

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092

Абрамян Ш.М.¹, Кандалова О.В.², Волкова Е.Н.¹, Найденов Н.П.¹, Морозов С.Г.¹

Измерение уровня экспрессии вторичных мессенджеров апоптоза в клетках кожи, выделенных из операционного материала при проведении операции лифтинга лица у пациенток разных возрастных групп

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»,

125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8;

²ФГБУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова»,

127473, Москва, ул. Делегатская, 22, стр. 1

Цель работы – измерение уровня экспрессии проапоптотных сигнальных белков Bad, Bax, Bak, Bim, Bid, 14-3-3, а также каспазы-2 и каспазы-9, в клетках кожи и подкожно-жировой ткани, выделенных из операционного материала при операции по коррекции контуров лица. **Методика.** Из операционного материала в самом начале операции (контрольные образцы), а также после её завершения (опытные образцы), были выделены образцы кожи и подкожной клетчатки, из которых были изолированы жизнеспособные клетки. Эти клетки обрабатывали антителами к сигнальным молекулам апоптоза и затем анализировали на проточном цитометре FACSCalibur по программе SimulSet.

Результаты. По сравнению с контрольными образцами, не подвергавшимися ишемии, клетки кожи, выделенные по завершению операции, подвергались действию ишемии / реперфузии, то есть в них оказались активированы сигналы апоптоза, ассоциированного с митохондриями, на что указывает повышение экспрессии проапоптотных белков и их фосфорилированных форм. Уровень экспрессии этих белков был проанализирован с позиций возраста пациенток. Было установлено, что в возрастной группе старше 50 лет все показатели статистически значимо превышали норму, а также соответствующие показатели пациенток более молодого возраста.

Заключение. Полученные данные указывают на активацию сигнальных путей апоптоза, ассоциированного с митохондриями, в клетках кожи и подкожно-жировой ткани, выделенных из операционного материала при коррекции контуров лица, а также на усугубление процесса апоптоза по мере старения организма пациента.

Ключевые слова: лифтинг лица; апоптоз; клетки кожи; сигнальные молекулы

Для цитирования: Абрамян Ш.М., Кандалова О.В., Волкова Е.Н., Найденов Н.П., Морозов С.Г. Измерение уровня экспрессии вторичных мессенджеров апоптоза в клетках кожи, выделенных из операционного материала при проведении операции лифтинга лица у пациенток разных возрастных групп. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(4): 107-114.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.107-114

Участие авторов: концепция и дизайн работы – Морозов С.Г.; концепция и дизайн работы, сбор и обработка первичных данных статистический анализ, иллюстрации и построение графиков, написание текста статьи Абрамян Ш.М.; статистический анализ, иллюстрации и построение графиков – Найденов Н.П.; сбор и обработка первичных данных – Волкова Е.Н.; сбор и обработка данных, редактирование статьи – Кандалова О.В. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Морозов Сергей Георгиевич, e-mail: sergey_moroz@list.ru

Финансирование. Работа выполнялась в рамках госзадания.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 09.10.2022

Принята к печати 27.10.2022

Опубликована 15.12.2022

Abramian Sh.M.¹, Kandalova O.V.², Volkova E.N.¹, Naidenov N.P.¹, Morozov S.G.¹**Measurement of apoptotic second messenger expression in skin cells isolated from tissue collected during face lifting surgery in patients of different age groups**¹Institute of General Pathology and Pathophysiology,
8 Baltiyskaya St., Moscow, 125315, Russian Federation;²Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry,
20/1 Delegatskaya St., Moscow, 127473, Russian Federation

The **aim** of this work was to measure the expression of proapoptotic signaling proteins, Bad, Bax, Bak, Bim, Bid, and 14-3-3, as well as caspase-2 and caspase-9, in skin cells and subcutaneous adipose tissue isolated from tissues collected during face lifting surgery.

Methods. Skin and subcutaneous tissue samples were isolated at the very beginning of the operation and after its completion; then viable cells were isolated from the samples. The cells were stained with antibodies to apoptosis signaling molecules and analyzed with a FACSCalibur flow cytometer using SimulSet software. Statistical analysis was performed with BIostat software.

Results. Skin cells isolated at the end of the operation were more severely damaged compared with control samples (cells isolated at the very beginning of the operation and not subjected to ischemia). In the cells obtained after the surgery, effects of ischemia/reperfusion were observed. The cells isolated after the face lifting surgery contained activated apoptotic signals associated with mitochondria, as indicated by increased expression of proapoptotic proteins and their phosphorylated forms. The proapoptotic protein expression was analyzed based on the patients' age. It was found that in the group older than 50 years, all indexes significantly exceeded both the normal range and respective values in younger female patients.

Conclusion. The study results showed activation of proapoptotic signaling pathways associated with mitochondria in skin cells and subcutaneous adipose tissue isolated during face lifting surgery along with aggravation of apoptosis as the patient ages.

Keywords: face lifting; apoptosis; skin cells; signaling molecules

For citation: Abramian Sh.M., Kandalova O.V., Volkova E.N., Naidenov N.P., Morozov S.G. Measurement of apoptotic second messenger expression in skin cells isolated from tissue collected during face lifting surgery in patients of different age groups. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66 (4): 107-114. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.107-114

Author's contribution: concept and design of the work – Morozov S.G.; concept and design of the work, collection and processing of primary data, statistical analysis, illustrations and graph construction, article text writing – Abramyan Sh.M.; statistical analysis, illustrations and graph construction – Naidenov N.P.; collection and processing of primary data – Volkova E.N.; collection and processing of data, editing of the article – Kandalova O.V. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all co-authors.

For correspondence: *Sergey G. Morozov*, Doctor of Medical Sciences, Professor, Director of the Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 8 Baltiyskaya St., Moscow, 125315, Russian Federation, e-mail: sergey_moroz@list.ru

Information about the authors:Morozov S.G., <https://orcid.org/0000-0001-5822-5729>Kandalova O.V., <https://orcid.org/0000-0003-0723-2800>**Financing.** The study was a part of a State Assignment.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 09.10.2022

Accepted 27.10.2022

Published 15.12.2022

Введение

В хирургической практике актуальна проблема ишемии/реперфузии (I/R), что связано с гибелью клеток и развитием полиорганной недостаточности при восстановлении кровотока в тканях обескровленных в течение длительного периода во время операции. Именно восстановление кровотока обуславливает развитие негативных процессов в клетках не только в зоне оперативного вмешательства, но и в других органах и тка-

нях. Изучению особенностей I/R и молекулярных событий, связанных с I/R при операции по коррекции контуров лица посвящена данная работа. Известно, что основную долю негативных эффектов, связанных с I/R, вносят митохондрии. Окислительный стресс является триггером апоптоза, связанного с митохондриями [1, 2]. Нарушение функциональной активности митохондрий, снижение мембранного потенциала митохондрий, приводит к повышению уровня реактивных форм кислорода в клетке [3], а также нарушению сиг-

налов, связанных с кальцием. Следует отметить, что с кальциевыми сигналами ассоциированы антиапоптотные белки Bcl-2 и Bcl-xL [4].

В регуляции апоптоза, связанного с митохондриями, участвуют как проапоптотные белки, так и антиапоптотные, большинство из них принадлежат семейству белков Bcl-2 (B-cell lymphoma-2), которые регулируют пермеабиллизацию внешней мембраны митохондрий, формирование пор и выход некоторых проапоптотных белков в экстраклеточный матрикс (ЕСМ) [5]. Проапоптотные мультидоменные белки Bax и Bak семейства Bcl-2 участвуют в пермеабиллизации внешней мембраны митохондрий при митохондриальном типе апоптоза. Белок Bax формирует олигомеры и в таком виде перемещается из цитозоля к мембране митохондрий, взаимодействует с белками, формирующими поры во внешней мембране митохондрий, что приводит к выходу ряда белков, в том числе цитохрома *c*, в цитозоль и активации каспазы-9. Вне апоптоза белки Bax и Bak предотвращают активацию программы старения клеток [6].

В семейство Bcl-2, группу “BH3 domain-only”, входят проапоптотные белки Bad, Bid, Bim/Bod, Bik, Hrk, Noxa, имеющие домен BH3, но не имеющие домена BH1 или домена BH2. Белок Bad вызывает диссоциацию комплекса белков Bax с Bcl-2 или Bcl-xL. При активации факторов, способствующих выживанию клетки, белок Bad фосфорилируется у человека по Ser75 (у мышей по Ser112 и Ser136). Это обуславливает связывание белка Bad с белками 14-3-3, что препятствует ассоциации Bad с Bcl-2 или Bcl-xL. Необходимо отметить, что, в отличие от опухолевых клеток, в нормальных клетках кожи проапоптотные стимулы вызывают активации белка Bad, которая не приводит к перемещению белка Bax из цитозоля и не вызывает диссоциации комплекса белков Bax /Bcl-2. Более того, активация Bad в нормальных фибробластах блокирует апоптоз [7].

Белок Bid локализуется в цитозоле в виде неактивного предшественника, он может взаимодействовать как с Bcl-2, так и с Bax. При активации Fas рецептора и проведении сигнала апоптоза Bid он расщепляется каспазой-8 по Asp60 с формированием tBid, который перемещается к внешней мембране митохондрий. tBid вызывает конформационные изменения белка Bak (последний является членом семейства Bcl-2 и локализуется на внешней мембране митохондрий), что приводит к формированию каналов в мембране митохондрий. Далее это приводит к выходу цитохрома *c*, формированию комплекса с Araf-1 и каспазой-9 и активации последней. При воспалении в расщеплении белка Bid

также участвует каспаза-1, что сопрягает сигнальные пути апоптоза и воспаления [8].

Белок Bim играет ключевую роль в апоптозе лимфоцитов, он имеет три изоформы, образуемые при альтернативном сплайсинге – Bim(EL), Bim(L), and Bim(S), последняя является наиболее цитотоксичной формой. Активность изоформ Bim(EL) и Bim(L) при апоптозе регулируется путем их фосфорилирования. Bim может взаимодействовать с белками Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w, Bfl-1, BHRF-1. При стрессе при активации сигналов, связанных с JNK1 и ERK 1/2, Bim фосфорилируется по Ser69 и диссоциирует из комплекса с динеином, перемещается к внешней мембране митохондрий и регулирует формирование пор, обуславливающих выход проапоптотных белков в ЕСМ [9].

Особый интерес представляет семейство белков 14-3-3, которые регулируют множество межбелковых взаимодействий в клетке. При активации сигналов апоптоза белок Bad взаимодействует с белком 14-3-3 в зависимости от уровня его фосфорилирования: нефосфорилированный Bad не связывается с 14-3-3 и может перемещаться к митохондриям, где активирует сигналы апоптоза, тогда как фосфорилированная форма Bad связана с белком 14-3-3, образует стабильный комплекс и препятствует сигналам апоптоза [10]. Кроме того, белки семейства 14-3-3 регулируют кальций-зависимые калиевые каналы при стрессе [11].

К сигнальным белкам апоптоза можно отнести и каспазы, но эти протеазы выполняют не только сигнальную роль, но, прежде всего, структурную, так как именно они расщепляют компоненты клетки и способствуют формированию апоптотных телец. Для сигналов апоптоза, связанных с митохондриями, наиболее важны каспаза-2 и каспаза-9, которые активируются при выходе проапоптотных белков в ЕСМ при открытии пор во внешней мембране митохондрий [12, 13].

Цель работы – измерение экспрессии проапоптотных сигнальных белков Bad, Bax, Bak, Bim, Bid, 14-3-3, а также каспазы-2 и каспазы-9, в клетках кожи и подкожно-жировой ткани, выделенных из операционного материала при операции по коррекции контуров лица.

Методика

В работе использован биологический материал 124 женщин (21 – 64 лет), которым в Клинике пластической и эстетической хирургии «Фрау Клиник 1» (Москва) были проведены операции по коррекции контура лица (лифтинг), все операции были выполнены по единому протоколу. Пациентки были разделены на группы по возрасту, все подписывали утвержденную Ученым Советом ФГБНУ «НИИОПП»

и одобренную Дирекцией клиники *форму информированного согласия* на участие в исследовании, а также разрешение на анонимное использование биологического материала пациенток. Протокол исследования одобрен Этическими Комиссиями ФГБНУ «НИ-ИОПП» и клиники. Работа проведена согласно Хельсинской Декларации по соблюдению прав человека. Все исследования выполнялись по международным правилам работы с биоматериалом людей.

Критерии исключения пациенток из исследования: острые бактериальные и вирусные инфекции, сахарный диабет, системные, аллергические, воспалительные или онкологические заболевания, беременность или приём противозачаточных препаратов.

При проведении операции по коррекции лица сразу после фиксации сосудов подкожной клетчатки были выделены фрагменты кожи и подкожной клетчатки используемые в качестве контроля отсутствия ишемии (контрольные образцы). После проведения операции лифтинга лица и снятия зажимов с сосудов также были выделены кусочки кожи и подкожной клетчатки (экспериментальные образцы) для исследования эффекта ишемии/реперфузии. Таким образом, для каждого экспериментального образца существовал свой внутренний контроль. Размер каждого из выделенных фрагментов составлял 2x1x0,5см. Образцы промывали в стерильном фосфатном буфере (PBS, *Phosphate Buffered Saline*, Sigma) и переносили в стерильную пробирку со средой RPMI-1640 (Flow) с 15% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (Flow) и оставляли при температуре +4 °C до окончания операции. Клетки из образцов тканей были выделены по методике [14], клетки получали при воздействии коллагеназы II (Sigma-Aldrich) в конечной концентрации [0,5мг/мл] при +37 °C и 5% CO₂ в течение 40 мин при непрерывном мягком перемешивании на шейкере. Затем к клеткам добавляли ЭДТА (10 mM) и лизирующий буфер для эритроцитов (Becton Dickinson, США). Суспензию клеток отмывали дважды в полной среде RPMI-1640 с 10 mM буфера HEPES (Sigma), 2 mM L-глутамин (Sigma) и 15% ЭТС (Flow) с центрифугированием 10 мин при 200 g и 25 °C. К осадку добавляли полную среду RPMI-1640 + 15% ЭТС, инкубировали при 37 °C и 5% CO₂ 2 ч для восстановления клеток. Процент живых клеток определяли по окраске трипановым синим при световой микроскопии (обычно >95% всех клеток) [14].

Клетки обрабатывали моноклональными антителами (mAb) к белкам Wax, Bad, Bak, BID, Vim и их фосфорилированным формам (P) (Cell Signaling Technologies, США), а также антителами к каспазе-2 и каспазе-9, ко-

торые проводят сигналы апоптоза от митохондрий. Клетки отмывали в PBS, доводили до концентрации $0,5 \times 10^6$ клеток в 50 мкл, добавляли 20 мкл mAb, инкубировали при +4 °C 40 мин. Если антитела не были напрямую меченными флуоресцеинами, то в качестве вторых антител использовали изотип-специфические F(ab)₂ фрагменты иммуноглобулинов (Ig), меченные флуоресцентными красителями. Клетки трижды отмывали, осадок фиксировали в 4%-м параформальдегиде на PBS.

Окрашенные клетки анализировали на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) по программе SimulSet. Первичный анализ клеток проводили при прямом и боковом просвечивании лазером в системе координат на каналах FSC-A/SSC-A (Forward Scat Cells & Side Scat Cells). В каждом образце анализировалось 10 тысяч событий на гейт одной популяции клеток, который устанавливали автоматически по программе или по экспрессии соответствующего маркера. Интенсивность флуоресценции mAb, меченных FITC, определяли на канале FL1 при длине волны 530 ± 5 нм, флуоресценцию фикоэритрина (PE) измеряли на канале FL2 (585 ± 5 нм). Интенсивность флуоресценции приводили к внутреннему стандарту. В качестве негативного контроля регистрировали флуоресценцию F(ab)₂ фрагментов изотип-специфических Ig, меченных соответствующим красителем без первичных mAb. Далее анализировали гистограмму, соответствующую распределению клеток на канале, по которой определяли процентное содержание антиген-положительных клеток и интенсивность флуоресценции (mean) в условных единицах, отражающую относительную плотность антигена на поверхности клетки или уровень включения флуоресцентной метки в клетку.

Исследование проведено с использованием оборудования ЦКП «Прикладная Генетика» МФТИ. (Соглашение № 075-15-2021-684).

Статистическую обработку результатов проводили по программе БИОСТАТ, Сравнение между двумя группами выполняли по критерию Стьюдента, данные представлены как $M \pm m$. Для анализа групп с малой выборкой использовали метод непараметрического анализа Ньюмена-Кейлса, при котором статистически значимые различия между группами даны как $p < 0,05$.

Результаты исследования

В наших предыдущих работах мы показали, что процент спонтанного апоптоза в клетках кожи, выделенных из операционного материала при лифтинге лица, наиболее выражен в эпителиальных клетках кожи [14, 15]. Однако статистически значимо более высокий уровень апоптоза, индуцированного клеточно-проникающим C2-церамидом, указывает на активацию сигнальных

путей апоптоза во всех типах клеток кожи и подкожно-жировой ткани по завершении операции по коррекции контуров лица [14]. То есть при этих обстоятельствах мы имеем дело с эффектом ишемии/реперфузии (I/R). Известно, что при I/R обязательно задействованы митохондрии, в которых генерируется высокий уровень перекисей и свободных радикалов, что является активатором сигнальных путей апоптоза, сопряженных с митохондриями [3]. В связи с этим в данной работе поставлена задача определения уровня экспрессии сигнальных белков, ассоциированных с митохондриальным типом апоптоза, в клетках кожи, выделенных при операции лифтинга лица. В данном исследовании контролем служили клетки, выделенные от того же пациента, но в самом начале операции, когда не было эффекта ишемии тканей (см. раздел «Методика»).

Данные по экспрессии сигнальных белков, ассоциированных с митохондриальным типом апоптоза, в клетках, выделенных из операционного материала при лифтинге лица, представлены в **табл. 1**.

В нашем исследовании белок Bad не был изменен после операции лифтинга лица по сравнению с контролем (**табл. 1**). Это согласуется с работами, в которых показано, что в нормальных клетках кожи активация белка Bad не сопряжена с развитием апоптоза [7]. В связи с полученными данными мы далее не изучали белок Bad.

Белок Bid, как и Bad, входит в группу “BH3 domain-only” семейства Bcl-2, ему принадлежит важная роль в проведении сигналов от рецепторов апоптоза,

так как при расщеплении каспазой-8 он превращается в укороченный tBid, который при перемещении к митохондриям вызывает изменения белка Вах и открытие пор во внешней мембране митохондрий [8]. В нашей работе экспрессия белка Bid значительно была повышена после завершения операции по изменению контуров лица, что указывает на вовлечение не только митохондрий, но и рецепторов апоптоза в эффекте гибели клеток при I/R (**табл. 1**).

Проапоптотические белки Вах и Вак взаимодействуют с белками, образующими поры во внешней мембране митохондрий, что приводит к выходу в ЕСМ цитохрома c и активации каспазы-9 [6]. В нашей работе показано статистически значимое повышение экспрессии белков Вах и Вак (**табл. 1**) в клетках, выделенных после операции лифтинга лица, что указывает на роль этих белков в гибели клеток кожи.

Уровни экспрессии каспазы-2 и каспазы-9 значительно были повышены ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными показателями (**табл. 1**). Что касается белков 14-3-3, то в проведении сигналов апоптоза принимают участие только некоторые формы из этого семейства, но антитела, которые мы использовали, показывают суммарный уровень всех белков 14-3-3 в клетке. Поэтому вычлнить те формы, которые имеют отношение к апоптозу, не представляется возможным. Тем не менее, общий уровень белка 14-3-3 был статистически значимо ($p < 0,05$) повышен в клетках, подвергшихся ишемии / реперфузии, по сравнению с контрольными клетками (**табл. 1**).

Таблица 1/ Table 1

Измерение экспрессии сигнальных белков апоптоза митохондрий в клетках кожи при ишемии / реперфузии при операции лифтинга лица (по данным проточной цитометрии)

Measuring the expression of mitochondrial apoptosis signaling proteins in skin cells during ischemia/reperfusion during facelift surgery (by flow cytometry)

Сигнальные белки Signaling proteins	Контроль (n = 124) Control	Ишемия / реперфузия (n = 124) Ischemia / reperfusion	$p < 0,05$ #
Bad, mean*	59 ± 3	62 ± 4	
Bid, mean	48 ± 4	72 ± 4	+
Bak, mean	121 ± 3	169 ± 5	+
Bax, mean	132 ± 4	176 ± 6	+
Bim, mean	72 ± 5	98 ± 4	+
14-3-3, mean	151 ± 6	196 ± 5	+
Каспаза-2 / Caspasa -2 mean	218 ± 5	278 ± 3	+
Каспаза-9 / Caspasa -9 mean	232 ± 7	294 ± 4	+

Примечание. *mean – интенсивность флуоресценции (в условных единицах),

$p < 0,05$ статистическая значимость по сравнению с контролем.

Note. *mean - fluorescence intensity (in conventional units),

$p < 0.05$ statistical significance compared to control.

Чтобы определить активацию сигнальных путей апоптоза, ассоциированных с митохондриями, мы измерили уровень экспрессии фосфорилированных (P) белков, для этого клетки, выделенные из операционного материала, окрашивали антителами к (P)-Bak, (P)-Bim, (P)-Bax. Вместо фосфорилированной формы (P)-Bid мы исследовали tBid, так как именно эта ук-

роченная форма участвует в передаче сигналов апоптоза (табл. 2). Полученные данные указывают на повышение активности сигналов апоптоза в клетках после ишемии по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Далее мы сравнили показатели экспрессии сигнальных белков в зависимости от возраста пациенток (табл. 3). Во-первых, для всех исследованных белков

Таблица 2/ Table 2

Определение активации сигнальных путей апоптоза митохондрий в клетках кожи при ишемии / реперфузии при операции лифтинга лица (по данным проточной цитометрии)

Determination of mitochondrial apoptosis signaling pathway activation in skin cells during ischemia/reperfusion during facelift surgery (by flow cytometry)

Сигнальные белки Signaling proteins	Контроль (n = 124) Control	Ишемия / реперфузия (n = 124) Ischemia / reperfusion	$p < 0,05$ #
** (P)-Bax, mean*	82 ± 3	112 ± 3	+
(P)-Bak, mean	97 ± 5	134 ± 4	+
(P)-Bim, mean	109 ± 2	141 ± 5	+
(P)-14-3-3, mean	173 ± 5	206 ± 4	+
tBid, mean	62 ± 3	135 ± 6	+

Примечание. *mean – интенсивность флуоресценции (в условных единицах),

** (P) – фосфорилированные белки,

$p < 0,05$ статистическая значимость по сравнению с контролем.

Note. *mean – fluorescence intensity (in conventional units),

** (P) – phosphorylated proteins,

$p < 0.05$ statistical significance compared to control.

Таблица 3/ Table 3

Измерение экспрессии сигнальных белков апоптоза митохондрий в клетках кожи при ишемии / реперфузии (I/R) при операции лифтинга лица в зависимости от возраста пациенток (по данным проточной цитометрии)

Measuring the expression of mitochondrial apoptosis signaling proteins in skin cells during ischemia/reperfusion (I/R) during facelift surgery depending on the age of the patients (according to flow cytometry)

Сигнальные белки Signaling proteins	Группы пациенток / Patient groups					
	I. 32 – 40 лет / years (n = 24)		II. 41 – 50 лет / 41 – 50 years (n = 36)		III. 41 – 64 года / 41 – 64 years n = 64	
	Контроль	I/R	Контроль	I/R	Контроль	I/R
Bax, mean*	112 ± 5	156 ± 4#	119 ± 4	171 ± 5#	128 ± 4	192 ± 4#
Bak, mean	105 ± 3	144 ± 3#	111 ± 5	159 ± 4#	119 ± 7	180 ± 6#
Bid, mean	39 ± 2	64 ± 5#	43 ± 5	76 ± 3#	49 ± 4	82 ± 4#
Bim, mean	66 ± 5	94 ± 6#	70 ± 5	109 ± 5#	75 ± 5	115 ± 7#
14-3-3, mean	143 ± 2	187 ± 4#	149 ± 6	203 ± 5#	155 ± 4	217 ± 6#
Каспаза-2 / Caspasa-2, mean	204 ± 6	267 ± 5#	209 ± 5	279 ± 5#	223 ± 7	294 ± 5#
Каспаза-9 / Caspasa-9, mean	221 ± 4	275 ± 4#	229 ± 4	288 ± 4#	237 ± 5	299 ± 6#

Примечание. *mean – интенсивность флуоресценции (в условных единицах),

$p < 0,05$ статистическая значимость по сравнению с контролем.

Note. *mean – fluorescence intensity (in conventional units),

$p < 0.05$ statistical significance compared to control.

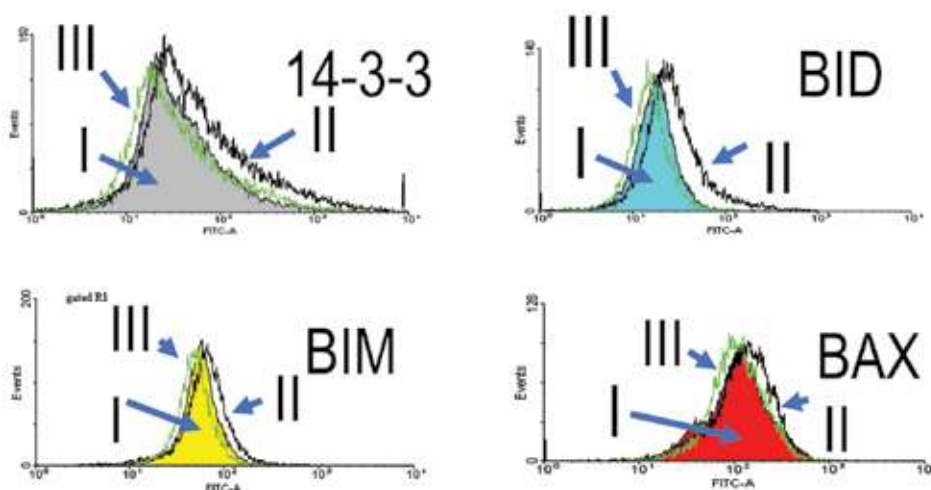
установлено значимое повышение показателей в клетках, подвергшихся ишемии, по сравнению с контролем ($p < 0,05$). При сравнении экспрессии сигнальных белков между группами разного возраста было показано, что для белков Bax и Bak не выявлено различий в контрольных группах разного возраста, но статистически значимо повышена экспрессия в группе старше 50 лет по сравнению с пациентками до 40 лет ($p < 0,05$) для клеток, подвергшихся I/R. Для белка Bim существенных различий не обнаружено, для Bid выявлены статистически значимые различия для клеток после I/R у лиц старше 50 лет по сравнению с пациентками до 40 лет ($p < 0,05$). Для суммарного пула белков 14-3-3 установлены значимые различия ($p < 0,05$) по экспрессии в группе пациенток старше 50 лет по сравнению с группой моложе 40 лет. Экспрессия каспазы-2 и каспазы-9 также статистически значимо ($p < 0,05$) была повышена у лиц старше 50 лет по сравнению с лицами моложе 40 лет в клетках после ишемии/реперфузии.

Некоторые гистограммы, соответствующие экспрессии сигнальных белков в лимфоцитах кожи приведены для примера на рисунке.

Заключение

В данной работе мы проанализировали уровни экспрессии белков Bad, Bak, Bax, Bim, Bid и его ук-

роченную форму tBid, а также суммарный пул белков 14-3-3 и каспаз-2 и -9 в клетках, выделенных из операционного материала при коррекции контуров лица. Контролем служили клетки, которые были изолированы из тканей в самом начале операции при отсутствии ишемии. За исключением белка Bad, все остальные сигнальные белки были существенно повышены в клетках после ишемии, связанной с нарушением кровотока во время операции. Это указывает на наличие эффекта ишемии/реперфузии и сопутствующем апоптозе в клетках, выделенных после завершения операции. Тип апоптоза установлен как митохондриальный, так как исследуемые белки проводят сигналы апоптоза, ассоциированные с митохондриями. При сравнении уровней экспрессии изучаемых белков в клетках, изолированных от пациентов разного возраста, установлено статистически значимое ($p < 0,05$) отличие для возрастной группы старше 50 лет по сравнению с группой пациенток моложе 40 лет. Это говорит о необходимости проведения дополнительных терапевтических вмешательств перед операцией лифтинга лица для коррекции митохондриальных нарушений и связанных с ними негативных последствий для клеток. Для этого можно использовать клеточные энергетика, что является предметом отдельной статьи.



Примеры гистограмм, отражающие экспрессию сигнальных белков апоптоза в гейте лимфоцитов у пациенток разных возрастных групп (данные проточной цитометрии).

Окрашенные пики (I) отражают уровень экспрессии соответствующего белка в клетках пациенток моложе 30 лет. (II) – экспрессия соответствующего белка у лиц в возрасте 30 – 40 лет. (III) – экспрессия соответствующего белка у лиц в возрасте старше 50 лет.

Examples of histograms showing the expression of apoptosis signaling proteins in the lymphocyte gate in patients of different age groups (flow cytometry data).

Stained peaks (I) reflect the expression level of the corresponding protein in the cells of patients younger than 30 years old. (II) – expression of the corresponding protein in individuals aged 30-40 years. (III) – expression of the corresponding protein in individuals aged over 50 years.

Выводы

1. Эффект ишемии/реперфузии и связанная с ним активация апоптоза регистрируется в клетках, выделенных из кожи и подкожно-жировой ткани по завершении операции лифтинга лица. Экспрессия сигнальных белков указывает на активацию митохондриального типа апоптоза в этих клетках.

2. Сравнение клеток, выделенных из операционного материала пациенток разных возрастных групп указывает на статистически значимое ($p < 0,05$) повышение уровней экспрессии сигнальных белков митохондриального типа апоптоза в клетках пациенток в возрасте старше 50 лет по сравнению с пациентками моложе 40 лет, что указывает на более тяжелые последствия ишемии/реперфузии для лиц старшего возраста при операции лифтинга лица.

Литература

(п.п. 1–13 см. References)

14. Абрамян Ш.М., Морозов С.Г. Определение уровня спонтанного и индуцированного апоптоза клеток, полученных из операционного материала при лифтинге лица. *Патогенез*. 2016; 14(4): 63-8.
15. Абрамян Ш.М., Блохин С.Н., Морозов С.Г. Роль лимфоцитов кожи и подкожно-жировой ткани в развитии осложнений после операции лифтинга лица. *Трансляционная медицина*. 2017; 4(S3): 6.
16. Абрамян Ш.М., Морозов С.Г. Изучение состояния сигнальных путей апоптоза в клетках при проведении пластических операций на лице. *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии*. 2017; 1: 70.

References

1. Li A., Zheng N., Ding X. Mitochondrial abnormalities: a hub in metabolic syndrome-related cardiac dysfunction caused by oxidative stress. *Heart Fail. Rev.* 2022; 27(4): 1387-94.
2. Dominic A., Le N., Takahashi M. Loop between NLRP3 inflammasome and reactive oxygen species. *Antioxid. Redox Signal.* 2022; 36(10-12): 84-796. doi: 10.1089/ars.2020.8257
3. Wang J., Liu H., Wu X., Shi C., Li W., Yuan Y., et al. Induction of apoptosis in SGC-7901 cells by iridium (III) complexes via endoplasmic reticulum stress-mitochondrial dysfunction pathway. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2022; 27(4-5): 455-69. doi: 10.1007/s00775-022-01943-6

Сведения об авторах:

Абрамян Шмагон Моисович, мл. науч. сотр. лаб. регуляции репаративных процессов ФГБНУ «НИИОПП»;
Кандалова Ольга Вадимовна, канд. мед. наук, доцент каф. кожных и венерических болезней ФГБУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова»;
Волкова Елена Николаевна, вед. науч. сотр. лаб. регуляции репаративных процессов ФГБНУ «НИИОПП»;
Найденков Николай Петрович, мл. науч. сотр. лаб. регуляции репаративных процессов ФГБНУ «НИИОПП»;
Морозов Сергей Георгиевич, доктор мед. наук, проф., член-корр. РАН, директор ФГБНУ «НИИОПП».

4. Rosa N., Speelman-Rooms F., Parys J., Bultynck G. Modulation of Ca²⁺ signaling by antiapoptotic Bcl-2 versus Bcl-xL: From molecular mechanisms to relevance for cancer cell survival. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*. 2022; 1877(6): 188791. doi: 10.1016/j.bbcan.2022.188791
5. Morris D., Johnson S., Bleck C., Lee D., Tjandra N. Humanin selectively prevents the activation of pro-apoptotic protein BID by sequestering it into fibers. *J. Biol. Chem.* 2020; 295(52): 18226-38. doi: 10.1074/jbc.RA120.013023
6. Deng J., Gutiérrez L., Stoll G., Motiño O., Martins I., Núñez L., et al. Paradoxical implication of BAX/BAK in the persistence of tetraploid cells. *Cell Death Dis.* 2021; 12(11): 1039-45.
7. Emhemmed F., Azouaou S., Hassan S., Lefevbre R., Désaubry L., Muller C., et al. The synthetic flavagline FL3 spares normal human skin cells from its cytotoxic effect via an activation of Bad. *Toxicol In Vitro*. 2019; 60: 27-35. doi: 10.1016/j.tiv.2019.04.025
8. Heilig R., Dilucca M., Boucher D., Chen K., Hancz D., Demarco B., et al. Caspase-1 cleaves Bid to release mitochondrial SMAC and drive secondary necrosis in the absence of GSDMD. *Life Sci. Alliance*. 2020; 3(6): e202000735.
9. Simula L., Corrado M., Accordi B., Di Rita A., Nazio F., Antonucci Y., et al. JNK1 and ERK1/2 modulate lymphocyte homeostasis via BIM and DRP1 upon AICD induction. *Cell Death Differ.* 2020; 27(10): 2749-67.
10. Sluchanko N., Tugaeva K., Gushchin I., Remeeva A., Kovalev K., Cooley R. Crystal structure of human 14-3-3 ζ complexed with the noncanonical phosphopeptide from proapoptotic BAD. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2021; 583: 100-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.10.053
11. Chen S., Feng X., Chen X., Zhuang Z., Xiao J., Fu H., et al. 14-3-3 γ , a novel regulator of the large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2020; 319(1): F52-F62.
12. Huang R., Liu C., Fu R., Yan Y., Yang J., Wang X., et al. Downregulation of PLK4 expression induces apoptosis and G0/G1-phase cell cycle arrest in keloid fibroblasts. *Cell. Prolif.* 2022; 55(7): e13271.
13. Liu B., Chen L., Li S., Wang Z., Cheng W. Smac/DIABLO regulates the apoptosis of hypertrophic scar fibroblasts. *Int. J. Mol. Med.* 2013; 32(3): 615-22.
14. Abramyan Sh.M., Morozov S.G. Determination of the level of spontaneous and induced apoptosis of cells obtained from surgical material during face lifting. *Patogenez*. 2016; 14(4): 63-8.
15. Abramyan Sh.M., Blokhin S.N., Morozov S.G. The role of skin lymphocytes and subcutaneous adipose tissue in the development of complications after facial lifting surgery. *Translyatsionnaya meditsina*. 2017; (S3): 6.
16. Abramyan Sh.M., Morozov S.G. Study of the state of signaling pathways of apoptosis in cells during plastic surgery on the face. *Annaly plasticheskoy, rekonstruktivnoy i esteticheskoy khirurgii*. 2017; 1: 70.