

УДК 616-092

## Возрастные особенности экспрессии маркёров аутофагии в клетках кожи пациентов с лифтингом лица

Абрамян Ш.М.<sup>1,2</sup>, Волкова Е.Н.<sup>1</sup>, Блохин С.Н.<sup>2</sup>, Морозов С.Г.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии».  
125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

<sup>2</sup> Клиника пластической и эстетической хирургии профессора Блохина С.Н. и доктора Вульфа И.А. «Frau Klinik».  
129110, Москва, ул. Гиляровского, д. 55

В период ишемии оперируемого органа или ткани, вызванной прекращением доступа питательных веществ с кровью, активируется аутофагия, что позволяет клеткам сохранить жизнеспособность. **Цель работы** – определение экспрессии белков аутофагии Beclin-1, LC3-II, p62, ATG5 в клетках кожи и подкожно-жировой клетчатки (ПЖК), выделенных из операционного материала при проведении лифтинга лица. **Пациентки** – женщины в возрасте 21-64 лет ( $n = 84$ ). **Материалы и методы.** Из образцов кожи и ПЖК лица, иссеченных во время операции лифтинга, путем обработки коллагеназой получали суспензию клеток. Измерение уровня флуоресценции белков аутофагии в клетках проводили методом проточной цитометрии. Данные анализировали по алгоритму ANOVA – в зависимости от возраста пациенток. **Результаты.** Уровень экспрессии исследуемых маркеров аутофагии снижался с возрастом, достоверные различия ( $p < 0,05$ ) получены для пациенток в возрасте старше 50 лет по сравнению с лицами моложе 30 лет. **Выводы.** Показано, что процессы аутофагии в клетках кожи и ПЖК активируются при лифтинге лица, но активность аутофагии достоверно снижается после 50 лет по сравнению с молодым возрастом. Также установлено сопряжение активности аутофагии с гипоксией и с изменением мембранного потенциала митохондрий в клетках ПЖК.

**Ключевые слова:** лифтинг лица; выделение клеток кожи; аутофагия; митохондрии.

**Для цитирования:** Абрамян Ш.М., Волкова Е.Н., Блохин С.Н., Морозов С.Г. Возрастные особенности экспрессии маркёров аутофагии в клетках кожи пациентов с лифтингом лица. Патогенез. 2018; 16(4): 174-177

**DOI:** 10.25557/2310-0435.2018.04.174-177

**Для корреспонденции:** Морозов Сергей Георгиевич, e-mail: biopharm@list.ru

**Финансирование.** Исследование не имеет спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 18.10.2018

## Age-related specificity of the autophagy marker expression in skin cells from patients with face lifting

Abramian Sh.M.<sup>1,2</sup>, Volkova E.N.<sup>1</sup>, Blokhin S.N.<sup>2</sup>, Morozov S.G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology,  
Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

<sup>2</sup> Professor S.N.Blokhin and Doctor I.A.Wolfe Clinic of plastic and aesthetic surgery «Frau Klinik»,  
Gilyarovskogo Str. 55, Moscow 129110, Russian Federation

Autophagy is known to be activated during organ or tissue ischemia induced by blood deprivation during surgery to keep the cells viable. **Aim.** To evaluate the expression of autophagy proteins, Beclin-1, LC3-II, p62, and Atg5 in cells isolated from the skin and subcutaneous fat excised from the face lifting surgical material. **Patients.** Women aged 21-64 ( $n = 84$ ) were recruited. **Methods.** Cells were obtained from face lifting surgical materials using the collagenase treatment. The autophagy protein expression was analyzed using the flow cytometry. Statistics was performed using ANOVA based on the age of patients. **Results.** Expression of the studied autophagy markers was found to decrease with age; significant differences ( $p < 0.05$ ) were obtained for patients older than 50 compared with those under 30. **Conclusions.** We demonstrated that autophagy was activated in cells from skin and subcutaneous fat during the face lifting. The autophagy protein expression was significantly reduced at ages older than 50 compared to the age under 30. The autophagy coupling with both hypoxia and changes in the mitochondrial membrane potential was also shown.

**Key words:** face lifting; skin cell isolation; autophagy; mitochondria.

**For citation:** Abramian Sh.M., Volkova E.N., Blokhin S.N., Morozov S.G. [Age-related specificity of the autophagy marker expression in skin cells from patients with face lifting]. Patogenez [Pathogenesis]. 2018; 16(4): 174-177 (in Russian)

**DOI:** 10.25557/2310-0435.2018.04.174-177

**For correspondence:** Morozov Sergey Georgievich, e-mail: biopharm@list.ru

**Funding.** The study had no sponsorship.

**Conflict of interests:** The authors declare no conflict of interests.

**Received:** 18.10.2018

## Введение

Термин «аутофагия» впервые использовал Christian de Duve в 1963 году. В настоящее время аутофагия рассматривается с точки зрения механизма поддержания гомеостаза и включает три типа: 1) микроаутофагия – физиологический процесс обмена веществ в клетке, сопровождается катаболизмом белковых комплексов, полисахаридов, органелл, мембранных структур, что необходимо для обновления состава клетки или её ремоделирования при активации; 2) макроаутофагия – утилизация органелл в лизосомах при резком ограничении поступления питательных веществ или энергии в клетку, например, при стрессе; 3) шаперон-зависимая аутофагия, при которой белки с нарушенной четвертичной и третичной структурой транслоцируются с помощью шаперонов через мембрану лизосом для протеолиза [1]. Два последних типа аутофагии предполагают её активацию для поддержания жизни клетки в короткий период депривации; при этом восстановление нормальной функции клетки возможно после возобновления поступления питательных веществ и энергии в полном объеме. Если этого не происходит, то в клетке инициируется апоптоз (необратимая гибель).

Аутофагия сопряжена с дисфункцией митохондрий, окислительным стрессом, процессами старения клетки и другими патологическими механизмами, лежащими в основе патогенеза многих заболеваний. Несмотря на то, что экспрессия основных генов аутофагии – *BECN1*, *MAP1/LC3B*, *ATG5*, *ATG7*, *ULK1*, *PIK3C3*, *mTOR*, существенно не меняется с возрастом, показано, что при старении в клетке аккумулируются поврежденные белковые комплексы и органеллы [2].

Для хирургической практики аутофагия интересна с точки зрения сохранения жизнеспособности клеток в период ишемии оперируемого органа или ткани, вызванной прекращением доступа питательных веществ с кровью. При ишемии митохондрии клеток кожи подвержены дегенерации, при этом одновременно с повышением экспрессии белков аутофагии (*Beclin-1*, *LC3-II* (microtubule-associated protein 1 light chain 3)-II, *p62*, *ATG(-5,-7,-12,-14)* (autophagy-related gene), *LAMP-2A* (lysosomal-associated membrane protein 2), *FIP200*, *WIPI1*) повышается экспрессия факторов, сопряженных с апоптозом митохондрий. Цель работы – определение экспрессии белков аутофагии в клетках кожи и подкожно-жировой клетчатки, выделенных из операционного материала при проведении лифтинга (подтяжки) лица у женщин.

## Материалы и методы исследования

В работе использован операционный материал, полученный при операции лифтинга лица у женщин (21-64 года,  $n = 84$ ) в Клинике пластической хирургии «Фрау Клиник». Все пациенты подписывали информированное согласие на участие в исследовании и разрешение на анонимное использование их биологического материала, утвержденное Ученым Советом ФГБНУ НИИОПП и одобренное Дирекцией Клиники. Протокол исследования одобрен Этическими Комиссиями Института и Кли-

ники. Работа проведена согласно Хельсинской Декларации по соблюдению прав человека. Критерии исключения пациентов из исследования: острые бактериальные и вирусные инфекции, сахарный диабет, системные аллергические, воспалительные или онкологические заболевания, беременность. Работа с кровью людей проводилась по международным правилам работы с биологическим материалом. Кровь брали натощак утром в день операции из локтевой вены в пробирку с ЭДТА. Биохимические исследования проводили на анализаторе Fuji Dri-Chem4000 («Fujifilm», Япония).

Кусочки ткани размером  $2 \times 1 \times 0,5$  см были иссечены из подкожно-жировой клетчатки в области операционного поля, далее из них выделены клетки по описанной ранее методике [3]. Жизнеспособность клеток при окраске трипановым синим составляла  $92 \pm 3\%$ . Клетки окрашивали моноклональными антителами (mAb, все от Abcam) к рецепторам онкостатина М (*anti-OSTM*, ab156939) на адипоцитах [4], рецепторам эфрина (*anti-Eph-R*, ab5497) на эпителиальных клетках [5], рецепторам нейтрофилов (*anti-CD66b*, ab48589) и лимфоцитов (*anti-CD3*, ab106215). Для оценки аутофагии использовали mAb *LC3/LAMP2* (Light Chain 3/ Lysosomal Associated Membrane Protein 2) (*anti-LC3*, ab225382), *Atg5* (Autophagy-related gene) (*anti-Atg5*, ab206714), *Beclin-1* (*anti-Beclin-1*, ab225466). Мембранный потенциал митохондрий определяли с помощью коммерческого набора Becton Dickinson по прилагаемой инструкции [[http://www.bdbiosciences.com/ds/ab/others/551302\\_Book\\_Website.pdf](http://www.bdbiosciences.com/ds/ab/others/551302_Book_Website.pdf)] с использованием красителя JC-1. Клетки анализировали на проточном цитометре FACSCalibur («Becton Dickinson», USA) по программе SimulSet по методике, описанной ранее [3]. Полученные данные обработаны по алгоритму ANOVA. Последующие межгрупповые сравнения средних проводили по *t*-критерию Стьюдента, данные представлены как  $M \pm m$ .

## Результаты исследования

Суспензии клеток, выделенных из операционного материала при лифтинге лица, были окрашены антителами к рецепторам, идентифицирующим популяции клеток. Далее в гейтах соответствующих клеток определяли флуоресценцию белков *LC3/LAMP2* *Atg5* и *Beclin-1*, экспрессия которых отражает активность аутофагии [2]. В табл. 1 представлены данные по уровню экспрессии белков аутофагии в клетках эпителия (по окраске на рецепторы эфрина [5]) и в адипоцитах (по окраске на рецепторы онкостатина М [4]) в зависимости от возраста пациенток.

В клетках пациенток старше 50 лет достоверно снижены все исследованные показатели аутофагии по сравнению с данными пациенток моложе 30 лет. Для адипоцитов *Beclin-1* считается ключевой молекулой, регулирующей аутофагию [6]. Уровень экспрессии белка *Beclin-1* в адипоцитах выше, чем в клетках эпителия, и он снижается более значительно в группе пациенток старше 50 лет по сравнению с лицами моложе 30 лет ( $p < 0,05$ ) (табл. 1).

Изменение флуоресценции красителя JC-1 отражает изменение мембранного потенциала митохондрий

Таблица 1

**Возрастные особенности экспрессии маркеров аутофагии в эпителиальных клетках и в адипоцитах из операционного материала, иссеченного при лифтинге лица (интенсивность флуоресценции, условные единицы).**

показатель	группы пациенток			
	21-30 лет, (n = 18)	31-40 лет, (n = 22)	41-55 лет, (n = 24)	51-64 лет, (n = 20)
эпителиальные клетки				
LC3	121 ± 5	123 ± 4	119 ± 5	105 ± 6*
Beclin-1	137 ± 6	135 ± 7	129 ± 4	125 ± 4*
Atg-5	72 ± 3	76 ± 5	68 ± 5	62 ± 4*
p62	201 ± 6	198 ± 5	162 ± 5*	144 ± 6*
адипоциты				
LC3	108 ± 4	102 ± 5	96 ± 5	92 ± 7*
Beclin-1	211 ± 4	205 ± 8	186 ± 5*	152 ± 7*
Atg-5	83 ± 6	85 ± 4	79 ± 7	71 ± 3*
p62	234 ± 5	228 ± 6	195 ± 7*	171 ± 4*

**Примечание:** \* –  $p < 0,05$  по отношению к лицам моложе 30 лет.

Таблица 2

**Экспрессия маркера гипоксии (фактора HIF-1 $\alpha$ ) и индикатора мембранного потенциала митохондрий (красителя JC-1) в эпителиальных клетках и в адипоцитах из операционного материала, иссеченного при лифтинге лица (интенсивность флуоресценции, условные единицы).**

показатель	группы пациенток			
	21-30 лет, (n = 18)	31-40 лет, (n = 22)	41-55 лет, (n = 24)	51-64 лет, (n = 20)
эпителиальные клетки				
HIF-1 $\alpha$	98 ± 7	105 ± 5	119 ± 5*	137 ± 8*
JC-1	141 ± 9	136 ± 8	127 ± 11	121 ± 8
адипоциты				
HIF-1 $\alpha$	105 ± 8	119 ± 7	138 ± 5*	156 ± 11*
JC-1	182 ± 13	174 ± 19	172 ± 11	165 ± 16

**Примечание:** \* –  $p < 0,05$  по отношению к лицам моложе 30 лет.

при дисфункции митохондрий, окислительном стрессе, инициации аутофагии или апоптоза и т.д.. В клетках изменение биоэнергетики митохондрий сопряжено с гипоксией, индикатором которой является фактор HIF-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor alpha). В эпителиальных клетках (табл. 2) и в адипоцитах пациенток старше 50 лет достоверно повышен уровень экспрессии фактора HIF-1 $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) и имеется тенденция к снижению мембранного потенциала митохондрий ( $p > 0,05$ ) по сравнению с пациентками моложе 30 лет.

### Обсуждение

Ранее нами были показаны возрастные различия в экспрессии маркеров апоптоза в клетках кожи лица у женщин [7]. В настоящей работе установлено снижение экспрессии маркеров аутофагии в клетках, выделенных из операционного материала при лифтинге лица. Наши данные, касающиеся экспрессии рецептора p62, согласуются с мнением других авторов [8], показавших, что с возрастом снижается скорость обмена рецептора p62 и повышается уровень его убиквитинированного белка,

что говорит о подавлении макроаутофагии при старении. Цитозольный регуляторный протеин p62/A170 вовлечен в сигнальные пути апоптоза и аутофагии в клетках, которые он регулирует за счет фосфорилирования вторичных мессенджеров – Src, STAT3, p62 сопрягает сигнальные пути аутофагии и протеасомной деградации убиквитинированных белков [9], что изменено в клетках стареющего организма.

С возрастом у человека развивается дисфункция митохондрий, что имеет отношение к патогенезу многих возрастных заболеваний. Между лизосомами и митохондриями существует взаимодействие при регулировании многих процессов в клетке, например, при терминальной дифференцировке кератиноцитов. В нашей работе показано изменение мембранного потенциала митохондрий в клетках, в которых активированы процессы аутофагии, а также регистрируется гипоксия.

### Выводы

При проведении операции лифтинга лица в клетках подкожно-жировой ткани активируются процессы аутофагии.

Показано сопряжение активности аутофагии с гипоксией и с изменением мембранного потенциала митохондрий в клетках, выделенных из операционного материала при проведении операции лифтинга лица.

### Список литературы

- Nagar R. Autophagy: A brief overview in perspective of dermatology. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 2017; 83(3): 290-297. DOI: 10.4103/0378-6323.196320
- Kim H., Park S., Moon S., Lee J., Kim S. Autophagy in Human Skin Fibroblasts: Impact of Age. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19(8): E2254. DOI: 10.3390/ijms19082254
- Абрамян Ш.М., Морозов С.Г. Определение уровня спонтанного и индуцированного апоптоза клеток, полученных из операционного материала при лифтинге лица. *Патогенез.* 2016; 14(4): 63-68.
- Elks C., Zhao P., Grant R., Hang H., Bailey J., Burk D., McNulty M.A., Mynatt R.L., Stephens J.M. Loss of oncostatin M signaling in adipocytes induces insulin resistance and adipose tissue inflammation in vivo. *J. Biol. Chem.* 2016; 291(33): 17066-17076. DOI: 10.1074/jbc.M116.739110
- Perez White B., Getsios S. Eph receptor and ephrin function in breast, gut, and skin epithelia. *Cell. Adh. Migr.* 2014; 8(4): 327-338. DOI: 10.4161/19336918.2014.970012
- Deng Y., Xu J., Zhang X., Yang J., Zhang D., Huang J., Lv P., Shen W., Yang Y. Berberine attenuates autophagy in adipocytes by targeting BECN1. *Autophagy.* 2014; 10(10): 1776-1786. DOI: 10.4161/auto.29746
- Абрамян Ш.М., Морозов С.Г. Изучение состояния сигнальных путей апоптоза в клетках при проведении пластических операций на лице. *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии.* 2017; 1: 70.
- Cavinato M., Koziel R., Romani N., Weinmüller R., Jenewein B., Hermann M., Dubrac S., Ratzinger G., Grillari J., Schmuth M., Jansen-Dürr P. UVB-induced senescence of human dermal fibroblasts involves impairment of proteasome and enhanced autophagic activity. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 2017; 72(5): 632-639. DOI: 10.1093/gerona/glw150
- Liu W., Ye L., Huang W., Guo L., Xu Z., Wu H., Yang C., Liu H.F. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2016; 21(29): 1-14. DOI: 10.1186/s11658-016-0031-z

## References

1. Nagar R. Autophagy: A brief overview in perspective of dermatology. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 2017; 83(3): 290-297. DOI: 10.4103/0378-6323.196320
2. Kim H., Park S., Moon S., Lee J., Kim S. Autophagy in Human Skin Fibroblasts: Impact of Age. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19(8): E2254. DOI: 10.3390/ijms19082254
3. Abramyan Sh.M., Morozov S.G. [Determination of the level of spontaneous and induced apoptosis of cells obtained from the surgical material for face lifting]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2016; 14(4): 63-68. (in Russian)
4. Elks C., Zhao P., Grant R., Hang H., Bailey J., Burk D., McNulty M.A., Mynatt R.L., Stephens J.M. Loss of oncostatin M signaling in adipocytes induces insulin resistance and adipose tissue inflammation in vivo. *J. Biol. Chem.* 2016; 291(33): 17066-17076. DOI: 10.1074/jbc.M116.739110
5. Perez White B., Getsios S. Eph receptor and ephrin function in breast, gut, and skin epithelia. *Cell. Adh. Migr.* 2014; 8(4): 327-338. DOI: 10.4161/19336918.2014.970012
6. Deng Y., Xu J., Zhang X., Yang J., Zhang D., Huang J., Lv P., Shen W., Yang Y. Berberine attenuates autophagy in adipocytes by targeting BECN1. *Autophagy*. 2014; 10(10): 1776-1786. DOI: 10.4161/auto.29746
7. Abramyan Sh.M., Morozov S.G. [The study of the status of signaling pathways of apoptosis in cells during plastic surgery on the face]. *Annaly plasticheskoy, rekonstruktivnoy i ehsteticheskoy hirurgii [Annals of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery]*. 2017; 1: 70. (in Russian)
8. Cavinato M., Koziel R., Romani N., Weinmüllner R., Jenewein B., Hermann M., Dubrac S., Ratzinger G., Grillari J., Schmuth M., Jansen-Dürr P. UVB-induced senescence of human dermal fibroblasts involves impairment of proteasome and enhanced autophagic activity. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 2017; 72(5): 632-639. DOI: 10.1093/gerona/glw150
9. Liu W., Ye L., Huang W., Guo L., Xu Z., Wu H., Yang C., Liu H.F. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2016; 21(29): 1-14. DOI: 10.1186/s11658-016-0031-z

### Сведения об авторах:

Абрамян Шмавон Маисович – младший научный сотрудник лаборатории регуляции репаративных процессов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; челюстно-лицевой и пластический хирург Клиники пластической и эстетической хирургии профессора Блохина С.Н. и доктора Вульфа И.А. «Frau Klinik».

Волкова Елена Николаевна – доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции репаративных процессов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Блохин Сергей Николаевич – доктор медицинских наук, профессор, руководитель Клиники пластической и эстетической хирургии профессора Блохина С.Н. и доктора Вульфа И.А. «Frau Klinik»

Сергей Георгиевич Морозов – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»