

ПЕПТИДНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИЙ ФИБРОБЛАСТОВ КОЖИ ПРИ ИХ СТАРЕНИИ *IN VITRO*

Н.С.Линькова^{1,2,3}, А.О.Дробинцева⁴, О.А.Орлова¹, Е.П.Кузнецова³,
В.О.Полякова^{1,4}, И.М.Кветной^{1,4}, В.Х.Хавинсон^{1,2,5}

¹Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, Санкт-Петербург, РФ;

²Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН, Санкт-Петербург, РФ;

³Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, РФ;

⁴ФГБУ НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О.Отта, Санкт-Петербург, РФ;

⁵Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова,
Санкт-Петербург, РФ

Методом иммунофлуоресцентной конфокальной микроскопии изучено влияние пептидов KE, KED, AED и AEDG на процессы пролиферации (Ki-67), регенерации и старения (CD98hc), апоптоза (каспаза-3) и ремоделирование межклеточного матрикса (ММП-9) в фибробластах кожи при их старении в культуре. Все изученные пептиды снижают синтез ММП-9, возрастающий при старении фибробластов кожи, и повышают экспрессию молекул Ki-67, CD98hc, синтез которых при клеточном старении снижается. Пептиды AED и AEDG снижают выраженность каспаза-зависимого апоптоза, повышающегося при старении культур клеток.

Ключевые слова: короткие пептиды, кожа, старение, сигнальные молекулы, культура клеток

В основе процесса старения кожи, выполняющей барьерную функцию, лежит повреждающее действие факторов внешней среды и замедление процессов клеточного обновления в организме. Возрастные изменения в фибробластах кожи прежде всего связаны со снижением синтеза коллагена, гиалуроновой кислоты и других биологически активных веществ [2,4]. Соотношение процессов апоптоза и пролиферации клеток кожи регулируется интерлейкинами (ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4), факторами роста (FGF, TNF- α и др.) и другими сигнальными молекулами, синтез которых, помимо фибробластов, осуществляется эндотелием сосудов [1]. Наиболее широко используемыми маркерами для оценки процессов пролиферации и апоптоза клеток кожи являются каспаза-3 и Ki-67. Каспаза-3 — важнейший компонент каскада апоптоза, участвует в апоптотической конденсации хроматина и фрагментации ДНК во всех типах клеток, в том числе в фибробластах кожи. Кроме того, экспрессия данного маркера обнаруживается в клетке на стадии, предшествующей апоптозу. Таким образом, определение уровня экспрессии каспазы-3 может быть использовано для количественной оценки апоптоза в фибробластах кожи [11,12]. Ki-67 — белок, экспрессия которого ассоцииро-

вана с пролиферацией клеток. Ki-67 верифицируется в ядрах пролиферирующих клеток кожи и других типах клеток в G1, G2, S и M-фазах клеточного цикла, с максимальной экспрессией в фазах G2 и M. В покоящихся клетках (фаза G0) данный белок отсутствует. Уровень экспрессии Ki-67 является информативным показателем для определения интенсивности деления фибробластов кожи [8-10,15].

Маркер CD98hc известен в качестве молекулы, участвующей в процессах обновления кожи. Исследование гена, кодирующего CD98hc, показало, что его удаление вызывает нарушение процессов пролиферации и миграции клеток кожи и процесса ее заживления. Аналогичные изменения фибробластов кожи наблюдаются при ее естественном старении, что коррелирует с возрастным снижением экспрессии CD98hc. Таким образом, уровень экспрессии CD98hc можно использовать для оценки способности фибробластов кожи к регенерации [7].

Матриксная металлопротеиназа-9 (ММП-9) реализует ремоделирование межклеточной среды фибробластами кожи. Индуцируемый ультрафиолетом синтез ММП-9 способствует разрушению фибриллярного коллагена I и III типа в дерме. Коэкспрессия ММП-2, ММП-3, ММП-9 приводит к деградации неколлагеновых компонентов дермы, в том числе гликопротеинов и протеогликанов базальной мембраны. При старении

Адрес для корреспонденции: miayu@yandex.ru. Линькова Н.С.



клеток кожи уровень тканевых ингибиторов ММП снижается, что способствует активации ремоделирования межклеточного матрикса [13,14].

В Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии были сконструированы и синтезированы короткие пептиды AEDG, KED, KE, AED.

Пептид AEDG, синтезированный на основе аминокислотного анализа полипептидного комплекса эпифиза, по данным экспериментов в культурах клеток и на животных обладает антиоксидантной активностью, регулирует синтез мелатонина, обладает иммуностимулирующими свойствами, способствует увеличению длины теломера в нормальных фибробластах и преодолению лимита Хейфлика [6]. Все эти свойства пептида позволяют предположить, что он может оказывать геропротективный эффект в отношении фибробластов кожи. Пептид KED, синтезированный на основе аминокислотного анализа полипептидного комплекса сосудов, при пероральном применении у людей и в экспериментальных моделях на животных и культурах эндотелия сосудов оказывал вазопротективный эффект, стимулировал процессы клеточного деления эндотелия и фибробластов [4]. Биологическая активность пептида KE, синтезированного на основе аминокислотного анализа полипептидного комплекса тимуса, направлена на активизацию пролиферации и дифференцировки эпителиальных и иммунных клеток тимуса; в экспериментах на животных этот пептид способствовал заживлению ран [3,6]. Пептид AED, сконструированный на основе полипептидного комплекса хрящевой ткани, в экспериментальных моделях у животных регулировал метаболизм в соединительной ткани [2,6]. На основании этих данных можно предположить, что пептиды KED, KE, AED и AEDG могут участвовать в регуляции функций фибробластов.

Исследование эффективности кремов с содержанием пептида AEDG показало, что его применение способствует повышению влагосодержания в поверхностных слоях кожи, визуально уменьшает рельеф морщин шеи и лица у женщин пожилого возраста. Кроме того, на органо-типических культурах клеток кожи крыс разного возраста было показано, что пептиды AEDG и KE стимулируют процессы пролиферации и снижают уровень апоптоза клеток [4,5].

Целью данного исследования являлось сравнительное изучение влияния коротких пептидов AED, KED, KE и AEDG на экспрессию маркеров клеточного обновления и ремоделирования межклеточного матрикса в культурах фибробластов кожи при их старении.

Методика исследования

Первичные культуры фибробластов выделяли из кожи молодых (3 мес) крыс Вистар путем ферментативной диссоциации с применением коллагеназы. Выделение первичной культуры осуществляли на чашках Петри ("Sarstedt"), обработанных раствором фибриногена ("Gibco"); последующее культивирование проводили во флаконах с обработанной поверхностью ("Sarstedt", 25 см²). Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе при 37°C в среде, содержащей 87.5% DMEM, 10% ЭТС, 1.5% HEPES-буфера, 1% раствора пенициллина и стрептомицина и α-глутамин. Пассирование клеток проводили через 3 сут, посевная концентрация составила около 3×10⁵ клеток на флакон. Предварительное разделение клеток для пассирования в соотношении 1:3-1:5 проводили, используя смесь 0.125% трипсина, 0.02 M EDTA, 0.02% глюкозы, растворенной в фосфатном буфере.

При каждом пересеве в ростовую среду добавляли раствор с пептидами. Клетки культивировали до 3-го и 14-го пассажа, на которых проводили иммуноцитохимическое окрашивание. В соответствии с рекомендацией Международной ассоциации исследований клеточных культур (Сан-Франциско, 2007) 3-й пассаж расценивали как "молодые" культуры, а 14-й — как "старые". Молодые и старые культуры разделяли на 5 групп: в 1-ю группу (контроль) добавляли физиологический раствор, во 2-ю — пептид AED, в 3-ю — KED, в 4-ю — KE, в 5-ю — AEDG. Все исследуемые пептиды добавляли в культуральную среду в конечной концентрации 20 нг/мл.

Для иммунофлюоресцентного окрашивания клетки пассировали в 24-луночном планшете ("БиолоТ"). В работе использовали первичные моноклональные антитела к каспазе-3 (1:75), Ki-67 (1:50), CD98hc (1:125) и ММП-9 (1:75) ("Novocastra").

Для проведения пермеабиллизации использовали 0.1% Тритон X-100 ("БиолоТ"), растворенный в ФСБ. Затем культуры клеток инкубировали в 1% ФСБ (pH 7.5) в течение 30 мин для блокировки неспецифического связывания. Инкубация с первичными антителами проводилась в течение 60 мин.

Конфокальную микроскопию клеток проводили в инвертированном конфокальном микроскопе "Olympus" Fluoview CM FV300-IX70 с использованием апохроматического объектива 606 UPlan. Для спецификации флюоресценции исследуемых маркеров использовали волну возбуждения аргонового лазера 488 нм. Ядра клеток докрашивали Hoechst 33258 ("Sigma"), в результате чего они флюоресцировали темно-синим, светло-зеленая флюоресценция показывала

экспрессию исследуемых маркеров (инкубация со вторичными антителами, конъюгированными с флюорохромом Alexa Fluor 488 (1:1000; “Abcam”), в течение 30 мин при комнатной температуре, в темноте). Для анализа полученных результатов использовали программное обеспечение “Видео Тест-Морфология 5.2”. В каждом случае анализировали 5 полей зрения при увеличении 200. Площадь экспрессии рассчитывали как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными клетками, к общей площади клеток в поле зрения и выражали в процентах. Этот параметр характеризует количество клеток, в которых экспрессируется исследуемый маркер.

Статистическая обработка данных включала подсчет среднего арифметического, стандартного отклонения и доверительного интервала для каждой выборки и проводилась в программе “Statistica 6.0”. Для анализа вида распределения использовали критерий Шапиро—Уилка. Для проверки статистической однородности нескольких выборок были использованы непараметрические процедуры однофакторного дисперсионного анализа (критерий Крускала—Уоллиса). В случаях, когда дисперсионный анализ выявлял статистически значимую неоднородность нескольких выборок, для последующего выявления неоднородных групп (путем их попарных сравнений) применяли процедуры множественных сравнений с помощью *U* критерия Манна—Уитни. Критический уровень достоверности нулевой гипотезы (об отсутствии различий) принимали равным 0.05.

Результаты исследования

На первом этапе оценивали влияние коротких пептидов на интенсивность клеточного деления фибробластов кожи при их старении. Для количественной оценки данного показателя использовали маркер Ki-67. В контроле экспрессия Ki-67 в молодых культурах была в 3.48 раза больше, чем в старых. Пептиды AED, KED, KE и AEDG повышали экспрессию Ki-67 в молодых культурах в 1.14, 1.89, 1.40 и 2.08 раза соответственно. В старых культурах пептиды AED, KED, KE и AEDG повышали экспрессию Ki-67 в 1.60, 5.61, 3.87 и 4.94 раза соответственно (рис. 1).

Затем оценивали влияние пептидов на апоптоз фибробластов кожи при их старении. Для количественной оценки апоптоза использовали маркер каспазы-3. Экспрессия каспазы-3 в молодых культурах была в 3.8 раза меньше, чем в старых. Пептид AED снижал экспрессию маркера в молодых культурах в 1.43 раза, а пептиды KED, KE и AEDG достоверно не влияли на данный показатель. Пептиды AED и AEDG сни-

жали экспрессию каспазы-3 в старых культурах фибробластов в 2.52 и 5.05 раза соответственно, а пептиды KED и KE достоверно не влияли на данный показатель (рис. 2).

Для количественной оценки интенсивности процессов ремоделирования межклеточного матрикса в фибробластах кожи при их старении использовали маркер ММП-9. В контроле экспрессия ММП-9 в молодых культурах была в 4.24 раза

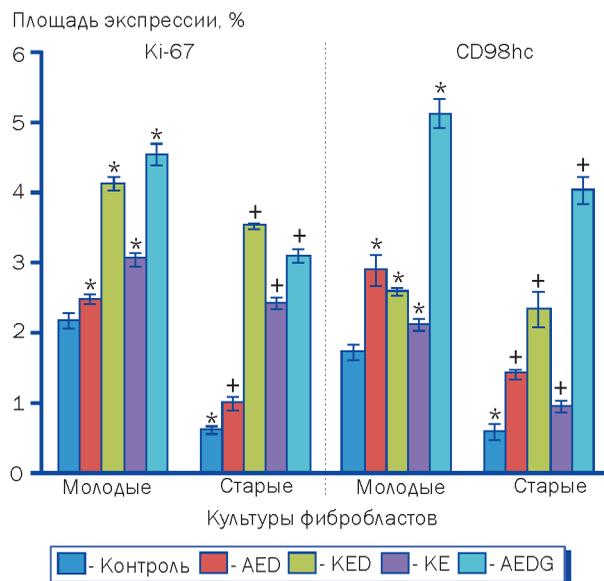


Рис. 1. Влияние пептидов на процессы пролиферации и апоптоза в фибробластах кожи при их старении.

Здесь и на рис. 2: $p < 0.05$ по сравнению с контролем для * молодых, + старых культур клеток.

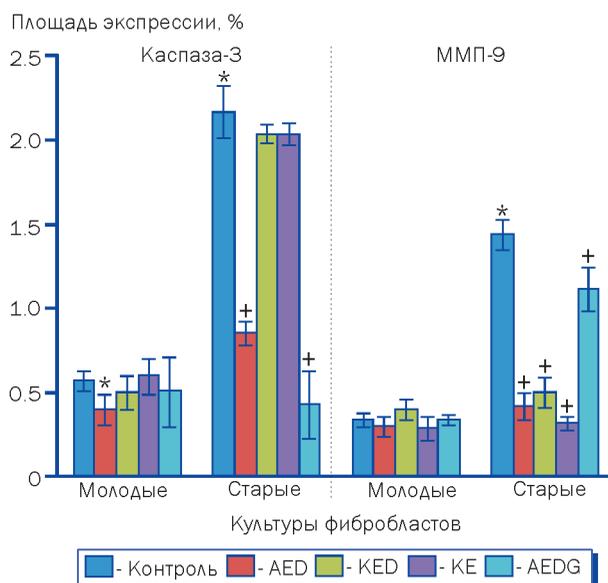


Рис. 2. Влияние пептидов на клеточное обновление и ремоделирование межклеточного матрикса в фибробластах кожи при их старении.

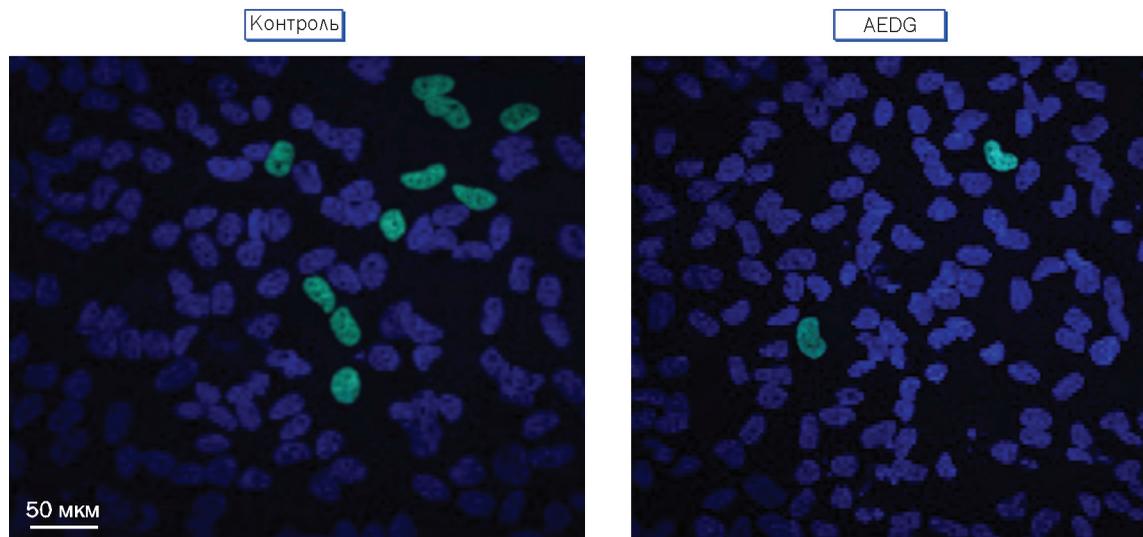


Рис. 3. Иммунофлуоресцентная конфокальная микроскопия культуры фибробластов кожи: 14-й пассаж, $\times 200$. Ядра клеток докрашены Hoechst 33258 – темно-синяя флуоресценция, светло-зеленая флуоресценция – окрашивание на каспазу-3.

меньше, чем в старых. Ни один из исследуемых пептидов не влиял на экспрессию ММП-9 в молодых культурах фибробластов. Под действием пептидов экспрессия ММП-9 в старых культурах фибробластов снижалась в 3.43 (AED), 2.88 (KED), 4.50 (KE) и 1.29 (AEDG) раза (рис. 2).

Экспрессия маркера функциональной активности клеток кожи CD98hc в молодых культурах была в 2.92 раза больше, чем в старых. Под действием пептидов AED, KED, KE и AEDG экспрессия CD98hc в молодых культурах повышалась в 1.66, 1.49, 1.22 и 2.94 раза соответственно, а в старых — в 2.38, 3.90, 1.62 и 6.75 раза (рис. 1).

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что механизм действия коротких пептидов связан с активацией пролиферации и замедлением процесса старения, что отражалось в повышении экспрессии маркеров Ki-67 и CD98hc под действием пептидов AED, KED, KE и AEDG в молодых и старых культурах фибробластов кожи. Наиболее выраженный стимулирующий эффект наблюдался под действием пептида AEDG. Таким образом, этот тетрапептид может быть исследован в качестве активного восстанавливающего компонента косметологических средств, предназначенных для применения у людей с выраженными признаками старения кожи.

Было показано повышение экспрессии маркера апоптоза каспазы-3 в старых культурах фибробластов кожи по сравнению с молодыми. Пептид AED снижал уровень апоптоза в молодых и старых культурах, а пептид AEDG — в старых культурах ниже уровня в молодых культурах (рис. 3). Таким образом, пептид AED может

быть исследован в качестве вещества, снижающего гибель фибробластов кожи при профилактике старения кожи. Пептид AEDG оказывал в 2 раза более выраженное геропротективное воздействие на старые культуры фибробластов кожи, чем пептид AED, что делает перспективным его дальнейшее изучение в качестве вещества, замедляющего процессы старения кожи людей старших возрастных групп.

Повышение экспрессии ММП-9 в старых культурах фибробластов кожи по сравнению с молодыми отражало активизацию процессов ремоделирования межклеточного матрикса и воспалительных реакций с возрастом. Короткие пептиды AED, KED, KE и AEDG снижали экспрессию ММП-9 в старых культурах и не влияли на данный показатель в молодых культурах. Полученные данные позволяют предположить, что изученные короткие пептиды на тканевом уровне будут сокращать сроки заживления поврежденной кожи, предотвращать ее раздражение, повышать тургор, увлажненность и замедлять процессы старения.

Литература

1. Белова О.В., Арион В.Я., Сергиенко В.И. Роль цитокинов в иммунологической функции кожи // Иммунопатол., аллергол., инфектол. 2008. № 1. С. 41-55.
2. Рыжак Г.А., Королькова Т.Н., Войтон Е.В. Геронто-косметология: профилактика и коррекция возрастных изменений кожи. СПб., 2006.
3. Хавинсон В.Х., Рыжак Г.А. Пептидные биорегуляторы в коррекции возрастных изменений // Эстетическая медицина. 2010. Т. 9, № 4. С. 409-413.
4. Хавинсон В.Х., Тарновская С.И., Линькова Н.С., Гупон Е.О., Елашкина Е.В. Эпигенетические аспекты пептидной



- регуляции пролиферации эндотелия сосудов при его старении // Успехи геронтолог. 2014. Т. 27, № 1. С. 108-114.
5. Чалисова Н.И., Линькова Н.С., Жекалов А.Н., Орлова А.О., Рыжак Г.А., Хавинсон В.Х. Короткие пептиды стимулируют клеточную регенерацию в коже при старении // Успехи геронтолог. 2014. Т. 27, № 4. С. 699-703.
 6. Anisimov V.N., Khavinson V.K. Peptide bioregulation of aging: results and prospects // Biogerontology. 2010. Vol. 11, N 2. P. 139-149.
 7. Boulter E., Estrach S., Errante A., Pons C., Cailleteau L., Tissot F., Meneguzzi G., Feral C.C. CD98hc (SLC3A2) regulation of skin homeostasis wanes with age // J. Exp. Med. 2013. Vol. 210, N 1. P. 173-190.
 8. Fernandez T.L., Van Lonkhuyzen D.R., Dawson R.A., Kimlin M.G., Upton Z. In vitro investigations on the effect of dermal fibroblasts on keratinocyte responses to ultraviolet B radiation // Photochem. Photobiol. 2014. Vol. 90, N 6. P. 1332-1339.
 9. Ghisalberti C.A., Morisetti A., Bestetti A., Cairo G. Potent trophic activity of spermidine supramolecular complexes in in vitro models // World J. Biol. Chem. 2013. Vol. 4, N 3. P. 71-78.
 10. Jahns A.C., Eilers H., Ganceviciene R., Alexeyev O.A. Pro-pionibacterium species and follicular keratinocyte activation in acneic and normal skin // Br. J. Dermatol. 2015. Vol. 172, N 4. P. 981-987.
 11. Ulakcsai Z., Bagaméry F., Vincze I., Szoko E., Tabi T. Protective effect of resveratrol against caspase 3 activation in primary mouse fibroblasts // Croat. Med. J. 2015. Vol. 56, N 2. P. 78-84.
 12. Wang X.W., Yu Y., Gu L. Dehydroabietic acid reverses TNF- α -induced the activation of FOXO1 and suppression of TGF-1/Smad signaling in human adult dermal fibroblasts // Int. J. Clin. Exp. Pathol. 2014. Vol. 7, N 12. P. 8616-8626.
 13. Wong V.W., Garg R.K., Sorkin M., Rustad K.C., Akaishi S., Levi K., Nelson E.R., Tran M., Rennert R., Liu W., Longaker M.T., Dauskardt R.H., Gurtner G.C. Loss of keratinocyte focal adhesion kinase stimulates dermal proteolysis through upregulation of MMP9 in wound healing // Ann. Surg. 2014. Vol. 260, N 6. P. 1138-1146.
 14. Xue S.N., Lei J., Lin D.Z., Yang C., Yan L. Changes in biological behaviors of rat dermal fibroblasts induced by high expression of MMP9 // World J. Emerg. Med. 2014. Vol. 5, N 2. P. 139-143.
 15. Zhang P., Li J., Tang X., Zhang J., Liang J., Zeng G. Dracorhordin perchlorate induces apoptosis in primary fibroblasts from human skin hypertrophic scars via participation of caspase-3 // Eur. J. Pharmacol. 2014. Vol. 728. P. 82-92.