

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 57.085.23

**Морфофункциональная характеристика фибробластов
папиллярного и ретикулярного слоев дермы кожи человека****О.С. Роговая¹ , А.О. Зупник² , Л.Ш. Измайлова¹ , Е.А. Воротеляк¹ **

¹Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова, Российская академия наук,
Россия, 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 26;

²Кафедра клеточной биологии и гистологии, биологический факультет, Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*e-mail: rogovaya26f@gmail.com

Фибробласты дермы являются неоднородной популяцией — среди них выделяют несколько субпопуляций, отличающихся происхождением, анатомической региональной специфичностью и расположением в толще дермы. Мы исследовали некоторые фенотипические и функциональные особенности фибробластов папиллярного и ретикулярного слоев дермы кожи человека. Выявлено, что эффективность выделения популяции ретикулярных фибробластов из первичной культуры увеличивается при снижении уровня кислорода до 5%. Морфометрический анализ культивированных фибробластов изученных популяций, сравнение силы и скорости контракции коллагенового геля и данные об уровнях экспрессии CD90 и CD73, полученные методами проточной цитофлуориметрии, показали существенные различия фибробластов папиллярного и ретикулярного слоев дермы человека височной области.

Ключевые слова: кожа человека, дерма, культивирование клеток, фибробласты, ретикулярные фибробласты, папиллярные фибробласты, контракция коллагенового геля

Кожный покров человека изучают уже на протяжении многих десятков лет, а фибробласты дермы — один из наиболее описанных типов клеток человека. При этом мы до сих пор гораздо лучше представляем функции дермы, чем понимаем механизмы, с помощью которых эта уникальная постоянно самообновляющаяся ткань их осуществляет. Последние несколько лет в связи с появлением новых методов исследований и новых данных о гетерогенном происхождении дермальных фибробластов интерес к ним снова растет [1–3].

Известно, что фибробласты дермы не являются однородной популяцией, в ней выделяют несколько субпопуляций, отличающихся расположением в толще дермы. В папиллярном слое, расположенном непосредственно под эпидермисом, преобладают фибробласты с более высокой ферментативной активностью, чем у клеток, расположенных в более глубоком ретикулярном слое [4]. Различия между папиллярными и ретикулярными субпопуляциями наблюдаются как *in vivo*, так и *in vitro* и выражаются в разном строении внеклеточного матрикса, а также в экспрессии клетками разных маркеров. Выделяют от трех до пяти субпопуляций фибробластов дермы с уникальным фенотипом [5–7].

Недавно было показано, что дермальные фибробласты млекопитающих имеют различное происхождение, которое прослеживается на ранних

эмбриональных этапах развития плода и зависит от анатомического расположения дермы. В частности, у мыши фибробласты кожи лицевой части головы происходят из нервного гребня, тогда как те, что расположены на спине, происходят из дерматомиотомы, а те, что внутри вентральной дермы, — из боковой пластинки мезодермы [8]. Для анализа неоднородности фибробластов дермы используют маркеры, позволяющие различать общие фибробласты-предшественники и фибробласты специфических субпопуляций [8, 9]. Важно отметить, что в процессе эмбрионального развития экспрессия маркеров, специфичных для одной популяции фибробластов, может снижаться, в то время как эти же маркеры могут начать экспрессироваться у другой субпопуляции на следующем этапе [10].

Фибробласты папиллярного слоя взрослой кожи сохраняют повышенную пролиферативную и синтетическую активность в культуре, они синтезируют больше протеогликанов, но меньше коллагена, чем фибробласты ретикулярного слоя [4, 11]. В культуре фибробласты папиллярного слоя имеют веретеновидную форму [6]. Большое влияние на морфофункциональные характеристики папиллярных фибробластов оказывает возраст — чем старше донор, тем меньшая доля клеток имеет высокий пролиферативный потенциал. Также с возрастом ослабевает их функция поддер-

жания ниши для кератиноцитов, формирующих новый эпидермис в момент эпителизации кожных ран. [1]. Фибробласты ретикулярного слоя в культуре обычно сильно распластаны и имеют звездчатую форму [12]. Кроме того, большинство из них экспрессируют гладкомышечный актин (α -SMA). Исследования показали, что в этой популяции повышена экспрессия генов, ответственных за подвижность и сокращение клеток [13].

На наш взгляд, очень интересна концепция анатомической региональной специфичности фибробластов. Даже фибробласты, которые имеют общее эмбриональное происхождение, могут демонстрировать гетерогенность, основанную на их анатомическом расположении и микроокружении [14]. Давно известно, что фибробласты из разных анатомических участков обладают уникальной метаболической активностью и по-разному взаимодействуют с эпителиальными клетками кожи, что они сохраняют «память» о своем положении в теле и остаются способными активировать этот регион-специфический фенотип даже при удалении из своей родной ниши [15, 16]. Изучение популяций фибробластов из разных анатомических участков расширит наши знания о сложности и гетерогенности популяций дермальных фибробластов. Мы исследовали особенности популяций ретикулярных и папиллярных фибробластов из височной области кожи человека.

Материалы и методы

Дермальные фибробласты получали из образцов кожи, полученных в ходе пластических операций от доноров в возрасте 50, 55 и 58 лет, с их информированного согласия, в «Национальном медицинском исследовательском центре радиологии радиологии» Минздрава России. Все манипуляции проводили в стерильных условиях: кожу промывали раствором Хенкса с 1 мкг/мл гентамицина, затем удаляли подкожную жировую клетчатку и отсекали скальпелем ретикулярный слой дермы от папиллярного таким образом, чтобы верхний слой был толщиной не более 0,5 мм. Ретикулярный слой измельчали ножницами до гомогенности, помещали в пробирку в 0,1% раствор коллагеназы I типа и оставляли в термостате при температуре 37 °C на 24 ч. От папиллярного слоя сначала при помощи 0,2%-ного раствора диспазы отделяли эпидермис по стандартной методике [17], а затем дерму ферментировали так же, как это описано выше для ретикулярного слоя дермы. После дезагрегации дермы коллагеназой полученную массу тщательно отмывали от фермента в фосфатно-солевом буфере DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline), после каждой промывки центрифугируя при 1000 об./мин, процедуру промывки повторяли 5 раз. После последнего центрифугирования осадок, представляющий собой фибробласты и не полностью растворившиеся

волокна коллагена, ресуспендировали в культуральной среде: DMEM (Dulbecco's modified Eagles medium; ПанЭко, Россия) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), 1% глутамакса (Gibco, США), 100 ед./мл пенициллина и 0,1 мг/мл стрептомицина (Gibco, США), и без фильтрования высевали в культуральные чашки Петри (Corning, США). Первичную культуру помещали в мультигазовый инкубатор с функцией подавления уровня кислорода до 5% (SANYO, Япония).

Каждые 2–3 сут проводили смену культуральной среды или, при необходимости, пассирование клеток в соотношении 1:3 стандартным способом [18], промывая их раствором версена (ПанЭко, Россия), а затем дезагрегируя их 0,05%-ным раствором трипсина (Gibco, США).

Для морфометрического анализа субпопуляций ретикулярных и папиллярных фибробластов и измерения скорости их роста использовали культуры на члтвертом пассаже. Клетки были посажены в культуральные чашки Петри диаметром 3 см² по 100 тыс. клеток в каждую. Наблюдения и съемку вели на инвертированном микроскопе (OLYMPUS-DP70, Япония) в течение 5 сут. Съемку каждой культуры клеток проводили ежедневно. Фотографии были обработаны в ImageJ.

Для приготовления геля использовали следующую смесь растворов: 665 мкл NaOH (0,34 н), 350 мкл Na₂CO₃ (9,5%), 1 мл десятикратной среды M199 (Gibco, США), 40 мкл глутамакса (Gibco, США), 200 мкл HEPES (Sigma, США) и 8 мл раствора коллагена I типа. В приготовленную смесь немедленно добавляли клеточную суспензию из расчета 150 тыс. клеток на 1 мл геля и быстро заливали его в лунки 24-луночного планшета по 400 мкл геля на лунку. После полного застывания геля в лунки вносили по 500 мкл культуральной среды и при помощи стерильной иглы отделяли гель от пластика, получая, таким образом, свободно плавающий гель. Культивирование проводили в условиях обычного CO₂-инкубатора с процентным содержанием CO₂, равным 5%, в течение 6 сут.

Измерительную фотосъемку для фиксации степени контракции геля проводили цифровой камерой ежедневно в течение 6 сут, изменение диаметра геля в лунках проводили на полученных фотографиях в программе ImageJ.

Иммуноцитохимическое окрашивание полученных культур клеток для выявления экспрессии специфических маркеров дермальных фибробластов проводили в 24-луночных культуральных планшетах. Клетки были посеяны в планшеты за сутки до окрашивания. Фиксацию клеток проводили 4%-ным раствором параформальдегида при комнатной температуре в течение 15 мин. Далее образцы отмывали от фиксатора в растворе DPBS (3 раза по 5 мин), после чего начинали инкубацию

в растворе первичных антител к фибронектину, коллагену I типа, коллагену III типа и виментину. Антитела разводили в соответствии с рекомендациями производителя (таблица) блокирующим раствором состава: DPBS с содержанием сыворотки в концентрации 2% и Тритона X100 в концентрации 0,2%. Инкубацию клеток проводили в течение 10–12 ч при температуре +4 °C в условиях влажной камеры. После этого культуру клеток отмывали от несвязавшихся первичных антител раствором DPBS (3 раза по 10 мин), затем в течение 1 ч при комнатной температуре в условиях абсолютной темноты и влажной камеры образцы инкубировали в растворе вторых антител, конъюгированных с флуорофором. Антитела разводили в соответствии с рекомендациями производителя раствором DPBS (таблица). Перед анализом образцов с помощью флуоресцентного микроскопа клетки отмывали (3 раза по 5 мин) от несвязавшихся вторых антител, чтобы избежать фонового сигнала от флуорофора. Для визуализации ядер клеток проводили окрашивание ДНК-связывающим красителем DAPI в концентрации 1 мкг/мл в течение 10 мин.

Для проточной цитофлуориметрии готовили суспензию клеток с концентрацией не менее $1 \cdot 10^6$ клеток/мл. Клетки снимали с поверхности стандартным методом, производили подсчет в счетчике, отмывали суспензию клеток в DPBS, после чего ее центрифугировали при 1000 об./мин в течение 10 мин. Супернатант сливали, а клеточный осадок ресуспендировали в блокирующем растворе до конечной концентрации $1 \cdot 10^6$ клеток на 100 мкл. Окрашивание клеток проводили по рекомендованной производителями антител методике в пробирках Eppendorf. Клетки окрашивали антителами к антигенам CD90 и CD73 (таблица). Для настройки параметров анализа использовали соответствующие каждому маркеру изотип-контроли, а для исключения автофлуоресценции применяли неокрашенные клетки каждого типа. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре Attune NxT (Thermo Fisher, США).

Клетки были выделены из кожи трех доноров одной возрастной группы и пола (см. начало «Материалов и методов»), все эксперименты

проводили в трех биологических повторах. Для морфометрического анализа съемку каждой культуры клеток проводили в 10 полях зрения (увеличение $\times 200$), всего было проанализировано 1240 клеток. Данные, полученные при обработке фотографий, анализировали в программах Prism 8 (США) и Microsoft Office Excel (США). Для сравнения независимых совокупностей в случаях отсутствия признаков нормального распределения данных использовался U-критерий Манна-Уитни. Для оценки величины контракции геля клетками эксперимент проводили в трех технических повторах, данные, полученные при обработке фотографий, анализировали в программе Microsoft Office Excel с использованием функции подсчета стандартного отклонения.

Результаты и обсуждение

Пониженная концентрация O_2 способствует выживанию фибробластов ретикулярного слоя. Были получены популяции дермальных фибробластов человека из кожи височной области — зоны, где полностью отсутствуют волосы, а кожа отличается тонким слоем ретикулярной дермы и очень тонким и рыхлым слоем подкожной клетчатки. При этом выделение клеток из ретикулярного слоя дермы и культивирование первичной культуры в условиях CO_2 -инкубатора с уровнем CO_2 в камере для культивирования, равным 5%, отличалось низкой эффективностью: полученные после ферментирования единичные клетки плохо прикреплялись к пластику и в большинстве погибали. При культивировании первичной культуры клеток в атмосфере со сниженной до 5% концентрацией O_2 (при этом уровень CO_2 был, как в предыдущем варианте 5%) мы наблюдали медленную миграцию фибробластов ретикулярного слоя из частично дезагрегированной ферментами дермы в течение двух недель. При выделении тотальной популяции фибробластов, без разделения дермы на ретикулярный и папиллярный слои, клетки в первичной культуре прикрепляются к пластику и начинают пролиферировать независимо от уровня кислорода в CO_2 -инкубаторе, так же, как и фибробласты папиллярного слоя дермы.

Таблица

Перечень использованных антител

Название (антиген)	Конъюгат	Животное (Изотип)	Каталожный номер, фирма производитель	Разведение
CD90	PE-Cy5	Мышь (IgG1)	#555597, BD	1:20
CD73	FITC	Мышь (IgG1)	#561254, BD	1:20
Фибронектин	—	Кролик (IgG)	#ab2413, Abcam	1:1000
Коллаген I	—	Кролик (IgG)	#ab21286, Abcam	1:250
Коллаген III	—	Кролик (IgG)	#ab7778, Abcam	1:1000
Виментин	—	Мышь (IgG1)	#ab8978, Abcam	1:250
Вторые детектирующие (к IgG мыши)	Alexa 488	Козел (IgG)	#ab150113, Abcam	1:1000
Вторые детектирующие (к IgG кролика)	Alexa 488	Козел (IgG)	#ab150077, Abcam	1:1000

В результате при культивировании со сниженной концентрацией O_2 культуры ретикулярных фибробластов образовали конфлюэнтный слой через три недели после выделения. Первичные фибробласты папиллярного слоя, так же, как и тотальная культура фибробластов от того же донора в условиях сниженного процента O_2 , образовывали плотный монослой уже через 3–4 сут после выделения. Стоит отметить, что при длительном культивировании различия между фибробластами разных популяций исчезают, что соответствует данным литературы [13], и тогда сравнение данных субпопуляций не имеет смысла. В нашей работе сравнение двух популяций проводили в культурах клеток не позднее шестого пассажа. Обе популяции фибробластов были положительны по основным специфическим для данного типа клеток маркерам: фибронектин, коллагены I и III типов, виментин.

Морфология и динамика роста ретикулярных и папиллярных фибробластов. Было проведено сравнение морфометрических параметров двух популяций фибробластов, полученных из височной области кожи. На прижизненных фото видно,

что папиллярные фибробласты имеют типичную веретеновидную форму, они более вытянуты и обычно имеют по 2–3 отростка (рис. 1А) Ретикулярные фибробласты в большинстве имеют вытянуто-звездчатую форму и более распластаны по субстрату (рис. 1Б). Были измерены площади клеток разных популяций. Здесь и далее, под термином «площадь клетки» мы будем подразумевать площадь культурального субстрата, который покрывает растущая на нем клетка. Сравнивали площади клеток в разреженных культурах (рис. 1В). На фотографии видно, что ретикулярные фибробласты отличаются от папиллярных формой и количеством отростков. Статистический анализ показал, что различия между средней общей площадью клеток в группах значимы, хотя и невелики. В тех же группах клеток было измерено ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО). Оказалось, что ЯЦО папиллярных фибробластов достоверно выше (0,085), чем у ретикулярных (0,066) (рис. 1Г, Д). Это подтверждает данные литературы о том, что папиллярные фибробласты обладают более высокой синтетической активностью, чем ретикулярные.

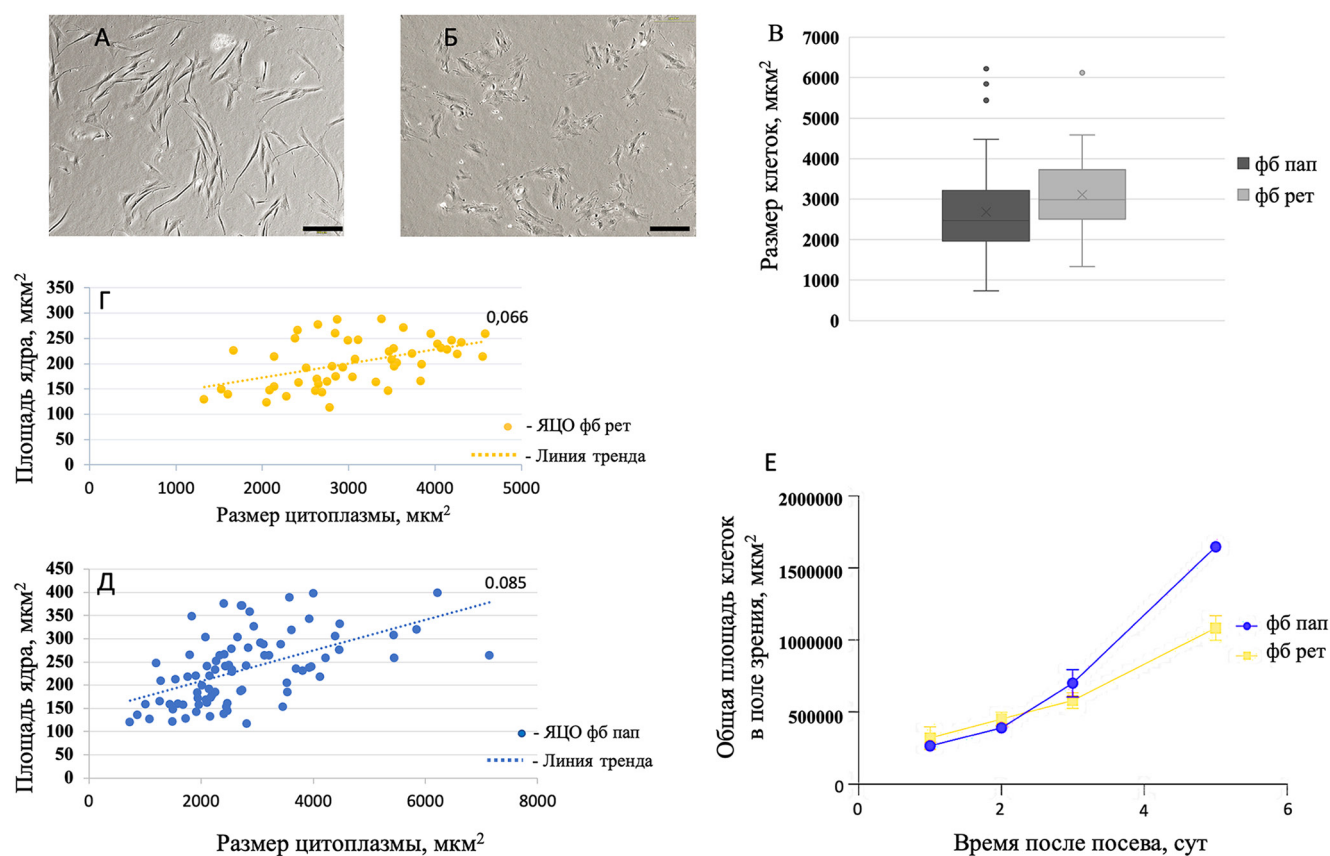


Рис. 1. Особенности морфологии популяций дермальных фибробластов в культуре. На фото папиллярные (А) и ретикулярные (Б) фибробласты четвертого пассажа, фазовый контраст. Результат сравнения площадей клеток культивируемых папиллярных (фб пап) и ретикулярных (фб рет) фибробластов (В), статистически значимое различие по U-критерию Манна-Уитни ($p < 0,05$). Ядерно-цитоплазматические отношения (ЯЦО) двух популяций фибробластов представлены в виде точечных диаграмм, для ретикулярных фибробластов его среднее значение 0,066 (Г), для папиллярных – 0,085 (Д). Скорость образования конфлюэнтного слоя на культуральной поверхности ретикулярными (фб рет) и папиллярными (фб пап) фибробластами, данные на графике представлены как среднее $\pm$ среднеквадратичное отклонение (Е).

Для измерения скорости роста субпопуляций мы оценивали изменение плотности культуры в полях зрения, вплоть до формирования конфлюэнтного монослоя, в случае папиллярных фибробластов — на 5 сут. Скорость роста культуры папиллярных фибробластов была выше, чем у ретикулярных фибробластов (рис. 1Е), при этом в монослое папиллярные клетки достигают более высокой плотности, чем ретикулярные, видимо, отчасти потому, что контактное ингибирование происходит не в полной мере [19, 20].

Сократительная способность фибробластов ретикулярного и папиллярного слоя. Для изучения со-

кратительной способности полученных фибробластов мы использовали стандартную модель контракции флолирующего трехмерного коллагенового геля [21]. Для того, чтобы оценить вклад каждой из исследуемых популяций в процесс сжатия геля, мы исследовали поведение культуры тотальной популяции фибробластов, выделенных из дермы височной области кожи, на раннем (4) и позднем (34) пассажах, а также отдельно — папиллярные и ретикулярные фибробласты четвертого пассажа того же донора. В результате все клетки показали способность к сжатию коллагенового геля в разной степени (рис. 2А). По результатам,

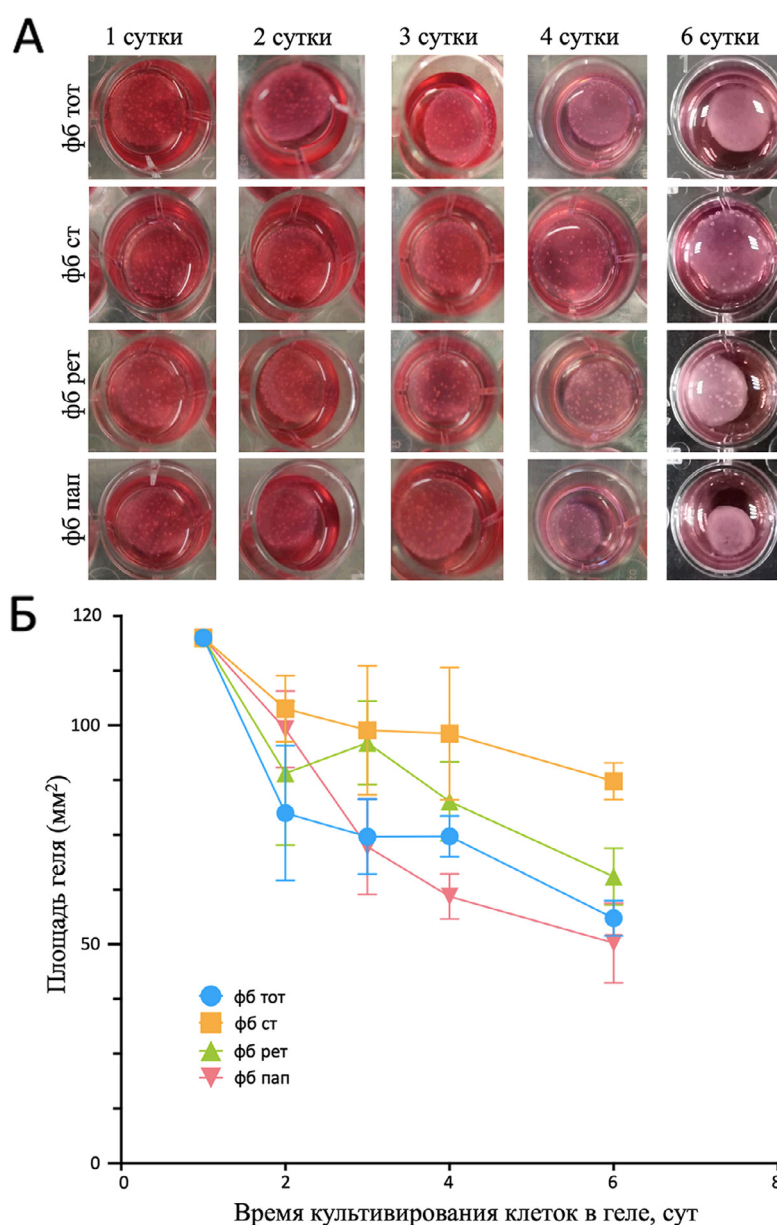


Рис. 2. Сократительная способность фибробластов в модели контракции коллагенового геля. На коллаже из прижизненных фотографий (А) показано, как в результате контракции уменьшается площадь коллагенового геля при культивировании в нем фибробластов в течение 6 сут; сверху вниз на фото: тотальные культуры четвертого пассажа (фб тот), стареющие культуры фибробластов поздних пассажей (фб ст), папиллярные фибробласты пятого пассажа (фб пап) и ретикулярные фибробласты (фб рет) пятого пассажа. Сильнее всего контрактировал гель с тотальной популяцией фибробластов четвертого пассажа (фб тот) и с фибробластами папиллярного слоя пятого пассажа (фб пап), слабее всего — гель со стареющей культурой фибробластов 34 пассажа (фб ст), на графике представлены данные трех биологических повторов как среднее $\pm$ среднеквадратичное отклонение (Б).

представленным на графике, видно, что самой интенсивной сократительной способностью обладают папиллярные фибробласты и фибробласты тотальной популяции раннего пассажа, при этом ретикулярные фибробласты активно сокращают гель только в первые сутки, а слабее всего сокращивали гель фибробласты стареющей культуры 34-го пассажа (рис. 2Б). Таким образом, можно сделать вывод, что сила сжатия геля культурой фибробластов кожи височной области напрямую зависит репликативного возраста культуры.

Особенности экспрессии поверхностных маркеров фибробластами ретикулярного и папиллярного слоя. Имеются данные, что ретикулярные и папиллярные фибробласты сильно различаются по уровню экспрессии некоторых маркеров. Группа исследователей использовала экспрессию CD90 для разделения субпопуляций фибробластов по своей методике, так как по их данным он не экспрессируется в популяции фибробластов, выделяемых из папиллярного слоя [5]. Мы использовали этот маркер для характеристики полученных популяций. Кроме того, мы исследовали уровень экспрессии CD73 (экто-5'-нуклеотидаза – NT5E). Молекула CD73 совместно с CD39 участвует в генерации внеклеточного аденозина. Образование внеклеточных пуриновых нуклеозидов играет роль в регуляции воспаления и тканевого гомеостаза [22]. Отличия в экспрессии аденозина могут свидетельствовать о разном статусе клеток. В результате было показано, что различные популяции фибробластов на 4–6 пассаже, как тотальная фракция фибробластов дермы, так и отдельно фибробласты папиллярного и ретикулярного слоев,

выделенные из дермы височной области кожи человека, положительно по выбранным нами маркерам. Кроме того, было показано, что при длительном культивировании до 35 пассажа фибробласты экспрессировали CD90 и CD73. Чтобы определить, имеются ли различия по экспрессии данных маркеров между исследуемыми популяциями фибробластов, оценили интенсивность медианной флуоресценции (MFI), данные представлены на диаграмме (рис. 3).

Выяснилось, что MFI CD90 выше у ретикулярных фибробластов, чем у папиллярных, в культурах 6 пассажа. Это особенно интересно в связи с недавно вышедшей работой, в которой именно анализ интенсивности экспрессии данного маркера позволил исследователям выделить отдельную популяцию мультипотентных стромальных клеток (МСК), расположенную в основании крипт толстой кишки [23]. Авторы показали, что клетки с высокой (CD90-high) и со средней (CD90-medium) экспрессией данного маркера выполняют разные роли в поддержании гомеостаза эпителия кишечника. Возможно, для исследования фибробластов дермы применимы схожие критерии. Исходя из полученных результатов, мы можем предположить, что CD73 можно использовать для определения ретикулярных и папиллярных субпопуляций фибробластов, так как различия в уровнях экспрессии CD73 в папиллярных и ретикулярных фибробластах аналогичны различиям в уровнях экспрессии CD90. Также мы наблюдали значительное снижение количества CD90 и CD73 в фибробластах на поздних пассажах (рис. 2Б).

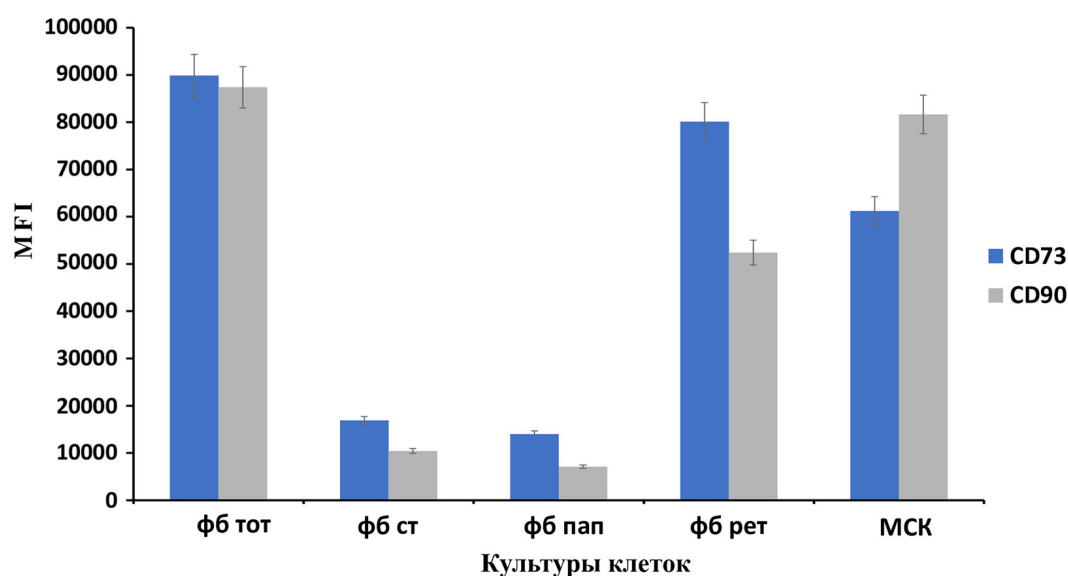


Рис. 3. Результаты проточной цитофлуориметрии культур фибробластов. Все исследуемые популяции фибробластов экспрессировали маркеры CD90 и CD73. Результаты измерения уровней MFI в исследуемых культурах фибробластов показаны на диаграмме, данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение трех биологических повторов. По оси абсцисс слева направо исследуемые культуры: тотальная фракция (фб тот), стареющая культура фибробластов (фб ст) 34-го пассажа, папиллярные фибробласты (фб пап) и ретикулярные фибробласты (фб рет). В качестве положительного контроля специфичности антител были использованы мультипотентные стромальные клетки (МСК).

Таким образом, было показано, что подавление уровня кислорода в атмосфере при культивировании первично выделенных фибробластов кожи человека височной области значительно повышает эффективность выделения жизнеспособных клеток дермы ретикулярного слоя. Скорость роста при культивировании выше у папиллярных фибробластов. Исходя из этого, можно предположить, что при выделении тотальной фракции фибробластов папиллярные фибробласты получают преимущества в силу своей большей активности. Ретикулярные и папиллярные фибробласты из кожи человека височной области ранних пассажей имеют ряд морфологических отличий, что выражается в разной форме клеток и в более высоком ЯЦО у папиллярных фибробластов. Также папиллярные фибробласты показали более высокую способность к сжатию коллагенового геля. Все ис-

следованные нами культуры фибробластов, включая фибробласты поздних пассажей, экспрессируют характерные маркеры фибробластов и маркеры стромальных клеток CD90 и CD73. Однако интенсивность экспрессии CD90 и CD73 в популяции ретикулярных фибробластов выше, чем в популяции папиллярных. При этом самый высокий уровень экспрессии наблюдали в фибробластах ранних пассажей, а самый низкий в клетках стареющей культуры.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-30015). Исследование проведено с соблюдением этических норм работы с культурами клеток человека и одобрено комиссией по биоэтике Института биологии развития имени Н.К. Кольцова. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rippa A.L., Kalabusheva E.P., Vorotelyak E.A. Regeneration of dermis: scarring and cells involved // *Cells*. 2019. Vol. 8. N 6: 607.
2. desJardins-Park H.E., Chinta M.S., Foster D.S., Borrelli M.R., Shen A.H., Wan D.C., Longaker M.T. Fibroblast heterogeneity in and its implications for plastic and reconstructive surgery: A basic science review // *Plast. Reconstr. Surg.* 2020. Vol. 8. N 6: e2927.
3. Zou M.L., Teng Y.Y., Wu J.J., Liu S.Y., Tang X.Y., Jia Y., Chen Z.H., Zhang K.W., Sun Z.L., Li X., Ye J.X., Xu R.S., Yuan F.L. Fibroblasts: Heterogeneous cells with potential in regenerative therapy for scarless wound healing // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. Vol. 20. N 9: 713605.
4. Harper R.A., Grove G. Human skin fibroblasts derived from papillary and reticular dermis: differences in growth potential in vitro // *Science*. 1979. Vol. 204. N 4392. P. 526–527.
5. Korosec A., Frech S., Gesslbauer B., Vierhapper M., Radtke C., Petzelbauer P. Lineage identity and location within the dermis determine the function of papillary and reticular fibroblasts in human skin // *J. Invest. Dermatol.* 2019. Vol. 139. N 2. P. 342–351.
6. Philippeos C., Telerman S.B., Oulès B., Pisco A.O., Shaw T.J., Elgueta R. Spatial and single-cell transcriptional profiling identifies functionally distinct human dermal fibroblast subpopulations // *J. Invest. Dermatol.* 2018. Vol. 138. N 4. P. 811–825.
7. Haydont V., Neiveyans V., Zucchi H., Fortunel N.O., Asselineau D. Genome-wide profiling of adult human papillary and reticular fibroblasts identifies ACAN, Col XI $\alpha 1$, and PSG1 as general biomarkers of dermis ageing, and KANK4 as an exemplary effector of papillary fibroblast ageing, related to contractility // *Mech. Ageing Dev.* 2019. Vol. 177. P. 157–181.
8. Griffin M.F., desJardins-Park H.E., Mascharak S., Borrelli M.R., Longaker M.T. Understanding the impact of fibroblast heterogeneity on skin fibrosis // *Dis. Model. Mech.* 2020. Vol. 13. N 6: dmm044164.
9. Driskell R.R., Lichtenberger B.M., Hoste E., Kretzschmar K., Simons B.D., Charalambous M., Ferron S.R., Herault Y., Pavlovic G., Ferguson-Smith A.C., Watt F.M. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair // *Nature*. 2013. Vol. 504. N 7479. P. 277–281.
10. Driskell R.R., Watt F.M. Understanding fibroblast heterogeneity in the skin // *Trends Cell Biol.* 2015. Vol. 25. N 2. P. 92–99.
11. Schönherr E., Beavan L.A., Hausser H., Kresse H., Culp L.A. Differences in decorin expression by papillary and reticular fibroblasts in vivo and in vitro // *Biochem. J.* 1993. Vol. 290. Pt. 3. P. 893–899.
12. Ambler C. A., Watt F.M. Adult epidermal Notch activity induces dermal accumulation of T cells and neural crest derivatives through upregulation of jagged 1 // *Development*. Vol. 137. N 21. P. 3569–3579.
13. Janson D.G., Saintigny G., van Adrichem A., Mahé C., El Ghalbzouri A. Different gene expression patterns in human papillary and reticular fibroblasts // *J. Invest. Dermatol.* 2012. Vol. 132. N 11. P. 2565–2572.
14. Rinn J.L., Bondre C., Gladstone, H.B., Brown P.O., Chang, H.Y. Anatomic demarcation by positional variation in fibroblast gene expression programs // *PLoS Genet.* Vol. 2. N 7: e119.
15. Jahoda C.A., Horne K.A., Oliver R.F. Induction of hair growth by implantation of cultured dermal papilla cells // *Nature*. 1984. Vol. 311. N 5986. P. 560–562.
16. Jahoda C.A., Reynolds A.J., Oliver R.F. Induction of hair growth in ear wounds by cultured dermal papilla cells // *J. Invest. Dermatol.* 1993. Vol. 101. N 4. P. 584–590.
17. Henrot P., Laurent P., Levionnois E., Leleu D., Pain C., Truchetet M.E., Cario M.A. Method for isolating and culturing skin cells: application to endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, and melanocytes from punch biopsies in systemic sclerosis skin // *Front. Immunol.* 2020. Vol. 7. N 11: 566607.
18. Фреши Р.Ян. Культура животных клеток: практическое руководство. Москва: Бином. Лаб. знаний, 2010. 691 с.
19. Schafer I.A., Pandey M., Ferguson R., Davis B.R. Comparative observation of fibroblasts derived from the pap-

illary and reticular dermis of infants and adults: growth kinetics, packing density at confluence and surface morphology // *Mech. Ageing Dev.* 1985. Vol. 31. N 3. P. 275–293.

20. *Sorrell J.M., Baber M.A., Caplan A.I.* Site-matched papillary and reticular human dermal fibroblasts differ in their release of specific growth factors/cytokines and in their interaction with keratinocytes // *J. Cell. Physiol.* 2004. Vol. 200. N 1. P. 134–145.

21. *Kanta J.* Collagen matrix as a tool in studying fibroblastic cell behavior // *Cell Adh. Migr.* 2015. Vol. 9. N 4. P. 308–316.

22. *Antonoli L., Blandizzi C., Pacher P., Haskó G.* Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine // *Nat. Rev. Cancer.* 2013. Vol. 13 N 12. P. 842–857.

23. *Wu N., Sun H., Zhao X., et al.* MAP3K2-regulated intestinal stromal cells define a distinct stem cell niche // *Nature.* 2021. Vol. 592. N 7855. P. 606–610.

Поступила в редакцию 14.09.2021

После доработки 17.10.2021

Принята в печать 29.10.2021

RESEARCH ARTICLE

Morphofunctional characteristics of fibroblasts of the papillary and reticular layers of the dermis of human skin

O.S. Rogovaya¹ , A.O. Zupnik² , L.Sh. Izmailova¹ , E.A. Vorotelyak¹ 

¹*N.K. Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Vavilova 26 Moscow, 119334, Russia;*

²*Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia*

*e-mail: rogovaya26f@gmail.com

Fibroblasts of the dermis are a heterogeneous population – among them there are several subpopulations that differ in origin, anatomical regional specificity and location in the thickness of the dermis. We investigated some phenotypic and functional features of fibroblasts of the papillary and reticular dermis of human skin. It was found that the introduction of reticular fibroblasts into the primary culture with an oxygen level reduced to 5% increases the efficiency of obtaining this population of fibroblasts. Morphometric analysis of cultured fibroblasts of the studied populations, comparison of the strength and rate of collagen gel contraction, and data on the expression levels of CD90 and CD73 obtained by flow cytometry showed significant differences in fibroblasts of the papillary and reticular layers of the human dermis of the temporal region.

Keywords: *human skin, dermis, cultivation of cells, fibroblasts, reticular fibroblasts, papillary fibroblasts, collagen gel contraction*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number № 21-74-30015.

Сведения об авторах

Роговая Ольга Сергеевна – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории клеточной биологии Института биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН. Тел.: 8-499-135-40-81; e-mail: rogovaya26f@gmail.com; ORCID <http://orcid.org/0000-0003-4251-9372>

Зупник Андрей Олегович – магистрант кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-17-94; e-mail: zu.andrey2011@gmail.com; ORCID <http://orcid.org/0000-0001-8313-4095>

Измайлова Любовь Шамилевна – аспирант лаборатории клеточной биологии Института биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН. Тел.: 8-499-135-40-81; e-mail: luba.ranaway-94@yandex.ru; ORCID <http://orcid.org/0000-0002-7739-9369>

Воротеляк Екатерина Андреевна – докт. биол. наук, чл.-корр. РАН, зав. лабораторией клеточной биологии Института биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН. Тел.: 8-499-135-40-81; e-mail: vorotelyak@yandex.ru; ORCID <http://orcid.org/0000-0001-5405-0212>