

УДК 57.085.23

## Новые методы тестирования в косметологии на 2D- и 3D-культурах фибробластов человека

Кожина К.В.<sup>1,2</sup>, Сабурина И.Н.<sup>2,4</sup>, Горкун А.А.<sup>2</sup>, Зурина И.М.<sup>2</sup>,  
Кошелева Н.В.<sup>2,3</sup>, Колокольцова Т.Д.<sup>2,4</sup>, Савина Г.Д.<sup>4</sup>, Репин В.С.<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup> — ООО «Premier-pharm», 123317 Россия, Москва, ул. Тестовская, д. 10

<sup>2</sup> — ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», 125315 Россия, Москва, ул. Балтийская, д. 8

<sup>3</sup> — Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119234 Россия, Москва, Ленинские горы 12-1

<sup>4</sup> — ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия последипломного образования Минздрава РФ, 123995 Москва, Россия, ул. Баррикадная, д. 2/1

В настоящее время исследование возрастных изменений физиологии организма на клеточном уровне является одним из основных направлений в области геронтологии и косметологии. Понимание патогенеза старения клеток может помочь в предотвращении их старения и сохранении их функций, и соответственно, в продлении активной фазы жизни взрослого человека. Для оценки эффективности различных омолаживающих препаратов все чаще и чаще используют монослойные культуры клеток. Однако измененная физиология клеток в монослое не позволяет с высокой степенью достоверности воспроизвести все возрастные изменения в полном объеме, для этого требуется трехмерное микроокружение. Одним из вариантов 3D клеточных культур являются сфероиды. При образовании сфероидов клетки формируют межклеточные контакты, синтезируют внеклеточный матрикс и создают микроокружение, поддерживающее их фенотип, максимально приближенный к нативному. Целью данного исследования стало изучение влияния геропротекторного препарата олигопептида p199 на 2D- и 3D-культуру фибробластов дермы человека. В ходе исследования была получена и охарактеризована культура фибробластов дермы человека, на которой было показано, что p199 стимулирует пролиферацию и миграцию клеток в монослое и увеличивает способность клеток к образованию сфероидов. Полученные данные демонстрируют различные подходы к оценке биоэффективности омолаживающих препаратов и свидетельствуют о преимуществе в применении 3D-культивирования для тестирования препаратов.

**Ключевые слова:** тестирование косметических препаратов, культура клеток, фибробласты, сфероиды, сфероидообразование, заживление раны

**Для цитирования:** Кожина К.В., Сабурина И.Н., Горкун А.А., Зурина И.М., Кошелева Н.В., Колокольцова Т.Д., Савина Г.Д., Репин В.С. Новые методы тестирования в косметологии на 2D- и 3D-культурах фибробластов человека. Патогенез. 2016; 14(2): 28-37

**Для корреспонденции:** Горкун Анастасия Алексеевна, кандидат биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», 125315 Россия, Москва, ул. Балтийская, д. 8. e-mail: stgork@gmail.com

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

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

**Поступила** 12.05.2016

## New methods for cosmetology tests using 2D and 3D cells cultures of human fibroblasts

Kozhina K.V.<sup>1,2</sup>, Saburina I.N.<sup>2,4</sup>, Gorkun A.A.<sup>2</sup>, Zurina I.N.<sup>2</sup>,  
Kosheleva N.V.<sup>2,3</sup>, Kolokoltsova T.D.<sup>2,4</sup>, Savina G.D.<sup>4</sup>, Repin V.S.<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup> — Ltd «Premier-Pharm» 10, Testovskaya st., Moscow, Russian Federation, 123317

<sup>2</sup> — FSBSI «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 8, Baltiyskaya st., Moscow, Russian Federation, 125315

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

<sup>4</sup> — Russian Medical Academy of Postgraduate Education, 123995, Russian Federation, Moscow, Barrikadnaya st., 2/1

Nowadays, studying age-related changes in physiology at cellular level is one of the most promising trends in gerontology and cosmetology. Understanding pathogenesis of cell aging can be helpful in maintaining cell function and prolongation of active phase of human life. Monolayer cell cultures are now often used to evaluate the efficacy of different anti-aging drugs. However, the physiology of cells in monolayer changes drastically, which does not allow fully reproduce all the age-related changes, because it requires three-dimensional (3D) surrounding. One of the possible 3D cultures is spheroid. In spheroids, cells form intercellular junctions, synthesize extracellular matrix and create microenvironment, necessary for maintaining phenotype, close to the initial one. The current work was conducted to study the effect of geroprotector drug, oligopeptide p199, on 2D and 3D culture of human dermal fibroblasts. On the obtained and characterized human dermal fibroblast cell culture it was shown that p199 stimulates cell proliferation and migration in monolayer, as well as their capability of spheroid formation. The obtained data demonstrate different approaches in evaluating bioefficacy of anti-aging drugs, as well as show the advantage of using 3D cultures for drug testing.

**Key words:** *cosmetic products testing, cell culture, fibroblasts, spheroids, spheroid formation, wound healing.*

**For citation:** Kozhina K.V., Gorkun A.A., Zurina I.N., Kosheleva N.V., Kolokoltsova T.D., Savina G.D., Saburina I.N., Repin V.S. *New methods for cosmetology tests using 2D and 3D cells cultures of human fibroblasts. Patogenez. 2016; 14(2): 28-37 (In Russian).*

**For correspondence:** Gorkun Anastasiya A., PhD, Leading Researcher work Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 125315, Russian Federation, Moscow, Baltiyskaya st., 8, e-mail: stgork@gmail.com

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

**Conflict of interest.** *The authors declare no conflict of interest.*

**Received 12.05.2016**

## Введение

Активное расширение рынка лекарственных и косметических препаратов, а также развитие таргетной терапии, требуют создания новых методов анализа биоэффективности и биобезопасности разрабатываемых медикаментов. Культуры клеток являются уникальной моделью для исследования токсичности веществ или испытания специфической активности лечебных препаратов, открывают новые возможности для изучения морфологии и ультраструктуры клеток, их молекулярно-биологических характеристик, а также способствует сокращению числа лабораторных животных в экспериментах *in vivo*. Культивирование стволовых и прогениторных клеток *in vitro* позволяет получать новые данные об особенностях функционирования и метаболизма клеток, выявлять ранние признаки изменения их состояния, дифференцировочного статуса и развития. Полученные в экспериментах *in vitro* данные о злокачественной трансформации клеток вносят значительный вклад в создание систем ранней диагностики опухолевых процессов и разработку препаратов для их предотвращения или торможения. Возможность выделения и выращивания клеток из разных тканей и органов делает перспективным их применение в регенеративной медицине, например, для реконструкции органов или поддержания их функции, с учетом этических, религиозных и правовых аспектов.

Стремительное развитие методов и технологий культивирования привело к увеличению количества работ с применением клеточных культур [1]. Одним из главных преимуществ этого метода является возможность прижизненного наблюдения за культурами, что делает их незаменимой моделью для проведения исследований в биологии, медицине, фармакологии или токсикологии. Для изучения морфологии и ультраструктуры клеток в настоящее время существует широкий выбор оборудования для разных видов микроскопии (световой, люминесцентной, электронной) [2].

Можно выделить два основных подхода к оценке эффективности препаратов *in vitro*: 2D и 3D культивирование. Монослойные 2D-культуры позволяют быстро и легко получить результат, однако они не воспроизводят реального характерного для тканей 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 для исследования цитотоксичности и антимикробактериальной активности препаратов [3]. Органотипические культуры позволяют лучше воспроизвести ответ клеток на медикаментозное воздействие и имеют потенциал для того,

чтобы стать превосходной платформой для создания и тестирования новых лекарственных средств. Однако такие 3D-культуры отличаются неоднородностью среды, в которой трудно контролировать изменения в жизнедеятельности клеток, используя обычные методы анализа, применяемые для 2D-культур.

В связи с этим существует большая потребность в создании новых моделей и методов *in vitro* анализа на 3D-культурах, которые могут стать «мостом» между 2D монослойными культурами клеток и животными моделями. В настоящее время, для скрининга противоопухолевых препаратов эффективно используют сфероиды из раковых стволовых клеток [4], поскольку они обладают значительным преимуществом: при тотальном контроле окружающей среды и состава сфероида, экспериментаторы получают возможность проводить анализ в пространственном контексте взаимодействий клетка-клетка и клетка-матрикс.

В косметологии основной терапевтической мишенью для разрабатываемых препаратов является кожа, поэтому наиболее перспективными для тестирования новых веществ представляются клетки кожи человека, в частности культура дермальных фибробластов. Это связано с тем, что наиболее значимые изменения, наблюдаемые при старении кожи, происходят в дерме, за счет дезорганизации взаимодействия фибробластов и внеклеточного матрикса. При этом для получения стабильных результатов по контролю лекарственных или косметических препаратов, выделенные культуры клеток должны быть охарактеризованы и иметь достаточно стабильные признаки, то есть предпочтительно использовать культуры клеток из общего банка.

Настоящее исследование посвящено изучению и сравнительной оценке эффективности биологически активного вещества на 2D- и 3D-культурах клеток. Для сравнительного анализа в качестве омолаживающего средства был выбран олигопептид p199, способный стимулировать синтез эластина, коллагена IV типа и фибронектина в фибробластах кожи человека [5, 6].

## Методика

### *Выделение и культивирование фибробластов кожи человека*

Забор материала осуществляли строго с соблюдением правил этики, Закона об охране здоровья граждан (№ 5487-1 «Об охране здоровья граждан» от 22 июля 1993 (в ред. Указа Президента РФ от 24.12.1993 N 2288; Федеральных законов от 02.03.1998 N 30-ФЗ, от 20.12.1999 N 214-ФЗ) и при информированном согласии донора.

Для выделения фибробластов было получено 3 биоптата кожной ткани человека (образец 1 — взрослый донор 45 лет, образец 2 — взрослый донор 54 лет, образец 3 — взрослый донор 52 лет). Первичную культуру дермальных фибробластов получали из биоптатов кожи путем механической дезагрегации и последующей ферментативной обработки. Клетки культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 2 mM L-глутамина и 10% фетальной телячьей сыворотки, до 4 пассажа, охарактеризовывали по экспрессии специфических маркеров и криоконсервировали, создавая банк культуры дермальных фибробластов человека. Линии от разных доноров были названы ФЧ-1, ФЧ-2, ФЧ-3. В дальнейшей работе использовали культуру клеток ФЧ-2, которая обладала наиболее стабильными культуральными и морфофункциональными характеристиками.

Для получения «стареющей» культуры клетки из полученного ранее банка культивировали до 18 пассажа (P18), в качестве контроля использовали культуру клеток 4 пассажа (P4).

Для исследования дозозависимого влияния олигопептида на 2D культуру, аликвоты (500 мкл) пептида P199, растворенного в солевом буфере смешивали с полной ростовой средой в соотношении 1:2, 1:10, 1:100, 1:1000. Анализ пролиферативной активности проводили на 2D культуре дермальных фибробластов P4 и P18. Клетки помещали на 12-луночные планшеты в плотности  $1 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup> в лунку. В качестве контроля исследовали поведение клеток в полной ростовой среде без добавления пептида. Клетки культивировали в присутствии пептида в течение 72 ч.

#### *Подсчет клеток и анализ пролиферативной активности*

Подсчет общего количества клеток производили через 72 часа с использованием автоматического счетчика клеток Countess (Invitrogen, США). Анализ динамики изменения числа клеток в монослое производили с помощью программы Cell-IQ Analyzer в течение 70 ч культивирования. Индекс пролиферации (IP) вычисляли по формуле:  $IP = N_{70}/N_0$ , где  $N_{70}$  — количество клеток через 70 ч культивирования, а  $N_0$  — через 0 ч культивирования.

#### *Морфологический анализ культуры клеток*

Для проведения морфологического анализа, предварительно зафиксированные в 4% растворе параформальдегида (+4°C, 20 мин) на покровных стеклах клетки окрашивали по протоколу гематоксилин-эозин.

#### *Контроль контаминации*

Для оценки наличия микоплазм в лабораторных условиях, фиксированный монослой клеток в течение 10 мин.

при +37°C окрашивали флюорохромом бис-бензimid (Hoechst — 33258), который связывается с двуцепочечной ДНК.

#### *Моделирование в монослое процесса заживления раневой поверхности путем миграции клеток*

Для оценки миграционной активности фибробластов и моделирования раневой поверхности в 2D культуре клетки высевали в лунки 12-луночных культуральных планшетов (Corning, США) в полной ростовой среде в концентрации  $1 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup> и культивировали в присутствии препарата p199 в соотношении с культуральной средой 1:10 до 90–100% конfluence (полного монослоя). Контролем служили клеточные культуры в лунках в полной ростовой среде без добавления пептида. После достижения культурами 100% конfluence наносили царапину острой глазной хирургической иглой. После нанесения царапины в течение 5 сут. вели прижизненное наблюдение за культурой в стандартных условиях (+37°C, 5% CO<sub>2</sub>) камеры-инкубатора прибора Cell-IQ (CM Technologies, Финляндия).

#### *3D культивирование фибробластов кожи человека*

Для изучения влияния олигопептида p199 на образование сфероидов из дермальных фибробластов монослойные клеточные культуры фибробластов P18, которые культивировали с добавлением в ростовую среду p199 и культуры фибробластов P18, культивируемые без добавления олигопептида, помещали на неадгезивные агарозные планшеты. Агарозные планшеты получали за счет полимеризации агарозы в специальных пластмассовых формах (3D Petri Dishes, Microtissue, США).

Для данного этапа исследования использовали аликвоты (500 мкл) пептида p199, растворенного в солевом буфере, и смешанные с полной ростовой средой в соотношении 1:10. Клетки снимали с культуральной поверхности, центрифугировали, полученный осадок ресуспендировали в полной ростовой среде и помещали на агарозные планшеты в концентрации  $1 \times 10^3$  клеток в лунку. Агарозные планшеты помещали в 12-луночные культуральные планшеты и вели прижизненное наблюдение в стандартных условиях камеры прибора Cell-IQ («CM Technologies», Финляндия) в течение 7 суток. Положительным контролем считали формирование сфероидов из фибробластов четвертого пассажа (P4) в полной ростовой среде без добавления пептида.

### **Результаты и обсуждение**

Проведенные исследования показали, что клетки, выделенные из образца 1 (ФЧ-1), обладали низкой жизнеспособностью, число их практически не увеличивалось

Таблица 1

#### **Индекс пролиферации культур фибробластов дермы человека, полученных от доноров разного возраста**

Название культуры клеток	1 пассаж	2 пассаж	3 пассаж	18 пассаж
ФЧ-1	2,03 ± 0,25	1,22 ± 0,21	0,75 ± 0,15	*
ФЧ-2	2,71 ± 0,15	3,20 ± 0,25	2,67 ± 0,24	2,0 ± 0,25
ФЧ-3	2,73 ± 0,27	2,67 ± 0,18	2,55 ± 0,25	*

Примечание. \* — не исследовали

при дальнейшем культивировании (индекс пролиферации 1,2—2,0 на 1—2 пассаже). Клетки быстро «старели» в культуре, что выражалось в значительном снижении скорости их деления (до 0,7—0,8 на 3 пассаже), повышенной вакуолизации и гибели клеток на 4—7 пассаже (табл. 1). Таким образом, данная культура была непригодной для получения больших запасов клеток, необходимых для длительного использования их в качестве модели исследования.

В противоположность этому, фибробласты из образцов 2 (ФЧ-2) и 3 (ФЧ-3) обладали хорошими культуральными характеристиками, имели достаточно высокую пролиферативную активность, равную 2,0—3,2. При дальнейшем культивировании клетки сохраняли индекс пролиферации до 2,0 и более, что сделало возможным создание достаточного запаса клеток в виде банка клеток и использование их в качестве модели для исследований.

Окрашивание фиксированного монослоя клеток ДНК специфическим красителем Hoechst 33258 подтвердил чистоту культуры ФЧ-2, в то время как в культуре фибробластов ФЧ-3 было выявлено присутствие микоплазмы (рис. 1). Двухцепочечная ДНК микоплазм выявлялась в виде светящихся точек разного размера на клетках или в межклеточном пространстве (рис. 1А). Известно, что микоплазмы в значительной степени влияют на жизнедеятельность клеток и, как следствие, искажают результаты исследований [7]. Поэтому культура клеток ФЧ-3 была забракована, ампулы с контаминированными клетками были уничтожены.

Таким образом для экспериментальных исследований использовали только культуру клеток ФЧ-2 (рис. 1Б), называемую в дальнейшем культура клеток дермальных фибробластов, на 4 пассаже (p4, или молодые клетки) и на 18 пассаже (p18, или стареющие клетки).

Морфология полученной культуры клеток дермы человека ФЧ-2 характеризовалась типичной для фибробластов картиной роста: поточно-расположенные клетки, иногда формирующие характерные «завитки» (рис. 2А). Первичная культура, то есть клетки, выделенные из ткани на 1 пассаже, представляла собой гетерогенную популяцию из клеток различных форм и размеров. При пассировании, за счет пролиферации одного типа клеток, диплоидная культура становилась гомогенной — клетки приобретали веретеновидную форму и размеры, в среднем, 100 x 10 мкм. Клетки выглядели прозрачными, были расположены параллельными группами, ориентированными в различных направлениях, то есть наблюдался характерный поточный рост клеток (рис. 2Б).

Если фото живых клеток на стекле давало представление о характере роста культуры, то окрашивание фиксированных клеток гематоксилин-эозином позволяло оценивать форму и размер клеток и ядра (рис. 3). В клетках исследуемой культуры ФЧ-2 цитоплазма содержала характерную мелкую зернистость, ядра были ориентированы по длинной оси клеток. Ядра содержали по 1—3 ядрышка, хроматин был представлен преимущественно эухроматином.

В культуре дермальных фибробластов 18 пассажа, которую использовали для дальнейших исследований, как стареющую, были хорошо заметны все признаки репликативного старения: спонтанное увеличение размера клеток, преобладание крупных плащевидных и парусовидных клеток (рис. 4А). Среднее значение индекса пролиферации

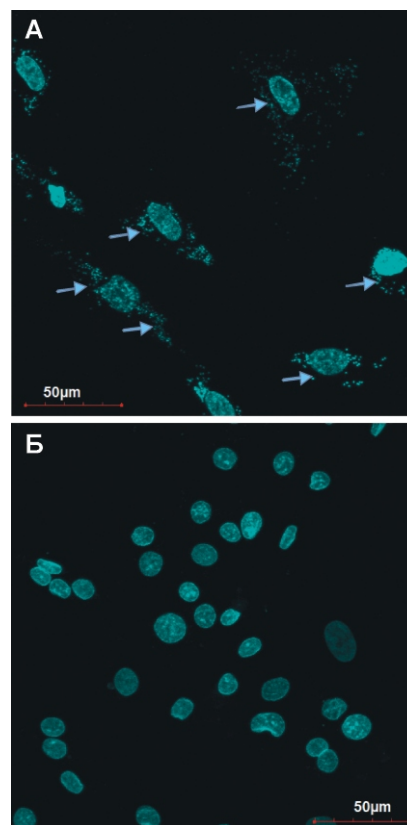


Рис. 1. Анализ микоплазменной контаминации в культуре фибробластов человека ФЧ-3 (А) и ФЧ-2 (Б). Стрелками указаны скопления микоплазм. Ядра окрашены Hoechst 33258 (синий). Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия.

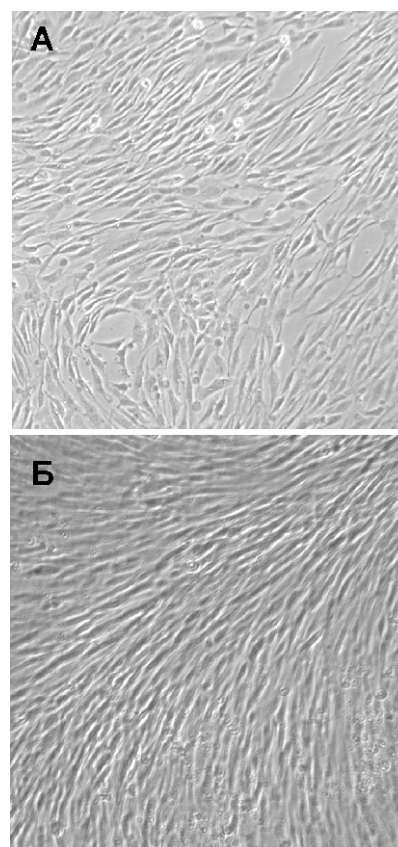


Рис. 2. Морфология первичной (А) и диплоидной (Б) культур фибробластов человека ФЧ-2. Ув. X100. Фиксированный, неокрашенный препарат. Фазово-контрастная микроскопия.

составляло 2,08 за 48 часов культивирования. Контрольная культура (P4) соответствовала по своим характеристикам фибробластам молодой кожи. В ней преобладали небольшие веретеновидные клетки, которые хорошо пролиферировали (рис. 4Б) — среднее значение индекса пролиферации составило 3,75 за 48 часов культивирования.

По данным предыдущего исследования [6], по экспрессии характерных для фибробластов маркеров культура 18 пассажа (P18) соответствовала возрастным изменениям, наблюдаемым в коже *in vivo*. Молодые клетки активно экспрессировали характерные для фибробластов маркеры (цитокератин 19, эластин, коллагены I, III и IV типов),

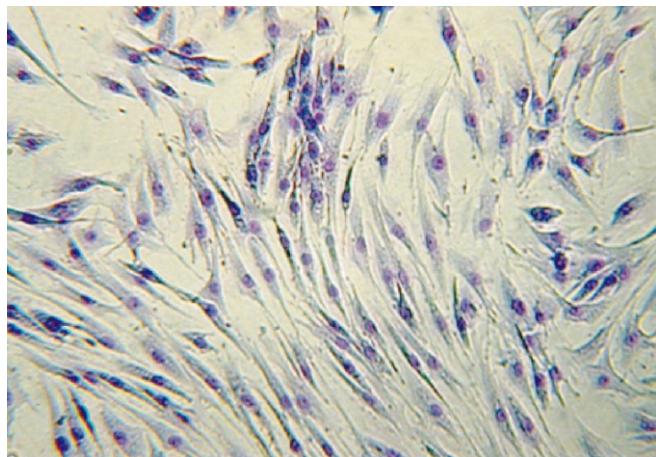


Рис. 3. Морфология диплоидной культуры фибробластов человека ФЧ-2 через 5 часов после посева на 4 пассаже. Ув. X200. Окрашено гематоксилин-эозином. Световая микроскопия.

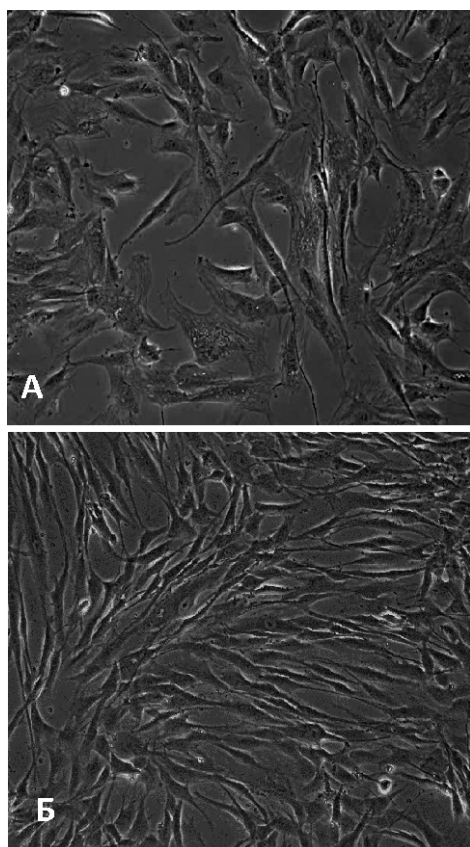


Рис. 4. А — опытная культура фибробластов (P18), Б — контрольная культура фибробластов (P4). Фазово-контрастная микроскопия.

отвечающие за основные биомеханические свойства кожи, такие, как гладкость, упругость, эластичность. В опытной культуре (P18) экспрессия маркеров заметно уменьшалась по сравнению с контрольной культурой. Таким образом, данный штамм, свободный от контаминантов и отражающий процесс «старения клеток» с ростом числа пассажей, позволил проводить дальнейшие научные исследования с использованием стандартного клеточного материала.

В связи с развитием норм биоэтики и усилением требований к биоэффективности разрабатываемых лекарственных или иммунопрофилактических препаратов, увеличивается и востребованность использования культур клеток для тестирования или производства этих препаратов. В этом случае наличие банка клеток позволяет иметь материал одного пассажного уровня или в установленных пределах пассажей со стабильными характеристиками и культивировать клетки только, когда они нужны.

В качестве объекта настоящего исследования, как наиболее перспективная для дальнейшего использования в области косметологии, была выбрана культура дермальных фибробластов. Именно они играют ключевую роль в морфогенезе и динамическом ремоделировании дермы, включая синтез компонентов внеклеточного матрикса и специфических ферментов, его деградирующих. Следовательно, воздействие препарата, потенциально обладающего геропротекторными свойствами, должно быть направлено именно на фибробласты, которые поддерживают структуру и функциональность кожной матрицы. Чтобы оценить возможность использования 2D и 3D культуры дермальных фибробластов в качестве модели стареющей кожи, в культуральную среду был добавлен препарат, обладающий геропротекторным и омолаживающим свойствами. Из множества различных экспериментальных препаратов, способных оказывать воздействие на дермальные фибробласты кожи человека, был выбран олигопептид p199, для которого ранее было показано, что он стимулирует пролиферацию фибробластов [8] и увеличение количества внеклеточного матрикса в коже человека [9] — два ключевых параметра, способствующих восстановлению гомеостаза и обновлению дермы. В ранее опубликованном исследовании было показано, что добавление p199 приводит к увеличению синтеза цитокератина 19, эластина, коллагена IV типа и фибронектина в 2D и 3D культуре клеток [5, 6].

При исследовании индекса пролиферации было установлено, что олигопептид p199 стимулировал скорость размножения фибробластов на 18 пассаже (рис. 5, табл. 2), при этом эффект зависел от количества вещества, внесенного в культуральную среду: при разведениях пептида 1:10 и 1:50, среднее значение индекса пролиферации превышало значение для разведения 1:100 и было сопоставимо со значением для 4 пассажа. Тогда, как среднее значение индекса пролиферации при разведении p199 1:100 оставалось на уровне 18 пассажа (рис. 6).

Так как фибробласты играют важную роль в процессах эпителизации и заживления ран, на модели механического повреждения монослойной культуры дермальных фибробластов оценивали влияние олигопептида p199 на функциональность, прежде всего на миграционную активность клеток. После нанесения царапины на монослой клеток, с помощью метода прижизненной цитраферной микроскопии наблюдали, как фибробласты мигрировали

в область повреждения и заполняли пустую поверхность в течение 24 ч (рис. 7). Динамика закрытия царапины представлена на графике сравнения (рис. 8) — при добавлении олигопептида p199 в ростовую среду фибробластов P18, закрытие царапины проходит намного быстрее, чем в среде без препарата, и по темпам приближается к показателям, характерным для контрольной культуры фибробластов 4 пассажа. В контрольной культуре «молодых» фибробластов (P4) закрытие 50% площади повреждения проходило за 12–13 часов культивирования, а полное закрытие царапины наблюдалось через 21 час. В культуре «старых» фибробластов (P18) в ростовой среде с добавлением олигопептида p199 в соотношении 1:50 закрытие 50% площади повреждения наблюдали через 12 часов культивирования, а 100% — через 26 часов. В контрольной культуре «старых» фибробластов (P18) в ростовой среде без добавления препарата p199 закрытие 50% площади повреждения наблюдали более чем через 35 часов культивирования, а 100% — только через 70 часов.

Монослойные клеточные культуры чаще всего применяют в разработке и исследованиях лекарственных средств. Однако 2D клеточная модель имеет существенные отличия от естественных трехмерных 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 образуют 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. Именно такой вывод фигурирует в работах, посвященных сравнительному анализу процессов *in vitro* и *in vivo* еще с 90-х годов XX века [10]. Это приводит исследователей к переводу модельных систем из 2D в 3D условия культивирования. Одним из вариантов 3D клеточных культур являются сфероиды. Они представляют собой трехмерные самоорганизующиеся в силу адгезивных свойств сферические кластеры клеток. При формировании сфероидов клетки формируют межклеточные контакты и создают микроокружение, поддерживающее их фенотип, максимально приближенный к нативному.

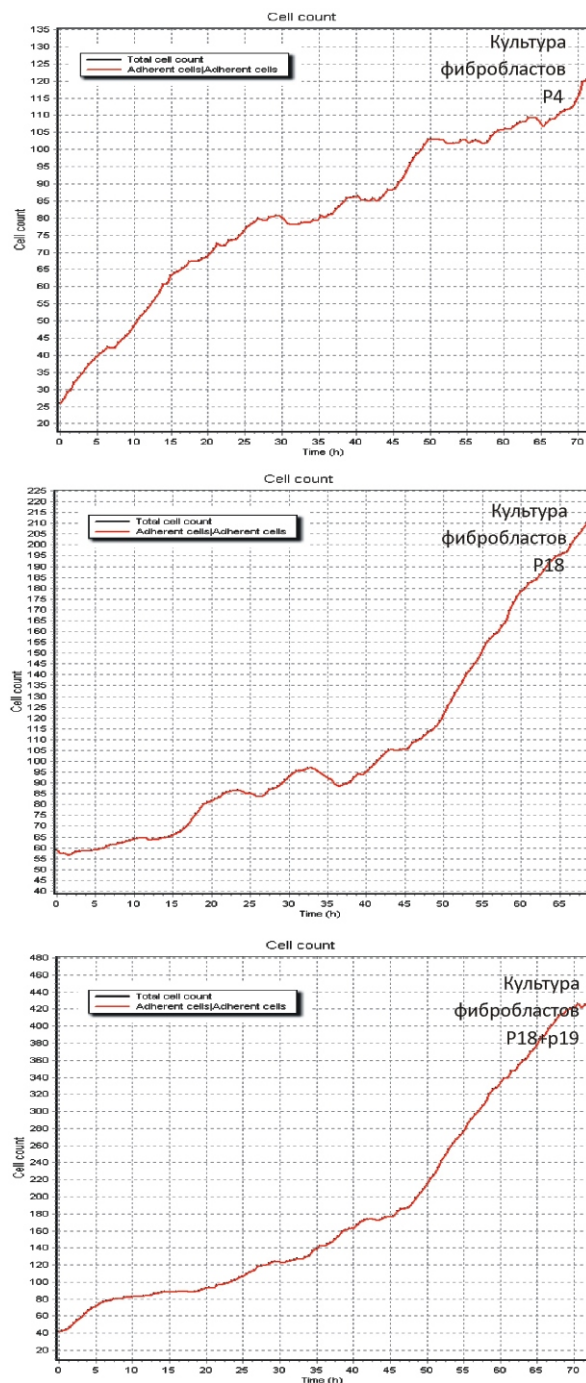


Рис. 5. Динамика изменения общего числа клеток в течение 70 часов культивирования фибробластов 4 пассажа, 18 пассажа без добавок и 18 пассажа с добавлением пептида p199 в ростовую среду. Графики построены в программе Cell-IQ Analyzer.

Таблица 2

**Значения индекса пролиферации  
для контрольных и экспериментальных культур фибробластов кожи человека**

	Культура клеток				
	P4	P18	P18+p199 (1:10)	P18+p199 (1:50)	P18+p199 (1:100)
Индекс пролиферации	3,25	1,86	3,5	2,3	1,7
	4,2	1,5	3,9	3	2,34
	3,8	2,9	4,6	3,3	2,5
Среднее значение	3,75	2,09	4	2,86	2,18
Стандартное отклонение	0,48	0,727	0,56	0,51	0,42

С помощью метода прижизненной цитраферной микроскопии в ходе данного исследования была прослежена динамика формирования дермальными фибробластами сфероидов при добавлении в культуральную среду олигопептида p199 и без него. На рис. 9 представлена сборка отдельных фотографий на сроках: 12 часов, 24 часа, 3, 5 и 7 сут. Из представленных данных следует, что добавление препарата p199 к культуре «старых» фибробластов 18 пассажа способствовало образованию рыхлого

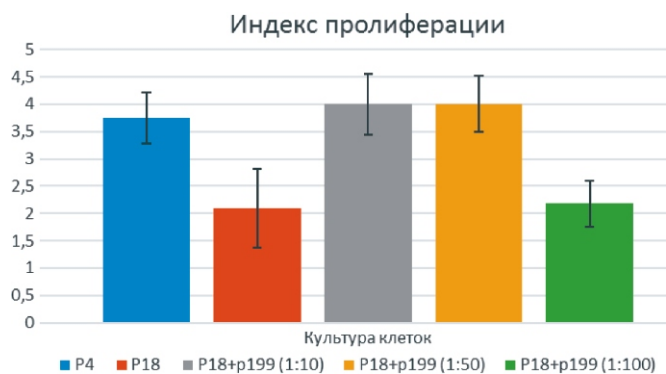


Рис. 6. Сравнительный анализ индекса пролиферации в контрольных и экспериментальных культурах фибробластов кожи человека.

сфероида уже через 12 часов 3D культивирования. В течение последующих дней происходила компактизация клеток и уплотнение сфероида, которое завершенное к 7 сут. культивирования. Размеры сфероидов из фибробластов P18 через 7 сут., даже после компактизации, превышали размеры сфероидов, образованных из фибробластов P4. Вероятно, это связано с большим размером клеток в культуре фибробластов P18. В 3D культуре фибробластов P18, культивированных без олигопептида, через 12 часов формировался рыхлый агрегат, который при дальнейшем культивировании не претерпевал компактизации, а оставался рыхлым с темной некротической областью внутри сфероида и рыхлым наружным слоем, состоящим из дебриса — элементов погибших клеток.

Низкодифференцированные клетки человека, включая «незрелые» фибробласты, в условиях отсутствия адгезии способны агрегировать друг с другом, формируя новую многоклеточную структуру — сфероид, содержащий характерные для большинства описанных сфероидов эпителиальный и мезенхимный компоненты [11, 12]. Стареющие культуры фибробластов утрачивают способность к сфероидообразованию. Для сфероидообразования важен определенный уровень экспрессии фибронектина и интегринов  $\alpha 5$  и  $\beta 1$  [13]. Дифференцировка и последующее старение клеток сопровождаются утратой способно-

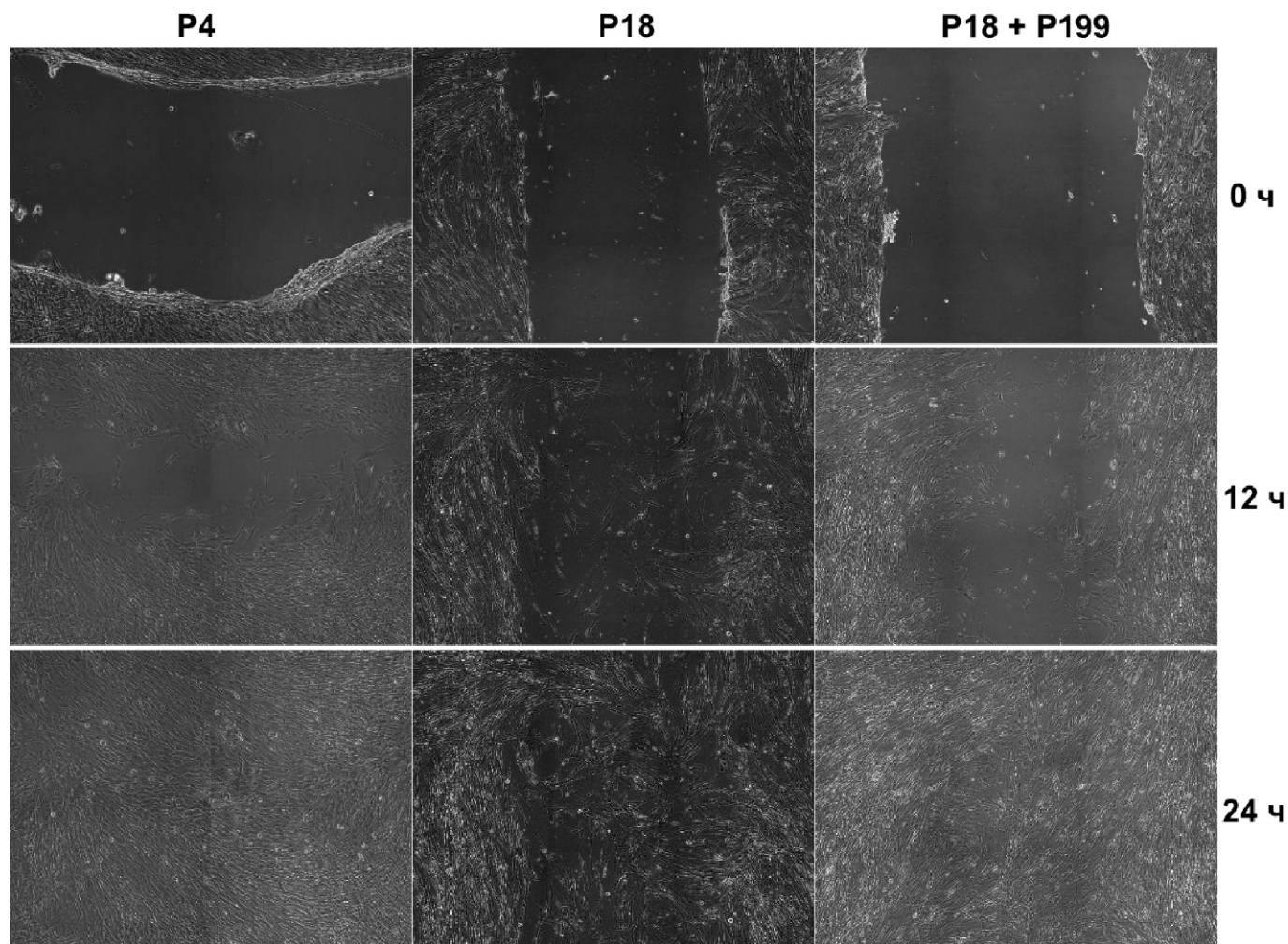


Рис. 7. Миграция фибробластов в область «царапины» в течение 24 ч на пассажах 4 и 18 в стандартной ростовой среде и с добавлением пептида p199. Световая фазово-контрастная прижизненная цитраферная микроскопия.

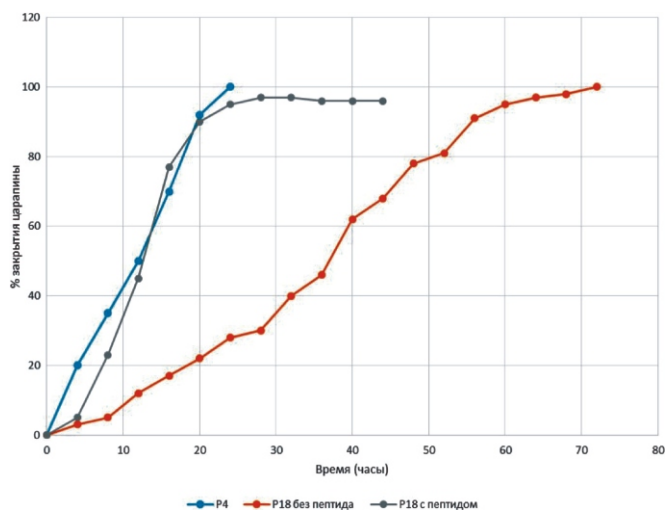


Рис. 8. Динамика закрытия царапины. Графики построены в программе Cell-IQ Analyzer.

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

### Заключение

Таким образом, в ходе данного исследования на основе данных литературы и собственной экспериментальной базы была получена и отобрана 2D культура дермальных фибробластов кожи человека, которая может быть использована в качестве тестовой системы для оценки эффективности и биобезопасности различных видов препаратов. Нами было установлено, что в процессе культивирования данная культура приобретает признаки «стареющих» клеток: уменьшается уровень пролиферации и синтеза белков внеклеточного матрикса. Данные критерии позволяют использовать полученную и охарактеризованную культуру ФЧ-2 для тестирования косметологических

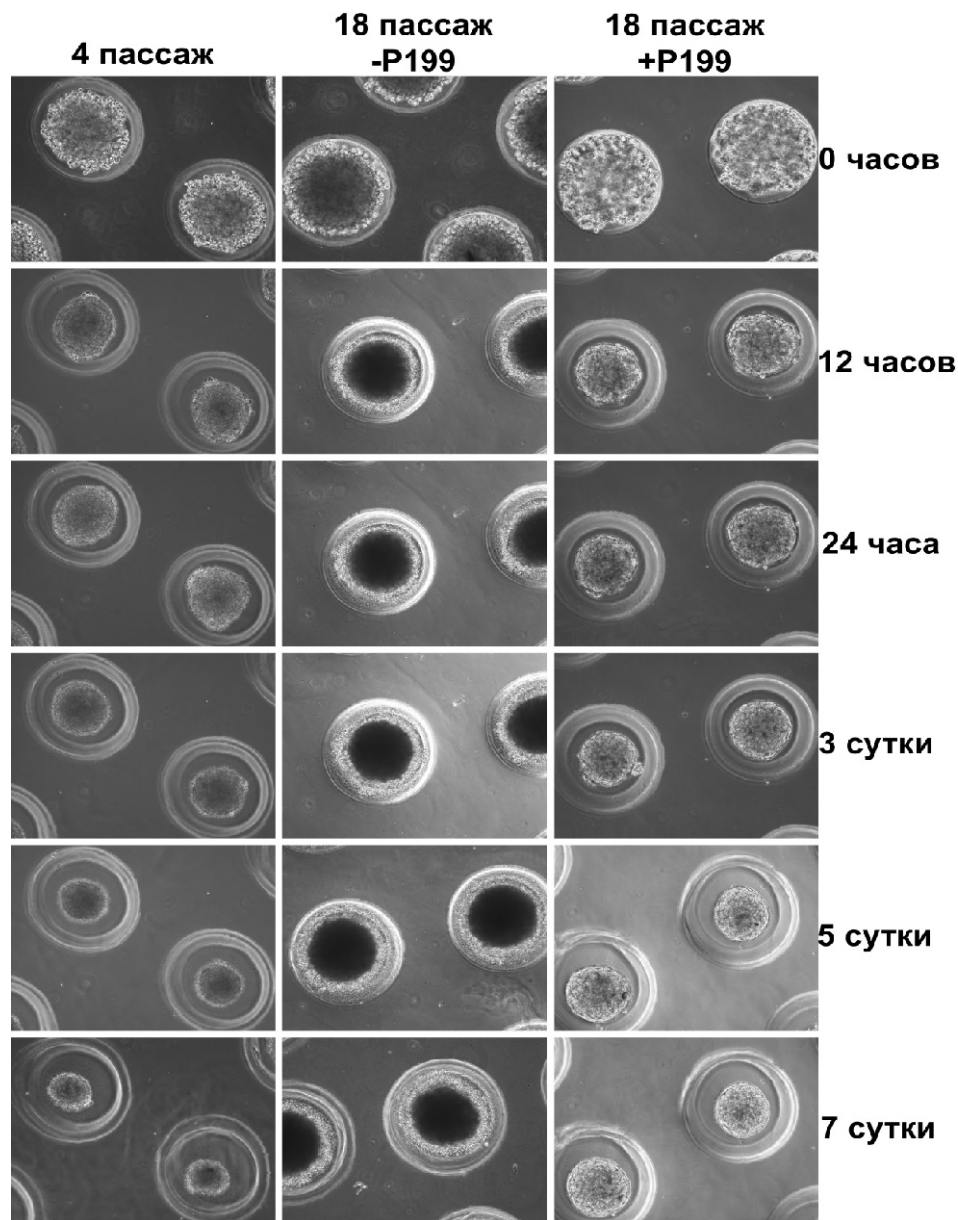


Рис. 9. Влияние препарата Meso-Wharton p199 на образование сфероидов из дермальных фибробластов в условиях 3D-культивирования. Световая фазово-контрастная прижизненная цейтраферная микроскопия.



препаратов, направленных на восстановление гомеостаза кожи и ее обновления.

Исследование способности фибробластов образовывать сфероиды в неадгезивных условиях показало, что присутствие в ростовой среде пептида стимулирует «омоложение» клеток и последующее восстановление мезенхимо-эпителиальной пластичности культивированных фибробластов. Последнее, согласно опубликованному исследованию [5, 6], происходит за счет восстановленной способности синтезировать компоненты внеклеточного матрикса (фибронектин и коллагены) в достаточном для установления межклеточных контактов количестве, что влияет на способность клеток формировать сфероиды. Таким образом, способность клеток к сфероидогенезу может стать критерием для оценки степени дифференцировки и «молодости» и, соответственно, может быть использована для оценки эффективности косметических препаратов.

### Список литературы

1. Колокольцова Т.Д., Сабурина И.Н., Рыбаков А.С. Культура клеток как уникальная модель для исследования в современной биологии и медицине. *Патогенез*. 2014; 11(2): 17-25.
2. Сабурина И.Н., Колокольцова Т.Д., Кошелева Н.В., Зурина И.М., Горкун А.А., Орлов А.А., Ольховцев А.Н., Юдин Д.А. Исследование цитотоксичности стоматологических имплантов EasyFastS (Ti) и EasyKon (ZrO<sub>2</sub>) in vitro. *Новое в стоматологии*. 2014; 1: 48-52.
3. 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; 46(8): 2533-9.
4. 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. 2014; 9(0): 1115-28.
5. Кожина К.В., Волкова Е.Н., Сабурина И.Н., Морозов С.Г., Зурина И.М., Кошелева Н.В., Горкун А.А., Григорьева А.А. Изучение влияния пептидных биорегуляторов на возрастные изменения кожи в культуральной модели в 3D-формате. *Российский журнал кожных и венерических болезней*. 2016; 19(1): 58-63.
6. Кожина К.В., Сабурина И.Н., Горкун А.А., Зурина И.М., Кошелева Н.В., Волкова Е.Н., Морозов С.Г. Сравнительный анализ воздействия p199 на 2D и 3D культуру дермальных фибробластов человека. *Патогенез*. 2015; 4: 35-41.
7. Колокольцова Т.Д., Сабурина И.Н. Патологические аспекты микоплазменной контаминации клеточных культур. *Патогенез*. 2013; 11(3): 29-31.
8. Петриковский Б. Клеточное обновление кожи как результат пептидной регуляции активности собственных стволовых клеток. *Эстетическая медицина*. 2012; 2: 283-93
9. Юцковская Я.А., Данилова А.А. Терапия кожи с признаками хронологического старения препаратом Meso-Wharton P199. Клинический пример. *Пластическая хирургия и косметология*. 2014; 3: 337-496.
10. Takeda K., Gosiewska A., Peterkofsky B. Similar, but not identical, modulation of expression of extracellular matrix components during in vitro and in vivo aging of human skin fibroblasts. *Journal of cellular physiology*. 1992; 153(3): 450-9.
11. Кошелева Н.В., Зурина И.М., Сабурина И.Н., Горкун А.А., Колокольцова Т.Д., Борзенко С.А., Репин В.С. Влия-

ние эмбриональной телячьей сыворотки на формирование сфероидов из стромальных клеток лимба глаза. *Патогенез*. 2015; 13(2): 4-11.

12. Сабурина И.Н., Репин В.С. 3D-культивирование: от отдельных клеток к регенерационной ткани (к вопросу о феномене эпителио-мезенхимальной пластичности). *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2010; 5(2): 75-86.

13. 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; 314(19): 3444-52.

### References

1. Kolokol'tsova T.D., Saburina I.N., Rybakov A.S. Cell culture as a unique model for research in modern biology and medicine. *Patogenez*. 2014; 11(2): 17-25. (in Russian)
2. Saburina I.N., Kolokol'tsova T.D., Kosheleva N.V., Zurina I.M., Gorkun A.A., Orlov A.A., Ol'khovtsev A.N., Judin D.A. Investigation of the cytotoxicity of dental implants EasyFastS (Ti) and EasyKon (ZrO<sub>2</sub>) in vitro. *Novoe v stomatologii*. 2014; 1: 48-52. (in Russian)
3. 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; 46(8) 2533-9.
4. 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; 9(9): 1115-28.
5. Kozhina K.V., Volkova E.N., Saburina I.N., Morozov S.G., Zurina I.M., Kosheleva N.V., Gorkun A.A., Grigor'eva A.A. The influence of peptide bioregulators on skin aging in a culture model in 3D-format. *Rossiiskii zhurnal kozhnykh i venericheskikh boleznei*. 2016; 19(1): 58-63. (in Russian)
6. Kozhina K.V., Saburina I.N., Gorkun A.A., Zurina I.M., Kosheleva N.V., Volkova E.N., Morozov S.G. Comparative analysis of the P199 effects on 2D and 3D culture of human dermal fibroblasts. *Patogenez*. 2015; 4: 35-41. (in Russian)
7. Kolokol'tsova T.D., Saburina I.N. Pathological aspects of cell cultures mycoplasma contamination. *Patogenez*. 2013; 11(3): 29-31. (in Russian)
8. Petrikovskii B. The cell renewal of skin as a result of peptide regulation of the own stem cells activity. *Esteticheskaya meditsina*. 2012; 2: 283-93. (in Russian)
9. Jutskovskaya Ja. A., Danilova A.A. Skin Therapy with signs of chronological aging by drug Meso-Wharton P199. Clinical example. *Plasticheskaya khirurgiya i kosmetologiya*. 2014; 3: 337-496. (in Russian)
10. Takeda K., Gosiewska A., Peterkofsky B. Similar, but not identical, modulation of expression of extracellular matrix components during in vitro and in vivo aging of human skin fibroblasts. *Journal of cellular physiology*. 1992; 153(3): 450-9.
11. Kosheleva N.V., Zurina I.M., Saburina I.N., Gorkun A.A., Kolokol'tsova T.D., Borzenok S.A., Repin V.S. Influence of fetal bovine serum on the formation of spheroids from limb eyes stromal cells. *Patogenez*. 2015; 13(2): 4-11. (in Russian)
12. Saburina I.N., Repin V.S. 3D-cultivation from individual cells to the regeneration of tissue (to a question about the phenomenon of the epithelium-mesenchymal plasticity). *Kletchnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya*. 2010; 5(2): 75-86. (in Russian)
13. 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; 314(19): 3444-52.

---

**Сведения об авторах:**

Кожина Кристина Витальевна, научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ «НИИОПП», врач дерматолог-косметолог, сертифицированный тренер ООО «Premier-pharm».

Сабурина Ирина Николаевна, доктор биол. наук, зав. лабораторией клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ «НИИОПП», проф. кафедры общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО «РМАПО» Минздрава РФ,

Горкун Анастасия Алексеевна, кандидат биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ «НИИОПП»

Зурина Ирина Михайловна, младший научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ «НИИОПП»

Кошелева Настасья Владимировна, кандидат биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ «НИИОПП», доцент кафедры эмбриологии Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Колокольцова Тамара Дмитриевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ «НИИОПП», профессор кафедры общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО РМАПО Минздрава РФ.

Савина Галина Дмитриевна, заведующая учебной частью кафедры общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО «РМАПО» Минздрава РФ.

Репин Вадим Сергеевич, главный научный сотрудник кафедры лаборатории клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ «НИИОПП», профессор кафедры общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО «РМАПО» Минздрава РФ.