

ВЛИЯНИЕ КОМПОЗИТНОГО КОЛЛАГЕНСОДЕРЖАЩЕГО ГИДРОГЕЛЯ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ФИБРОБЛАСТОВ ПОСЛЕ КИСЛОТНО-ИНДУЦИРОВАННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ *IN VITRO*

Марков П.А.¹,
Еремин П.С.¹,
Гильмутдинова И.Р.¹,
Гребень А.И.¹,
Костромина Е.Ю.¹,
Соколов А.С.²,
Артемьева И.А.²

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии» Минздрава России (121099, г. Москва, ул. Новый Арбат, 32, Россия)

² ООО «ПЕРВЫЙ ЖИВОЙ КОЛЛАГЕН» (127055, г. Москва, Тихвинский пер., 9, стр. 1, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Еремин Пётр Серафимович,
e-mail: ereminps@gmail.com

РЕЗЮМЕ

Хорошо известно, что кислотность микроокружения оказывает значимое влияние на функциональную активность клеток, участвующих в восстановлении ткани. На сегодняшний день пока недостаточно полно исследовано действие биоматериалов, содержащих в своём составе компоненты межклеточного матрикса дермы человека, на фибробласты, находящиеся в условиях ацидоза.

Цель исследования. Оценить влияние композитного гидрогеля, содержащего в своём составе компоненты дермы, на функциональную активность интактных фибробластов и фибробластов с кислотнo-индуцированной дисфункцией.

Материалы и методы. Для имитации физико-химических условий острого воспаления фибробласты человека инкубировали в течение часа при 39 °C в закисленной до pH = 6 питательной среде. С использованием методов световой и люминесцентной микроскопии оценивали морфометрические характеристики фибробластов кожи человека. Оценку количества апоптических клеток и индекса пролиферации выполняли с использованием проточной цитофлуориметрии.

Результаты. Установлено, что воздействие на фибробласты кислой среды ингибирует их адгезивные свойства и снижает скорость роста клеток. Внесение гидрогеля в клеточную суспензию с повреждёнными клетками восстанавливает адгезивные свойства и рост клеток. В популяции фибробластов после кислотного воздействия снижается количество живых клеток и увеличивается количество клеток в стадии апоптоза. Культивирование повреждённых фибробластов в присутствии композитного гидрогеля увеличивает количество живых клеток в популяции и снижает количество апоптических клеток. Кислотно-индуцированное повреждение фибробластов снижает индекс пролиферативной активности. Выявлено, что внесение гидрогеля в культуральную среду стимулирует пролиферативную активность как интактных, так и повреждённых фибробластов. Полученные результаты указывают на то, что композитный гидрогель, состоящий из компонентов внеклеточного матрикса, способен восстанавливать функциональную активность фибробластов, повреждённых в результате воздействия кислой среды. Полученные результаты могут быть использованы для создания биоматериалов, повышающих эффективность регенерации кожных покровов при чрезмерно интенсивном остром воспалении.

Ключевые слова: фибробласты, ацидоз, адгезия, апоптоз, пролиферация, коллаген, эластин, гидрогель

Для цитирования: Марков П.А., Еремин П.С., Гильмутдинова И.Р., Гребень А.И., Костромина Е.Ю., Соколов А.С., Артемьева И.А. Влияние композитного коллагенсодержащего гидрогеля на функциональную активность фибробластов после кислотнo-индуцированного повреждения *in vitro*. *Acta biomedica scientifica*. 2024; 9(2): 243-252. doi: 10.29413/ABS.2024-9.2.24

Статья поступила: 01.08.2023

Статья принята: 01.03.2024

Статья опубликована: 31.05.2024

EFFECT OF COMPOSITE COLLAGEN CONTAINING HYDROGEL ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF FIBROBLASTS AFTER ACID-INDUCED *IN VITRO* INJURY

Markov P.A.¹,
 Eremin P.S.¹,
 Gilmutdinova I.R.¹,
 Greben A.I.¹,
 Kostromina E.Yu.¹,
 Sokolov A.S.²,
 Artemyeva I.A.²

¹ National Medical Research Center
 for Rehabilitation and Balneology
 (Novy Arbat 32, Moscow 121099,
 Russian Federation)

² FIRST ALIVE COLLAGEN LLC
 (Tikhvinsky lane 9, building 1,
 Moscow 127055, Russian Federation)

Corresponding author:
 Petr S. Eremin,
 e-mail: ereminps@gmail.com

ABSTRACT

It is well known that the acidity of the microenvironment has a significant impact on the functional activity of cells involved in tissue repair. To date, the effect of biomaterials containing components of the human dermis intercellular matrix on fibroblasts under acidosis has not been fully studied.

The aim of the study. To evaluate the effect of a composite hydrogel containing dermal components on the functional activity of intact fibroblasts and fibroblasts with acid-induced dysfunction.

Materials and methods. To simulate the physicochemical conditions of acute inflammation, human fibroblasts were incubated for an hour at 39 °C in a nutrient medium overacidified to pH = 6. The morphometric characteristics of human skin fibroblasts were assessed using light and fluorescence microscopy methods. The number of apoptotic cells and proliferation index were assessed using flow cytometry.

Results. It has been established that exposure of fibroblasts to an acidic medium inhibits their adhesive properties and reduces the rate of cell growth. The introduction of hydrogel into a cell suspension with damaged cells restores adhesive properties and cell growth. In the fibroblast population, after acid exposure, the number of living cells decreases, and the number of apoptotic cells increases. Cultivation of damaged fibroblasts in the presence of a composite hydrogel increases the number of living cells in the population and reduces the number of apoptotic cells. Acid-induced fibroblast damage reduces the proliferative activity index. It was revealed that the introduction of hydrogel into the culture medium stimulates the proliferative activity of both intact and damaged fibroblasts. The results obtained indicate that a composite hydrogel consisting of extracellular matrix components is capable of restoring the functional activity of fibroblasts damaged as a result of exposure to an acidic medium. The results obtained can be used to create biomaterials that increase the efficiency of skin regeneration in cases of excessively intense acute inflammation.

Key words: fibroblasts, acidosis, adhesion, apoptosis, proliferation, collagen, elastin, hydrogel

Received: 01.08.2023
 Accepted: 01.03.2024
 Published: 31.05.2024

For citation: Markov P.A., Eremin P.S., Gilmutdinova I.R., Greben A.I., Kostromina E.Yu., Sokolov A.S., Artemyeva I.A. Effect of composite collagen containing hydrogel on the functional activity of fibroblasts after acid-induced *in vitro* injury. *Acta biomedica scientifica*. 2024; 9(2): 243-252. doi: 10.29413/ABS.2024-9.2.24

ВВЕДЕНИЕ

Одним из ключевых этапов заживления ран является фаза воспаления, представляющая собой переходный процесс между гемостазом и заживлением раны. Каждая стадия воспалительно-репаративного процесса характеризуется своим значением кислотности раневого ложа. Так, например, стадия острого воспаления сопровождается снижением кислотности раневого ложа до $\text{pH} = 5,5\text{--}6$; на стадии репаративной регенерации кислотность составляет порядка $\text{pH} = 7$; хроническое воспаление характеризуется щелочной ($\text{pH} = 8$) реакцией [1].

Хорошо известно, что кислотность среды оказывает значимое влияние на функциональную активность клеток, участвующих в восстановлении ткани. Так, например, показано, что инкубация тромбоцитов в кислой среде, близкой к $\text{pH} = 5$ стимулирует образование тромбоцитарного фактора роста [2]. Кислая среда уменьшает активацию дендритных клеток, нарушает гликолиз Т-клеток и функцию эффекторных Т-клеток, поляризацию моноцитов [3–6]. Наряду с тромбоцитами, моноцитами и макрофагами непосредственное участие в воспалительно-репаративных процессах играют дермальные фибробласты. Фибробласты представляют собой гетерогенную клеточную популяцию, ответственную за продукцию и ремоделирование внеклеточного матрикса дермы [7]. В настоящее время влияние кислотности среды на функциональную активность фибробластов исследовано недостаточно. Так, например, показано, что увеличение pH среды приводит к снижению миграционной активности и синтеза ДНК дермальными фибробластами [8]. В то же время результаты других исследователей показывают, что функциональные реакции фибробластов не зависят от pH среды и опосредуются иными механизмами [2, 9].

Однако несмотря на имеющиеся различия в экспериментальных данных, бесспорно, что функциональная активность клеток, в том числе и фибробластов, зависит от кислотности и микроокружения среды.

В настоящее время набирает популярность новая парадигма восстановления тканей с использованием биоматериалов искусственного и природного происхождения, направленная не столько на создание биологически инертных материалов, сколько на создание биоматериалов, способных регулировать клеточные реакции при различных патологических состояниях: острые и хронические раны, тяжёлые и полнослойные повреждения [10–12].

Результаты многочисленных исследований указывают на перспективность использования биологически активных полимеров для контроля воспалительно-репаративных процессов. Ряд проведённых исследований показывают, что гидрогелевые биоматериалы, содержащие в своём составе компоненты межклеточного матрикса дермы человека, повышают приживаемость фибробластов и мезенхимальных стромальных клеток человека [13–16].

На сегодняшний день пока недостаточно полно исследовано действие биоматериалов, содержащих в сво-

ём составе компоненты межклеточного матрикса дермы человека, на фибробласты, находящиеся в условиях ацидоза.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить влияние композитного гидрогеля, содержащего в своём составе компоненты дермы, на функциональную активность интактных фибробластов и фибробластов с кислотно-индуцированной дисфункцией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Композитный коллагенсодержащий гидрогель был предоставлен компанией ООО «ПЕРВЫЙ ЖИВОЙ КОЛЛАГЕН» (Россия) и представляет собой гидрогель, состоящий из гидролизата коллагена и эластина. Оценивали влияние гидрогеля на интактные фибробласты кожи человека HDF (Cell Applications, США; кат. № 106K-05a) и фибробласты с кислотно-индуцированным повреждением.

Моделирование кислотного повреждения клеток. Для имитации физико-химических условий острого воспаления фибробласты человека (1×10^6 шт/мл, 5 мл) инкубировали в течение часа в закисленной до $\text{pH} = 6$ питательной среде при 39°C . Инкубацию проводили в стерильной 15 мл полипропиленовой пробирке (Corning) при перемешивании (50 об/мин). Закисление среды осуществляли молочной кислотой при конечной концентрации кислоты в питательной среде 0,4 %. Через час в клеточную суспензию вносили 5 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) и центрифугировали при 1700 об/мин в течение 5 минут, после чего надосадочную жидкость сливали, клеточный осадок ресуспендировали в стандартной питательной среде (10 мл).

Для контроля повреждения клеток использовали оценку количества живых, мёртвых и апоптических клеток в популяции, используя для этого проточную цитометрию BD FACSCanto II (Becton Dickinson and Company, США) и коммерческий набор FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Pharmingen, США). Повреждение считалось индуцированным при снижении количества живых клеток в популяции на 20–30 % и увеличении количества апоптических клеток в 2 раза.

Цитотоксичность исследуемых образцов оценивали с использованием проточного цитофлуориметра BD FACSCanto II (Becton Dickinson and Company, США) и коммерческого набора Kit Live/Dead Test (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Для этого в 12-луночный культуральный планшет вносили по 1 мл исследуемых образцов. Затем в лунки вносили интактные фибробласты ($6,0\text{--}6,5 \times 10^5$ шт/100 мкл). Во всех экспериментах, где не указано иное, использовали питательную среду ДЕМ-F12 (Gibco, США), содержащую 10%-ю фетальную бычью сыворотку (Gibco, США) и 1%-й раствор пенициллина-стрептомицина (ПанЭко, Россия). Инкубировали в течение суток при стандартных условиях (37°C ; 5 % CO_2).

Затем клетки снимали с поверхности пластика, используя для этого 0,25%-й раствор трипсина-EDTA (StemCell, США), трижды промывали в ФСБ и оценивали количество живых и мёртвых клеток согласно протоколу, рекомендованному производителем набора Kit Live/Dead Test (Thermo Fisher Scientific Inc., США).

Адгезивные свойства интактных и повреждённых фибробластов оценивали по количеству клеток, прикрепившихся к поверхности культурального пластика за 120 минут при совместной инкубации с исследуемыми образцами гидрогеля. Для этого в 12-луночный культуральный планшет вносили по 1 мл образцов. Затем в часть лунок вносили интактные, в часть лунок – повреждённые фибробласты ($5-7 \times 10^4$ шт/100 мкл). Для улучшения визуализации клетки были предварительно окрашены витальным флуоресцентным красителем PKH-26 (Sigma, США). Инкубировали в стандартных условиях (37°C ; 5 % CO_2) в течение 120 минут. Затем среду извлекали и промывали от неадгезированных клеток. С использованием световой и люминесцентной микроскопии оценивали количество и морфометрические характеристики фибробластов. Количество повторов для каждого образца – 5 шт.

Морфометрическая характеристика клеток. Оценивали влияние гидрогеля на размеры, форму клеток и количество фибробластов. Для улучшения визуализации клетки были предварительно окрашены витальным флуоресцентным красителем PKH-26. Как было описано выше, интактные и повреждённые клетки инкубировали с исследуемыми образцами при стандартных условиях культивирования в течение суток. Размеры и количество клеток оценивали с использованием встроенного программного обеспечения Image Analysis (Leica Microsystems, Германия).

Оценка количества апоптотических клеток. Влияние исследуемых образцов на количество апоптотических клеток в популяции оценивали при их совместной инкубации интактными и повреждёнными фибробластами человека. Для этого в 12-луночный культуральный планшет вносили по 1 мл исследуемых образцов гидрогеля. Затем в лунки вносили интактные или повреждённые фибробласты ($6,0-6,5 \times 10^5$ шт/100 мкл) и инкубировали в течение суток при стандартных условиях. Затем клетки снимали с поверхности пластика, используя для этого 0,25%-й раствор трипсина-EDTA, трижды промывали в ФСБ. Оценку количества апоптотических и некротических клеток проводили методом проточной цитометрии с использованием коммерческого набора (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I; BD Pharmingen, США).

Клеточный цикл и индекс пролиферации фибробластов. Оценивали влияние гидрогеля на фазы клеточного цикла интактных и повреждённых фибробластов человека. Для этого в 12-луночный культуральный планшет вносили по 1 мл исследуемых образцов гидрогеля. Затем в лунки вносили интактные или повреждённые фибробласты ($6,0-6,5 \times 10^5$ шт/100 мкл) и инкубировали в течение суток при стандартных условиях. Затем клетки снимали с поверхности пластика и трижды промыва-

ли в ФСБ. Фазы клеточного цикла: фаза покоя (фаза G0), фаза клеточного роста (фаза G1), синтетическая фаза (фаза S) и фаза клеточного деления (фаза M), – оценивали методом проточной цитометрии с помощью коммерческого набора Kit CellCycle (BD Pharmingen, США). Индекс пролиферативной активности определяли, суммируя количество клеток, находящихся в фазах S и M клеточного цикла.

Статистическая обработка результатов

При обработке данных вычисляли среднее арифметическое значение (M), среднее квадратичное отклонение (SD, standard deviation). Статистическая значимость различий оценивалась по t-критерию Стьюдента и критерию χ^2 Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе исследования оценивали зависимость жизнеспособности фибробластов от концентрации гидрогеля в культуральной среде. Для этого готовили последовательные разведения исходного образца. Установлено, что жизнеспособность клеток не изменяется при концентрации гидрогеля в культуральной среде менее 3 % (табл. 1). Поэтому в дальнейших исследованиях использовали 3%, 1,5% и 0,75%-ю концентрации образца в культуральной среде.

На следующих этапах исследования оценивали влияние гидрогеля на функциональную активность интактных и повреждённых фибробластов. Адгезивные свойства фибробластов оценивали с целью охарактеризовать способность клеток прикрепляться к субстратам. Установлено, что в контроле через 2 часа инкубации количество интактных фибробластов, прикрепившихся к пластику, составляет 65 ± 7 шт/0,1 мм² (рис. 1а). При внесении в культуральную среду гидрогеля в концентрации 3 % адгезивные свойства фибробластов не изменяются. При снижении концентрации гидрогеля в культуральной среде количество адгезированных клеток увеличивается (рис. 1а).

Выявлено, что воздействие на фибробласты физико-химических условий, имитирующих острое воспаление, вызывает снижение адгезивности клеток в среднем на 60 %. Количество прикрепившихся к культуральному пластику клеток составляет 24 ± 5 шт/0,1 мм² (рис. 1б). Внесение гидрогеля в культуральную среду к повреждённым клеткам восстанавливает способность фибробластов прикрепляться к субстрату. Количество адгезированных на пластике клеток составляет в среднем 46 ± 7 шт/0,1 мм² (рис. 1б). При этом установлено, что, в отличие от реакции интактных фибробластов, адгезия повреждённых фибробластов не зависит от концентрации гидрогеля в культуральной среде (рис. 1б).

Оценивали влияние гидрогеля морфометрические характеристики интактных и повреждённых клеток. В контроле через сутки после инкубации интактные клетки приобретают веретеновидную форму; длина клеток составляет 118 ± 23 мкм (рис. 2а). Выявлено,

ТАБЛИЦА 1

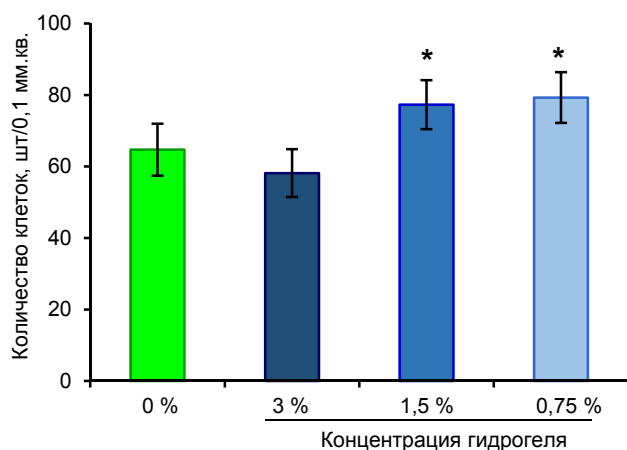
КОЛИЧЕСТВО ЖИВЫХ И МЁРТВЫХ КЛЕТОК
ЧЕРЕЗ 24 Ч СОВМЕСТНОЙ ИНКУБАЦИИ ИНТАКТНЫХ
ФИБРОБЛАСТОВ В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЕ,
СОДЕРЖАЩЕЙ КОЛЛАГЕНОВЫЙ ГИДРОГЕЛЬ

TABLE 1

THE NUMBER OF LIVING AND DEAD CELLS AFTER 24 H
COINCUBATION OF INTACT FIBROBLASTS IN A CULTURE
MEDIUM CONTAINING COLLAGEN HYDROGEL

Концентрация гидрогеля в питательной среде, %	Количество живых клеток, %	Количество мёртвых клеток, %
50	12 ± 5*	87 ± 5*
25	12 ± 3*	87 ± 3*
12	20 ± 7*	80 ± 7*
6	31 ± 4*	68 ± 4*
3	87 ± 7	10 ± 4
1,5	92 ± 3	7 ± 3
0,75	92 ± 5	6 ± 3
Контроль (0% гидрогеля)	95 ± 3	4 ± 2

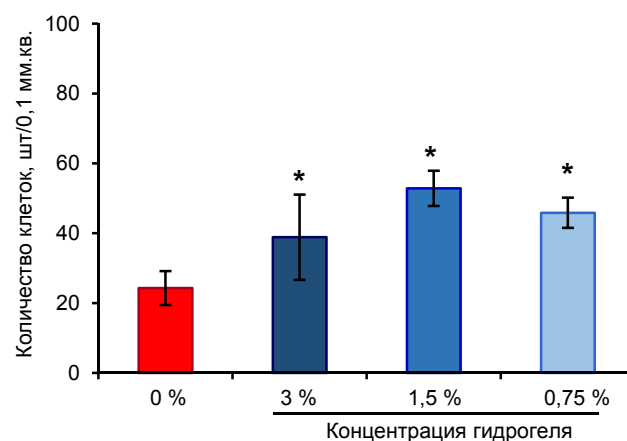
Примечание. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартного отклонения; n = 5; * – различия статистически значимы при $p < 0,05$ по сравнению с контролем.



а

РИС. 1.

Влияние концентрации гидрогеля в культуральной среде на адгезию интактных (а) и повреждённых (б) фибробластов: данные представлены в виде среднего значения ± стандартного отклонения; * – различия статистически значимы при $p < 0,05$ по сравнению с контролем (0 %)



б

FIG. 1.

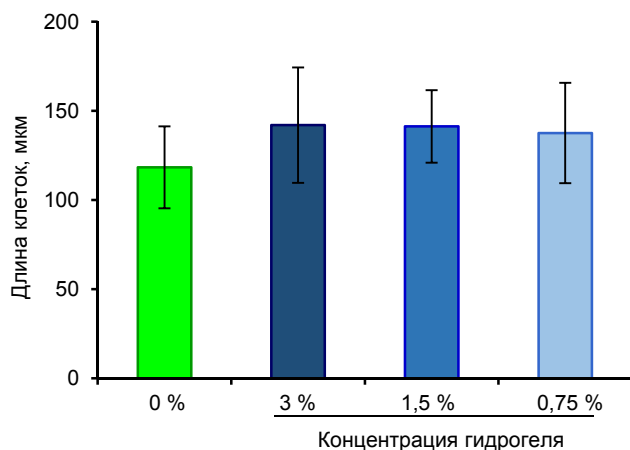
The effect of hydrogel concentration in the culture medium on the adhesion of intact (а) and damaged (б) fibroblasts: data are presented as mean ± standard deviation; * – differences are statistically significant compared to control (0 %) at $p < 0.05$

что совместная инкубация гидрогеля с интактными фибробластами независимо от его концентрации в культуральной среде не влияет на форму и длину интактных клеток (рис. 2а).

Установлено, что действие на фибробласты физико-химических условий, имитирующих острое воспаление, ингибирует рост клеток в среднем на 30 %. Через сутки инкубации в стандартных условиях длина повреждённых фибробластов составляет 83 ± 14 мкм (рис. 2б). Внесение гидрогеля в культуральную среду с повреждёнными фибробластами восстанавливает рост клеток. При этом статистически значимой разницы между кон-

центрацией гидрогеля в культуральной среде и увеличением размеров повреждённых фибробластов не наблюдается (рис. 2б).

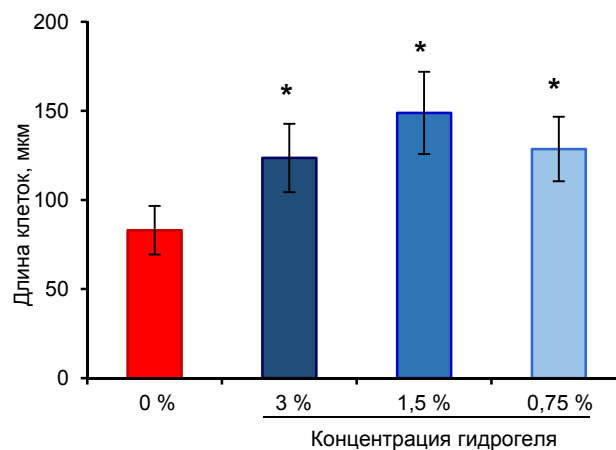
Таким образом, результаты морфометрических исследований показывают, что совместное культивирование гидрогеля и интактных фибробластов не влияет на адгезию и размеры клеток. Воздействие на фибробласты физико-химических условий, имитирующих стадию острого воспаления, ингибирует адгезивные свойства и снижает скорость роста клеток. Гидрогель, инкубированный с повреждёнными клетками, восстанавливает их адгезивные свойства и клеточный рост.



a

РИС. 2.

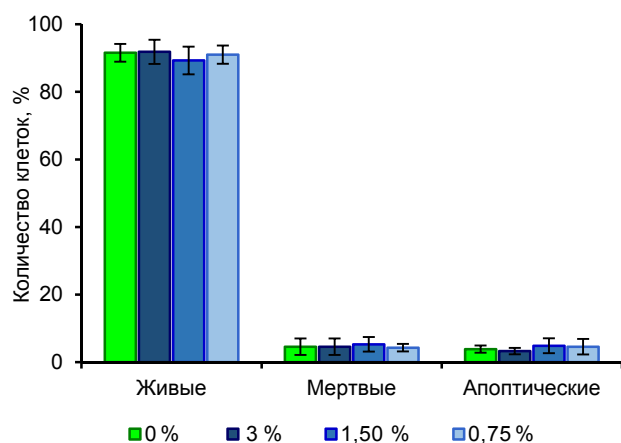
Влияние концентрации гидрогеля в культуральной среде на размеры интактных (а) и повреждённых (б) фибробластов: данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартного отклонения; * – различия статистически значимы при $p < 0,05$ по сравнению с контролем (0 %)



б

FIG. 2.

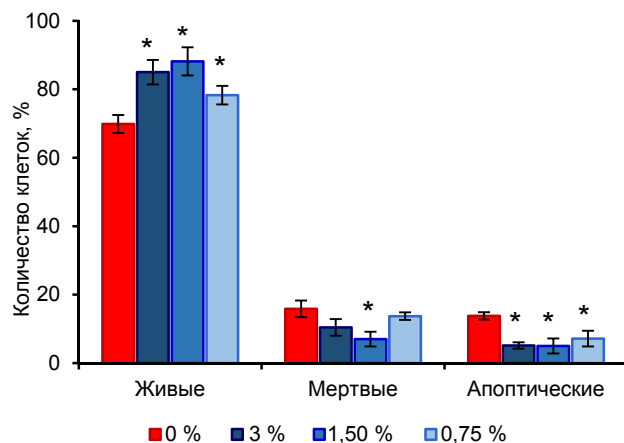
The effect of hydrogel concentration in the culture medium on the length of intact (a) and damaged (б) fibroblasts: data are presented as mean $\pm$ standard deviation; * – differences are statistically significant compared to control (0 %) at $p < 0.05$



a

РИС. 3.

Влияние гидрогеля на количество живых, мёртвых и апоптотических клеток в популяции интактных (а) и повреждённых (б) фибробластов: данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартного отклонения; * – различия статистически значимы при $p < 0,05$ по сравнению с контролем (0 %)



б

FIG. 3.

The effect of hydrogel on the number of living, apoptotic and dead cells in intact (a) and damaged (б) fibroblasts population: data are presented as mean $\pm$ standard deviation; * – differences are statistically significant compared to control (0 %) at $p < 0.05$

Следующий этап исследования был посвящён оценке влияния гидрогеля на количество апоптотических клеток, клеточный цикл и пролиферативную активность интактных и повреждённых фибробластов.

В норме при культивировании интактных фибробластов в стандартных условиях количество живых, апоптотических и мёртвых клеток в популяции составляет 92 ± 3 , 4 ± 1 и 5 ± 2 % соответственно (рис. 3а). Внесение гидрогеля в культуральную среду с интактными фибробластами не влияет на количество мёртвых и апоптотических клеток (рис. 3а).

Установлено, что воздействие на фибробласты физико-химических условий, имитирующих острое воспаление, вызывает увеличение количества апоптотических и мёртвых клеток в популяции до 14 ± 3 и 16 ± 3 % соответственно (рис. 3б). Внесение гидрогеля в культуральную среду с повреждёнными фибробластами увеличивает количество жизнеспособных клеток и предотвращает активацию апоптоза. Количество апоптотических клеток снижается более чем в два раза и не зависит от концентрации гидрогеля в культуральной среде (рис. 3б).

На следующем этапе исследования оценивали влияние гидрогеля на клеточный цикл и пролиферативную активность интактных и повреждённых фибробластов. Пролиферативная активность популяции клеток определяется по соотношению количества клеток, находящихся в синтетической фазе (фаза S) и фазе клеточного деления (фаза M) к клеткам, находящимся в фазе покоя (фаза G0) и фазе клеточного роста (фаза G1).

Оценка клеточного цикла интактной популяции фибробластов показывает, что через сутки культивирования более 80 % клеток находятся в фазе роста (табл. 2). Индекс пролиферативной активности популяции интактных фибробластов составляет порядка 20 % (табл. 2).

Установлено, что инкубация интактных клеток в присутствии гидрогеля изменяет распределение фибробластов в фазах клеточного цикла и пролиферативную активность клеток. Так, например, внесение 3 % и 1,5 % в культуральную среду приводит к уменьшению количества клеток в фазах G0/G1; одновременно с этим увеличивается количество клеток в синтетической фазе и фазе клеточного деления, что говорит об увеличении индекса пролиферативной активности клеток (табл. 2). При этом следует отметить, что характер происходящих изменений зависит от концентрации гидрогеля в культуральной среде. Например, при 3%-й концентрации гидрогеля увеличивается количество клеток в фазе S, в то время как при 1,5%-й концентрации – в фазе M клеточного цикла (табл. 2).

Предварительное воздействие на клетки кислой среды приводит к изменению соотношения фибробластов в фазах клеточного цикла, а именно: увеличивается количество клеток в фазе G0/G1 и ингибируется переход клеток в синтетическую фазу и фазу клеточного деления (табл. 3). Изменения в клеточном цикле характеризуются снижением индекса пролиферативной активности повреждённых кислотой клеток (табл. 3).

Выявлено, что культивирование повреждённых фибробластов в средах, содержащих коллагеновый гидрогель, восстанавливает клеточный цикл популяции и пролиферативную активность повреждённых фибробластов (табл. 3). При этом наиболее интенсивные изменения наблюдаются при культивировании повреждённых клеток в среде, содержащей 3%-й гидрогель (табл. 3).

Таким образом, установлено, что воздействие кислой среды снижает функциональную активность фибробластов, что выражается в снижении адгезии к субстрату, замедлении скорости клеточного роста и пролиферации, а также сопровождается увеличением в популяции количества апоптических клеток. Сокультивирование повреждённых фибробластов с коллагенсодержащим гидрогелем способствует восстановлению функциональной активности клеток. Полученные результаты расширяют представления о функциональном состоянии клеток в условиях острого воспаления и методов восстановления их функциональности с использованием биологически активных материалов.

ТАБЛИЦА 2
ВЛИЯНИЕ ГИДРОГЕЛЯ НА ФАЗЫ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА
В ПОПУЛЯЦИИ ИНТАКТНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ

Концентрация гидрогеля в культуральной среде	Распределение клеток в фазах клеточного цикла, %			Индекс пролиферативной активности, %
	G0/G1	S	M/G2	
0 % (контроль)	80 ± 5	13 ± 3	7 ± 1	20 ± 4
3 %	60 ± 5*	29 ± 4*	10 ± 4	39 ± 5*
1,5 %	65 ± 4*	17 ± 2	19 ± 3*	36 ± 4*
0,75 %	76 ± 2	14 ± 2	10 ± 1	24 ± 2

Примечание. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартного отклонения; * – различия статистически значимы при $p < 0,05$ по сравнению с контролем (0 %).

TABLE 2
THE EFFECT OF HYDROGEL ON THE CELL CYCLE IN INTACT
FIBROBLASTS POPULATION

ТАБЛИЦА 3
ВЛИЯНИЕ ГИДРОГЕЛЯ НА ФАЗЫ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА
В ПОПУЛЯЦИИ ПОВРЕЖДЁННЫХ ФИБРОБЛАСТОВ

Концентрация гидрогеля в культуральной среде	Распределение клеток в фазах клеточного цикла, %			Индекс пролиферативной активности, %
	G0/G1	S	M/G2	
0 % (контроль)	90 ± 2	5 ± 1	5 ± 1	10 ± 1
3 %	55 ± 5*	34 ± 5*	9 ± 2	44 ± 5*
1,5 %	69 ± 4*	16 ± 2*	15 ± 3*	31 ± 4*
0,75 %	77 ± 5*	14 ± 1*	8 ± 4	22 ± 4*

Примечание. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартного отклонения; * – различия статистически значимы при $p < 0,05$ по сравнению с контролем (0 %).

TABLE 3
THE EFFECT OF HYDROGEL ON THE CELL CYCLE
IN DAMAGED FIBROBLASTS POPULATION

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В исследовании оценивали действие композитного коллагенсодержащего гидрогеля ООО «ПЕРВЫЙ ЖИВОЙ КОЛЛАГЕН» на интактные фибробласты и фибробласты, предварительно инкубированные в среде, имитирующей физико-химически условия раневой полости на острой стадии воспаления.

Изучение регенеративного потенциала биоматериалов на основе коллагена является достаточно популярным направлением исследований в области тканевой инженерии и регенеративной медицины [17–20]. При этом следует отметить, что в большинстве *in vitro* исследований используются питательные среды с pH = 7,4, что соответствует физиологическим нормам межтканевой жидкости. Однако при остром течении воспаления кислотность среды в раневом ложе снижается до pH = 5,5–6 [1], что вызывает различного рода дисфункции как на клеточном, так и на тканевом уровне.

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы [2–4, 9, 21] и в то же время расширяют знания и представления о патофизиологических процессах, сопровождающие острые воспалительные реакции. Так, например, в данном исследовании было показано, что в условиях физиологического ацидоза снижается адгезивность и пролиферативная активность фибробластов, а также увеличивается количество клеток в стадии апоптоза (программируемой клеточной гибели). Используемый нами коллагеновый гидрогель восстанавливает как адгезивность, так и пролиферативную активность фибробластов, повреждённых инкубацией в кислой среде.

Молекулярно-клеточные механизмы такого действия в полной мере ещё не исследованы. Можно предположить, что увеличение количества адгезированных клеток обусловлено наличием в коллагене пептидных сайтов связывания, специфичных к интегринам фибробластов [18].

Ранее было показано, что биоматериалы на основе животных и растительных полимеров могут использоваться для замещения кожной ткани и стимуляции процессов репарации и регенерации [22–24]. При этом для повышения регенеративного потенциала биоматериалов в их состав интегрируются стволовые клетки и факторы роста [23, 24].

Полученные в данной работе результаты показывают, что регенеративный потенциал биоматериалов можно увеличивать также и посредством регуляции концентрации биологически активных соединений в составе биоматериала, к которым относится и коллаген [25, 26]. Выявлено, что коллагеновый гидрогель наиболее эффективно восстанавливает функциональную активность фибробластов при 3%-й и 1,5%-й концентрации в культуральной среде. Увеличение концентрации негативно сказывается на жизнеспособности как интактных, так и повреждённых клеток.

Несмотря на полученные обнадеживающие результаты, демонстрирующие способность коллагенсодержащего гидрогеля сохранять функциональную активность

фибробластов в условиях ацидоза, пока не известно, будет ли найденное свойство значимым для усиления репаративной регенерации в условиях *in vivo*, при моделировании острых кожных ран у лабораторных животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, установлено, что при моделировании физиологического ацидоза, характерного для острой стадии воспалительного процесса, функциональная активность фибробластов снижается, что выражается в снижении их адгезивных свойств, замедлении роста клеток и пролиферации, а также в увеличении количества апоптотических клеток в популяции. Полученные нами результаты демонстрируют, что композитный гидрогель, состоящий из гидролизата коллагена и эластина, способен восстанавливать функциональную активность фибробластов, повреждённых в результате воздействия кислой среды, характерной для острой стадии воспаления.

Опираясь на полученные результаты, можно очертить основные направления дальнейших исследований, необходимых для характеристики биофункциональных свойств коллаген-содержащих биоматериалов. Такими направлениями могут быть:

- интеграция коллагенсодержащего гидрогеля с биологически инертными материалами и характеристика структурно-механических и биологических свойств композитного материала в зависимости от концентрации гидрогеля и способа интеграции;
- оценка влияния композитного гидрогеля и содержащих его биоматериалов на функциональную активность и клеточную дифференцировку моноцитов и макрофагов, клеток, регулирующих воспалительно-репаративные процессы и восстановление повреждённых тканей;
- направленная модификация и функционализация известных раневых покрытий, используемых при лечении острых и хронических ран различного генеза;
- характеристика биосовместимости и регенеративного потенциала выбранных биоматериалов на лабораторных животных с использованием моделей кожных ран с острым и хроническим течением воспалительного процесса, острого и хронического воспаления.

Полученные результаты данного исследования и результаты будущих исследований могут быть применены в различных практических областях медицины, таких как хирургия, травматология, комбустиология, дерматовенерология, косметология и т. д. Использование новых функциональных биоматериалов для регенерации кожных покровов позволит уменьшить период восстановления и реабилитации пациентов, а также снизить риск развития длительно незаживающих хронических ран.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Schneider LA, Korber A, Grabbe S, Dissemond J. Influence of pH on wound-healing: A new perspective for wound-therapy? *Arch Dermatol Res.* 2007; 298(9): 413-420. doi: 10.1007/s00403-006-0713-x
- Liu Y, Kalén A, Risto O, Wahlström O. Fibroblast proliferation due to exposure to a platelet concentrate *in vitro* is pH dependent. *Wound Repair Regen.* 2002; 10(5): 336-340. doi: 10.1046/j.1524-475x.2002.10510.x
- Brand A, Singer K, Koehl GE, Kolitzus M, Schoenhammer G, Thiel A, et al. LDHA-associated lactic acid production blunts tumor immunosurveillance by T and NK cells. *Cell Metab.* 2016; 24(5): 657-671. doi: 10.1016/j.cmet.2016.08.011
- Rostamian H, Khakpoor-Koosheh M, Jafarzadeh L, Masoumi E, Fallah-Mehrjardi K, Tavassolifar MJ, et al. Restricting tumor lactic acid metabolism using dichloroacetate improves T cell functions. *BMC Cancer.* 2022; 22(1): 39. doi: 10.1186/s12885-021-09151-2
- Marin E, Bouchet-Delbos L, Renoult O, Louvet C, Nerrière-Daguin V, Managh AJ, et al. Human tolerogenic dendritic cells regulate immune responses through lactate synthesis. *Cell Metab.* 2019; 30(6): 1075-1090.e8. doi: 10.1016/j.cmet.2019.11.011
- Shan T, Chen S, Chen X, Wu T, Yang Y, Li S, et al. M2TAM subsets altered by lactic acid promote T cell apoptosis through the PDL1/PD1 pathway. *Oncol Rep.* 2020; 44(5): 1885-1894. doi: 10.3892/or.2020.7767
- Woodley DT. Distinct fibroblasts in the papillary and reticular dermis: Implications for wound healing. *Dermatol Clin.* 2017; 35: 95-100. doi: 10.1016/j.det.2016.07.004.7
- Lengheden A, Jansson L. pH effects on experimental wound healing of human fibroblasts *in vitro*. *Eur J Oral Sci.* 1995; 103: 148-155. doi: 10.1111/j.1600-0722.1995.tb00016.x
- Quinn WJ 3rd, Jiao J, TeSlaa T, Stadanlick J, Wang Z, Wang L, et al. Lactate limits T cell proliferation via the NAD(H) redox state. *Cell Rep.* 2020; 33(11): 108500. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108500
- Hakimi N, Cheng R, Leng L, Sotoudehfar M, Ba PQ, Bakhtyar N, et al. Handheld skin printer: *In situ* formation of planar biomaterials and tissues. *Lab Chip.* 2018; 18(10): 1440-1451. doi: 10.1039/c7lc01236e
- Regier MC, Montanez-Sauri SI, Schwartz MP, Murphy WL, Beebe DJ, Sung KE. The influence of biomaterials on cytokine production in 3D cultures. *Biomacromolecules.* 2017; 18(3): 709-718. doi: 10.1021/acs.biomac.6b01469
- Sheikholeslam M, Wright ME, Jeschke MG, Amini-Nik S. Biomaterials for skin substitutes. *Adv Healthcare Mat.* 2018; 7: 1002. doi: 10.1002/adhm.201700897
- Cabral LRB, Teixeira LN, Gimenez RP, Demasi APD, de Brito Junior RB, de Araújo VC, et al. Effect of hyaluronic acid and poly-L-lactic acid dermal fillers on collagen synthesis: An *in vitro* and *in vivo* study. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2020; 13: 701-710. doi: 10.2147/CCID.S266015
- Gilmutdinova IR, Kostromina E, Yakupova RD, Eremin PS. Development of nanostructured bioplastic material for wound healing. *Eur J Transl Myol.* 2021; 31: 1-5. doi: 10.4081/ejtm.2021.9388
- Gomez-Gutierrez JG, Bhutiani N, McNally MW, Chuong P, Yin W, Jones MA, et al. The neutral red assay can be used to evaluate cell viability during autophagy or in an acidic microenvironment *in vitro*. *Biotech Histochem.* 2021; 96(4): 302-310. doi: 10.1080/10520295.2020.1802065
- Hwang SJ, Ha GH, Seo WY, Kim CK, Kim K, Lee SB. Human collagen alpha-2 type I stimulates collagen synthesis, wound healing, and elastin production in normal human dermal fibroblasts (HDFs). *BMB Rep.* 2020; 53: 539-544. doi: 10.5483/BMBRep.2020.53.10.120
- Drobnik J, Pietrucha K, Piera L, Szymański J, Szczepanowska A. Collagenous scaffolds supplemented with hyaluronic acid and chondroitin sulfate used for wound fibroblast and embryonic nerve cell culture. *Adv Clin Exp Med.* 2017; 26(2): 223-230. doi: 10.17219/acem/62835
- Huang J, Heng S, Zhang W, Liu Y, Xia T, Ji C, et al. Dermal extracellular matrix molecules in skin development, homeostasis, wound regeneration and diseases. *Semin Cell Dev Biol.* 2022; 128: 137-144. doi: 10.1016/j.semcdb.2022.02.027
- Metwally S, Ferraris S, Spriano S, Krysiak ZJ, Kaniuk Ł, Marzec MM, et al. Surface potential and roughness controlled cell adhesion and collagen formation in electrospun PCL fibers for bone regeneration. *Mater Design.* 2020; 194: 108915. doi: 10.1016/j.matdes.2020.108915
- Xu L, Meng J, Zhang S, Ma X, Wang S. The amplified effect of surface charge on cell adhesion by nanostructures. *Nanoscale.* 2016; 8: 12540-12543. doi: 10.1039/C6NR00649C
- Wolf MT, Daly KA, Brennan-Pierce EP, Johnson SA, Carruthers CA, D'Amore A, et al. A hydrogel derived from decellularized dermal extracellular matrix. *Biomaterials.* 2012; 33(29): 7028-7038. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.06.051
- Mohamed A, Xing M. Nanomaterials and nanotechnology for skin tissue engineering. *Int J Burns Trauma.* 2021; 2: 29-41.
- Sun L, Huang Y, Bian Z, Petrosino J, Fan Z, Wang Y, et al. Sundew-inspired adhesive hydrogels combined with adipose-derived stem cells for wound healing. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016; 8(3): 2423-2434. doi: 10.1021/acsami.5b11811
- Zhang X, Kang X, Jin L, Bai J, Liu W, Wang Z. Stimulation of wound healing using bioinspired hydrogels with basic fibroblast growth factor (bFGF). *Int J Nanomedicine.* 2018; 4(13): 3897-3906. doi: 10.2147/IJN.S168998
- Anderegg U, Halfter N, Schnabelrauch M, Hintze V. Collagen/glycosaminoglycan-based matrices for controlling skin cell responses. *Biol Chem.* 2021; 402(11): 1325-1335. doi: 10.1515/hsz-2021-0176
- Chattopadhyay S, Raines RT. Review collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers.* 2014; 101: 821-833. doi: 10.1002/bip.22486

Сведения об авторах

Марков Павел Александрович – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела биомедицинских технологий, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии» Минздрава России, e-mail: p.a.markov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4803-4803>

Еремин Петр Серафимович – научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии» Минздрава России, e-mail: ereminps@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8832-8470>

Гильмутдинова Ильмира Ринатовна – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела биомедицинских технологий, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии» Минздрава России, e-mail: gilm.ilmira@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6743-2615>

Гребень Анастасия Игоревна – младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии» Минздрава России, e-mail: aik-nastya@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2423-523X>

Костромина Елена Юрьевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии» Минздрава России, e-mail: bioimed07@hotmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9728-7938>

Артемьева Ирина Александровна – креативный директор, ООО «ПЕРВЫЙ ЖИВОЙ КОЛЛАГЕН», e-mail: irina.artemyeva@pmtcollagen.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3559-2435>

Соколов Андрей Сергеевич – директор по проектам, ООО «ПЕРВЫЙ ЖИВОЙ КОЛЛАГЕН», e-mail: sokolov@pmtcollagen.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0685-5109>

Information about the authors

Pavel A. Markov – Cand. Sc (Biol.), Leading Research Officer at the Department of Biomedical Technologies, National Medical Research Center for Rehabilitation and Balneology, e-mail: p.a.markov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4803-4803>

Petr S. Eremin – Research Officer at the Laboratory of Cellular Technologies National Medical Research Center for Rehabilitation and Balneology, e-mail: ereminps@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8832-8470>

Ilmira R. Gilmudinova – Cand. Sc (Med.), Leading Research Officer at the Department of Biomedical Technologies, National Medical Research Center for Rehabilitation and Balneology, e-mail: gilm.ilmira@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6743-2615>

Anastasia I. Greben – Junior Research Officer at the Laboratory of Cellular Technologies, National Medical Research Center for Rehabilitation and Balneology, e-mail: aik-nastya@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2423-523X>

Elena Yu. Kostromina – Cand. Sc. (Biol.), Senior Research Officer at the Laboratory of Cellular Technologies, National Medical Research Center for Rehabilitation and Balneology, e-mail: bioimed07@hotmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9728-7938>

Irina A. Artemyeva – Creative Director, FIRST ALIVE COLLAGEN LLC, e-mail: irina.artemyeva@pmtcollagen.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3559-2435>

Andrey S. Sokolov – Project Director, FIRST ALIVE COLLAGEN LLC, e-mail: sokolov@pmtcollagen.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0685-5109>