

Е.О. Денис¹, Т.Б. Папурина², А.К. Коляда¹, Э. Тестер³

¹ГУ «Институт геронтологии имени Д.Ф. Чеботарева НАМН Украины», Киев

²Учебно-научный центр «Институт биологии и медицины», Киев

³ABG Lab, Джерси-Сити, США

Влияние полипептида Wharton Jelly Peptide P199 на функциональное состояние фибробластов и мезенхимальных стволовых клеток кожи

Цель работы — определить влияние соединения sh-Oligopeptide-72 (Wharton Jelly Peptide P199) на активность и подвижность мезенхимальных стволовых клеток кожи (МСК) и фибробластов *in vitro*.

Материалы и методы. Первичную культуру фибробластов дермы и МСК получили от здоровых доноров в возрасте 40 лет. Метаболическая и пролиферативная активность клеток исследована при помощи МТТ-теста и теста «заживление раны». Изучены концентрации полипептида от 1 до 1000 нг/мл.

Результаты и обсуждение. Wharton Jelly Peptide P199 в диапазоне концентраций 1–1000 нг/мл не проявляет ни токсического, ни стимулирующего эффекта на дифференцированные фибробласты. Однако МСК дермы человека оказались чувствительны к действию полипептида P199. Препарат в концентрации 1–2 нг/мл стимулирует метаболическую активность МСК. Выявлено дифференцированное действие препарата на миграционную активность. Показано стимулирующее действие на подвижность МСК дермы, но не зрелых фибробластов дермы.

Выводы. Wharton Jelly Peptide P199 стимулирует метаболическую, пролиферативную и миграционную активность МСК дермы человека. В отношении фибробластов кожи подобных эффектов не выявлено.

Ключевые слова

Фибробласты, мезенхимальные стволовые клетки, полипептид P199, Wharton Jelly Peptide P199, sh-Oligopeptide-72, кожа, дифференцирование, старение.

Благодаря развитию биотехнологических способов получения человеческих пептидов стало возможным их высококачественное производство. В связи с этим в последнее время активно обсуждается потенциальная роль синтезированных рекомбинантных человеческих полипептидов в дерматологии и дерматокосметологии. Данные вещества не ксеногенны, не несут инфекционной опасности и могут производиться в больших количествах. Особый интерес представляют пептиды, характерные для тканей пупочного канатика — органа, богатого стволовыми клетками.

Соединение sh-Oligopeptide-72 (Wharton Jelly Peptide P199) является синтетическим аналогом полипептида, широко представленного в ткани пупочного канатика человека. Это соединение полипептидной природы и рассматрива-

ется как стимулятор деления и дифференциации стволовых клеток эпидермиса и дермы. Также есть данные о влиянии полипептида на возрастные характеристики кожи [15]. Было показано положительное влияние препарата Meso-Wharton P199, которое заключается в стимулировании процессов обновления клеточных структур дермы и эпидермиса при введении препарата в кожу инъекционным путем [2, 9].

Цель работы — изучить влияние полипептида P199 (sh-Oligopeptide-72) на показатели активности и подвижности мезенхимальных стволовых клеток кожи (МСК) и фибробластов.

Материалы и методы

Культура фибробластов дермы. Первичную культуру фибробластов дермы получали от здоровых доноров-добровольцев в возрасте 40 лет. Клетки,

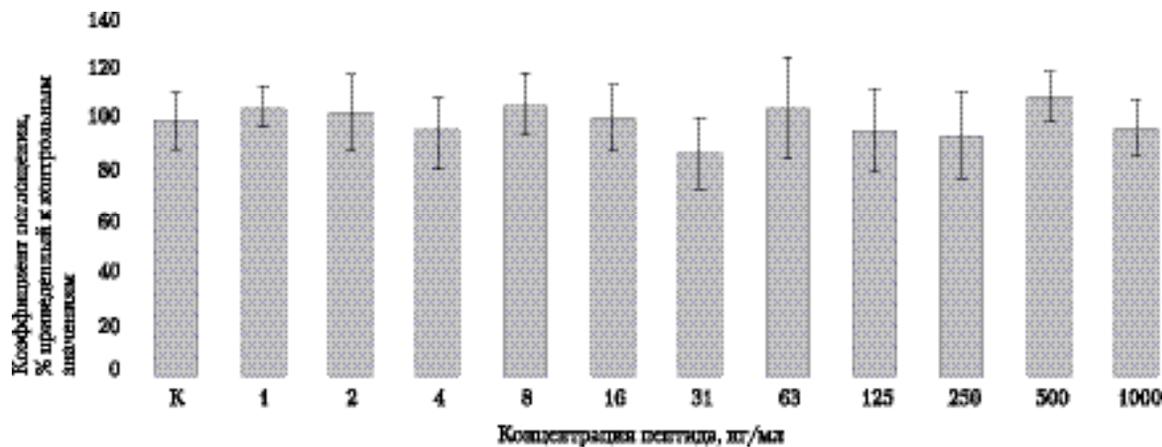


Рис. 1. Результаты МТТ-теста

Метаболическая активность клеток представлена как коэффициент поглощения формазана

полученные из эксплантов, культивировали в полной среде (ДМЕМ обогащенная 10 % фетальной бычьей сывороткой) при 100 % влажности температуре 37 °С с 5 % CO₂. После прохождения трех пассажей и стабилизации культуры клетки использовали для испытаний [1, 8, 16].

Культура МСК. Первичную культуру мезенхимальных стволовых клеток получали из подкожного липоасpirата. Липоасpirацию выполняли у доноров-добровольцев среднего возраста. Жир был собран с внутренней поверхности бедер по методике P. Tonnard [4, 11, 18].

Ткань тщательно перемешивали с буфером для отмывания в течение 5 мин, после чего центрифугировали 10 мин при 300 g. Осадок — стромально-васкулярную фракцию (СПФ) — растворяли в 5 мл среды α-МЕМ, обогащенного фетальной бычьей сывороткой (10 %), с добавлением, и вносили в культуральные флаконы с площадью адгезивной поверхности 25 см² [5].

МТТ-тест. Использовали концентрацию пептида от 1 до 1000 нг/мл. Клетки инкубировали с тест-агентом в течение 2 сут на 96-луночных планшетах в концентрации 5 тыс. кл/см². После чего проводили замену среды на свежую без целевого пептида и вносили в условиях затемнения раствор МТТ-реактанта (5 мг/мл на фосфатном буфере). Инкубация с реактантом длилась 5 ч, после чего среду с реактантом отбирали, а наработанные кристаллы формазана растворяли в 200 мкл 100 % ДМСО, удерживали планшет еще 30 мин при 37 °С и измеряли результаты на спектрометре VARIOSCAN [3, 6, 7, 14].

Тест «заживления раны». Для проведения тестов соответствующие культуры были посеяны в 12-луночные планшеты, где они культивировались при стандартных условиях до достижения полного монослоя. Шпателем снимали

протяженную ленту клеток шириной около 1000 мкм в центральной области монослоя. Лунку отмывали чистой средой от разрушенных клеток и заполняли свежей питательной средой с пониженной концентрацией фетальной бычьей сыворотки (2 %) и двумя предварительно выбранными концентрациями исследуемого пептида (250 нг/мл, 10 нг/мл). Контролем выступали лунки с аналогичной средой без пептида [10, 12].

После внесения среды и раствора полипептида сразу проводили фотографирование образованного свободного от клеток поля. Повторные фото делали через 16 и 24 ч. На полученных фотографиях с помощью программного обеспечения CorelPhotopaint измеряли ширину пустого поля царапины для оценки скорости заполнения его мигрирующими клетками [13].

Результаты и обсуждение

Все исследуемые концентрации полипептида Р199 (от 1 до 1000 нг/мл) не приводили к изменениям метаболической и пролиферативной активности зрелых фибробластов. Средние значения поглощения раствора формазана, наработанного клетками в среде при разных концентрациях полипептида Р199, соответствуют среднему значению данного показателя в контрольной группе (рис. 1). Все значения в исследуемой группе находятся в пределах области стандартного отклонения контрольной группы. На графике представленная зависимость уровня метаболической активности, оцениваемая по коэффициенту поглощения формазана в диапазоне 560–660 нм. Значения приводят в процентах к значению контроля (100 %).

Зрелые фибробласты дермы не чувствительны к полипептиду Р199. Не обнаружено стиму-

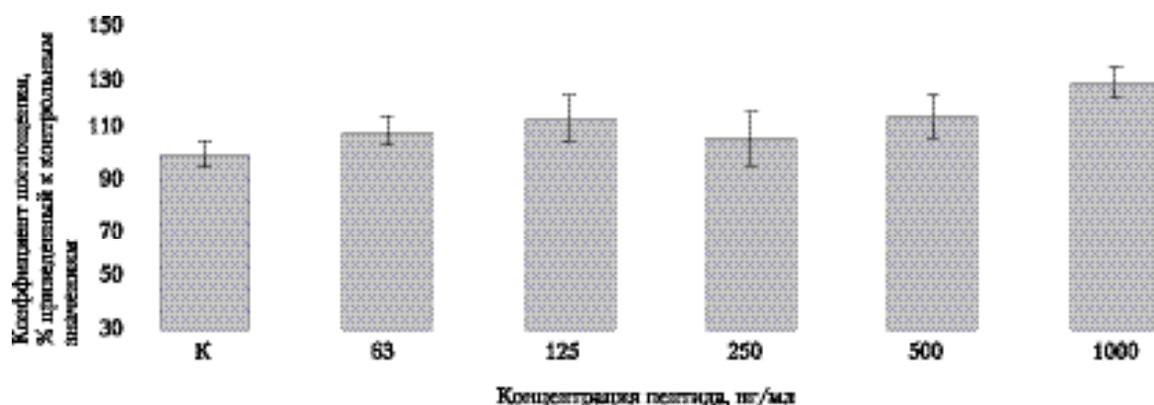


Рис. 2. Результаты МТТ-теста, проведенного в культурах МСК

Метаболическая активность клеток представлена как коэффициент поглощения формазана

лирующего или угнетающего влияния всех изученных концентраций. На основании этого полипептид можно считать нетоксичным для фибробластов дермы.

В результате исследования выявлено стимулирующее действие полипептида Р199 в определенных концентрациях на МСК человека. Концентрация от 0,5 мкг/мл до 2 нг/мл не имеет выраженного влияния. Метаболическая активность клеток при воздействии препарата в данных концентрациях была близка к контрольной (рис. 2). При этом препарат в концентрациях 1–2 нг/мл стимулировал метаболическую активность стволовых клеток.

Таким образом, МСК более чувствительны к воздействию препарата, чем фибробласты.

Тест «заживления раны». В экспериментах на фибробластах дермы не выявлено повышения миграционной активности зрелых фибробластов после воздействия на них полипептида Р199. Наблюдалась высокая миграционная активность фибробластов – за 60 ч пробелы закрывались полностью. За 20 ч ширина царапины в контрольных образцах уменьшилась на 16 % по отношению к исходной, при концентрации Wharton Jelly Peptide Р199™ 10 нг/мл – на 18 %, а при 250 нг/мл – на 15,2 %. После 46 ч инкубации в контрольной группе было заполнено 56,7 %, при тестовой концентрации 10 нг/мл – 62,1 %, а при 250 нг/мл – 59 %. Динамика движения оказалась близкой для разных групп. Итак, полипептид Р199 не влияет на миграционную активность фибробластов.

В отличие от фибробластов МСК, которые инкубировали с полипептидом Р199, обнаружили гораздо более высокую миграционную активность, чем при культивировании с контрольным раствором. В контрольной группе ширина пробелов за 18 ч уменьшалась в среднем на 25,8 %, а

за 28 ч – на 62 %. В то время как при концентрации пептида 10 нг/мл клетки покрывали 71,6 % царапины в течение 18 ч, а за 28 ч область повреждения уже была равномерно заполненной клетками (рис. 3).

Более высокая концентрация полипептида Р199 имела такой же эффект: за 18 ч – 68,5 %, за 28 ч – почти полное зарастание. Отсутствие разницы между действием высокой и низкой концентраций агента и сам факт мощной стимуляции миграции уже при низкой концентрации 10 нг/мл полипептида Р199 в среде свидетельствуют о специфическом влиянии полипептида Р199 на миграционную активность МСК кожи.

Проведенное исследование показало специфичность воздействия полипептида Р199 на двигательную и метаболическую активность МСК, а также отсутствие значимого влияния изучаемых концентраций на фибробласты кожи. Эффекты мезотерапевтических препаратов, содержащих полипептид Р199, можно объяснить именно влиянием вещества на миграционную активность МСК, которые рекрутируются из глубоких слоев подкожного основания или дермы и, вероятно, дифференцируясь в фибробласты, восстанавливают истощенный клеточный пул, а затем ремоделируют матриксную составляющую, синтезируя коллагены различных типов, эластин и гликозаминогликаны. Отсутствие стимулирующего эффекта препарата на зрелые фибробласты может быть вызвано его неспособностью активизировать процессы митохондриального дыхания [17].

Выводы

1. Фибробласты дермы взрослого человека не чувствительны к различным концентрациям Wharton Jelly Peptide Р199. Вещество в диапазо-

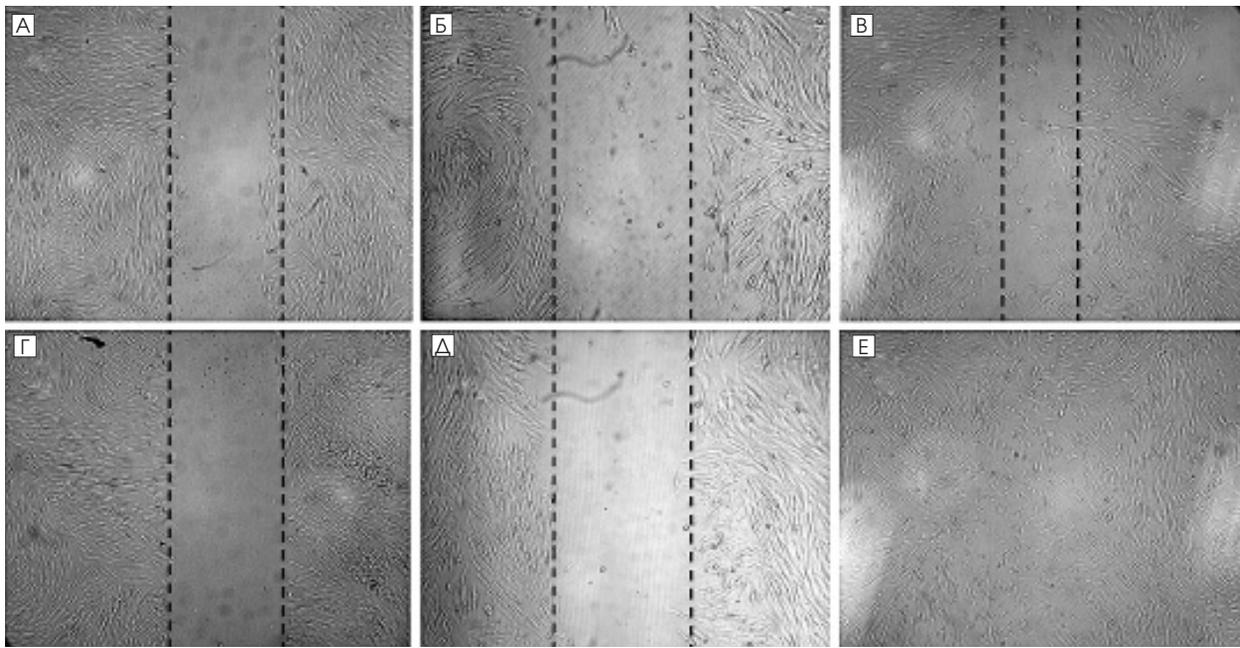


Рис. 3. Заповнення МСК поля царапини за різні проміжки часу

А — контроль, 0 ч; Б — контроль, 18 ч; В — контроль, 28 ч; Г — 10 нг/мл поліпептида Р199, 0 ч; Д — 10 нг/мл поліпептида Р199, 18 ч; Е — 10 нг/мл поліпептида Р199, 29 ч.

не концентрацій 1–1000 нг/мл не проявляє ні токсического, ні стимулюючого ефектів на диференційовані фібробласти.

2. МСК дерми людини чутливі до поліпептиду Р199. Препарат в концентрації

1–2 нг/мл стимулює метаболічну активність МСК.

3. Wharton Jelly Peptide P199™ стимулює міграційну активність МСК дерми, але не зрілих фібробластів.

Список литературы

1. Адамс Р. Методы культуры клеток.— М.: Мир, 1983.— 263 с.
2. Кветной И., Смирнова И. MESO-WHARTON: Исследование экспрессии сигнальных молекул пептида Р199 // Нувель Эстетик.— 2014.— № 3 (85).— Р. 1–4.
3. Черепович В.С., Волочник Е.В., Антоненко Е.В. Оптимизация критических параметров МТТ-теста для оценки клеточной и лекарственной цитотоксичности // Мед. журн.— 2006.— № 2.— С. 106–108.
4. Voquest A., Shahdadfar A. Isolation of stromal stem cells from human adipose tissue // *Methods Mol. Biol.*— 2006.— P. 35–46. doi:10.1385/1-59745-005-7:35.
5. Campisi J. The biology of replicative senescence // *Burp. Cancer* 1997.— Vol. 33.— P. 703–709. doi:10.1016/S0959-8049(96)00058-5.
6. Dimri G.P. et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*— 1995.— Vol. 92 (20).— P. 9363–9367.
7. Freshney R.I. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications.*— 3rd Edition — Wiley-Blackwell, New York.— 1993.— P. 76–84.
8. Hall B.M. et al. Aging of mice is associated with p16(Ink4a) and β -galactosidase-positive macrophage accumulation that can be induced in young mice by senescent cells // *Aging (Albany NY).*— 2016.— Vol. 8 (7).— P. 1294–1315. doi:10.18632/aging.100991.
9. Haudenschild C.C. et al. Endothelial regeneration. II. Restitution of endothelial continuity // *Lab. Invest.*— 1979.— Vol. 41.— P. 407–418.
10. Joel A. Aronowitz, Ryan A. Lockhart, Cloe S. Hakakian. Mechanical versus enzymatic isolation of stromal vascular fraction cells from adipose tissue // *Springerplus.*— 2015.— Vol. 4.— P. 713. doi:10.1186/s40064-015-1509-2.
11. Li T., Xia M., Gao Y. et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: an overview of their potential in cell-based therapy // *Expert Opin. Biol. Ther.*— 2015.— Vol. 15 (8).— P. 1–14. doi:10.1517/14712598.2015.1051528.
12. Liang C.-C., Park A., Guan J.-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro // *Nat. Protoc.*— 2007.— Vol. 2.— P. 329–333. doi:10.1038/nprot.2007.30.
13. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J. Immunol. Methods.*— 1983.— Vol. 65.— P. 55–63.
14. Shekhvatova A.S., Durnova A.O., Kvetnoi I.M. et al. The expression of signaling molecules under the influence of P199 peptide in Meso-Wharton preparation, Inekts // *Metody Kosmetol.*— 2013.— Vol. 4.— P. 38–46.
15. Srirama G., Bigliardia P.L., Mei Bigliardi-Qi M. Fibroblast heterogeneity and its implications for engineering organotypic skin models in vitro // *Eur. J. Cell Biol.*— 2015.— P. 1–30. doi:10.1016/j.ejcb.2015.08.001.
16. Tonnard P., Verpaele A., Peeters G. et al. Nanofat grafting: Basic Research and clinical applications // *Plast. Reconstr. Surg.*— 2013.— Vol. 132.— P. 1017–1026. doi:10.1097/PRS.0b013e31829fe1b0.
17. Wilkinson P.F., Millington R. *Skin (Digitally printed version ed.).*— Cambridge: Cambridge University Press, 2009.— P. 49–50.
18. Young H.E., Duplaa C. et al. Clonogenic analysis reveals reserve stem cells in postnatal mammals. I. Pluripotent mesenchymal stem cells // *Anat. Rec.*— 2001.— Vol. 263.— P. 350–360. doi:10.1002/ar.1112.

Є.О. Деніс¹, Т.Б. Папуріна², А.К. Коляда¹, Е. Тестер³

¹ДУ «Інститут геронтології імені Д.Ф. Чеботарьова НАМН України», Київ

²ННЦ «Інститут біології і медицини», Київ

³ABG Lab, Джерсі-Сіті, США

Вплив поліпептида Wharton Jelly Peptide P199 на функціональний стан фібробластів і мезенхімальних стовбурових клітин шкіри

Мета роботи – визначити вплив sh-Oligopeptide-72 (Wharton Jelly Peptide P199) на активність та рухливість мезенхімальних стовбурових клітин шкіри (МСК) та фібробластів *in vitro*.

Матеріали та методи. Первинну культуру фібробластів дерми та МСК отримали від здорових донорів віком 40 років. Метаболічну та проліферативну активність клітин досліджували за допомогою МТТ-тесту і тесту «загоєння рани». Вивчено концентрації поліпептиду від 1 до 1000 нг/мл.

Результати та обговорення. Wharton Jelly Peptide P199 у діапазоні концентрацій 1–1000 нг/мл не виявляє ні токсичного, ні стимулювального ефекту на диференційовані фібробласти. Однак МСК дерми людини виявилися чутливими до дії поліпептиду P199. Препарат у концентрації 1–2 нг/мл стимулює метаболічну активність МСК. Виявлено диференційовану дію препарату на міграційну активність. Показано стимулювальну дію на рухливість МСК дерми, але не зрілих фібробластів дерми.

Висновки. Wharton Jelly Peptide P199 стимулює метаболічну, проліферативну та міграційну активність МСК дерми людини. Щодо фібробластів шкіри таких ефектів не виявлено.

Ключові слова: фібробласти, мезенхімальні стовбурові клітини, поліпептид P199, Wharton Jelly Peptide P199, sh-Oligopeptide-72, шкіра, диференціювання, старіння.

Y.O. Denis¹, T.B. Papurina², O.K. Koliada¹, E. Tester³

¹SI «D.F. Chebotarev Institute of Gerontology NAMS of Ukraine», Kyiv

²ESC «Institute of Biology and Medicine», Kyiv

³Head of Lab ABG Lab, NJ 07410, ,Jersey, USA

Impact of Wharton Jelly Peptide P199 on fibroblast and mesenchyme skin cells functioning

Objective – to determine the effect of the sh-oligopeptide-72 on the activity and mobility of mesenchymal stem cells of the skin (MSC) and fibroblasts *in vitro*.

Materials and methods. The primary culture of dermal fibroblasts and MSCs was obtained from healthy donors of 40 years. The metabolic and proliferative activity of cells was investigated using the MTT test and the «wound healing» test. The concentration of the polypeptide from 1 ng/ml to 1000 ng/ml was investigated.

Results and discussion. The concentration range of 1–1000 ng/ml does not show any toxic or stimulating effects on differentiated fibroblasts. At the same time, MSCs of the human derma were sensitive to the action of the P199 polypeptide. The concentration of 1–2 ng/ml stimulates the metabolic activity of MSCs. Also, we have detected the differential effect of P199 on migration activity. It is shown stimulating effect on the mobility of MSC of the dermis, but not of dermal fibroblasts.

Conclusions. Wharton Jelly Peptide P199 stimulates the metabolic, proliferative and migration activity of dermal MSCs. Skin fibroblasts Have not been affected.

Key words: fibroblasts, mesenchymal stem cells, polypeptide P199, Wharton Jelly Peptide P199, sh-Oligopeptide-72, skin, differentiation, aging.

Дані про авторів:

Деніс Євгеній Олександрович, мол. наук. співр. лабораторії епігенетики ДУ «Інститут геронтології імені Д.Ф. Чеботарьова НАМН України»

04114, м. Київ, вул. Вишгородська, 67

E-mail: deniseugen@ukr.net

Папуріна Тетяна Борисівна, студентка 5 курсу кафедри генетики ННЦ «Інститут біології та медицини»

Коляда Олександр Костянтинович, мол. наук. співр. лабораторії епігенетики ДУ «Інститут геронтології імені Д.Ф. Чеботарьова НАМН України»

Тестер Еліна, керівник лабораторії ABG Lab, NJ 07410, Джерсі-Сіті, США