

## ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ АКТИВАЦИИ АУТОФАГИИ В СТИМУЛЯЦИИ РЕГЕНЕРАЦИИ

© 2013 г. Х. С. Вишнякова<sup>1</sup>, К. В. Попов<sup>1,3</sup>, Е. А. Воротеяк<sup>2</sup>, Р. Р. Файзуллин<sup>2</sup>,  
А. С. Артюхов<sup>2,3</sup>, Е. Е. Егоров<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

<sup>2</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, Москва, 119071

<sup>3</sup>Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный,  
Московская обл., 141700

Поступила в редакцию 26.02.2013 г.

Принята к печати 25.03.2013 г.

Старение клеток человека происходит неравномерно. Стареющие клетки часто нарушают функции соседних клеток, еще не подверженных старению. Стимуляция регенерации тканей может иметь огромное практическое значение в медицине, особенно в гериатрии. Один из возможных способов индукции регенерации состоит в избирательном удалении из ткани стареющих и поврежденных клеток. В ходе изучения механизма действия средства для стимуляции роста волос (бальзам “Satura rosta”) было обнаружено, что препарат не стимулирует пролиферацию различных клеток человека и не повышает их устойчивость к стрессу. Наоборот, в условиях окислительного стресса препарат становился цитотоксическим, хотя и не вызывал увеличения продукции активных форм кислорода. В дальнейшем показано, что препарат повышает транскрипционную активность гена *p53*, активизирует аутофагию и вызывает слабую адипогенную дифференцировку. Обсуждается гипотеза аутофагической регенерации, согласно которой избирательная аутофагическая гибель старых и поврежденных клеток, находящихся в состоянии окислительного стресса, запускает процесс регенерации, который может усиливаться как за счет омолаживающего эффекта усиления аутофагии, так и за счет высвобождения дополнительных метаболитов.

**Ключевые слова:** аутофагия, пролиферация, волосы, облысение, клетки человека, “Satura® Rosta”, регенерация.

POSSIBLE ROLE OF AUTOPHAGY ACTIVATION IN THE STIMULATION OF REGENERATION by K. S. Vishnyakova<sup>1</sup>, K. V. Popov<sup>1,3</sup>, E. A. Vorotelyak<sup>2</sup>, R. R. Faizullin<sup>2</sup>, A. S. Artyukhov<sup>2,3</sup>, Y. E. Yegorov<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup>Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia; \*e-mail: yegorov58@gmail.com; <sup>2</sup>Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia; <sup>3</sup>Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow Region, 141700 Russia). Human cell senescence occurs unevenly and senescent cells in tissues frequently can disturb the function of neighbouring nonsenescent ones. Setting of tissues regeneration can have profound practical significance in medicine, especially in geriatrics. One of the approaches to solve the problem is selective elimination of senescent and damaged cells from the tissues that can be the first phase of the process. During the investigation of the mechanisms of action of the preparation for hair growth stimulation it was discovered that this preparation does not stimulate proliferation of various human cells and does not increase the resistance of cells to stress. On the contrary the preparation becomes cytotoxic at the conditions of oxidative stress although on its own account it did not induce elevation of production of reactive oxygen species. Further investigations showed that the preparation increases transcriptional activity of *p53* gene, increase autophagy level and induce weak adipogenic differentiation. The hypothesis of autophagic regeneration is discussed. As a result, the selective autophagic cell death of any senescent and damaged cells that undergoes oxidative stress triggers the regeneration process which can be increased by both the rejuvenation effect of increased autophagy and at the expense of nutrients released during the autophagy.

**Keywords:** autophagy, proliferation, hair, baldness, human cells, “Satura® Rosta”, regeneration.

DOI: 10.7868/S0026898413050212

\*Эл. почта: yegorov58@gmail.com

Термин аутофагия ввел в 1963 г. лауреат Нобелевской премии Христиан де Дюв. В настоящее время под аутофагией в широком смысле подразумевают процесс доставки цитоплазматического материала в лизосомы [1].

Аутофагия происходит в клетках постоянно и может стимулироваться различными стрессовыми обстоятельствами. В дополнение к гомеостатическим функциям расщепления макромолекул с образованием низкомолекулярных компонентов, используемых клеткой для своих нужд, и очистки клеток от неправильно свернутых белков и поврежденных органелл, аутофагия абсолютно необходима при различных физиологических и патологических состояниях, таких как раннее эмбриональное развитие, деградация белков, способных к агрегации или образовавших сшивки, освобождение от бактерий. Нарушения аутофагии проявляются при различных заболеваниях — от инфекционных до рака и нейродегенерации [2].

Действие аутофагии, направленное против процессов старения, в последние несколько лет стало общепризнанным фактом. Различные воздействия, замедляющие старение, в том числе снижение калорийности питания, не эффективны в условиях подавления аутофагии [3]. Увеличение продолжительности жизни нематод и мух под действием рапамицина, спермидина и ресвератрола частично опосредовано аутофагией [4]. И, наоборот, при искусственном торможении аутофагии развиваются состояния, напоминающие преждевременное, часто сегментарное старение [1]. Показано, что индукция аутофагии способна остановить потерю стволовых клеток волоса и предотвратить тем самым облысение мышей с искусственно повышенной экспрессией гена *Wnt1* [5].

Облысение и поседение считаются признаками старения. В последние годы растет интерес к изучению волосных фолликулов, которые могут стать очень перспективной моделью для изучения старения клеток, тканей и человека в целом.

Рост волос происходит повторяющимися циклами. Цикл начинается стадией роста волосного фолликула — анагеном, далее наступает дегенерация — катаген, переходящая в телоген — стадию покоя [6]. Продолжительность такого цикла у человека может составлять несколько лет. Примечательно, что один и тот же фолликул способен циклично проходить через все эти изменения, возвращаясь к очень интенсивному росту после продолжительного покоя.

Изменения, происходящие в коже, безусловно, должны влиять на рост волоса. Старение кожи сопряжено, в частности, с истончением слоя жировой клетчатки, уменьшением общего содержания клеток и снижением интенсивности метаболизма [7]. Эти изменения постепенно накапливаются и все более затрудняют рост волос. Однако

нарушения, приводящие к облысению и поседению, возникают существенно раньше, чем развивается классический фенотип старой кожи. Возможно, в данном случае мы имеем дело с сегментарным старением, которое захватывает непосредственно волосные фолликулы.

Гипотетически существует множество мишеней, на которые могут воздействовать препараты от облысения. Среди этих препаратов выделяются прежде всего те, которые препятствуют старению и усиливают регенерацию. Недавно было доказано, что избирательная элиминация стареющих клеток способна задерживать развитие ассоциированных со старением патологий [8]. Можно предположить, что средства от облысения могут оказывать общеомолаживающее действие, поэтому мы решили выбрать в качестве объекта изучения бальзам “Satura® Rosta” (БСР). Многие годы БСР используется как эффективное средство от облысения, однако механизм его действия неизвестен. Фактором, способствующим этому выбору, было также согласие представителей производителя предоставить нам активное начало препарата в чистом виде.

В представленной работе мы изучали возможные механизмы действия БСР в культуре клеток.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Препарат “Satura® Rosta”.** БСР с 1989 года производится фирмой “Propico Inc.” (Великобритания) и используется для стимуляции роста волос. За это время БСР показал высокую эффективность в России, США, Великобритании, Израиле и других странах. Препарат имеет многочисленные сертификаты эффективности и соответствия санитарно-гигиеническим нормам для косметических препаратов. Точный состав препарата является коммерческой тайной фирмы “Propico Inc.”. Фирма предоставила нам основу БСР, которая составляет 5% коммерческого препарата, а генеральный директор фирмы доктор Г.В. Зигмонд сообщила, что основа состоит из переработанного экстракта различных водорослей. Эту основу мы использовали для работы с клетками (1%-ный спиртовой раствор).

**Культуры клеток.** Первичные культуры фибробластов кожи человека (штамм 1608) и клеток волосного сосочка (дермальной папиллы) человека любезно предоставлены С.М. Тереховым (МГНЦ РАМН). Клон иммортализованных фибробластов кожи человека получен в результате введения гена *hTERT* в клетки 1608 как описано ранее [9, 10]. Иммортализованные клетки дермальной папиллы (DP-hTERT) получены путем лентивирусной трансфекции первичной культуры геном *hTERT*. Свойства этих клеток описаны в [11]. Первичные кератиноциты человека выделя-

ли из образцов кожи, полученных в ходе пластических операций. Использовали также линию HaCaT иммортализованных неопухолевых кератиноцитов человека. Культуры стромальных клеток костного мозга мышей СЗН получены согласно [12]. Эти клетки культивировали при пониженной (3%) концентрации кислорода в инкубаторе ThermoForma, модель 484 (США).

Клетки, за исключением первичных кератиноцитов, росли в среде DMEM (“ПанЭко”, Россия) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (ЭТС) (“HyClone”), 2 мМ *L*-глутамин (“ПанЭко”) и 40 мкг/мл гентамицина (“ПанЭко”) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Первичные кератиноциты культивировали в среде DMEM : F12 (1 : 1) с добавлением 10% ЭТС, 2 мМ *L*-глутамин, 40 мкг/мл гентамицина, 10 нг/мл эпидермального фактора роста (EGF), 5 мкг/мл инсулина и 0.25 мкг/мл изопротеренола. МТТ-анализ проводили согласно [13]. Клетки и препараты фотографировали с помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа Nikon Diavert (Япония) и камеры Nikon D5000 (Япония). Изображения контрастировали с помощью программы Image J v1.23 (“Scion”).

**Изучение адипогенной дифференцировки.** Культуры стволовых клеток костного мозга культивировали при пониженной (3%) концентрации кислорода в инкубаторе ThermoForma (модель 484). Среду с БСР (0.001%) меняли каждые три–четыре дня. После этого клетки промывали и фиксировали забуференным раствором формальдегида (4%) в течение 10 мин при комнатной температуре. Для выявления липидов клетки окрашивали в течение 10 мин насыщенным в 70%-ном этаноле фильтрованным раствором Судана IV. Окрашенные клетки трижды споласкивали водой и фотографировали. РНК выделяли с помощью набора Total RNA Isolation System (“Promega”). Обратную транскрипцию проводили с использованием набора Oligo(dT)15 cDNA first chain Synthesis kit (“Силекс”, Россия). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили, используя набор JumpStart™ Taq ReadyMix™ kit (“Sigma”) и амплификатор “Терцик” (Россия). Использовали следующие праймеры (ДНК мыши):

ССААТ/энхансер-связывающий белок  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ), (NM\_007678.3) 5'-CATGCCGGGA-GAАСТСТААС-3'/5'-CTGGAGGTGACTGCTC-ATCG-3', длина продукта – 86 п.н.;

Рецептор  $\gamma$ , активируемый пролифераторами пероксисом (PPAR $\gamma$ ) (NM\_008904.2) 5'-GTCCTTC-STCCATGCCTGAC-3'/5'-GACTGCGGTTGTGT-ATGGGA-3', длина продукта 376 п.н.;

глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH), (NM\_008084.2) 5'-GCGAGACCCCACTAАСАТСА-3'/5'-GAGTTGGGATAGGGCCTCTCTT-3', длина продукта – 832 п.н.

**Колониеобразование.** Способность клеток формировать колонии изучали согласно [10]. По 100–200 клеток (подсчет проводили в камере Горяева) высевали в пластиковые чашки Петри диаметром 10 см (“Costar”) в среде DMEM с 15% ЭТС. Через 7 дней клетки фиксировали этанолом и окрашивали метиленовым синим. Подсчитывали число колоний и количество клеток в колониях. На каждый срок просчитывали по три чашки каждого типа. Каждую чашку закрепляли на листе бумаги с нарисованной сеткой. Изображения анализировали с помощью стереомикроскопа МБС-9. На листе бумаги с увеличенным изображением сетки отмечали положение колоний и количество клеток в них. Число клеток округляли по разрядам двоичной системы. Например, если группа клеток состояла из трех или четырех клеток, то в зачет шли четыре клетки, если в группе было от пяти до восьми клеток, то восемь, если от 256 до 512, то 512. Подсчет клеток проводили независимо два человека.

**Оценка уровня аутофагии.** Плазмида pSELECT-GFP-LC3 (“InvivoGen”) содержит ген *LC3B* человека, слитый с геном зеленого флуоресцентного белка (GFP), что позволяет визуализировать процесс образования аутофагосом в реальном времени. Количество и яркость зеленых гранул коррелируют с количеством и размером аутофагосом [14, 15]. Мы трансфицировали клетки 1608-hTERT плазмидами pSELECT-GFP-LC3 и pSELECT-NGFP-zeo и получили клоны стабильных трансфектантов. Плазмиду pSELECT-NGFP-zeo (“InvivoGen”) использовали в качестве контрольной. Эта плазмида содержит ген *GFP* и не содержит *LC3*. Клетки с контрольной плазмидой имеют диффузную зеленую окраску. В цитоплазме клеток, трансфицированных pSELECT-GFP-LC3, выявлены многочисленные точки зеленого цвета, которые появляются при вовлечении белка LC3 в состав аутофагосом. Уровень диффузной зеленой окраски в этих клетках был очень низким.

**Продукция активных форм кислорода.** Уровень активных форм кислорода определяли по степени окисления клетками витального красителя 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеиндиацетата (H<sub>2</sub>DCFDA) [16]. Фибробласты 1608 высевали по 100 000 клеток на лунку в шестилуночные планшеты (“Costar”) за 24 ч до начала эксперимента. БСР (0.001%) добавляли в лунки и инкубировали в течение 30 мин при 37°C. После этого клетки промывали 1 раз теплым раствором Хенкса и добавляли раствор H<sub>2</sub>DCFDA (“Invitrogen”) в растворе Хенкса в концентрации 1 мкМ. Через 20 мин инкубации при 37°C лунки трижды промывали раствором Хенкса, добавляли по 370 мкл диметилсульфоксида (ДМСО, “ПанЭко”) и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. После этого раствор переносили в лунки 96-луночного черного планшета

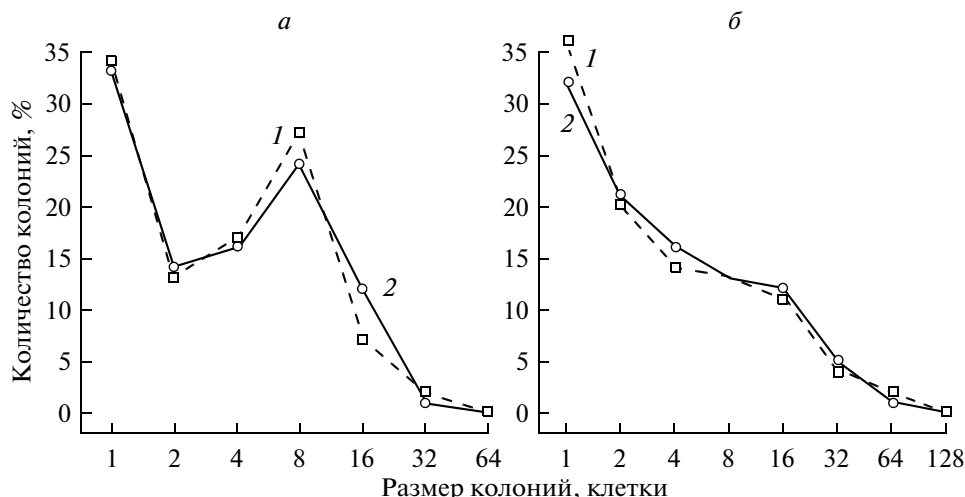


Рис. 1. Влияние БСР на колониюобразование. *а* – клетки DP-hTERT. 1 – DP-hTERT + БСР; 2 – DP-hTERT, контроль. *б* – 1608-hTERT. 1 – 1608-hTERT + БСР; 2 – 1608-hTERT, контроль.

(SPL №30296, Ю. Корея) (по 180 мкл на лунку) и измеряли флуоресценцию на приборе Chameleon V (485/535 нм) (Финляндия).

**Изучение транскрипционной активности белка p53.** Клетки HCT116-CMV5-Waf-ConA-lacZ были любезно предоставлены Д.В. Кочетковым (ИМБ РАН). Это опухолевые клетки человека, экспрессирующие ген *p53* дикого типа и содержащие конструкцию, чувствительную к *p53* [17]. Клетки выращивали в среде DMEM с добавлением 10% ЭТС (“HyClone”), 2 мМ *L*-глутамин (“ПанЭко”) и 40 ед./мл гентамицина при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Клетки рассеивали в 96-луночные планшеты за 24 ч до эксперимента, чтобы к его началу плотность клеток составляла приблизительно 70–80% от монослоя. После этого в часть лунок добавляли алкилирующий агент метилметансульфонат (MMS) в концентрации от 2 до 20 мкг/мл, чтобы индуцировать экспрессию *p53* (положительный контроль). В часть лунок ничего не добавляли (отрицательный контроль), в часть добавляли действующее начало БСР в различных концентрациях (спиртовой раствор, конечная концентрация от 0.0001 до 0.001%). Инкубировали в течение 24 ч. Далее для определения активности β-галактозидазы среду заменяли окрашивающим буфером, содержащим: 2 мг/мл *o*-нитрофенилгалактозида (ONPG), 250 мМ Трис-НСl (рН 7.4), 1 мМ MgCl<sub>2</sub> и 0.02% NP-40, и инкубировали при 37°C в течение 2 ч. Интенсивность окрашивания (оптическую плотность) оценивали количественно на приборе Chameleon V при длине волны 485 нм. Повышение оптической плотности раствора указывает на возрастание транскрипционной активности эндогенного *p53* и может быть количественно сравнено с актива-

цией, вызванной различными индукторами *p53* (в нашем случае с MMS).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

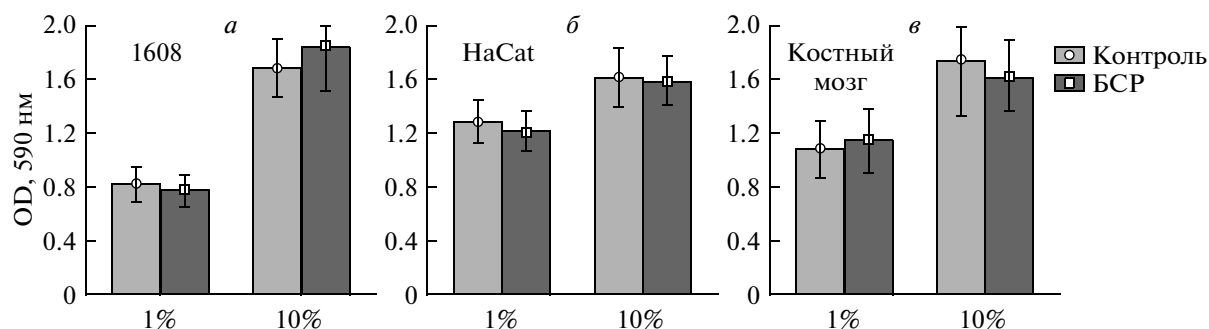
### Влияние БСР на пролиферацию клеток в культуре

Мы проанализировали влияние БСР на пролиферацию клеток. Оказалось, что в концентрации свыше 0.001% БСР тормозит пролиферацию первичных кератиноцитов человека. Препарат действовал также на фибробласты кожи человека (штамм 1608), иммортализованные линии фибробластов (1608-hTERT) и кератиноцитов человека (HaCat), на иммортализованные клетки дермальной папиллы (DP-hTERT).

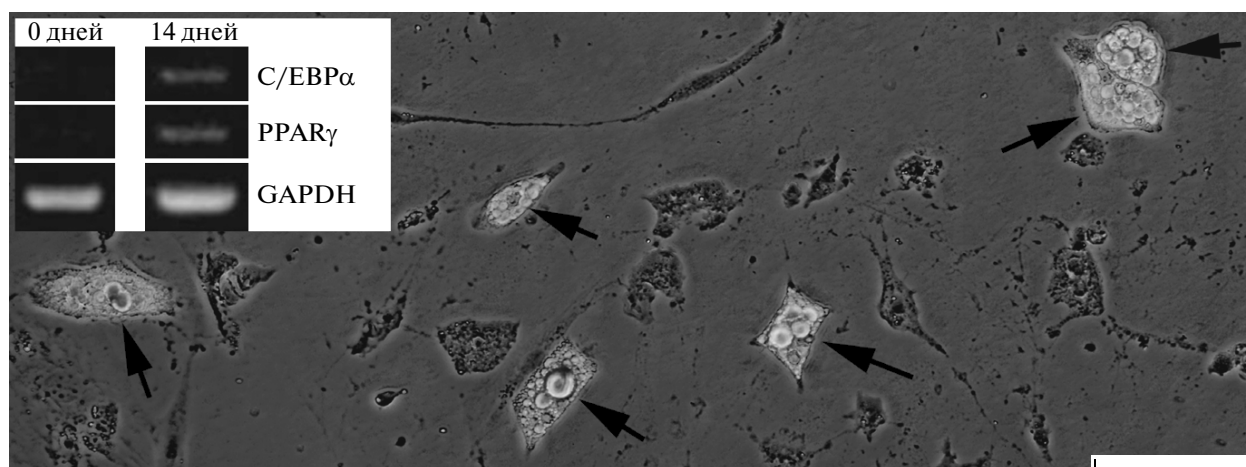
В концентрации 0.001% и ниже БСР не тормозил пролиферацию, но и не стимулировал ее, что показано в тесте колониюобразования (рис. 1) и с помощью ММТ-теста (рис. 2). Мы использовали не только клетки человека, но и стромальные клетки костного мозга мыши.

### Влияние БСР на адипогенную дифференцировку

В опытах на стромальных клетках костного мозга мыши мы заметили, что длительное воздействие БСР вызывает их адипогенную дифференцировку (рис. 3), которая сопровождается специфическими изменениями морфологии клеток и индукцией экспрессии специфических для адипогенеза генов (*PPARγ* и *C/EBPα*). Окрашивание Суданом IV подтвердило, что вакуоли содержат липиды. В отличие от адипогенной дифференцировки, индуцированной специальными средами [18], количество образующихся адипоцитов в этом случае было сравнительно небольшим, и



**Рис. 2.** МТТ-анализ влияния БСР на рост клеток 1608 (а), HaCat (б) и стромальных клеток костного мозга мыши (в). Использовали сыворотку в концентрации 1 и 10%. Разбросы составляют  $\pm 1.96$  стандартного отклонения.



**Рис. 3.** БСР вызывает адипогенную дифференцировку стромальных клеток костного мозга мыши. Время инкубации – 14 дней. Адипоциты указаны стрелками. Фазовый контраст, окраска Суданом IV, цифровое контрастирование. Длина масштабной линейки – 100 мкм. На врезке – появление экспрессии генов, связанных с адипогенной дифференцировкой.

они располагались в основном по отдельности, а не в виде скоплений (рис. 3).

ски снимало действие пероксида водорода (данные не приведены).

#### **Влияние БСР на колониобразование в условиях окислительного стресса**

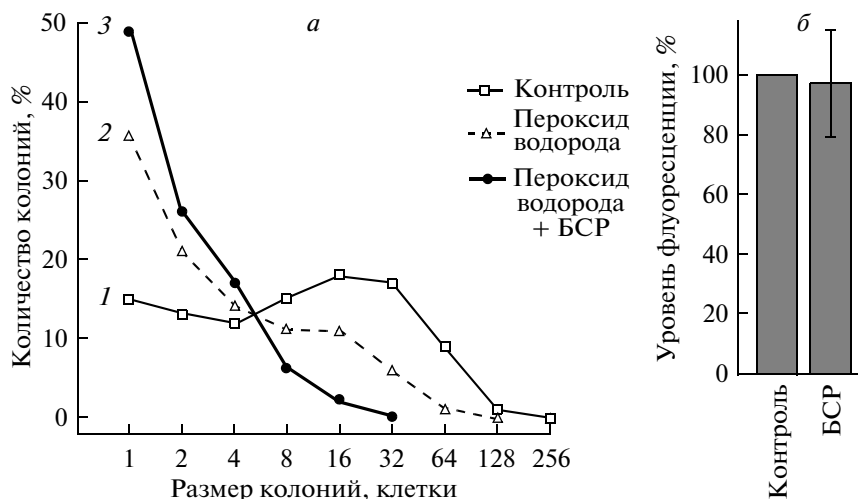
Для объяснения возможных механизмов действия БСР мы проверяли гипотезу о защите клеток от окислительного стресса. С этой целью изучали колониобразование фибробластов 1608 в присутствии БСР и пероксида водорода. Оказалось, что БСР не только не защищает фибробласты от окислительного стресса (80 мкМ пероксида водорода), но, наоборот, действует аддитивно с пероксидом водорода, снижая количество образовавшихся колоний и уменьшая их размер (рис. 4а). Параллельно возрастает доля клеток, вышедших из клеточного цикла (доля колоний, состоящих из одной клетки).

В подобных опытах сам БСР не влияет статистически значимо на колониобразование, а добавление антиоксиданта карнозина (15 мМ) практиче-

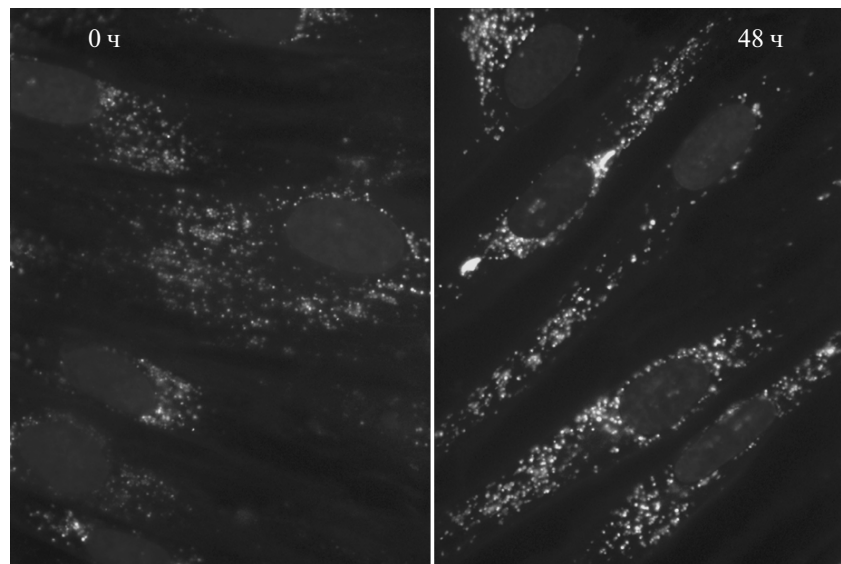
#### **Влияние БСР на способность клеток окислять $H_2DCF-DA$**

Одна из возможных причин, объясняющих аддитивное действие БСР и пероксида водорода, состояла в том, что БСР стимулирует продукцию активных форм кислорода в клетках или сам является окислителем. Проникающий в клетки краситель  $H_2DCFDA$  представляет собой восстановленную форму флуоресцеина, которая служит индикатором активных форм кислорода в клетках. После отщепления ацетатных групп внутриклеточными эстеразами и окисления нефлуоресцентный  $H_2DCFDA$  превращается в сильно флуоресцирующий 2',7'-дихлорофлуоресцеин (DCF).

Установлено, что БСР не влияет статистически значимо на флуоресценцию DCF в фибробластах 1608, т.е. не подтвердилась гипотеза об усилении



**Рис. 4.** Влияние окислительного стресса и БСР на колониобразование фибробластов 1608. *а* – Распределение клеток по размеру колоний; *б* – влияние БСР на окислительную способность фибробластов 1608. 1 – Контроль; 2 – пероксид водорода; 3 – пероксид водорода + БСР. Разбросы составляют  $\pm 1.96$  стандартного отклонения.



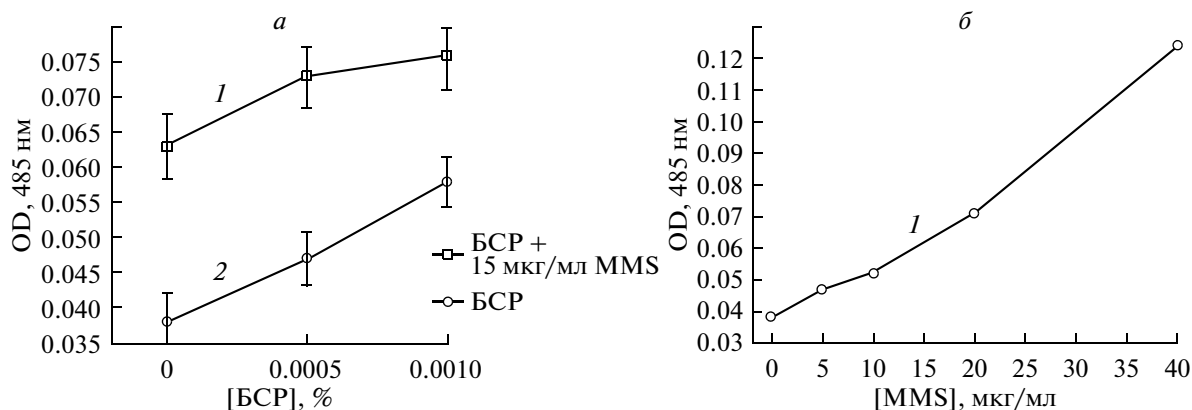
**Рис. 5.** Активация аутофагии в фибробластах 1608-hTERT человека, трансфицированных pSELECT-GFP-LC3, после добавления БСР. На правом снимке (через 48 ч) наблюдается увеличение количества и яркости зеленых гранул во всех клетках.

под его влиянием продукции активных форм кислорода в клетках (рис. 4б).

#### **Влияние БСР на аутофагию**

Клетки, рост которых останавливался в присутствии повышенных концентраций БСР, имели сильно вакуолизированную цитоплазму. Было решено проверить возможность активации аутофагии под влиянием БСР. С этой целью получили клетки, экспрессирующие ген *LC3-GFP*. В процессе аутофагии белок LC3 мигрирует из цитозоля в растущие незрелые аутофагосомы, где его

концентрация заметно увеличивается. Меченный зеленым флуоресцентным белком LC3 способен визуализировать этап роста и созревания аутофагосом. Показано, что уже через 8 ч после введения БСР аутофагия действительно усиливается (использовали БСР в концентрации 0.001%, которая не тормозит пролиферацию даже в длительных опытах). Через 48 ч активация аутофагии становится очевидной (рис. 5). Количество светящихся гранул и их размер значительно увеличиваются. В контрольных клетках, трансфицированных плазмидой pSELECT-NGFP-zeo, характер флуорес-



**Рис. 6.** Влияние БСР на транскрипционную активность p53. *a* – Аддитивность действия БСР и метилметансульфоната (MMS); *б* – калибровочная кривая индукции p53 с помощью метилметансульфоната. 1 – БСР + MMS (15 мкг/мл); 2 – БСР. Разбросы составляют  $\pm 1.96$  стандартного отклонения.

ценции не изменялся в процессе инкубации с БСР. Окраска оставалась диффузной.

#### Влияние БСР на транскрипционную активность белка p53

Один из факторов, способных повышать уровень аутофагии, – транскрипционная активация гена p53 [19, 20]. Для определения транскрипционной активности эндогенного p53 мы использовали клетки, содержащие репортерный ген *lacZ*, кодирующий бактериальную  $\beta$ -галактозидазу, под контролем промотора, совмещенного с p53-зависимым регуляторным элементом. Уровень экспрессии репортерного гена в данной конструкции зависит исключительно от функционального состояния p53, на него не влияет активность соседних генов [17].

Используя клетки НСТ116-CMV5-Waf-ConA-lacZ (опухолевые клетки человека, экспрессирующие ген p53 дикого типа, в которые встроена конструкция, чувствительная к p53), мы показали, что БСР вызывает дозозависимое повышение транскрипционной активности p53 (рис. 6). Уровень подъема активности при использованной нами концентрации БСР (0.001%) соответствовал действию примерно 10 мкг/мл MMS – алкилирующего агента, индуцирующего p53. Растворитель не влиял на индукцию p53. Наблюдали аддитивность действия БСР и MMS (рис. 6a).

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мы предполагали, что средство, способствующее росту волос, вероятнее всего стимулирует пролиферацию клеток. Однако оказалось, что БСР не стимулирует пролиферацию клеток *in vitro*. Мы не смогли выявить стимуляцию пролиферации шести видов клеток, включая первичные и иммортализованные фибробласты человека, первичные и иммортализованные кератиноциты, клетки дер-

мальной папиллы человека и стромальные клетки костного мозга мыши, (рис. 1 и рис. 2).

Другая возможность влиять на клеточный гомеостаз – повышение устойчивости клеток к неблагоприятным воздействиям. Мы проверили самую простую гипотезу, а именно, способность БСР защищать клетки от окислительного стресса. Однако в условиях окислительного стресса БСР вызывал уменьшение количества колоний (прямую гибель клеток), повышал количество клеток, вышедших из клеточного цикла (возросла доля колоний, состоящих из одиночных клеток), снижал пролиферативную способность (уменьшался средний размер колоний) (рис. 4a).

Полученные результаты заставили нас выдвинуть третью гипотезу – аутофагическую.

Старение клеток сопровождается постепенным развитием окислительного стресса, который, как известно, резко усиливает процессы аутофагии, что может вести к аутофагической гибели клетки [21, 22]. Например, после фокальной ишемии в ткани головного мозга развивается окислительный стресс. Подавление процессов аутофагии в этих условиях уменьшает гибель нейронов [23].

БСР способен усиливать аутофагию, поэтому при окислительном стрессе процесс из поддерживающего гомеостаз может становиться разрушительным: в условиях окислительного стресса мы наблюдали гибель клеток (рис. 4a).

Аутофагия часто рассматривается как механизм гибели клеток млекопитающих, однако, по сути, это способ поддержания гомеостаза. Аутофагией называют различные процессы, ведущие к доставке цитоплазматического материала к лизосомам [24]. Разделяют макроаутофагию (собственно аутофагия), микроаутофагию и аутофагию, опосредованную шаперонами. Аутофагия – главный механизм деградации долгоживущих белков и един-

ственный механизм деградации органелл [25]. В настоящее время считается, что аутофагия играет существенную роль в защите от инфекций, в развитии аутоиммунных и воспалительных процессов [26].

Обнаруженное нами усиление аутофагии под действием БСР способно объяснить все наблюдаемые результаты.

Известно, что в процессе старения организма угасание функций стволовых клеток во многом определяется не только изменениями самих стволовых клеток, но и старением их микроокружения. Например, возрастные нарушения функции гемопоэтических стволовых клеток обусловлены, прежде всего, старением их микроокружения — стромальных клеток костного мозга [27]. Сходным образом возрастная саркопения возникает в результате нарушения функционирования мышечных стволовых клеток, вызванного старением их ниши [28]. При развитии облысения клетки волосяных фолликулов также не утрачивают потенциальной способности к росту. Недавно показали, что стволовые клетки волоса полностью сохраняются в толще дермы при андрогенетической алопеции, даже на стадии уже развившегося облысения [29].

Облысение считается одним из маркеров старения. Процесс развивается постепенно и может рассматриваться как сегментарное преждевременное старение. Волосяной фолликул можно представить как гетерогенную систему, которая состоит из интенсивно делящихся эпителиальных клеток, в том числе стволовых, и сравнительно мало делящегося соединительнотканного компонента, состоящего из волосяного сосочка и оболочки самого фолликула. Известно, что эпителиальные клетки менее подвержены процессам старения, чем клетки соединительной ткани [30]. Именно поэтому соединительнотканый компонент фолликула может отвечать за возрастные нарушения роста волоса. Об этом свидетельствует и то, что в его состав входят клетки волосяного сосочка, которые по современным представлениям управляют ростом волоса [31] и опосредуют гормональные изменения, принимающие участие в развитии облысения [32].

Соединительнотканый компонент формирует базальную мембрану — непосредственное микроокружение кератиноцитов. Базальная мембрана управляет ростом любых эпителиальных клеток. Эпителиальные клетки в культуре способны к длительной пролиферации только при наличии базальной мембраны. В ее отсутствие пролиферация тормозится задолго до исчерпания клетками пролиферативного лимита [33].

Если допустить, что в развитии облысения участвует компонент, определяемый старением клеток, то усиление аутофагии способно вызывать

постепенное самопереваривание стареющих и поврежденных клеток, подверженных окислительному стрессу, очищать стареющие клетки от поврежденных белков и органелл, улучшая тем самым их функции и ускоряя обмен белков. Индукция аутофагии приводит к высвобождению высокоэнергетических продуктов, способных ускорить метаболизм соседних клеток, как это происходит при индукции аутофагии в фибробластах, ассоциированных с опухолью [34]. Этот процесс может способствовать восстановлению подкожной жировой клетчатки — депо питательных веществ и энергии, обязательному для начала роста волоса.

Чтобы подействовать на соединительнотканый компонент фолликула БСР должен пройти через эпидермис. Один из путей проникновения этого препарата в организм при поверхностном нанесении — трансфолликулярный перенос [35]. При этом БСР сначала попадает в щель, окружающую волос, и уже из нее перемещается внутрь организма. Недавно показали, что даже мелкие наночастицы (40 нм) при поверхностном нанесении способны этим путем достигать оболочек фолликула [36].

Наиболее вероятно, что компоненты БСР проникают непосредственно по поверхности волоса вглубь кожи, достигая оболочки фолликула и волосяного сосочка. Слой эпителиальных клеток в этом месте наиболее тонкий, в нем нет рогового слоя, который может существенно ограничивать проникновение препарата через эпидермис, поэтому стареющие клетки фолликула (прежде всего соединительнотканной оболочки и волосяного сосочка) должны становиться основной мишенью БСР. Аутофагическое омоложение фолликула (аутофагическая гибель стареющих клеток и повышение скорости обмена стареющих компонентов в остальных клетках) вместе с повышенной в результате этих процессов концентрацией питательных веществ стимулирует рост волоса. В дополнение к действию БСР на волосяные фолликулы нельзя исключать и возможности его воздействия на регенерацию кожи, хотя этот эффект должен быть менее выражен.

Вероятно, что активация аутофагии при действии БСР обусловлена обнаруженным нами повышением транскрипции гена *p53*. Известно, что *p53* индуцирует аутофагию после генотоксического стресса, активируя АМР-киназу и подавляя mTOR [20, 37–39].

Еще одна особенность активации аутофагии — ее способность оказывать противовоспалительное действие, в том числе на кератиноциты человека [40]. Повышение экспрессии *p53* практически всегда сопровождается снижением активности медиатора воспаления NF- $\kappa$ B [41], поэтому БСР должен обладать противовоспалительным действием. Со слов Г.В. Зигмонд, а также по личному опыту ав-



торов (В.Х.С. и Е.Е.Е.) БСР оказывает выраженное противовоспалительное действие при ожогах.

Индукция адипогенеза также согласуется с противовоспалительной активностью БСР. Известно, что провоспалительные цитокины подавляют адипогенез, снижая экспрессию генов *PPAR $\gamma$*  и *C/EBP $\alpha$*  и блокируя действие инсулина. Также TNF- $\alpha$  и IL-1 подавляют адипогенез, активируя каскад TAK1/TAB1/NIK, что, в свою очередь, ведет к подавлению активности *PPAR $\gamma$*  — одного из ключевых факторов адипогенеза [42].

С другой стороны, индометацин и другие нестероидные противовоспалительные средства способны индуцировать адипогенез, активируя *PPAR $\gamma$*  [43, 44].

Таким образом, нами показано, что терапевтическая активность БСР может быть связана с индукцией процессов аутофагии в клетках кожи. Однако для подтверждения этого вывода необходимо провести поиск молекулярных мишеней БСР. С нашей точки зрения, активацию аутофагии можно рассматривать как новый перспективный инструмент терапии патологий, связанных со старением.

Авторы выражают благодарность Д.В. Кочеткову (ИМБ РАН) за предоставленные клетки НСТ116-СМV5-Waf-ConA-lacZ, также фирме “Propico Inc.” и ее руководителям Г.В. Зигмонд и Ю. Зигмонд за всестороннюю поддержку.

Часть экспериментов выполнена на приборной базе ЦКП “ГЕНОМ” ИМБ РАН.

Работа поддержана Министерством образования и науки Российской Федерации (соглашение № 8127) и Российского фонда фундаментальных исследований (13-04-01178).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ravikumar B., Sarkar S., Davies J.E., et al. 2010. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* **90**, 1383–1435.
- Mizushima N., Levine B., Cuervo A.M., Klionsky D.J. 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature.* **451**, 1069–1075.
- Rubinsztein D.C., Marino G., Kroemer G. 2011. Autophagy and aging. *Cell.* **146**, 682–695.
- Morselli E., Galuzzi L., Kepp O., et al. 2009. Autophagy mediates pharmacological lifespan extension by spermidine and resveratrol. *Aging.* **1**, 961–969.
- Castilho R.M., Squarize C.H., Chodosh L.A., et al. 2009. mTOR mediates Wnt-induced epidermal stem cell exhaustion and aging. *Cell Stem Cell.* **5**, 279–289.
- Stenn K.S., Paus R. 2001. Controls of hair follicle cycling. *Physiol. Rev.* **81**, 449–494.
- Fossel M. 2004. Cells, aging, and human disease. Oxford: Oxford Univ. Press.
- Baker D.J., Wijshake T., Tchkonja T., et al. 2011. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature.* **479**, 232–237.
- Егоров Е.Е., Терехов С.М., Вишнякова Х.С., и др. 2003. Теломеризация — способ получения иммортальных клеток человека, сохраняющих нормальные свойства. *Онтогенез.* **34**, 183–192.
- Moldaver M.V., Yegorov Y.E. 2009. Sparse plating increases the heterogeneity of proliferative potential of fibroblasts. *Mech. Ageing Dev.* **130**, 337–342.
- Chermnykh E.S., Vorotelyak E.A., Moldaver M.V., et al. 2010. Dermal papilla cells induce keratinocyte tubulogenesis in culture. *Histochem. Cell Biol.* **133**, 567–576.
- Zhu H., Guo Z. K., Jiang X. X. et al. 2010. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone. *Nat. Protocols.* **5**, 550–560.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* **65**, 55–63.
- Kabaya Y., Mizushima N., Ueno T., et al. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* **19**, 5720–5728.
- Mizushima N., Yamamoto A., Matsui M., et al. 2004. *In vivo* analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol. Biol. Cell.* **15**, 1101–1111.
- Eruslanov E., Kusmartsev S. 2010. Review of cellular ROS generation and antioxidant defense mechanisms and methods for their analysis using H2DCFDA. *Meth. Mol. Biol.* **594**, 57–72.
- Разоренова О.В., Агапова Л.С., Буданов А.В., и др. 2005. Ретровирусные репортерные системы для оценки активности стрессовых сигнальных путей, контролируемых факторами транскрипции p53, HIF-1 и HSF-1. *Молекуляр. биология.* **39**, 286–293.
- Панюхин Н.В., Вишнякова Х.С., Егоров Е.Е. 2008. Влияние парциального давления кислорода на выживаемость, пролиферацию и дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга мыши. *Биол. мембраны.* **25**, 260–267.
- Maiuri M.C., Malik S.A., Morselli E., et al. 2009. Stimulation of autophagy by the p53 target gene Sestrin. *Cell Cycle.* **8**, 1571–1576.
- Tasdemir E., Maiuri M.C., Morselli E., et al. 2008. A dual role of p53 in the control of autophagy. *Autophagy.* **4**, 810–814.
- Chen Y., Gibson S.B. 2008. Is mitochondrial generation of reactive oxygen species a trigger for autophagy? *Autophagy.* **4**, 246–248.
- Chen Y., McMillan-Ward E., Kong J., et al. 2007. Mitochondrial electron-transport-chain inhibitors of complexes I and II induce autophagic cell death mediated by reactive oxygen species. *J. Cell Sci.* **120**, 4155–4166.
- Wen Y.D., Sheng R., Zhang L.S., et al. 2008. Neuronal injury in rat model of permanent focal cerebral ischemia is associated with activation of autophagic and lysosomal pathways. *Autophagy.* **4**, 762–769.
- Marino G., Madeo F., Kroemer G. 2010. Autophagy for tissue homeostasis and neuroprotection. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**, 1–9.

25. Ryan K.M. 2011. p53 and autophagy in cancer: guardian of the genome meets guardian of the proteome. *47*, 44–50.
26. Levine B., Mizushima N., Virgin H.W. 2011. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*. **469**, 323–335.
27. Ju Z., Jiang H., Jaworski M., et al. 2007. Telomere dysfunction induces environmental alterations limiting hematopoietic stem cell function and engraftment. *Nat. Med.* **13**, 742–747.
28. Carlson M.E., Conboy I.M. 2007. Loss of stem cell regenerative capacity within aged niches. *Aging Cell*. **6**, 371–382.
29. Garza L.A., Yang C.-C., Zhao T., et al. 2011. Bald scalp in men with androgenetic alopecia retains hair follicle stem cells but lacks CD200-rich and CD34-positive hair follicle progenitor cells. *J. Clin. Invest.* **121**, 613–622.
30. Stern M.M., Bickenbach J.R. 2007. Epidermal stem cells are resistant to cellular aging. *Aging Cell*. **6**, 439–452.
31. Schmidt-Ullrich R., Paus R. 2005. Molecular principles of hair follicle induction and morphogenesis. *Bioessays*. **27**, 247–261.
32. Inui S., Itami S. 2011. Molecular basis of androgenetic alopecia: from androgen to paracrine mediators through dermal papilla. *J. Dermatol. Sci.* **61**, 1–6.
33. Herbert B.-S., Wright W.E., Shay J.W. 2002. p16ink4a inactivation is not required to immortalize mammary epithelial cells. *Oncogene*. **21**, 7897–7900.
34. Capparelli C., Guido C., Whitaker-Menezes D., et al. 2012. Autophagy and senescence in cancer-associated fibroblasts metabolically supports tumor growth and metastasis via glycolysis and ketone production. *Cell Cycle*. **11**, 2285–2302.
35. Benson H.A. 2005. Transdermal drug delivery: penetration enhancement techniques. *Curr. Drug Delivery*. **2**, 23–33.
36. Vogt A., Combadiere B., Hadam S., et al. 2006. 40 nm, but not 750 or 1.500 nm, nanoparticles enter epidermal CD1a+ cells after transcutaneous application on human skin. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 1316–1322.
37. Maiuri M.C., Malik S.A., Morselli E., et al. 2009. Stimulation of autophagy by the p53 target gene Sestrin2. *Cell Cycle*. **8**, 1571–1576.
38. Feng Z., Zhang H., Levine A.J., Jin S. 2005. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**, 8204–8209.
39. Zhao Y.G., Zhao H., Miao L., et al. 2012. The p53-induced gene *Ei24* is an essential component of the basal autophagy pathway. *J. Biol. Chem.* **287**, 42053–42063.
40. Lee H.M., Shin D.-M., Yuk J.M., et al. 2011. Autophagy negatively regulates keratinocyte inflammatory responses via scaffolding protein p62/SQSTM1. *J. Immunol.* **186**, 1248–1258.
41. Gudkov A.V., Gurova K.V., Komarova E.A. 2011. Inflammation and p53: a tale of two stresses. *Genes Cancer*. **2**, 503–516.
42. Suzawa M., Takada I., Yanagisawa J., et al. 2003. Cytokines suppress adipogenesis and PPARgamma function through the TAK1/TAB1/NIK cascade. *Nat. Cell Biol.* **5**, 224–230.
43. Lehmann J.M., Lenhard J.M., Oliver B.B., et al. 1997. Peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha$  and  $\gamma$  are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Biol. Chem.* **272**, 3406–3410.
44. Kim S., Moustaid-Moussa N. 2000. Secretory, endocrine and autocrine/paracrine function of the adipocyte. *J. Nutr.* **130**, 3110–3115.