

© Коллектив авторов, 2018
УДК 611.77.018.083:612.67

Н. В. Фридман¹, Н. С. Линькова^{1,2}, В. О. Полякова^{3,4}, А. О. Дробинцева^{3,5},
С. В. Трофимова¹, А. В. Дудков¹, В. Х. Хавинсон^{1,6}, И. М. Кветной^{1,3,4}

ЭКСПРЕССИЯ КОЛЛАГЕНА I ТИПА, СИРТУИНА-6 И МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ-1 В ФИБРОБЛАСТАХ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА В ПРОЦЕССЕ ДЛИТЕЛЬНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

¹ Отдел биogerонтологии (руков. — чл.-кор. РАН проф. В. Х. Хавинсон), АНО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии»; ² кафедра «Медицинская физика» (зав. — д-р физ.-мат. наук О. Л. Власова), ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»; ³ отдел патоморфологии (руков. — проф. И. М. Кветной), ФГБНУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д. О. Отта»; ⁴ кафедры патологии (зав. — канд. мед. наук Л. П. Чурилов) и физиологии (зав. — проф. А. Г. Марков), ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»; ⁵ кафедра медицинской биологии (зав. — канд. мед. наук Н. С. Абдукаева), ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет»; ⁶ группа пептидной регуляции старения (руков. — чл.-кор. РАН проф. В. Х. Хавинсон), Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

Цель работы — верификация маркеров старения фибробластов кожи в модели *in vitro*.

Материал и методы. Исследование проведено на культурах фибробластов кожи человека 3-го пассажа («молодые» культуры) и 14-го пассажа («старые культуры»). Методом иммунофлюоресцентной конфокальной микроскопии в культурах фибробластов кожи изучена экспрессия коллагена I типа, сиртуина-6 и матриксной металлопротеиназы-1 (MMP-1).

Результаты. Установлено, что при старении в культурах фибробластов экспрессия коллагена I типа и сиртуина-6 снижается, соответственно, в 3,5 и 3,6 раза, а экспрессия MMP-1 возрастает в 2,5 раза.

Выводы. Возможно, снижение экспрессии сиртуина-6 приводит к нарушению синтеза коллагена I типа и повышению активности MMP-1, что может иметь большое значение для понимания молекулярных механизмов старения кожи.

Ключевые слова: фибробласты кожи человека, старение, сиртуин-6, коллаген I типа, матриксные металлопротеиназы

Возрастные изменения кожи являются проявлением общебиологического процесса старения и подчинены законам фундаментальной геронтологии. С другой стороны — кожа, в отличие от внутренних органов, выполняет барьерную функцию, подвергаясь воздействию агрессивных антропогенных факторов внешней среды, что является одной из возможных причин ее ускоренного старения [1, 4]. В основе возрастных изменений кожи лежит, прежде всего, нарушение микроциркуляции, сопровождающееся застойными явлениями в интерстиции, истончением дермо-эпидермального соединения, уменьшением численности фибробластов, изменением соотношения коллагенов I и III типов в сторону увеличения коллагена I типа, повышением вязкости основного вещества дермы, нарушением

водно-электролитного баланса кожи и усилением трансэпидермальной потери воды [5].

Ранее с использованием метода иммунофлюоресцентной конфокальной микроскопии было изучено влияние белка Ki-67 на процессы пролиферации, пептида CD98hc — на регенерацию и старение, каспазы-3 — на апоптоз, MMP-9 — на ремоделирование межклеточного матрикса в фибробластах кожи при их старении в культуре пассажами [2]. Было установлено, что пептиды снижают синтез MMP-9, повышающийся при старении фибробластов кожи, и увеличивают экспрессию молекул Ki-67, CD98hc, синтез которых при клеточном старении снижается. Пептиды также снижают выраженность каспаза-зависимого апоптоза, повышающегося при старении культур клеток. Однако изученные в рабо-

Сведения об авторах:

Фридман Наталья Владимировна (e-mail: ibg@gerontology.ru), отдел клеточной биологии и патологии, Дудков Александр Владимирович, Трофимова Светлана Владиславовна (e-mail: dr.s.trofimova@gmail.com), Хавинсон Владимир Хацкелевич (e-mail: khavinson@gerontology.ru), АНО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии», 197110, Санкт-Петербург, пр. Динамо, 3

Линькова Наталья Сергеевна (e-mail: miaay@yandex.ru), кафедра «Медицинская физика», ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29

Полякова Виктория Олеговна (e-mail: vopol@yandex.ru), Дробинцева Анна Олеговна (e-mail: anna-flor@mail.ru), лаборатория клеточной биологии, Кветной Игорь Моисеевич (e-mail: igor.kvetnoy@yandex.ru), отдел патоморфологии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д. О. Отта», 199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, 3

те маркеры скорее можно отнести к молекулам, характеризующим функциональную активность фибробластов кожи, чем к маркерам ее возрастной инволюции. Молекулярно-клеточные механизмы старения кожи в настоящее время изучены недостаточно. В связи с этим целью работы явился поиск наиболее информативных маркеров старения фибробластов кожи в модели *in vitro*.

Материал и методы. Фибробласты кожи женщины (1970 г.р.) выделяли из кожи околоушной области, полученной в результате операции по круговой подтяжке лица в клинике «Fijie» (Санкт-Петербург). Получено разрешение локального этического комитета (№ 4/1 от 30.11. 2013 г.) и информированное согласие пациентки на использование материала кожи для проведения данного исследования. Кожу обрабатывали в стерильных условиях раствором диспазы II в концентрации 2,4 ЕД/мл в течение 18 ч при 4 °С, после чего механически отделяли эпидермис от дермы. Для получения суспензии клеток дерму измельчали ножницами до кусочков размером 2–3 мм и помещали в раствор коллагеназы I типа в среде M199. Полученную суспензию клеток осаждали при 1 g в течение 5 мин, после чего осадок клеток ресуспендировали в питательной среде, состоящей из среды M199, 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 1% L-глутамин, 1,5% Нерес-буфера и смеси пенициллина и стрептомицина. Через 5 дней первичная культура достигала монослоя, после чего проводили процедуру ее пересевания. Для снятия клеток с подложки использовали раствор трипсин-версена (Gibco, ES), который добавляли по 500 мкл на флакон, время действия — 3 мин при температуре 37 °С. Открепление клеток от подложки контролировали под микроскопом. Для блокирования ферментативной реакции добавляли полную питательную среду по 5 мл на флакон. Затем суспензию клеток центрифугировали 5 мин при 1000 g. Этот пассаж считали нулевым. Посевная концентрация составила 50 тыс. клеток на 1 мл среды. Пассирование производили через 3 дня на 4-й, когда культура достигала состояния монослоя. Культивирование проводили до 3-го и 14-го пассажа, на котором клетки рассеивали на планшет и производили иммуноцитохимическое окрашивание. В соответствии с рекомендацией Международной ассоциации исследований клеточных культур (Сан-Франциско, 2007), 3-й пассаж расценивали как «молодые» культуры, а 14-й — как «старые». Для проведения пермеабилзации использовали 0,1% Тритон X-100 (БиолоТ, Россия), растворенный в фосфатно-солевом буфере. Затем культуры клеток инкубировали в 1% фосфатно-солевом буфере (рН 7,5) в течение 30 мин для блокировки неспецифического связывания. Инкубацию с первичными антителами проводили в течение 60 мин. В работе использо-

вали первичные моноклональные антитела к коллагену I типа (1:100, Abcam, США), сиртуину-6 (1:200, Abcam, США), MMP-1 (1:150, Abcam, США).

Конфокальную микроскопию клеток проводили в инвертированном конфокальном микроскопе Fluoview CM FV300-IX70 (Olympus, Япония) с использованием апохроматического объектива 606 UPlan. Для спецификации флюоресценции исследуемых маркеров использовали волну возбуждения аргонного лазера 488 нм. Ядра клеток докрашивали реактивом Hoechst 33258 (Sigma, США), в результате чего они флюоресцировали темно-синим цветом. Зеленая или красная флюоресценция показывала экспрессию исследуемых маркеров в результате инкубации со вторичными антителами, конъюгированными с флюорохромом Alexa Fluor 488 (1:1000; Abcam, США) или Alexa Fluor 647 (1:1000, Abcam, США), в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте. Готовые препараты заключали под покровные стекла в монтирующую среду Dako Fluorescent Mounting Medium (Dako, США).

Для анализа полученных результатов использовали отечественное программное обеспечение «ВидеоТест-Морфология 5.2». В каждом случае анализировали 5 полей зрения при увеличении 200. Площадь экспрессии рассчитывали как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными клетками, к общей площади клеток в поле зрения и выражали в процентах. Этот параметр характеризует количество клеток, в которых экспрессируется исследуемый маркер. Также в условных единицах (у. е.) оценивали оптическую плотность экспрессии, отражающую количество исследуемого маркера, синтезируемого в одной клетке.

Статистическую обработку данных проводили в программе «Statistica 6.0», она включала подсчет среднего арифметического, стандартного отклонения и доверительного интервала для каждой выборки. Для анализа вида распределения использовали критерий Шапиро—Уилка. Проверку статистической однородности нескольких выборок производили с использованием непараметрических процедур однофакторного дисперсионного анализа (критерий Крускала—Уоллиса). В случаях, когда дисперсионный анализ выявлял статистически значимую неоднородность нескольких выборок, для последующего выявления неоднородных групп применяли процедуры множественных сравнений с помощью U-критерия Манна—Уитни. Критический уровень достоверности нулевой гипотезы (об отсутствии различий) принимали равным 0,05.

Результаты исследования. Площадь экспрессии коллагена I типа в «старых» культурах фибробластов была в 3,5 раза ниже, чем в «молодых» культурах (таблица). При этом

Сравнительная характеристика экспрессии маркерных белков в фибробластах кожи при их старении *in vitro*

Маркер	Площадь экспрессии, %		Оптическая плотность экспрессии, у. е.	
	«молодые» культуры	«старые» культуры	«молодые» культуры	«старые» культуры
Коллаген I типа	27,22±2,78	7,92±1,51*	34,7±1,8	31,4±2,2
Сиртуин-6	8,54±1,16	2,37±0,31*	20,1±2,3	7,6±0,5*
MMP-1	4,78±0,33	12,04±1,12*	14,5±1,6	22,7±2,1*

* Различия значимы при $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим показателем в «молодых» культурах фибробластов кожи.

оптическая плотность экспрессии коллагена I типа в «молодых» и «старых» культурах фибробластов кожи достоверно не различается (см. таблицу). Полученные данные свидетельствуют о том, что при старении количество фибробластов кожи, в которых происходит активный синтез коллагена I типа, снижается. Однако в тех «старых» фибробластах, в которых синтез коллагена происходит, активность этого процесса остается на уровне «молодых» клеток (рис. 1). На рис. 1, б заметны флюоресцентно идентифицируемые синие ядра клеток, вокруг которых не наблюдается синтеза коллагена (вокруг ядер отсутствует зеленое иммуноокрашивание), тогда как на рис. 1, а во всех клетках хорошо различима реакция на коллаген I типа.

Площадь экспрессии ММР-1 в «старых» культурах фибробластов была в 2,5 раза выше, чем в «молодых» культурах (см. таблицу). Такая же тенденция наблюдалась и для оптической плотности. Оптическая плотность экспрессии ММР-1 в «старых» культурах фибробластов кожи была в 1,6 раза ниже, чем в «молодых» клетках. Полученные данные свидетельствуют о том, что при старении количество фибробластов кожи, в которых синтезируется ММР-1, повышается. Одновременно при старении в культуре в каждом фибробласте синтез ММР-1 возрастает по сравнению с «молодыми» клетками.

Площадь экспрессии сиртуина-6 в «старых» культурах фибробластов была в 3,6 раза ниже,

чем в «молодых» культурах. Такая же тенденция наблюдалась и для оптической плотности экспрессии сиртуина-6: в «старых» культурах фибробластов кожи она была в 2,6 раза ниже, чем в «молодых» клетках. Полученные данные свидетельствуют о том, что при старении количество фибробластов кожи, в которых синтезируется сиртуин-6, снижается. Одновременно в «старых» фибробластах, в которых синтез сиртуина-6 все-таки наблюдается, активность этого процесса снижается по сравнению с «молодыми» фибробластами (рис. 2). На рис. 2, б заметно снижение количества флюоресцентно окрашенных на сиртуин-6 розовых ядер клеток, при этом в тех клетках, в которых розовая иммунофлюоресценция все-таки наблюдается, ее интенсивность (яркость) заметно ниже, чем на рис. 2, а.

Обсуждение полученных данных. Удельный вес коллагена в коже снижается при хронологическом старении и фотостарении. Ранее в ходе морфометрических исследований кожи живота пациентов разных возрастных групп (от 10 до 75 лет) рядом авторов выявлено прогрессивное уменьшение доли соединительной ткани, содержащей коллагеновые волокна, с возрастом пациентов [3]. Эти изменения были более выражены в средней части дермы и достигали существенных величин уже к 50 годам. При этом происходило снижение синтеза коллагена I и III типов. Темпы снижения первого более

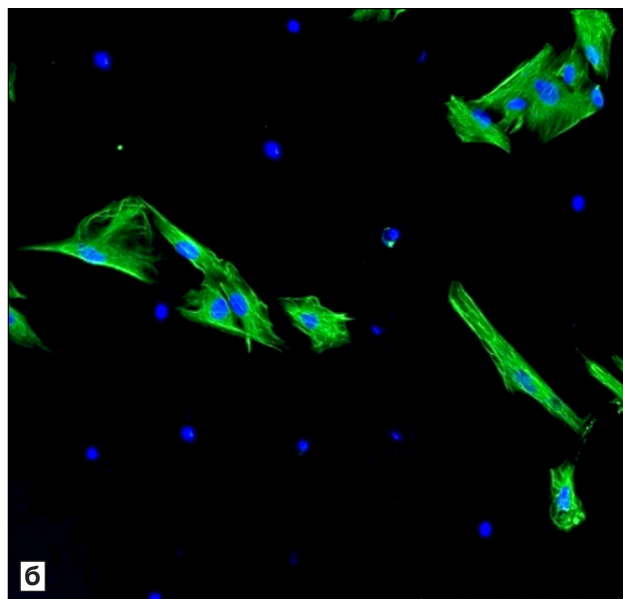
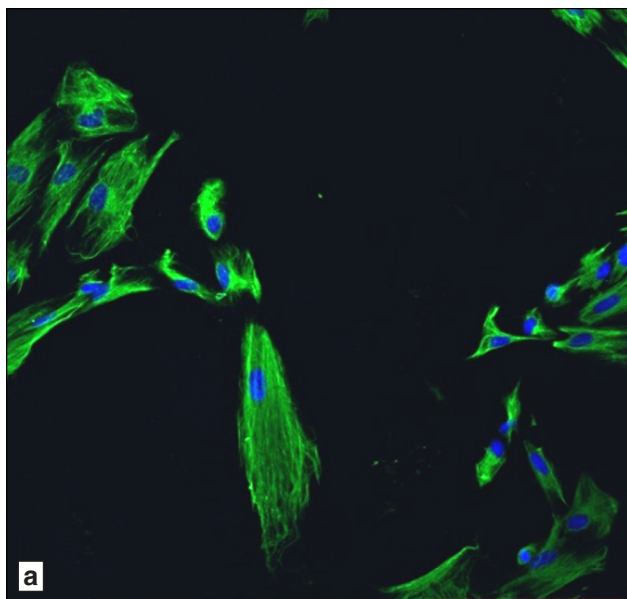


Рис. 1. Экспрессия коллагена I типа в культуре фибробластов кожи.

а — на 3-м пассаже («молодая» культура); б — на 14-м пассаже («старая» культура). Иммунофлюоресцентная конфокальная микроскопия. Ядра клеток выявлены реакцией на Hoechst 33258 (округлые, в центре клеток), в цитоплазме клеток — окрашивание на коллаген I типа. Ув. 200

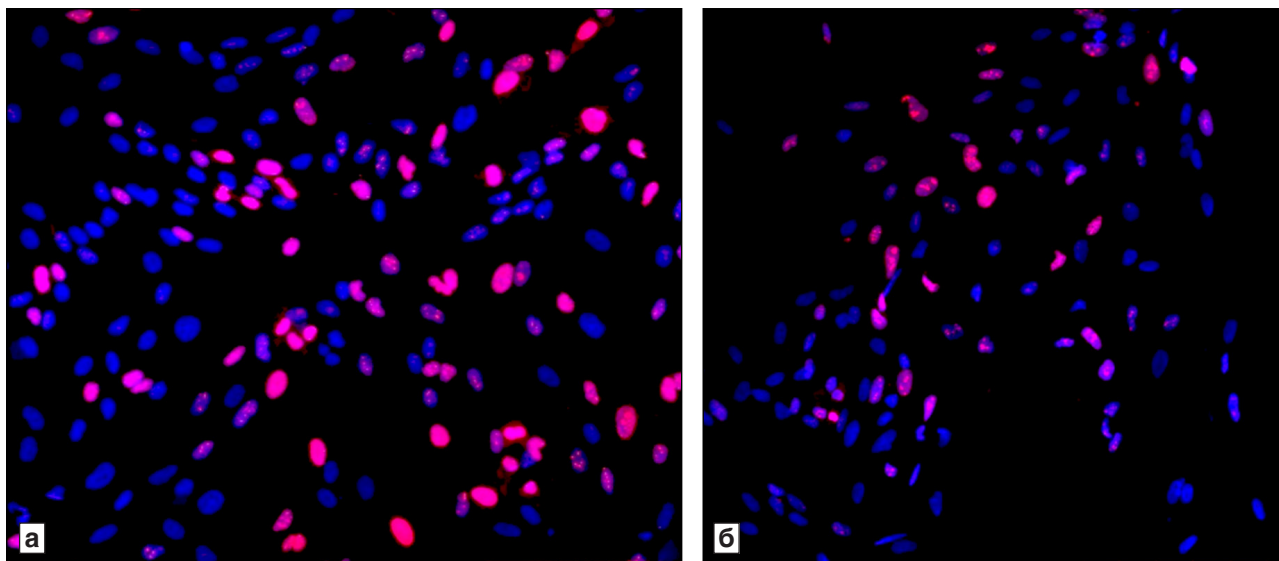


Рис. 2. Экспрессия сиртуина-6 в культуре фибробластов кожи.

а — на 3-м пассаже («молодая» культура); б — на 14-м пассаже («старая» культура). Иммунофлюоресцентная конфокальная микроскопия. Ядра клеток выявлены реакцией на Hoechst 33258 (темно-серое окрашивание), реакция на сиртуин-6 — светло-серые ядра. Ув. 200

значимы, в связи с этим изменялось соотношение коллагена III и I типа (у молодых — 15 и 80% соответственно), коррелирующее с возрастом пациентов [13]. Эти данные согласуются с полученными нами результатами, свидетельствующими о том, что площадь экспрессии коллагена I типа в «старых» культурах фибробластов в 3,5 раза ниже, чем в «молодых» культурах. В 2001 г. J. Varani и соавт. в серии опытов *in vitro* продемонстрировали, что добавление в культуру фибробластов деградированного коллагена подавляет их синтетическую активность, а добавление интактного коллагена не приводит к аналогичному эффекту. Таким образом, аккумуляция с возрастом частично деградированного коллагена является одной из причин снижения синтеза проколлагена фибробластами [12]. Позднее стало очевидным, что процесс клеточного старения фибробластов является следствием снижения их механической стимуляции деградированным коллагеном [8]. На поверхности фибробластов имеются рецепторы (интегрины), обеспечивающие связь актина клеточного цитоскелета с белками основного вещества дермы, в первую очередь коллагеном I типа. Адгезия и взаимное механическое напряжение между фибробластами и коллагеном дермы вовлечены в регуляцию целого ряда клеточных процессов, включая передачу сигналов, экспрессию генов и обмен веществ. Эти процессы регулируют метаболизм фибробластов, в том числе баланс между производством коллагена I типа и его разрушением матриксной металло-

протеиназой (ММР-1), обеспечивают способность клеток к миграции, а также обеспечивают механическое натяжение их цитоскелета и поддержание формы клетки, динамическое напряжение между фибробластами и коллагеновыми волокнами. В нашем исследовании синтез ММР-1 в фибробластах кожи при их старении возрастал в 1,6 раза на фоне снижения синтеза коллагена I типа. Эти данные хорошо согласуются с приведенными выше результатами, полученными другими исследователями, и могут указывать на то, что при старении матриксные металлопротеиназы активно расщепляют коллаген I типа, синтезируемый фибробластами кожи, а синтез нового коллагена замедляется, т.е. происходит дисбаланс этих процессов.

Белок сиртуин-6 (SIRT-6) является критическим регулятором транскрипции стабильности генома, длины теломер, репарации ДНК и метаболического гомеостаза [11]. Опубликованные ранее данные свидетельствуют о том, что повышенная экспрессия гена сиртуина-6 на 15,8% увеличивает продолжительность жизни мышей-самцов [9]. У нокаутных по сиртуину-6 мышей наблюдались фенотип преждевременного старения, тяжелая лимфопения, потеря подкожного жира, остеопения и нарушение обмена веществ. Такие мыши погибали в молодом возрасте [7]. Сиртуин-6 модулирует теломерный хроматин, деацетилируя лизин-9 гистона H3 и предотвращая теломерную дисфункцию и раннее клеточное старение [10]. При изучении фибробластов кожи челове-

ка с молчащим геном сиртуина-6 было показано, что он ингибирует транскрипцию гена, ответственного за синтез коллагена I типа (COL1A1), и повышает секрецию MMP-1 [6]. Как полагают авторы работы, полученные результаты свидетельствуют о том, что нокдаун гена сиртуина-6 может влиять на синтез и деградацию коллагена [6]. Выявленное нами одновременное снижение синтеза коллагена I типа и сиртуина-6 при повышении экспрессии MMP-1 в фибробластах кожи человека при их старении в культуре полностью подтверждает это предположение. Выявленное нами снижение синтеза сиртуина-6 в фибробластах кожи при их старении в культуре может указывать на общеприродные процессы старения клеток кожи и снижение стабильности генома фибробластов.

Выводы. Установлено, что при старении фибробластов кожи человека в культуре в них снижается экспрессия коллагена I типа и сиртуина-6, и одновременно возрастает экспрессия MMP-1. Вероятно, эти процессы тесно связаны между собой. Таким образом, выявленный нами паттерн изменения экспрессии коллагена I типа, сиртуина-6 и MMP-1 может характеризовать процессы старения фибробластов кожи. Поскольку результаты были получены нами на первичной культуре фибробластов кожи одного человека, в дальнейшем планируется получение аналогичных культур от других пациентов с целью уточнения представленных данных.

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования: И. М. К., В. Х. Х.

Сбор и обработка материала: Н. В. Ф., А. О. Д.

Статистическая обработка данных: А. В. Д.

Анализ и интерпретация данных: С. В. Т., В. О. П.

Написание текста: Н. С. Л.

Авторы сообщают об отсутствии в статье конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Газитаева З.И., Чеонг Й., Линькова Н.С., Полякова В.О., Дробинцева А.О. Молекулярная морфология кожи. Оптимизация диагностики старения и изучения пептидных герпротекторов. СПб.: Свое издательство, 2015. 122 с. [Gazitaeva Z.I., Cheong Y., Linkova N.S., Polyakova V.O., Drobintseva A.O. Skin molecular morphology. Optimization of ageing diagnostic and peptide geroprotector investigation. SPb.: Svoe izdatel'stvo, 2015. 122 p. In Russ.].
2. Линькова Н.С., Дробинцева А.О., Орлова О.А., Кузнецова Е.П., Полякова В.О., Кветной И.М., Хавинсон В.Х. Пептидная регуляция функций фибробластов кожи при их старении in vitro // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2016. № 1. С. 40–44 [Linkova N.S., Drobintseva A.O., Orlova O.A., Kuznetsova E.P., Polyakova V.O., Kvetnoy I.M., Khavinson V.Kh. Peptide Regulation of Skin Fibroblasts Functions during Their Aging In vitro // Kletochnye tekhnologii v biologii i meditsine. 2016. № 1. P. 175–178. In Russ.]. Doi 10.1007/s10517-016-3370-x
3. Смирнова Г.О., Мантурова Н.Е., Топчиева Г.В., Ступин В.А. Прогнозирование результатов эстетических вмешательств по механизмам старения кожи и соотношению коллагена I/III типов // Фундаментальные исследования. 2012. № 7. С. 191–194 [Smirnova G.O., Manturova N.E., Topchieva G.V., Stupin V.A. Forecasting of aesthetic intervention results in skin ageing mechanisms and collagens I/III types correlations // Fundamental'nye issledovaniya. 2012. № 7. P. 191–194. In Russ.].
4. Хавинсон В.Х., Линькова Н.С., Куканова Е.О., Орлова О.А. Молекулярные механизмы снижения функциональной активности клеток кожи при ее старении // Успехи физиологических наук. 2016. Т. 47, № 2. С. 62–76 [Khavinson V.Kh., Linkova N.S., Kukanova E.O., Orlova O.A. Molecular Mechanisms of Functional Activity Decreasing of the Skin Cells With Its Aging // Uspekhi fiziologicheskikh nauk. 2016. Vol. 47, № 2. P. 62–76. In Russ.].
5. Шепитько В.И., Ерошенко Г.А., Лисаченко О.Д. Возрастные аспекты строения кожи лица человека // Мир медицины и биологии. 2013. Т. 9, № 3–2 (40). С. 91–97 [Shepitko V.I., Eroshenko G.A., Lisachenko O.D. Age-related aspects of human face skin structure // Mir meditsiny i biologii. 2013. Vol. 9, № 3–2 (40). P. 91–97. In Russ.].
6. Baohua Y., Li L. Effects of SIRT6 silencing on collagen metabolism in human dermal fibroblasts // Cell Biol. Int. 2012. Vol. 36, № 1. P. 105–108.
7. Choi J.E., Mostoslavsky R. Sirtuins, metabolism, and DNA repair // Curr Opin Genet. Dev. 2014. Vol. 26. P. 24–32.
8. Fisher G., Kang S., Varani J., Bata-Csorgo Z., Wan Y., Datta S., Voorhees J.J. Mechanism of photoaging and chronological skin aging // Arch. Dermatol. 2008. Vol. 138. P. 1462–1467.
9. Kanfi Y., Peshti V., Gil R., Naiman S., Nahum L., Levin E., Kronfeld-Schor N., Cohen H.Y. SIRT6 protects against pathological damage caused by diet-induced obesity // Aging Cell. 2010. Vol. 9, № 2. P. 162–173.
10. Michishita E., McCord R.A., Berber E., Kioi M., Padilla-Nash H., Damian M., Cheung P., Kusumoto R., Kawahara T.L., Barrett J.C., Chang H.Y., Bohr V.A., Ried T., Gozani O., Chua K.F. SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin // Nature. 2008. Vol. 452, № 7186. P. 492–496.
11. Sharma A., Diecke S., Zhang W.Y., Lan F., He C., Mordwin N.M., Chua K.F., Wu J.C. The role of SIRT6 protein in aging and reprogramming of human induced pluripotent stem cells // J. Biol. Chem. 2013. Vol. 288, № 25. P. 18439–18447.
12. Varani J., Spearman D., Perone P., Fligel S.E., Datta S.C., Wang Z.Q., Shao Y., Kang S., Fisher G.J., Voorhees J.J. Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen in vitro // Am. J. Pathol. 2001. Vol. 158, № 3. P. 931–942.
13. Yang H., Li J., Wang Q.H. Role of CD14 and TLR4 in type I, type III collagen expression, synthesis and secretion in LPS-induced normal human skin fibroblasts // Int. J. Clin. Exp. Med. 2015. Vol. 8, № 2. P. 2429–2434.

Поступила в редакцию 19.04.2017

Получена после доработки 16.09.2017

TYPE I COLLAGEN, SIRTUIN-6, AND MATRIX METALLOPROTEINASE-1 EXPRESSION IN HUMAN SKIN FIBROBLASTS DURING LONG-TERM CULTIVATION

N. V. Fridman¹, N. S. Lin'kova^{1, 2}, V. O. Polyakova^{3, 4}, A. O. Drobintseva^{3, 5}, S. V. Trofimova¹, A. V. Dudkov¹, V. Kh. Khavinson^{1, 6}, I. M. Kvetnoy^{1, 3, 4}

Objective — to verify the senescence markers of skin fibroblasts in *in vitro* model.

Material and methods. The study was performed on cultured human skin fibroblasts of 3rd passage ("young" cultures) and 14th passage ("old" cultures). The expression of type I collagen, sirtuin-6 and matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) in skin fibroblasts cultures was examined using the method of immunofluorescence confocal microscopy.

Results. It was shown that during cell aging, the expression of type I collagen and sirtuin-6 in skin fibroblasts cultures decreased 3.5 and 3.6 times respectively, while the expression of MMP-1 increased 2.5 times.

Conclusions. It is suggested, that decreasing sirtuin-6 expression results in the disturbances of type I collagen synthesis and increase in MMP-1 expression. This mechanism can play an important role in the understanding of molecular mechanisms of skin aging.

Key words: human skin fibroblasts, aging, sirtuin-6, type I collagen, matrix metalloproteinase

¹ Department of Biogerontology, St. Petersburg Bioregulation and Gerontology Institute, 3, Prospekt Dynamo, St. Petersburg 197110; ² Department of Medical Physics, Institute of Physics, Nanotechnology and Telecommunications, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, 29 Polytechnicheskaya St., St. Petersburg 195251; ³ Department of Pathomorphology, D. O. Ott Scientific-Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproduction, 3, Mendeleyevskaya line, St. Petersburg 199034; ⁴ Departments of Pathology and Physiology, St. Petersburg State University, 7–9 Universitetskaya emb., St. Petersburg 199034; ⁵ Department of Medical Biology, St. Petersburg State Pediatric Medical University, 2, Litovskaya St., St. Petersburg 194100; ⁶ Group of Peptide Regulation of Ageing, RAS I. P. Pavlov Institute of Physiology, 6, Makarova emb., St. Petersburg 199034.