

<https://doi.org/10.21516/2072-0076-2025-18-1-92-99>



Регуляция активности коллагенолитических ферментов с помощью тромбоцитных препаратов *in vitro*

Е.В. Ченцова¹, Н.В. Боровкова^{2,3}, К.В. Сироткина^{1✉}, М.С. Макаров², М.В. Сторожева², И.Н. Пономарев²

¹ ФГБУ «НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, ул. Садовая-Черногрозская, д. 14/19, Москва, 105062, Россия

² ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского» Департамента здравоохранения города Москвы, Большая Сухаревская площадь, д. 3, Москва, 129090, Россия

³ ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, ул. Островитянова, д. 1, Москва, 117997, Россия

Цель работы — оценить *in vitro* влияние тромбоцитных препаратов на активность коллагенолитических ферментов. **Материал и методы.** В качестве коллагеновых матриц использовали трансплантаты амниона человека и коллагеновые повязки на основе коллагена I типа человека. В качестве источника коллагенолитических ферментов использовали препарат Ферменкол. Исследовали тромбоцитные препараты: богатая тромбоцитами плазма (БотП); концентрированная суспензия тромбоцитов, отмытых от плазмы (ОтмТр); бедная тромбоцитами плазма (БедПл); лизаты БотП, БедПл и ОтмТр. Для оценки антиколлагенолитической активности определяли уровень автофлуоресценции коллагена тканевых трансплантатов, концентрацию коллагена в растворе, интенсивность пролиферации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) на поверхности трансплантатов. **Результаты.** Препараты на основе БотП и ОтмТр вызывали значительное ингибирование коллагенолитической активности, которое отсутствовало при использовании БедПл. Интенсивность подавления коллагенолитических ферментов в БотП и ОтмТр зависела от исходного содержания тромбоцитов с гранулами. Тромбоцитные препараты значительно усиливали адгезию и рост ММСК на поверхности амниона и коллагеновой повязки. **Заключение.** Использование тромбоцитарных лизатов позволяет получить препараты, в которых совмещается подавление коллагенолитической активности и ростстимулирующий эффект, который сохраняется даже при разведении лизата БотП в отношении 1:200. Для эффективного ингибирования коллагенолитических ферментов рекомендуется использовать БотП с исходной концентрацией тромбоцитов с гранулами не менее 350 тыс/мкл.

Ключевые слова: амнион; коллаген; тромбоциты; антиколлагенолитическая активность; автофлуоресценция; пролиферация

Конфликт интересов: отсутствует.

Прозрачность финансовой деятельности: никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Для цитирования: Ченцова Е.В., Боровкова Н.В., Сироткина К.В., Макаров М.С., Сторожева М.В., Пономарев И.Н. Регуляция активности коллагенолитических ферментов с помощью тромбоцитных препаратов *in vitro*. Российский офтальмологический журнал. 2025; 18 (1): 92-9. <https://doi.org/10.21516/2072-0076-2025-18-1-92-99>

Regulation of collagenolytic activity using platelet preparations *in vitro*

Ekaterina V. Chentsova¹, Natalia V. Borovkova^{2,3}, Kseniya V. Sirotkina¹✉, Maksim S. Makarov²,
Maya V. Storozheva², Ivan N. Ponomarev²

¹ Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, 14/19, Sadovaya-Chernogryazskaya St., Moscow, 105062, Russia

² N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, 3, Bolshaya Sukharevskaya Square, Moscow, 129090, Russia

³ Pirogov Russian National Research Medical University, 1, Ostrovityanova St., Moscow, 117997, Russia

sirotkina.ksen8@yandex.ru

Purpose: to study different platelet preparations' impact on collagenase activity *in vitro*. **Materials and methods.** Human amnion transplants and collagen covers, based on human type I collagen, were used as collagen matrices. The drug Fermencol was used as a source of collagen-lytic peptidases. We used platelet-rich plasma (PRP); concentrated suspension of platelets washed from plasma (WP); platelet-poor plasma (PPP); lysates of PRP, PPP and WP. To assess the collagen-lytic activity we studied the level of collagen autofluorescence in tissue grafts, collagen concentration in solution, proliferation intensity of mesenchymal multipotent stromal cells (MMSC) on the surface of the grafts. **Results.** Preparations based on PRP and WP stimulated significant inhibition of collagen-lytic activity, which was absent in PPP. The inhibition of collagen-lytic effect in PRP and WP depended on the initial content of platelets with granules. Platelet preparations significantly enhanced the adhesion and growth of MMSC on the surface of the amnion and collagen cover. **Conclusion.** The use of platelet lysates combined high inhibition of collagen-lytic peptidases and growth-stimulating effect, which persists even with dilution of PRP lysate in ratio 1:200. For effective inhibition of collagen-lytic peptidases is recommended to use PRP with initial concentration of platelets with granules at least 350 thousand/ml.

Keywords: amnion; collagen; platelets; anti-collagenase activity; autofluorescence; proliferation

Conflict of interests: there is no conflict of interests.

Financial disclosure: no author has a financial or property interest in any material or method mentioned.

For citation: Chentsova E.V., Borovkova N.V., Sirotkina K.V., Makarov M.S., Storozheva M.V., Ponomarev I.N. Regulation of collagenolytic activity using platelet preparations *in vitro*. Russian ophthalmological journal. 2025; 18 (1): 92-9 (In Russ.). <https://doi.org/10.21516/2072-0076-2025-18-1-92-99>

Лекарственные препараты на основе тромбоцитов человека могут быть совмещены с различными раневыми покрытиями, в том числе с тканевыми трансплантатами. Насыщение раневых покрытий тромбоцитами позволяет увеличить их общий репаративный потенциал, получить раневое покрытие с определенным биологическим эффектом. В зависимости от типа тканевого дефекта актуальным является выбор оптимальной формы тромбоцитных препаратов. Тромбоциты могут быть использованы в виде высококонцентрированной суспензии в плазме (богатая тромбоцитами плазма, БоТП) или в бесплазменной среде, в виде тромбоцитарного лизата, также возможно использование плазмы, полученной после полной или частичной деагрегации тромбоцитов [1–3]. Изделия на основе коллагена представляются весьма удобными носителями тромбоцитных препаратов благодаря таким свойствам, как биосовместимость, гигроскопичность, высокая адгезивная привлекательность для тромбоцитов, а также их гранул [4]. При лечении дефектов роговицы востребованы тканевые трансплантаты с малой толщиной и невысокой степенью компактизации коллагена. К ним относятся коллагеновые повязки, а также трансплантаты на основе амниона. Ранее нами было показано, что совмещение трансплантатов амниона с тромбоцитными препаратами увеличивает их ростстимулирующий эффект [5]. При этом мы не учитывали наличие в тромбоцитах тканевых ингибиторов металлопротеиназ и других биологически активных веществ, способных регулировать активность коллагенолитических ферментов [6]. Использование тромбоцитных препаратов в качестве ингибитора

коллагенолитических ферментов представляется весьма перспективным при лечении кератолитизиса.

ЦЕЛЬ работы — оценка влияния тромбоцитных препаратов на активность коллагенолитических ферментов *in vitro*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проводили в 2022–2023 гг. в научном отделении биотехнологии и трансфузиологии ГБУЗ НИИ СП им. Н.В. Склифосовского. В качестве коллагеновых матриц использовали образцы аллогенного амниона и коллагеновые повязки на основе коллагена I типа человека. Образцы амниона предварительно консервировали путем высушивания на поверхности силикатных гранул по стандартной методике [7]. Коллагеновые повязки готовили из 0,7–0,8%-ного раствора жидкого коллагена I типа человека, выделенного из сухожилий доноров тканей [8]. В качестве источника коллагенолитических ферментов использовали препарат Ферменкол, содержащий 9 типов коллагенолитических ферментов. Для разведения сухой фракции ферментов использовали изотонический физраствор (0,9% хлорид натрия), 4 мг сухой фракции разводили 40 мл физраствора. Опытные образцы амниона и коллагеновых повязок площадью 0,5–1,0 см² предварительно вымачивали в изотоническом физрастворе, затем помещали в эппендорфы и вымачивали в 500 мкл препарата Ферменкол или 500 мкл смеси ферменкола и тромбоцитных препаратов в течение 10 мин при 20–22 °С. Во всех случаях соотношение ферменкола и тромбоцитных препаратов составляло 1:1.

В работе использовали следующие тромбоцитные препараты: БоТП; концентрированная суспензия тромбоцитов, отмытых от плазмы (ОтмТр); бедная тромбоцитами плазма (БедПл); лизаты БоТП, БедПл и ОтмТр; лизаты БоТП, разведенные изотоническим физраствором 0,9 % хлорида натрия в соотношении 1:200 и 1:300. Для получения БоТП пробирки с исходной кровью, консервированной на цитрате или ЭДТА, центрифугировали в течение 4–5 мин с ускорением 300–350 g, затем отбирали супернатантную плазму с тромбоцитами и повторно центрифугировали плазму в течение 17 мин с ускорением 700 g. В результате на дне формировался осадок тромбоцитов. Супернатант представлял собой БедПл с концентрацией тромбоцитов менее 100 тыс/мкл. БедПл в количестве от 2/3 до 3/4 от всего ее объема удаляли из пробирки, в оставшемся объеме ресуспендировали осадок тромбоцитов для получения БоТП. Для получения ОтмТр проводили двухэтапное центрифугирование тромбоцитов с теми же режимами, как и при получении лизата БоТП. После получения осадка тромбоцитов из образцов удаляли всю жидкую фракцию и вносили фосфатно-солевой раствор PBS с pH = 7,3 или изотонический 0,9%-ный раствор хлорида натрия в объеме от 1/4 до 1/3 от всего объема забранной плазмы, проводили ресуспендирование осадка до полного исчезновения тромбоцитарных конгломератов. Для получения тромбоцитарных лизатов образцы БоТП, ОтмТр и БедПл замораживали до –40 °С с последующей медленной разморозкой при +2–4 °С [9]. Для оценки содержания тромбоцитов с гранулами использовали способ оценки морфофункционального статуса тромбоцитов, основанный на витальном окрашивании клеток. Концентрация тромбоцитов с гранулами БоТП и ОтмТр варьировала от 280 до 480 тыс/мкл.

Антиколлагенолитическую активность оценивали по общему количеству свободного белка в среде после обработки трансплантатов и по уровню автофлуоресценции коллагена в составе трансплантатов. Общий белок определяли по УФ-методике оценки общей концентрации белка [10, 11]. Методика основана на двух физико-химических свойствах белков: 1-е — поглощение белков в УФ-области — количественно описывается законом Бера — Ламберта — Бугера, где оптическая плотность раствора линейно зависит от концентрации белка в растворе; 2-е — соотношение оптической плотности белков при длине волны 280 и 260 нм — является стабильным для белков, независимо от их типа. Таким образом, регистрация оптической плотности при 280 и 260 нм позволяет оценить общую концентрацию белка в смеси белков [11]. С помощью спектрофотометра оценивали оптическую плотность среды при длине волны 280 нм (A280) и 260 нм (A260), концентрацию белка (мг/мл) рассчитывали по формуле: концентрация белка = $1.55A_{280} - 0.76A_{260}$. Оценивали содержание общего белка при экспозиции коллагеновой повязки в физрастворе, в растворе ферменкола (разведение физраствором 1:1) без повязки, в смеси раствора ферменкола и тромбоцитарного лизата, разведенного 1:200 или 1:300 (соотношение раствора ферменкола и лизата составляло 1:1). Параллельно оценивали концентрацию белка в растворе ферменкола и смеси ферменкол + тромбоцитарный лизат без добавления повязок для оценки исходного уровня белка в растворе ферменкола и в лизате. Для оценки концентрации свободного коллагена из концентрации общего белка в опыте вычитали концентрацию белка в растворе ферменкола и смеси ферменкол + тромбоцитарный лизат.

Для количественной характеристики автофлуоресценции коллагеновых волокон использовали параметр средней

интенсивности свечения (mean fluorescence activity, MFI). Полученные цифровые фотографии переносили в программу Adobe Photoshop 8, выделяли отдельные изображения коллагеновых волокон и определяли интенсивность их флуоресценции в фут-канделах [12]. Оценку антиколлагенолитической активности тромбоцитных препаратов оценивали по сохранности MFI тканевых трансплантатов и выражали в процентах. Сохранность MFI рассчитывали по формуле $(MFI_{\text{опыт}} - MFI_{\text{ферменкол}}) / (MFI_{\text{контроль}} - MFI_{\text{ферменкол}})$, где $MFI_{\text{контроль}}$ — уровень автофлуоресценции матриц до воздействия ферменкола, $MFI_{\text{ферменкол}}$ — уровень автофлуоресценции матриц после воздействия ферменкола (ингибирование металлопротеиназ полностью отсутствует), $MFI_{\text{опыт}}$ — уровень автофлуоресценции матриц, вымоченных в тромбоцитных препаратах, после воздействия ферменкола. При $MFI_{\text{опыт}} = MFI_{\text{контроль}}$ сохранность MFI составляет 100 % (коллагенолитические ферменты в составе ферменкола полностью ингибированы, антиколлагенолитическая активность максимальная); при $MFI_{\text{опыт}} = MFI_{\text{ферменкол}}$ сохранность MFI составляет 0 % (антиколлагенолитическая активность полностью отсутствует).

Все исследования *in vitro* проводили на культуре мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) человека 3–8-го пассажа. В каждую лунку с площадью ростовой поверхности 1,9 см² вносили по 10 тыс. клеток в среде ДМЭМ (Dulbecco's Modified Eagle Medium), содержащей 10 % эмбриональной бычьей сыворотки. В контрольные лунки вносили суспензию клеток без трансплантатов, в опытные лунки помещали образцы амниона или коллагеновой губки, затем вносили суспензию клеток. Клетки инкубировали 3 сут при температуре 37 °С и 5%-ной концентрации CO₂ в атмосфере. Оценивали количество клеток на поверхности трансплантатов, общую структурную целостность клеток и их морфологию. Для этого клетки окрашивали витальным (прижизненным) флуорохромным красителем на основе триафлавина — акридинового оранжевого или триафлавина-родамина С. В работе использовали конфокальный микроскоп Nikon Eclipse 80i, совмещенный с флуоресцентной лампой Nikon Intesilight C-HGFi (Nikon Corporation, Япония). Для получения флуоресцентного изображения окрашенных тромбоцитов и диплоидных клеток человека использовали синий светофильтр с λ возбуждения 450–490 нм, λ эмиссии — от 520 нм, время экспозиции — 0,25–1,0 с.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью методов вариационной статистики с использованием пакета программ Microsoft Excel 2000. Вычисляли средние арифметические значения (M), среднеквадратичные отклонения (σ). Для оценки различий использовали t-критерий Стьюдента. Проверку распределения на нормальность проводили с помощью теста Колмогорова — Смирнова. Различия значений считали достоверными при уровне значимости более 95 % ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Γοὰτῆα αἰδῶεῖ ἑῶααἰ ἰῶεὸς-ἀνῆῖ ἀεὶ ῶαἰ ἰνὸς. В исходных образцах амниона уровень автофлуоресценции составил $7,2 \pm 0,4$, в коллагеновых повязках — $26,4 \pm 0,5$. Если в коллагеновых повязках коллаген имел мелкосетчатую структуру, то в трансплантатах амниона коллаген имел диффузный вид с очень равномерным распределением материала, отдельные волокна не выявлялись (рис. 1, А, Б). После обработки препаратом Ферменкол уровень MFI достоверно снижался в образцах амниона в 2,0 раза, в коллагеновых повязках — в 2,4 раза (табл. 1, рис. 1, В, Г). В присутствии лизатов БоТП и ОтмТр снижение MFI было гораздо менее

выраженным и не превышало 1,2 раза, в присутствии лизатов БедПл уровень MFI значимо не отличался от опытов без использования тромбоцитных препаратов (табл. 1, рис. 1, Д—З). Разведение лизатов БоТП 1:200 и 1:300 достоверно снижало антиколлагенолитическую активность,

с другой стороны, в опытах с разведением лизата БоТП 1:200 MFI амниона и коллагеновых повязок была достоверно выше, чем при обработке ферменколом без тромбоцитных препаратов. В опытах, где использовали БоТП и ОтмТр с разным содержанием тромбоцитов с гранулами, сохран-

ность MFI варьировала в очень широком диапазоне: от 20 до 93 % в трансплантатах через сутки экспозиции и от 5 до 90 % через 3 сут экспозиции. При этом была выявлена выраженная корреляционная связь между общим содержанием тромбоцитов с гранулами и сохранностью MFI, в опытах с амнионом коэффициент корреляции был выше, чем в опытах с коллагеновой повязкой (табл. 2). Наибольшее ингибирование коллагенолитических ферментов ферменкола мы наблюдали при обработке трансплантатов лизатом БоТП или ОтмТр с исходной концентрацией тромбоцитов с гранулами 350–460 тыс/мкл. В этом случае сохранность MFI амниона и коллагеновых повязок составляла 70–90 % через сутки и 60–80 % через 3 сут с момента обработки. При концентрации тромбоцитов в исходной БоТП и ОтмТр выше 460 тыс/мкл и ниже 350 тыс/мкл ингибирующий эффект препарата был гораздо менее выраженным. Таким образом, для ингибирования коллагенолитических ферментов наиболее оправданно использовать лизаты БоТП с концентрацией тромбоцитов с гранулами от 350 до 460 тыс/мкл.

Стоит отметить, что вымачивание трансплантатов в БоТП и ОтмТр проходило при температуре 20–22 °С, при которой в норме отсутствует активная массовая адгезия тромбоцитов. Тромбоцитарные конгломераты и агрегаты не выявлялись на поверхности трансплантатов амниона и коллагеновых повязок. С другой стороны, тромбоциты могли адсорбироваться на поверхности трансплантатов, а также адгезировать дискретно (отдельными клетками). Полученный эффект очень интересен и указывает на то, что высококонцентрированные суспензии тромбоцитов могут быть использованы для повышения антиколлагенолитической активности тромбоцитов без их дополнительной активации или криодеструкции.

Спектроскопический анализ показал, что обработка коллагеновых повязок раствором ферменкола увеличивала концентрацию свободного белка в 2,38 раза, тогда как в присутствии лизата БоТП, разведенного 1:200, активность металлопротеиназ практически отсутствовала. При использовании лизата БоТП, разведенного 1:300, концентрация белка была в 1,46 раза выше, чем в опытах с разведением ли-

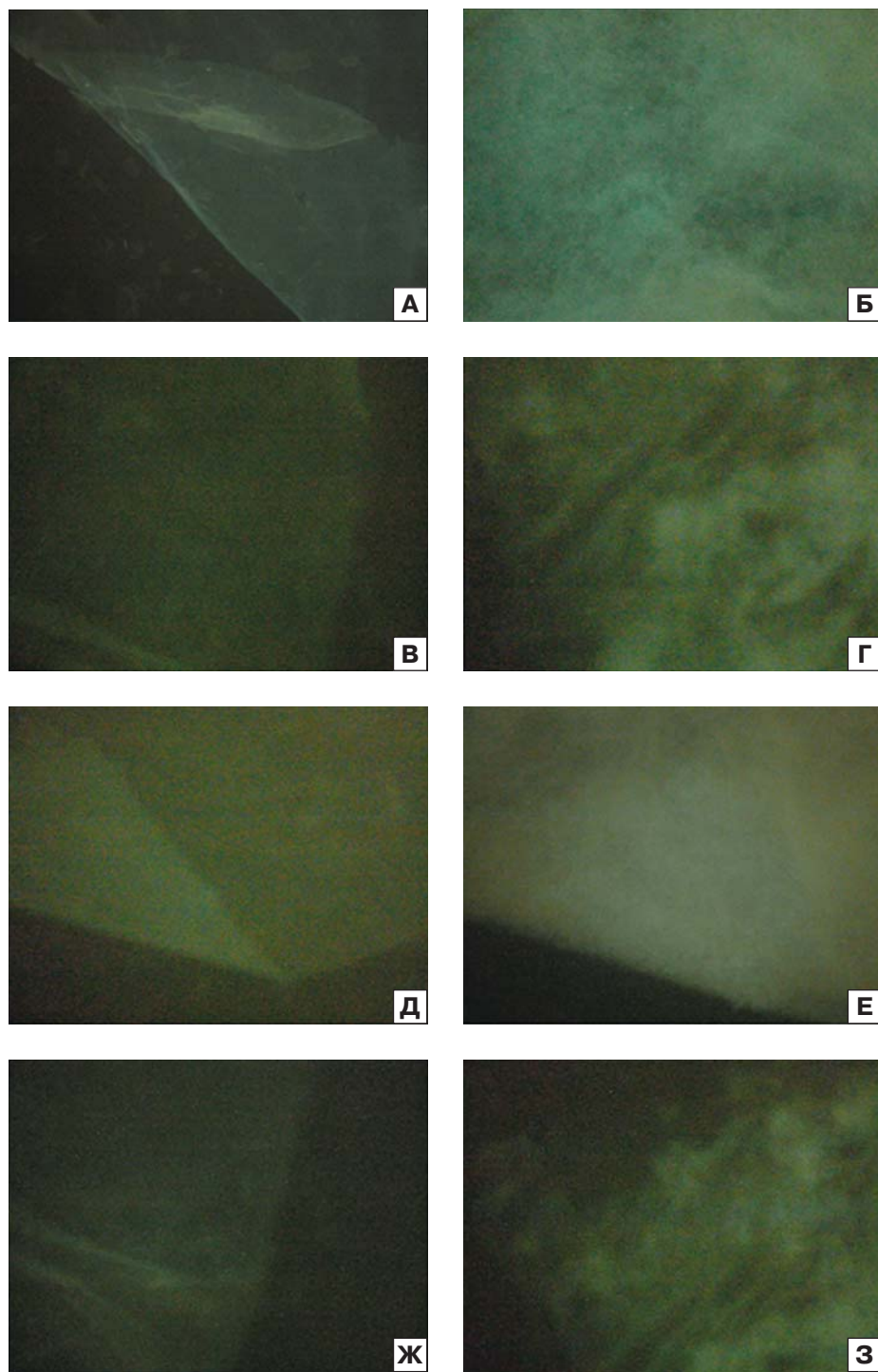


Рис. 1. Автофлуоресценция трансплантатов амниона (левый ряд) и повязки на основе коллагена I типа человека (правый ряд). $\times 40$. А, Б — исходные трансплантаты. В, Г — трансплантаты, обработанные препаратом Ферменкол. Д, Е — трансплантаты, обработанные смесью препарата Ферменкол и лизата БоТП в соотношении 1:1. Ж, З — трансплантаты, обработанные смесью препарата Ферменкол и лизата БедПл в соотношении 1:1

Fig. 1. Autofluorescence of amnion (left column) and human collagen 1 type-based cover (right column). Magnification $\times 40$. А, Б — native tissue grafts. В, Г — tissue graft, treated with Fermencol. Д, Е — tissue graft, treated with Fermencol and PRP lysate, measured 1:1. Ж, З — tissue graft, treated with Fermencol and PPP-lysate, measured 1:1

Таблица 1. Оценка автофлуоресценции тканевых трансплантатов, обработанных смесью тромбоцитарных препаратов и ферменкола
Table 1. Autofluorescence value in tissue grafts, treated with Fermencol and platelet preparation

Тип обработки матрикса для подавления активности коллагенолитических ферментов Type of matrix treatment for inhibition of collagen-lytic peptidases	Амнион Amnion		Коллагеновая повязка Collagen cover	
	Уровень автофлуоресценции, фут-кандел Autofluorescence level, ft-candel			
	через 1 сут после обработки препаратом Ферменкол after 1 day Fermencol treatment	через 3 сут после обработки препаратом Ферменкол after 3 day Fermencol treatment	через 1 сут после обработки препаратом Ферменкол after 1 day Fermencol treatment	через 3 сут после обработки препаратом Ферменкол after 3 day Fermencol treatment
Контроль 1 (матрикса без обработки препаратом Ферменкол и без тромбоцитарных препаратов) Control 1 (without Fermencol and platelet treatment)	7,2 ± 0,4	7,2 ± 0,4	26,4 ± 0,5	26,0 ± 0,5
Контроль 2 (матрикса обработаны препаратом Ферменкол без добавления тромбоцитарных препаратов) Control 2 (Fermencol treatment without platelets)	3,6 ± 0,5*	3,2 ± 0,5*	10,9 ± 1,6*	10,5 ± 1,3*
Лизат БоТП (содержание тромбоцитов с гранулами — 450 тыс/мкл) Lysate of platelet-rich plasma (450 × 10 ³ platelets with granules)	6,1 ± 0,6**	5,7 ± 0,6**	22,8 ± 1,2**	22,6 ± 1,3**
Лизат БедПл (содержание тромбоцитов с гранулами — 35 тыс/мкл) Lysate of platelet-poor plasma (35 × 10 ³ platelets with granules)	3,6 ± 0,5	3,3 ± 0,4	14,4 ± 1,3**	14,0 ± 1,0**
Лизат ОтмТр Lysate of plasma-washed platelets	6,3 ± 0,8**	6,3 ± 0,8**	24,3 ± 1,0**	24,1 ± 1,0**
Лизат БоТП, разведенный физраствором 1:200 Lysate of platelet-rich plasma, measured 1:200	5,3 ± 0,4**	5,2 ± 0,4**	18,5 ± 1,3**	18,5 ± 1,3**
Лизат БоТП, разведенный физраствором 1:300 Lysate of platelet-rich plasma, measured 1:300	4,3 ± 0,7*	4,1 ± 0,7*	13,9 ± 0,6**	13,5 ± 0,5**

Примечание. * — достоверно относительно контроля 1 при p < 0,05, + — достоверно относительно контроля 2 при p < 0,05.
Note. * — reliable relative to control 1 at p < 0.05, + — reliable relative to control 2 at p < 0.05.

Таблица 2. Взаимосвязь (коэффициент корреляции) между содержанием тромбоцитов с гранулами в тромбоцитарных препаратах и сохранностью MFI тканевых трансплантатов, обработанных смесью тромбоцитарных препаратов и ферменкола
Table 2. Correlation between platelet with granules count and MFI survival in tissue grafts, treated with Fermencol and platelet preparation

Тип препарата Type of preparation	Амнион Amnion		Коллагеновая повязка Collagen cover	
	через 1 сут экспозиции after 1 day	через 3 сут экспозиции after 3 day	через 1 сут экспозиции after 1 day	через 3 сут экспозиции after 3 day
БоТП Platelet-rich plasma	0,63	0,66	0,39	0,37
ОтмТр Plasma-washed platelets	0,76	0,59	0,46	0,44

зата 1:200, при этом лизат БоТП, разведенный 1:300, также вызывал ингибирование коллагенолитических ферментов (рис. 2). Таким образом, даже при значительном разведении тромбоцитарных лизатов можно получить препарат, обладающий антипротеазным действием.

Γδīēēōāδāōēāīāy āēōēāīīñōū ēēāōīē īā īīāāδō-īīñōē ōδāīīīēāīōāōīā. При витальном окрашивании

на эпителиальной части амниона можно было видеть большое количество тесно расположенных клеток с низкой яркостью цитоплазмы. Секреторные везикулы в составе клеток амниона не выявлялись (рис. 3, А). С другой стороны, практически все ядра клеток давали зеленое свечение, что говорит о сохранности ДНК в их составе. Наличие плотного монослоя эпителиальных клеток препятствовало

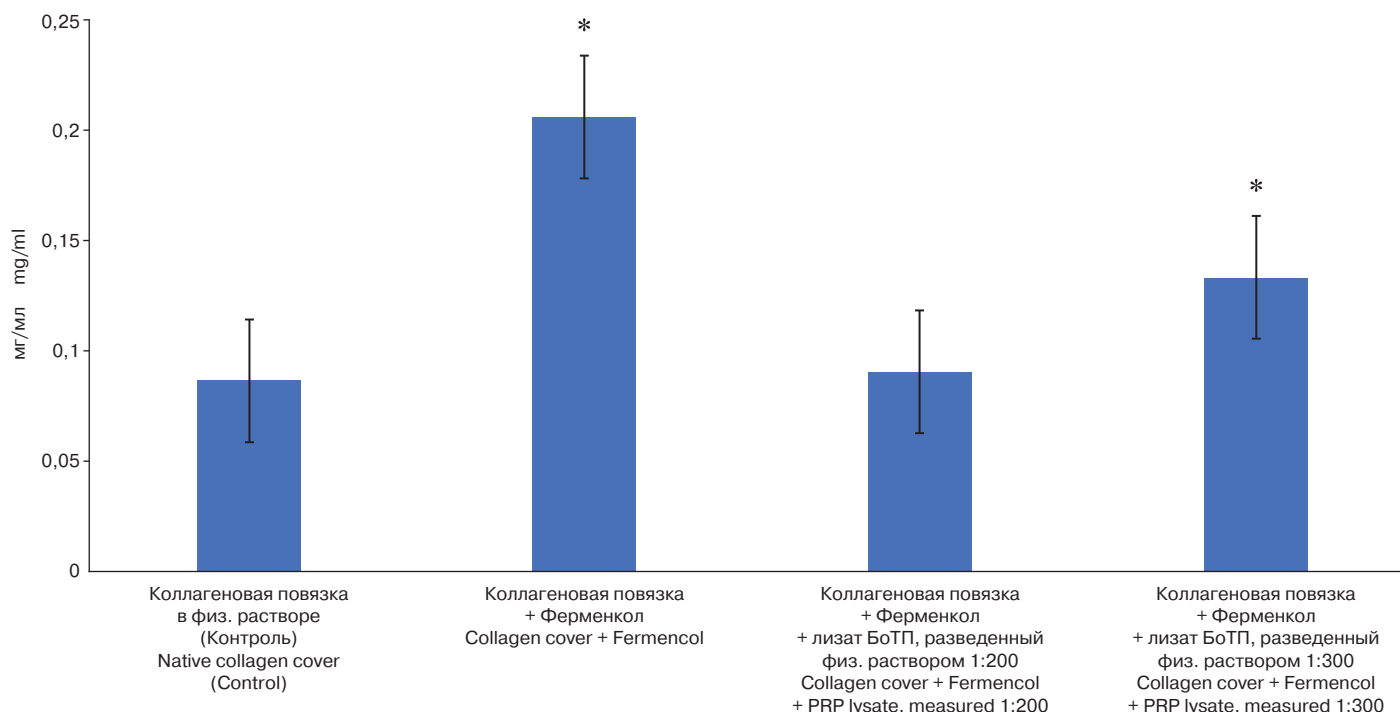


Рис. 2. Концентрация растворимого коллагена после инкубирования коллагеновой повязки с препаратом Ферменкол в присутствии и в отсутствие лизата БоТП

Fig. 2. Concentration of soluble collagen after collagen cover incubation with Fermencol in the presence and absence of PRP lysate

Таблица 3. Плотность ММСК на поверхности трансплантатов, обработанных разными способами, через 3 сут культивирования (тыс/см²)
Table 3. Mesenchymal multipotent stromal cells density of tissue graft after 3 days of cultivation (10³/cm²)

Тип воздействия Type of treatment	Амнион Amnion	Коллагеновая повязка Collagen cover
Контроль 1 (матрикса без обработки препаратом Ферменкол и без тромбоцитарных препаратов) Control 1 (without Fermencol and platelet treatment)	1,4 ± 0,5	7,1 ± 0,8
Контроль 2 (матрикса обработаны препаратом Ферменкол без добавления тромбоцитарных препаратов) Control 2 (Fermencol treatment without platelets)	10,8 ± 0,7	12,6 ± 0,9
Лизат БоТП (содержание тромбоцитов с гранулами — 450 тыс/мкл) Lysate of platelet-rich plasma (450 × 10 ³ platelets with granules)	17,5 ± 1,3 ⁺	16,6 ± 1,0 ⁺
Лизат БедПл (содержание тромбоцитов с гранулами — 35 тыс/мкл) Lysate of platelet-poor plasma (35 × 10 ³ platelets with granules)	12,8 ± 2,7	14,5 ± 2,2
Лизат ОтмТр Lysate of plasma-washed platelets	15,3 ± 0,7	15,2 ± 0,9
Лизат БоТП, разведенный физраствором 1:200 Platelet-rich plasma lysate diluted with saline 1:200	14,7 ± 1,2	13,3 ± 1,9
Лизат БоТП, разведенный физраствором 1:300 Platelet-rich plasma lysate diluted with saline 1:300	7,7 ± 1,6 ⁺	7,9 ± 1,1 ⁺

Примечание. * — достоверно относительно контроля 1 при $p < 0,05$, + — достоверно относительно контроля 2 при $p < 0,05$.

Note. * — reliable relative to control 1 at $p < 0.05$, + — reliable relative to control 2 at $p < 0.05$.

адгезии ММСК на поверхности амниона: через 3 сут плотность ММСК на поверхности была низкой и составляла в среднем $1,4 \pm 0,5$ тыс/см², тогда как на коллагеновых повязках плотность ММСК составила $7,1 \pm 0,8$ тыс/см². После обработки ферменколом собственные эпителиальные клетки уже не выявлялись на поверхности амниона (рис. 3, В), одновременно с этим заметно возрастало число ММСК на поверхности амниона: через 3 сут культивирования плотность ММСК была в среднем в 7,6 раза выше, чем в контрольных образцах, и составляла в среднем $10,8$ тыс/см².

На коллагеновых повязках после обработки ферменколом плотность ММСК также достоверно увеличивалась в 1,8 раза (рис. 3, Б, Г). Активный рост клеток на трансплантатах амниона отмечался также в опытах с использованием лизатов БоТП и ОтмТр, а также лизатов БедПл, в лизатах БоТП, разведенных 1:200 и 1:300, пролиферация ММСК была менее выраженной (табл. 3, рис. 3, Д—З). Увеличение пролиферативной активности ММСК на коллагеновых повязках после обработки ферменколом, по всей видимости, связано со снижением компактизации наиболее крупных коллагено-

вых волокон, с переходом всего коллагена в более диффузное состояние. Показано, что наиболее адгезивно привлекательными для клеток являются коллагеновые матрицы с низкой степенью компактизации волокон, где распределение коллагена является наиболее равномерным и принимает

вид, близкий к мембране [4, 10]. Таким образом, препарат Ферменкол может быть использован для повышения адгезивных свойств тканевых трансплантатов, в том числе трансплантатов с высокой компактизацией коллагена, таких как перикард, твердая мозговая оболочка, дермальный матрикс. Нужно отметить, что в опытах, где использовались препараты с высоким содержанием тромбоцитов с гранулами (лизат БоТП, ОтмТр), пролиферативная активность ММСК была выше, чем при использовании БедПл и лизатов БоТП с сильным разведением. Это указывает на то, что ростовые факторы адсорбируются трансплантатами амниона и коллагеновой повязкой даже в условиях короткой экспозиции при 20–22 °С и оказывают дозозависимое влияние на рост клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование лизатов высококонцентрированных суспензий тромбоцитов позволяет получить препараты, в которых совмещается высокая антиколлагенолитическая активность и ростстимулирующий эффект, который сохраняется даже при разведении лизата БоТП в отношении 1:200. Эффективность использования суспензий с интактными тромбоцитами (без криодеструкции) зависит от исходного качества тромбоцитов. В связи с этим приготовление лизатов БоТП и ОтмТр представляется более удобным. Наиболее перспективным препаратом, способным ингибировать активность коллагенолитических ферментов, является лизат богатой тромбоцитами плазмы с концентрацией тромбоцитов с гранулами не менее 350 тыс/мкл.

Литература/References

1. Anitua E, Zalduendo M, Troya M, Alkhraisat MH, Blanco-Antona LA. Platelet-rich plasma as an alternative to xenogeneic sera in cell-based therapies: A need for standardization. *Int J Mol Sci.* 2022; 23 (12): 6552. doi: 10.3390/ijms23126552
2. Henschler R, Gabriel C, Schallmoser K, Burnouf T, Koh MBC. Human platelet lysate current standards and future developments. *Transfusion.* 2019; 59: 1407–13. doi: 10.1111/trf.15174
3. Hargett LA, Bauer NN. On the origin of microparticles: From “platelet dust” to mediators of intercellular communication. *Pulm Circ.* 2013; 3 (2): 329–40. doi: 10.4103/2045-8932.114760
4. Jiang LB, Su DH, Liu P, et al. Shape-memory collagen scaffold for enhanced cartilage regeneration: native collagen versus denatured collagen. *Osteoarthritis Cartilage.* 2018; 26 (10): 1389–99. doi: 10.1016/j.joca.2018.06.004
5. Ченцова Е.В., Боровкова Н.В., Макаров П.В. и др. Биологический эффект комбинации лизата тромбоцитов и амниотической мембраны в культуре буккального эпителия. *Российский офтальмологический журнал.* 2022; 15 (4): 115–20. [Chentsova E.V., Borovkova N.V., Makarov P.V., et al. The biological effect of a combination of platelet lysate and amniotic

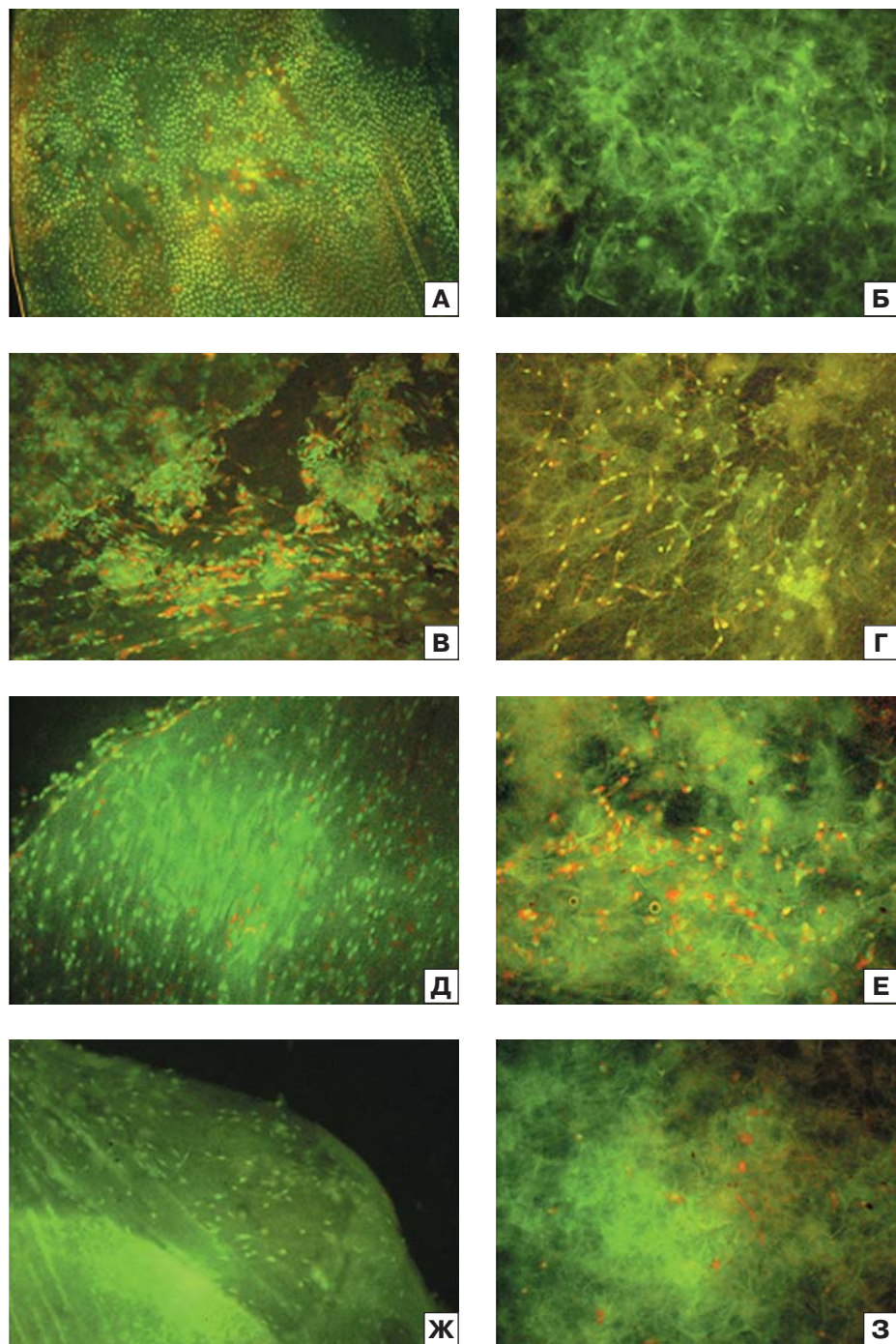


Рис. 3. Рост ММСК на поверхности трансплантата амниона (левый ряд) и повязки на основе коллагена I типа человека (правый ряд) через 3 сут культивирования. Витальное окрашивание трипафлавином — акридиновым оранжевым. $\times 100$. А, Б — исходные трансплантаты. В, Г — трансплантаты, обработанные препаратом Ферменкол. Д, Е — трансплантаты, обработанные смесью препарата Ферменкол и лизата БоТП в соотношении 1:1. Ж, З — трансплантаты, обработанные смесью препарата Ферменкол и лизата БедПл в соотношении 1:1.

Fig. 3. Mesenchymal multipotent stromal cells growth on amnion (left column) and human collagen 1 type-based cover (right column) after 3 days cultivation. Vital staining with trypan blue-acridine orange. Magnification $\times 100$. А, Б — native tissue grafts. В, Г — tissue graft, treated with Fermencol. Д, Е — tissue graft, treated with Fermencol and PRP lysate, in a ratio 1:1. Ж, З — tissue graft, treated with Fermencol and PPP-lysate, in a ratio 1:1

- membrane in buccal epithelium culture. *Russian ophthalmological journal*. 2022; 15 (4): 115–20. (In Russ.)). <https://doi.org/10.21516/2072-0076-2022-15-4-115-120>
6. Villeneuve J, Block A, Le Bousse-Kerdil s MC, et al. Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in platelets and megakaryocytes: a novel organization for these secreted proteins. *Exp Hematol*. 2009; 37 (7): 849–56. doi: 10.1016/j.exphem.2009.03.009
 7. Nejad AR, Hamidieh AA, Amirkhani MA, Sisakht MM. Update review on five top clinical applications of human amniotic membrane in regenerative medicine. *Placenta*. 2021; 103: 104–19. doi: 10.1016/j.placenta.2020.10.026
 8. Ермолов А.С., Смирнов С.В., Хватов В.Б. и др. Биологическая повязка для лечения ожогов. Патент РФ № 2314129; 2008. [Ermolov A.S., Smirnov S.V., Khvatov V.B., et al. Biological cover for burn wound treatment. Patent RF No 2314129; 2008 (In Russ.)].
 9. Боровкова Н.В., Макаров М.С., Андреев Ю.В., Сторожева М.В., Пономарев И.Н. Оценка цитокинового состава сыворотки крови и препаратов на основе тромбоцитов человека. *Молекулярная медицина*. 2021; 19 (3): 51–7. [Borovkova N.V., Makarov M.S., Andreev Ju.V., Storozheva M.V., Ponomarev I.N. Evaluation of the cytokine composition of blood serum and preparations based on human platelets. *Molekuljarnaja medicina*. 2021; 19 (3): 51–7 (In Russ.)]. <https://doi.org/10.29296/24999490-2021-03-08>
 10. Степанченко Н.С., Новикова Г.В., Мошков И.Е. Количественное определение содержания белка. *Физиология растений*. 2011, 58 (4): 624–30. [Stepanchenko N.S., Novikova G.V., Moshkov I.E. Quantitative determination of protein content. *Fiziologija rastenij*. 2011, 58 (4): 624–30 (In Russ.)].
 11. Смирнов В.А., Климошкин Ю.Н. Аминокислоты и полипептиды: учебное пособие. Часть I. Самара. Самарский гос. техн. ун-т. 2007. [Smirnov V.A., Klimochkin Yu.N. Amino acids and polypeptides: a tutorial. Part I. Samara. Samara State Technical University. 2007 (In Russ.)].
 12. Макаров М.С., Сторожева М.В., Боровкова Н.В. Значение автофлюоресценции коллагеновых волокон для оценки биологических свойств тканевых трансплантатов. *Современные технологии в медицине*. 2017; 9 (2): 83–90. [Makarov M.S., Storozheva M.V., Borovkova N.V. Collagen fiber autofluorescence level in evaluating the biological properties of tissue grafts. *Sovremennye tekhnologii v medicine* 2017; 9 (2): 83–90 (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.2.10>

Вклад авторов в работу: Е.В. Ченцова, Н.В. Боровкова — концепция и дизайн исследования, редактирование статьи; К.В. Сироткина — проведение исследований, написание статьи, подготовка иллюстраций; М.С. Макаров — проведение исследований, статистическая обработка и интерпретация данных, написание статьи, подготовка иллюстраций; И.Н. Пономарев, М.В. Сторожева — проведение эксперимента.

Authors' contribution: E.V. Chentsova, N.V. Borovkova — concept and design of the study, editing of the article; K.V. Sirotkina — data collection and processing, writing of the article, preparation of illustrations; M.S. Makarov — data collection, processing and interpretation, writing of the article, preparation of illustrations; I.N. Ponomarev, M.V. Storozheva — experiment conducting.

Поступила: 30.08.2023. Переработана: 10.09.2023. Принята к печати: 11.09.2023
Originally received: 30.08.2023. Final revision: 10.09.2023. Accepted: 11.09.2023

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ/INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

ФГБУ «НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, ул. Садовая-Черногрозская, д. 14/19, Москва, 105062, Россия

Екатерина Валериановна Ченцова — д-р мед. наук, профессор, старший научный сотрудник отдела травматологии и реконструктивной хирургии

Ксения Валерьевна Сироткина — аспирант отдела травматологии и реконструктивной хирургии, врач-офтальмолог, ORCID 0009-0007-5148-1712

¹ ГБУЗ «НМИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского» Департамента здравоохранения города Москвы, Большая Сухаревская площадь, д. 3, Москва, 129090, Россия

² ФГАОУВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, ул. Островитянова, д. 1, Москва, 117997, Россия

Наталья Валерьевна Боровкова — д-р мед. наук, заведующая отделением биотехнологий и трансфузиологии¹, доцент кафедры трансплантологии и искусственных органов², ORCID 0000-0002-8897-7523

Максим Сергеевич Макаров — канд. биол. наук, старший научный сотрудник¹

Майя Викторовна Сторожева — научный сотрудник¹

Иван Николаевич Пономарев — канд. мед. наук, старший научный сотрудник¹

Для контактов: Ксения Валерьевна Сироткина, sirotkina.ksen8@yandex.ru

Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, 14/19, Sadovaya-Chernogryazskaya St., Moscow, 105062, Russia

Ekaterina V. Chentsova — Dr. of Med. Sci., professor, senior researcher of the department of traumatology and reconstructive surgery

Kseniya V. Sirotkina — PhD student, ophthalmologist, department of traumatology and reconstructive surgery, ORCID 0009-0007-5148-1712

¹ N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, 3, Bolshaya Sukharevskaya Square, Moscow, 129090, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, 1, Ostrovityanova St., Moscow, 117997, Russia

Natalia V. Borovkova — Dr. of Med. Sci., head of the department of biotechnology and transfusiology¹, associate professor of the chair of transplantology and artificial organs², ORCID 0000-0002-8897-7523

Maksim S. Makarov — Cand. of Biol. Sci., senior researcher¹

Maya V. Storozheva — researcher¹

Ivan N. Ponomarev — Cand. of Med. Sci., senior researcher¹

For contacts: Kseniya V. Sirotkina, sirotkina.ksen8@yandex.ru