

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА

УДК 57.086.835

© Коллектив авторов, 2019

Л.Ю. Орехова¹, Р.Р. Фархшатов², Л.П. Герасимова²,
М.Ф. Кабилова², К.В. Данилко², Р.Р. Хайбуллина², И.В. Машкина³
**IN VITRO-АНАЛИЗ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК
НА КОЛЛАГЕНОВОМ 3D-МАТРИКСЕ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ
МЯГКИХ ТКАНЕЙ ПОЛОСТИ РТА**

¹ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

² ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет»
Минздрава России, г. Уфа

³ООО «Дина Медсервис», г. Уфа

Цель работы: сравнительный анализ сочетанного применения препаратов активированной аутоплазмы, гиалуроновой кислоты и коллагенового 3D-матрикса in vitro.

Материал и методы. Для эксперимента использовали фибробласты из легких эмбриона человека. Оценивалась пролиферативная активность фибробластов в присутствии активированной плазмы, препарата гиалуроновой кислоты и коллагенового 3D-матрикса Fibromatrix для регенерации мягких тканей полости рта. Оценку цитотоксичности и пролиферативной активности проводили через 1, 3 и 7 суток посредством колориметрического МТТ-теста. Результаты регистрировались с помощью микроскопического исследования и фотографирования в проходящем свете.

Результаты. Было установлено, что стабильный активный рост фибробластов наблюдался при сочетанном использовании коллагенового 3D-матрикса и активированной плазмы. Препарат на основе гиалуроновой кислоты способствует пролиферации фибробластов человека, однако активность препарата снижается, ингибируя рост клеток к 7-м суткам.

Заключение. Представленные результаты демонстрируют перспективность применения комбинации аутогенной тромбоцитарной плазмы и коллагенового 3D-матрикса для регенерации мягких тканей полости рта в клинической практике.

Ключевые слова: регенерация, пролиферация фибробластов, рецессия десны, хирургическое лечение десневой рецессии, тромбоцитарная аутогенная плазма, коллагеновый матрикс, гиалуроновая кислота.

L. Yu. Orekhova, R.R. Farkhshatova, L.P. Gerasimova,
M.F. Kabirova, K.V. Danilko, R.R. Khaibullina, I.V. Mashkina
**IN VITRO ANALYSIS OF PROLIFERATIVE ACTIVITY OF CELLS
ON THE COLLAGEN 3D MATRIX FOR REGENERATION OF SOFT
TISSUES OF THE ORAL CAVITY**

Objective: a comparative analysis of the combined use of preparations of activated plasma, hyaluronic acid and collagen 3D matrix in vitro.

Materials and methods. For the experiment, fibroblasts from the lungs of a human embryo were used. The proliferative activity of fibroblasts was evaluated in the presence of activated plasma, the preparation of hyaluronic acid and the 3D collagen matrix Fibromatrix for the regeneration of soft tissues of the oral cavity. Evaluation of cytotoxicity and proliferative activity was estimated by colorimetric MTT test in 1, 3 and 7 days. The results were recorded using microscopic examination and photographing in transmitted light.

Results. It was found, that stable active growth of fibroblasts was observed with the combined use of collagen 3D matrix and activated plasma. A preparation based on hyaluronic acid promotes the proliferation of human fibroblasts, but its activity decreases, inhibiting cell growth by 7th day.

Conclusion. The presented results demonstrate the prospects of using a combination of autogenous platelet plasma and 3D collagen matrix for the regeneration of soft tissues of the oral cavity in clinical practice.

Key words: regeneration, fibroblast proliferation, gingival recession, surgical treatment of gingival recession, platelet autologous plasma, collagen matrix, hyaluronic acid.

На сегодняшний день проблема заболеваний пародонта является актуальной в структуре стоматологических патологий в связи с широкой распространенностью и недостаточной эффективностью проводимого лечения. Распространенность десневой рецессии достигает 99,7% у взрослого населения. Причем, с возрастом ее распространенность возрастает (Леус П.А., Казеко Л.А., 1993).

Для устранения десневой рецессии основным методом является хирургическое лечение. В настоящее время разработаны «классические» методики с использованием лос-

кутных техник, аутотрансплантатов и др., которые широко применяются в клинической практике. Для увеличения зоны кератинизированной прикрепленной десны «золотым стандартом» признан свободный соединительно-тканый трансплантат (Давидян А.Л., 2007; Naeri A., Parsell D., 2000; Rocuzzo M. et al., 2002; Thoma D. et al., 2012). Подобные вмешательства имеют ряд недостатков, связанных с неудовлетворительным эстетическим результатом и необходимостью дополнительного операционного вмешательства с целью забора аутотрансплантата.

В настоящее время активно разрабатываются различные хирургические техники. Перспективной областью является применение новых биоматериалов совместно со стандартизированными хирургическими протоколами. Альтернативой использования ауто-трансплантатов для восстановления объема мягких тканей являются аллогенные коллагеновые матрицы, которые обладают рядом преимуществ: доступны в неограниченном количестве, хорошо интегрируются в мягкие ткани и снижают риск возникновения осложнений, связанных с наличием дополнительного операционного поля при заборе ауто-трансплантатов (Хюскенс Х.П., 2014; Zuccelli G., Amore C., Sforza N.M., Montebugnoli L., 2003).

Ряд клинических и экспериментальных работ посвящены исследованию аутогенной тромбоцитарной плазмы как эффективного кератопластического средства при воспалительных заболеваниях пародонта (Бирагова А.А., Белеченков А.А., Епхийев А.А., 2018; Chai J., Jin R., Yuan G., Kanter V., Miron R.J., Zhang Y, 2019; Verma R., Negi G., Kandwal A., Chandra H., Gaur D., Harsh M., 2019; Mohan S.P., Jaishangar N., Devy S., Narayanan A., Cherian D., Madhavan S.S., 2019). Работы по применению плазмы при десневой рецессии малочисленны (Çetiner D., Gökalp Kalabay P., Özdemir B., Çankaya Z.T., 2018; Li R., Liu Y., Xu T., Zhao H., Hou J., Wu Y., Zhang D., 2019).

Для влияния на процессы регенерации мягких тканей многие авторы предлагают использовать препараты на основе гиалуроновой кислоты (Ушаков Р.В., Ушаков А.Р., Дьяконова М.С., 2017; Pilloni A., Nardo F., Rojas M.A., 2019; Ahmadian E., Eftekhari A., Dizaj S.M., 2019). В некоторых исследовательских работах гиалуроновая кислота применялась для лечения повреждений мягких тканей, предотвращения инфицирования операционных ран в комплексном лечении заболеваний пародонта, для восстановления утраченных межзубных сосочков (Hammad H.M., 2011; Becker et al., 2009).

Таким образом, на современном этапе развития мукогингивальной пластической хирургии актуальным является поиск новых методов и способов хирургического лечения десневой рецессии с использованием новейших биоматериалов и препаратов, позволяющих повысить эффективность проводимого лечения. Одним из актуальных подходов к терапии является сочетание препаратов на основе гиалуроновой кислоты, аутогенной тромбоцитарной плазмы и аллогенного коллагенового 3D-матрикса для регенерации мягких тканей полости рта.

Для выяснения перспектив использования различных методов и видов имплантируемых материалов в клинической практике важным этапом является исследование *in vitro* на клеточных модельных системах.

Проведен сравнительный анализ перспективы сочетанного применения препаратов на основе гиалуроновой кислоты, активированной плазмы и коллагенового 3D-матрикса для регенерации мягких тканей полости рта *in vitro*.

Задачи: 1. Оценка пролиферативной активности фибробластов человека в присутствии активированной плазмы или активированной плазмы на коллагеновом 3D-матриксе. 2. Оценка пролиферативной активности фибробластов в присутствии препарата на основе гиалуроновой кислоты или препарата на основе гиалуроновой кислоты на коллагеновом 3D-матриксе. 3. Сравнительная оценка пролиферативной активности фибробластов человека при культивировании в присутствии препарата на основе гиалуроновой кислоты, активированной плазмы и коллагенового 3D-матрикса.

Материал и методы

1.1. Культивирование клеток. Для эксперимента *in vitro* были использованы клетки фибробластоподобной линии из легких эмбриона человека (ФЛЭЧ-104, Биолот, Россия). Клетки культивировали в полной среде α -MEM (Gibco), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Biowest, Франция), 2 мМ L-глутамина и 40 ед/мл гентамицина, в условиях инкубатора при температуре 37°C, 100% влажности и содержании CO₂ 5% [1]. Культуральную среду заменяли на новую каждые 3-4 дня. По достижении 70-80% конфлюэнтности клетки пересевали. Для этого ФЛЭЧ-104 снимали с подложки с помощью раствора трипсина ЭДТА 0,25% (ПанЭко, Россия), подсчитывали на автоматическом счетчике TC20 (BioRad, США) и рассевали плотностью 4×10^4 на 1 см² объемом 25 см² в культуральные флаконы. Для проведения дальнейших экспериментов использовали клетки 1-3-го пассажей.

1.2. Подготовка плазмы крови. Кровь здорового донора-добровольца была собрана в асептических условиях в стерильные пробирки с гепарином натрия и разделительным гелем («Группа Цзянсийских медицинских оборудований Хунда», Китай) объемом 5 мл, для получения плазмы центрифугировали при 3000 об./мин 5 минут (Eppendorf, Германия). Для активации плазмы использовали 10% раствор CaCl₂. На каждый 1 мл плазмы крови добавляли 70 мкл 10% раствора CaCl₂ [2]. Затем пробирка с плазмой помещалась в термостат

на 30 минут при 37°C для образования сгустка и центрифугировалась в течение 2 минут при 1500 об./мин (Eppendorf, Германия). Жидкая часть активированной плазмы была использована в дальнейших экспериментах.

1.3. Подготовка 3D-матрикса. Из коллагенового 3D-матрикса для регенерации мягких тканей Fibromatrix (Cardioplant, Россия) в асептических условиях были подготовлены пластины размером 9×9 мм.

1.4. Изучение цитотоксичности. Культуру клеток ФЛЭЧ-104 1-3-го пассажей снимали с подложки, ресуспендировали в среде α -MEM (Gibco), содержащей 2% эмбриональной телячьей сыворотки (Biowest, Франция), 2 мМ L-глутамина и 40 ед/мл гентамицина, подсчитывали на автоматическом счетчике TC20 (BioRad, США) с окраской трипановым синим (0,4%) и рассеивали по 15×10^3 клеток в 200 мкл среды на каждую лунку 48-луночного планшета с адгезивной поверхностью (Eppendorf, Германия). Предварительно во все экспериментальные лунки были помещены пластины коллагенового матрикса, лунки смачивались 200 мкл культуральной средой без клеток.

Всего использовано 6 экспериментальных условий по 4 повтора для каждого:

1. Коллагеновый 3D-матрикс для регенерации мягких тканей полости рта (контроль 1).
2. Коллагеновый 3D-матрикс для регенерации мягких тканей полости рта и 10% активированной плазмы донора.
3. Коллагеновый 3D-матрикс для регенерации мягких тканей полости рта и 0,01% гиалуроновой кислоты («Имплантат для стоматологии вязкоэластичный стерильный», Revident, Россия).
4. Адгезивная поверхность планшета (контроль 2).
5. Адгезивная поверхность планшета и 10% активированной аутогенной плазмы донора.
6. Адгезивная поверхность планшета и 0,01% гиалуроновой кислоты.

В качестве контрольных лунок использовали лунки без клеток с пластинами коллагенового 3D-матрикса Fibromatrix (Cardioplant, Россия) для регенерации мягких тканей полости рта и без него, содержащими 10% активированной плазмы донора или 0,01% гиалуроновой кислоты и без них.

Оценку цитотоксичности и пролиферативной активности проводили через 1, 3 и 7 суток с помощью МТТ-теста.

1.5. Проведение МТТ-теста. Колориметрический тест МТТ основан на способности оксидоредуктаз-клетки превращать желтый тетразолиевый краситель – 3-(4,5-диметилтиазол-2-

ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид в нерастворимый пурпурный формазан. Через 1-7 суток среду удаляли и заменяли 400 мкл раствора МТТ 5 мг/мл на 4 часа. После чего вместо раствора МТТ добавляли 400 мкл диметилсульфоксида на 1 час для полного растворения образовавшихся кристаллов формазана. Затем по 200 мкл раствора переносили в лунки 96-луночного планшета (Eppendoux, Германия) [3].

Оптическую плотность (ОП) полученного раствора регистрировали в каждой лунке при длине волны 530 нм и длине волны фонового поглощения 620 нм, используя мультипланшетный анализатор Spark 10M (Tecan, Австрия).

Анализ результатов МТТ-теста для каждой лунки рассчитывали $ОП_{dif} = ОП_{530} - ОП_{620}$. Относительная метаболическая активность клеток = $ОП_{dif}$ в лунке с активированной плазмой или гиалуроновой кислотой – $ОП_{dif}$ соответствующей лунки без клеток / $ОП_{dif}$ лунки только с коллагеновым матриксом или адгезивной поверхностью планшета – $ОП_{dif}$ соответствующей лунки без клеток * 100%. Все эксперименты проводили в четырех повторах, рассчитывали среднее значение для каждой серии повторов и стандартное отклонение.

1.6. Микроскопическое исследование. Для регистрации полученных результатов клетки в отдельных подготовленных лунках для каждого из условий были фиксированы этанолом, окрашены красителем Гимза и сфотографированы в проходящем свете и/или с помощью метода фазового контраста на инвертированном микроскопе Axio Observer D1 и камеры AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Германия) [4].

Статистическая обработка полученных результатов исследований проводилась с помощью программы GraphPadPrism v.6.0 с помощью параметрического критерия Стьюдента, уровень доверия – 95% ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

1. Оценка пролиферативной активности фибробластов человека в присутствии активированной плазмы или активированной плазмы на коллагеновом 3D-матриксе.

Оценку пролиферативной активности фибробластов оценивали на 1-е, 3-и и 7-е сутки культивирования клеток на экспериментальных материалах. Полученные результаты (рис. 1 и 2) показывают, что на первые сутки пролиферативная активность фибробластов достоверно ниже ($p < 0,0001$), относительно контроля, в отличие от 3-х и 7-х суток в обоих случаях, причем максимальных стабильных равных значений она достигала в присутствии коллагенового 3D-матрикса Fibromatrix на 3-и и 7-е сутки культивирования ($p = 0,3457$). В то время,

как в лунках без коллагена активность нормальных фибробластов не превышала 65% относительно контроля 2, причем результат на 3-и сутки был достоверно выше ($p=0,0172$), чем на 7-е сутки культивирования.

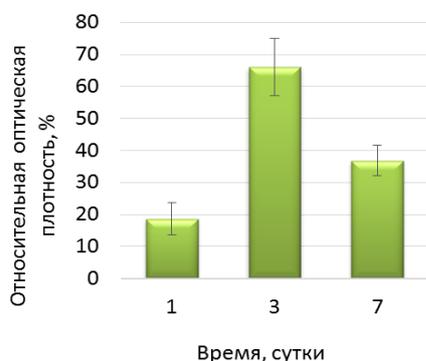


Рис. 1. Пролiferативная активность фибробластов человека в присутствии активированной плазмы

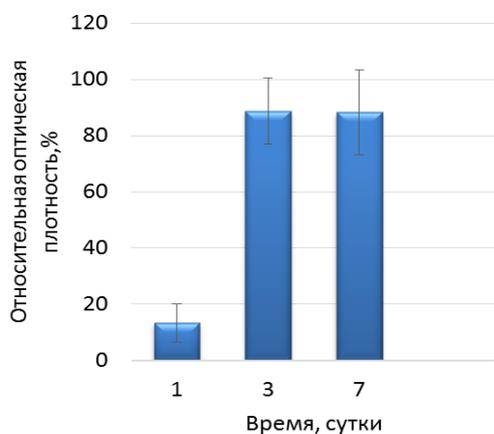


Рис. 2. Пролiferативная активность фибробластов человека в присутствии активированной плазмы на коллагеновом 3D-матриксе

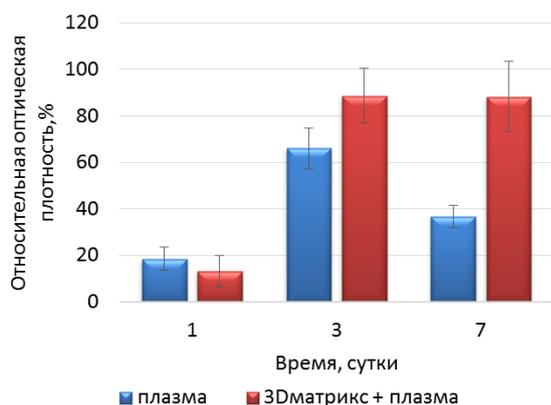


Рис. 3. Пролiferативная активность фибробластов человека в присутствии активированной плазмы и активированной плазмы на коллагеновом 3D-матриксе

Таким образом, представленные данные (рис. 3) показывают, что при культивировании линии фибробластов ФЛЭЧ-104 на коллагеновом 3D-матриксе Fibromatrix в присутствии активированной плазмы наблюдается более высокая пролиферативная активность клеток как на 3-и сутки (рис. 4,5), так и на 7-е сутки.

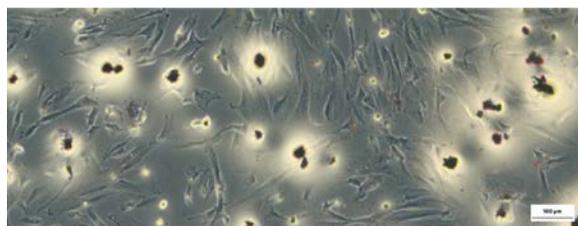


Рис. 4. Фибробласты на поверхности адгезивного планшета (3-и сутки культивирования, фазовый контраст, увел. $\times 100$)

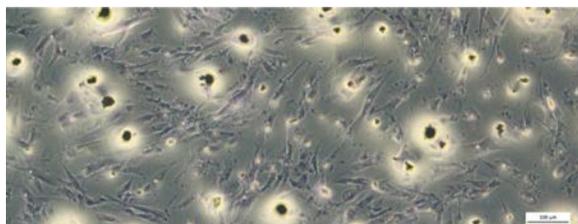


Рис. 5. Фибробласты на поверхности адгезивного планшета в присутствии 10% активированной плазмы (3-и сутки культивирования, фазовый контраст, увел. $\times 100$)

2. Оценка пролиферативной активности фибробластов в присутствии препарата на основе гиалуроновой кислоты или препарата на основе гиалуроновой кислоты на коллагеновом 3D-матриксе.

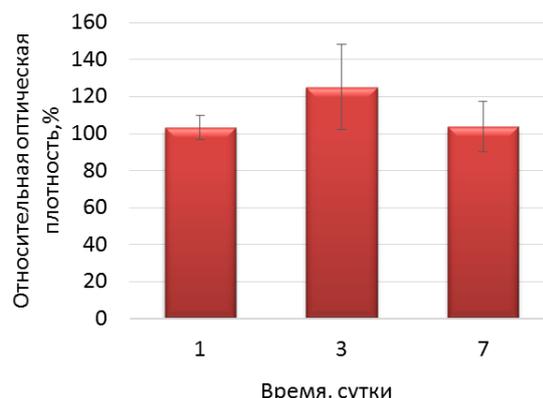


Рис. 6. Пролiferативная активность фибробластов человека в присутствии препарата на основе гиалуроновой кислоты

В присутствии только гиалуроновой кислоты (рис. 6) относительная активность клеточной пролиферации на 1-е, 3-и и 7-е сутки была практически одинакова ($p=0,1858$, $p=0,9545$, $p=0,2357$ соотв.) и не достигала 124% относительно контроля. Данные наблюдения позволяют сделать вывод о том, что гиалуроновая кислота способствует адгезии и пролиферации клеток, однако данный эффект незначителен относительно контроля 2.

Изучение пролиферативной активности клеточной культуры (рис. 7) показывает, что в лунках в присутствии гиалуроновой кислоты и коллагеновой мембраны Fibromatrix наиболее активный рост клеток наблюдался только на 3-и сутки ($p=0,0029$, $p=0,0008$ соотв.). Кроме того, отмечен обратный, угнетающий эффект. Так, на 7-е сутки культивирования в данных лунках показано значительное сниже-

ние ($p=0,0008$) пролиферативной активности клеток относительно контроля 2.

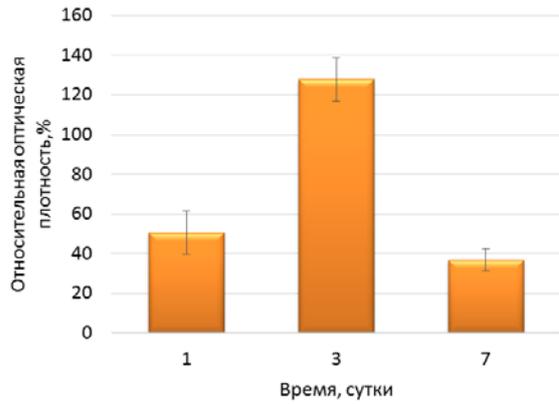


Рис. 7. Проллиферативная активность фибробластов человека в присутствии препарата на основе гиалуроновой кислоты на коллагеновом 3D-матриксе

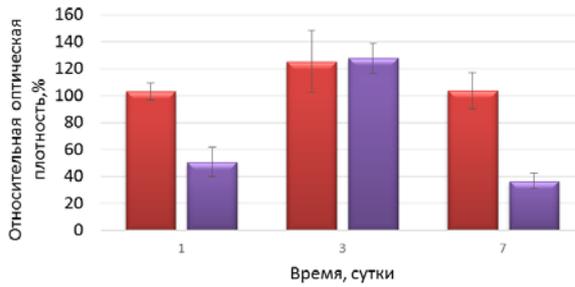


Рис. 8. Проллиферативная активность фибробластов человека в присутствии препарата на основе гиалуроновой кислоты и препарата на основе гиалуроновой кислоты на коллагеновом 3D-матриксе

Таким образом, результаты эксперимента (рис. 8) показывают, что при сочетании гиалуроновой кислоты с коллагеновым 3D-матриксом Fibromatrix пролиферация клеток на 1- и 7-е сутки значительно ниже ($p=0,0020$, $p=0,0014$ соотв.), чем в присутствии только гиалуроновой кислоты.

Отмечено отрицательное влияние гиалуроновой кислоты на пролиферативную активность клеток линии ФЛЭЧ-104 в лунках с коллагеновым 3D-матриксом Fibromatrix на 7-е сутки (рис.9, 10).

3. Сравнительная оценка пролиферативной активности фибробластов с применением препаратов на основе гиалуроновой кислоты, активированной плазмы и коллагенового 3D-матрикса.

При сравнительном анализе активности клеточных культур в лунках, содержащих только активированную плазму или гиалуроновую кислоту (рис.11), установлено, что активированная плазма не создает условий для повышения пролиферативной активности фибробластов, а гиалуроновая кислота способствует росту клеток в незначительной степени относительно контроля 2.

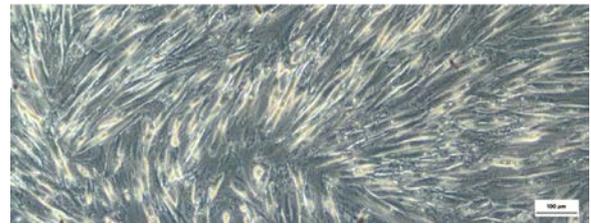


Рис. 9. Фибробласты на поверхности адгезивного планшета (7-е сутки культивирования, фазовый контраст, увел. $\times 100$)

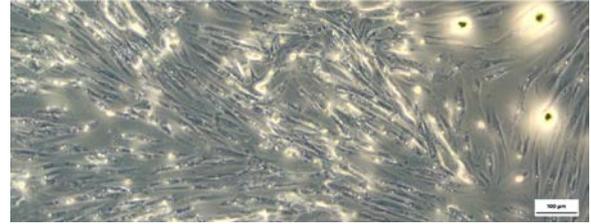


Рис. 10. Фибробласты на поверхности адгезивного планшета в присутствии препарата на основе гиалуроновой кислоты (Revident, Россия) (7-е сутки культивирования, фазовый контраст, увел. $\times 100$)

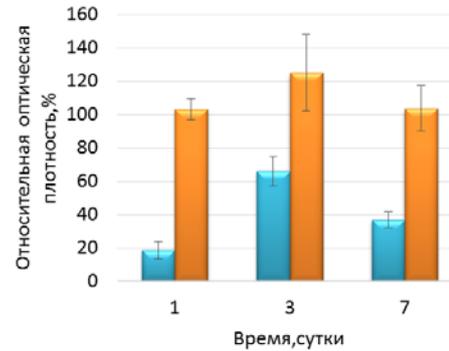


Рис. 11. Проллиферативная активность фибробластов человека в присутствии препарата на основе гиалуроновой кислоты и активированной плазмы

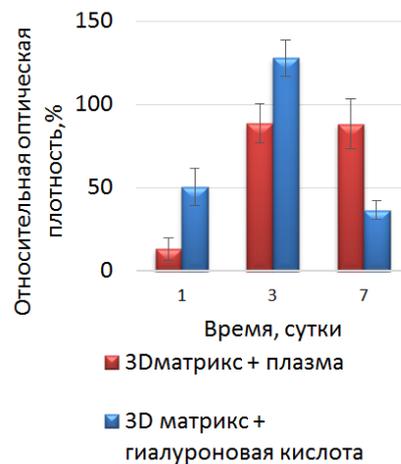


Рис. 12. Проллиферативная активность фибробластов человека в присутствии препарата на основе гиалуроновой кислоты на коллагеновом 3D-матриксе и активированной плазмы на коллагеновом 3D-матриксе

Однако в образцах, содержащих активированную плазму и гиалуроновую кислоту в присутствии коллагенового 3D-матрикса Fibromatrix (рис. 12), активированная плазма способствует адгезии и пролиферации клеток, а гиалуроновая кислота, напротив, подавляет

клеточную активность к 7-м суткам ($p=0,025$, $p=0,0180$, $p=0,0106$, соотв.) (рис. 13, 14).

Мы отметили ингибирующий эффект активированной плазмы и коллагенового 3D-матрикса Fibromatrix на клетки линии ФЛЭЧ-104 на 1-е сутки культивирования.



Рис. 13. Фибробласты на поверхности коллагенового 3D-матрикса Fibromatrix для регенерации мягких тканей полости рта (Cardioplant, Россия) в присутствии 10% активированной плазмы (7-е сутки культивирования, фазовый контраст, увел. $\times 100$)



Рис. 14. Поверхность коллагенового 3D-матрикса Fibromatrix для регенерации мягких тканей полости рта (Cardioplant, Россия) в присутствии 0,01% гиалуроновой кислоты (Revident, Россия) (7-е сутки культивирования, фазовый контраст, увел. $\times 100$)

Результаты и обсуждение

В результате проведенного эксперимента получены данные о пролиферативной активности клеток фибробластоподобной линии из легких эмбриона человека ФЛЭЧ-104 в присутствии препарата на основе гиалуроновой кислоты Revident, активированной плазмы и коллагенового 3D-матрикса Fibromatrix. Результаты свидетельствуют о том, что наибольшая пролиферативная активность клеток наблюдалась в присутствии активированной плазмы и коллагенового 3D-матрикса Fibromatrix.

По данным исследований Долгалева А.А. с соавт. (2016, 2017) установлено, что использованный и в нашей работе коллагеновый 3D-матрикс не обладает цитотоксичностью [5]. Коллаген, входящий в состав мембраны Fibromatrix, обладает высокой плотностью и образует 3D-структуру, а значит, большее количество фибробластов может оседать на данной мембране [6]. В работе Богдан В.Г. с соавт. (2014) установлено, что аутологичная тромбоцитарная плазма стимулирует синтез коллагена 1- и 3-го типов в культурах фибробластов и данными авторами сделан вывод о том, что синергичное увеличение продукции коллагенов с преимущественным накоплением коллагена 3-го типа может являться отражением активации фибробластов с формированием *in vivo* времен-

ной матрицы в процессе ремоделирования тканей в сочетании с преобразованием коллагена 3-го типа в истинный коллаген 1-го типа [7].

По данным исследований о составе аутоплазмы установлено, что тромбоцитарная аутогенная плазма ускоряет естественные механизмы регенерации благодаря наличию в тромбоцитах факторов роста [8-11], а именно IGF, PDGF, EGF, FGF, TGF- β , PDEGF, VEGF, PDAGF, PLGF-1/-2 и др. [12,13], которые активируют и стимулируют пролиферацию отдельных типов клеток. По результатам нашего эксперимента, положительный эффект активированной плазмы на пролиферативную активность фибробластов человека наблюдался на 3-и и 7-е сутки. Однако отмечен ингибирующий эффект активированной плазмы на 1-е сутки, где активность клеток была значительно ниже относительно контроля. Возможно, это связано с тем, что в условиях *in vitro* наблюдается избыточная концентрация биологически активных молекул, подавляющих адгезию и деление фибробластов в 1-е сутки. Однако к 3-м суткам данный ингибирующий эффект нивелируется вследствие разрушения части молекул биологически активных веществ и усиления адаптации клеток.

Высокая пролиферативная активность фибробластов человека в присутствии активированной плазмы и коллагеновой мембраны, очевидно, обусловлена тем, что помимо положительного влияния активированной плазмы на рост клеток обнаруживается положительное влияние и самого коллагенового матрикса на адгезию клеток, что в свою очередь способствует повышению пролиферативной активности фибробластов.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что гиалуроновая кислота способствует пролиферации клеток, однако данный эффект незначителен. Более того, при оценке активности роста фибробластов человека в лунках с гиалуроновой кислотой и коллагеновым 3D-матриksom отмечен ингибирующий эффект на 7-е сутки культивирования.

В некоторых исследованиях показано, что гиалуроновая кислота определяет процессы регенерации мягких тканей: вызывает активизацию фибробластов, которые продуцируют коллагеновые волокна, стимулирует производство цитокинов фибробластами, кератиноцитами, цементобластами и стимулирует синтез эндогенной гиалуроновой кислоты эндотелиальными клетками [14,15]. В работе Hammad H.M. (2011) показано, что гиалуроновая кислота участвует в процессах миграции и дифференцировке клеток [16].

В своем эксперименте мы использовали препарат на основе гиалуроновой кислоты Revident, содержащий высокомолекулярную гиалуроновую кислоту (до 3,3 мДа). В исследовании Gallorini M с соавторами. (2017), направленном на изучение влияния гиалуроновой кислоты на степень пролиферации и жизнеспособности клеток *in vitro* в зависимости от ее молекулярной массы, отмечено, что гиалуроновая кислота с высокой молекулярной массой (> 103 кДа) не влияет на пролиферацию клеток [17]. Помимо этого, некоторые авторы также отмечают ингибирующий эффект гиалуроновой кислоты данного типа на клеточную пролиферацию [18,19].

Кроме того, полученные нами результаты могут быть обусловлены способностью гиалуроновой кислоты с высокой молекулярной массой повышать вязкость культуральной среды, что приводит к снижению пролиферативной активности фибробластов.

Для увеличения эффективности применения аутогенной тромбоцитарной плазмы с сочетанным использованием коллагенового 3D-матрикса Fibromatrix для регенерации мягких тканей полости рта в клинической практике требуется подбор оптимальной концентрации аутогенной тромбоцитарной плазмы.

Выводы

При сравнительном анализе пролиферативной активности клеток в присутствии коллагенового 3D-матрикса Fibromatrix *in vitro* стабильный активный рост фибробластов наблюдался при сочетанном использовании коллагенового 3D-матрикса Fibromatrix и активированной плазмы.

Препарат на основе высокомолекулярной гиалуроновой кислоты способствует пролиферации клеточной линии фибробластов человека, однако активность данного препарата снижается, ингибируя рост клеток уже к 7-м суткам.

Для оценки возможности увеличения пролиферативной активности клеток в присутствии активированной плазмы и коллагенового 3D-матрикса Fibromatrix необходимо провести подбор оптимальной концентрации активированной плазмы в ходе дальнейших исследований. Представленные результаты данного эксперимента *in vitro* демонстрируют перспективность применения комбинации аутогенной тромбоцитарной плазмы и аллогенного коллагенового 3D-матрикса Fibromatrix для регенерации мягких тканей полости рта в клинической практике.

Сведения об авторах статьи:

Орехова Людмила Юрьевна – д.м.н., профессор, зав. кафедрой стоматологии терапевтической и пародонтологии ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова Минздрава России. Адрес: 197101, г. Санкт-Петербург, Петроградская наб., 44.

Фархшатов Рушана Рамилевна – аспирант кафедры терапевтической стоматологии с курсом ИДПО ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 45/1. E-mail: rushana1189@mail.ru.

Герасимова Лариса Павловна – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой терапевтической стоматологии с курсом ИДПО ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 45/1.

Кабирова Миллуша Фаузиевна – д.м.н., профессор кафедры терапевтической стоматологии с курсом ИДПО, декан стоматологического факультета ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 45/1. E-mail: kabirova_milya@list.ru.

Данилко Ксения Владимировна – к.б.н., с.н.с. ЦНИЛ БГМУ, доцент кафедры биологии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3.

Хайбуллина Расима Рашитовна – д.м.н., профессор кафедры терапевтической стоматологии с курсом ИДПО ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Заки Валиди, 45/1.

Машкина Ирина Владимировна – врач-стоматолог клиники ООО «Дина Медсервис». Адрес: 450022, г. Уфа, ул. Бакалинская, 68/6.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kasaj A. In vitro evaluation of various bioabsorbable and nonresorbable barrier membranes for guided tissue regeneration. /Kasaj A., Reichert C, Götz H, Röhrig B, Smeets R, Willershausen B. // Head Face Med. 2008 Oct 14;4:22. doi: 10.1186/1746-160X-4-22.
2. Klara Janjić The impact of collagen membranes on 3D gingival fibroblast toroids/ Klara Janjić, Barbara Cviki, Barbara Schädli, Andreas Moritz // BMC Oral Health. – 2019. – V.48. – 2019. – P: 48. doi: 10.1186/s12903-019-0736-2
3. Базиков, И.А. Сравнительное исследование процессов адгезии и пролиферации фибробластов на биорезорбируемых мембранах «Кардиоплант» и Bio-Gide / И.А. Базиков, А.А. Долгалев, А.Н. Мальцев [и др.] // Медицинский алфавит. – 2017. – № 1. – С.16-18.
4. Долгалев, А.А. Сравнительный анализ биодинамических характеристик резорбируемых коллагеновых мембран на клеточных культурах / А.А. Долгалев, В.А. Зеленский, И.А. Базиков // Пародонтология. – 2016. – №4(86). – С.56-60.
5. Talebi Ardakani MR. Comparison of attachment and Proliferation of Human Gingival Fibroblasts on Different Collagen Membranes. / Talebi Ardakani MR, Hajizadeh F, Yadegari Z. // Ann Maxillofac Surg. 2018 Jul-Dec;8(2):218-223. doi: 10.4103/ams.ams_150_17
6. Богдан, В.Г. Оценка стимулирующего влияния обогащенной тромбоцитами плазмы в экспериментальной модели культур фибробластов для пациентов с трофическими язвами венозной этиологии /В.Г. Богдан, Д.А. Толстов, М.М. Зафранская// Медицинские новости. – 2014. – № 9. – С.87-89.
7. Бирагова, А.К. Эффективность лечения краевой рецессии десны с применением инъекции, обогащенной тромбоцитами плазмы / А.К. Бирагова, А.А. Белеченков, А.А. Елхив // Вестник медицинских технологий, электронный журнал. – 2018. – № 2. – С.7-9.
8. Hersant B Use of platelet-rich plasma (PRP) in microsurgery/ B Hersant, La Padula S, M SidAhmed-Mezi, AM Rodriguez, JP Menin-gaud // J Stomatol Oral Maxillofac Surg. – 2017. – V.118(4). – P:236-237. doi: 10.1016/j.jormas.2017.05.009. Epub 2017 Jun 19.
9. Llamas SG Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. / SG Llamas [et al.] // Transplantation. – 2004. – Feb 15. V.77(3). – P:350-5. doi:10.1097/01. TP. 0000112381.80964.85
10. Гуляева, О.А. Применение тромбоцитарной аутологичной плазмы в комплексном лечении и профилактике гингивита у пациентов с несъемными ортодонтическими конструкциями /О.А. Гуляева, Д.Н. Тухватуллина, В.Г. Солодкий// Пародонтология. – 2016. – № 2(79). – С. 29-34.

11. Greenhalgh D.G. The role of growth factors in wound healing/ Greenhalgh D.G. // *J Trauma*. – 1996 – Jul;41(1). – P:159-67. DOI: 10.1097/00005373-199607000-00029
12. Larjava H. Characterization of one phenotype of human periodontal granulation-tissue fibroblasts. / Larjava H., Heino J., Kähäri V.M., Krusius T, Vuorio E. // *J Dent Res*. – 1989. – Jan;68(1). – V:20-5. DOI: 10.1177/0022034589080010301
13. Malasse J. Hyaluronan Does Not Regulate Human Epidermal Keratinocyte Proliferation and Differentiation. / Malasse J., Pendaries V., Hontoir F., De Glas V., Van Vlaender D., Simon M., Lambert de Rouvroit C., Poumay Y. // *J. Biol. Chem.* – 2016. – Mar 18;291(12). – P:6347-58. doi: 10.1074/jbc.M115.661348. Epub 2015 Dec 1.
14. Kaneko K. Hyaluronan inhibits BMP-induced osteoblast differentiation. / Kaneko K., Higuchi C., Kunugiza Y., Yoshida K., Sakai T., Yoshikawa H., Nakata K. // *FEBS Lett.* – 2015. – Feb 13;589(4). – P:447-54. doi: 10.1016/j.febslet.2014.12.031. Epub 2015 Jan 12.
15. Hammad H. M. Effects of topically applied agents on intra-oral wound healing in a rat model: a clinical and histomorphometric study. / Hammad HM, Hammad MM, Abdelhadi IN, Khalifeh MS. // *Int J Dent Hyg*. – 2011. – Feb;9(1). – P:9-16. doi: 10.1111/j.1601-5037.2009.00410.x.
16. Gallorini M. Hyaluronic acid increases tendon derived cell viability and proliferation in vitro: comparative study of two different hyaluronic acid preparations by molecular weight. / Gallorini M, Berardi AC, Berardocco M, Gissi C, Maffulli N, Cataldi A, Oliva F. // *Muscles Ligaments Tendons J*. – 2017. – Sep 18;7(2). – P:208-214 doi: 10.11138/mltj/2017.7.2.208. eCollection 2017 Apr-Jun.
17. Boeckel D. G. In vitro evaluation of cytotoxicity of hyaluronic acid as an extracellular matrix on OFCOL II cells by the MTT assay. / Boeckel D.G., Shinkai R.S., Grossi M.L., Teixeira E.R. // *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. – 2014. – Jun;117(6). – P:423-8. doi: 10.1016/j.oooo.2012.07.486. Epub 2012 Nov 10.
18. Lai J. Y. Adhesion, phenotypic expression, and biosynthetic capacity of corneal keratocytes on surfaces coated with hyaluronic acid of different molecular weights. / Lai J.Y., Tu I.H. // *Acta Biomater*. – 2012. – Mar; 8(3). – P:1068-79. doi: 10.1016/j.actbio.2011.11.012. Epub 2011 Nov 17

REFERENCES

1. Kasaj A. In vitro evaluation of various bioabsorbable and nonresorbable barrier membranes for guided tissue regeneration. / Kasaj A., Reichert C, Götz H, Röhrig B, Smeets R, Willershausen B. // *Head Face Med*. 2008 Oct 14;4:22. doi: 10.1186/1746-160X-4-22. Klara Janjić The impact of collagen membranes on 3D gingival fibroblast toroids/ Klara Janjić, Barbara Cvikič, Barbara Schädl, Andreas Moritz // *BMC Oral Health*. – 2019. – V.48. – 2019. – P: 48. doi: 10.1186/s12903-019-0736-2
2. Bazikov I.A. Sravnitel'noe issledovanie processov adgezii i proliferacii fibroblastov na biorezorbiruemykh membranah «Kardioplant» i Bio-Gide / I.A. Bazikov, A.A. Dolgalev, A.N. Mal'cev A.N. [i dr.] // *Medicinskij alfavit*. – 2017. – № 1. – S.16-18. (In Russ.).
3. Dolgalev A.A. Sravnitel'nyj analiz biodinamicheskikh harakteristik rezorbiruemykh kollagenovykh membran na kletochnykh kul'turah / A.A. Dolgalev, V.A. Zelenskij, I.A. Bazikov // *Parodontologiya*. – 2016. – №4(86) – S.56-60. (In Russ.).
4. Talebi Ardakani MR. Comparison of attachment and Proliferation of Human Gingival Fibroblasts on Different Collagen Membranes. / Talebi Ardakani MR, Hajizadeh F, Yadegari Z. // *Ann Maxillofac Surg*. – 2018. – Jul-Dec;8(2). – P:218-223. doi: 10.4103/ams.ams_150_17.
5. Bogdan V.G. Ocenka stimuliruyushchego vliyaniya obogashchennoj trombocitami plazmy v eksperimental'noj modeli kul'tur fibroblastov dlya pacientov s troficheskimi yazvami vnoznoj etiologii / V.G. Bogdan, D.A. Tolstov, M.M. Zafanskaya // *Medicinskie novosti*. – 2014 – №9 – S.87-89. (In Russ.).
6. Biragova A.K. Effektivnost' lecheniya kraevoy recessii desny s primeneniem in»ekcij obogashchennoj trombocitami plazmy / A.K. Biragova, A.A. Belechenko, A.A. Ephiev // *Vestnik medicinskih tekhnologij, elektronnyj zhurnal*. – 2018. – № 2. – S.7-9. (In Russ.).
7. Hersant B Use of platelet-rich plasma (PRP) in microsurgery/ B Hersant, La Padula S, M SidAhmed-Mezi, AM Rodriguez, JP Meningaud // *J Stomatol Oral Maxillofac Surg*. – 2017. – V.118(4). – P:236-237. doi: 10.1016/j.jormas.2017.05.009. Epub 2017 Jun 19.
8. Llamas SG Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. / SG Llamas [et al.] // *Transplantation*. – 2004. – Feb 15. V.77(3). – P:350-5. doi:10.1097/01. TP. 0000112381.80964.85
9. Gulyaeva O.A., Primenenie trombocitarnoj autologichnoj plazmy v kompleksnom lechenii i profilaktike gingivita u pacientov s nes»emnymi ortodonticheskimi konstrukcijami / O.A. Gulyaeva, D.N. Tuhvatullina, V.G. Solodkij // *Parodontologiya*. – 2016. – № 2(79). – S. 29-34. (In Russ.).
10. Greenhalgh D.G. The role of growth factors in wound healing. *J Trauma*. 1996 Jul;41(1):159-67. DOI: 10.1097/00005373-199607000-00029
11. Greenhalgh D.G. The role of growth factors in wound healing/ Greenhalgh D.G. // *J Trauma*. – 1996 – Jul;41(1). – P:159-67. DOI: 10.1097/00005373-199607000-00029
12. Larjava H. Characterization of one phenotype of human periodontal granulation-tissue fibroblasts. / Larjava H., Heino J., Kähäri V.M., Krusius T, Vuorio E. // *J Dent Res*. – 1989. – Jan;68(1). – V:20-5. DOI: 10.1177/0022034589080010301
13. Malasse J. Hyaluronan Does Not Regulate Human Epidermal Keratinocyte Proliferation and Differentiation. / Malasse J., Pendaries V., Hontoir F., De Glas V., Van Vlaender D., Simon M., Lambert de Rouvroit C., Poumay Y. // *J. Biol. Chem.* – 2016. – Mar 18;291(12). – P:6347-58. doi: 10.1074/jbc.M115.661348. Epub 2015 Dec 1.
14. Kaneko K. Hyaluronan inhibits BMP-induced osteoblast differentiation. / Kaneko K., Higuchi C., Kunugiza Y., Yoshida K., Sakai T., Yoshikawa H., Nakata K. // *FEBS Lett.* – 2015. – Feb 13;589(4). – P:447-54. doi: 10.1016/j.febslet.2014.12.031. Epub 2015 Jan 12.
15. Hammad H. M. Effects of topically applied agents on intra-oral wound healing in a rat model: a clinical and histomorphometric study. / Hammad HM, Hammad MM, Abdelhadi IN, Khalifeh MS. // *Int J Dent Hyg*. – 2011. – Feb;9(1). – P:9-16. doi: 10.1111/j.1601-5037.2009.00410.x.
16. Gallorini M. Hyaluronic acid increases tendon derived cell viability and proliferation in vitro: comparative study of two different hyaluronic acid preparations by molecular weight. / Gallorini M, Berardi AC, Berardocco M, Gissi C, Maffulli N, Cataldi A, Oliva F. // *Muscles Ligaments Tendons J*. – 2017. – Sep 18;7(2). – P:208-214 doi: 10.11138/mltj/2017.7.2.208. eCollection 2017 Apr-Jun.
17. Boeckel D. G. In vitro evaluation of cytotoxicity of hyaluronic acid as an extracellular matrix on OFCOL II cells by the MTT assay. / Boeckel D.G., Shinkai R.S., Grossi M.L., Teixeira E.R. // *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. – 2014. – Jun; 117(6). – P:423-8. doi: 10.1016/j.oooo.2012.07.486. Epub 2012 Nov 10.
18. Lai J. Y. Adhesion, phenotypic expression, and biosynthetic capacity of corneal keratocytes on surfaces coated with hyaluronic acid of different molecular weights. / Lai J.Y., Tu I.H. // *Acta Biomater*. – 2012. – Mar;8(3). – P:1068-79. doi: 10.1016/j.actbio.2011.11.012. Epub 2011 Nov 17