

© Team of authors, 2024 / © Коллектив авторов, 2024

3.1.16. Plastic surgery, 3.3.3. Pathological physiology / 3.1.16. Пластическая хирургия, 3.3.3. Патологическая физиология

Optimal conditions for studying the effects of platelet-rich plasma *in vitro* on the culture of dermal fibroblasts

T.I. Vlasova, E.P. Brodovskaya, K.S. Madonov, I.A. Khutorskaya

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russia

Contacts: Tatyana Ivanovna Vlasova – e-mail: v.t.i@bk.ru

Подбор оптимальных условий для изучения влияний обогащенной тромбоцитами плазмы *in vitro* на культуру дермальных фибробластов

Т.И. Власова, Е.П. Бродовская, К.С. Мадонов, И.А. Хуторская

ФГБОУ ВО Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, Саранск, Россия

Контакты: Власова Татьяна Ивановна – e-mail: v.t.i@bk.ru

优化富含血小板的血浆 (PRP) 在体外对真皮成纤维细胞培养影响的条件

T.I. Vlasova, E.P. Brodovskaya, K.S. Madonov, I.A. Khutorskaya

N.P. 奥加廖夫国立莫尔多瓦研究型大学, 萨兰斯克, 俄罗斯

联系人: Tatyana Ivanovna Vlasova – 电邮: v.t.i@bk.ru

Objective. To study the effects of platelet-rich plasma (PRP) *in vitro* on the culture of dermal fibroblasts depending on the plasma concentration in the medium, method of activation, and cell density.

Material and methods. To prepare PRP, we used one of the classic protocols for one-step centrifugation of blood from healthy donors (n=4). The study included series with different cell densities (hTERT-HDFa – d220 cell line): 2500/well, 5000/well and 10000/well – 96-well plate). Activated donor PRP was added to the experimental wells at the concentrations of 10.0%, 5.0%, 2.5%. We used freeze-thaw cycle as a control activator, with a series of experiments with additional activation using 10% CaCl₂ (20 l/ml). We analyzed cell survival and metabolic activity with the MTT test. The evaluation of fibroblast migration activity was done in a scratch assay. The assessment of cell morphology and the determination of cell death mechanisms were conducted using fluorescent microscopy with preliminary staining of samples. StatTech v. 4.1.7 was used for statistical analysis.

Results. The viability assessment of the hTERT-HDFa cells with different cell densities demonstrated the maximum metabolic activity of human skin fibroblasts at an initial planting density of 2500–5000 thousand cells per well (25 000–50 000/ml), and a decrease in cell growth intensity with increasing density. The optimal cell viability values were reached after 72 hours of observation. The effect of PRP activation with CaCl₂ supplementing the freeze-thaw cycle before addition to the medium on fibroblast viability was negligible. In the scratch assay, the defect area closed faster with PRP used at the concentrations of 5–10%.

Conclusion. To assess the biological effects of PRP on human skin fibroblast culture, we recommend to use a 5–10% concentration of the activated sample in the culture medium; the optimal planting density for this cell culture is 25 000–50 000 cells/ml.

Key words: platelets, PRP therapy, human dermal fibroblasts, regeneration

Conflicts of interest. The authors have no conflicts of interest to declare.

Financing. The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 24-25-00278, <https://rscf.ru/project/24-25-00278/>

For citation: Vlasova T.I., Brodovskaya E.P., Madonov K.S., Khutorskaya I.A. Optimal conditions for studying the effects of platelet-rich plasma *in vitro* on the culture of dermal fibroblasts. Head and neck. Russian Journal. 2024;12(3):76–83

Doi: 10.25792/HN.2024.12.3.76-83

The authors are responsible for the originality of the data presented and the possibility of publishing illustrative material – tables, drawings, photographs of patients.

Цель исследования: изучить действие обогащенной тромбоцитами плазмы (PRP) *in vitro* на культуру клеток дермальных фибробластов в зависимости от ее концентрации в среде, способа активации, плотности посадки клеток.

Материал и методы. Для приготовления PRP использовали один из классических протоколов одноэтапного центрифугирования цельной крови здоровых доноров ($n=4$). Исследование проводили при разной плотности клеток (клеточная линия hTERT-HDFa – d220): 2500 кл./лунка, 5000 кл./лунка и 10 000 кл./лунка – 96-луночный планшет). В опытные лунки вносили активированную PRP доноров в концентрациях 10,0%, 5,0, 2,5%. В качестве контрольной активации использовали цикл «замораживание-размораживание», с серией экспериментов с дополнительной активацией 10% CaCl₂ (20 л/мл). Анализ выживаемости и метаболической активности клеток проводили с помощью МТТ-теста. Миграционную активность фибробластов исследовали в ране *in vitro* (scratch assay). Морфологическую оценку клеток и определение механизмов клеточной гибели проводили при помощи флуоресцентной микроскопии с предварительной окраской образцов. Статистический анализ (StatTech v. 4.1.7).

Результаты. Оценка жизнеспособности клеток линии hTERT-HDFa в зависимости от плотности посадки клеток продемонстрировала, что максимальная метаболическая активность фибробластов кожи человека отмечается при первоначальной плотности посадки 2,5–5,0 тыс. клеток на лунку (25–50 тыс./мл), при увеличении плотности отмечается снижение интенсивности роста культуры. Оптимальные показатели жизнеспособности клеток регистрируются через 72 часа наблюдения. Влияние дополнительной к «замораживанию-размораживанию» активации CaCl₂ PRP перед внесением в среду на жизнеспособность фибробластов оказалось несущественным. Результаты изучения раны *in vitro* показали, что область дефекта закрывается быстрее при использовании PRP в концентрациях 5–10%.

Заключение. На основании оценки результатов воздействия PRP на культуру фибробластов кожи человека рекомендуется использовать 5–10% концентрацию активированного образца в культуральной среде, оптимальная посадочная плотность для данной культуры 25–50 тыс. кл./мл.

Ключевые слова: тромбоциты, PRP-терапия, дермальные фибробласты человека, регенерация

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-25-00278, <https://rscf.ru/project/24-25-00278/>

Для цитирования: Власова Т.И., Бродовская Е.П., Мадонов К.С., Хуторская И.А. Подбор оптимальных условий для изучения влияния обогащенной тромбоцитами плазмы *in vitro* на культуру дермальных фибробластов. *Head and neck. Голова и шея. Российский журнал.* 2024;12(3):76–83

Doi: 10.25792/HN.2024.12.3.76-83

Авторы несут ответственность за оригинальность представленных данных и возможность публикации иллюстративного материала – таблиц, рисунков, фотографий пациентов.

研究目的: 研究富含血小板的血浆 (PRP) 在体外对真皮成纤维细胞的影响, 这取决于其在培养基中的浓度、激活方式以及细胞接种密度。

材料与方法: 使用经典的一步全血离心法制备PRP, 取自健康供体 ($n=4$)。在不同细胞密度下进行实验 (细胞系 hTERT-HDFa – d220) : 2500个细胞/孔、5000个细胞/孔、10000个细胞/孔 (96孔板中)。向实验孔中加入活化的供体PRP, 浓度分别为10.0%、5.0%、2.5%。冻融循环作为对照激活, 并进行一系列10% CaCl₂ (20 μ l/ml)的额外激活实验。使用MTT测试分析细胞的存活率和代谢活性。通过划痕试验研究成纤维细胞的迁移活性。通过荧光显微镜对细胞的形态进行评估, 并确定细胞死亡的机制, 样品预先染色。统计分析使用StatTech v. 4.1.7。

结果: 根据细胞接种密度评估hTERT-HDFa细胞系的存活率表明, 当初始接种密度为每孔2,500到5,000个细胞 (每毫升25,000到50,000个) 时, 人类皮肤成纤维细胞的代谢活性最高。增加接种密度会降低细胞培养的生长强度。在72小时的观察后记录最佳细胞存活率。相较于冻融循环, CaCl₂对PRP的额外激活对成纤维细胞的存活影响不大。体外伤口研究结果表明, 当使用浓度为5%–10%的PRP时, 缺陷区域的闭合速度更快。

结论: 根据PRP对人类皮肤成纤维细胞培养的影响评估, 推荐在培养基中使用5%–10%浓度的活化样品, 最佳接种密度为每毫升25,000到50,000个细胞。

关键词: 血小板, PRP治疗, 人体真皮成纤维细胞, 再生

利益冲突: 作者声明不存在利益冲突。

资金支持: 本研究由俄罗斯科学基金会资助, 项目编号24–25–00278, <https://rscf.ru/project/24-25-00278/>

引用格式: Vlasova T.I., Brodovskaya E.P., Madonov K.S., Khutorskaya I.A. Optimal conditions for studying the effects of platelet-rich plasma in vitro on the culture of dermal fibroblasts. Head and neck. Russian Journal. 2024;12(3):76–83

Doi: 10.25792/HN.2024.12.3.76-83

作者对所提供数据的原创性以及插图材料（包括表格、图形和患者照片）的出版权限承担责任。

Введение

Репаративная регенерация – важнейший биологический процесс, необходимый для восстановления структуры и функции тканей после повреждения. Нарушение процесса заживления сопровождается формированием рубцов, хронических ран, нарушением функции ткани и органа. Особую актуальность данная проблема приобретает в аспекте восстановления тканей после хирургического лечения и лучевой терапии патологии ЛОР-органов и лицевой области, где имеет значение отсутствие не только функциональных, но и косметических дефектов [1–3]. Распространенной проблемой является восстановление тканей после лучевой поврежденности при радиотерапии онкологических болезней головы и шеи [4, 5]. В настоящее время активно разрабатываются новые и совершенствуются старые подходы к стимуляции репаративного потенциала тканей и ускорению процессов заживления [6, 7].

Важными участниками и модуляторами процесса заживления являются тромбоциты. Одним из эффективных способов повышения эффективности процессов заживления является использование обогащенной тромбоцитами аутоплазмы (PRP). PRP содержит множество факторов роста и других биологически активных белков, включая VEGF, PDGF, TGF, хемокины, фибронектин, витронектин, плазменные факторы свертывания. PRP действует как противовоспалительное и прорегенеративное средство, ускоряя процесс заживления ран [8].

Несмотря на положительные эффекты PRP-терапии, данный метод регенеративной медицины имеет свои ограничения и проблемные аспекты.

Традиционно PRP используют в свежем виде сразу после приготовления, при этом активно ведутся поиски способов хранения данного биологического препарата без утраты его клинической эффективности [9, 10]. В ряде исследований показано, что замораживание плазмы для сохранения и последующего использования может стать ключом к расширению показаний и увеличению ситуаций клинического применения PRP-терапии [11, 12]. В других исследованиях продемонстрировано, что хранение плазмы без использования отрицательных температур также позволяет сохранить ее прорегенераторную активность за счет сохранения концентраций биологически активных веществ и стимулирующего действия на культуру клеток [13].

Другим неоднозначным аспектом применения PRP-терапии является выбор метода активации тромбоцитов перед использованием препарата. Активация тромбоцитов является важным процессом при использовании PRP, который, во-первых, способствует выбросу тромбоцитами α -гранул, содержащих большую часть биологически активных веществ, регулирующих процесс регенерации тканей, во-вторых, способствует активации фибриногена и инициации формирования фибриновой матрицы, также играющей важную роль в процессе заживления. Существует несколько подходов к активации PRP: использование химических активаторов (CaCl_2 , тромбин, коллаген), при-

менение физического подхода – цикл замораживание/размораживание, использование ультразвука, механическая активация с использованием фильтра с микропорами [14, 15].

Ряд исследователей для клинических исследований рекомендуют использовать неактивированную плазму [14].

Таким образом, в настоящее время существует широкий диапазон мнений, основанных на результатах исследований, посвященных изучению способов хранения и активации PRP, тем не менее подобные исследования остаются актуальными и необходимыми в аспекте создания универсального протокола подготовки PRP для клинического применения.

Фибробласты играют ключевую роль в процессе заживления ран, синтезируя факторы роста, компоненты внеклеточного матрикса, регулируя процессы сокращения раны, ее реэпителизацию и ремоделирование [16]. Культура дермальных фибробластов достаточно часто используется для оценки влияния различных прорегенераторных препаратов, в т.ч. и PRP, объективно отражая особенности клеточного ответа на различные стимулирующие влияния [17]. Но до настоящего времени открыты вопросы подбора оптимальных концентраций PRP в культуральной среде, плотности посадки клеток и использования метода активации плазмы перед введением.

Цель исследования. Данное исследование посвящено изучению свойств PRP in vitro и ее влияния на культуру клеток дермальных фибробластов в зависимости от ее концентрации в среде, способа активации, плотности посадки клеток.

Материал и методы

Процедура PRP. Для приготовления PRP использовали цельную кровь 4 здоровых доноров (средний возраст \pm SD: 20,3 \pm 0,8). Исследуемые подтвердили, что не курят, не принимали каких-либо лекарственных препаратов в течение недели до исследования. Отсутствие хронических соматических и острых инфекционных заболеваний подтверждено данными врачебного осмотра и медицинской документации исследуемых. Общий анализ крови выполняли на анализаторе Mindray BC-3600 (Китай). Содержание форменных элементов крови было в пределах референсных значений для данной возрастной группы, число тромбоцитов цельной крови ($M \pm SD$) – 232,3 \pm 38,3/л. Кровь забирали в пробирки (Improve 4,5 мл, с цитратом натрия 1:9 3,8%) Для приготовления PRP использовали один из классических протоколов одноэтапного центрифугирования [18] (ELMI Centrifuge CM-6MT, ротор 6M.02) 270 г 7 минут при температуре 22 °C; регистрировали фракционирование компонентов крови: эритроциты – нижний слой, лейкоцитарное кольцо – средний слой, плазма – верхний слой. Отбирали 1 мл плазмы (1/2 общего объема плазмы в среднем) из зоны непосредственно над лейкоцитарным кольцом, число тромбоцитов в готовых образцах составило ($M \pm SD$): 613,2 \pm 125,2 /л. Плазму помещали в стерильные пробирки типа Eppendorf, замораживали при температуре -20 °C, срок хранения до 1 месяца.

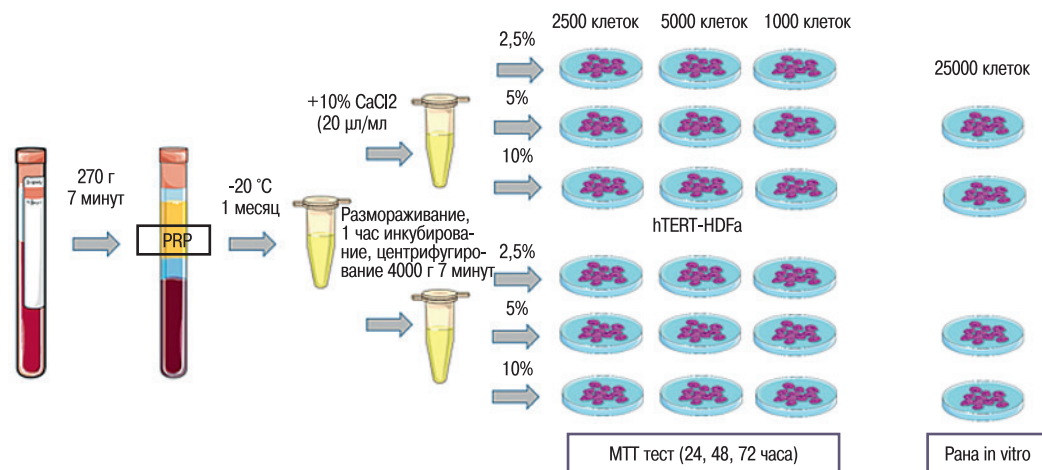


Рис. 1. Схема эксперимента подбора оптимальных условий оценки эффектов PRP на культуру дермальных фибробластов человека
Figure 1. Schematic diagram of the experiment of selecting optimal conditions for evaluating the effects of PRP on human dermal fibroblast culture

Безопасность подобного способа хранения показана в ряде исследований [11].

Культура клеток. Клеточная линия hTERT-HDFa (d220) иммортализованных дермальных фибробластов человека была получена из УНУ «Коллекция клеточных культур» ИБР РАН. Исследование проводили при разной плотности клеток: 2500 кл./лунка, 5000 кл./лунка и 10000 кл./лунка (96-луночный планшет); 25 000/ лунка для 24-луночного планшета. Для культивирования использовали среду DMEM (Servicebio, Китай) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) (Biosera, Франция) и 1% пенициллин-стрептомицин (Панэко, Россия). Клетки инкубировали при 37 °C и 5% CO₂ в течение 24 часов. Затем полная питательная среда заменялась на среду без сыворотки. В опытные лунки вносили активированную PRP доноров в концентрациях 10,0%, 5,0, 2,5%. Пробы без внесения PRP – отрицательный контроль. В качестве положительного контроля использовали аналогичную среду без PRP с добавлением 10% FBS (fetal bovine serum).

Активация тромбоцитов. В качестве активации использовали цикл «замораживание-размораживание». По данным предварительных серий экспериментов, данный способ активации является не вполне контролируемым и достаточным, на основании чего было принято решение сравнить эффективность данного вида активации с результатами проб с дополнительной активацией 10% CaCl₂ (20 л/мл) с последующей инкубацией в течение 1 часа при температуре 22 °C [19] и центрифугированием (EBA 21 Hettich, 4000 g x10 минут) для отделения фибринового сгустка. После чего супернатант активированной PRP отбирали и вносили в культуру клеток в соответствующей концентрации (рис. 1).

MTT-тест. Анализ выживаемости клеток с помощью MTT-теста проводился для определения наиболее эффективных условий эксперимента оценки влияния PRP на культуру фибробластов кожи человека (ФКЧ). Через 24, 48 и 72 часа инкубации клеток с PRP добавляли раствор MTT (5 мг/мл) и инкубировали 3,5 часа в стандартных условиях. Образовавшиеся кристаллы формазана растворяли с помощью ДМСО (диметилсульфоксид). Оптическую плотность образцов измеряли с помощью спектрофотометра (Thermo Scientific, США) при длине волны 570 нм против 650 нм. Жизнеспособность клеток в образце оце-

нивали относительно данных контроля (-), показатели которого принимали за 100%.

Протокол исследование раны in vitro (scratch assay). Клетки рассаживали в 24-луночный планшет (25 тыс. кл./лунка). Клетки инкубировали при 37 °C и 5% CO₂ в течение 24 часов. В моно-слое клеток кончиком дозатора (200 мкл) создавали дефект, после чего вносили PRP согласно схеме (рис. 1). Инкубировали 24 часа при тех же условиях. Морфологическую оценку клеток и фотографирование дефекта проводили через 0, 4 и 24 часа с помощью инвертированного микроскопа Микромед-И (Россия) и камеры Tourcam (Китай). Расчет % закрытия раны проводили в программе Fiji ImageJ (Research Services Branch of the National Institute of Mental Health USA) по формуле: закрытие раны = (S раны в 0 час. - S раны 24 час.) / S раны в 0 час. * 100%, где S раны – площадь раны в мкм² [20].

Флуоресцентная микроскопия. Морфологическую оценку, а также механизмы клеточной гибели проводили с помощью флуоресцентной микроскопии при двойном окрашивании акридиновым оранжевым (AO) 100 мкг/мл и йодистым пропидием (PI) 100 мкг/мл через 48 часов инкубации согласно протоколу [21]. AO окрашивает ядра живых клеток в зеленый цвет, апоптотических – в яко-зеленый и желтый. PI проникает только в клетки с нарушением целостности мембраны и окрашивает ядро красным. Флуоресцентную микроскопию проводили на люминесцентном инвертированном микроскопе BM35FXT (ICOE, Китай). Микрофотографии делали с помощью цифровой камеры Ломо МС-20 (Россия).

Статистический анализ. Программы StatTech v. 4.1.7 (ООО "Статтех", Россия). Оценка соответствия нормальному распределению - критерий Шапиро-Уилка. Сравнение групп с помощью критерия Краскела-Уоллиса, апостериорные сравнения – с помощью критерия Данна с поправкой Холма. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Формат описания данных медиана (Me), нижний и верхний квартили (Q1–Q3).

Результаты

Оценка жизнеспособности клеток линии hTERT-HDFa в зависимости от плотности посадки клеток продемонстрировало нали-

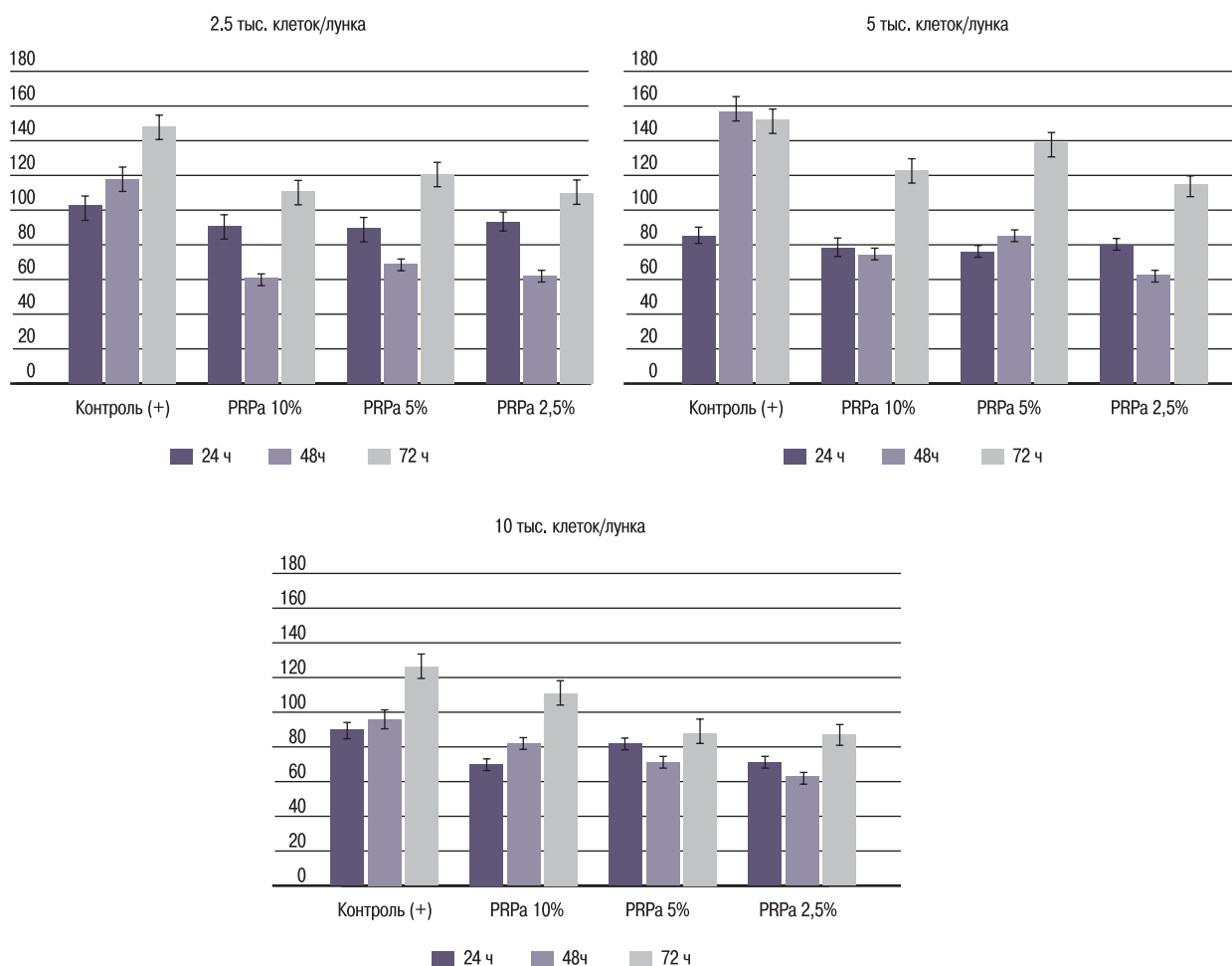


Рис. 2. Оценка влияния различных концентраций PRP (дополнительная активация CaCl₂) на метаболическую активность и жизнеспособность ФКЧ. (Контроль (-) – 100%.)

Figure 2. Evaluation of the effect of different PRP concentrations (additional CaCl₂ activation) on metabolic activity and viability of HFCs. (Control (-) – 100%.)

Таблица 1. Жизнеспособность ФКЧ в зависимости от плотности посадки и периода наблюдения
Table 1. Viability of HFC depending on planting density and observation period

Параметры Parameters	Плотность посадки / Planting density			p
	25 тыс. кл./мл 25 thousand cells/ml	50 тыс. кл./мл 50 thousand cells/ml	100 тыс. кл./мл 100 thousand cells/ml	
Жизнеспособность, Ме [IQR] Viability, Me [IQR]	99,99 [82,58; 113,03]	89,30 [80,10; 130,80]	81,35 [72,53; 100,54]	0,035
	Срок наблюдения / Observation period			
	24 часа / 24 hours	48 часов / 48 hours	72 часа / 72 hours	
PRP 2,5%, Ме [IQR]	69,90 [56,01; 85,28]	57,69 [47,31; 75,91]	98,54 [91,13; 112,59]	<0,001
PRP 5%, Ме [IQR]	78,33 [65,72; 83,36]	72,77 [57,05; 81,76]	115,88 [101,79; 130,68]	<0,001
PRP 10%, Ме [IQR]	72,24 [60,07; 81,97]	61,61 [52,33; 77,89]	113,65 [100,07; 143,45]	<0,001
Контроль (+), Ме [IQR] / Control (+), Me [IQR]	89,59 [83,96; 102,52]	115,51 [103,02; 141,06]	143,10 [133,26; 151,82]	< 0,001
	Дополнительная активация CaCl ₂ / Additional activation with CaCl ₂			
	Отсутствие / Absent	Наличие / Present		
PRP 2,5%, Ме [IQR]	73,43 [49,75; 95,60]	80,01 [57,74; 93,94]		0,846
PRP 5%, Ме [IQR]	79,40 [68,90; 106,76]	81,87 [65,98; 100,74]		0,686
PRP 10%, Ме [IQR]	73,80 [56,80; 97,25]	77,05 [58,82; 102,36]		0,888
Контроль (+), Ме [IQR] / Control (+), Me [IQR]	119,66 (30,94)		119,66 (30,94)	1,000

Примечание. p – достоверность межгрупповых различий; принцип определения в группы: плотность посадки, срок наблюдения и наличие дополнительной активации.

Note: p - significance of intergroup differences; the basis of assignment to groups: planting density, observation period, and presence of additional activation.

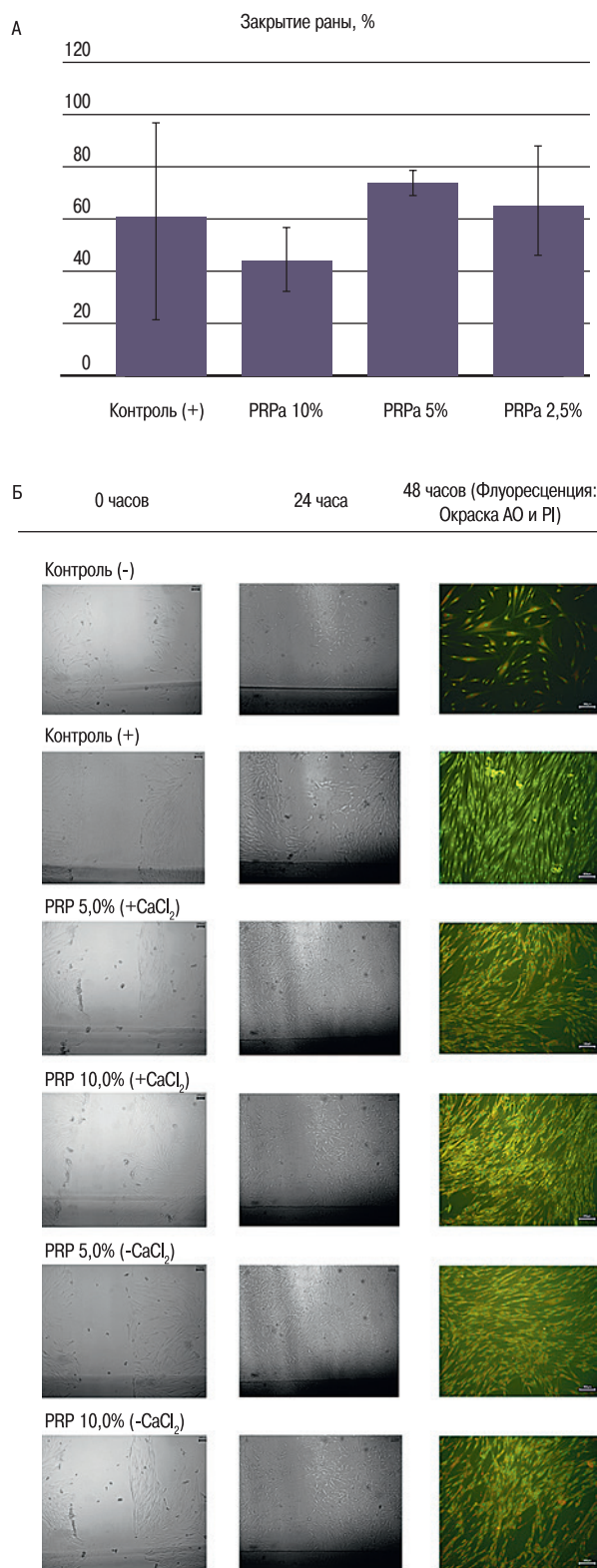


Рис. 3. Процент закрытия (А) и фотография дефекта (Б) через 24 часа после внесения PRP. Достоверных отличий между группами PRP 5,0% и PRP 10,0% не отмечалось. Scale bar=100 мкм.

Figure 3. Percentage of closure (A) and photographs of the defect (B) 24 hours after PRP application. No significant differences were observed between the PRP 5.0% and PRP 10.0% groups. Scale bar=100 μ m.

чие достоверных межгрупповых отличий (табл. 1). Причем оптимальные показатели жизнеспособности клеток регистрировали через 72 часа наблюдения. Влияние дополнительной активации CaCl_2 PRP перед внесением в среду на жизнеспособность ФКЧ оказалось несущественным, но при этом было более удобно в аспекте управления процессом активации и приготовления необходимых разведений PRP.

Оценка влияния различных концентраций PRP в культуральной среде на жизнеспособность и метаболическую активность ФКЧ выявила, что наименее эффективно внесение PRP в концентрации 2,5%. Использование PRP в концентрациях 5,0 и 10,0% показало сопоставимые результаты (рис. 2).

Учитывая результаты МТТ-теста, для оценки влияние PRP на деление и миграцию клеток были выбраны концентрации плазмы 5% и 10% с применением обоих способов активации. Исследования показали, что миграция клеток происходила во всех группах (рис. 3), и дефекты закрылись на 2/3 в течение 24 часов, через 48 часов регистрировали полное закрытие раны.

Обсуждение

Результаты исследования показали, что жизнеспособность и метаболическая активность фибробластов зависит от плотности посадки культуры, концентрации PRP в среде, срока наблюдения после внесения плазмы. Оптимальная плотность посадки, при которой выявляется максимальная метаболическая активность ФКЧ является 2,5–5,0 тыс. клеток на лунку (25–50 тыс./мл), при увеличении плотности отмечается снижение интенсивности роста культуры. Проведенные исследования показали достаточность цикла «замораживание-размораживание» как способа активации PRP, что согласуется с исследованиями других авторов. [21] Дополнительное внесение CaCl_2 не оказывало существенного влияния на показатели метаболической активности и подвижности ФКЧ. Но следует отметить, что дополнительное внесение CaCl_2 ускоряло процесс образования фибринового сгустка, что в итоге снижало вязкость супернатанта и не затрудняло процесс разведения PRP. Также в литературе показано, что внесение CaCl_2 увеличивает дегрануляцию тромбоцитов и повышает содержание факторов роста по сравнению с активацией при размораживании [23].

Изучение метаболической активности культуры на разных сроках культивирования показало наилучшие результаты через 72 часа наблюдения. В первые сутки после внесения PRP регистрировали снижение метаболической активности ФКЧ, что, вероятно, связано с присутствующими в плазме продуктами деградации тромбоцитов и другими факторами, ингибирующими рост. Полученный результат не согласуется с данными литературы относительно данного срока наблюдения, хотя к 3-м суткам эксперимента мы регистрировали увеличение жизнеспособности и метаболической активности аналогично данным исследованиям [17, 24].

Одним из важных свойств ФКЧ является их миграционный потенциал в ситуации повреждения, что является важным механизмом реализации процессов заживления ран. Результаты изучения раны *in vitro* показали, что область царапины закрывается быстрее при использовании PRP. Полное закрытие дефекта регистрируется к 48 часам эксперимента. Однако результаты статистических тестов не выявили достоверных отличий по данному параметру между образцами 5,0 и 10,0% PRP.

Учитывая известные положительные клинические эффекты PRP терапии и выявленные особенности протокола изучения

влияний PRP, полученные данные не только расширяют возможности клинического применения данного способа для стимуляции процессов регенерации послеоперационных ран в клинике, в частности в оториноларингологии, стоматологии, челюстно-лицевой хирургии [25–27], но и открывают перспективы изучения молекулярных механизмов положительных эффектов PRP как основу для совершенствования технологии.

Заключение

При оценке биологических эффектов PRP на культуру ФКЧ рекомендуется использовать 5,0–10,0% концентрации активированного образца в культуральной среде, оптимальная посадочная плотность для данной культуры 25 000–50 000 кл./мл. Использование дополнительной активации CaCl₂ после размораживания не влияло на результаты исследований, но облегчало работу с образцами плазмы. Наибольшая метаболическая активность культуры ФКЧ зарегистрирована на 72 часа после внесения PRP.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Rathna R.P., Kulandhaivel M. *Advancements in wound healing: integrating biomolecules, drug delivery carriers, and targeted therapeutics for enhanced tissue repair.* Arch. Microbiol. 2024;206(4):199. Doi: 10.1007/s00203-024-03910-y.
- Костяева М.Г., Еремина И.З., Кастыро И.В. *Морфология и физиология слюнных желез. Голова и шея.* 2022;10(3):81–7. Doi: 10.25792/HN.2022.10.3.81–87. [Kostyaeva M.G., Eremina I.Z., Kastyro I.V. *Morphology and physiology of the salivary glands. Head and neck.* 2022;10(3):81–7 (In Russ.)].
- Лукьянчиков В.А., Шатохин Т.А., Горозжанин В.А. и др. *Удаление опухолей верхней трети шеи и основания черепа с использованием внутриротовой межкортикальной остеотомии нижней челюсти. Голова и шея.* 2023;11(3):33–41. Doi: 10.25792/HN.2023.11.3.33-41. [Lukyanchikov V.A., Shatokhin T.A., Gorozhanin V.A., et al. *Mandibular bilateral sagittal split osteotomy as a treatment approach for upper neck and skull base tumors. Head and neck.* 2023; 11(3): 33-41 (In Russ.)].
- Alfouzan A.F. *Radiation therapy in head and neck cancer.* Saudi Med. J. 2021;42(3):247–54. Doi: 10.15537/smj.2021.42.3.20210660. [PMID: 33632902; PMID: PMC7989258].
- Решетов И.В., Володина В.Д., Серова Н.С., Романко Ю.С. *Оценка информативности лучевых методов исследования при лечении опухолей головы и шеи с использованием неoadъювантной химиотерапии. Голова и шея.* 2023;11(2):75–80. Doi: 10.25792/HN.2023.11.2.75-80. [Reshetov I.V., Volodina V.D., Serova N.S., Romanko Yu.S. *The utility of radiation imaging during the treatment of head and neck tumors with neoadjuvant chemotherapy. Head and neck.* 2023;11(2):75–80 (In Russ.)].
- Igrunkova A., Fayzullin A., Serejnikova N., et al. *Beneficial effects of dinitrosyl iron complexes on wound healing compared to commercial nitric oxide plasma generator.* Intern. J. Mol. Sci. 2023;24(5):4439.
- Калинина Е.А., Цокова Л.В., Литвинов А.Н. и др. *Оценка результатов направленной костной регенерации на фоне применения гипоксена при хроническом пародонтите. Голова и шея.* 2023;11(4):65–8. [Kalinina E.A., Tsokova L.V., Litvinov A.N., et al. *Evaluation of guided bone regeneration outcomes on the background of hypoxen treatment in chronic periodontitis. Head and neck.* 2023;11(4):65–8 (In Russ.)].
- Shams F., Moravvej H., Hosseinzadeh S., et al. *Overexpression of VEGF in dermal fibroblast cells accelerates the angiogenesis and wound healing function: in vitro and in vivo studies.* Sci. Rep. 2022;12(1):18529. Doi: 10.1038/s41598-022-233048.
- Baba K., Yamazaki Y., Sone Y., et al. *An in vitro long-term study of cryopreserved umbilical cord blood-derived platelet-rich plasma containing growth factors-PDGF-BB, TGF-β, and VEGF.* J. Craniomaxillofac. Surg. 2019;47(4):668–75. Doi: 10.1016/j.jcms.2019.01.020. [Epub 2019 Jan 22, PMID: 30738636].
- Nakajima R., Saita Y., Kobayashi Y., et al. *Comparison of bioactive substances in novel-developed freeze-dried platelet-rich plasma (PRP) and activated normal PRP, and investigation of bioactive substance levels after long-term storage.* Regen. Ther. 2024;27:200–6. Doi: 10.1016/j.reth.2024.03.021. [PMID: 38571893; PMID: PMC10990710].
- Beitia M., Delgado D., Mercader J., et al. *The effect of short-term cryopreservation on the properties and functionality of platelet-rich plasma.* Platelets, 2023;34(1):2210243. Doi: 10.1080/09537104.2023.2210243.
- McClain A.K., McCarril T.M. *The effect of four different freezing conditions and time in frozen storage on the concentration of commonly measured growth factors and enzymes in equine platelet-rich plasma over six months.* BMC. Vet. Res. 2019;15(1):292. Doi: 10.1186/s12917-019-2040-4. [PMID: 31412868, PMID: PMC6694589].
- Moore G.W., Maloney J.C., Archer R.A., et al. *Platelet-rich plasma for tissue regeneration can be stored at room temperature for at least five days.* Br. J. Biomed. Sci. 2016 74(2):71–7. Doi: 10.1080/09674845.2016.1233792.
- Cavallo C., Roffi A., Grigolo B., et al. *Platelet-Rich Plasma: The Choice of Activation Method Affects the Release of Bioactive Molecules.* Biomed. Res. Int. 2016;2016:6591717. Doi: 10.1155/2016/6591717. [Epub 2016 Sep 8, PMID: 27672658, PMID: PMC5031826].
- Michno A., Kirkor Z., Gojtowska E., et al. *Pulsed Radiofrequency Neuromodulation Contributes to Activation of Platelet-Rich Plasma in vitro Conditions.* Neuromodulation. 2021;24(8):1451–7. Doi: 10.1111/ner.13105. [Epub 2020 Feb 6, PMID: 32027438].
- Wei K., Nguyen H.N., Brenner M.B. *Fibroblast pathology in inflammatory diseases.* J. Clin. Investig. 2021;31(20):e149538. Doi: 10.1172/JCI149538.
- Idris M., Kusuma I., Juniarti J. *Effect of platelet-rich plasma on fibroblasts induced by lipopolysaccharide: in vitro study for wound healing.* Curr. Biomed. 2023;2(1):36–44. https://doi.org/10.29244/curbiomed.2.1.36-44.
- Alves R., Grimalt R. *A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification.* Skin. Appendage Disord. 2018;4(1):18–24. Doi: 10.1159/000477353. [Epub 2017 Jul 6. PMID: 29457008; PMID: PMC5806188].
- Arora G., Arora S. *Platelet-rich plasma-Where do we stand today? A critical narrative review and analysis.* Dermatol. Ther. 2021;34(1):e14343. Doi: 10.1111/dth.14343. [Epub 2020 Oct 8, PMID: 32979292].
- Suarez-Arnedo A., Torres Figueroa F., Clavijo C., et al. *An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays.* PLoS One. 2020;15(7):e0232565. Doi: 10.1371/journal.pone.0232565. [PMID: 32722676; PMID: PMC7386569].
- McGahon A.J., Martin S.J., Bissonnette R.P., et al. *The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro.* Methods Cell. Biol. 1995;46:153–85. Doi: 10.1016/s0091-679x(08)61929-9. [PMID: 7541883].
- Kikuchi N., Yoshioka T., Taniguchi Y., et al. *Optimization of leukocyte-poor platelet-rich plasma preparation: a validation study of leukocyte-poor platelet-rich plasma obtained using different preparer, storage, and activation methods.* J. Exp. Orthop. 2019;6(1):24. Doi: 10.1186/s40634-019-0190-8. [PMID: 31161535, PMID: PMC6546777].
- Smith O.J., Talaat S., Tomouk T., et al. *An Evaluation of the Effect of Activation Methods on the Release of Growth Factors from Platelet-Rich Plasma.* Plast. Reconstr. Surg. 2022;149(2):404–11. Doi: 10.1097/PRS.0000000000008772. [PMID: 35077415].
- Hassan R., Sabry D., Rabea A.A. *Assessment of ultra-structure, viability and function of lipopolysaccharides-stimulated human dermal fibroblasts treated*

- with chrysin and exosomes (in vitro study). *Saudi Dent. J.* 2022;34(5):346–54. Doi: 10.1016/j.sdentj.2022.04.006. [Epub 2022 Apr 25, PMID: 35814848, PMCID: PMC9263745].
25. *Найван А.К., Маркушин А.А., Кастыро И.В. и др. Сравнение степени алогогенности ринопластики, септопластики и риносептопластики. Голова и шея.* 2023;11(4):17–24 [Nashwan A.K., Markushin A.A., Kastyro I.V., et al. Comparison of the degree of allogenicity of rhinoplasty, septoplasty and rhinoseptoplasty *Head and Neck.* 2023;11(4):17–24 (In Russ.)].
 26. *Mijiritsky E., Assaf H.D., Peleg O., et al. Use of PRP, PRF and CGF in Periodontal Regeneration and Facial Rejuvenation-A Narrative Review. Biology (Basel).* 2021;10(4):317. Doi: 10.3390/biology10040317.
 27. *Драгунова С.Г., Косырева Т.Ф., Хамидулин Г.В. и др. Оценка влияния закрытого синус-лифтинга на изменения вегетативной нервной системы в раннем послеоперационном периоде. Голова и шея.* 2022;10(1):8–15 [Dragunova S.G., Kosyreva T.F., Khamidulin G.V., et al. Assessment of the impact of closed sinus lift on changes in the autonomic nervous system in the early postoperative period. *Head and Neck.* 2022;10(1):8–15 (In Russ.)].

Поступила 01.06.2024

Получены положительные рецензии 29.06.24

Принята в печать 13.07.24

Received 01.06.2024

Positive reviews received 29.06.24

Accepted 13.07.24

Вклад авторов. Все авторы внесли эквивалентный вклад в написание статьи.
The contribution of the authors. All the authors have made an equivalent contribution to the writing of the article.

Информация об авторах:

Власова Татьяна Ивановна – д.м.н., профессор, заведующая кафедрой нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО МГУ им. Н.П. Огарева. Адрес: 430005, Республика Мордовия, Саранск, ул. Большевикская, д. 68. ORCID: 0000-0002-2624-6450.

Бродовская Екатерина Павловна – к.м.н., доцент кафедры анестезиологии, реаниматологии и трансфузиологии с курсом медицины катастроф ФГБОУ ВО МГУ им. Н.П. Огарева. Адрес: 430005, Республика Мордовия, Саранск, ул. Большевикская, д. 68. ORCID: 0000-0002-1060-9843.

Мадонов Константин Сергеевич – ассистент кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО МГУ им. Н.П. Огарева». Адрес: 430005, Республика Мордовия, Саранск, ул. Большевикская, д. 68.

Хуторская Ирина Александровна – к.б.н., старший преподаватель кафедры цитологии, гистологии и эмбриологии с курсами медицинской биологии и молекулярной биологии клетки ФГБОУ ВО МГУ им. Н. П. Огарева. Адрес: 430005, Республика Мордовия, Саранск, ул. Большевикская, д. 68. ORCID: 0000-0001-5553-0525.

Information about the authors:

Tatiana Ivanovna Vlasova – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Normal and Pathological Physiology, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Ogarev Mordovia State University. Address: 68 Bolshevistskaya St., 430005 Saransk, Republic of Mordovia. ORCID: 0000-0002-2624-6450.

Ekaterina Pavlovna Brodovskaya – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Anesthesiology, Resuscitation, and Transfusion Medicine with a Course of Disaster Medicine, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Ogarev Mordovia State University. Address: 68 Bolshevistskaya St., 430005 Saransk, Republic of Mordovia. ORCID: 0000-0002-1060-9843.

Konstantin Sergeevich Madonov – Assistant of the Department of Normal and Pathological Physiology, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Ogarev Mordovia State University. Address: 68 Bolshevistskaya St., 430005 Saransk, Republic of Mordovia.

Irina Alexandrovna Khutorskaya – Candidate of Biological Sciences, Senior Lecturer of the Department of Cytology, Histology, and Embryology with Courses of Medical Biology and Molecular Ciology of the Cell, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Ogarev Mordovia State University. Address: 68 Bolshevistskaya St., 430005 Saransk, Republic of Mordovia. ORCID: 0000-0001-5553-0525.