

Экспрессия сигнальных молекул под действием пептида P199 в составе препарата Meso-Wharton

А.С. Шехватова

клинический ординатор кафедры инфекционных болезней, эпидемиологии и дерматовенерологии Санкт-Петербургского государственного университета (Санкт-Петербург)

А.О. Дурнова

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной биологии отдела патоморфологии ФГБУ «НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта» СЗО РАМН (Санкт-Петербург)

И.М. Кветной

доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки, руководитель отдела патоморфологии ФГБУ «НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта» СЗО РАМН (Санкт-Петербург)

И.О. Смирнова

доктор медицинских наук, профессор кафедры инфекционных болезней, эпидемиологии и дерматовенерологии Санкт-Петербургского государственного университета (Санкт-Петербург)

Введение

Эпидермис и дерма являются динамическими структурами, компоненты которых постоянно подвергаются обновлению и модификации. Обновление структур эпидермиса и дермы обеспечивается балансом ряда процессов: пролиферации, дифференцировки и эксфолиации кератиноцитов, обновления пула фибробластов и других клеток дермы, апоптоза клеток и репарации ДНК, процессами синтеза матричных белков и их деградации. Ключевым среди них является обновление кератиноцитов и фибробластов, которое обеспечивается стволовыми клетками (СК) [1]. В коже человека имеются несколько разных популяций СК.

В эпидермисе это:

- фолликулярные, расположенные в сосочке волосяного фолликула (bulge) мультипотентные клетки, которые обеспечивают постоянное ремоделирование волосяных фолликулов, а при травме — репарацию эпидермиса;
- интерфолликулярные, расположенные в базальном слое эпидермиса унипотентные клетки, являющиеся источником прогениторных (transient amplifying) клеток, которые в свою очередь дают начало дифференцированным клеткам эпидермиса.

Стволовые клетки дермы:

- мезенхимальные мультипотентные клетки, которые могут дифференцироваться в адипоциты, остеобласты, хондроциты, нервные клетки, гепатоциты;
- дермальные прогениторные (skin-derived precursors) мультипотентные клетки, которые могут дифференцироваться в адипоциты, гладкомышечные клетки, клетки глии и Шванновские клетки;
- фиброциты, прогениторные для фибробластов;
- фолликулярные мезенхимальные мультипотентные клетки (см. эпидермис).

Мультипотентные СК содержатся в **жировой ткани**, унипотентные — в структуре **сальных желез**.

Известно, что СК существуют в «нишах», образованных дифференцированными клетками и внеклеточным матриксом. Окружающие клетки и структура ниш обеспечивают условия, необходимые для поддержания самовоспроизведения СК, продукции ими дочерних дифференцированных клеток *in vivo* [2]. С другой стороны, между СК и клетками их микроокружения («ниши») идет постоянный «диалог», направленный на ограничение стимулов, которые могут привести к истощению пула СК за счет избыточной пролиферации или апоптоза. Таким образом, функцией «ниши» является поддержание баланса покоя и активности СК.

Старение кожи затрагивает все ее отделы и клетки, в том числе СК кожи. Возрастные изменения СК могут включать снижение их мобилизации (нарушение сигнальных механизмов), а также снижение числа СК, способных адекватно отвечать на стимулы.

По многочисленным данным, число СК не всегда уменьшается с возрастом. Тем не менее их функция, т.е. способность производить прогениторные и дифференцированные клетки, снижается [3]. Это может быть обусловлено,

во-первых, повреждениями ДНК самих СК, например в результате оксидативного стресса. А во-вторых, старением клеток микроокружения. Стволовые клетки начинают испытывать влияние «стареющей ниши», нарушается их мобилизация или уменьшается число клеток, способных адекватно отвечать на пролиферативные сигналы. Таким образом создается своеобразный порочный круг, когда стареющие дифференцированные клетки не оказывают должного влияния на СК, что в свою очередь приводит к нарушению адекватного обновления клеточных структур эпидермиса и дермы, снижению синтетической активности фибробластов.

Перспективным направлением в создании препаратов для коррекции и профилактики возрастной инволюции кожи является разработка пептидов с различным механизмом действия, в том числе и таких, основной мишенью для которых являются СК.

Эти механизмы могут быть направлены на:

1. Поддержание клеток «ниши» [4];
2. Увеличение пролиферативной активности СК;
3. Поддержание потенциала самообновления СК путем защиты ДНК [5].

К этой группе относится инъекционный препарат медицинского назначения, предназначенный для интенсивной «репарации» кожи, Meso-Wharton P199 [6]. В его состав входят синтетический аналог эмбрионального пептида Wharton Jelly Peptide P199 (P199), гиалуроновая кислота с молекулярной массой 2900 кДа (1,5%), факторы роста (EGF; bFGF; IGF-2; TRX), витамины (А; группы В; С; Е; К; фолиевая кислота), аминокислоты, микроэлементы, коэнзимы, нуклеиновые кислоты — всего 52 компонента. Состав препарата повторяет состав Вартонова студня пуповины, по аналогии с которым он и был создан. Разработчики предполагают, что таким образом обеспечивается работа не только пептида P199, но и воссоздаются эффекты микроокружения СК.

Результаты серии исследований *in vitro* и *in vivo* позволяют считать, что пептид P199 — ключевой компонент препарата для мезотерапии Meso-Wharton P199, инициирует глубокие и продолжительные антивозрастные и регенерационные эффекты в коже, которые являются результатом стимуляции, пролиферации, миграции и дифференцировки СК (табл. 1).

Предполагается, что при топическом применении пептида P199 за счет активации СК происходит замещение вяло обновляющихся клеточных структур эпидермиса и дермы, повышается синтетическая активность фибробластов и выработка нового коллагена.

Таблица 1

Механизмы действия препарата Meso-Wharton P199	
Постулируемый механизм действия	Обоснование
Стволовые клетки кожи как мишень для Wharton Jelly Peptide P199	Нанесение пептида P199 в виде крема приводит к увеличению экспрессии мембранных маркеров СК (SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60) в коже новорожденных белых мышей
	При инкубации культуры кожи в присутствии пептида наблюдается увеличение экспрессии цитокератинов СК
Активация пролиферативных свойств СК	В культуре СК происходит усиление экспрессии генов факторов роста и молекул адгезии (KGF, EGF, VEGF, FGF), а также внутриклеточных сигнальных молекул (EGF-R, c-RAS, c-SRC, c-MYC)
	В культуре клеток отмечается экспрессия ИЛ-1, ИЛ-3, ИЛ-6, ИЛ-8
Обновление структур эпидермиса и дермы	По данным клинических испытаний на волонтерах, после интрадермального введения препарата Meso-Wharton P199 наблюдается улучшение внешнего вида кожи (повышение тургора, разглаживание макрорельефа, улучшение овала лица, снижение выраженности гиперпигментации), при ультразвуковом сканировании — повышение эхогенности в субэпидермальной зоне
	При патоморфологическом исследовании выявлено появление в верхних отделах дермы тонких фибрилл коллагена, ориентированных параллельно друг другу

Целью настоящего исследования являлась сравнительная комплексная оценка влияния пептида P199 и препарата Meso-Wharton P199 на экспрессию сигнальных молекул, являющихся маркерами процессов обновления эпидермиса и дермы, в культурах клеток с разным уровнем возрастной инволюции.

Материалы и методы

Исследование выполнено на первичных культурах клеток — культуре кератиноцитов человека, содержащей преимущественно базальные клетки, и смешанной культуре фибробластов человека. Клетки взрослого человека выделяли из переднебоковой поверхности кожи лица, полученной в результате пластической операции.

Для каждой культуры были сформированы 3 группы:

- 1-я группа (контроль) — культура клеток, в которую вводился физиологический раствор;
- 2-я группа (опыт) — культура клеток, в которую вводился пептид P199 в концентрации 15 нг/мл;
- 3-я группа (опыт) — культура клеток, в которую вводился препарат Meso-Wharton P199 в количестве, обеспечивающем концентрацию изучаемого пептида 15 нг/мл.

Для оценки особенностей экспрессии маркеров при старении клеточной культуры были взяты контрольные точки в соответствии с рекомендацией Международной ассоциации исследований клеточных культур (США, Сан-Франциско, 2007).

Для фибробластов:

1. 3-й пассаж, соответствующий уровню развития «молодой» культуры клеток;
2. 7-й пассаж, соответствующий уровню развития «зрелой» культуры клеток;
3. 13-й пассаж, соответствующий уровню развития «старой» культуры клеток.

Для кератиноцитов:

1. 1-й пассаж, соответствующий уровню развития «молодой» культуры клеток;
2. 3-й пассаж, соответствующий уровню развития «зрелой» культуры клеток.

Для иммуноцитохимического исследования использовали первичные моноклональные антитела к ряду маркеров, характеризующих процессы обновления эпидермиса и дермы (табл. 2), и вторичные антитела — биотинилированные антимышинные иммуноглобулины (Novolink Polymerdetection system, Peroxidase/DAB, Rabbit, Mouse, 1:40).

Таблица 2

Маркеры, характеризующие процессы обновления эпидермиса и дермы		
Маркер	Антитела	Биологический смысл
Проколлаген I типа	1:50, Lifespan Biosciences	Проколлаген I типа может быть использован как маркер биосинтеза коллагена I типа
CD105	1:50, Novocastra	Эндоглин или CD105 — трансмембранный белок, который является рецептором трансформирующего фактора роста β , контролирующего пролиферацию, клеточную дифференцировку и другие функции в большинстве клеток. Один из маркеров СК дермы
p63	1:50, Santa Cruz	Белок p63 участвует в реализации многих функций, которые необходимы для самоподдержания СК эпидермиса. Его экспрессия обеспечивает адгезию кератиноцитов и подавление апоптоза, а также поддержание целостности эпидермиса как ткани. Экспрессия p63 является характерной чертой СК эпидермиса
β 1-интегрин	Novocastra	В коже β 1-интегрин экспрессируется в базальном слое эпидермиса. При выключении его экспрессии клетки уходят в терминальную дифференцировку, что отражает возможность использования его как маркера СК эпидермиса
Ki 67	1:75, Dako	Белок Ki 67 экспрессируется во время всех активных фаз цикла клетки (G1, S, G2, и митоз), но отсутствует в фазе G0. Это показатель обновления (клеточной пролиферации) клеток дермы и эпидермиса

ИНТЕНСИВНАЯ АНТИВОЗРАСТНАЯ ТЕРАПИЯ КОЖИ

Meso-Wharton P199™
by Dr. Petrikovsky MD

- Пептидная регуляция активности собственных стволовых клеток кожи
- Обновление клеточного пула в эпидермисе и дерме



РЕКЛАМА

Тел.: (495) 795-0711, (495) 795-0716 | Москва Сити, Северная башня, ООО «Премьер Фарм»

Инъекционный препарат медицинского назначения / Регистрационное удостоверение №ФСЗ 2010/06641

По данным проведенных исследований, пептид P199 и препарат Meso-Wharton P199 оказывали стимулирующий эффект на пролиферативную активность фибробластов и кератиноцитов.

Пермеабиллизацию проводили с применением 0,1% Тритона X100. Визуализацию реакции выполняли с применением пероксидазы хрена и диаминобензидина (EnVision Detection System, Peroxidase/DAB, Rabbit, Mouse).

Оценку результатов иммуноцитохимического окрашивания осуществляли морфометрическим методом на микроскопе Nikon Eclipse E400 с помощью цифровой камеры Nikon DXM1200 и программного обеспечения Videotest Morphology 5.2. В каждом случае анализировали 5 полей зрения при увеличении $\times 200$ [6]. 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 фактор дифференцировки.

Статистическую обработку данных выполняли в программе Statistica 8.0. Для сравнения и оценки межгрупповых различий использовали непараметрический *U* критерий Манна-Уитни, который является наиболее точным методом для сравнения выборок, включающих в себя около 1015 элементов. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

По данным проведенных исследований, пептид P199 и препарат Meso-Wharton P199 оказывали стимулирующий эффект на пролиферативную активность фибробластов и кератиноцитов. Этот эффект был более выражен в «зрелой» и «старой» культурах фибробластов и «молодой» культуре кератиноцитов.

Так, при культивировании фибробластов в присутствии Meso-Wharton P199 пролиферативная активность клеток в «молодой» культуре увеличивалась в 1,2 раза ($p=0,007$), в культуре «зрелых» фибробластов — в 3,4 раза ($p=0,000000$) и в культуре «старых» клеток — 2,2 раза ($p=0,006$) по сравнению с контролем. Достоверные изменения показателя площади экспрессии маркера Ki67 при культивировании фибробластов в присутствии пептида P199 были отмечены только в культуре «зрелых» и «старых» клеток — в 2,2 и 1,5 раза ($p=0,000000$ и $p=0,001$) соответственно (**табл. 3, рис. 1**).

Добавление препарата Meso-Wharton P199 к кератиноцитам сопровождалось увеличением относительной площади экспрессии Ki67 в 3,4 раза в «молодой» культуре и в 2,8 раза в «зрелой» культуре ($p=0,000000$). Эффекты пептида P199 были несколько менее выраженными: показатели площади экспрессии выросли в 2,1 и 1,6 раз ($p=0,000008$, $p=0,0002$) соответственно (**табл. 4, рис. 2**).

Экспрессия эндоглина (CD105), маркера СК дермы, изменялась недостоверно как в присутствии препарата Meso-Wharton P199, так и пептида P199.

А вот показатели экспрессии $\alpha 3\beta 1$ и $\beta 1$ -интегрина кератиноцитами существенно изменялись. Площадь экспрессии $\alpha 3\beta 1$ в культуре «молодых» клеток при введении пептида P199 и препарата Meso-Wharton P199 увеличивалась по сравнению с контролем в 2,1 и 3,1 раз соответственно ($p=0,000000$), а в культуре «зрелых» клеток — в 2,4 ($p=0,000005$) и 1,3 раза ($p=0,009$) соответственно (**табл. 5, рис. 3**).

Аналогично изменялась и экспрессия $\beta 1$ -интегрина. В культуре «молодых» клеток площадь его экспрессии повышалась в 2 раза ($p=0,000000$) и при введении пептида P199, и препарата Meso-Wharton P199.

По результатам проведенных исследований установили, что препарат Meso-Wharton P199 и пептид P199 оказывали выраженный эффект на синтетическую активность культивируемых фибробластов (**табл. 6, рис. 4**). Этот эффект был особенно значимым в культуре немолодых клеток. Причем стимулирующее воздействие препарата Meso-Wharton P199 было более выраженным в культурах «зрелых» клеток, а Peptide P199 — в культуре «старых» клеток. Так, в «моло-

Таблица 3

Относительная площадь экспрессии маркера Ki67 в культуре фибробластов			
Группы	Пассаж 3 («молодые» клетки)	Пассаж 7 («зрелые» клетки)	Пассаж 13 («старые» клетки)
Контроль	53,72±4,22	23,97±6,87	24,78±4,87
Meso-Wharton P199	62,37±1,68	77,96±1,07	55,15±2,03
Пептид P199	47,58±5,70	53,32±3,31	37,52±1,44

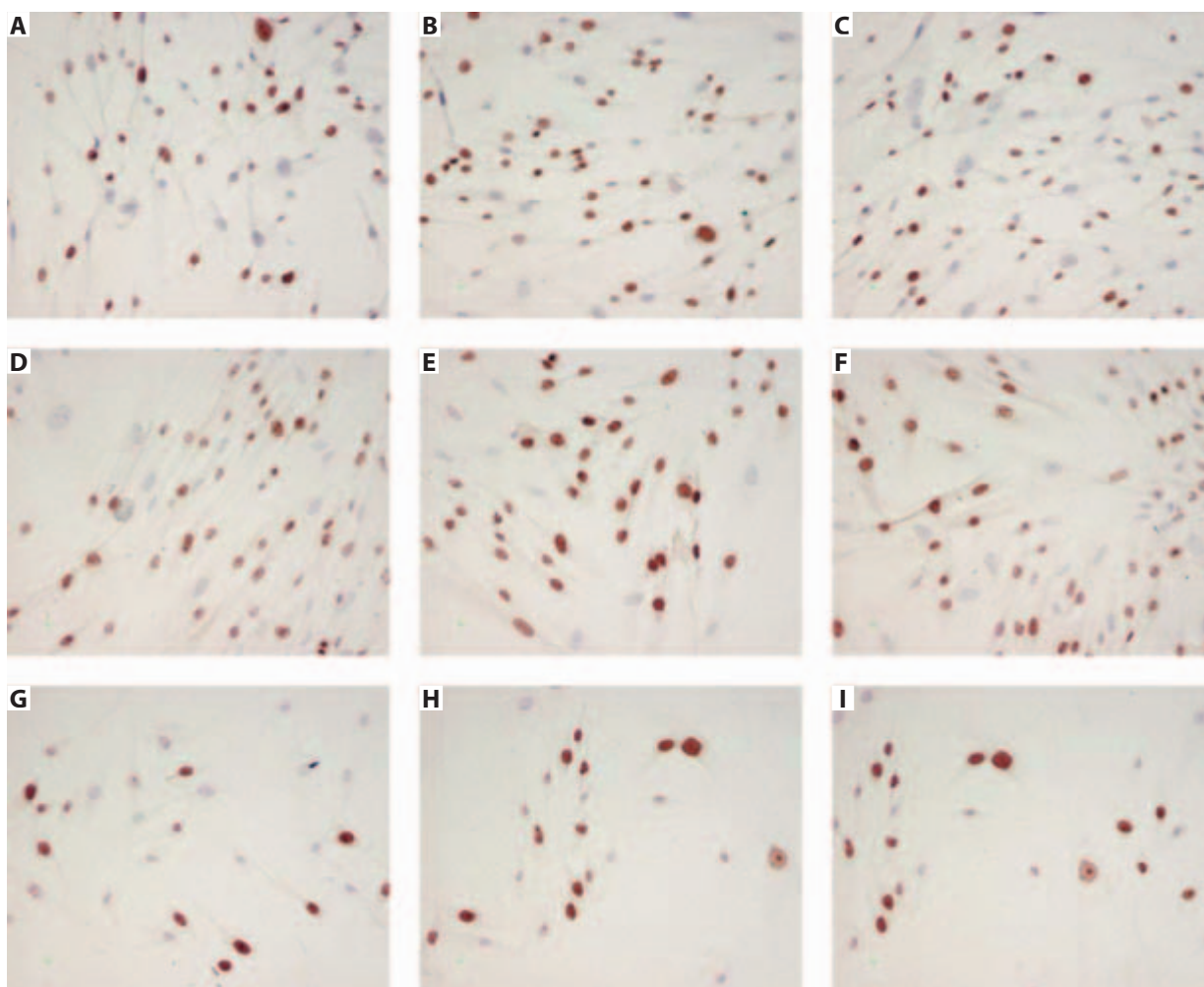


Рис. 1. Экспрессия Ki67 в культуре фибробластов. Иммуноцитохимическое исследование, x200

- A — «молодые» фибробласты, контроль;
- B — «молодые» фибробласты в присутствии комплексного препарата;
- C — «молодые» фибробласты в присутствии пептида P199;
- D — «зрелые» фибробласты, контроль;
- E — «зрелые» фибробласты в присутствии комплексного препарата;
- F — «зрелые» фибробласты в присутствии пептида P199;
- G — «старые» фибробласты, контроль;
- H — «старые» фибробласты в присутствии комплексного препарата;
- I — «старые» фибробласты в присутствии пептида P199.

дой» культуре площадь экспрессии проколлагена I типа повышалась в присутствии Meso-Wharton P199 в 3,9 раза, а пептида P199 — в 2,8 раз по сравнению с контролем ($p=0,000000$ и $p=0,000005$ соответственно), в «зрелой» культуре — в 3,2 и 1,9 раза, а в культуре «старых» клеток в 16,4 и 22,65 раза ($p=0,000000$; $p=0,000001$) соответственно.

Таблица 4

Относительная площадь экспрессии Ki67 в культуре кератиноцитов		
Группа	Пассаж 1 («молодые» клетки)	Пассаж 3 («зрелые» клетки)
Контроль	16,57±2,89	27,83±1,66
Meso-Wharton P199	55,59±5,66	77,08±7,18
Пептид P199	34,7±1,98	45,01±5,09

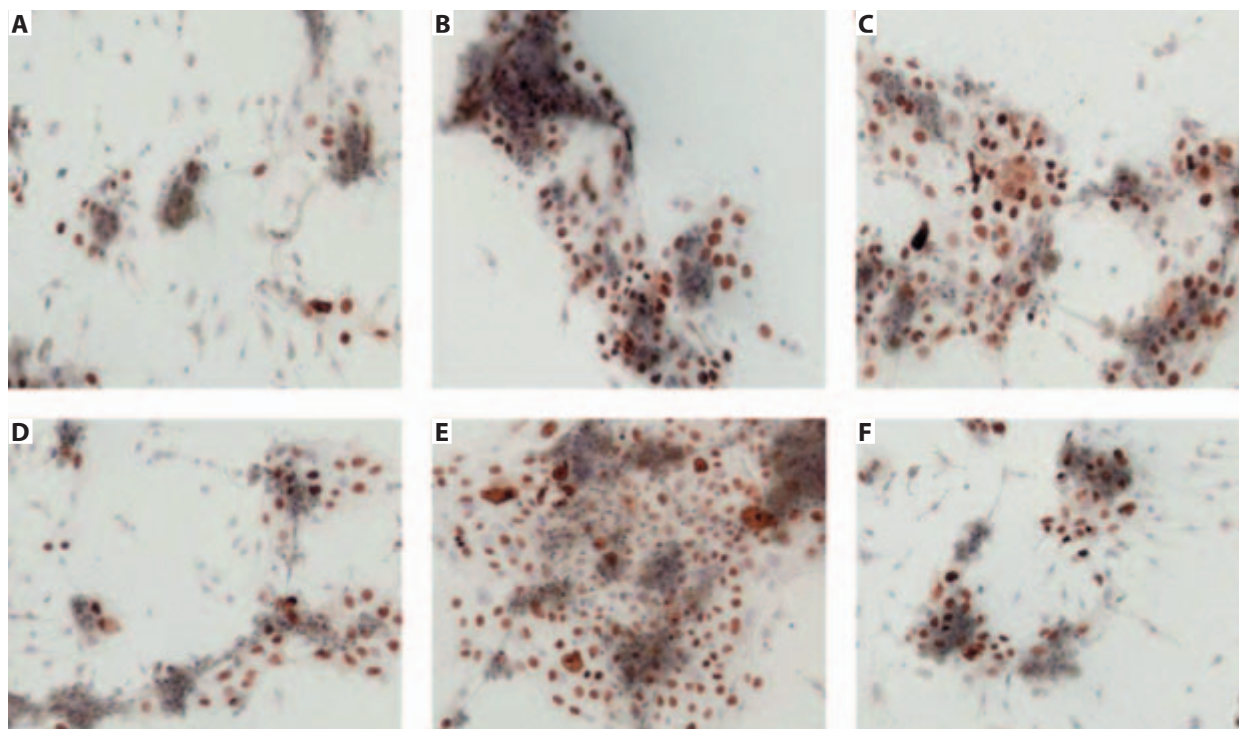


Рис. 2. Экспрессия Ki67 в культуре кератиноцитов. Иммуноцитохимическое исследование, x200

- A — «молодые» кератиноциты, контроль;
- B — «молодые» кератиноциты в присутствии комплексного препарата;
- C — «молодые» кератиноциты в присутствии пептида P199;
- D — «зрелые» кератиноциты, контроль;
- E — «зрелые» кератиноциты в присутствии комплексного препарата;
- F — «зрелые» кератиноциты в присутствии пептида P199.

Обсуждение

В ходе проведенного исследования выявлен стимулирующий эффект пептида P199 и инъекционного препарата Meso-Wharton P199 на пролиферативную активность кератиноцитов и фибробластов в культуре, а также синтетическую активность фибробластов. Эти данные можно трактовать в пользу предположения о том, что пептид P199 и препарат Meso-Wharton P199 стимулируют процессы обновления клеточных структур эпидермиса и дермы при нанесении на кожу и при внутрикожном введении инъекционным путем.

Стимулирующий эффект в отношении фибробластов был более выраженным в культуре «зрелых» и «старых» клеток, что соотносится с клиническими данными о более высокой эффективности препарата у пациентов старших возрастных групп.

Таблица 5

Относительная площадь экспрессии маркеров стволовости кератиноцитами				
Группы	Пассаж 1 («молодые» клетки)		Пассаж 3 («зрелые» клетки)	
	p63	β1-интегрин	p63	β1-интегрин
Контроль	25,79±2,20	30,96±1,93	35,23±3,73	17,77±1,23
Meso-Wharton P199	80,39±5,96	61,06±3,46	45,47±5,28	36,2±4,37
Пептид P199	53,35±3,61	67,24±1,22	61,25±6,43	36,85±4,32

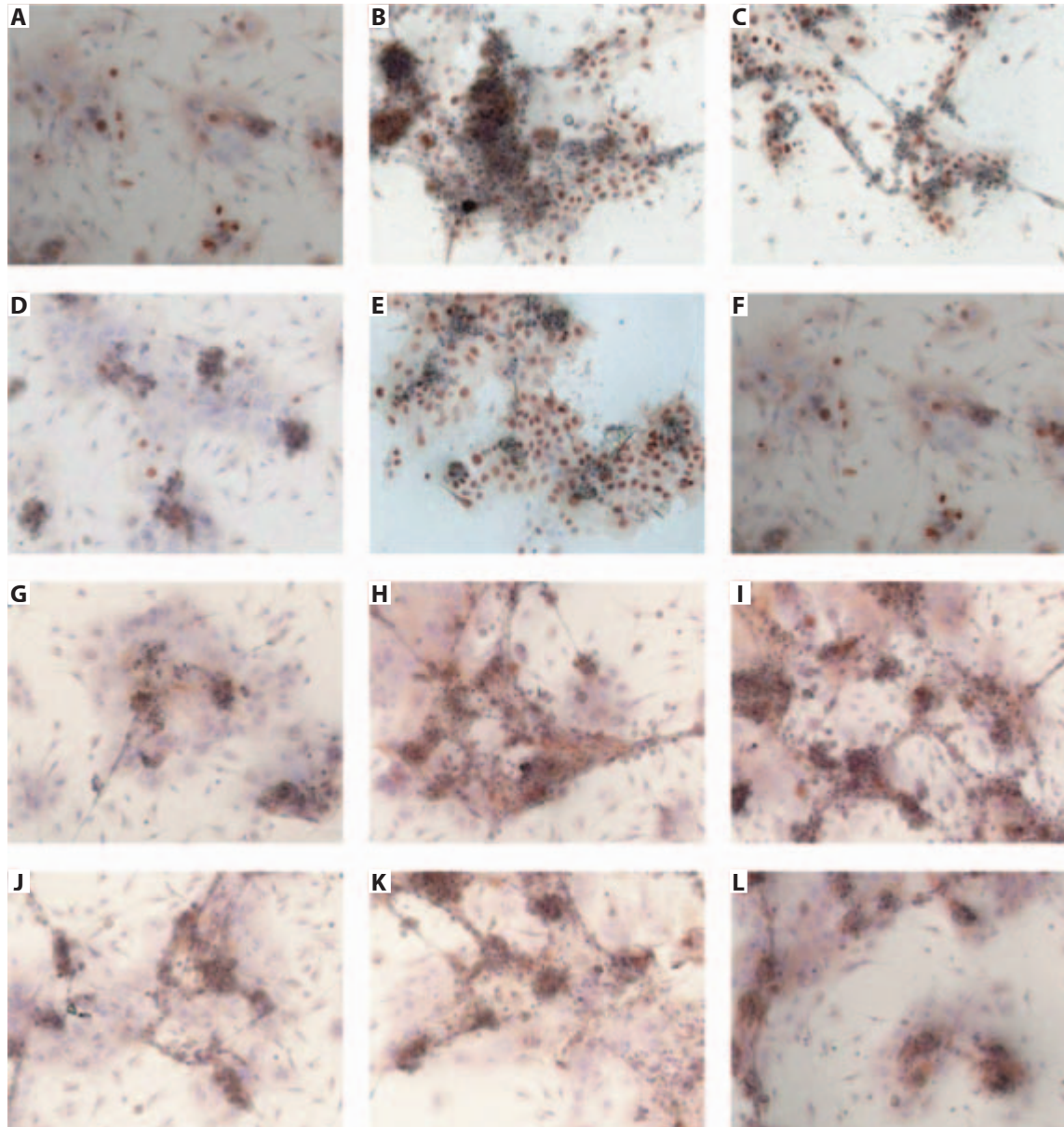


Рис. 3. Экспрессия маркеров компартмента стволовых клеток — p63, β1-интегрина — в культуре кератиноцитов. Иммуноцитохимическое исследование, ×200

- A — «молодые» кератиноциты, контроль, p63;
 B — «молодые» кератиноциты в присутствии комплексного препарата, p63;
 C — «молодые» кератиноциты в присутствии пептида P199, p63;
 D — «зрелые» кератиноциты, контроль, p63;
 E — «зрелые» кератиноциты в присутствии комплексного препарата, p63;
 F — «зрелые» кератиноциты в присутствии пептида P199, p63;
 G — «молодые» кератиноциты, контроль, β1-интегрин;
 H — «молодые» кератиноциты в присутствии комплексного препарата, β1-интегрин;
 I — «молодые» кератиноциты в присутствии пептида P199, β1-интегрин;
 J — «зрелые» кератиноциты, контроль, β1-интегрин;
 K — «зрелые» кератиноциты в присутствии комплексного препарата, β1-интегрин;
 L — «зрелые» кератиноциты в присутствии пептида P199, β1-интегрин.

Таблица 6

Относительная площадь экспрессии проколлагена I типа в культуре фибробластов			
Группы	Пассаж 3 («молодые» клетки)	Пассаж 7 («зрелые» клетки)	Пассаж 13 («старые» клетки)
Контроль	4,34±0,46	23,85±3,09	1,58±0,45
Meso-Wharton P199	16,74±2,34	76,05±2,6	25,87±3,71
Peptide P199	12,31±1,46	46,44±3,66	35,80±6,16

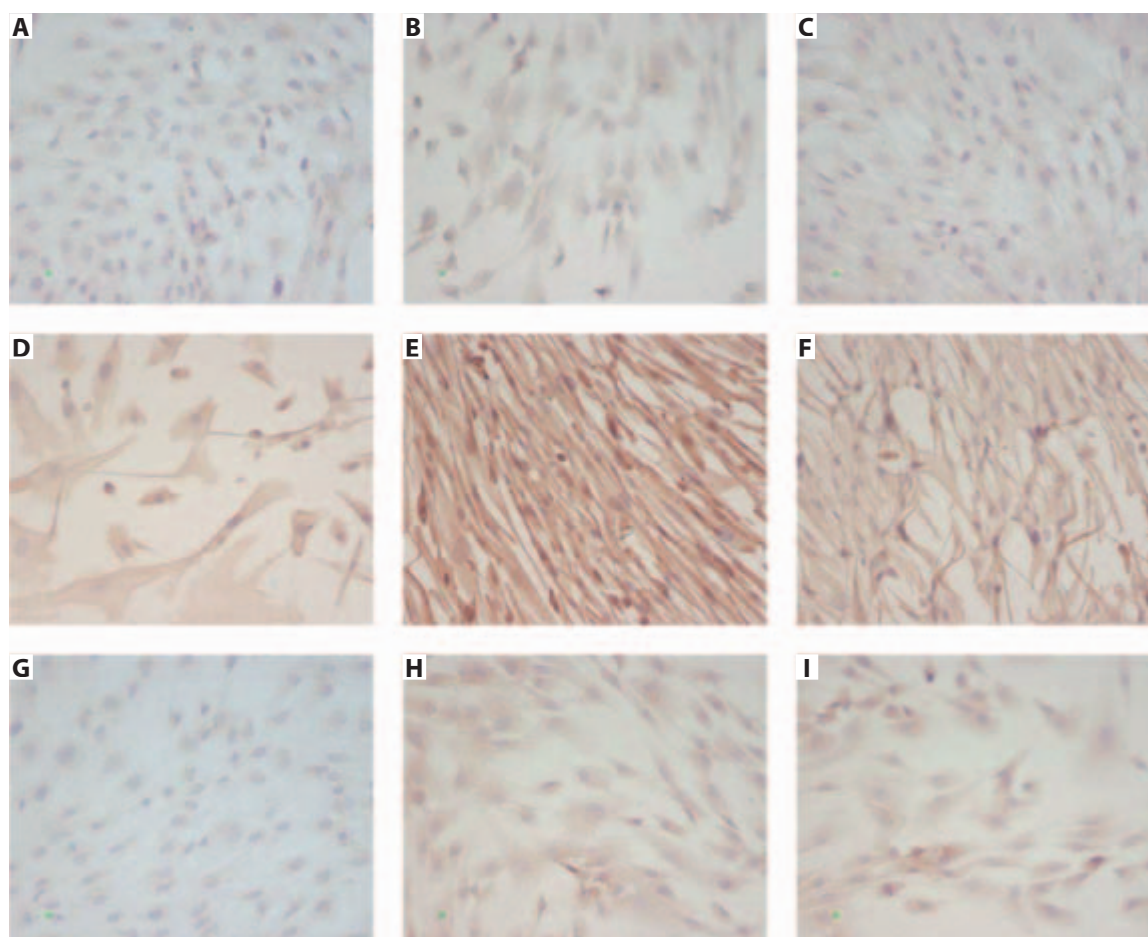


Рис. 4. Экспрессия маркера проколлаген I типа в культуре фибробластов. Иммуноцитохимическое исследование, $\times 200$

- A — «молодые» фибробласты, контроль;
 B — «молодые» фибробласты в присутствии комплексного препарата;
 C — «молодые» фибробласты в присутствии пептида P199;
 D — «зрелые» фибробласты, контроль;
 E — «зрелые» фибробласты в присутствии комплексного препарата;
 F — «зрелые» фибробласты в присутствии пептида P199;
 G — «старые» фибробласты, контроль;
 H — «старые» фибробласты в присутствии комплексного препарата;
 I — «старые» фибробласты в присутствии пептида P199.

Литература

1. Giangreco A., Qin M., Pinter J.E., Watt F.M. Epidermal stem cells are retained in vivo throughout skin aging. *Aging Cell*. 2008; 7 (2): 250–259.
2. Moore K.A., Lemischka I.R. 2006. Stem cells and their niches. *Science*. 311: 1880–1885.
3. Sharpless N.E., DePinho R.A. How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8: 703–713.
4. Weber C., Pohl S., Poertner R., Pino-Grace P., Wallrapp C., Geigle P., Czermak P. Bioreactor system for expansion and differentiation of human mesenchymal stem cells: design and scale-up strategy. *GIT Bioprocessing*. 2009; 1: 9–13.
5. Zouboulis C.C., Adjaye J., Akamatsu H., Moe-Behrens G., Niemann C. Human skin stem cells and the ageing process. *Exp Gerontol*. 2008; 43 (11): 986–997.
6. Петриковский Б. Клеточное обновление возрастной кожи как результат пептидной регуляции собственных стволовых клеток. *Эстетическая медицина*. 2012; XI (2): 283–293.

