

Сравнительный анализ воздействия р199 на 2D и 3D культуру дермальных фибробластов человека

Кожина К.В.^{1,2}, Сабурова И.Н.¹, Горкун А.А.¹, Зурина И.М.¹,
Кошелева Н.В.^{1,3}, Волкова Е.Н.², Морозов С.Г.¹

¹ — ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», РФ, 1253158, Москва, Балтийская ул., д.8

² — ООО «Центр восстановительной медицины», РФ, 123098, Москва, ул. Маршала Василевского, д.11, к1

³ — Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, РФ, 119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.12

E-mail: stgork@gmail.com

Сегодня биотехнологии открывают путь к применению широкого спектра эффективных и инновационных косметических активных веществ. Современное развитие клеточных технологий теоретически позволяет полностью заменить животные модели для анализа и развития косметических препаратов на культуры клеток, которые являются высокочувствительными к токсическому эффекту, простыми в применении и предпочтительными с точки зрения биоэтики. Монослойная культура дермальных фибробластов является широко распространенной модельной системой в области тестирования и разработки косметических препаратов. Но сфероиды, полученные из дермальных фибробластов, могут стать моделью, более соответствующей нативной тканевой организации при сохранении высокой пропускной способности к анализу. В данном исследовании сравнивали дозозависимый эффект пептида р199 на экспрессию коллагенов I, III и IV типов, а также фибронектина как в 2D, так и в 3D культуре дермальных фибробластов человека. Использование трехмерной модели позволило не только оценить изменения в уровне экспрессии белков внеклеточного матрикса, но и их структуру при синтезе во внеклеточное пространство.

Ключевые слова: тестирование косметических препаратов, культура клеток, фибробласты, сфероиды, коллаген, фибронектин

Введение

Сегодня биотехнологии открывают путь к применению широкого спектра эффективных и инновационных косметических активных веществ. Современное развитие клеточных технологий теоретически позволяет полностью заменить животные модели для анализа и развития косметических препаратов на культуры клеток, которые являются высокочувствительными к токсическому эффекту, простыми в применении и предпочтительными с точки зрения биоэтики. Производители косметики обязаны предоставлять потребителю следующую информацию:

- 1) оценка безопасности продукта для здоровья человека;
- 2) существующие данные о нежелательных последствиях для здоровья человека в результате использования продукта;
- 3) доказательства эффективности, заявленной для косметического продукта.

Именно на эти критерии опираются исследователи при подборе экспериментальных тестов, которые могут выявить и классифицировать биологическую косметическую активность.

Органотипические культуры, реконструированные из диссоциированных клеток, были впервые разработаны в 1980-х годах. Наиболее хорошо охарактеризованной такой культурой является эквивалент кожи, разработанный в 1980 г. и используемый и в настоящее время [15]. Эквиваленты кожи, состоящие из фибробластов внутри коллагена и кератиноцитов на его поверхности, были успешно трансплантированы донорам клеток для замены поврежденной кожи. С 1990-х годов используются для изучения антиоксидантной защиты против фотостарения, метаболизма лекарственных препаратов, процессов дифференцирования, генной терапии и иммунной системы [2]. Од-

нако создание и поддержание *in vitro* эквивалентов тканей представляет собой дорогой и трудоемкий процесс [12]. Тогда как предпочтительно, чтобы модель, используемая для скринингового анализа, давала быстрый результат при применении относительно простых и недорогих аналитических методов [8].

Основные подходы к скрининговому анализу, основанному на культурах клеток [17]:

1. Исследование вторичных мессенджеров — мониторинг передачи сигнала после активации поверхностных клеточных рецепторов;
2. Анализ репортерных генов — изучение клеточного ответа на уровне транскрипции и трансляции;
3. Анализ клеточной пролиферации и цитотоксичности — контроль пролиферации и гибели клеток в ответ на внешние сигналы и стресс.

В основном в исследованиях используют иммортализованные клеточные линии, первичные культуры клеток и линии раковых клеток. Иммортализованные и раковые линии имеют ограничения в анализе в результате содержащихся мутаций, которые могут исказить полученные результаты. Первичные культуры обеспечивают репрезентативный клеточный ответ, однако имеют ограниченное время жизни, сложны в культивировании и трансфекции. Революцию в анализе лекарственных препаратов совершили недавние исследования с применением стволовых клеток: раковых стволовых клеток, мезенхимных стромальных клеток, эмбриональных стволовых клеток и индуцированных плюрипотентных клеток. Применение подобных клеток помогло комбинировать адекватный ответ и простоту культивирования — ключевые параметры для применения метода в фармакологическом скрининге [17].

Монослойные культуры позволяют быстро и легко получить результат, однако они не отражают реального микроокружения клеток, взаимодействий клетка-клетка и клетка-матрикс, вследствие чего полученные результаты могут не соответствовать нормальной физиологии ткани. Но именно монослойные культуры являются более эффективными в отношении исследования цитотоксичности и, например, антимикобактериальной активности препарата [16].

3D культуры могут лучше воспроизвести клеточные ответы на медикаментозное лечение и имеют потенциал, чтобы стать превосходной платформой для нового развития лекарственных средств. Тем не менее, 3D культуры создают неоднородную среду, в которой трудно контролировать изменения в клетках и их деятельности, используя обычные методы анализа, применяемые для 2D культур. Таким образом, существует большая потребность в создании новых методов *in vitro* анализа на 3D культурах, которые могут стать «мостом» между 2D монослойными культурами клеток и животными моделями. В настоящее время ряд исследователей эффективно использует сфероиды из раковых стволовых клеток для скрининга противоопухолевых препаратов [7]. В данном исследовании для сравнительной оценки эффективности косметического препарата p199, обладающего антивозрастным эффектом, в качестве объекта выбрана культура фибробластов человека. Это связано с тем, что наиболее значимые изменения, происходящие в процессе старения кожи, наблюдаются в дерме, где происходит дезорганизация взаимодействия фибробластов и интерстициального матрикса. Фибробласты играют ключевую роль в морфогенезе и динамическом ремоделировании дермы, включая синтез компонентов внеклеточного матрикса и специфических ферментов, деградирующий его. Следовательно, воздействие препарата должно быть направлено именно на фибробласты, которые поддерживают структуру и функциональность кожной матрицы. Целями такого исследования являются подтверждение и улучшение предыдущих результатов с использованием более сложных аналитических методов для измерения динамического синтеза компонентов внеклеточного матрикса в сфероиде, где фибробласты находятся в более физиологичной среде. В этой трехмерной модели фибробласты не пролиферируют и окружены собственным новосинтезированным матриксом с организацией, очень похожей на нормальную дерму.

Материалы и методы

Первичную культуру дермальных фибробластов получали с добровольного информированного согласия пациента (пол — женский, возраст — 54 года) из биоптата кожи посредством механической дезагрегации и последующей ферментативной обработки 0,25% раствором трипсина. Высеивали на чашки Петри в плотности 1×10^5 — 2×10^5 клеток/см² в ростовую среду DMEM/F12, дополненную 2мМ L-глутамином, гентамицином (50 мкг/мл) и 10% фетальной телячьей сыворотки, среду заменяли каждые двое суток. Культивировали в стандартных условиях (+37°C, 5% CO₂) до 4 пассажа, описывали клетки по экспрессии характерных маркеров и криоконсервировали аликвоты культуры по 1×10^6 клеток, создавая банк первичной куль-

туры дермальных фибробластов человека, на которой проводили все дальнейшие исследования.

Для анализа размораживали две аликвоты культуры, одну из которых культивировали до появления всех признаков репликативного старения дермальных фибробластов (18 пассаж, P18). Размороженная, не пассированная культура клеток 4 пассажа (P4) считалась контрольной и соответствовала по своим характеристикам фибробластам молодой кожи. Сфероиды 3D культуры P18 и P4 получали, высевая клетки на агарозные планшеты (3DPetriDish, MicrotissueTM, США) в концентрации 25×10^4 клеток/мл.

Чтобы исследовать дозозависимое воздействие на 2D и 3D культуру дермальных фибробластов, аликвоты (500 мкл) пептида p199, растворенного в солевом буфере смешивали с полной ростовой средой в соотношении 1:10, 1:100 и культивировали клетки и сфероиды в присутствии пептида в течение 72 ч. Исследовали морфологию клеток и экспрессию маркеров: коллагенов I, III и IV типов и фибронектина. Далее для проведения иммуноцитохимического анализа клетки фиксировали в 4% растворе параформальдегида (4°C, 20 мин). Сфероиды затем помещали в 20% раствор сахарозы (4 ч, +4°C) и готовили серию срезов толщиной 10—20 мкм на криотоме SM1850UV (Leica, Германия). Результат экспрессии визуализировали с помощью последовательной инкубации образцов с первичными и вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромами FITC (E = 525 nm) и DyLight594 (E = 617 nm). Ядра докрашивали раствором Hoechst 33258 (0,004 мг/мл). Анализ проводили с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Olympus Fluoview FV10 (Olympus, Япония).

Результаты и обсуждение

Использование в исследовании одной и той же первичной культуры клеток позволяет сопоставлять и сравнивать полученные данные. Как показал предварительный анализ, монослойная культура дермальных фибробластов P18 демонстрировала признаки репликативного старения: индекс пролиферации был ниже 1,5, средний диаметр клеток приближался к 20 мкм, тогда как индекс пролиферации культуры P4 был равен 2—2,5, а средний диаметр клеток был равен 13 мкм. Кроме того, культура P18 практически не экспрессировала коллагены I, III и IV типов и фибронектин и не формировала сфероиды в 3D культуре, что также подтверждает процесс «старения» клеток в культуре.

Далее приведены результаты экспрессии ключевых белков внеклеточного матрикса (ВКМ), обеспечивающих целостность и функциональность здоровой и молодой кожи, в 2D и 3D культуре фибробластов при культивировании в присутствии различных концентраций p199. Как показано на рис. 1 и 2, экспрессия коллагенов I и III типов в культуре P18 соответствует экспрессии в культуре P4 независимо от внесенной концентрации белка p199, тогда как экспрессия коллагена IV типа (рис. 3) и фибронектина (рис. 4) явно имеет дозозависимый характер: интенсивность флуоресценции изменяется при воздействии различных концентраций препарата. Локализацию белков ВКМ в клетках наблюдали следующую: коллагенов I и IV типов — околядерную, коллагена III типа — равномерную по цитоплазме, фибронектина — вдоль мембран в цитоплазме и во внеклеточном пространстве.

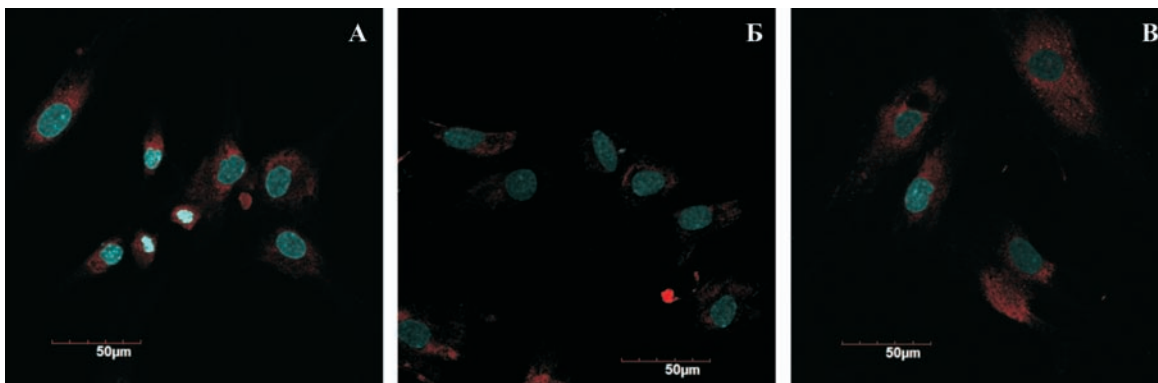


Рис. 1. Иммуноцитохимический анализ экспрессии коллагена I (красный) в 2D культуре фибробластов P18 после сокультивирования с p199, смешанного с ростовой средой в соотношении 1:10 (А), 1:100 (Б), и фибробластов P4, контрольной группы (В). Ядра докрашены Hoechst 33258 (синий).

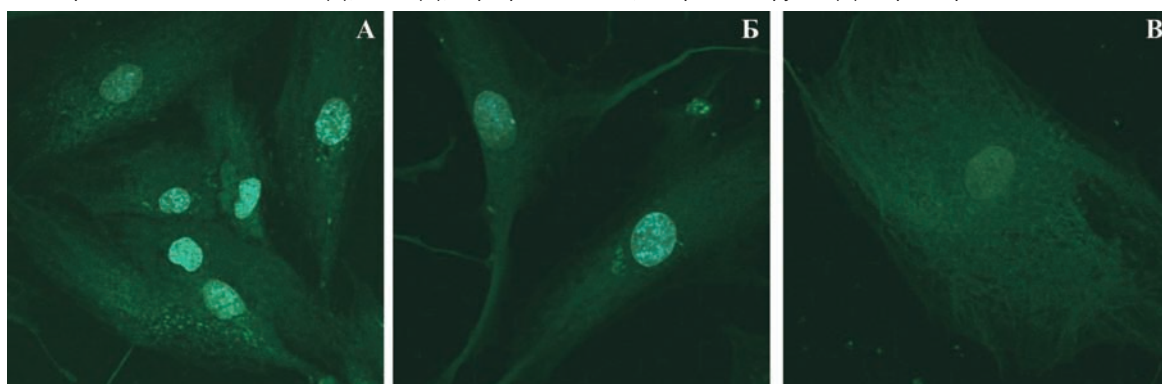


Рис. 2. Иммуноцитохимический анализ экспрессии коллагена III (зеленый), α SMA (красный) в 2D культуре фибробластов P18 после сокультивирования с p199, смешанного с ростовой средой в соотношении 1:10 (А), 1:100 (Б), и фибробластов P4, контрольной группы (В). Ядра докрашены Hoechst 33258 (синий).

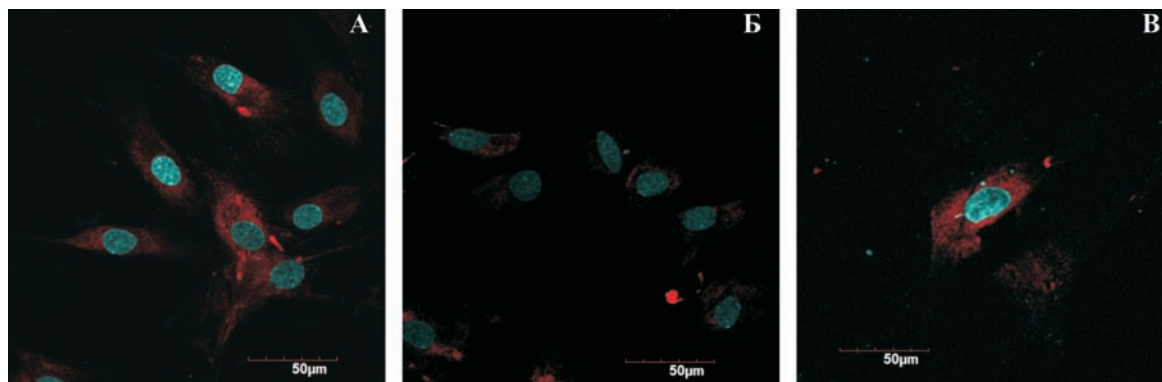


Рис. 3. Иммуноцитохимический анализ экспрессии коллагена IV (красный) в 2D культуре фибробластов P18 после сокультивирования с p199, смешанного с ростовой средой в соотношении 1:10 (А), 1:100 (Б), и фибробластов P4, контрольной группы (В).

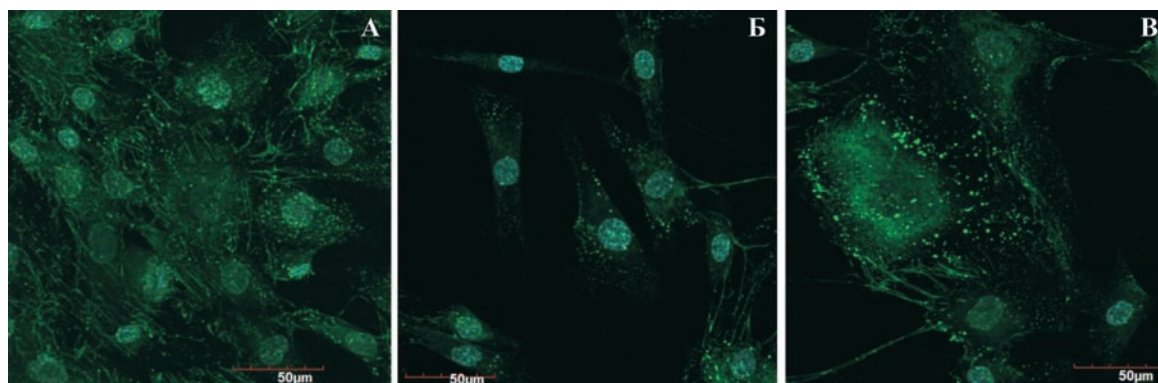


Рис. 4. Иммуноцитохимический анализ экспрессии фибронектина (зеленый) в 2D культуре P18 после сокультивирования с p199, смешанного с ростовой средой в соотношении 1:10 (А), 1:100 (Б), и фибробластов P4, контрольной группы (В). Ядра докрашены Hoechst 33258 (синий).

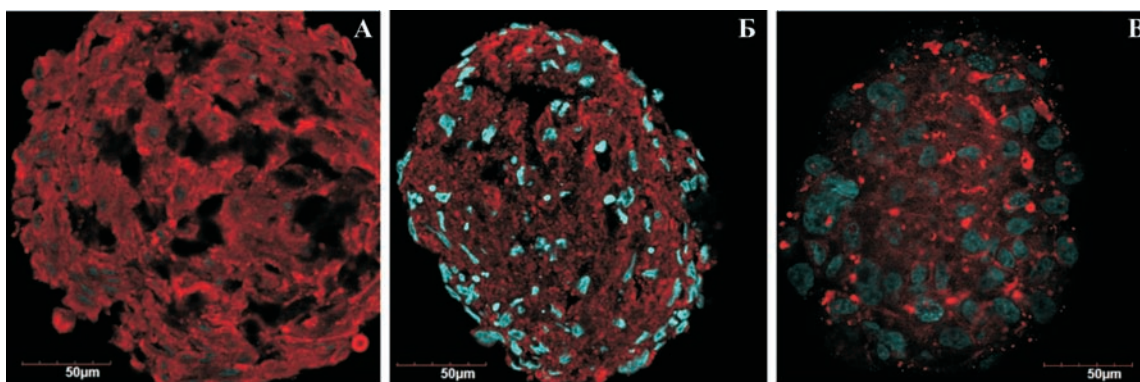


Рис. 5. Иммуноцитохимический анализ экспрессии коллагена I (красный) в сфероиде, полученных из фибробластов P18 после сокультивирования с r199, смешанного с ростовой средой в соотношении 1:10 (А), 1:100 (Б), и фибробластов P4, контрольной группы (В). Ядра докрашены Hoechst 33258 (синий).

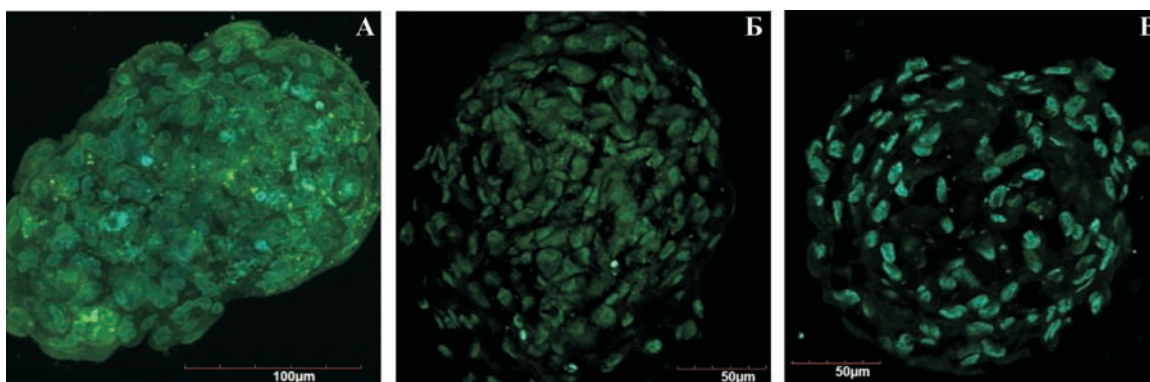


Рис. 6. Иммуноцитохимический анализ экспрессии коллагена III (зеленый), αSMA (красный) в сфероиде, полученных из фибробластов P18 после сокультивирования с r199, смешанного с ростовой средой в соотношении 1:10 (А), 1:100 (Б), и фибробластов P4, контрольной группы (В). Ядра докрашены Hoechst 33258 (синий).

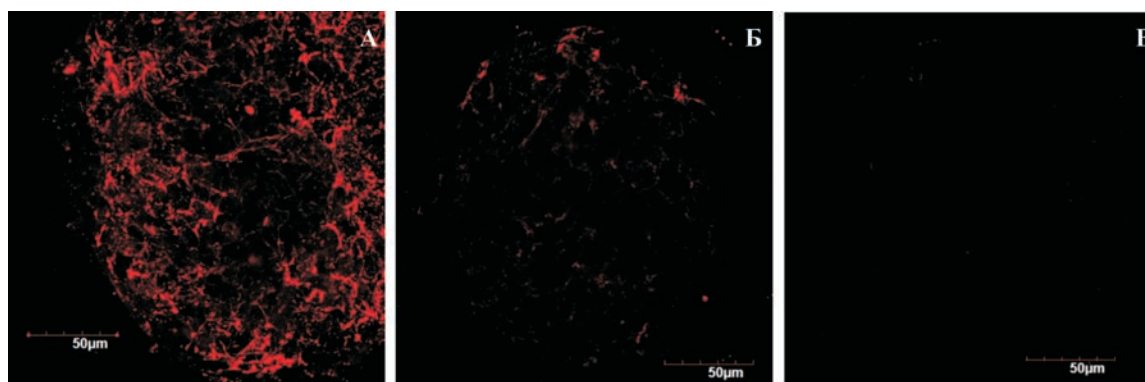


Рис. 7. Иммуноцитохимический анализ экспрессии коллагена IV (красный) в сфероиде, полученных из фибробластов P18 после сокультивирования с r199, смешанного с ростовой средой в соотношении 1:10 (А), 1:100 (Б), и фибробластов P4, контрольной группы (В).

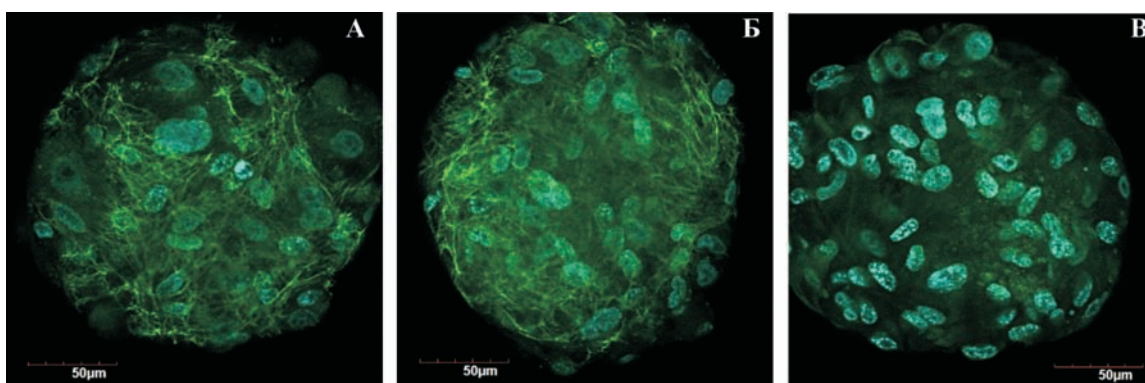


Рис. 8. Иммуноцитохимический анализ экспрессии фибронектина (зеленый) в сфероиде, полученных из фибробластов P18 после сокультивирования с r199, смешанного с ростовой средой в соотношении 1:10 (А), 1:100 (Б), и фибробластов P4, контрольной группы (В). Ядра докрашены Hoechst 33258 (синий).

Анализ экспрессии белков ВКМ в сфероиде фибробластов показал, что в 3D культуре клетки синтезируют белки матрикса не только внутри клетки, но и во внеклеточное пространство, позволяя таким образом оценить структуру новообразованного каркаса. В 3D культуре коллаген I (рис. 5) и III (рис. 6) типов формируют плотную оболочку, окружая все клетки сфероида, экспрессия белков носит дозозависимый характер: интенсивность флуоресценции выше при разведении препарата р199 в ростовой среде 1:10. Однако изменения в интенсивности флуоресценции метки коллагенов I и III не так значительны, как для коллагена IV типа (рис. 7). Коллаген IV типа формирует во внеклеточном пространстве сетевидный каркас, расположенный преимущественно в центральной части сфероида. Экспрессия коллагена IV типа полностью коррелирует с концентрацией р199 в среде, более того экспрессия этого белка ВКМ во внеклеточном пространстве полностью отсутствует в контрольной группе, которую не инкубировали с пептидом р199. Экспрессия фибронектина также зависит от концентрации препарата р199, увеличиваясь в соответствии с его концентрацией и превышая уровень экспрессии белка в контрольной группе (рис. 8). Структура новосинтезированного фибронектина во внеклеточном пространстве — нитевидная, матрикс объединяет клетки сфероида в единую сеть, участвуя, вероятно, в компактизации сфероида.

Коллаген — фибриллярный секреторный белок, наиболее распространенный в организме человека. Он образует волокна, переплетающиеся как нити в ткани. Коллаген и эластин формируют волокнистый каркас, в который могут вращать новые клетки, и обеспечивают коже упругость и эластичность, а нарушение их синтеза приводит к потере этих свойств. По морфологии коллаген принято делить на три группы: фибриллярный коллаген: коллагены I, II, III и V типов; сетевидный коллаген — коллаген IV типа, образующий опорную сеть базальных мембран; нитевидный коллаген — коллаген VI типа.

Коллагены I и III типов формируют основной каркас дермы, но их соотношение в коже меняется с возрастом [4]. В результате старения в коже происходит накопление активных форм кислорода (АФК), которые повышают уровень пептида-активатора 1 (AP-1), стимулирующего активность матричных металлопротеиназ 1, 2 и 9 (ММП1, 2, 9), что приводит к разрушению внеклеточного матрикса кожи. В то же время АФК снижают содержание фактора TGF- β 2, отвечающего за синтез нового коллагена. Таким образом, формируется дисбаланс белков ВКМ [6].

Коллаген IV типа — уникальный член семейства коллагенов, который присутствует только в базальной мембране, характерен только для эмбрионального и детского возраста и с годами быстро уменьшается [9]. Фибробласты, которые были использованы для данного исследования, были выделены из кожи человека, возраст которого составлял 54 года, поэтому экспрессия коллагена IV в контрольной группе выявлена не была. Однако именно данный параметр может стать наиболее показательным в доказательстве эффективности антивозрастной активности косметических препаратов. Как следует из сопоставления результатов экспрессии 2D (рис. 3) и 3D (рис. 7) культуры фибробластов, клетки человека с возрастом не утрачивают полностью способность синтезировать коллаген IV типа (рис. 3, В), однако это не означает, что при этом фибробласты сохраняют способность синте-

зировать его во внеклеточное пространство для формирования каркаса дермы (рис. 7, В). Из представленных результатов следует, что оценить изменения в синтезе и структуре ключевых белков ВКМ возможно только в 3D культуре.

Из приведенных выше результатов, также было установлено, что препарат 199 положительно влияет на уровень экспрессии фибронектина (рис. 8), который вместе с гликозаминогликанами составляют аморфный (основной) компонент межклеточного матрикса. Также фибронектин отвечает за адгезию, подвижность, дифференцировку и взаимную ориентацию клеток [3]. Кроме того, при изучении процессов сфероидообразования в культуре дермальных фибробластов было установлено, что клетки, не экспрессирующие фибронектин не могли образовать [14]. В данном исследовании фибробласты P18 не образовывали сфероиды, что, вероятно, было связано именно со сниженной экспрессией фибронектина, и, как следует из представленных результатов, имело обратимый эффект в присутствии анализируемого препарата р199. Поэтому способность клеток формировать сфероиды также можно считать косвенным признаком антивозрастного действия косметических препаратов.

Монослойные культуры являются признанной модельной системой, используемой в разработке и исследованиях лекарственных средств. Однако такая 2D клеточная модель отличается от естественных условий. Обычная адгезивная культура представляет собой растущие двумерным (2D) монослоем клетки на плоской поверхности. Клетки, прикрепленные к искусственной пластиковой или стеклянной подложке, контактируют с другими клетками с образованием межклеточных контактов только в одной плоскости, что препятствует формированию многомерной структуры. Все органы и ткани, включая кожу, имеют трехмерную клеточную организацию в которой клетки взаимодействуют друг с другом, образуя сложные комплексы контактов с другими клетками и внеклеточным матриксом, формируя, таким образом, уникальное микроокружение. Поэтому «старение» монослойной культуры фибробластов *in vitro* во многом сходно, но не полностью эквивалентно старению кожи *in vivo*. Воспроизвести все возрастные изменения на монослойной культуре в полном объеме не удастся. Это приводит исследователей к переводу модельных систем из 2D в 3D условия культивирования [5]. Одним из вариантов 3D клеточных культур являются сфероиды. Они представляют собой трехмерные самоорганизующиеся в силу природных адгезивных свойств сферические кластеры клеток, состоящие как из одного типа клеток, так и из нескольких [10]. При формировании сфероидов клетки могут восстановить межклеточные контакты и создать микроокружение, поддерживающее их нативный фенотип. Однако не все клетки могут образовывать сфероиды. Низкодифференцированные клетки человека, включая «незрелые» фибробласты, в условиях отсутствия адгезии способны агрегировать друг с другом, формируя новую многоклеточную структуру — сфероид, содержащий эпителиальный и мезенхимный компоненты [1, 11, 13]. Стареющие культуры фибробластов способность к сфероидообразованию утрачивают. Для сфероидообразования важен определенный уровень экспрессии фибронектина и интегрин α 5 и β 1 фибробластами. Дифференцировка и последующее старение клеток сопровождается утратой

способности к мезенхимо-эпителиальному переходу, без которого невозможно формирование сфероидов. Таким образом, сфероидообразование является уникальной простой количественной тестовой системой для определения клеточной зрелости и оценки влияния на нее исследуемых препаратов.

Кроме того, 3D клеточные культуры более стабильны, чем 2D клеточные культуры. Их можно поддерживать в культуре в течение длительного времени — более 3 месяцев, в отличие от монослойных культур, которые быстро достигают конфлюентного состояния и требуют постоянного пересева или при отсутствии пролиферации («старые» культуры) погибают. Поэтому именно 3D культуры можно активно использовать при изучении отсроченных эффектов лекарственных препаратов.

Список литературы

1. Кошелева Н.В., Зурина И.М., Сабурин И.Н., Горкун А.А., Колоколцова Т.Д., Борзенко С.А., Репин В.С. Влияние эмбриональной телячьей сыворотки на формирование сфероидов из стромальных клеток лимба глаза // Патогенез. — 2015. — Т. 13, №2. — С. 4—11.
2. Augustin C., Frei V., Perrier E., Huc A., Damour O., An in vitro selection of new cosmetic active compounds: From screening tests on monolayered fibroblast culture to efficiency study on 3-D dermal equivalent // J. Appl. Cosmetol. — 1997. — Т. 15. — С. 1—12.
3. Boyer B. Kern P., Fournanier A., Labat-Robert J. Age-dependent variations of the biosyntheses of fibronectin and fibrous collagens in mouse skin // Experimental gerontology. — 1991. — Т. 26, № 4. — С. 375—383.
4. Cheng W., Yan-hua R., Fang-gang N., Guo-an Z. The content and ratio of type I and III collagen in skin differ with age and injury // African Journal of Biotechnology. — 2013. — Т. 10, № 13. — С. 2524—2529.
5. Filatov M.A., Khramova Y.V., Semenova M.L. In Vitro Mouse Ovarian Follicle Growth and Maturation in Alginate Hydrogel: Current State of the Art // Acta Naturae. — 2015. — Vol. 7, №2. — P. 48—56.
6. Helfrich Y.R., Sachs D.L., Voorhees J.J. Overview of skin aging and photoaging // Dermatol. Nurs. — 2008. — Т. 20, № 3. — С. 177.
7. Hickman J.A., Graeser R., de Hoogt R., Vidic S., Brito C., Gutekunst M., van der Kuip H. Three-dimensional models of cancer for pharmacology and cancer cell biology: capturing tumor complexity in vitro/ex vivo // Biotechnol. J. — 2014. — Т. 9, № 9. — С. 1115—1128.
8. Kenny H.A., Lal-Nag M., White E.A., Shen M., Chiang C.-Y., Mitra A.K. Quantitative high throughput screening using a primary human three-dimensional organotypic culture predicts in vivo efficacy // Nature Communications. — 2015. — 6. — P. e6220.
9. Khoshnoodi J., Pedchenko V., Hudson B. G. Mammalian collagen IV // Microscopy research and technique. — 2008. — Т. 71, № 5. — С. 357—370.
10. Kosheleva N., Saburina I., Zurina I., Gorkun A., Kolokoltsova T., Repin V. Studying chimeric cell spheroids in 3D culture // Regenerative Medicine. — 2015. — Vol. 10, №07s. — P. 178.
11. Kubatiev A.A., Zurina I.M., Kosheleva N.V., Gorkun A.A., Saburina I.N., Repin V.S. From 2D cell phenotypes to 3D live high-content imaging: new ways to windows // Journal of Cytology & Histology. — 2015. — Vol. 6, №6. — P. 378.
12. Reichl S., Bednarz J., Muller-Goymann C.C. Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies // The British Journal of Ophthalmology. — 2004. — Т. 88, № 4. — С. 560—565.
13. Repin V.S., Saburina I.N., Kosheleva N.V., Gorkun A.A., Zurina I.M., Kubatiev A.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. — Vol. 158. — Issue 1. — P. 137—144.

14. Salmenpera P., Kankuri E., Bizik J., Siren V., Virtanen I., Takahashi S., Leiss M., Fassler R., Vaheri A. Formation and activation of fibroblast spheroids depend on fibronectin-integrin interaction // Experimental cell research. — 2008. — Т. 314. — № 19. — С. 3444—3452.

15. Seet W.T., Maarof M., Khairul Anuar K., et al. Shelf-Life Evaluation of Bilayered Human Skin Equivalent, MyDerm™. Brandner JM, ed. // PLoS ONE. — 2012. — Т. 7. — № 8. — P. e40978.

16. 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 // Antimicrob Agents Chemother. — 2002. — Т. 46, № 8. — С. 2533—2539.

17. Zang R., Li D., Tang I.-C., Wang J., Yang S.-T. Cell-based assays in high-throughputs for drug discovery // International Journal of Biotechnology for Wellness Industries. — 2012. — Т. 1, № 1. — С. 31.

Поступила 20.09.2015

References

1. Kosheleva N.V., Zurina I.M., Saburina I.N., Gorkun A.A., Kolokoltsova T.D., Borzenok S.A., Repin V.S. The impact of fetal bovine serum on formation of spheroids from eye stromal limbal cells // Patogenez. — 2015. — Vol. 13, №2. — P. 4—11.
2. Augustin C., Frei V., Perrier E., Huc A., Damour O., An in vitro selection of new cosmetic active compounds: From screening tests on monolayered fibroblast culture to efficiency study on 3-D dermal equivalent // J. Appl. Cosmetol. — 1997. — Т. 15. — С. 1—12.
3. Boyer B. Kern P., Fournanier A., Labat-Robert J. Age-dependent variations of the biosyntheses of fibronectin and fibrous collagens in mouse skin // Experimental gerontology. — 1991. — Т. 26, № 4. — С. 375—383.
4. Cheng W., Yan-hua R., Fang-gang N., Guo-an Z. The content and ratio of type I and III collagen in skin differ with age and injury // African Journal of Biotechnology. — 2013. — Т. 10, № 13. — С. 2524—2529.
5. Filatov M.A., Khramova Y.V., Semenova M.L. In Vitro Mouse Ovarian Follicle Growth and Maturation in Alginate Hydrogel: Current State of the Art // Acta Naturae. — 2015. — Vol. 7, №2. — P. 48—56.
6. Helfrich Y.R., Sachs D.L., Voorhees J.J. Overview of skin aging and photoaging // Dermatol. Nurs. — 2008. — Т. 20, № 3. — С. 177.
7. Hickman J.A., Graeser R., de Hoogt R., Vidic S., Brito C., Gutekunst M., van der Kuip H. Three-dimensional models of cancer for pharmacology and cancer cell biology: capturing tumor complexity in vitro/ex vivo // Biotechnol. J. — 2014. — Т. 9, № 9. — С. 1115—1128.
8. Kenny H.A., Lal-Nag M., White E.A., Shen M., Chiang C.-Y., Mitra A.K. Quantitative high throughput screening using a primary human three-dimensional organotypic culture predicts in vivo efficacy // Nature Communications. — 2015. — 6. — P. e6220.
9. Khoshnoodi J., Pedchenko V., Hudson B. G. Mammalian collagen IV // Microscopy research and technique. — 2008. — Т. 71, № 5. — С. 357—370.
10. Kosheleva N., Saburina I., Zurina I., Gorkun A., Kolokoltsova T., Repin V. Studying chimeric cell spheroids in 3D culture // Regenerative Medicine. — 2015. — Vol. 10, №07s. — P. 178.
11. Kubatiev A.A., Zurina I.M., Kosheleva N.V., Gorkun A.A., Saburina I.N., Repin V.S. From 2D cell phenotypes to 3D live high-content imaging: new ways to windows // Journal of Cytology & Histology. — 2015. — Vol. 6, №6. — P. 378.
12. Reichl S., Bednarz J., Muller-Goymann C.C. Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies // The British Journal of Ophthalmology. — 2004. — Т. 88, № 4. — С. 560—565.
13. Repin V.S., Saburina I.N., Kosheleva N.V., Gorkun A.A., Zurina I.M., Kubatiev A.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. — Vol. 158. — Issue 1. — P. 137—144.
14. Salmenpera P., Kankuri E., Bizik J., Siren V., Virtanen I., Takahashi S., Leiss M., Fassler R., Vaheri A. Formation and activation of fibroblast spheroids depend on fibronectin-integrin interaction // Experimental cell research. — 2008. — Т. 314, № 19. — С. 3444—3452.
15. Seet W.T., Maarof M., Khairul Anuar K., et al. Shelf-Life Evaluation of Bilayered Human Skin Equivalent, MyDerm™. Brandner JM, ed. // PLoS ONE. — 2012. — Т. 7, № 8. — P. e40978.

16. 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* // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2002. — T. 46, № 8. — C. 2533—2539.

17. Zang R., Li D., Tang I.-C., Wang J., Yang S.-T. Cell-based assays in high-throughputs for drug discovery // *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries.* — 2012. — T. 1, № 1. — C. 31.

Received 20.09.2015

Copmarative study of p199 effect on 2D and 3D cultures of human dermal fibroblasts

**Kozhina K.V.^{1,2}, Saburina I.N.¹, Gorkun A.A.¹, Zurina I.N.¹,
Kosheleva N.V.^{1,3}, Volkova E.N.², Morozov S.G.¹**

¹ — FSBSI «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 8, Baltiyskaya st., Moscow, Russian Federation, 125315

² — LLC «Center of restorative medicine», 11-1, Marshal Vasilevsky st., Moscow, Russian Federation, 123098

³ — Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 12-1, Leninskie Gory, Moscow, Russian Federation, 119234

Nowadays, biotechnologies open the way for application of a wide range of effective and innovative cosmetic active substances. Modern development of cell technologies theoretically allows us to completely replace animal models for the development and analysis of cosmetic products with cell cultures, which are relatively easy-to-use, highly sensitive to toxic effects, and preferable in the context of bioethics. Monolayer culture of dermal fibroblasts is a widely used model system in the field of testing and development of cosmetic products. In contrast to 2D monolayer, 3D spheroids from dermal fibroblasts can become a model that would be closer to native tissue organization while maintaining a high throughput analysis capacity. In the current study, we compared the dose-dependent effect of P199 peptide on the expression of I, III and IV types collagen and fibronectin in 2D and 3D cultures of human dermal fibroblasts. By using this three-dimensional model, we were able to evaluate changes in the level of expression of extracellular matrix proteins, as well as their structure during synthesis to the extracellular space.

Key words: *cosmetic products testing, cell culture, fibroblasts, spheroids, collagen, fibronectin*