

УДК 615.275.4

DOI: 10.14427/jipai.2024.3.102

Исследование пролиферативной активности и экспрессии генов (col1a1, mmp1a, mmp1b, mmp3, vcan, eln) в фибробластах после воздействия препаратов коллагена

М.А. Моржанаева¹, Е.В. Свечникова^{2,3}, Ю.Ю. Бабин⁴, О.В. Старкина⁴¹ ООО «Бьюти Эксперт Медикал», Москва² ФГБУ «Поликлиника №1» Управления делами Президента Российской Федерации, Москва³ Медицинский институт непрерывного образования ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ», Москва⁴ ООО «Мелситек», генетическая лаборатория «Melsytech Genetics», Нижний Новгород

Study of proliferative activity and gene expression (col1a1, mmp1a, mmp1b, mmp3, vcan, eln) in fibroblasts after exposure to collagen preparations

М.А. Morzhanaeva¹, E.V. Svechnikova^{2,3}, Y.Y. Babin⁴, O.V. Starkina⁴¹ LLC «Beauty Expert Medical», Moscow, Russia² "Polyclinic No. 1" Department of presidential Affairs, Moscow, Russia³ Medical Institute of Continuing Education «ROSBIOTECH», Moscow, Russia⁴ LLC «Melsytech», genetics laboratory "Melsytech Genetics", Nizhny Novgorod, Russia

Аннотация

Цель исследования: оценить жизнеспособность и пролиферативную активность фибробластов, а также экспрессию генов (коллаген первого типа (COL1), эластин (ELN), матриксная металлопротеиназа 1-го типа (MMP1), матриксная металлопротеиназа 3-го типа (MMP3) и верзикан (VCAN)) после воздействия шести препаратов коллагена. **Материалы и методы исследования.** Для измерения жизнеспособности, пролиферации и цитотоксичности клеток использовался стандартный МТТ-тест. Экспрессию генов измеряли с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с обратной транскрипцией (RT-rtPCR). **Результаты.** В результате анализа полученных данных мы выявили, что эффективность исследуемых препаратов не зависит от концентрации коллагена в конечном растворе. Так, по результатам МТТ (метилтиазолилдифенил-тетразолиум бромид)-теста наибольшая пролиферативная активность наблюдалась для фибробластов, которые обрабатывали препаратом Collost micro. Для препарата Linerage через 48 часов наблюдается более высокая экспрессия коллагена по сравнению с остальными препаратами. Необходимо отметить отсутствие экспрессии гена mmp1 спустя 24 часа во всех образцах кроме проб, обработанных препаратами Collapro30+ и Collapro55+. Спустя 48 часов после обработки клеток экспрессия гена mmp1 детектировалась только в образце, обработанном препаратом Linerage. Результаты попарного сравнения отличий экспрессии между группами по гену MMP3 (24 часа и 48 часов после инкубации) выявлено не было. Также в образцах, обработанных препаратами Collapro30+,

Summary

The aim of the study was to evaluate the viability and proliferative activity of fibroblasts, as well as gene expression (collagen type 1 (COL1), elastin (ELN), matrix metalproteinase type 1 (MMP1), matrix metalproteinase type 3 (MMP3) and versican (VCAN)) after exposure to six different collagen preparations - dermal fillers.

Materials and methods. The standard MTT test was used to measure cell viability, proliferation and cytotoxicity. Gene expression was measured using real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-rtPCR).

Results. The results obtained showed that the effectiveness of the studied drugs does not depend on the concentration of collagen in the final solution. When performing the MTT test, the greatest proliferative activity was observed for fibroblasts incubated with the Collost micro drug. For the Linerage drug, after 48 hours, a higher expression of collagen was observed compared to other drugs. It should be noted that there was no expression of the mmp1 gene after 24 hours in all samples except those treated with Collapro30+ and Collapro55+. Based on the results of pairwise comparison, no significant differences between groups in MMP3 gene expression (24 hours and 48 hours after incubation) were revealed. Also, in samples treated with Collapro30+, Collapro45+ and Collapro55+, versican is expressed at a higher level on the first day of the study. In turn, on the second day, versican is expressed at a higher level in the Collapro45+ and Linerage preparations.

Collapro45+ и Collapro55+, верзикан экспрессируется на более высоком уровне на первые сутки исследования. В свою очередь на вторые сутки верзикан экспрессируется на более высоком уровне у препаратов Collapro45+ и Linerase.

Ключевые слова

коллаген, эластин, верзикан, матриксная металлопротеиназа, экспрессия генов, фибробласты, дермальные филлеры.

Введение

Дерма, которая обеспечивает структурную поддержку сосудистой системы кожи, придатков и эпидермиса, состоит по большей части из внеклеточного матрикса. Внеклеточный матрикс образован различными белками, протеогликанами и гликозаминогликанами, которые в основном секретируются фибробластами [1]. Коллаген типа I является самым распространённым белком в коже человека. Он составляет более 90% от её сухого веса. Уникальные физические свойства коллагеновых волокон придают коже структурную целостность. Фибриллярные коллагены типа I, III и V самостоятельно собираются в более крупные коллагеновые волокна, которые образуют трёхмерную структурную сеть по всей дерме [2].

Все фибриллярные коллагены состоят из трёх полипептидных цепей, обвитых друг вокруг друга в тройной спиральной конфигурации. Каждая полипептидная цепь изначально синтезируется с дополнительными аминокислотами на обоих концах, которые обеспечивают растворимость [1]. Растворимая тройная спираль, которая называется проколлагеном, собирается внутри фибробластов, затем он секретируется из фибробластов, а пептидные концы удаляются двумя ферментами во внеклеточном пространстве [3]. Удаление концов производит коллаген, который спонтанно собирается (т. е. созревает) в большие волокна, которые затем ферментативно сшиваются [4].

Существуют факторы, которые влияют на выработку коллагена фибробластами и на скорость его разрушения ферментами. Таким фактором является механическое напряжение и воздействие на кожу ультрафиолета (отсутствие механического растяжения фибробластов координированно увеличивает выработку коллагеназы и уменьшает выработку коллагена). Кроме того, даже кратковременное УФ-облучение снижает выработку коллагена примерно на 80% и увеличивает уровень матричных металлопротеиназ в сотни раз [1,5–8].

Одним из подходов в косметологии, применяемых для активации выработки коллагена и улучшения состояния стареющей кожи в целом, является применение коллагеновых пептидов и

Keywords

collagen, elastin, versican, matrix metalloproteinase, gene expression, fibroblasts, dermal fillers.

самого коллагена как в качестве пищевой добавки, так и в виде инъекций. Коллагены выделяют в основном из тканей животных, пептиды получают путём ферментативного гидролиза коллагена, в результате которого крупные молекулы коллагена распадаются. Ограниченные исследования *in vitro* продемонстрировали потенциальную пользу пептидов коллагена в отношении увеличения пролиферации фибробластов. В ответ на них клетки, такие как фибробласты, могут вырабатывать коллаген самостоятельно, хотя регуляция этого механизма ещё не до конца изучена. В свете научных данных о пользе коллагена и коллагеновых пептидов для здоровья кожи фибробласты являются наиболее распространённым типом клеток в соединительной ткани и используются для поддержания структурного каркаса кожи. Кроме того, они играют важную роль в регенерации кожи. Поэтому исследования, направленные на изучение последствий воздействия на них экзогенным коллагеном, являются актуальными [9,10].

Цель исследования: оценить жизнеспособность и пролиферативную активность фибробластов, а также экспрессию генов (коллаген первого типа (COL1), эластин (ELN), матриксная металлопротеиназа 1-го типа (MMP1), матриксная металлопротеиназа 3-го типа (MMP3) и верзикан (VCAN)) после воздействия препаратов коллагена (Collost micro, Linerase, Nithya, Collapro30+, Collapro45+ и Collapro55+).

Материалы и методы исследования

Подготовка препаратов к исследованию

В работе были использованы коммерческие препараты коллагенов (таблица 1). Препараты разводили стерильным физиологическим раствором, если это требовалось согласно инструкции.

Оценка жизнеспособности и пролиферации фибробластов

Стандартный МТТ-тест использовался для измерения жизнеспособности и пролиферации клеток, а также эффекта цитотоксичности. Этот

Таблица 1. Препараты коллагенов и их характеристики

Название	Заявленный производителем состав	Количество коллагена во флаконе, г	Концентрация коллагена в препарате после разведения согласно инструкции, мг/мл
Collost® micro	Коллаген I типа микронизированный	0,15	30
Linerase®	Гидролизированный гетерологичный коллаген I типа	0,1	20
Nithya®	Микрочастицы коллагена гетерологического I типа	0,07	14
Collapro® 30+	Коллаген рыб 10%, олигопептиды коллагена, гиалуроновая кислота 1% (молекулярная масса 800–1500 кДа), аминокислоты (24 вида), витамины (14 видов) минералы (8 видов), коэнзимы, вода	–	–
Collapro® 45+	Коллаген рыб 15%, олигопептиды коллагена, гиалуроновая кислота 1% (молекулярная масса 800–1500 кДа), аминокислоты (24 вида), витамины (14 видов) минералы (8 видов), коэнзимы, вода	–	–
Collapro® 55+	Коллаген рыб 20%, олигопептиды коллагена, гиалуроновая кислота 1% (молекулярная масса 800–1500 кДа), аминокислоты (24 вида), витамины (14 видов) минералы (8 видов), коэнзимы, вода	–	–

колориметрический метод основан на восстановлении метаболически активными клетками жёлтой соли тетразолия (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид или МТТ) до фиолетовых кристаллов формазана. Жизнеспособные клетки содержат ферменты NAD(P)H-зависимой оксидоредуктазы, которые восстанавливают МТТ до формазана. С помощью солюбилизирующего раствора нерастворимые кристаллы формазана растворяют. Полученный окрашенный раствор оценивают количественно с помощью измерения абсорбции на микропланшетном ридере. Для проведения МТТ-анализа клетки фибробластов линии L929 культивировали в течение ночи при плотности 10 000 клеток/лунку в 96-луночном планшете в среде DMEM, содержащей 10% сыворотки. Через 24 ч клетки обрабатывали исследуемыми препаратами в различных разведениях. Через 24 ч инкубации среду удаляли, лунки промывали фосфатно-буферным солевым раствором (PBS) и добавляли в каждую лунку раствор МТТ в концентрации 0,5 мкг/мл. Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 18 ч. По истечении времени инкубации в лунки вносили диметилсульфоксид для солюбилизации кристаллов формазана перед измерением абсорбции при 570 нм. Для

проведения МТТ-анализа использовали 6 технических повторов для каждого разведения препарата и 18 для контроля.

Оценка экспрессии генов

Для оценки экспрессии генов после инкубации с препаратами коллагенов фибробласты высаживали в 6-луночные планшеты. В каждой лунке находилось по 200 000 клеток. Далее клетки инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 24 ч или 48 ч в среде DMEM. После инкубации заменяли среду, добавляли исследуемые препараты (соотношение среда/препарат 1:1) и продолжали инкубацию в течение 18 ч при 37°C, 5% CO₂. По окончании инкубации клетки отмывали от среды и снимали с культурального планшета с помощью раствора Версена (ПанЭко, Россия).

Экспрессию генов измеряли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с обратной транскрипцией (RT-rtPCR). Использовали праймеры для амплификации следующих генов: коллаген первого типа (COL1), эластин (ELN), матриксная металлопротеиназа 3-го типа (MMP3), матриксная металлопротеиназа 1-го типа (MMP1) и верзикан (VCAN). Отбор образцов клеточных культур проводили спустя 24 часа и 48 часов после внесения

препаратов. Из образцов клеток выделяли РНК с помощью набора SoloRNA kit (Evrogen, Russia) согласно инструкции производителя. Количество и качество очищенной РНК определяли с помощью спектрофотометра (Implen, Germany). Перед проведением обратной транскрипции РНК нормализовали в каждом образце до одинаковых значений. Обратную транскрипцию проводили с помощью набора MMLV RT kit (Evrogen, Russia). Количественную ПЦР выполняли на амплификаторе QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific, USA) с набором для проведения ПЦР (Evrogen, Russia). Относительную экспрессию генов анализировали по методике, описанной в работе Vandesompele et al., 2002. Образцы исследовали в трёх повторностях. Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения JASP (<https://jasp-stats.org/>) и пакетов Python scipy и seaborn. Первичный анализ данных проводили с помощью дисперсионного анализа. По результатам дисперсионного анализа проводили оценку различий между группами (между разными препаратами) с помощью критерия Стьюдента, для тех случаев, где полученное значение p было менее 0,05.

Результаты и их обсуждение

При визуальном наблюдении через 24 часа инкубации с препаратами коллагена не всегда клетки формировали монослой (рис. 1). Например, препараты линейки Collapro (рис. 1. Д-Ж), видимо, подавляли метаболизм фибробластов, что приводило к снижению скорости их деления. Для препаратов Collost и Linerase такого эффекта

не наблюдалось (рис. 1 Б, В). Из-за наличия крупных частиц коллагена в растворе мы испытывали сложности при визуализации клеток, инкубированных с препаратом Nithya (рис. 1 Г).

Полученные результаты подтвердились при проведении МТТ-теста. Согласно полученным данным, наибольшая пролиферативная активность наблюдалась для фибробластов, инкубированных с препаратом Collost micro (рис. 2). Статистически значимое увеличение метаболической активности клеток при добавлении препарата Collost micro в среду наблюдалось при использовании его в низких концентрациях (при 6,25% и 3,125% $p < 0,05$ и при содержании 1,552% препарата в среде – $p < 0,001$), но и в образцах, где присутствовало 25% препарата, метаболическая активность клеток была статистически значимо выше ($p < 0,05$), в то время как все остальные препараты, за исключением Linerase, подавляли метаболизм клеток при содержании в культуральной среде 25% и выше (рис. 2).

Чтобы исключить влияние концентрации основного действующего вещества – коллагена – в препаратах, исходное сухое содержимое флаконов препаратов Collost micro, Linerase и Nithya было растворено в таком объёме стерильного 0,9% раствора NaCl. Таким образом, концентрация растворов препаратов находилась в соответствии с теми конечными концентрациями коллагена, которые находились во флаконах каждого из этих препаратов (30 мг/мл как в препарате Collost micro, 20 мг/мл – как в препарате Linerase, 14 мг/мл – как в препарате Nithya). Препараты Collapro 30+, Collapro 45+, Collapro 55+ из

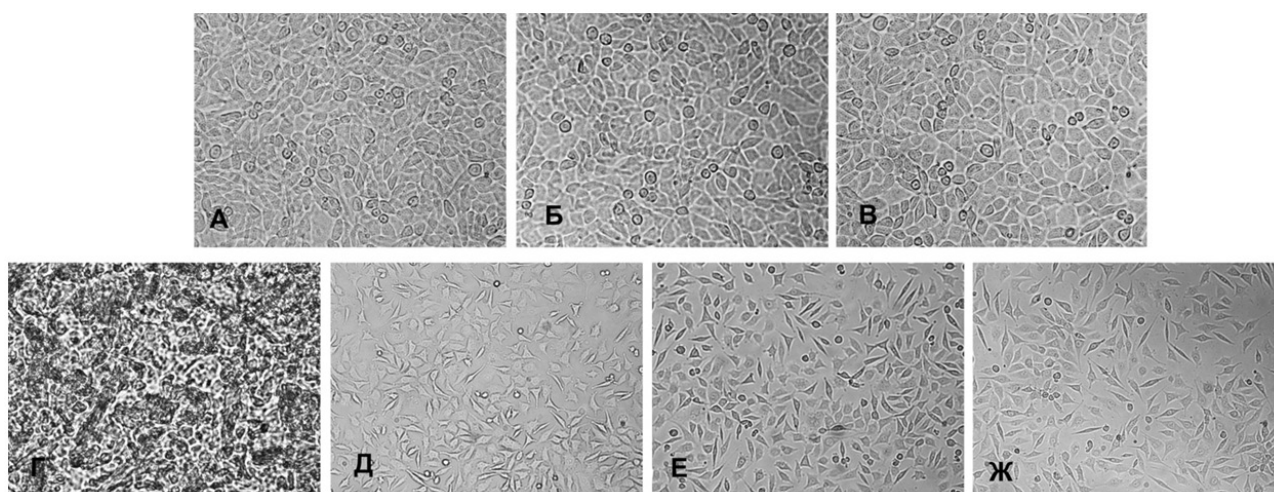


Рис. 1. Микрофотографии фибробластов линии L929 через 24 часа после инкубации с препаратами коллагена в концентрации, рекомендованной для использования производителем: А – 0,9% NaCl (контроль), Б – Collost micro, В – Linerase, Г – Nithya, Д – Collapro 30+, Е – Collapro 45+, Ж – Collapro 55+

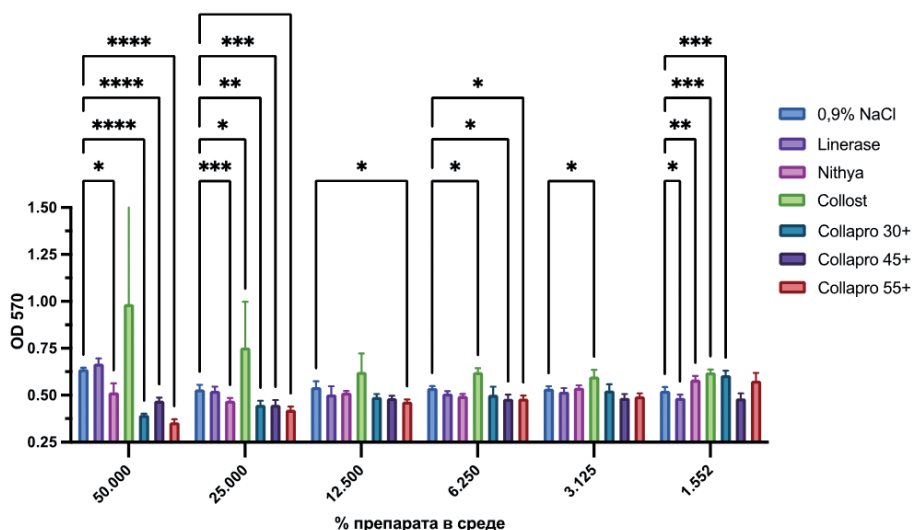


Рис. 2. Метаболическая активность фибробластов линии L929, оценённая колориметрически с помощью МТТ-теста после инкубации с препаратами коллагена в разной концентрации (статистика: многофакторный дисперсионный анализ, критерий Даннета для множественных сравнений, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$)**

данного эксперимента исключили, поскольку они поставляются уже в разведённом виде.

Результаты анализа показали, что эффективность исследуемых препаратов не зависит от концентрации коллагена в конечном растворе. Так, увеличение концентрации препарата Linerase оказывало подавляющее действие на пролиферативную активность фибробластов, в то же время увеличение концентрации препарата Nithya не оказывало такого воздействия (рис. 3).

Результаты анализа экспрессии генов

Экспрессия указана в кратном выражении. Например, если экспрессия в первом образце составляет 2, а во втором 1, это означает, что количество транскриптов (количество молекул мРНК), синтезированных с этого гена в два раза больше в первом образце по сравнению со вторым. Обозначения на графиках: К – контрольный образец, С – Collost micro, N – Nithya, L – Linerase, Cp30+ – Collapro30+, Cp45+ – Collapro45+, Cp55+ – Collapro55+.

Необходимо отметить отсутствие экспрессии гена *tmpr1* спустя 24 часа во всех образцах кроме проб, обработанных препаратами Collapro30+ и Collapro55+ (рис. 4). Кроме того, даже в этих образцах количество целевой мРНК было небольшим, близким к пороговому уровню детекции.

Результаты анализа экспрессии генов

Экспрессия указана в кратном выражении. Например, если экспрессия в первом образце составляет 2, а во втором 1, это означает, что коли-

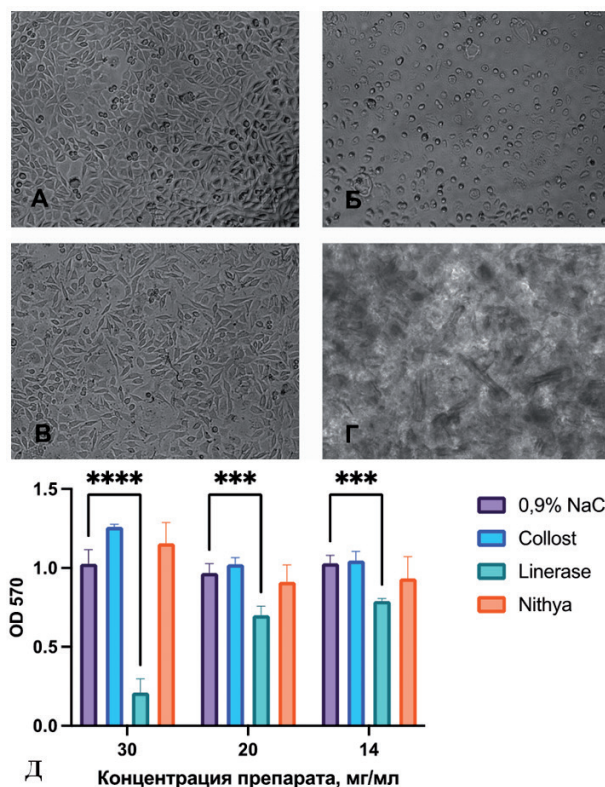


Рис. 3. Микрофотографии фибробластов линии L929 через 24 часа после инкубации с препаратами коллагена в концентрации 30 мг/мл: А – контроль, Б – Collost micro, В – Linerase, Г – Nithya, Д – метаболическая активность фибробластов линии L929 после добавления к ним препаратов коллагена (30, 20 и 14 мг/мл), оценённая колориметрически с помощью МТТ-теста после инкубации с препаратами коллагена в разной концентрации (многофакторный дисперсионный анализ, критерий Даннета для множественных сравнений, * $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$)**

чество транскриптов (количество молекул мРНК), синтезированных с этого гена в два раза больше в первом образце по сравнению со вторым. Обозначения на графиках: К – контрольный образец, С – Collost micro, N – Nithya, L – Linerase, Cp30+ – Collapro30+, Cp45+ – Collapro45+, Cp55+ – Collapro55+.

Необходимо отметить отсутствие экспрессии гена *mmp1* спустя 24 часа во всех образцах кроме проб, обработанных препаратами Collapro30+ и Collapro55+ (рис. 4). Кроме того, даже в этих образцах количество целевой мРНК было небольшим, близким к пороговому уровню детекции.

Спустя 48 часов после обработки клеток, экспрессия гена *mmp1* наблюдалась только в образце, который инкубировали с препаратом Linerase (рис. 5).

По результатам дисперсионного анализа значимые отличия между группами (клетками, обработанными разными препаратами) наблюдались для гена *mmp3* (металлопротеиназа первого типа) в образцах, отобранных спустя 24 часа после инкубации, и для генов *col1* (коллаген первого типа) и *vcap* (верзикан) в образцах, отобранных спустя 48 часов после инкубации (таблица 2). Далее для этих генов проводили попарное сравнение всех групп с использованием критерия Стьюдента (таблицы 3 и 4).

По результатам попарного сравнения значимых отличий между группами по экспрессии гена MMP3 (24 часа после инкубации) выявлено не было (рис. 6).

Спустя 48 часов после обработки клеток экспрессия гена *mmp3* наблюдалась только в образце, который инкубировали с препаратом Linerase. Похожая картина наблюдалась спустя 24 часа для гена *mmp3*. Здесь экспрессия гена детектировалась в образцах, обработанных пре-

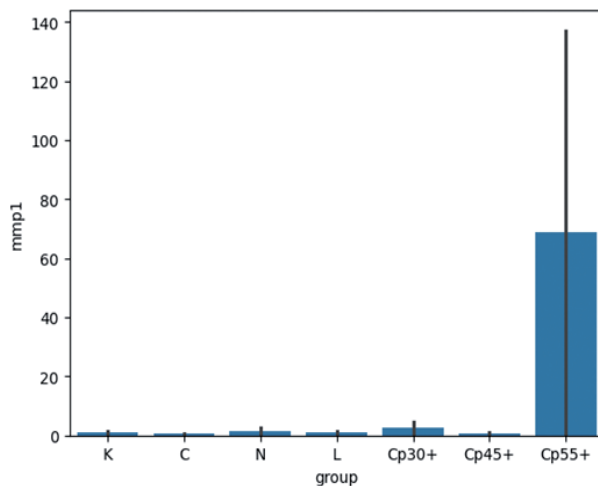


Рис. 4. Относительная экспрессия металлопротеиназы первого типа, 24 часа после инкубации

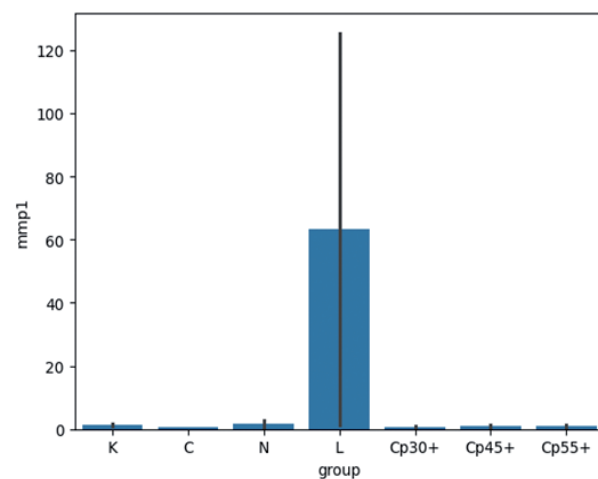


Рис. 5. Относительная экспрессия металлопротеиназы первого типа, 48 часов после инкубации

Таблица 2. Результаты дисперсионного анализа

Время отбора образца	Ген	Значение p
24 часа	Col1	0,264
	MMP1	0,476
	ELN	0,525
	VCAN	0,346
	MMP3	0,005*
48 часов	Col1	0,016*
	MMP1	0,457
	ELN	0,424
	VCAN	0,038*

Таблица 3. Результаты попарного сравнения экспрессии генов в образцах (24 часа после обработки образцов препаратами)

Ген	Группа 1	Группа 2	Значение p
mmp3	контроль	Collost micro	0,1685
	контроль	Nithya	0,3714
	контроль	Linerase	0,9652
	контроль	Collapro30+	0,3082
	контроль	Collapro45+	0,2544
	контроль	Collapro55+	0,0817
	Collost micro	Nithya	0,3702
	Collost micro	Linerase	0,2262
	Collost micro	Collapro30+	0,8326
	Collost micro	Collapro45+	0,2543
	Collost micro	Collapro55+	0,0817
	Nithya	Linerase	0,3715
	Nithya	Collapro30+	0,3703
	Nithya	Collapro45+	0,3107
	Nithya	Collapro55+	0,0824
	Linerase	Collapro30+	0,3457
	Linerase	Collapro45+	0,2544
	Linerase	Collapro55+	0,0817
	Collapro30+	Collapro45+	0,2543
	Collapro30+	Collapro55+	0,0817
	Collapro45+	Collapro55+	0,0877

препаратами Nithya, Collapro45+ и Collapro55+. Через 48 часов после инкубации экспрессия гена mmp3 не наблюдалась ни в одном образце.

Попарное сравнение экспрессии по гену коллагена первого типа (24 часа после инкубации) выявило значимое отличие образцов, обработанных препаратами Collost micro, Collapro55+, Nithya и Linerase от контрольного образца. Экспрессия гена коллагена первого типа в данных

образцах была ниже по сравнению с контролем (рис. 7).

Попарное сравнение экспрессии по гену коллагена первого типа (48 часов после инкубации) выявило значимое отличие образцов, обработанных препаратами Collost micro, Collapro30+, Collapro45+ и Collapro55+, от контрольного образца. Экспрессия гена коллагена первого типа в данных образцах была ниже по сравнению с кон-

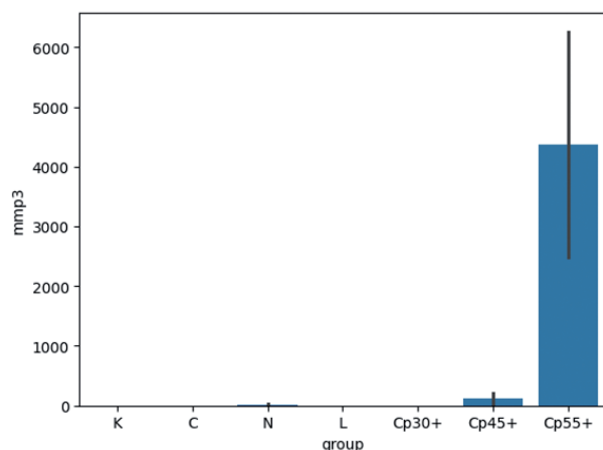


Рис. 6. Относительная экспрессия металлопротеиназы третьего типа, 24 часа после инкубации

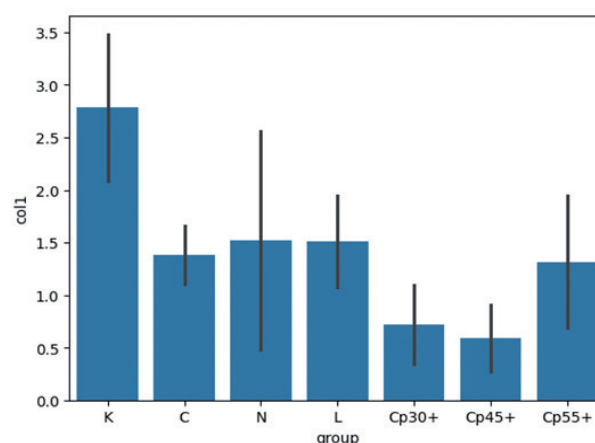


Рис. 7. Относительная экспрессия коллагена первого типа, 24 часа после инкубации

Таблица 4. Результаты попарного сравнения экспрессии генов в образцах (48 часов после обработки образцов препаратами)

Ген	Группа 1	Группа 2	Значение p
Col1	контроль	Collost micro	0,034*
	контроль	Nithya	0,0924
	контроль	Linerase	0,2331
	контроль	Collapro30+	0,0306*
	контроль	Collapro45+	0,0387*
	контроль	Collapro55+	0,0277*
	Collost micro	Nithya	0,6741
	Collost micro	Linerase	0,2366
	Collost micro	Collapro30+	0,5059
	Collost micro	Collapro45+	0,8327
	Collost micro	Collapro55+	0,3429
	Nithya	Linerase	0,4924
	Nithya	Collapro30+	0,5176
	Nithya	Collapro45+	0,6339
	Nithya	Collapro55+	0,4664
	Linerase	Collapro30+	0,1893
	Linerase	Collapro45+	0,2413
	Linerase	Collapro55+	0,1692
	Collapro30+	Collapro45+	0,7958
	Collapro30+	Collapro55+	0,8712
Collapro45+	Collapro55+	0,6876	
vcan	контроль	Collost micro	0,0235*
	контроль	Nithya	0,0211*
	контроль	Linerase	0,0719
	контроль	Collapro30+	0,0724
	контроль	Collapro45+	0,2848
	контроль	Collapro55+	0,0698
	Collost micro	Nithya	0,4201
	Collost micro	Linerase	0,1249
	Collost micro	Collapro30+	0,4584
	Collost micro	Collapro45+	0,261
	Collost micro	Collapro55+	0,3359
	Nithya	Linerase	0,0993
	Nithya	Collapro30+	0,329
	Nithya	Collapro45+	0,2111
	Nithya	Collapro55+	0,2379
	Linerase	Collapro30+	0,7365
	Linerase	Collapro45+	0,6146
	Linerase	Collapro55+	0,7927
	Collapro30+	Collapro45+	0,5123
	Collapro30+	Collapro55+	0,9285
Collapro45+	Collapro55+	0,5356	

тролем (рис. 8). При этом для препарата Linerase через 48 часов наблюдается более высокая экспрессия коллагена по сравнению с остальными препаратами (рис. 9).

Сравнение экспрессии по гену верзикана (24 часа после инкубации) выявило значимое отличие образцов, обработанных препаратами Collarpro30+ и Collarpro55+, и была значительно больше, чем контрольный и другие образцы (рис. 9).

Сравнение экспрессии по гену верзикана (48 часов после инкубации) выявило значимое отличие образцов, обработанных препаратами Collost и Nithya, от контрольного образца. Как и в случае с коллагеном, в данных образцах наблюдалась более низкая экспрессия верзикана по сравнению с контролем (рис. 10). Однако для препаратов Linerase и Collarpro45+ через 48 часов

наблюдается более высокая экспрессия верзикана по сравнению с остальными препаратами.

Сравнение экспрессии по гену эластину (24 часа после инкубации) выявило значимое отличие образцов, обработанных препаратами, от контрольного образца. В данных образцах наблюдалась более низкая экспрессия эластина по сравнению с контролем (рис. 11).

Однако для препаратов Collarpro45+ через 48 часов наблюдается более высокая экспрессия эластина по сравнению с контрольным образцом и остальными препаратами (рис. 12).

Выявленные значения относительной экспрессии генов соответствуют значениям, полученным ранее в похожих работах [11].

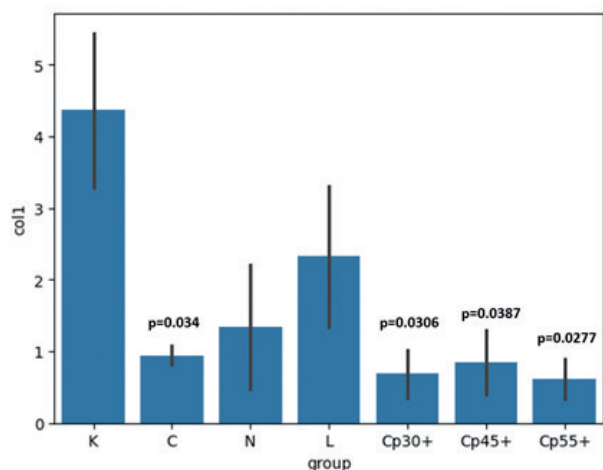


Рис. 8. Относительная экспрессия коллагена первого типа, 48 часов после инкубации

На рисунке указаны значения $p < 0,05$ относительно контроля

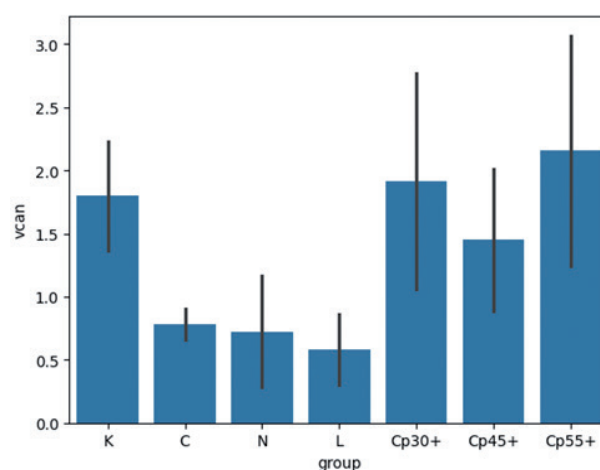


Рис. 9. Относительная экспрессия верзикана, 24 часа после инкубации

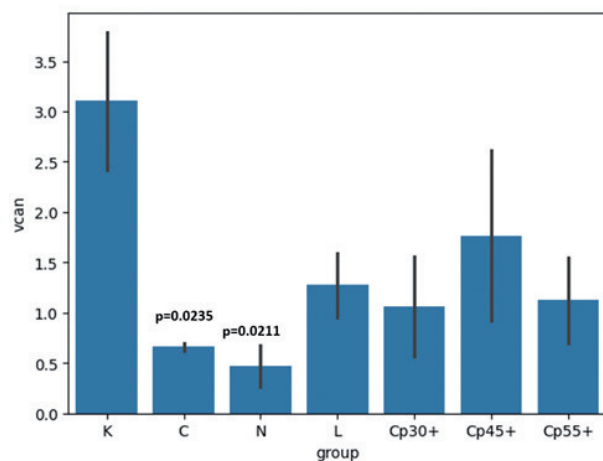


Рис. 10. Относительная экспрессия верзикана, 48 часов после инкубации

На рисунке указаны значения $p < 0,05$ относительно контроля

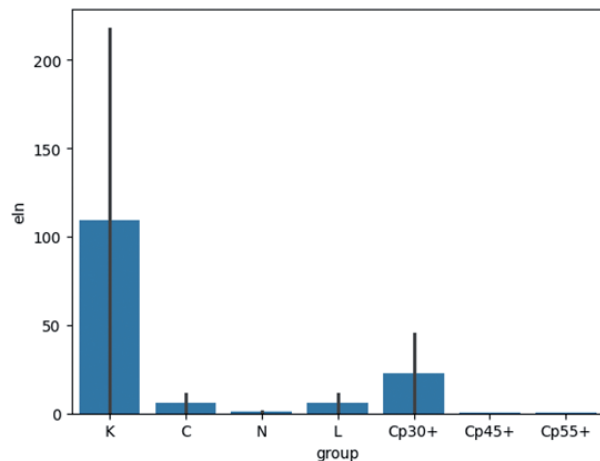


Рис. 11. Относительная экспрессия эластина, 24 часа после инкубации

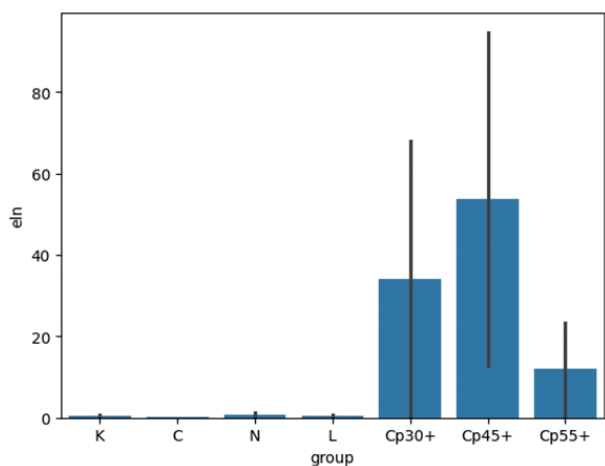


Рис. 12. Относительная экспрессия эластина, 48 часов после инкубации

Выводы

1. При исследовании препаратов в МТТ-тесте мы выявили следующую тенденцию: эффективность исследуемых препаратов находится в обратной зависимости от концентрации коллагена в конечном растворе, что подтверждается другими исследованиями [12]. Например, при увеличении концентрации препарата Linerase он оказывал подавляющее действие на пролиферативную активность фибробластов, но при этом нужно отметить, что препарат Nithya при увеличении его концентрации не оказывал подобного воздействия (рис. 3). Можно предположить, что это происходит из-за того, что концентрация препарата Linerase составляет 100 мг, а концентрация Nithya 70 мг, что на 30% ниже. Однако препараты линейки Collapro (рис. 1. Д-Ж) подавляют метаболизм фибробластов, что приводит к снижению скорости их деления. Подобный эффект угнетения фибробластов вероятнее всего связан с многокомпонентностью препаратов Collapro и избыточным накоплением продуктов распада.

При использовании в низких концентрациях статистически значимое увеличение метаболической активности клеток наблюдалось при добавлении в среду препарата Collost micro (при 6,25%

и 3,125% $p < 0,05$ и при содержании 1,552% препарата в среде – $p < 0,001$). Также в образцах, где присутствовало 25% препарата, метаболическая активность клеток также была статистически значимо выше ($p < 0,05$), что говорит о сохранении высокой дозировки коллагена даже при разведении препарата и о высокой способности стимулировать фибробласты к пролиферации при снижении концентрации препарата Collost.

Также можно сделать вывод, что при снижении концентрации препаратов их эффективность на клеточной линии растёт (рис. 2). При соотношении препаратов в среде 1.552 Linerase достоверно ниже контроля (не стимулирует рост клеток), препараты Nithya, Collost micro, Collapro30+ достоверно выше контроля (стимулируют рост клеток), Collapro45+ и Collapro55+ находятся на равном уровне с контролем (рис. 2).

Таким образом, мы подтвердили находку, ранее описанную в литературе: зависимость стимуляции клеток препаратами не находится в линейной зависимости от концентрации коллагена [12]. При этом, так как целью было исследование препаратов в рабочей концентрации (заявленной производителем), на измерение экспрессии мы взяли образец с самой высокой концентрацией (рис. 2, 50 процентов препарата в среде).

Однако остальные препараты, за исключением Linerase, подавляли метаболизм клеток при содержании в культуральной среде 25% и выше. Полученные данные свидетельствуют об относительной безопасности препаратов в заданной производителем дозировке и об отсутствии необходимости повышения концентрации с целью увеличения пролиферативной активности фибробластов.

2. При анализе экспрессии генов не было выявлено более высоких по сравнению с контролем значений экспрессии в образцах, обработанных препаратами. Снижение экспрессии генов согласуется с данными, полученными с помощью МТТ-теста. В используемой концентрации ни один из препаратов не активировал метаболиче-

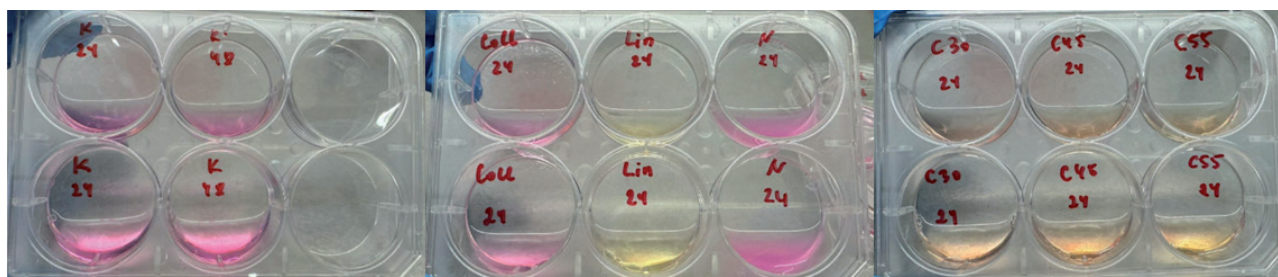


Рис. 13. Изменение цвета среды для культивирования фибробластов, содержащей кислотно-основный индикатор феноловый красный, после добавления препаратов коллагена. О снижении pH свидетельствует жёлтое окрашивание

скую активность и пролиферацию фибробластов (см. рис. 2, % препарата в среде 50,000). Такая особенность может быть связана с изменением свойств питательной среды для культивирования. Это предположение подтверждает тот факт, что при добавлении в питательную среду некоторых исследованных препаратов коллагена стандартная полная среда для культивирования закислялась, о чём можно судить по изменению цвета содержащегося в ней фенолового красного (среда становилась жёлтой) (рис. 13). Поэтому статистически значимое снижение экспрессии генов относительно контроля нельзя интерпретировать как негативный эффект исключительно от воздействия коллагена, содержащегося в препаратах. Таким образом, он может быть связан с изменением свойств питательной среды.

Полученные нами результаты являются отправной точкой для поиска оптимальной концентрации препаратов. Так, в литературе существует мнение, что для точного измерения экспрессии необходимо подбирать наиболее эффективную концентрацию для каждого препарата по отдельности в тесте МТТ [12], но в таком случае она не будет равна концентрации, заданной производителем (возможно, необходимо подбирать наименьшую эффективную концентрацию, чтобы снизить влияние буфера и других веществ в составе препаратов).

Литература

1. Fitzpatrick TB. *Dermatology in General Medicine*. McGraw-Hill, Health Professions Division, 1993.
2. Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, et al. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med*. 1997;337(20):1419-1428. doi:10.1056/NEJM199711133372003.
3. Bornstein P. The biosynthesis of collagen. *Annu Rev Biochem*. 1974;43(1):567-603.
4. Siegel RC. Lysyl oxidase. *Int Rev Connect Tissue Res*. 1979;8:73-118.
5. Jariashvili K, Madhan B, Brodsky B, et al. UV damage of collagen: insights from model collagen peptides. *Biopolymers*. 2012;97(3):189-198. doi:10.1002/bip.21725.
6. Liu J, Yu W, Liu Y, et al. Mechanical stretching stimulates collagen synthesis via down-regulating SO2/AAT1 pathway. *Sci Rep*. 2016;6:21112. Published 2016 Feb 16. doi:10.1038/srep21112.
7. Varani J, Spearman D, Perone P, et al. Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen in vitro. *Am J Pathol*. 2001;158(3):931-942. doi:10.1016/S0002-9440(10)64040-0.
8. Varani J, Dame MK, Rittie L, et al. Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. *Am J Pathol*. 2006;168(6):1861-1868. doi:10.2353/ajpath.2006.051302.
9. Edgar S, Hopley B, Genovese L, et al. Effects of collagen-derived bioactive peptides and natural antioxidant compounds on proliferation and matrix protein synthesis by cultured normal human dermal fibroblasts. *Sci Rep*. 2018;8(1):10474. doi:10.1038/s41598-018-28492-w.
10. Inacio PAQ, Chaluppe FA, Aguiar GF, et al. Effects of Hydrolyzed Collagen as a Dietary Supplement on Fibroblast Activation: A Systematic Review. *Nutrients*. 2024;16(11):1543. doi:10.3390/nu16111543.
11. Ohara H, Ichikawa S, Matsumoto H, et al. Collagen-derived dipeptide, proline-hydroxyproline, stimulates cell proliferation and hyaluronic acid synthesis in cultured human dermal fibroblasts. *J Dermatol*. 2010;37(4):330-338. doi:10.1111/j.1346-8138.2010.00827.x.
12. Dierckx S, Patrizi M, Merino M, et al. Collagen peptides affect collagen synthesis and the expression of collagen, elastin, and versican genes in cultured human dermal fibroblasts. *Front Med (Lausanne)*. 2024;11:1397517. doi:10.3389/fmed.2024.1397517.

Сведения об авторах

Свечникова Елена Владимировна – д.м.н., профессор кафедры кожных и венерических болезней ФГБОУ ВО «Российский Биотехнологический Университет (РОС-БИОТЕХ)», зав. отделением дерматовенерологии и косметологии в ФГБУ «Поликлиника № 1» Управления делами Президента Российской Федерации. 125080, г. Москва, Волоколамское шоссе, д. 11. E-mail: elene-elene@bk.ru. ORCID: 0000-0002-5885-4872.

Моржанаева Мария Андреевна – врач-косметолог, дерматолог, главный врач клиники Скин арт. E-mail: maria_morzhanaeva@mail.ru. ORCID: 0000-0001-8657-9559.

Бабин Юрий Юрьевич – руководитель лаборатории молекулярной биологии, ООО «Мелситек». E-mail: babin.yurii@gmail.ru. ORCID: 0000-0002-7524-5921.

Старкина Ольга Васильевна – руководитель лаборатории биотехнологии, ООО «Мелситек». E-mail: starkina@melsytech.com. ORCID: 0000-0002-0896-1450.

Поступила 28.08.2024.