

УДК 611.018.21:57.085.23:616-098  
DOI: 10.35693/2500-1388-2020-5-3-210-215

## Фибробласты как объект изучения пролиферативной активности *in vitro*

В.И. Кузьмичева<sup>1</sup>, Л.Т. Волова<sup>1</sup>, Ф.Н. Гильмиярова<sup>1</sup>, И.М. Быков<sup>2</sup>, Е.В. Авдеева<sup>1</sup>, Н.А. Колотьева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава РФ (Самара, Россия)

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» (Краснодар, Россия)

### Аннотация

В настоящем обзоре рассмотрено анатомическое и функциональное разнообразие фибробластов, особенности протекания метаболических процессов и энергетического обмена в этих клетках.

Обсуждается изменение пролиферативной активности фибробластов в зависимости от воздействия различных факторов. Описано влияние малатдегидрогеназной челночной системы на активность метаболических процессов фибробластов, показано, что увеличение жизни клеточной культуры ассоциировано с цитозольной изоформой данного фермента.

Продemonстрирована устойчивость клеточной линии фибробластов при активации свободно-радикальных процессов и перекисного окисления в условиях добавления биологически активных соединений, обсуждается роль отдельных метаболитов в обеспечении свободно-радикальной защиты и поддержании пролиферативного потенциала клеток.

**Ключевые слова:** культура клеток, фибробласты, метаболизм, малатдегидрогеназа, пируват, лактат.

**Конфликт интересов:** не заявлен.

### Для цитирования:

Кузьмичева В.И., Волова Л.Т., Гильмиярова Ф.Н., Быков И.М., Авдеева Е.В., Колотьева Н.А. **Фибробласты как объект изучения пролиферативной активности *in vitro***. Наука и инновации в медицине. 2020;5(3):210-215  
doi: 10.35693/2500-1388-2020-5-3-210-215

### Сведения об авторах

**Кузьмичева В.И.** – ассистент кафедры фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой.

ORCID: 0000-0002-5232-1549

**Волова Л.Т.** – д.м.н., профессор, зав. биотехнологическим отделом ИЭМБ и директор НПЦ «Самарский банк тканей».

ORCID: 0000-0002-8510-3118

**Гильмиярова Ф.Н.** – д.м.н., профессор кафедры фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой. ORCID: 0000-0001-5992-3609

**Быков И.М.** – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фундаментальной и клинической биохимии.

ORCID: 0000-0002-1787-0040

**Авдеева Е.В.** – д.фарм.н., профессор кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии.

ORCID: 0000-0003-3425-7157

**Колотьева Н.А.** – к.м.н., доцент кафедры фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой.

ORCID: 0000-0002-7853-6222

### Автор для переписки

**Кузьмичева Валерия Игоревна**

Адрес: Самарский государственный медицинский университет, ул. Арцыбушевская, 171, г. Самара, Россия, 443001.

E-mail: bio-sam@yandex.ru

Тел.: +7 (846) 337 04 63.

АТФ – аденозинтрифосфат; МДГ – малатдегидрогеназа.

**Рукопись получена:** 20.04.2020

**Рецензия получена:** 10.05.2020

**Решение о публикации принято:** 12.05.2020

## Fibroblasts as the subject of proliferative activity research *in vitro*

Valeriya I. Kuzmicheva<sup>1</sup>, Larisa T. Volova<sup>1</sup>, Frida N. Gilmiyarova<sup>1</sup>,

Ilya M. Bykov<sup>2</sup>, Elena V. Avdeeva<sup>1</sup>, Natalya A. Kolotieva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Samara State Medical University (Samara, Russia)

<sup>2</sup>Kuban State Medical University (Krasnodar, Russia)

### Abstract

This review presents the data devoted to anatomical and functional diversity of fibroblasts, peculiarities of metabolic processes and energy exchange in these cells.

In particular, the changes in fibroblast proliferative activity depending on various factors are discussed. The review shows the influence of the malate dehydrogenase shuttle system on the activity of metabolic processes and the life span of fibroblasts *in vitro*. The increase of cell cultivation time *in vitro* is associated with the cytosolic isoform of this enzyme.

The stability of fibroblast cell culture to the activation of free-radical processes and peroxidation with addition of biologically active compounds is described and followed by a discussion of the role of separate metabolites in providing free-radical protection and maintenance of the proliferative potential of cells.

**Keywords:** cell culture, fibroblasts, metabolism, malate dehydrogenase, pyruvate, lactate.

**Conflict of interest:** nothing to disclose.

### Citation

Kuzmicheva VI, Volova LT, Gilmiyarova FN, Bykov IM, Avdeeva EV, Kolotieva NA. **Fibroblasts as the subject of proliferative activity research *in vitro***. Science & Innovations in Medicine. 2020;5(3):210-215  
doi: 10.35693/2500-1388-2020-5-3-210-215

### Information about authors

**Valeriya I. Kuzmicheva** – assistant of the Chair of fundamental and clinical biochemistry with laboratory diagnostics. ORCID: 0000-0002-5232-1549

**Larisa T. Volova** – PhD, Professor, the Head of Biotechnology Department of IEMB, director of Samara Tissue Bank. ORCID: 0000-0002-8510-3118

**Frida N. Gilmiyarova** – PhD, Professor, Chair of fundamental and clinical biochemistry with laboratory diagnostics. ORCID: 0000-0001-5992-3609

**Ilya M. Bykov** – PhD, the Head of the Department of fundamental and clinical biochemistry. ORCID: 0000-0002-1787-0040

**Elena V. Avdeeva** – Dr. Sci. of Pharmacy, Professor, Department of pharmacognosy with botany and the basics of phytotherapy.

ORCID: 0000-0003-3425-7157

**Natalya A. Kolotieva** – PhD, Associate Professor, the Chair of fundamental and clinical biochemistry with laboratory diagnostics. ORCID: 0000-0002-7853-6222

### Corresponding Author

**Valeriya I. Kuzmicheva**

Address: Samara State Medical University, 171 Artsybushevskaya st., Samara, Russia, 443001.

E-mail: bio-sam@yandex.ru

Phone: +7 (846) 337 04 63.

**Received:** 20.04.2020

**Revision Received:** 10.05.2020

**Accepted:** 12.05.2020

**Ф**ибробласты — это клетки, которые синтезируют и интегрируют структурные белки, такие как коллаген и эластин, во внеклеточный матрикс большинства тканей мезенхимального происхождения [1, 2]. Для фибробластов характерна экспрессия маркеров, включающих в себя виментин и проколлаген I $\alpha$ 2 цепи [3].

Соединительнотканый каркас сердца [4], легких [5], желудочно-кишечного тракта [6], мышц и других органов содержат фибробласты, выполняющие специализированные функции [8]. Показаны различия в экспрессии генов между фибробластами дермы и дериватов кожи [9, 10], фибробласты, полученные из различных анатомических участков, имеют тканеспецифические цитофизиологические отличия [11]. Кроме того, существуют значительные отличия в архитектонике дермы разных участков тела, которые определяют регенеративный потенциал ткани и влияют на возникновение и характер патологических процессов, например, образование келоидных рубцов [12]. Различия морфофункционального состояния культивируемых фибробластов, полученных из разных участков тела, коррелируют с различной экспрессией гомеобоксных генов Хокса (HOX-генов), что отражает различные направления местной дифференцировки. Таким образом, биологические свойства фибробластов, полученных из разных участков тела, скорее всего, отражают сочетание эндогенных особенностей и роль таких факторов, как механическое напряжение, которое разнится между топографическими областями [13].

Последние исследования подтверждают концепцию, что перициты — фибробласты, связанные с кровеносными сосудами, — являются разновидностью мезенхимальных стволовых клеток *in vivo*. Перициты ассоциируются и окружают сосудистые каналы в большинстве тканей. Для идентификации перицитов предложен ряд маркеров, в том числе NG2 и RGS5 [14]. Специфическая подгруппа перицитов, экспрессирующих ADAM12, присутствующих в коже и мышцах, активируется в результате ранения и способствует избыточной выработке коллагена в рубце [15].

Фибробласты сердца составляют большую популяцию клеток в этом органе, перемежаясь с кардиомиоцитами. Признано, что воздействие сигналов ангиотензина II на сердечные фибробласты и миоциты приводит к гипертрофии и фиброзу [4]. Воспалительная сигнализация IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  также приводит к патологическим изменениям в синтезе коллагена сердечными фибробластами, сопровождающим сердечную недостаточность.

Представленные выше различия обусловлены особенностями анатомического происхождения фибробластов, вместе с тем эти клетки, выделенные из одного типа тканей, также могут иметь разный функциональный потенциал. Например, фибробласты кортикальной и медуллярной зон почек проявляют различия в культуре клеток и в их реакции на митогенную стимуляцию [16].

К внешним факторам, определяющим судьбу фибробласта, относят контакт с клеткой, секретируемые сигнальные факторы и взаимодействие со стромальными

элементами. Эксперименты на культуре клеток показывают, что кератиноциты стимулируют фибробласты производить ряд цитокинов, включая ИЛ-6 и FGF7. ИЛ-1 был идентифицирован как индуцирующий фактор в этих экспериментах при сокультивировании клеток [17]. И наоборот, факторы, секретируемые фибробластами, влияют на рост и дифференциацию кератиноцитов, что указывает на реципрокное взаимодействие клеток. Фибробласты, культивируемые как монослой, демонстрируют различия в экспрессии и морфологии коллагена по сравнению с фибробластами в трехмерной культуре. Также наблюдаются различия между коллагеном и фибриновыми гелями [18].

Что касается специфических факторов, вовлеченных в регуляцию фибробластов, то складывающаяся картина представляет собой сложное взаимодействие множества сигнальных путей, которые синергетически регулируют идентичность и функцию фибробластов. Ингибирование сигнального пути Wnt/ $\beta$ -катенин в эпидермисе нарушает адипогенез [19]. Интересно, что последствия активации этого пути специфичны для разных подтипов фибробластов. Стабилизация  $\beta$ -катенина в дермальных фибробластах в процессе развития приводит к фиброзу и нарушает адипогенез [20].

Дисрегуляция сигнализации Wnt наблюдается при ряде состояний, характеризующихся aberrантным или чрезмерным фиброзом. Профиброзные эффекты TGF- $\beta$  опосредуются через каноническую сигнализацию Wnt путем снижения экспрессии антагониста Wnt Dickkopf-1 [21]. Этот путь также вовлечен в развитие почечного фиброза [22], идиопатического фиброза легких [23].

Фибробласты играют важную роль в поддержании структурной целостности дермы. Для выполнения этой функции должен существовать механизм, при помощи которого эти клетки адаптируются к механическим нагрузкам и реагируют на них. Сигнализация YAP через путь Hippo вовлечена в регулирование жесткости клеточного матрикса [24]. Кроме того, была продемонстрирована роль сигнализации фокальной киназы адгезии в реакциях раны на механическое напряжение.

Старение связано с характерными изменениями в структуре дермы, в том числе с утончением и выравниванием эпителиально-дермального соединения, с потерей эпидермальных гребней [25]. Интересно, что это преимущественно влияет на папиллярную дерму: изменения в поведении папиллярных фибробластов дермы, полученных от пожилых доноров, наблюдались в трехмерных культурах [26]. Изменения также заметны и в других компонентах кожи, таких как крупные кровеносные сосуды.

В эксперименте показано, что в коже пролиферация фибробластов происходит во время эмбрионального развития мыши; однако последующий рост животного не связан с дальнейшей пролиферацией фибробластов, а достигается простым увеличением объема матрикса между соседними фибробластами [27]. Это согласуется с наблюдением, что скорость деления фибробластов в дерме взрослого человека в обычном состоянии очень низкая. Вероятно, во время старения количества

фибробластов у взрослого человека недостаточно для поддержания структурной целостности матрикса. С другой стороны, возможно, что в составе подтипов фибробластов дермы наблюдаются возрастные изменения.

## ■ ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА КУЛЬТУРЫ ФИБРОБЛАСТОВ

Культивируемые фибробласты могут удовлетворять свои энергетические потребности для поддержания роста главным образом за счет использования анаэробного гликолиза и в ограниченной степени за счет использования окисления глутамина. Клетки в культуре проходят через две фазы. Первоначально они получают энергию из анаэробного гликолиза, преобразуя большую часть глюкозы среды в молочную кислоту. Лактат вырабатывается в эту начальную фазу роста с коэффициентом 1,6 нмоль на моль глюкозы. Замена культуральной среды и удаление накопленного лактата восполняют глюкозу, что приводит к более быстрому ее усвоению. Утилизация лактата при исчерпании глюкозы происходит только потому, что нет доступных гексозных субстратов [28].

Таким образом, рост в неизменной среде свидетельствует о быстрой гликолитической фазе при пролиферации клеток и окислительной фазе при сплошном росте. Утилизация глюкозы может быть снижена достаточно заметно при добавлении 10 мМ лактата и 0,5 мМ пирувата. Эффект этих трехуглеродных субстратов заключается в обеспечении энергии за счет их окисления в цикле трикарбоновых кислот. Добавление ингибиторов дыхания не влияет на скорость утилизации глюкозы, что свидетельствует об отсутствии окислительного метаболизма, когда пируват и лактат присутствуют в низких концентрациях.

Способность клеток использовать глюкозу снижается по мере того, как они переходят в фазу сплошного роста. При добавлении к фибробластам инсулина или эпидермального фактора роста возникающий в результате этого стимул сопровождается одновременным повышением скорости гликолиза и активности фосфофруктокиназы [29, 30].

Снижение утилизации глюкозы, наблюдаемое в растущих культурах при достижении сплошного роста, вероятно, связано с сочетанием двух причин. Во-первых, снижение роста клеток и оборота АТФ создают меньшую потребность на синтез АТФ при помощи гликолиза. Во-вторых, увеличение концентрации лактата заставляет окислительный метаболизм играть более заметную роль в синтезе АТФ, тем самым замедляя анаэробное превращение глюкозы.

При изучении клеточных культур необходимо учитывать общий метаболический статус используемых клеток *in vitro*, относительную интенсивность различных метаболических процессов, а также изменения, вызванные исследуемыми факторами. В одном из исследований методом газовой хроматографии был проанализирован метаболитный состав среды фибробластов [31]. Данное исследование проводилось в течение 31 недели, показатели изучались в динамике,

были выявлены значительные количественные отличия, наблюдаемые на хроматограммах. Это наглядно показывает, что клеточный метаболизм является динамическим процессом, подверженным влиянию различных факторов: сыровоточного состава, сезонных изменений окружающей среды и т.д.

Общее количество пиков в масс-хроматограммах составило 110. Выявлены 11 метаболитов. Выявление аланина в образцах свидетельствует о значительном увеличении его содержания в среде в результате роста клеток, так как экстрагируемость аминокислот этилацетатом низка. Поскольку выделение аланина характерно для различных пулов клеток животных и человека, активность этого процесса должна постоянно превышать собственные потребности клетки. Поскольку аланин не является конечным продуктом метаболизма, его избыточное производство клетками должно, по всей вероятности, служить некоторому внеклеточному процессу, связанному с существованием клеток в организме. Глюкозно-аланиновый цикл может быть таким процессом: синтезированный аланин, особенно в мышечной ткани, поступает в печень, где он используется для синтеза глюкозы. Затем глюкоза переносится в другие ткани.

При культивировании клеток концентрация молочной кислоты может увеличиваться в 10–18 раз в сравнении с контрольной средой. Выделение сравнительно большого количества молочной кислоты свидетельствует о высокой активности процессов анаэробного гликолиза при выращивании фибробластов.

В то время как содержание многих метаболитов изменялось в среде, присутствие лимонной кислоты характеризовалось стабильностью. Однако ее концентрация была примерно на уровне других метаболитов. Это, вероятно, указывает на то, что активность процессов цикла Кребса в дермальных фибробластах *in vitro* ниже, чем анаэробный гликолиз.

Выделение холестерина фибробластами показывает, что его синтез из ацетил-КоА превышает внутриклеточные требования. Как и аланин, холестерин, возможно, вырабатывается фибробластами в соответствии с генетически детерминированной программой клеточного метаболизма *in vivo*.

Выделение фибробластами гидроксиэтилового эфира пальмитиновой кислоты представляет особый интерес с точки зрения эндогенного происхождения этанола, обсуждаемого в настоящее время в литературе.

Даже самая поверхностная интерпретация полученных данных позволяет предположить, что метаболиты, выделяемые фибробластами, *in vitro* отражают активность определенных процессов в клетках *in vivo*.

## ■ ВЛИЯНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ МЕТАБОЛИТОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ФИБРОБЛАСТОВ

Ограничение калорий является научно доказанным методом задержки старения у широкого круга видов, включая человека [32], подчеркивающим важность энергетического метаболизма как ключевого регулятора старения. Имеются убедительные данные,

подтверждающие мнение о том, что изменение активности углеводного метаболизма играет определенную роль в этом процессе: активность некоторых гликолитических ферментов, таких как гексокиназа, глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа, фосфоглицераткиназа, фосфоглицератмутаза и лактатдегидрогеназа, увеличивается в стареющих фибробластах человека [30]; снижается активность некоторых ферментов цикла трикарбоновых кислот, таких как аконитаза и альфа-кетоглутаратдегидрогеназа, в то время как активность изоцитратдегидрогеназы увеличивается в стареющих митохондриях почек мыши [31]; снижается активность малат-аспартатного челнока в стареющих фибробластах человека [30]. Примечательно, что в контексте последнего наблюдения активация компонентов малат-аспартатной челночной системы увеличивает продолжительность жизни у дрожжей [32].

Цитозольная малатдегидрогеназа человека (МДГ1) является компонентом малат-аспартатной челночной системы, которая катализирует восстановление оксалоацетата до малата с помощью переносчика НАД. После импорта в митохондрию малат окисляется до оксалоацетата с восстановлением НАД до НАДН митохондриальной малатдегидрогеназой (МДГ2). Суммарный эффект описываемой челночной системы заключается в транслокации восстановленных эквивалентов, образующихся при гликолизе, в митохондрии для генерации АТФ посредством окислительного фосфорилирования.

Возможность того, что цитозольная МДГ1 человека играет определенную роль в клеточном старении, подтверждается рядом сообщений. В молодых клетках человека МДГ, по-видимому, ассоциируется с p36 — регулятором активности МДГ, позволяющим цитозольному МДГ функционировать как челночный фермент; в стареющих клетках человека, напротив, МДГ, по-видимому, диссоциирован с p36, что отключает фермент, не позволяя ему направить поток водорода из цитозоли в митохондрии [33–36].

В исследовании S. Lee и соавт. [38] показано, что нокдаун МДГ1 индуцирует клеточное старение в фибробластах человека, тогда как нокдаун МДГ2 не влияет на старение. МДГ1 действует как ключевой регулятор клеточного старения через свою роль в окислении НАДН и последующей модуляции активности АМФ-активированной протеинкиназы и сиртуина-1.

Примечательно, что изменения в активности МДГ1 связаны с рядом заболеваний, в том числе боковым амиотрофическим склерозом, сахарным диабетом, шизофренией и дилатационной кардиомиопатией [39]. Считается, что ингибирование МДГ1 в раковых клетках может быть многообещающей терапией опухолевых заболеваний, поскольку активация клеточного старения является проверенной стратегией для необратимой остановки клеточного цикла [40].

В другом исследовании [41] диплоидные фибробласты человека, культивируемые *in vitro*, подверглись ограниченному количеству клеточных делений, известному как репликативное старение [42]. Репликативное старение использовано в качестве клеточной модели для изучения механизма старения. Для идентификации

молекулярных изменений в стареющих фибробластах были выбраны высокопроизводительные подходы транскриптомики и протеомики. Протеомное профилирование дифференциально экспрессированных белков в молодых и старых фибробластах проводилось с использованием различных методов, таких как двумерный гель-электрофорез (2DGE), iTRAQ-маркировка, двумерный дифференциальный гель-электрофорез (2D-DIGE). Отмечено, что экспрессия белка МДГ2 была выше в стареющих клетках, чем в молодых. Хотя МДГ2 не может напрямую регулировать клеточное старение, он все же может влиять на энергетический метаболизм, так как является частью малат-аспартатного челнока. Повышение уровня белка МДГ2 позволяет предположить, что усиление активности данного фермента способствует выживанию стареющих клеток, увеличивая интенсивность углеводного обмена.

Недавно было обнаружено, что добавление пирувата индуцирует пролиферацию фибробластов посредством НАД<sup>+</sup>-зависимого синтеза аспартата в моделях остановки клеточного цикла, вызванных митохондриальной дисфункцией, и защищает фибробласты легких от старения путем увеличения соотношения НАД<sup>+</sup>/НАДН [43–45]. Однако физиологическая функция пирувата, лежащая в основе его протекторной роли в нормальных условиях, остается неизвестной.

В одном из исследований была показана роль пирувата в дермальных фибробластах человека в нормальных условиях [46]. Фибробласты культивировали в присутствии (Пир+) или отсутствии (Пир-) 1 мМ пирувата в течение 12 дней. Функциональным следствием лишения пирувата в культуральных средах было значительное снижение пролиферации фибробластов с 4-го дня. Кроме того, в Пир-клетках наблюдалось накопление клеток в фазе G2/M и повышение p53. Индуцированное депривацией пирувата старение фибробластов было определено на основе увеличения активности β-галактозидазы, снижения уровня внутриклеточного белка группы высокой подвижности B1.

Кроме того, морфология митохондрий Пир-фибробластов была изменена с линейной на круглую форму. Эти данные позволяют предположить, что отсутствие пирувата вызывает увеличение содержания аномальных митохондрий, которые производят меньше АТФ.

Сообщалось, что пируват необходим для митофагии — нормального процесса утилизации митохондрий — посредством стабилизации PINK1 [47]. При анализе содержания митохондрий в клетках Пир+ и Пир- с использованием зеленого красителя Mitotracker было установлено их увеличение примерно в четыре раза при отсутствии пирувата, что позволяет предположить в качестве причины — дефект митохондриального клиренса — митофагии.

Для определения влияния пирувата на старение кожи человека использовали модель кожного эквивалента, которая близко имитирует *in vivo* кожу человека, культивируемую в присутствии или отсутствии пирувата в течение 7 дней после контакта с воздухом. Гистологический анализ показал, что эпидермис, включая роговой слой, у



Пир- был тоньше, чем у Пир+. Несмотря на то что морфология и количество кожных клеток существенно не изменились, количество  $\beta$ -галактозидаз-положительных клеток, связанных со старением, увеличилось, а соотношение НАД+/НАДН в дерме Пир- уменьшилось по сравнению с дермой Пир+. Более того, уровень матричной металлопротеиназы-1, известной как фибробластная коллагеназа, и SASP были заметно повышены, а аномальные коллагеновые волокна были увеличены в дерме Пир-, как это описано для пожилой кожи [48], что указывает на то, что пируват также защищает от старения дермальные фибробласты.

В недавно опубликованном исследовании была показана выраженная антиоксидантная роль пирувата на культуре фибробластов и мезенхимальных стволовых клеток [49]. Фибробласты человека (линия клеток Hs27) и эмбриональные стволовые клетки (линия клеток HUES3) подвергались воздействию возрастающих концентраций различных окислительных стресс-индуцирующих агентов: перекиси водорода, трет-бутил гидроксида и ротенона, в разные периоды времени: 1 час, 24 часа и 72 часа. Жизнеспособность клеток анализировалась методом измерения флуоресцентной активности реагента AlamarBlue. Все окислительные агенты, вызывающие стресс, имели кумулятивный эффект, зависящий от времени. Другие исследуемые антиоксиданты показали четкую кривую токсичности в обоих типах клеток, за исключением пирувата, который оказался не токсичен для соматических клеток. Защитное действие антиоксидантов впервые было оценено в фибробластах, подвергшихся воздействию повышенных концентраций перекиси водорода в течение 72 часов. Пируват показал важный дозозависимый защитный эффект, способный нейтрализовать токсичность  $H_2O_2$  до концентрации в 500 раз выше нормы. Все исследованные антиоксиданты показали частичную защиту только от некоторых прооксидантных агентов, в то время как пируват — от всех перечисленных.

Было исследовано антиоксидантное действие пирувата на физиологию митохондрий на клетках-фибробластах человека. Для этого использовали MitoTracker Зеленый

для локализации всех митохондрий в клетке, MitoTracker Оранжевый — для того, чтобы локализовать митохондрии с высоким мембранным потенциалом, а Hoechst 33342 — для локализации ядер. При обработке фибробластов различными прооксидантными агентами в соответствии с распределением митохондрий с высоким мембранным потенциалом можно было наблюдать три различных паттерна окрашивания: равномерное цитоплазматическое распределение в здоровых клетках, периядерное распределение в поврежденных клетках и отсутствие флуоресценции в мертвых клетках. Эффект пирувата проявлялся в виде защиты от потери мембранного потенциала митохондрий, но не в случае окислительного стресса, вызванного ТГБ. Также пируват способен активировать синтез генов, ответственных за нормализацию свободно-радикальных процессов.

Что касается лактата, его влияние на пролиферативный потенциал фибробластов оказалось прямо противоположным [50]. Показано, что растущий в культуре фибробласт синтезирует и высвобождает лактат, способствуя усилению свободно-радикальных процессов через взаимодействие с хелатными комплексами железа. Взаимосвязь между лактатом и свободными радикалами заключается в реакции Фентона (реакция пероксида водорода с ионами железа), при которой лактат способствует комплексообразованию ионов железа в диапазоне физиологического pH в присутствии перекиси водорода. Увеличение содержания лактата и железа будет способствовать более выраженному протеканию названных процессов.

## ■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, фибробласты представляют собой универсальную биологическую модель для изучения *in vitro* динамических молекулярных регуляторных процессов, лежащих в основе роста и пролиферации клеток, метаболизма и трансдукции внутри- и внеклеточных сигналов. ■

**Конфликт интересов:** все авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2006;6(5):392-401. doi: 10.1038/nrc1877
2. Parsonage G, Filer AD, Haworth O, et al. A stromal address code defined by fibroblasts. *Trends in Immunology*. 2005;26(3):150-156. doi: 10.1016/j.it.2004.11.014
3. Driskell RR, Watt FM. Understanding fibroblast heterogeneity in the skin. *Trends in Cell Biology*. 2015;25(2):92-99. doi: 10.1016/j.tcb.2014.10.001
4. Camelliti P, Borg T, Kohl P. Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovascular Research*. 2005;65(1):40-51. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.08.020
5. Ramos C, Montañó M, García-Alvarez Jorge, et al. Fibroblasts from Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Normal Lungs Differ in Growth Rate, Apoptosis, and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases Expression. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2001;24(5):591-598. doi: 10.1165/ajrcmb.24.5.4333
6. Pascal RR, Kaye GI, Lane MN. Colonic Pericryptal Fibroblast Sheath: Replication, Migration, and Cytodifferentiation of a Mesenchymal Cell System in Adult Tissue. *Gastroenterology*. 1968;54(5):835-851. doi: 10.1016/s0016-5085(68)80155-6
7. Kühl U, Öcalan M, Timpl R, et al. Role of muscle fibroblasts in the deposition of type-IV collagen in the basal lamina of myotubes. *Differentiation*. 1984;28(2):164-172. doi: 10.1111/j.1432-0436.1984.tb00279.x
8. Castor CW, Prince RK, Dorstewitz EL. Characteristics of human "fibroblasts" cultivated in vitro from different anatomical sites. *Laboratory Investigation*. 1962;11:703-713.
9. Rinn JL, Bondre C, Gladstone HB, et al. Anatomic Demarcation by Positional Variation in Fibroblast Gene Expression Programs. *PLoS Genetics*. 2006;2(7). doi: 10.1371/journal.pgen.0020119
10. Rinn JL, Wang JK, Allen N, et al. A dermal HOX transcriptional program regulates site-specific epidermal fate. *Genes & Development*. 2008;22(3):303-307. doi: 10.1101/gad.1610508
11. Houzelstein D, Chéraud Y, Auda-Boucher G, et al. The expression of the homeobox gene *Msx1* reveals two populations of dermal progenitor cells originating from the somites. *Development*. 2000;127(10):2155-2164.

12. Bayat A, Arscott G, Ollier W, et al. Description of site-specific morphology of keloid phenotypes in an Afrocaribbean population. *British Journal of Plastic Surgery*. 2004;57(2):122-133. doi: 10.1016/j.bjps.2003.11.009
13. Wong VW, Rustad KC, Akaishi S, et al. Focal adhesion kinase links mechanical force to skin fibrosis via inflammatory signaling. *Nature Medicine*. 2011;18(1):148-152. doi: 10.1038/nm.2574
14. Paquet-Fifield S, Schlüter H, Li A, et al. A role for pericytes as microenvironmental regulators of human skin tissue regeneration. *Journal of Clinical Investigation*. March 2009. doi: 10.1172/jci38535
15. Dulauroy S, Carlo SED, Langa F, et al. Lineage tracing and genetic ablation of ADAM12 perivascular cells identify a major source of profibrotic cells during acute tissue injury. *Nature Medicine*. 2012;18(8):1262-1270. doi: 10.1038/nm.2848
16. Rodemann HP, Muller GA, Knecht A, et al. Fibroblasts of rabbit kidney in culture. I. Characterization and identification of cell-specific markers. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 1991;261(2). doi: 10.1152/ajprenal.1991.261.2.f283
17. Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte-Fibroblast Interactions in Wound Healing. *Journal of Investigative Dermatology*. 2007;127(5):998-1008. doi: 10.1038/sj.jid.5700786
18. Kessler D, Dethlefsen S, Haase I, et al. Fibroblasts in Mechanically Stressed Collagen Lattices Assume a "Synthetic" Phenotype. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(39):36575-36585. doi: 10.1074/jbc.m101602200
19. Donati G, Proserpio V, Lichtenberger BM, et al. Epidermal Wnt/ $\beta$ -catenin signaling regulates adipocyte differentiation via secretion of adipogenic factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(15). doi: 10.1073/pnas.1312880111
20. Mastrogiannaki M, Lichtenberger BM, Reimer A, et al.  $\beta$ -Catenin Stabilization in Skin Fibroblasts Causes Fibrotic Lesions by Preventing Adipocyte Differentiation of the Reticular Dermis. *Journal of Investigative Dermatology*. 2016;136(6):1130-1142. doi: 10.1016/j.jid.2016.01.036
21. Akhmetshina A, Palumbo K, Dees C, et al. Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF- $\beta$ -mediated fibrosis. *Nature Communications*. 2012;3(1). doi: 10.1038/ncomms1734
22. He W, Dai C, Li Y, Zeng G, Monga SP, Liu Y. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Promotes Renal Interstitial Fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2009;20(4):765-776. doi: 10.1681/asn.2008060566
23. Chilosi M, Poletti V, Zamò A, et al. Aberrant Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway Activation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *The American Journal of Pathology*. 2003;162(5):1495-1502. doi: 10.1016/s0002-9440(10)64282-4
24. Calvo F, Ege N, Grande-Garcia A, et al. Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nature Cell Biology*. 2013;15(6):637-646. doi: 10.1038/ncb2756
25. El-Domyati M, Attia S, Saleh F, et al. Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Experimental Dermatology*. 2002;11(5):398-405. doi: 10.1034/j.1600-0625.2002.110502.x
26. Mine S, Fortunel NO, Pigeon H, Asselineau D. Aging Alters Functionally Human Dermal Papillary Fibroblasts but Not Reticular Fibroblasts: A New View of Skin Morphogenesis and Aging. *PLoS ONE*. 2008;3(12). doi: 10.1371/journal.pone.0004066
27. Rognoni E, Gomez C, Pisco AO, et al. Inhibition of  $\beta$ -catenin signalling in dermal fibroblasts enhances hair follicle regeneration during wound healing. *Development*. 2016;143(14):2522-2535. doi: 10.1242/dev.131797
28. McKay ND, Robinson B, Brodie R, Rooke-Allen N. Glucose transport and metabolism in cultured human skin fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1983;762(2):198-204. doi: 10.1016/0167-4889(83)90071-x
29. Diamond I, Legg A, Schneider JA, Rozengurt E. Glycolysis in quiescent cultures of 3T3 cells. Stimulation by serum, epidermal growth factor, and insulin in intact cells and persistence of the stimulation after cell homogenization. *Journal of biological chemistry*. 1978;253(3):866-871.
30. Schneider JA, Diamond I, Rozengurt E. Glycolysis of quiescent cultures of 3T3 cells. Addition of serum, epidermal growth factor, and insulin increases the activity of phosphofructokinase in a protein synthesis-independent manner. *Journal of biological chemistry*. 1978;253(3):872-877.
31. Antoshechkin A, Tatur V, Perevezentseva O, Maximova L. Determination of human fibroblasts metabolism in vitro by gas chromatography-mass spectrometry of cell-excreted metabolites. *Analytical Biochemistry*. 1988;169(1):33-40. doi: 10.1016/0003-2697(88)90253-9
32. Yu BP. Why calorie restriction would work for human longevity. *Biogerontology*. 2006;7(3):179-182. doi: 10.1007/s10522-006-9009-y
33. Zwierschke W, Mazurek S, Stöckl P, et al. Metabolic analysis of senescent human fibroblasts reveals a role for AMP in cellular senescence. *Biochemical Journal*. 2003;376(2):403-411. doi: 10.1042/bj20030816
34. Zhao L, Jia Y, Yan D, et al. Aging-related changes of triose phosphate isomerase in hippocampus of senescence accelerated mouse and the intervention of acupuncture. *Neuroscience Letters*. 2013;542:59-64. doi: 10.1016/j.neulet.2013.03.002
35. Ziegler DV, Wiley CD, Velarde MC. Mitochondrial effectors of cellular senescence: beyond the free radical theory of aging. *Aging Cell*. 2014;14(1):1-7. doi: 10.1111/ace1.12287
36. Yarian CS, Toroser D, Sohal RS. Aconitase is the main functional target of aging in the citric acid cycle of kidney mitochondria from mice. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2006;127(1):79-84. doi: 10.1016/j.mad.2005.09.028
37. Easlon E, Tsang F, Skinner C, et al. The malate-aspartate NADH shuttle components are novel metabolic longevity regulators required for calorie restriction-mediated life span extension in yeast. *Genes & Development*. 2008;22(7):931-944. doi: 10.1101/gad.1648308
38. Lee S-M, Dho SH, Ju S-K, et al. Cytosolic malate dehydrogenase regulates senescence in human fibroblasts. *Biogerontology*. 2012;13(5):525-536. doi: 10.1007/s10522-012-9397-0
39. Mali Y, Zisapels N. Gain of interaction of ALS-linked G93A superoxide dismutase with cytosolic malate dehydrogenase. *Neurobiology of Disease*. 2008;32(1):133-141. doi: 10.1016/j.nbd.2008.06.010
40. Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Cell*. 2007;130(2):223-233. doi: 10.1016/j.cell.2007.07.003
41. Tan J-K, Jaafar F, Makpol S. Proteomic profiling of senescent human diploid fibroblasts treated with gamma-tocotrienol. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2018;18(1). doi: 10.1186/s12906-018-2383-6
42. Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, et al. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992;89(21):10114-10118. doi: 10.1073/pnas.89.21.10114
43. Birsoy K, Wang T, Chen WW, et al. An Essential Role of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Cell Proliferation Is to Enable Aspartate Synthesis. *Cell*. 2015;162(3):540-551. doi: 10.1016/j.cell.2015.07.016
44. Sullivan LB, Gui DY, Hosios AM, et al. Supporting Aspartate Biosynthesis Is an Essential Function of Respiration in Proliferating Cells. *Cell*. 2015;162(3):552-563. doi: 10.1016/j.cell.2015.07.017
45. Wiley CD, Velarde MC, Lecot P, et al. Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell Metabolism*. 2016;23(2):303-314. doi: 10.1016/j.cmet.2015.11.011
46. Kim JY, Lee SH, Bae I-H, et al. Pyruvate Protects against Cellular Senescence through the Control of Mitochondrial and Lysosomal Function in Dermal Fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology*. 2018;138(12):2522-2530. doi: 10.1016/j.jid.2018.05.033
47. Park S, Kim K, Bae IH, et al. TIMP3 is a CLOCK-dependent diurnal gene that inhibits the expression of UVB-induced inflammatory cytokines in human keratinocytes. *The FASEB Journal*. 2018;32(3):1510-1523. doi: 10.1096/fj.201700693r
48. Fligel SE, Varani J, Datta SC, et al. Collagen Degradation in Aged/Photodamaged Skin In Vivo and After Exposure to Matrix Metalloproteinase-1 In Vitro. *Journal of Investigative Dermatology*. 2003;120(5):842-848. doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12148.x
49. Ramos-Ibeas P, Barandalla M, Colleoni S, Lazzari G. Pyruvate antioxidant roles in human fibroblasts and embryonic stem cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2017;429(1-2):137-150. doi: 10.1007/s11010-017-2942-z
50. Wagner S, Hussain MZ, Hunt TK, et al. Stimulation of fibroblast proliferation by lactate-mediated oxidants. *Wound Repair and Regeneration*. 2004;12(3):368-373. doi: 10.1111/j.1067-1927.2004.012315.x