



## Влияние биопластического материала на адгезию, рост и пролиферативную активность фибробластов человека в средах, имитирующих кислотность раневого ложа при остром и хроническом воспалении

✉ Марков П.А.<sup>1,\*</sup>, ✉ Еремин П.С.<sup>1</sup>, ✉ Падерин Н.М.<sup>2</sup>, ✉ Гильмутдинова И.Р.<sup>1</sup>,  
✉ Костромина Е.Ю.<sup>1</sup>, ✉ Гребень А.И.<sup>1</sup>, ✉ Фесюн А.Д.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии» Минздрава России, Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук ФГБУН ФИЦ «Коми научный центр УрО РАН», г. Сыктывкар, Россия

### РЕЗЮМЕ

**ВВЕДЕНИЕ.** Одним из ключевых этапов заживления ран является фаза воспаления, представляющая собой переходный процесс между гемостазом и заживлением раны. Каждая стадия воспалительно-репаративного процесса характеризуется своим значением кислотности раневого ложа. Например, при остром течении воспаления кислотность среды в раневом ложе снижается до pH 5,5–6. Хроническое течение воспалительного процесса, напротив, сопровождается увеличением pH до 8. На сегодняшний день пока недостаточно полно исследовано действие биоматериалов, содержащих в своем составе компоненты межклеточного матрикса дермы человека, на фибробласты, находящиеся в условиях ацидоза и алкалоза.

**ЦЕЛЬ.** Охарактеризовать влияние биопластического материала на основе коллагена, гиалуроновой кислоты и эластина на жизнеспособность и пролиферативную активность фибробластов человека в условиях, имитирующих кислотность острой и хронической раны.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.** Биопластический материал изготавливали согласно методу, описанному в патенте RU 2722744. Адгезивные свойства и пролиферативную активность фибробластов человека оценивали визуально с использованием люминесцентной микроскопии. Оценку количества апоптических и мертвых клеток проводили методом проточной цитометрии (BD FACSCanto II) с использованием коммерческого набора FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen). Прочность, модуль Юнга и эластичность гелей определяли на анализаторе текстуры TA.XT-plus texture analyser (Stable Micro Systems, Великобритания).

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Установлено, что в условиях физиологического ацидоза функциональная активность фибробластов снижается, что выражается в снижении адгезивных свойств и пролиферативной активности клеток. Биопластический материал на основе коллагена, гиалуроновой кислоты и эластина способствует сохранению адгезивных свойств, жизнеспособности и пролиферативной активности фибробластов в условиях физиологического ацидоза.

**ВЫВОДЫ.** Полученные результаты указывают на то, что биопластический материал на основе растворимых компонентов дермы может быть использован в качестве биологически активного компонента раневых повязок для повышения эффективности репаративной регенерации, особенно при чрезмерном остром воспалении.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** биоматериалы, коллаген, гиалуроновая кислота, эластин, фибробласты, адгезия, пролиферация, апоптоз, кислотность.

**Для цитирования / For citation:** Марков П.А., Еремин П.С., Падерин Н.М., Гильмутдинова И.Р., Костромина Е.Ю., Гребень А.И., Фесюн А.Д. Влияние биопластического материала на адгезию, рост и пролиферативную активность фибробластов человека в средах, имитирующих кислотность раневого ложа при остром и хроническом воспалении. Вестник восстановительной медицины. 2023; 22(2):42-51. <https://doi.org/10.38025/2078-1962-2023-22-2-42-51> [Markov P.A., Eremin P.S., Paderin N.M., Gilmutdinova I.R., Kostromina E.Yu., Greben A.I., Fesyun A.D. Effect of Bioplastic Material on Adhesion, Growth and Proliferative Activity of Human Fibroblasts when Incubated in Solutions Mimic the Acidity of Wound an Acute and Chronic Inflammation. Bulletin of Rehabilitation Medicine. 2023; 22(2): 42-51. <https://doi.org/10.38025/2078-1962-2023-22-2-42-51> (In Russ.).]

\*Для корреспонденции: Марков Павел Александрович, E-mail: [markovpa@nmicrk.ru](mailto:markovpa@nmicrk.ru), [p.a.markov@mail.ru](mailto:p.a.markov@mail.ru);  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4803-4803>

Статья получена: 10.02.2023

Поступила после рецензирования: 14.03.2023

Статья принята к печати: 18.04.2023

# Effect of Bioplastic Material on Adhesion, Growth and Proliferative Activity of Human Fibroblasts when Incubated in Solutions Mimic the Acidity of Wound an Acute and Chronic Inflammation

 Pavel A. Markov<sup>1,\*</sup>,  Petr S. Eremin<sup>1</sup>,  Nikita M. Paderin<sup>2</sup>,  Ilmira R. Gilmutdinova<sup>1</sup>,  Elena Yu. Kostromina<sup>1</sup>,  Anastasia I. Greben<sup>1</sup>,  Anatoliy D. Fesyun<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Medical Research Center for Rehabilitation and Balneology, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Institute of Physiology of Federal Research Centre «Komi Science Centre of the Urals Branch of the Russian Academy of Sciences», Syktyvkar, Russia

## ABSTRACT

**INTRODUCTION.** One of the key stages of wound healing is the phase of inflammation, which is a transitional process between hemostasis and wound healing. Each stage of the inflammatory-reparative process is characterized by its own value of the acidity of the wound bed. For example, in the acute stage of inflammation, the acidity of the medium in the wound bed decreases to a pH of 5.5-6. The chronic stage of the inflammatory process, on the contrary, is accompanied by an increase in pH to 8. To date, so far, the effect of biomaterials containing components of the intercellular matrix of the human dermis on fibroblasts under acidosis and alkalosis has not been fully investigated.

**AIM.** To define the effect of bioplastic material based on collagen, hyaluronic acid and elastin on the viability and proliferative activity of human fibroblasts in conditions simulating the acidity of acute and chronic wounds.

**MATERIAL AND METHODS.** Bioplastic material was made according to the method described in patent RU 2722744. Adhesive properties and proliferative activity of human fibroblasts were assessed visually using fluorescent microscopy. The number of apoptotic and dead cells was assessed by flow cytometry (BD FACSCanto II) using the commercial FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen). The strength, Young's modulus, and elasticity of the gels were determined on a TA.XT-plus texture analyzer (Stable Micro Systems, Great Britain).

**RESULTS AND DISCUSSION.** Using the methods of luminescent microscopy and flow cytometry, we found that the cell viability (namely, adhesive properties and proliferative activity) decreases after incubation on condition mimic of physiological acidosis. We found that, bioplastic material contributes to the preservation of adhesive properties, viability and proliferative activity of fibroblasts in physiological acidosis conditions.

**CONCLUSION.** The results obtained indicate that bioplastic material based on soluble dermis components can be used as a biologically active component of wound dressings for increase the effectiveness of reparative regeneration, especially in cases of excessive acute inflammation.

**KEYWORDS:** biomaterials, collagen, hyaluronic acid, elastin, fibroblasts, adhesion, proliferation, apoptosis, acidity.

**For citation:** Markov P.A., Eremin P.S., Paderin N.M., Gilmutdinova I.R., Kostromina E.Yu., Greben A I., Fesyun A.D. Effect of Bioplastic Material on Adhesion, Growth and Proliferative Activity of Human Fibroblasts when Incubated in Solutions Mimic the Acidity of Wound an Acute and Chronic Inflammation. Bulletin of Rehabilitation Medicine. 2023; 22(2):42-51. <https://doi.org/10.38025/2078-1962-2023-22-2-42-51> (In Russ.).

\***For correspondence:** Pavel A. Markov, E-mail: markovpa@nmicrk.ru, p.a.markov@mail.ru;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4803-4803>

**Received:** 10.02.2023

**Revised:** 14.03.2023

**Accepted:** 18.04.2023

## Список сокращений

FITC — изотиоцианат флуоресцеина

ВКМ — внеклеточный матрикс

ДМЕМ — среда Игла, модифицированная Дульбекко

мН — миллиньютон

ФБС — фетальная сыворотка крупного рогатого скота

ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота

## ВВЕДЕНИЕ

Повреждение кожных покровов в результате воздействия механических, физических или химических

факторов, а также хронические раны могут вызвать тяжелые осложнения вплоть до летальных [1]. В настоящее время набирает популярность новая парадигма восстановления тканей с использованием биоматериалов искусственного и природного происхождения, направленная не столько на создание биологически инертных материалов, сколько на создание биоматериалов, способных регулировать клеточные реакции при различных патологических состояниях: острые и хронические раны, тяжелые и полнослойные повреждения [2–4].

Результаты многочисленных исследований указывают на перспективность использования биологически активных полимеров для контроля воспалительно-репаративных процессов. Ряд проведенных исследований показывает, что биоматериалы, содержащие в своем составе компоненты межклеточного матрикса дермы человека, повышают приживаемость фибробластов и мезенхимальных стромальных клеток человека [5–7].

Одним из ключевых этапов заживления ран является фаза воспаления, представляющая собой переходный процесс между гемостазом и заживлением раны. Каждая стадия воспалительно-репаративного процесса характеризуется своим значением кислотности раневого ложа. Так, стадия острого воспаления сопровождается снижением кислотности раневого ложа до pH 5,5–6, на стадии репаративной регенерации кислотность составляет порядка pH 7, хроническое воспаление характеризуется щелочной реакцией (pH 8) [8]. Хорошо известно, что кислотность среды оказывает влияние на функциональную активность клеток, а именно: пролиферацию, клеточный цикл, генерацию белков межклеточного матрикса, внутриклеточные сигнальные каскады, генерацию цитокинов и т. д. [9–13].

Из данных литературы известно, что, контролируя функциональную активность фибробластов, можно увеличить эффективность заживления кожных ран [14,15]. На сегодняшний день пока недостаточно полно исследовано действие биоматериалов, содержащих в своем составе компоненты межклеточного матрикса дермы человека, на клетки, находящиеся в условиях ацидоза и алкалоза. Поэтому для эффективного использования биоматериалов в качестве компонентов раневых покрытий требуется охарактеризовать их действие на функциональную активность клеток в условиях, имитирующих кислотность раневого ложа при остром и хроническом течении воспалительного процесса.

Цель исследования — охарактеризовать влияние биопластического материала на основе коллагена, гиалуроновой кислоты и эластина на жизнеспособность и пролиферативную активность фибробластов человека в условиях, имитирующих кислотность острой и хронической раны.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 1. Материалы

Коллаген I типа, гидролизованный из кожи крупного рогатого скота, эластин и гиалуроновая кислота производства МОБИТЭК-М (Россия), бычий сывороточный альбумин производства Sigma-Aldrich (Германия). Набор для определения протеина Bradford (BioRad, США), витальный флюоресцентный краситель PKH-26 (Sigma). Фетальная сыворотка крупного рогатого скота (ФБС, NuClone, США), среда Игла, модифицированная Дульбекко (DMEM), сбалансированный солевой раствор Хенкса, фосфатно-буферный раствор, хлорид калия, гидроксид калия, пенициллин-стрептомицин, поставляемые компанией «Биолот» (Россия), молочная кислота от компании «Ветторг» (Белорусия).

### 2. Состав и метод изготовления органоспецифического биопластического материала

Процесс получения биопластического материала, подробно описанный в патенте RU 2722744 [16], включает

в себя следующие стадии: приготовление исходной смеси, заморозка и последующая вакуумная сублимационная сушка. В состав биоматериала входят коллаген I типа, гиалуроновая кислота и эластин. Соотношения компонентов подобраны в пропорциях, равных соотношению в дерме взрослого человека, а именно: 70 % коллагена, 29 % гиалуроновой кислоты и 1 % эластина. Компоненты растворяли в стерильной дистиллированной воде, перемешивание осуществляли на лопастной мешалке, при 500–900 об/мин, в течение 20 минут. Полученную смесь разливали в чашки Петри и выдерживали 20 минут при комнатной температуре, после чего замораживали при  $-70^{\circ}\text{C}$ , через сутки образцы высушивали в вакуумно-сушильном аппарате при давлении 300 Па. Полученные образцы стерилизовали 70%-м раствором этилового спирта и ультрафиолетовым излучением.

### 3. Адгезия клеток к биоматериалу

Адгезивные свойства биоматериала оценивали по количеству фибробластов, прикрепившихся к поверхности образцов. Для улучшения визуализации клеток проводили предварительное окрашивание фибробластов витальным флюоресцентным красителем PKH-26.

Предварительно простерилизованные спиртом и UV-облучением образцы биоматериалов ( $\varnothing 5$  мм) поместили в лунки 96-луночных планшетов из расчета один образец на лунку, общее количество повторов для каждого образца — 5 шт. Во всех экспериментах, где не указано иное, использовали питательную среду DMEM, содержащую 10%-ю ФБС и 1%-й раствор пенициллина-стрептомицина. Затем в лунки внесли 0,1 мл питательной среды с кислотой (pH 6), нейтральной (pH 7) и щелочной (pH 8) реакцией, содержащей фибробласты в количестве  $5 \times 10^4$  шт./мл. Количество повторов для каждого образца — 5 штук. Для закисления питательной среды использовали молочную кислоту, для защелачивания — раствор NaOH. В качестве контроля использовали питательную среду с добавлением эквивалентного количества (10 мкл/мл) дистиллированной воды. Инкубировали в стандартных условиях ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ ). Количество и морфометрические характеристики фибробластов оценивали через 6 часов с использованием световой и люминесцентной микроскопии.

### 4. Пролиферативная активность клеток

Оценку пролиферативной активности проводили при совместной инкубации исследуемых образцов с фибробластами человека. Для улучшения визуализации клеток проводили предварительное окрашивание клеток витальным флюоресцентным красителем PKH-26.

Для характеристики пролиферативной активности в лунки 96-луночного планшета поместили заранее простерилизованные спиртом и UV-облучением образцы биоматериалов ( $\varnothing 5$  мм) из расчета один образец на лунку, общее количество повторов для каждого образца — 5 штук. Затем в лунки внесли 0,1 мл питательной среды с кислотой (pH 6), нейтральной (pH 7) и щелочной (pH 8) реакцией, содержащей фибробласты в количестве  $2 \times 10^4$  шт./мл.

Через 24, 48 и 72 часа после совместной инкубации биоматериалов с фибробластами оценивали количество и морфометрические характеристики клеток. Для этого



использовали микроскоп Leica (Leica Microsystems) и методы светового, поляризационного и люминесцентного наблюдения. Пролиферативную активность оценивали, подсчитывая количество клеток на квадрате площадью 0,15 мм<sup>2</sup>.

### 5. Оценка количества апоптических клеток

Влияние биоматериала на количество апоптических и мертвых клеток в популяции оценивали при совместной инкубации образцов с клетками человека. Для этого фибробласты высевали в лунки 12-луночного планшета в количестве  $4 \times 10^4$  шт./мл, инкубировали в стандартных условиях до достижения 90 % монослоя, после чего стандартную питательную среду заменяли на питательные среды с кислотностью pH 6, pH 7 и pH 8 и вносили биоматериал, предварительно простерилизованный ультрафиолетом (120 мин). Инкубацию проводили в стандартных условиях культивирования клеток. Через 24 часа биоматериал извлекали. Адгезированные клетки снимали с поверхности планшета с использованием раствора трипсин-ЭДТА. Оценку количества апоптических и мертвых клеток проводили методом проточной цитометрии (BD FACSCanto II) с использованием коммерческого набора FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen).

### 6. Оценка механических свойств и интенсивности биодеструкции

Прочность, модуль Юнга и эластичность гелей определяли на анализаторе текстуры TA.XT-plus texture analyser (Stable Micro Systems, Великобритания), оснащенном сферическим зондом ( $\varnothing$  5 мм). Скорость движения зонда в образцах — 10 мм/мин, глубина проникновения — 5 мм. Расчеты механических кривых зависимости силы от расстояния погружения зонда выполнены с использованием программного обеспечения Texture Exponent 6.1.4.0 (Stable Micro Systems, Великобритания). Определяли прочность образца (максимальную силу, прикладываемую до разрушения образца, mN), энергию деформации (mkJ) и эластичность (расстояние, пройденное зондом до разрушения образца, мм).

Интенсивность биодеструкции оценивали, измеряя механические свойства биоматериала до и после инкубации в кислой (pH 6), нейтральной (pH 7) и щелочной (pH 8) средах.

### 7. Статистическая обработка результатов

При обработке данных вычисляли среднее арифметическое значение (M), среднее квадратичное отклонение (SD). Достоверность различий оценивалась по t-критерию Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из направлений поиска способов повышения эффективности репаративной регенерации является регуляция функциональной активности клеток, участвующих в процессах восстановления ткани. Наряду с моноцитами и макрофагами непосредственное участие в воспалительно-репаративных процессах играют дермальные фибробласты. Фибробласты представляют собой гетерогенную клеточную популяцию, ответственную за продукцию и ремоделирование внеклеточного

матрикса дермы [17]. Адгезия фибробластов к субстрату играет важную роль во многих клеточных процессах, включая миграцию и пролиферацию клеток, а также заживление ран и ангиогенез [14, 18].

В проведенном исследовании адгезивные свойства клеток оценивали в условиях нейтральной, кислой и щелочной среды. Для этого фибробласты, предварительно окрашенные флюоресцентным красителем, инкубировали в нейтральной, кислой и щелочной средах. Установлено, что через 6 часов при инкубации в нейтральной среде (pH 7) на поверхности пластика адгезируется  $114 \pm 27$  клеток на 0,15 мм<sup>2</sup> (рис. 1а). В кислой среде количество адгезированных клеток снижается и составляет менее  $26 \pm 9$  шт., то есть порядка 20 % от контрольного значения (рис. 1б). В щелочной среде количество адгезированных клеток сопоставимо с контролем и составляет  $97 \pm 16$  шт. на 0,15 мм<sup>2</sup> (рис. 1в). Во всех использованных средах клетки имеют преимущественно сферическую форму с площадью тела  $116 \pm 17$  мкм<sup>2</sup>.

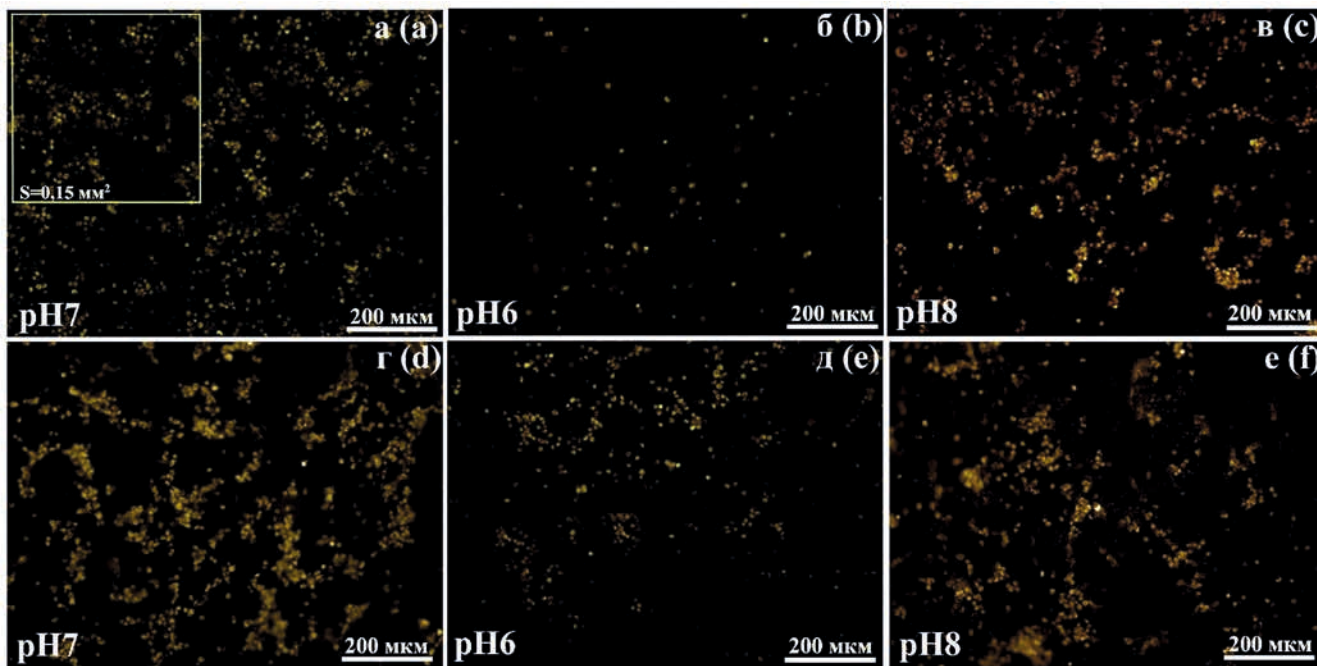
Установлено, что в условиях нейтральной среды количество адгезированных клеток на поверхности биоматериала составляет  $98 \pm 13$  шт. / 0,15 мм<sup>2</sup> (рис. 1г). В кислой среде количество адгезированных клеток снижается на 40 % и составляет  $57 \pm 6$  шт. / 0,15 мм<sup>2</sup> (рис. 1д). Щелочная среда не влияет на адгезию клеток к биоматериалу, количество адгезированных клеток составляет  $99 \pm 19$  шт. / 0,15 мм<sup>2</sup> (рис. 1е). Размеры клеток на поверхности биоматериала сопоставимы с размерами клеток, адгезированных на культуральном пластике.

Ранее сообщалось, что биоматериалы на основе компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ) поддерживают адгезию и пролиферацию фибробластов [19–21]. В большинстве проводимых исследований по влиянию биоматериалов на функциональную активность фибробластов и их миграционную способность используются питательные среды с pH около 7, что соответствует физиологическим нормам межтканевой жидкости. Однако при остром течении воспаления кислотность среды в раневом ложе снижается до pH 5,5–6. Хроническое течение воспалительного процесса, напротив, сопровождается увеличением pH до 8 [22].

Результаты проведенного нами исследования показывают, что в кислой среде адгезивные свойства фибробластов снижаются. Несмотря на дисфункцию фибробластов, инкубированных в условиях ацидоза культуральной среды, количество прикрепившихся клеток к поверхности биоматериала выше, чем к культуральному пластику. Механизмы данного явления пока не исследованы. Можно предположить, что увеличение количества адгезированных клеток обусловлено наличием в коллагене пептидных сайтов связывания специфических к интегринам фибробластов [23].

На следующем этапе исследования оценивали влияние биопластического материала на морфологию и пролиферативную активность фибробластов при их инкубации в средах с нейтральным значением pH, а также в условиях ацидоза и алкалоза.

Через сутки культивирования фибробластов в питательной среде с pH 7 на поверхности лунки насчитывается примерно 70–80 клеток на 0,15 мм<sup>2</sup>. Более 90 % клеток имеют веретеновидную форму тела, размеры клеток со-



**Рис. 1.** Адгезия фибробластов к пластику (а, б, в) и к поверхности биопластического материала (г, д, е) в нейтральной (а, г), кислой (б, д) и щелочной (в, е) средах. Люминесцентная микроскопия, увеличение 50×  
**Fig. 1.** Adhesion of fibroblasts on the plastic (a, b, c) and to the surface of bioplastic material (d, e, f) in neutral (a, d), acidic (b, e) and alkaline (c, f) media. Fluorescent microscopy, magnification 50×

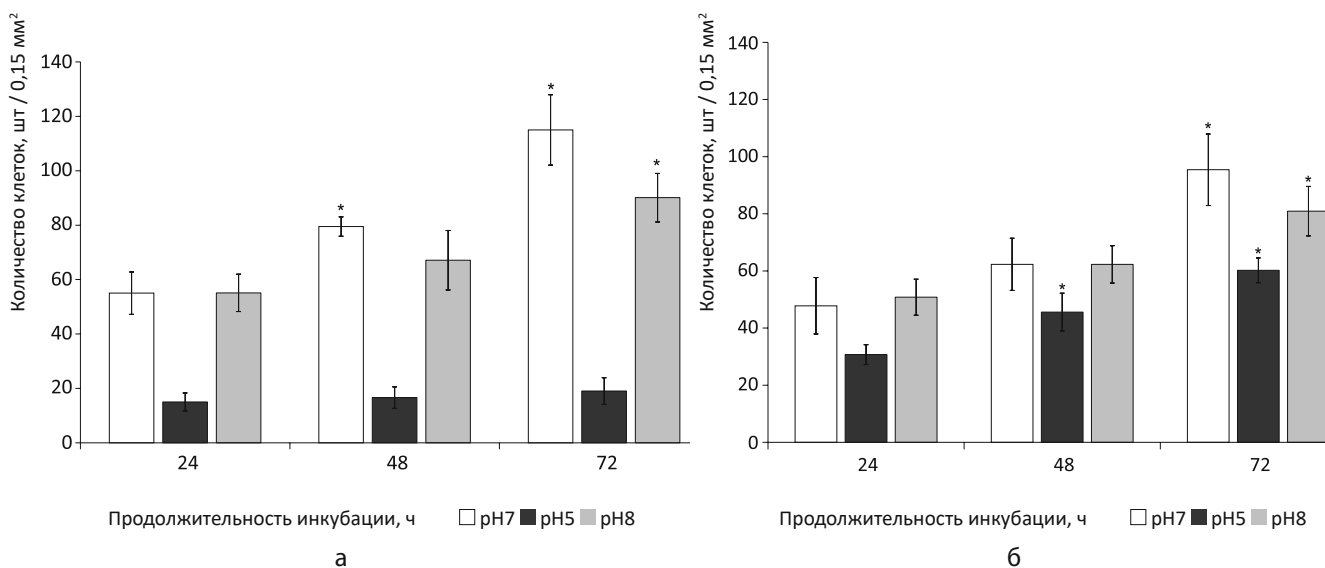
ставляют  $116 \pm 15 \text{ мкм}^2$  (рис. 2а). С увеличением продолжительности культивирования количество и размеры клеток увеличиваются. К концу периода наблюдения количество клеток увеличивается более чем в два раза (рис. 2а), площадь тела клеток достигает  $330 \pm 59 \text{ мм}^2$  (рис. 3а). Полученные результаты свидетельствуют о нормальной пролиферативной активности клеточной популяции.

Выявлено, что при инкубации в кислой среде рост клеток ингибируется. Так, например, из 10 прикрепив-

шихся клеток только 2 имеют веретеновидную форму. Количество клеток за весь период наблюдения не увеличивается (рис. 2б, 3б).

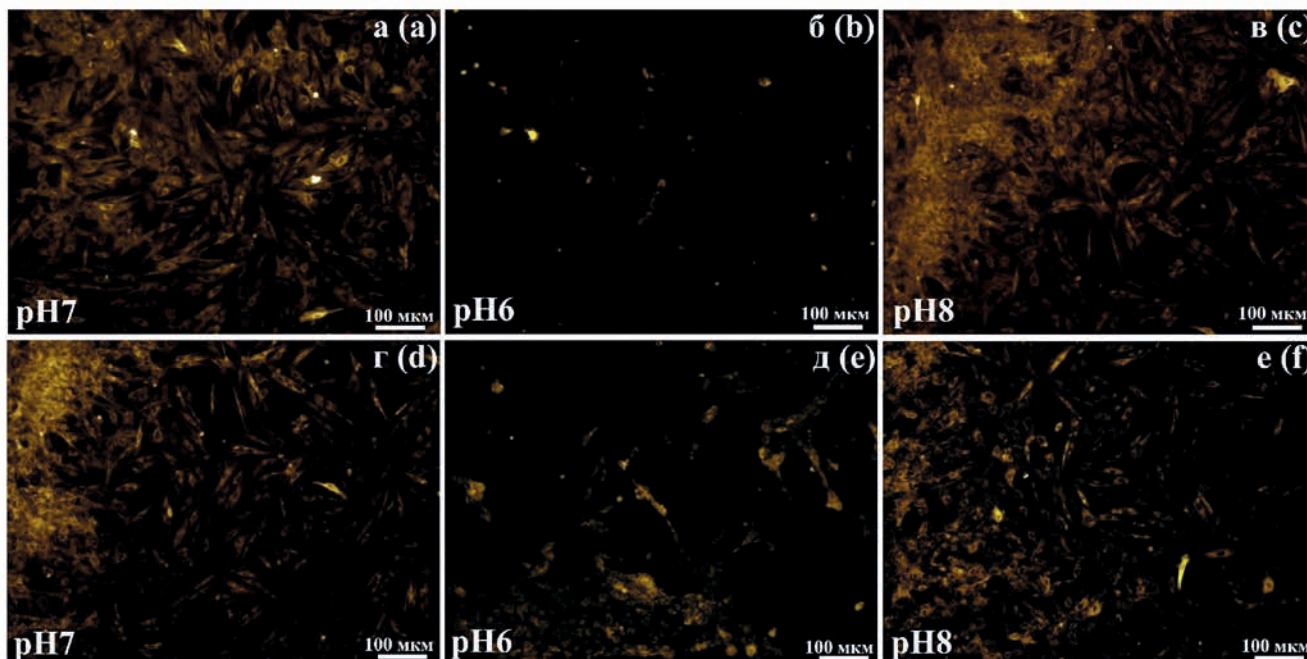
Выявлено, что щелочная среда практически не влияет на пролиферативную активность фибробластов, количество клеток сопоставимо с количеством клеток, инкубированных в культуральной среде при pH 7 (рис. 2в, 3в).

Полученные результаты согласуются с данными литературы; ранее было показано, что в кислых условиях



**Рис. 2.** Пролиферативная активность фибробластов на поверхности культурального пластика (а) и на поверхности биопластического материала (б) после инкубации в нейтральной, кислой и щелочной средах  
**Fig. 2.** Proliferative activity of fibroblasts on the surface of culture plastic (a) and on the surface of bioplastic material (б) after incubation in neutral, acidic and alkaline media

**Примечание:** \* — различия достоверны при  $p < 0,05$ , по сравнению с контролем,  $M \pm SD$ ,  $n = 5$ .  
**Note:**  $M \pm SD$ ; \* — differences are significant compared to control, when  $p < 0,05$ ;  $n = 5$ .



**Рис. 3.** Фибробласты на поверхности культурального пластика (а, б, в) и поверхности биопластического материала (г, д, е) через 72 ч культивирования в нейтральной (а, г), кислой (б, д) и щелочной (в, е) средах. Люминесцентная микроскопия, увеличение 100х

**Fig. 3.** Fibroblasts on the surface of cultural plastic (a, b, c) and the surface of bioplastic material (d, e, f) after 72 h of cultivation in neutral (a, d), acidic (b, e), and alkaline (c, f) media. Fluorescent microscopy, magnification 100x

пролиферативная и миграционная способность фибробластов снижается [24].

Установлено, что культивирование фибробластов на поверхности биоматериала в условиях кислой среды увеличивает пролиферативную активность клеток. Так, например, к концу эксперимента количество клеток увеличивается с  $31 \pm 3$  до  $58 \pm 6$  шт. (рис. 2б), также увеличиваются размеры клеток с  $98 \pm 15$  до  $252 \pm 70$  мкм<sup>2</sup> (рис. 3д). Несмотря на это, функциональная активность фибробластов, культивированных в кислых условиях, остается сниженной по сравнению с клетками, культивированными на пластике и на поверхности биоматериала в условиях нейтральной и щелочной среды (рис. 2, 3).

На следующем этапе исследования, с использованием проточной цитометрии, рассматривали влияние биоматериала на количество апоптических клеток. Для этого биоматериал инкубировали с предварительно адгезированными на культуральном пластике фибробластами.

В контроле через сутки инкубации фибробластов в питательной среде с pH 7 количество живых, апоптических и мертвых клеток составляет  $94 \pm 5$ ,  $1,1 \pm 0,3$  и  $5,2 \pm 0,2$  % соответственно (рис. 4). В кислой среде количество живых клеток снижается до  $28 \pm 10$  %, в то время как количество апоптических и мертвых клеток увеличивается до  $6 \pm 1$  и  $81 \pm 12$  % соответственно. В щелочной среде количество живых клеток снижается в меньшей степени и составляет  $72 \pm 9$  % от всех клеток в популяции. Количество мертвых клеток возрастает до  $18 \pm 3$  %, апоптических клеток — до  $12 \pm 3$  % (рис. 4).

Установлено, что биоматериал не влияет на количество апоптических клеток в нейтральной и щелочной средах. Данные проточной цитометрии показывают, что

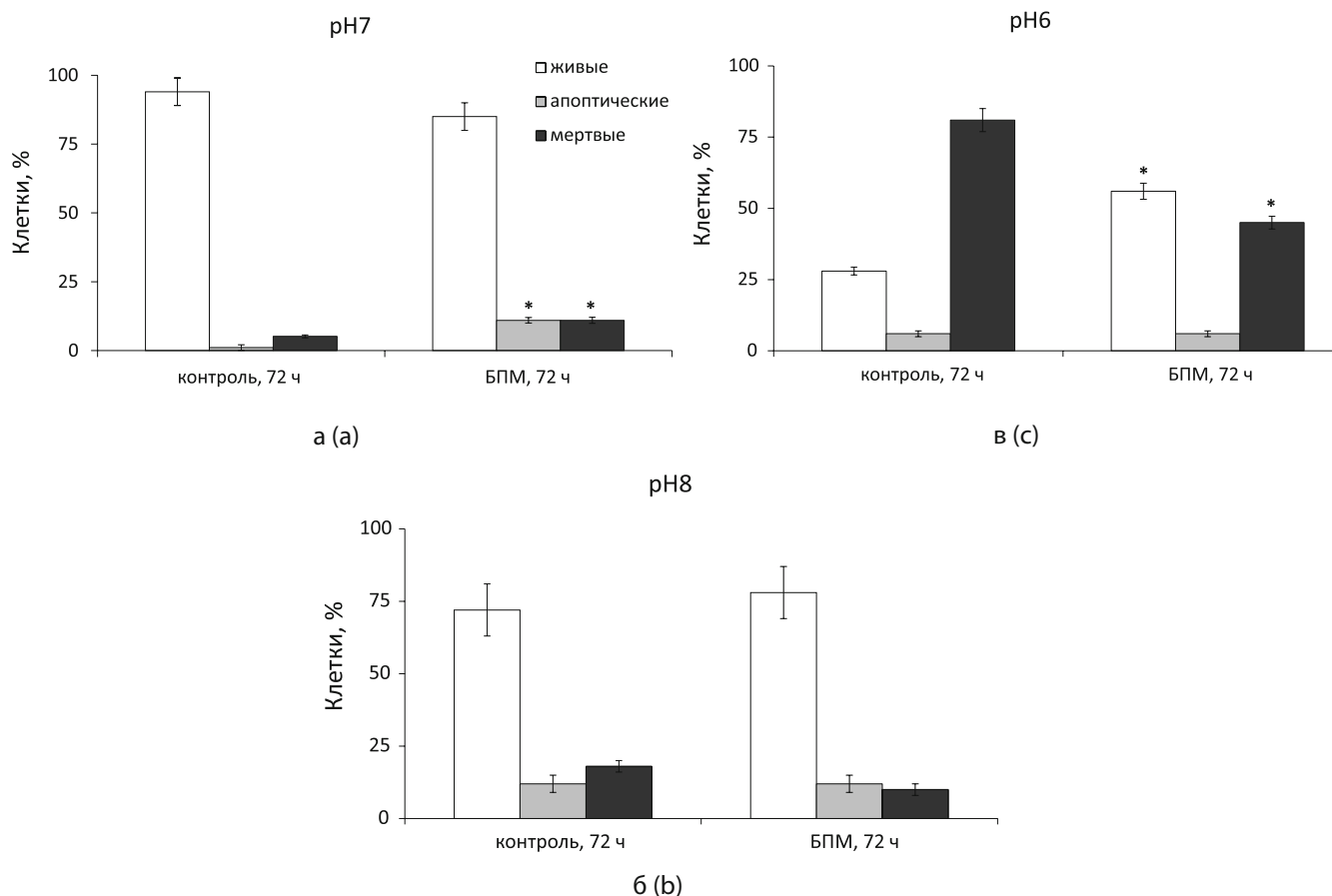
при инкубации клеток в кислой среде, в присутствии биоматериала, количество живых клеток увеличивается более чем в два раза (рис. 4).

Таким образом установлено, что исследуемый биопластический материал повышает жизнеспособность фибробластов в условиях физиологического ацидоза, а именно: способствует адгезии клеток, увеличивает их пролиферативную активность, а также снижает количество мертвых клеток.

На заключительном этапе исследования оценивали устойчивость биоматериала к деструкции в солевых растворах с нейтральной, кислой и щелочной реакцией. Установлено, что прочность сухого биоматериала составляет  $1960 \pm 696$  мН. После помещения биоматериала в солевой раствор прочность образцов стремительно снижается и уже через 15 минут составляет менее 10 % от начальной (табл. 1). Однако дальнейшее снижение прочности замедляется и в течение последующих суток практически не изменяется. В сухом состоянии исследуемый биоматериал обладает низкой эластичностью; расстояние, проходимое зондом до прокола образца, в среднем составляет  $0,83 \pm 0,21$  мм. Найдено, что при инкубации в солевых растворах увеличивается эластичность биоматериала (табл. 1). Полученные результаты показывают, что изменения прочности и эластичности биоматериала не зависят от кислотности солевого раствора (табл. 1).

Изучение регенеративного потенциала биоматериалов на основе коллагена, эластина, гиалуроновой кислоты, а также их композиций с другими биополимерами является достаточно популярным направлением исследований в области тканевой инженерии и регенеративной медицины. Популярность использования природных био-





**Рис. 4.** Влияние биопластического материала (БПМ) на количество живых, апоптических и мертвых клеток через 72 ч совместной инкубации в нейтральной (а), кислой (б) и щелочной (в) средах

**Fig. 4.** The effect of bioplastic material (BPM) on the number of livings, apoptotic and dead cells after 72 h of incubation in neutral (a), acidic (b) and alkaline (c) media

**Примечание:** \* — различия достоверны при  $p < 0,05$ , по сравнению с контролем,  $M \pm SD$ ,  $n = 7$ .

**Note:**  $M \pm SD$ ; \* — differences are significant compared to control, when  $p < 0,05$ ;  $n = 7$ .

**Таблица 1.** Деструкция биоматериала в кислой, нейтральной и щелочной средах

**Table 1.** Destruction of biomaterial after incubation in acidic, neutral and alkaline solutions

Продолжительность инкубации, ч / Incubation time, h	Прочность, мН / Strength, mN			Эластичность, мм / Elasticity, mm		
	pH 6	pH 7	pH 8	pH 6	pH 7	pH 8
0,25	109 ± 7	87 ± 16	127 ± 28	1,45 ± 0,02	1,43 ± 0,21	1,85 ± 0,13
3	68 ± 9 *	58 ± 2 *	106 ± 9	2,58 ± 0,2 *	2,66 ± 0,31 *	2,84 ± 0,58 *
24	51 ± 10	40 ± 6 *	66 ± 10 *	2,81 ± 0,14	2,33 ± 0,12	2,96 ± 0,77

**Примечание:** Данные представлены в виде среднееарифметического значения ± стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ); \* — различия достоверны при  $p < 0,05$ , по сравнению с предыдущим значением,  $n = 7$ .

**Note:** data are presented as means ± standard deviation ( $M \pm SD$ ); \* — differences are significant compared to previous value,  $p < 0,05$ ;  $n = 7$ .

полимеров в качестве компонентов тканеинженерных конструкций обусловлена в первую очередь их высокой биосовместимостью с клетками и тканями человека и животных [25–27].

Результаты проведенного исследования расширяют представления о функциональных свойствах биоматериалов, изготовленных из компонентов межклеточного

матрикса. Несмотря на полученные обнадеживающие результаты, демонстрирующие способность биопластического материала сохранять функциональную активность фибробластов в условиях ацидоза, пока не известно, будет ли найденное свойство биопластического материала значимым для усиления репаративной регенерации в условиях *in vivo* при моделировании острых кожных ран у лабораторных животных.

**ВЫВОДЫ**

1. Поверхность биоматериала на основе коллагена, гиалуроновой кислоты и эластина обладает качествами, поддерживающими адгезию и пролиферативную активность фибробластов.

2. В условиях физиологического ацидоза снижается адгезивность и пролиферативная активность фибробластов, увеличивается количество апоптических клеток. Выявлено, что исследованный биопластический материал

предотвращает дисфункцию фибробластов, вызванную воздействием кислой среды.

3. Кислотность инкубационной среды не влияет на механические свойства биоматериала.

4. Биоматериал на основе растворимых компонентов дермы может быть использован в качестве биологически активного компонента раневых повязок для повышения эффективности репаративной регенерации, особенно при чрезмерном остром воспалении.

**ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ**

**Марков Павел Александрович**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела биомедицинских технологий, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии» Минздрава России.

E-mail: markovpa@nmicrk.ru, p.a.markov@mail.ru;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4803-4803>

**Ерёмин Петр Серафимович**, научный сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела биомедицинских технологий, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии» Минздрава России.

E-mail: ereminps@gmail.com;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8832-8470>

**Падерин Никита Михайлович**, научный сотрудник отдела молекулярной иммунологии и биотехнологии, Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук.

E-mail: paderin\_nm@mail.ru;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5313-7105>

**Гильмутдинова Ильмира Ринатовна**, кандидат медицинских наук, заведующая отделом биомедицинских технологий, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии» Минздрава России.

E-mail: gilm.ilmira@mail.ru;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6743-2615>

**Костромина Елена Юрьевна**, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела биомедицинских технологий, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии» Минздрава России.

E-mail: bioimed07@hotmail.com;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9728-7938>

**Гребень Анастасия Игоревна**, младший научный сотрудник отдела биомедицинских технологий, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии» Минздрава России.

E-mail: aik-nastya@mail.ru;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2423-523X>

**Фесюн Анатолий Дмитриевич**, доктор медицинских наук, и.о. директора, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии» Минздрава России.

E-mail: nmicrk@nmicrk.ru;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3097-8889>

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают свое авторство в соответствии с международными критериями ICMJE (все авторы внесли значительный вклад в концепцию, дизайн исследования и подготовку статьи, прочитали и одобрили окончательный вариант до публикации). Наибольший вклад распределен следующим образом: Марков П.А. — разработка концепции статьи, получение и анализ фактических данных, написание и редактирование текста статьи, проверка и утверждение текста статьи, обоснование научной значимости; Еремин П.С. — получение и анализ фактических данных, написание и редактирование текста статьи, статистическая обработка данных; Падерин Н.М. — получение и анализ фактических данных, написание и редактирование текста статьи, статистическая обработка данных; Гильмутдинова И.Р. — проверка и утверждение текста статьи, проектное руководство; Костромина Е.Ю. — поиск/анализ (полнотекстовых англоязычных) источников, написание и редактирование текста статьи; Гребень А.И. — поиск/анализ (полнотекстовых англоязычных) источников, написание и редактирование текста статьи; Фесюн А.Д. — проверка и утверждение текста статьи, проектное руководство.

**Источники финансирования.** Данное исследование не было поддержано никакими внешними источниками финансирования.

**Конфликт интересов.** Гильмутдинова И.Р., Еремин П.С. — обладатели патента РФ, 2722744, А61L27/44. 2020 «Органоспецифический биопластический пористый материал на основе растворимой формы стабилизированного внеклеточного матрикса». Фесюн А.Д. — и. о. директора ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии», президент Национальной ассоциации экспертов по санаторно-курортному лечению, главный редактор журнала «Вестник восстановительной медицины». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Доступ к данным.** Данные, подтверждающие выводы этого исследования, можно получить по запросу у корреспондирующего автора.

**ADDITIONAL INFORMATION**

**Pavel A. Markov**, Ph.D. (Biol.), Department of Biomedical Technologies, National Medical Research Center for Rehabilitation and Balneology, Moscow, Russia.

E-mail: markovpa@nmicrk.ru, p.a.markov@mail.ru;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4803-4803>

**Petr S. Eremin**, Researcher, Laboratory of Cellular Technologies, Department of Biomedical Technologies, National Medical Research Center for Rehabilitation and Balneology, Moscow, Russia.

E-mail: ereminps@gmail.com;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8832-8470>

**Nikita M. Paderin**, Researcher, Department of Molecular Immunology and Biotechnology, Institute of Physiology of the Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russia.

E-mail: paderin\_nm@mail.ru;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5313-7105>



**Ilmira R. Gilmutdinova**, Ph.D. (Med.), Head of the Department of Biomedical Technologies, National Medical Research Center for Rehabilitation and Balneology, Moscow, Russia.

E-mail: gilm.ilmira@mail.ru;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6743-2615>

**Elena Yu. Kostromina**, Ph.D. (Biol.), Senior Researcher, Department of Biomedical Technologies, National Medical Research Center for Rehabilitation and Balneology, Moscow, Russia.

E-mail: bioimed07@hotmail.com;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9728-7938>

**Anastasia I. Greben**, Junior Researcher, Department of Biomedical Technologies, National Medical Research Center for Rehabilitation and Balneology, Moscow, Russia.

E-mail: aik-nastya@mail.ru;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2423-523X>

**Anatoliy D. Fesyun**, Dr Sci. (Med.), Acting Director, National Medical Research Center for Rehabilitation and Balneology, Moscow, Russia.

E-mail: E-mail: nmicrk@nmicrk.ru;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3097-8889>

**Author Contributions.** All authors confirm their authorship according to the international ICMJE criteria (all authors contributed significantly to the conception, study design and preparation of the article, read and approved the final version before publication). Special contributions: Markov P.A. — development of the concept

of the article, obtaining and analyzing factual data, writing and editing the text of the article, checking and approving the text of the article, substantiating scientific significance; Eremin P.S. — obtaining and analyzing data, writing and editing the text of the article, statistical data processing; Paderin N.M. — obtaining and analyzing data, writing and editing the text of the article, statistical data processing; Gilmutdinova I.R. — checking and approving the text of the article, project management; Kostromina E.Yu. — search/analysis of (full-text English-language) sources, writing and editing the text of the article; Greben A.I. — search/analysis of (full-text English-language) sources, writing and editing the text of the article; Fesyun A.D. — verification and approval of the text of the article, project management.

**Funding.** This study was not supported by any external funding sources.

**Disclosure.** Gilmutdinova I.R., Eremin P.S. own patent RU 2722744, A61L27/44. 2020 "Organospecific bioplastic porous material based on a soluble form of stabilized extracellular matrix". Fesyun A.D. — Acting Director of the National Medical Research Center for Rehabilitation and Balneology, President of the National Association of Experts in Spa Treatment, Editor-in-Chief of the Bulletin of Rehabilitation Medicine. Other authors declare that there is no conflict of interest related to the research and publication of this article.

**Data Access Statement.** The research data is available from the corresponding author.

## Список литературы / References

- Shpichka A., Butnaru D., Bezrukov E A. et al. Skin tissue regeneration for burn injury. *Stem Cell Research & Therapy*. 2019; 10(1): 94 p. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1203-3>.
- Sheikholeslam M., Wright M E.E., Jeschke M G., Amini-Nik S Biomaterials for Skin Substitutes. *Advanced Healthcare Materials*. 2018; 7(5): 20 p. <https://doi.org/10.1002/adhm.201700897>.
- Regier M C., Montanez-Sauri S I., Schwartz M P. et al. The Influence of Biomaterials on Cytokine Production in 3D Cultures. *Biomacromolecules*. 2017; 18(3): 709–718. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b01469>.
- Hakimi N., Cheng R., Leng L. et al. Handheld skin printer: in situ formation of planar biomaterials and tissues. *Lab on a Chip*. 2018; 18(10): 1440–1451. <https://doi.org/10.1039/c7lc01236e>.
- Gilmutdinova I R., Kostromina E., Yakupova R D., Eremin P S. Development of nanostructured bioplastic material for wound healing. *European Journal of Translational Myology*. 2021; 31(1): 1–5. <https://doi.org/10.4081/ejtm.2021.9388>.
- Гильмутдинова И Р., Костромина Е Ю., Якупова Р Д., Еремин П С. Разработка наноструктурированного биопластического материала для комбустиологии. *Биотехнология*. 2020; 36(4): 65–68. [Gilmutdinova I R., Kostromina E.Yu., Yakupova R D., Eremin P S. Creation of a novel nanostructured bioplastic material for combustiology. *Biotechnologiya*. 2020; 36(4): 65–68 (In Russ.).]
- Cabral L R.B., Teixeira L N., Gimenez R P. et al. Effect of Hyaluronic Acid and Poly-L-Lactic Acid Dermal Fillers on Collagen Synthesis: An in vitro and in vivo Study. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*. 2020; (13): 701–710. <https://doi.org/10.2147/CCID.S266015>.
- Schneider L A., Korber A., Grabbe S. et al. Influence of pH on wound-healing: a new perspective for wound-therapy. *Archives of Dermatological Research*. 2007; (298): 413–420. <https://doi.org/10.1007/s00403-006-0713-x>.
- Matsuki T., Pédrón T., Regnault B. et al. Epithelial cell proliferation arrest induced by lactate and acetate from *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium breve*. *PLoS One*. 2013; 8(4): e63053. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063053>
- Shan T., Chen S., Chen X. et al. M2-TAM subsets altered by lactic acid promote T-cell apoptosis through the PD-L1/PD-1 pathway. *Oncology Reports*. 2020; 44(5): 1885–1894. <https://doi.org/10.3892/or.2020.7767>.
- Quinn W J. 3rd, Jiao J., TeSlaa T. et al. Lactate Limits T Cell Proliferation via the NAD(H) Redox State. *Cell Reports*. 2020; 33(11): 108500. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108500>.
- Gomez-Gutierrez J G., Bhutiani N., McNally M W. et al. The neutral red assay can be used to evaluate cell viability during autophagy or in an acidic microenvironment in vitro. *Biotechnol & Histochemistry*. 2021; 96(4): 302–310. <https://doi.org/10.1080/10520295.2020.1802065>.
- Liu Y., Kalén A., Risto O., Wahlström O Fibroblast proliferation due to exposure to a platelet concentrate in vitro is pH dependent. *Wound Repair and Regeneration*. 2002; 10(5): 336–340.
- Jiang D., Rinkevich Y Scars or Regeneration? Dermal Fibroblasts as Drivers of Diverse Skin Wound Responses. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(2): 617. <https://doi.org/10.3390/ijms21020617>.
- Zhang X., Kang X., Jin L. et al. Stimulation of wound healing using bioinspired hydrogels with basic fibroblast growth factor (bFGF). *International Journal of Nanomedicine*. 2018; (13): 3897–3906. <https://doi.org/10.2147/IJN.S168998>.
- Гильмутдинова И Р., Еремин П С. Органоспецифический биопластический пористый материал, на основе растворимой формы стабилизированного внеклеточного матрикса. Патент РФ, 2722744, А61L27/44. 2020 [Gilmutdinova I R., Eremin P S. Organ-specific bioplastic material based on soluble form of stabilized extracellular matrix. RU Patent RU 2722744, A61L27/44. 2020. (In Russ.).]
- Avery D., Govindaraju P., Jacob M. et al. Extracellular matrix directs phenotypic heterogeneity of activated fibroblasts. *Matrix Biology*. 2018; (67): 90–106. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.12.003>.
- Katoh K. FAK-Dependent Cell Motility and Cell Elongation. *Cells*. 2020; 9(1): 192. <https://doi.org/10.3390/cells9010192>.

19. Wolf M T., Daly K A., Brennan-Pierce E P. et al. A hydrogel derived from decellularized dermal extracellular matrix. *Biomaterials*. 2012; 33(29): 7028–7038. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.06.051>.
20. Drobnik J., Pietrucha K., Piera L. et al. Collagenous scaffolds supplemented with hyaluronic acid and chondroitin sulfate used for wound fibroblast and embryonic nerve cell culture. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2017; 26(2): 223–230. <https://doi.org/10.17219/acem/62835>.
21. Suh H, Lee JE. Behavior of fibroblasts on a porous hyaluronic acid incorporated collagen matrix. *Yonsei Medical Journal*. 2002; 43(2): 193–202. <https://doi.org/10.3349/ymj.2002.43.2.193>.
22. Schneider L A., Korber A., Grabbe S., Dissemond J Influence of pH on wound-healing: a new perspective for wound-therapy? *Archives of Dermatological Research*. 2007; 298(9): 413–420. <https://doi.org/10.1007/s00403-006-0713-x>.
23. Grab B., Miles A J., Furcht L T., Fields G B. Promotion of fibroblast adhesion by triple-helical peptide models of type I collagen-derived sequences. *The Journal of Biological Chemistry*. 1996; 271(21): 12234–12240. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.21.12234>.
24. Kruse C R., Singh M., Targosinski S. et al. The effect of pH on cell viability, cell migration, cell proliferation, wound closure, and wound reepithelialization: In vitro and in vivo study. *Wound Repair and Regeneration*. 2017; 25(2): 260–269. <https://doi.org/10.1111/wrr.12526>.
25. Marin M M., Ianchis R., Leu Alexa R. et al. Development of New Collagen/Clay Composite Biomaterials. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 23(1): 401. <https://doi.org/10.3390/ijms23010401>.
26. Catoira M C., Fusaro L., Di Francesco D. et al. Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2019; 30(10): 115. <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6318-7>.
27. Meyer M Processing of collagen-based biomaterials and the resulting materials properties. *BioMedical Engineering OnLine*. 2019; 18(1): 24. <https://doi.org/10.1186/s12938-019-0647-0>.

