутки культивирования. Иммуноцитохимическое окрашивание, ядра клеток докрашены красителем Hoechst 33258 (синий). Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

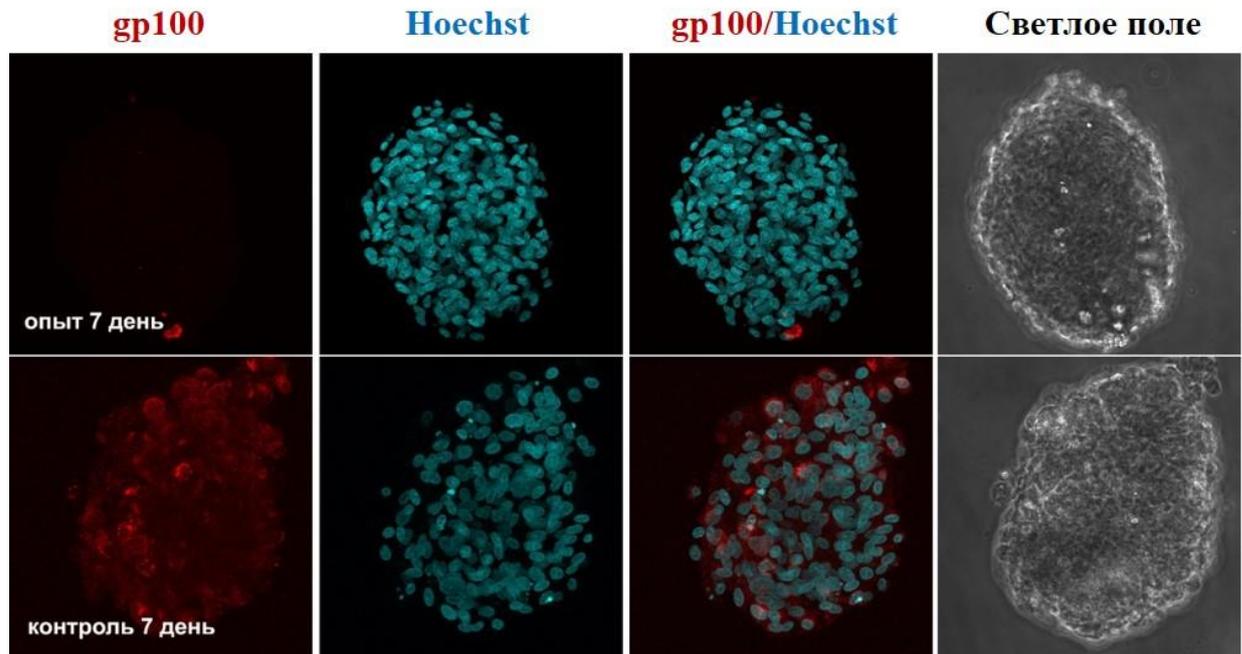


Рисунок 30. Экспрессия фактора gp100 (красный) в сфероидах из меланоцитов человека опытной (5µМ фукоксантина) и контрольной групп на 7 сутки культивирования. Иммуноцитохимическое окрашивание, ядра клеток докрашены красителем Hoechst 33258 (синий). Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

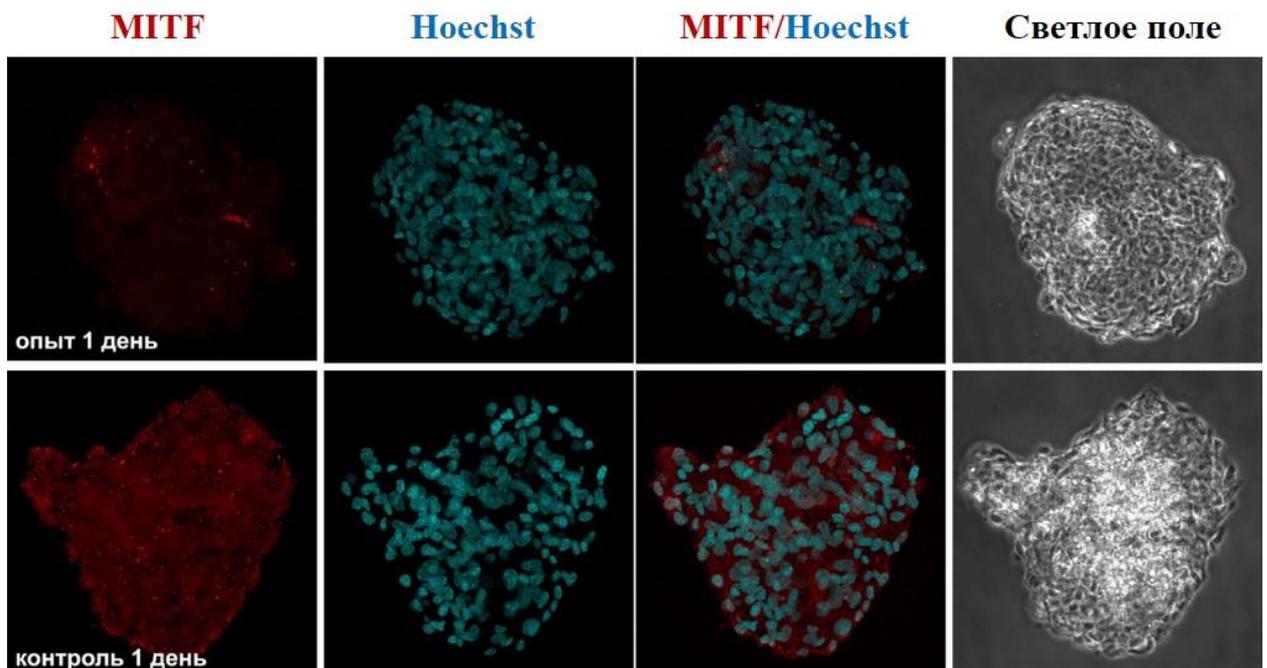


Рисунок 31. Экспрессия фактора MITF (красный) в сфероидах из меланоцитов человека опытной (5μM фукоксантина) и контрольной групп на 1 сутки культивирования. Иммуноцитохимическое окрашивание, ядра клеток докрашены красителем Hoechst 33258 (синий). Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

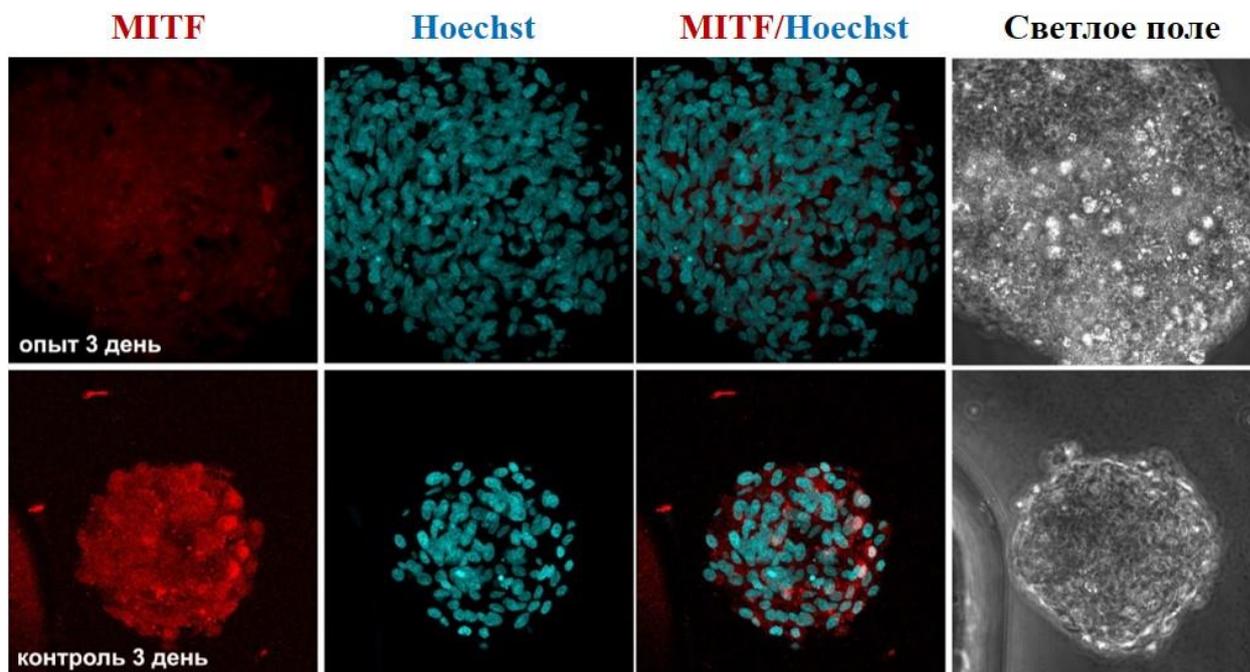


Рисунок 32. Экспрессия фактора MITF (красный) в сфероидах из меланоцитов человека опытной (5μM фукоксантина) и контрольной групп на 3 сутки культивирования. Иммуноцитохимическое окрашивание, ядра клеток докрашены красителем Hoechst 33258 (синий). Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

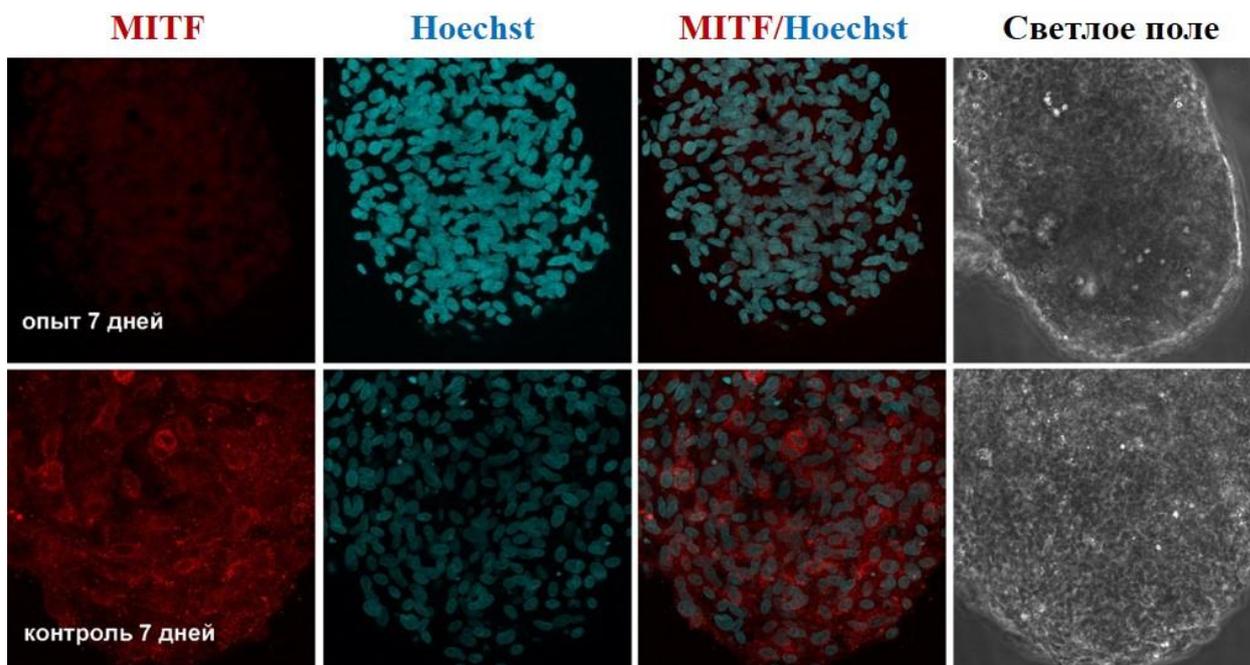


Рисунок 33. Экспрессия фактора MITF (красный) в сфероидах из меланоцитов человека опытной (5μM фукоксантина) и контрольной групп на 7 сутки культивирования. Иммуноцитохимическое окрашивание, ядра клеток докрашены красителем Hoechst 33258 (синий). Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

В отличие от данных по grp100 и MITF, экспрессию фактора Sox10 наблюдали в сфероидах обеих групп. При этом уровень его экспрессии увеличивался по мере культивирования (Рисунок 34-36). Однако динамика накопления фактора Sox10 различалась. Так в отличие от контроля экспрессия белка не наблюдалась в первые сутки культивирования меланоцитов в опыте и обнаруживалась только на третьи сутки. На 7 сутки роста клеток разницы в экспрессии фактора не выявлено.

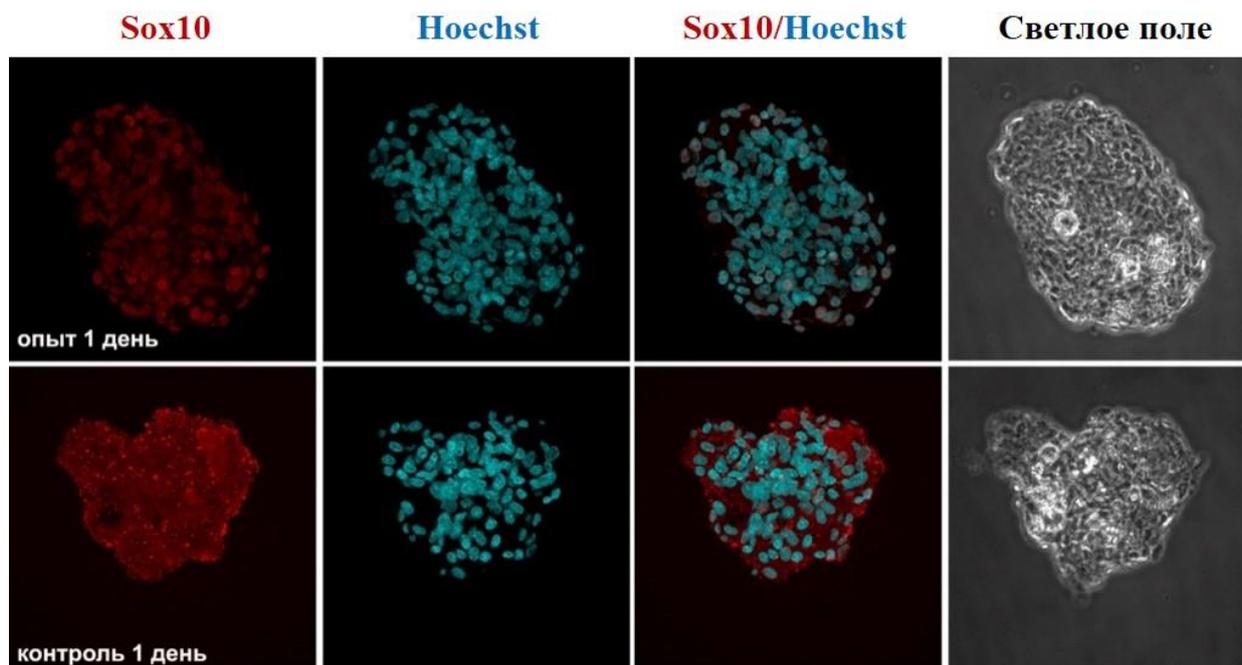


Рисунок 34. Экспрессия фактора Sox10 (красный) в сфероидах из меланоцитов человека опытной (5μM фукоксантина) и контрольной групп на 1 сутки культивирования. Иммуноцитохимическое окрашивание, ядра клеток докрашены красителем Hoechst 33258 (синий). Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

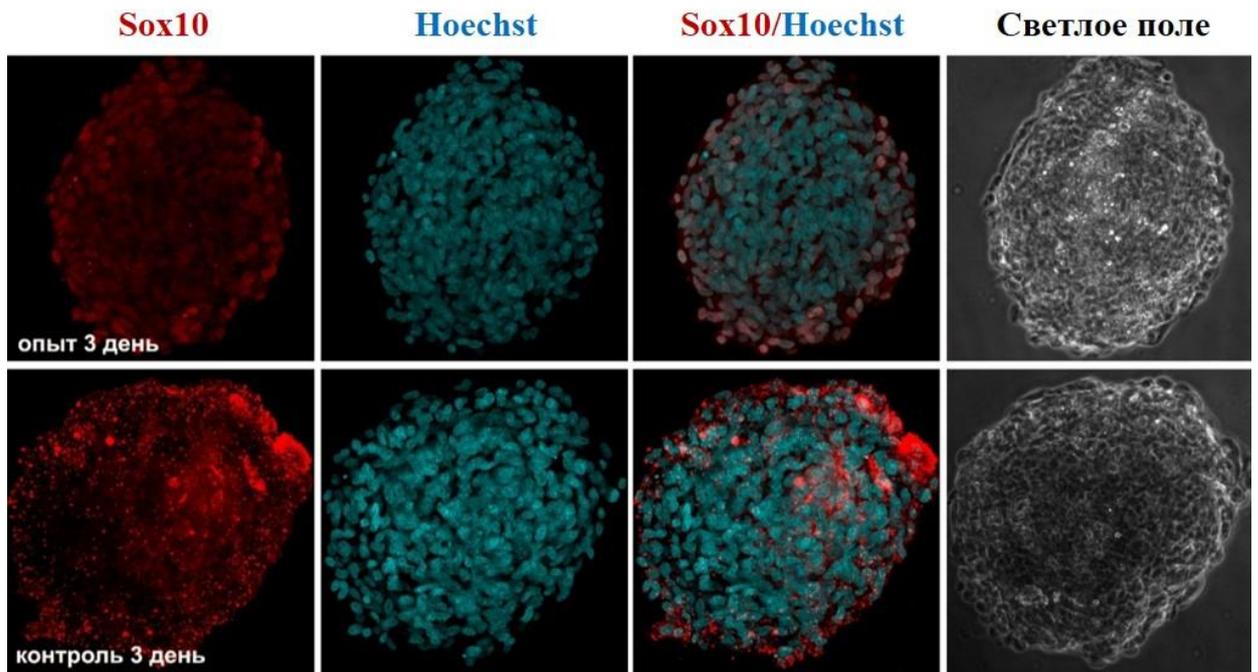


Рисунок 35. Экспрессия фактора Sox10 (красный) в сфероидах из меланоцитов человека опытной (5μМ фукоксантина) и контрольной групп на 3 сутки культивирования. Иммуноцитохимическое окрашивание, ядра клеток докрашены красителем Hoechst 33258 (синий). Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

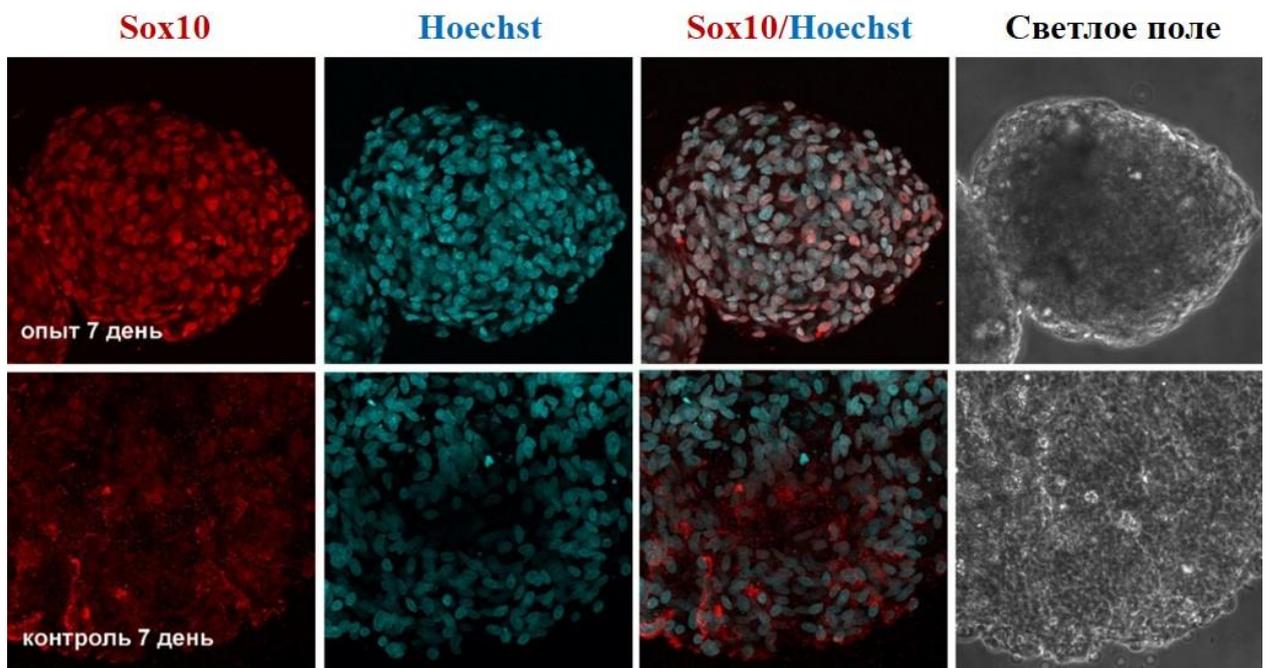


Рисунок 36. Экспрессия фактора Sox10 (красный) в сфероидах из меланоцитов человека опытной (5μМ фукоксантина) и контрольной групп на 7 сутки культивирования. Иммуноцитохимическое окрашивание, ядра клеток докрашены красителем Hoechst 33258 (синий). Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

Количественный анализ экспрессии ключевых факторов меланогенеза по интенсивности флуоресценции показал, что экспрессия gp100 была выше на 3-й и 7-й день культивирования в контрольной группе. Однако, достоверная разница между опытом и контролем была выявлена только на 7 сутки культивирования (Рисунок 28-30, 37).

Экспрессия MITF в сфероидах, культивированных в присутствии фукоксантина, так же была достоверно отличима от контрольной группы лишь на 7 сутки (Рисунок 31-33, 37). Разницы в экспрессии Sox10 между контрольной и опытной группами выявлено не было на всех сроках культивирования (Рисунок 34-37).

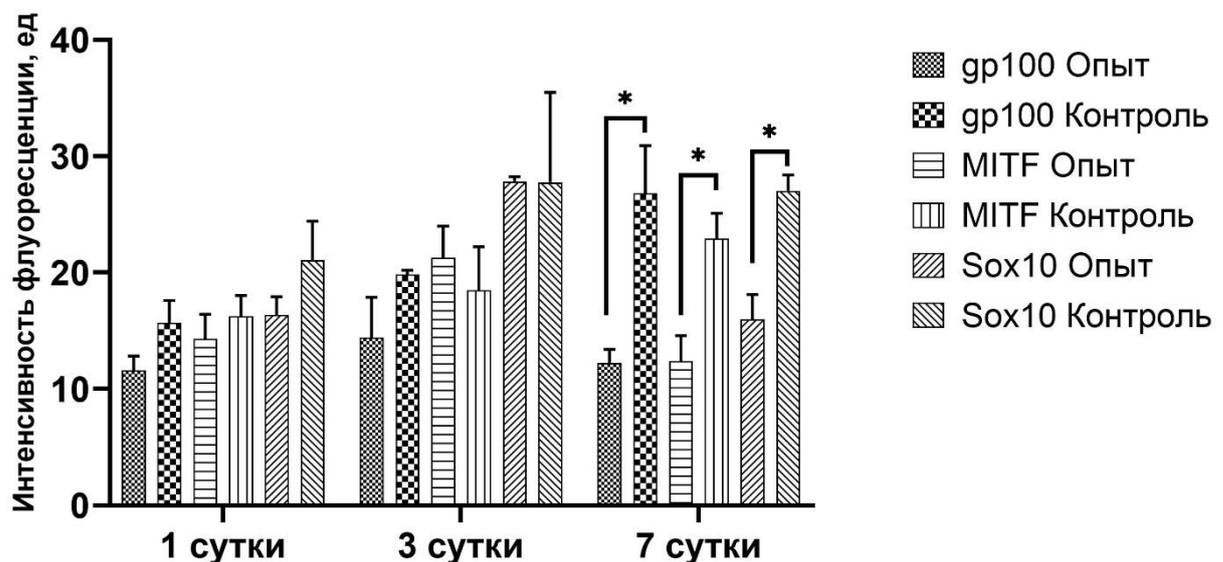


Рисунок 37. Анализ средней интенсивности флуоресценции на изображениях после иммуноцитохимического окрашивания сфероидов из меланоцитов человека в опытной (в присутствии фукоксантина) и контрольной группах, окрашенных антителами против gp100, MITF и Sox10 на 3 и 7 дни в 3D-культуре. * $p < 0,05$.

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 (сфероидов) 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 [77]. 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 (Рисунок 27).

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 высокочувствительно и адекватно реагируют на добавление ингибирующего фактора.

3.3.3. Исследование экспрессии генов MC1R и TYR в контрольных и опытных сфероидов из меланоцитов человека

Несмотря на множество усилий, условия регуляции пигментации кожи и волос до сих пор полностью не выявлены. Показано, что ультрафиолет активирует связывание ростовых факторов с цитокиновыми рецепторами на поверхности клеток, что запускает разные сигнальные пути, которые регулируют экспрессию множества генов [93]. Результаты исследования экспрессии генов MC1R и TYR в клетках опытной и контрольной групп представлены на рисунках 38 и 39. Как видно из рисунка 38, экспрессия гена MC1R в клетках контрольной и опытной культуры достоверно не отличалась.

В отличие от результатов, полученных на тканевом эквиваленте Меланодерм, в экспериментах с 3D-культивированием клеток в виде сфероидов

при добавлении препарата фукоксантин снижения уровня экспрессии гена MC1R1 не наблюдалось. К 7 суткам культивирования в опытных клетках уровень экспрессии MC1R был сопоставим с данными контрольной культуры (Рисунок 38).

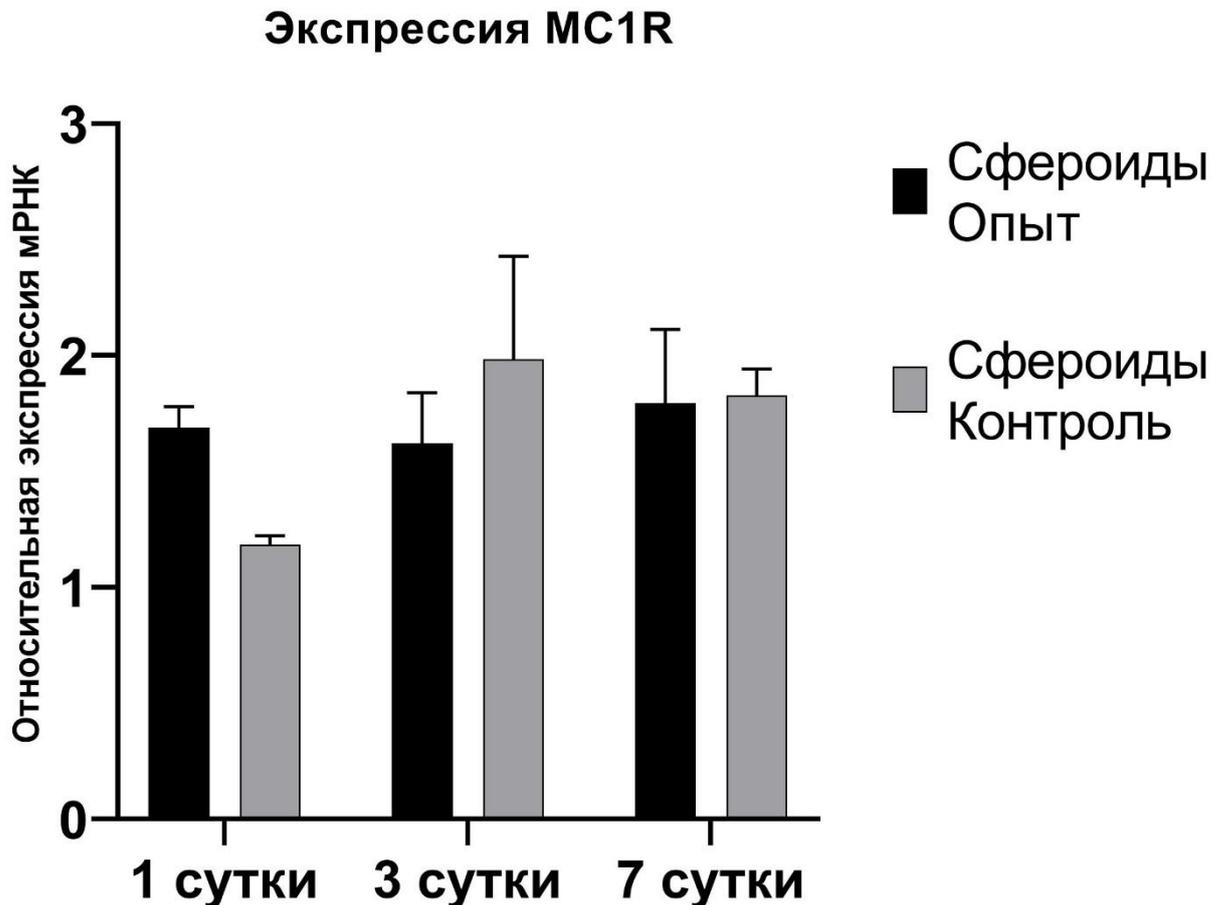


Рисунок 38. Экспрессия гена MC1R в меланоцитах человека, культивированных в сфероиде. Приведены средние значения \pm стандартное отклонение. Метод ПЦР в реальном времени.

Иную картину наблюдали при контроле активности гена тирозиназы (TYR) в меланоцитах, культивированных в сфероиде. Данные по экспрессии гена TYR представлены на рисунке 39, из которого видно, что активность гена под влиянием фукоксантина значительно и достоверно снижается к 7 суткам культивирования ($*p < 0,05$). Имеет место значительное подавление экспрессии гена TYR в опыте на 7 сутки, тогда как в контроле она сохраняется примерно на одном уровне в течение всего срока 3D культивирования (Рисунок 39).

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.

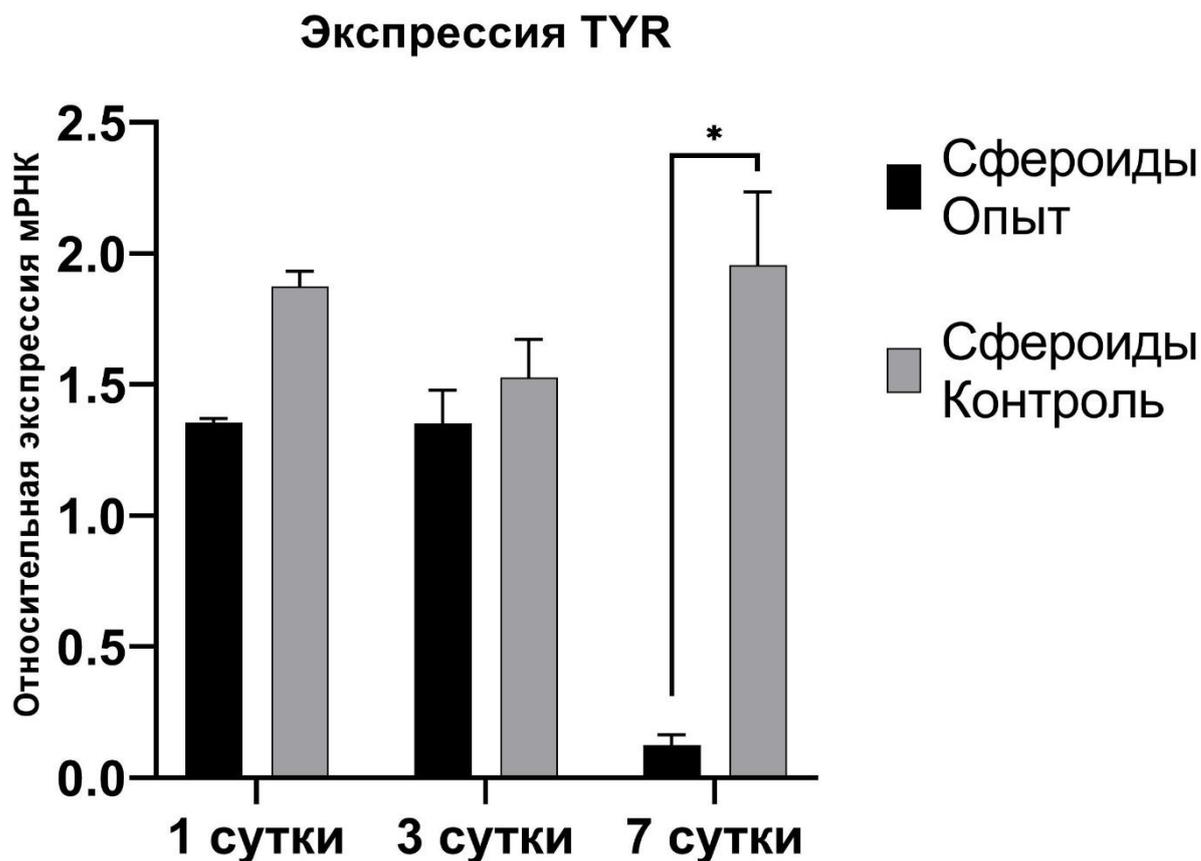


Рисунок 39. Экспрессия гена TYR в меланоцитах, культивированных в сфероидах. Приведены средние значения \pm стандартное отклонение. Метод ПЦР в реальном времени, $*p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой

Таким образом, анализ экспрессии генов MC1R и TYR показал, что фукоксантин способен подавлять экспрессию гена главного фермента тирозиназы. Shimoda Н. с соавторами показали, что фукоксантин ингибирует тирозиназу и снижает уровень мРНК MC1R и тирозиназа-зависимого рецептора 1, что еще раз подтверждает ингибирующий эффект препарата на продукцию пигмента[102].. При этом максимальный эффект воздействия препарата согласно нашим данным

достигается к 7 дню культивирования *in vitro*, что свидетельствует о накопительном эффекте препарата

3.4. Сравнительный анализ данных, полученных на моделях тканевого эквивалента Меланодерм и сфероидов из меланоцитов человека

При сравнении методов следует отметить, что каждый метод имеет свои преимущества и недостатки. Для более полного понимания токсичности или механизмов влияния препаратов на функциональную активность клеток ткани необходимо использование обоих методов. Если 2D культура проще в исполнении, то 3D культура позволяет получить данные о поведении клеток в микроокружении, более приближенному к нативному, что дает несомненные преимущества.

Известно, что культивирование клеток в монослойной культуре *in vitro* сопряжено с потерей тканеспецифичных маркеров клеток [92], в то время как 3D культивирование клеток в виде тканевых эквивалентов или сфероидов способствует сохранению их фенотипа и функциональности. При сфероидогенезе происходит восстановление межклеточных контактов, а также синтез тканеспецифических маркеров, что способствует восстановлению функциональной активности клеток.

В случае с монослойной культурой меланоцитов основным параметром, который можно оценивать, помимо экспрессии специфических маркеров, является изменение культуральных характеристик клеток, в частности, индекса пролиферации. При этом оценить функциональную активность в монослойной культуре затруднительно, поскольку клетки не накапливают синтезированный пигмент, а выбрасывают его в окружающую среду. Тогда как в 3D условиях – многослойных тканевых эквивалентах и компактных сфероидах, не только сохранялся синтез главных факторов меланогенеза, но и накапливался меланин. Неравномерность распределения и роста клеток в тканевом эквиваленте кожи наблюдали и другие авторы. Germain L. с соавторами отмечают слабый рост

меланоцитов в тканеинженерной конструкции в присутствии кератиноцитов, а также снижение пигмент-продуцирующей активности клеток [42]

Проведенное исследование по получению и культивированию из меланоцитов кожи человека в 3D культуре в виде сфероидов показало способность меланоцитов формировать плотные сфериды как контроле, так и в опыте и проследить динамику накопления в них пигмента меланина. При этом накопление пигмента было более выраженным по сравнению с таковым в тканевых эквивалентах Меланодерм за тот же период культивирования. Добавление препарата фукоксантина в невысокой (нетоксичной) дозе достоверно снижало уровень пигментации в сфероидах.

Результаты иммуноцитохимического анализа меланоцитов, выращенных в составе тканевого эквивалента и в виде сфероидов, показали наличие в них специфических маркеров меланогенеза: gp100, MITF и Sox10 при длительном культивировании. При культивировании меланоцитарных клеток в тканевой конструкции Меланодерм в присутствии фукоксантина показано достоверное снижение экспрессии транскрипционных факторов меланогенеза MITF и Sox10, что подтверждает ингибирующее действие фукоксантина на функциональную или пигмент-продуцирующую активность меланоцитов при культивировании.

В экспериментах с культивированием тканевых конструкций Меланодерм в опытных образцах экспрессия транскрипционных факторов была менее выражена, чем в сфероидах из меланоцитов, что позволяет утверждать, что культивирование меланоцитов в виде сфероидов является более удачной и функциональной моделью, так как клетки находятся в тесном контакте между собой, частично восстанавливается микроокружение, характерное для нативной ткани. Вероятно, именно это позволило впервые показать возможность влияния фукоксантина на фактор созревания меланосом gp100. Модели 2D и 3D культур могут быть успешно использованы как тест-системы для оценки эффективности препаратов, направленных на регуляцию уровня пигментации кожи.

Сравнение результатов, полученных на модели тканевого эквивалента и 3D культур меланоцитов, показало, что в контрольных образцах на протяжении всего

периода культивирования сохранялась экспрессия специфических генов TYR и MC1R, при этом в относительных количествах мРНК, уровень этих генов был выше в сфероидах, за исключением резкого роста уровня MC1R в тканевом эквиваленте на 7 сутки.

Полученные результаты еще раз подтверждают, что меланоциты *in vitro* способны формировать длительноживущие, жизнеспособные 3D структуры — сфероиды, с сохранением фенотипа и синтеза тканеспецифичных маркеров, подтверждающих их высокую функциональную активность, более выраженную, чем в коммерческих тканевых эквивалентах кожи. Это, вероятно, связано с тем, что сфероиды состоят только из одного типа клеток, количество которых можно регулировать, что делает эту систему более пластичной и чувствительной к воздействию специфических внешних факторов.

Анализ экспрессии генов MC1R и TYR в присутствии фукоксантина в сфероидах из меланоцитов показал, что фукоксантин способен подавлять экспрессию гена тирозиназы. В тканевых эквивалентах достоверная разница была выявлена в уровне мРНК MC1R в контрольной и опытной группах. При этом максимальный эффект препарата достигался к 7 дню культивирования *in vitro*, что свидетельствует о накопительном эффекте.

Согласно данным других авторов фукоксантин ингибирует тирозиназу и снижает экспрессию мРНК MC1R и тирозиназа-зависимого рецептора 1, а также оказывает противовоспалительное воздействие — снижает уровень мРНК циклооксигеназы 2 (COX-2) и рецептора к простагландину 1 (EP1) [102], что совпадает с нашими данными и еще раз подтверждает ингибирующий эффект препарата на продукцию пигмента и подтверждает пригодность и наибольшую эффективность применения модели 3D культуры меланоцитов для исследования.

Полученные результаты подтверждают избирательность воздействия исследуемого препарата: он подавляет созревание меланосом и интенсивный синтез меланина. Следовательно, фукоксантин не способен вызвать тяжелые патофизиологические осложнения, что имеет большое научное и практическое значение и позволяет рекомендовать его для использования в качестве

высокоэффективного лечебного или профилактического препарата, влияющего на процессы нормального и/или патологического меланогенеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пигментация – одно из самых малопонятных заболеваний кожи, сложных в лечении и получении хорошего результата. При выборе препаратов для профилактики или коррекции нарушений пигментации кожи необходимо глубокое понимание процессов, происходящих на клеточном и молекулярном уровне.

Сравнительный анализ меланоцитов, культивированных в монослое разное число пассажей, показал значительные изменения характеристик клеток. Изменение морфологии высокодифференцированных меланоцитов, а также снижение продуктивной активности и скорости роста клеток с увеличением числа пассажей *in vitro*, свидетельствуют, по-нашему мнению, о процессах старения клеток в монослойной культуре.

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

В отличие от монослойного культивирования клеток, как правило, сопряженного с потерей тканеспецифичных маркеров, при 3D культивировании клеток в виде тканевых эквивалентов или сфероидов происходит восстановление межклеточных контактов, а также синтез тканеспецифических маркеров, что способствует восстановлению их фенотипа и функциональной активности. В связи с этим, провели сравнительное исследование влияния фукоксантина на два типа трехмерных культур, содержащих меланоциты человека.

В тканевом эквиваленте Меланодерм за 7 суток не наблюдали как значительного увеличения пигментации в контрольной группе, так и снижения продукции меланина клетками в присутствии фукоксантина. Помещение суспензии меланоцитов в неадгезивные условия приводило к формированию другого типа 3D культуры – сфероидов, в которых методом прижизненной

цейтраферной микроскопии удалось проследить динамику компактизации и накопления в них пигмента меланина.

Исследование на модели культуры клеток позволило получить уникальные данные как на клеточном, так и на молекулярном уровне и проанализировать экспрессию ключевых факторов меланогенеза. Сравнение результатов, полученных на двух 3D клеточных моделях, показало, что в сфероиды контрольной группы наблюдали поддержание на высоком уровне экспрессии специфических генов TYR и MC1R, а также синтеза белков, участвующих в меланогенезе — gp100, MITF и Sox10.

Полученные данные доказывают, что меланоциты *in vitro* способны формировать длительно живущие, жизнеспособные 3D структуры — сфериды, 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 сфероиды. Это, по всей видимости, связано с тем, что в сфериды состоят только из исследуемого типа клеток – меланоцитов, в то время как в составе тканевого эквивалента содержатся два типа клеток. Это делает сфериды более доступной и функциональной моделью. Модели 2D и 3D культур могут быть успешно использованы как тест-системы для оценки эффективности препаратов, направленных на регуляцию уровня пигментации кожи.

Так, воздействие фукоксантина приводило к снижению активности гена основного фермента, обеспечивающего синтез меланина, – тирозиназы в сфероиды и MC1R в тканевых эквивалентах, что подтверждает его ингибирующее влияние на процесс меланогенеза. А подавление синтеза тирозиназы, по-видимому, происходило в результате ингибирования транскрипционного фактора MITF. Кроме того, впервые было показано, что фукоксантин способен подавлять экспрессию фактора регуляции созревания меланосом gp100.

Таким образом, в ходе исследования фукоксантин проявил себя как препарат с высокой биологической активностью. Установлено, что в нетоксичных

концентрациях он подавляет пролиферацию меланоцитов в монослойной культуре. Полученные результаты показывают избирательность воздействия исследуемого препарата, что имеет большое научное и практическое значение и позволяет рекомендовать его для использования в качестве высокоэффективного лечебного или профилактического препарата, влияющего на процессы нормального и/или патологического меланогенеза.

Результаты исследований подтвердили, что 3D культура меланоцитов может быть использована как тонкий высокочувствительный метод контроля токсичности препаратов и проведения дальнейших исследований для подбора оптимальных концентраций при создании косметических и лечебных препаратов.

Высокоперспективный для лечения и защиты кожи человека препарат фукоксантин в высоких концентрациях может быть цитотоксичным для нормальных эукариотических клеток, что подтверждено по изменению морфологии меланоцитов и снижению их пролиферативной активности.

Исследование ключевых факторов, участвующих в процессе меланогенеза, а также механизмов изменения функциональной активности меланоцитов кожи человека позволяют получить новые данные о патогенезе нарушений пигментации, разработать новые высокоэффективные препараты для профилактики и терапии заболеваний, в том числе рака кожи, а также бороться с проблемами возрастных изменений. Возможность использования фукоксантина в качестве препарата, влияющего на пигментные клетки кожи человека, что делает его перспективным для лечения нарушений пигментации кожи, включая старческие пигментные пятна.

Впервые полученные данные о влиянии растительного пигмента фукоксантина на процессы изменения функциональной активности меланоцитов кожи человека в разных моделях позволят создавать новые методы лечения нарушений пигментации или бороться с проблемами возрастных изменений.

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 *gp100*, *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 *gp100*.
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 СОКРАЩЕНИЙ

2D культура – монослойная культура клеток (two-dimensional cell culture)

3D – культура клеток в сфероидах (three-dimensional cell culture)

BMP4 – костный морфогенетический белок 4

CIP1 – белок, взаимодействующий с циклин-зависимой киназой (Cdk-interacting protein)

COX-2 – циклооксигеназа 2

Dct – допахром тауроменаза

DOPA – 3,4-дигидроксифенилаланин

EDN3 – эндотелин 3

EGF – эпидермальный фактор роста

EP1 – рецептор к простагландину 1

ET-1 – эндотелин 1

EVT3 – эндотелин 3

FBS – сыворотка крови плодов коровы

FGF – фактор роста фибробластов

HFSC – стволовые клетки волосяного фолликула

HMB45 – маркер клеток меланомы человека (Human Melanoma Black)

ИЛ-1 β (ИЛ 1) – интерлейкин 1-бета

KIT – рецептор тирозинкиназы

KGF – кератиноцит-стимулирующий фактор роста

MAP – митоген-активированный белок (mitogen-activated protein)

MC1R – рецептор меланокортина-1

MITF – микрофальма транскрипционный фактор

NMDA – N метил D-аспартат

PAH – фенилаланингидроксилаза

PAX3 – фактор транскрипции (paired-box 3)

PMEL 17 – премеланосомный белок 17

SOX10 – фактор транскрипции (sex-determining region Y (SRY)-box 10)

PCNA – антиген пролиферирующих клеток

SCF – фактор стволовых клеток

TGF – трансформирующий фактор роста

TNI – изоформа тирозингидроксилазы I

TIMP 1 и 3 – тканевой ингибитор металлопротеиназы 1 и 3

Tyr – тирозиназа

TYRP-1 – родственный тирозиназе белок 1

α -SMA – гладкомышечный альфа-актин

АКТГ – адренотропный гормон

АФК – активная форма кислорода

ВКМ – внеклеточный матрикс

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

иПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

КПЭ – клетки пигментного эпителия глаза

микроРНК – малая некодирующая рибонуклеиновая кислота

ММП (MMP) – металлопротеиназы

ММСК – мультипотентные мезенхимные стромальные клетки

МСГ – меланоцит-стимулирующий гормон

НСПК – нейральные стволовые/прогениторные клетки

РНК – рибонуклеиновая кислота

СКМц – стволовые клетки меланоцитов

УФ – ультрафиолет

УФА – ультрафиолет А типа

УФБ – ультрафиолет Б типа

УФО – ультрафиолетовое облучение

ФНО (TNF- α) – фактор некроза опухоли

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Борзенко С.А., Попов И.А., Островский Д.С., Сабурин И.Н., Кошелева А.В., Зурина И.М. Конструирование трансплантатов донорского ретинального пигментного эпителия методом трехмерного клеточного культивирования // Сибирский научный медицинский журнал. – 2014. – V. 34. – № 3. – P. 42-47.
2. Быков В.Л. Частная гистология человека. Санкт-Петербург: СОТИС, 2011. 304 p.
3. Колокольцова Т., Сабурин И., Нановская Т., Патрикеева С., Верниковская Д., Зурина И., Горкун А., Кошелева Н., Полтавцева Р., Сухих Г. Характеристика трофобластов при длительном культивировании *in vitro* // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2017. – № 3. – P. 168-174.
4. Колокольцова Т.Д., Сабурин И.Н., Рыбаков А.С. Культура клеток как уникальная модель для исследования в современной биологии и медицине // Патогенез. – 2014. – V. 11. – № 2. – P. 17.
5. Колокольцова Т.Д., Юрченко Н.Д., Колосов Н.Г., Шумакова О.В., Нечаева Е.А. Перспективы использования аттестованных фетальных фибробластов человека при лечении ран различной этиологии // Вестник РАМН. – 1998. – № 3. – P. 32-35.
6. Колокольцова Т., Юрченко Н., Нечаева Е., Радеева И., Шалунова Н., Петручке М., Бердникова З., Колосов Н. Получение аттестованных фибробластов человека, пригодных для научных и медицинских исследований // Биотехнология. – 2007. – № 1. – P. 58-64.
7. Колосов Н.Г., Ефремов А.В., Колокольцева Т.Д., Евланова Е.А., Шалунова Н.В. Опыт применения культивированных аллофибробластов при лечении ран различной этиологии // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2005. – № 3. – P. 57-59.
8. Кэмпбелл А., Джиллет Г., Джонс Г. Медицинская этика: учеб. пособие / пер. с англ.; под ред. Ю. М. Лопухина, Б. Г. Юдина. 2-е изд., испр.: М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 400 p.

9. Малюгин Б.Э., Борзенко С.А., Комах Ю.А., Арбуханова П.М., Желтоножко А.А., Сабурин И.Н., Колокольцова Т.Д., Зурина И.М., Агапов И.И., Давыдова Л.И. Современные возможности клеточных технологий в конструировании биологического эквивалента искусственной роговицы // Сибирский научный медицинский журнал. – 2014. – V. 34. – № 5. – P. 43-47.
10. Сабурин И.Н., Джусоева Е.В., Горкун А.А., Зурина И., 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. – V. 62. – № 4. – P. 265-268.
11. Семенова М.Л., Сергеев С.А., Сабурин И.Н., Кошелева Н.В. Использование органотипической культуры сетчатки как модели для исследования миграционной активности трансплантированных клеток // Гены и клетки. – 2010. – V. 5. – № 2. – P. 56-61.
12. Троценко Т. Новая эра фотоиммунопротекторов на основе экстракта папоротника *Polypodium leucotomos* // Косметические средства. – 2017. – V. 3. – № 4. – P. 68-72.
13. Юсупова Л. Современный взгляд на проблему старения кожи // Лечащий врач. – 2017. – № 6. – P. 75-75.
14. Alencar-Silva T., Zonari A., Foyt D., Gang M., Pogue R., Saldanha-Araujo F., Dias S.C., Franco O.L., Carvalho J.L. IDR-1018 induces cell proliferation, migration, and reparative gene expression in 2D culture and 3D human skin equivalents // Journal of tissue engineering and regenerative medicine. – 2019. – V. 13. – № 11. – P. 2018-2030.
15. Augustin C., Collombel C., Damour O. Use of dermal equivalent and skin equivalent models for identifying phototoxic compounds in vitro // Photodermatology, photoimmunology & photomedicine. – 1997. – V. 13. – № 1-2. – P. 27-36.
16. Baker B.M., Chen C.S. Deconstructing the third dimension—how 3D culture microenvironments alter cellular cues // Journal of cell science. – 2012. – V. 125. – № 13. – P. 3015-3024.

17. Bastonini E., Kovacs D., Picardo M. Skin pigmentation and pigmentary disorders: focus on epidermal/dermal cross-talk // *Annals of dermatology*. – 2016. – V. 28. – № 3. – P. 279-289.
18. Beauchamp P., Moritz W., Kelm J.M., Ullrich N.D., Agarkova I., Anson B.D., Suter T.M., Zuppinger C. Development and characterization of a scaffold-free 3D spheroid model of induced pluripotent stem cell-derived human cardiomyocytes // *Tissue Engineering Part C: Methods*. – 2015. – V. 21. – № 8. – P. 852-861.
19. Bello Y.M., Falabella A.F., Eaglstein W.H. Tissue-engineered skin // *American journal of clinical dermatology*. – 2001. – V. 2. – № 5. – P. 305-313.
20. Bondurand N., Pingault V., Goerich D.E., Lemort N., Sock E., Caignec C.L., Wegner M., Goossens M. Interaction among SOX10, PAX3 and MITF, three genes altered in Waardenburg syndrome // *Human molecular genetics*. – 2000. – V. 9. – № 13. – P. 1907-1917.
21. Bott K., Upton Z., Schrobback K., Ehrbar M., Hubbell J.A., Lutolf M.P., Rizzi S.C. The effect of matrix characteristics on fibroblast proliferation in 3D gels // *Biomaterials*. – 2010. – V. 31. – № 32. – P. 8454-8464.
22. Cai J., Rao M.S. Stem cell and precursor cell therapy // *Neuromolecular medicine*. – 2002. – V. 2. – № 3. – P. 233-249.
23. Cardinali G., Bolasco G., Aspite N., Lucania G., Lotti L.V., Torrisi M.R., Picardo M. Melanosome transfer promoted by keratinocyte growth factor in light and dark skin-derived keratinocytes // *Journal of investigative dermatology*. – 2008. – V. 128. – № 3. – P. 558-567.
24. Chaicharoenaudomrung N., Kunhorm P., Noisa P. Three-dimensional cell culture systems as an in vitro platform for cancer and stem cell modeling // *World Journal of Stem Cells*. – 2019. – V. 11. – № 12. – P. 1065.
25. Chang A.L.S. Expanding our understanding of human skin aging // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2016. – V. 136. – № 5. – P. 897-899.
26. Chou W.C., Takeo M., Rabbani P., Hu H., Lee W., Chung Y.R., Carucci J., Overbeek P., Ito M. Direct migration of follicular melanocyte stem cells to the

- epidermis after wounding or UVB irradiation is dependent on Mc1r signaling // *Nature medicine*. – 2013. – V. 19. – № 7. – P. 924.
27. Cooper C.D., Raible D.W. Mechanisms for reaching the differentiated state: Insights from neural crest-derived melanocytes // *Seminars in cell & developmental biology*. -- T. 20 --Elsevier, 2009. -- C. 105-110.
28. Costin G.-E., Hearing V.J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress // *The FASEB journal*. – 2007. – V. 21. – № 4. – P. 976-994.
29. Costin G.-E., Raabe H. Optimized in vitro pigmentation screening assay using a reconstructed three dimensional human skin model // *Rom J Biochem*. – 2013. – V. 50. – № 1. – P. 15-27.
30. Craig S., Earnshaw C.H., Virós A. Ultraviolet light and melanoma // *The Journal of pathology*. – 2018. – V. 244. – № 5. – P. 578-585.
31. Cristofalo V.J., Volker C., Allen R.G. Use of the fibroblast model in the study of cellular senescence // *Aging methods and protocols*Springer, 2000. -- C. 23-52.
32. D'Errico M., Lemma T., Calcagnile A., De Santis L.P., Dogliotti E. Cell type and DNA damage specific response of human skin cells to environmental agents // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. – 2007. – V. 614. – № 1-2. – P. 37-47.
33. D'Mello S.A., Finlay G.J., Baguley B.C., Askarian-Amiri M.E. Signaling pathways in melanogenesis // *International journal of molecular sciences*. – 2016. – V. 17. – № 7. – P. 1144.
34. D'Orazio J.A., Jarrett S., Marsch A., Lagrew J., Cleary L. Melanoma—epidemiology, genetics and risk factors // *Recent Advances in the Biology, Therapy and Management of Melanoma*, 2013. -- C. 1-34.
35. Delevoye C. Melanin transfer: the keratinocytes are more than gluttons // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2014. – V. 134. – № 4. – P. 877-879.
36. Duval K., Grover H., Han L.-H., Mou Y., Pegoraro A.F., Fredberg J., Chen Z. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture // *Physiology*. – 2017. – V. 32. – № 4. – P. 266-277.

37. Eichhorn T., Rauscher S., Hammer C., Führer B., Gröger M., Weber V. Cell-culture model to study endothelial activation in sepsis // *Critical Care*. – 2015. – V. 19. – № S1. – P. P39.
38. Ernfors P. Cellular origin and developmental mechanisms during the formation of skin melanocytes // *Experimental cell research*. – 2010. – V. 316. – № 8. – P. 1397-1407.
39. Fennema E., Rivron N., Rouwkema J., van Blitterswijk C., de Boer J. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues // *Trends in biotechnology*. – 2013. – V. 31. – № 2. – P. 108-115.
40. Fenner J., Clark R. Anatomy, physiology, histology, and immunohistochemistry of human skin // *Skin tissue engineering and regenerative medicine*, 2016. -- C. 1-17.
41. Fu C., Chen J., Lu J., Yi L., Tong X., Kang L., Pei S., Ouyang Y., Jiang L., Ding Y. Roles of inflammation factors in melanogenesis // *Molecular Medicine Reports*. – 2020. – V. 21. – P. 11421-1430.
42. Germain L., Larouche D., Nedelec B., Perreault I., Duranceau L., Bortoluzzi P., Beaudoin Cloutier C., Genest H., Caouette-Laberge L., Dumas A. Autologous bilayered self-assembled skin substitutes (SASSs) as permanent grafts: a case series of 14 severely burned patients indicating clinical effectiveness // *Eur Cell Mater*. – 2018. – V. 36. – P. 128-141.
43. Gledhill K., Guo Z., Umegaki-Arao N., Higgins C.A., Itoh M., Christiano A.M. Melanin transfer in human 3D skin equivalents generated exclusively from induced pluripotent stem cells // *PloS one*. – 2015. – V. 10. – № 8.
44. Gola M., Czajkowski R., Bajek A., Dura A., Drewa T. Melanocyte stem cells: biology and current aspects // *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. – 2012. – V. 18. – № 10. – P. RA155.
45. Goyer B., Pereira U., Magne B., Larouche D., Kearns-Turcotte S., Rochette P.J., Martin L., Germain L. Impact of ultraviolet radiation on dermal and epidermal DNA damage in a human pigmented bilayered skin substitute // *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. – 2019. – V. 13. – № 12. – P. 2300-2311.

46. Haass N.K., Herlyn M. Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma // *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. -- T. 10 --Elsevier, 2005. -- C. 153-163.
47. Han L.H., Tong X., Yang F. Photo-crosslinkable PEG-Based Microribbons for Forming 3D Macroporous Scaffolds with Decoupled Niche Properties // *Advanced materials*. – 2014. – V. 26. – № 11. – P. 1757-1762.
48. Haraguchi Y., Shimizu T., Sasagawa T., Sekine H., Sakaguchi K., Kikuchi T., Sekine W., Sekiya S., Yamato M., Umezu M. Fabrication of functional three-dimensional tissues by stacking cell sheets in vitro // *Nature protocols*. – 2012. – V. 7. – № 5. – P. 850.
49. Hasan A., Waters R., Roula B., Dana R., Yara S., Alexandre T., Paul A. Engineered biomaterials to enhance stem cell-based cardiac tissue engineering and therapy // *Macromolecular bioscience*. – 2016. – V. 16. – № 7. – P. 958-977.
50. Helfrich Y.R., Sachs D.L., Voorhees J.J. Overview of skin aging and photoaging // *Dermatology nursing*. – 2008. – V. 20. – № 3. – P. 177.
51. Hirobe T. Structure and function of melanocytes: microscopic morphology and cell biology of mouse melanocytes in the epidermis and hair follicle // *Histology and histopathology*. – 1995. – V. 10. – № 1. – P. 223-237.
52. Hirobe T. How are proliferation and differentiation of melanocytes regulated? // *Pigment cell & melanoma research*. – 2011. – V. 24. – № 3. – P. 462-478.
53. Hirobe T. Keratinocytes regulate the function of melanocytes // *Dermatologica Sinica*. – 2014. – V. 32. – № 4. – P. 200-204.
54. Hong Y., Song B., Chen H.-D., Gao X.-H. Melanocytes and skin immunity // *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. -- T. 17 --Elsevier, 2015. -- C. 37-39.
55. Hou L., Arnheiter H., Pavan W.J. Interspecies difference in the regulation of melanocyte development by SOX10 and MITF // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2006. – V. 103. – № 24. – P. 9081-9085.

56. Hou L., Pavan W.J. Transcriptional and signaling regulation in neural crest stem cell-derived melanocyte development: do all roads lead to Mitf? // *Cell research*. – 2008. – V. 18. – № 12. – P. 1163-1176.
57. Hsu Y.-C., Li L., Fuchs E. Emerging interactions between skin stem cells and their niches // *Nature medicine*. – 2014. – V. 20. – № 8. – P. 847.
58. Huh D., Hamilton G.A., Ingber D.E. From 3D cell culture to organs-on-chips // *Trends in cell biology*. – 2011. – V. 21. – № 12. – P. 745-754.
59. Jung J.M., Noh T.K., Jo S.Y., Kim S.Y., Song Y., Kim Y.-H., Chang S.E. Guanine Deaminase in Human Epidermal Keratinocytes Contributes to Skin Pigmentation // *Molecules*. – 2020. – V. 25. – № 11. – P. 2637.
60. Karbassi E., Fenix A., Marchiano S., Muraoka N., Nakamura K., Yang X., Murry C.E. Cardiomyocyte maturation: advances in knowledge and implications for regenerative medicine // *Nature Reviews Cardiology*. – 2020. – P. 1-19.
61. Khan A.Q., Travers J.B., Kemp M.G. Roles of UVA radiation and DNA damage responses in melanoma pathogenesis // *Environmental and molecular mutagenesis*. – 2018. – V. 59. – № 5. – P. 438-460.
62. Kim Y.C., Choi S.Y., Park E.Y. Anti-melanogenic effects of black, green, and white tea extracts on immortalized melanocytes // *Journal of veterinary science*. – 2015. – V. 16. – № 2. – P. 135-143.
63. Kleszczyński K., Kim T.K., Bilska B., Sarna M., Mokrzyński K., Stegemann A., Pyza E., Reiter R.J., Steinbrink K., Böhm M. Melatonin exerts oncostatic capacity and decreases melanogenesis in human MNT-1 melanoma cells // *Journal of pineal research*. – 2019. – V. 67. – № 4. – P. e12610.
64. Koch L., Deiwick A., Schlie S., Michael S., Gruene M., Coger V., Zychlinski D., Schambach A., Reimers K., Vogt P.M. Skin tissue generation by laser cell printing // *Biotechnology and bioengineering*. – 2012. – V. 109. – № 7. – P. 1855-1863.
65. Koh C.J., Atala A. Tissue engineering, stem cells, and cloning: opportunities for regenerative medicine // *Journal of the American Society of Nephrology*. – 2004. – V. 15. – № 5. – P. 1113-1125.

66. Kolokol'tsova T., Saburina I., Nanovskaya T., Patrikeeva S., Vernikovskaya D., Zurina I., Gorkun A., Kosheleva N., Poltavtseva R., Sukhikh G. Characteristics of Trophoblasts in Long-Term Culture // *Bulletin of experimental biology and medicine*. – 2017. – V. 164. – № 2. – P. 259-265.
67. Kolokoltsova T.D., Saburina I.N., Zurina I.M., Gorkun A.A., Kosheleva N.V., Repin V.S., Poltavtseva R.A., Sukhikh G.T. Isolation and characterization of trophoblasts from enzymatic explants of human term placenta // *Human cell*. – 2017. – V. 30. – № 4. – P. 249-257.
68. Kondo T. Methods and means related to cancer stem cells Google Patents, 2020.
69. Kosheleva N., Ilina I., Kozhina K., Zurina I., Roskova A., Gorkun A., Ovchinnikov A., Agranat M., Morozov S., Saburina I. Cellular model based on laser microsurgery of cell spheroids to study the repair process // *Russian Journal of Developmental Biology*. – 2017. – V. 48. – № 1. – P. 56-64.
70. Kosheleva N., Zurina I., Saburina I., Gorkun A., Kolokoltsova T., Borzenok S., Repin V. Influence of fetal calf serum on the formation of spheroids from limbal stromal cells of the eye // *Pathogenesis, Moscow, Russia*. – 2015. – V. 13. – P. 4-11.
71. Kubic J.D., Young K.P., Plummer R.S., Ludvik A.E., Lang D. Pigmentation PAX-ways: the role of Pax3 in melanogenesis, melanocyte stem cell maintenance, and disease // *Pigment cell & melanoma research*. – 2008. – V. 21. – № 6. – P. 627-645.
72. Lei T.C., Virador V., Yasumoto K.-i., Vieira W.D., Toyofuku K., Hearing V.J. Stimulation of melanoblast pigmentation by 8-methoxypsoralen: the involvement of microphthalmia-associated transcription factor, the protein kinase a signal pathway, and proteasome-mediated degradation // *Journal of investigative dermatology*. – 2002. – V. 119. – № 6. – P. 1341-1349.
73. Lei T.C., Virador V.M., Vieira W.D., Hearing V.J. A melanocyte–keratinocyte coculture model to assess regulators of pigmentation in vitro // *Analytical biochemistry*. – 2002. – V. 305. – № 2. – P. 260-268.
74. Li H., Fan L., Zhu S., Shin M.K., Lu F., Qu J., Hou L. Epilation induces hair and skin pigmentation through an EDN3/EDNRB-dependent regenerative response of melanocyte stem cells // *Scientific reports*. – 2017. – V. 7. – № 1. – P. 1-13.

75. Li L., Fukunaga-Kalabis M., Herlyn M. Isolation and cultivation of dermal stem cells that differentiate into functional epidermal melanocytes // *Human Cell Culture Protocols* Springer, 2012. -- C. 15-29.
76. Li L., Fukunaga-Kalabis M., Yu H., Xu X., Kong J., Lee J.T., Herlyn M. Human dermal stem cells differentiate into functional epidermal melanocytes // *Journal of Cell Science*. – 2010. – V. 123. – № 6. – P. 853-860.
77. Lin J.Y., Fisher D.E. Melanocyte biology and skin pigmentation // *Nature*. – 2007. – V. 445. – № 7130. – P. 843-850.
78. Magnus T., Liu Y., Parker G.C., Rao M.S. Stem cell myths // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 2008. – V. 363. – № 1489. – P. 9-22.
79. Mahmoud B.H., Hexsel C.L., Hamzavi I.H., Lim H.W. Effects of visible light on the skin // *Photochemistry and photobiology*. – 2008. – V. 84. – № 2. – P. 450-462.
80. Mei C., Zhou S., Zhu L., Ming J., Zeng F., Xu R. Antitumor effects of Laminaria extract fucoxanthin on lung cancer // *Marine drugs*. – 2017. – V. 15. – № 2. – P. 39.
81. Metcalfe A., Ferguson M. Molecular and cellular basis of regeneration and tissue repair // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2008. – V. 65. – № 1. – P. 24.
82. Mukherjee P.K., Biswas R., Sharma A., Banerjee S., Biswas S., Katiyar C. Validation of medicinal herbs for anti-tyrosinase potential // *Journal of herbal medicine*. – 2018. – V. 14. – P. 1-16.
83. Mull A.N., Zolekar A., Wang Y.-C. Understanding melanocyte stem cells for disease modeling and regenerative medicine applications // *International journal of molecular sciences*. – 2015. – V. 16. – № 12. – P. 30458-30469.
84. Nazih H., Bard J.-M. Microalgae in Human Health: Interest as a Functional Food // *Microalgae in Health and Disease Prevention* Elsevier, 2018. -- C. 211-226.
85. Ni J., Wang N., Gao L., Li L., Zheng S., Liu Y., Ozukum M., Nikiforova A., Zhao G., Song Z. The effect of the NMDA receptor-dependent signaling pathway on cell morphology and melanosome transfer in melanocytes // *Journal of dermatological science*. – 2016. – V. 84. – № 3. – P. 296-304.

86. Okamoto R., Shimizu H., Suzuki K., Kawamoto A., Takahashi J., Kawai M., Nagata S., Hiraguri Y., Takeoka S., Sugihara H.Y. Organoid-based regenerative medicine for inflammatory bowel disease // *Regenerative Therapy*. – 2020. – V. 13. – P. 1-6.
87. Olivatti T.O.F., Alcantara G.P., Lemos A.C.C.E., da Silva M.G., Miot H.A. Standardization of organoid culture for evaluation of melanogenesis induced by UVB, UVA and visible light // *Anais Brasileiros de Dermatologia*. – 2020. – V. 95. – № 1. – P. 46-51.
88. Peng J., Yuan J.-P., Wu C.-F., Wang J.-H. Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: metabolism and bioactivities relevant to human health // *Marine drugs*. – 2011. – V. 9. – № 10. – P. 1806-1828.
89. Pines A., Backendorf C., Alekseev S., Jansen J.G., de Gruijl F.R., Vrieling H., Mullenders L.H. Differential activity of UV-DDB in mouse keratinocytes and fibroblasts: impact on DNA repair and UV-induced skin cancer // *DNA repair*. – 2009. – V. 8. – № 2. – P. 153-161.
90. Potterf S.B., Furumura M., Dunn K.J., Arnheiter H., Pavan W.J. Transcription factor hierarchy in Waardenburg syndrome: regulation of MITF expression by SOX10 and PAX3 // *Human genetics*. – 2000. – V. 107. – № 1. – P. 1-6.
91. Prior N., Inacio P., Huch M. Liver organoids: from basic research to therapeutic applications // *Gut*. – 2019. – V. 68. – № 12. – P. 2228-2237.
92. Repin V., Saburina I., Kosheleva N., Gorkun A., Zurina I., Kubatiev A. 3D-technology of the formation and maintenance of single dormant microspheres from 2000 human somatic cells and their reactivation in vitro // *Bulletin of experimental biology and medicine*. – 2014. – V. 158. – № 1. – P. 137-144.
93. Rittié L., Fisher G.J. UV-light-induced signal cascades and skin aging // *Ageing research reviews*. – 2002. – V. 1. – № 4. – P. 705-720.
94. Rwigemera A., Mamelona J., Martin L.J. Inhibitory effects of fucoxanthinol on the viability of human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 are correlated with modulation of the NF-kappaB pathway // *Cell biology and toxicology*. – 2014. – V. 30. – № 3. – P. 157-167.

95. Rwigemera A., Mamelona J., Martin L.J. Comparative effects between fucoxanthinol and its precursor fucoxanthin on viability and apoptosis of breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 // *Anticancer research.* – 2015. – V. 35. – № 1. – P. 207-219.
96. Sagrillo-Fagundes L., Clabault H., Laurent L., Hudon-Thibeault A.-A., Salustiano E.M.A., Fortier M., Bienvenue-Pariseault J., Yen P.W., Sanderson J.T., Vaillancourt C. Human primary trophoblast cell culture model to study the protective effects of melatonin against hypoxia/reoxygenation-induced disruption // *JoVE (Journal of Visualized Experiments).* – 2016. – № 113. – P. e54228.
97. Santiago-Walker A., Li L., Haass N., Herlyn M. Melanocytes: from morphology to application // *Skin pharmacology and physiology.* – 2009. – V. 22. – № 2. – P. 114-121.
98. Sarin K.Y., Artandi S.E. Aging, graying and loss of melanocyte stem cells // *Stem cell reviews.* – 2007. – V. 3. – № 3. – P. 212-217.
99. Schallreuter K.U., Kothari S., Chavan B., Spencer J.D. Regulation of melanogenesis—controversies and new concepts // *Experimental dermatology.* – 2008. – V. 17. – № 5. – P. 395-404.
100. Schieke S.M., Schroeder P., Krutmann J. Cutaneous effects of infrared radiation: from clinical observations to molecular response mechanisms // *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine.* – 2003. – V. 19. – № 5. – P. 228-234.
101. Seet W.T., Maarof M., Anuar K.K., Chua K.-H., Irfan A.W.A., Ng M.H., Aminuddin B.S., Ruszymah B.H.I. Shelf-life evaluation of bilayered human skin equivalent, MyDerm™ // *PloS one.* – 2012. – V. 7. – № 8.
102. Shimoda H., Tanaka J., Shan S.J., Maoka T. Anti-pigmentary activity of fucoxanthin and its influence on skin mRNA expression of melanogenic molecules // *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* – 2010. – V. 62. – № 9. – P. 1137-1145.
103. Slominski A., Tobin D.J., Shibahara S., Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation // *Physiological reviews.* – 2004. – V. 84. – № 4. – P. 1155-1228.
104. Sommer L. Generation of melanocytes from neural crest cells // *Pigment cell & melanoma research.* – 2011. – V. 24. – № 3. – P. 411-421.

105. Sutherland R., Carlsson J., Durand R., Yuhas J. Spheroids in cancer research // *Cancer research*. – 1981. – V. 41. – № 7. – P. 2980-2984.
106. Takahashi K., Hosokawa M., Kasajima H., Hatanaka K., Kudo K., Shimoyama N., Miyashita K. Anticancer effects of fucoxanthin and fucoxanthinol on colorectal cancer cell lines and colorectal cancer tissues // *Oncology letters*. – 2015. – V. 10. – № 3. – P. 1463-1467.
107. Takii T., Yamamoto Y., Chiba T., Abe C., Belisle J.T., Brennan P.J., Onozaki K. Simple fibroblast-based assay for screening of new antimicrobial drugs against *Mycobacterium tuberculosis* // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2002. – V. 46. – № 8. – P. 2533-2539.
108. Tang J., Li Q., Cheng B., Jing L. Primary culture of human face skin melanocytes for the study of hyperpigmentation // *Cytotechnology*. – 2014. – V. 66. – № 6. – P. 891-898.
109. Tarafder A.K., Bolasco G., Correia M.S., Pereira F.J., Iannone L., Hume A.N., Kirkpatrick N., Picardo M., Torrisi M.R., Rodrigues I.P. Rab11b mediates melanin transfer between donor melanocytes and acceptor keratinocytes via coupled exo/endocytosis // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2014. – V. 134. – № 4. – P. 1056-1066.
110. Than U.T.T., Leavesley D.I., Parker T.J. Characteristics and roles of extracellular vesicles released by epidermal keratinocytes // *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. – 2019. – V. 33. – № 12. – P. 2264-2272.
111. Thomas A.J., Erickson C.A. The making of a melanocyte: the specification of melanoblasts from the neural crest // *Pigment cell & melanoma research*. – 2008. – V. 21. – № 6. – P. 598-610.
112. Tu C.X., Lin M., Lu S.S., Qi X.Y., Zhang R.X., Zhang Y.Y. Curcumin inhibits melanogenesis in human melanocytes // *Phytotherapy Research*. – 2012. – V. 26. – № 2. – P. 174-179.
113. Van Putte L., De Schrijver S., Moortgat P. The effects of advanced glycation end products (AGEs) on dermal wound healing and scar formation: a systematic review // *Scars, burns & healing*. – 2016. – V. 2. – P. 2059513116676828.

114. Vandamme N., Berx G. From neural crest cells to melanocytes: cellular plasticity during development and beyond // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2019. – V. 76. – № 10. – P. 1919-1934.
115. Videira I.F.d.S., Moura D.F.L., Magina S. Mechanisms regulating melanogenesis // *Anais brasileiros de dermatologia*. – 2013. – V. 88. – № 1. – P. 76-83.
116. Wang Y., Tissot M., Rolin G., Muret P., Robin S., Berthon J.-Y., He L., Humbert P., Viennet C. Development and validation of a simple method for the extraction of human skin melanocytes // *Cytotechnology*. – 2018. – V. 70. – № 4. – P. 1167-1176.
117. Wäster P., Eriksson I., Vainikka L., Öllinger K. Extracellular vesicles released by melanocytes after UVA irradiation promote intercellular signaling via miR21 // *Pigment Cell & Melanoma Research*. – 2020.
118. Watanabe K.i., Takeda K., Yasumoto K.i., Usono T., Saito H., Ikeda K., Takasaka T., Takahashi K., Kobayashi T., Tachibana M. Identification of a distal enhancer for the melanocyte-specific promoter of the MITF gene // *Pigment cell research*. – 2002. – V. 15. – № 3. – P. 201-211.
119. Watson R.E., Griffiths C.E. Pathogenic aspects of cutaneous photoaging // *Journal of cosmetic dermatology*. – 2005. – V. 4. – № 4. – P. 230-236.
120. Weiner L., Han R., Scicchitano B.M., Li J., Hasegawa K., Grossi M., Lee D., Brissette J.L. Dedicated epithelial recipient cells determine pigmentation patterns // *Cell*. – 2007. – V. 130. – № 5. – P. 932-942.
121. West M.D. The cellular and molecular biology of skin aging // *Archives of dermatology*. – 1994. – V. 130. – № 1. – P. 87-95.
122. Wu X.S., Masedunskas A., Weigert R., Copeland N.G., Jenkins N.A., Hammer J.A. Melanoregulin regulates a shedding mechanism that drives melanosome transfer from melanocytes to keratinocytes // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2012. – V. 109. – № 31. – P. E2101-E2109.
123. Xiao L., Zhang R.-z., Zhu W.-y. The distribution of melanocytes and the degradation of melanosomes in fetal hair follicles // *Micron*. – 2019. – V. 119. – P. 109-116.

124. Yamaguchi Y., Brenner M., Hearing V.J. The regulation of skin pigmentation // *Journal of biological chemistry*. – 2007. – V. 282. – № 38. – P. 27557-27561.
125. Yamaguchi Y., Hearing V.J. Physiological factors that regulate skin pigmentation // *Biofactors*. – 2009. – V. 35. – № 2. – P. 193-199.
126. Yamaguchi Y., Hearing V.J. Melanocytes and their diseases // *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. – 2014. – V. 4. – № 5. – P. a017046.
127. Yuan X., Jin Z. Paracrine regulation of melanogenesis // *British Journal of Dermatology*. – 2018. – V. 178. – № 3. – P. 632-639.
128. Zahoor M.A., Khurshid M., Qureshi R., Naz A., Shahid M. Cell culture-based viral vaccines: current status and future prospects // *Future Virology*. – 2016. – V. 11. – № 7. – P. 549-562.
129. Zamarrón A., Lorrio S., González S., Juarranz Á. Fernblock prevents dermal cell damage induced by visible and infrared a radiation // *International journal of molecular sciences*. – 2018. – V. 19. – № 8. – P. 2250.
130. Zhang Q., Nogales-Cadenas R., Lin J.-R., Zhang W., Cai Y., Vijg J., Zhang Z.D. Systems-level analysis of human aging genes shed new light on mechanisms of aging // *Human molecular genetics*. – 2016. – V. 25. – № 14. – P. 2934-2947.
131. Zocco M., Blanpain C. Identifying the niche controlling melanocyte differentiation // *Genes & development*. – 2017. – V. 31. – № 8. – P. 721-723.