

Свердлова Мария Вадимовна

**СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТАРНОЙ ПЛАЗМЫ И
ТРОМБОЦИТАРНЫХ СГУСТКОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ РАН У ЖИВОТНЫХ**

4.2.1. Патология животных, морфология, физиология, фармакология и
токсикология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата ветеринарных наук

Санкт-Петербург – 2023

Работа выполнена на кафедре общей, частной и оперативной хирургии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины».

Научный руководитель – Бокарев Александр Владимирович,
доктор ветеринарных наук.

Официальные оппоненты: Концевая Светлана Юрьевна,
доктор ветеринарных наук, профессор,
заведующая кафедрой агробiotехнологий и
научеомких способов сельскохозяйственного
производства ФГБОУ ДПО «Российская академия
кадрового обеспечения агропромышленного
комплекса»;

Чернигова Светлана Владимировна,
доктор ветеринарных наук, профессор, профессор
кафедры диагностики, внутренних незаразных
болезней, фармакологии, хирургии и акушерства
ФГБОУ ВО «Омский государственный
университет имени П. А. Столыпина».

**Ведущая организация – ФГБОУ ВО «Московская государственная академия
ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К. И. Скрябина».**

Защита диссертации состоится 19 октября 2023 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета 35.2.034.02 на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» по адресу: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская д.5, тел/факс 8(812) 388-36-31.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО СПбГУВМ по адресу: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская д. 5, и на официальном сайте <http://spbguvm.ru>

Автореферат разослан « » _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Хватов
Виктор Александрович

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. На протяжении всего существования как гуманной, так и ветеринарной медицины врачи и ученые искали способы ускорения заживления раневых повреждений. По мере накопления как практических, так и научных знаний эти поиски приобрели новый вектор в сторону разработки способов, обеспечивающих не просто быстрое заживление раневой патологии, а заживление с максимально полным восстановлением тканеспецифичности, то есть по типу реституции. В последнее время большие успехи в лечении ран достигнуты благодаря применению методов регенеративной медицины, одним из вариантов которой является использование плазмы, обогащенной тромбоцитами. Исследования механизмов ускорения процессов регенерации и ремоделирования рубца под действием тромбоцитарных фактов носят интегральный характер. Этим вопросом занимаются и биохимики, и молекулярные биологи, и специалисты в области цитологии и гистологии, а также специалисты клинических дисциплин. В отечественной ветеринарной медицине исследованиями различных аспектов механизмов и терапевтической эффективности плазмы, обогащенной тромбоцитами занимались такие ученые как: Пигарева, В. Ю., 2016; Гусева, В. А., 2016; Семенов, Б. С., 2016; Шилкина, Г. А., 2017; Ватников, Ю. А., 2018; Ерин, И. С., 2020; Стекольников, А. А., 2020; Захаров, А. Ю., 2020; Бокарев, А. В., 2021. Сходные исследования проводятся и зарубежными учеными (Tanabe, T., 2012; Yamada, A. L., 2012; Zuffova, K., Krisova, S., Zert, Z., 2013; Filgueiras, R. R., 2014; Facon-Poroszewska, M., Kielbowicz, Z., Przada, P., 2019; Skwarcz, S., 2019). На современном этапе учеными активно проводятся исследования, включающие в себя решение таких проблем как: эффективные, простые и экономически целесообразные способы получения тромбоцитарной плазмы, сравнительная характеристика лечебных эффектов различных молекулярных и клеточных компонентов тромбоцитарной плазмы, спектр патологических состояний при которых тромбоцитарная плазма может быть использована в качестве лечебного средства, селективное влияние на лечебные эффекты тромбоцитарной плазмы примеси мононуклеарных и гранулоцитарных лейкоцитов, возможные негативные эффекты применения тромбоцитарной плазмы. Использование аутологичной плазмы для лечения раневой патологии различного этиопатогенеза и различной локализации в настоящий момент считается перспективным методом в ветеринарной медицине.

Степень разработанности темы. Многие аспекты лечения ран различного этиопатогенеза при помощи плазмы и сгустков, обогащенных тромбоцитами до настоящего времени, остаются спорными или недостаточно изученными. Во-первых, отсутствует информация по оптимальным методам получения тромбоцитарной плазмы от разных видов животных. Во-вторых, отсутствует информация о влиянии на здоровые или поврежденные ткани таких образцов плазмы, которые не содержат тромбоциты или в которых дополнительно присутствуют лейкоциты. Также не определены критерии, в соответствии с которыми следует использовать в качестве индуктора

регенерационных процессов тромбоцитарную плазму или тромбоцитарный сгусток. Кроме того, имеется недостаточно данных о влиянии тромбоцитарной плазмы и тромбоцитарных сгустков на заживление ран в зависимости от различий в их этиопатогенезе.

Цель и задачи исследований. Цель работы – сравнить эффективность аутологичной тромбоцитарной плазмы и аутологичных тромбоцитарных сгустков при лечении ран у животных.

Для решения обозначенной цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать наиболее оптимальный и доступный для ветеринарных клиник общего профиля способ получения тромбоцитарной плазмы и тромбоцитарных сгустков из стабилизированной крови различных видов животных;

2. Исследовать влияние бесклеточной, тромбоцитарной и тромбоцитарно-лейкоцитарной цитратной плазмы на здоровую кожу лабораторных крыс при внутривенном и подкожном введении;

3. Изучить влияние бесклеточных, тромбоцитарных и тромбоцитарно-лейкоцитарных сгустков на состояние ожогово-резаной раны у лабораторных крыс;

4. Определить эффективность тромбоцитарной плазмы и тромбоцитарных сгустков для лечения ожоговых ран у лабораторных крыс;

5. Дать оценку эффективности тромбоцитарной плазмы и тромбоцитарных сгустков для лечения ран различного этиопатогенеза у домашних животных в условиях клиники;

6. Дать рекомендации по получению и использованию тромбоцитарной плазмы и тромбоцитарных сгустков при лечении кожных дефектов животных.

Научная новизна работы. В ходе научного исследования был разработан оптимальный метод выделения из цитратной крови различных видов животных тромбоцитарной плазмы и тромбоцитарных сгустков, содержащих количество тромбоцитов, значительно превышающее исходное в цельной крови. Предложен ранее не описанный метод выделения тромбоцитарной плазмы из одного миллилитра цельной крови, что позволяет выделять тромбоцитарную плазму из цельной крови животных весом до одного килограмма, а также у лабораторных крыс без их эвтаназии. Изучена макроморфологическая и гистологическая картина влияния плазмы с разным клеточным составом на здоровую и поврежденную кожу крыс. В свою очередь в условиях *in vitro* исследовано влияние основных молекулярных и клеточных элементов кровяного сгустка на контаминант раневого канала. В условиях лаборатории (на крысах) исследовано влияние тромбоцитарного и тромбоцитарно-лейкоцитарного аутологичного сгустка на заживление осложненной резаной раны. В условиях клиники исследована эффективность инъекций тромбоцитарной плазмы и аппликаций тромбоцитарных сгустков на заживление ран различного этиопатогенеза у собак и кошек.

Теоретическая и практическая значимость работы. В результате полученных экспериментальных данных был предложен простой к

исполнению, экономически целесообразный и выполнимый даже в неспециализированных ветеринарных клиниках способ получения плазмы, обогащенной тромбоцитами. В том числе из одного миллилитра крови. Исследовано влияние наличия лейкоцитов в плазме, обогащенной тромбоцитами (при ее подкожном или внутрикожном введении) на состояние здоровой кожи, и кожи находящейся в процессе заживления после экспериментального повреждения. Получены данные о том, что основные компоненты кровяного сгустка, такие как фибрин, тромбоциты и лейкоциты вместе, и каждый по отдельности принимают участие в первичной санации раны. Отработан и предложен простой к исполнению метод лечения гнойно-некротических ран путем последовательной аппликации на раневую поверхность сначала тромбоцитарно-лейкоцитарного сгустка до достижения очищения раны, а затем тромбоцитарного сгустка для ускорения процессов образования первичного рубца и его реорганизации. Полученные данные могут быть использованы в практической и теоретической деятельности ветеринарных специалистов.

Методология и методы исследований. Для достижения цели и выполнения поставленных задач данного исследования были использованы такие методы как: гистологические, а также дифференциальное центрифугирование крови для получения отдельных клеточных фракций, моделирование раневого процесса на лабораторных животных, клинические исследования при лечении ран у животных в условиях ветеринарной клиники, морфометрические и планиметрические для мониторинга раневого процесса, а также статистический анализ полученных результатов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Способ получения тромбоцитарной плазмы и тромбоцитарных сгустков из стабилизированной крови различных видов животных;
2. Механизм бактерицидного действия структурных и клеточных элементов кровяного сгустка;
3. Влияние бесклеточной, тромбоцитарной и тромбоцитарно-лейкоцитарной плазмы на здоровую кожу лабораторных животных (крыс) при подкожном введении;
4. Эффективность бесклеточной, тромбоцитарной и тромбоцитарно-лейкоцитарной плазмы и аналогичных по содержанию сгустков при лечении экспериментальных ран у лабораторных животных (крыс);
5. Влияние тромбоцитарной плазмы и тромбоцитарных сгустков на заживление ран различного этиопатогенеза у мелких домашних животных.

Степень достоверности и апробация результатов диссертационной работы. Достоверность исследований подтверждается использованием современных методов диагностики на сертифицированном оборудовании, а также статистической обработкой полученных данных.

Материалы диссертации были представлены на научной конференции: «Национальная научная конференция профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов СПбГУВМ» (Санкт-Петербург,

2021). Получен патент РФ на изобретение «Способ получения плазмы, обогащенной тромбоцитами, из малых объемов крови» № RU 2789518 C1 от 06.02.2023. Материалы диссертационной работы используются в учебном процессе, в научно-исследовательской деятельности на кафедре хирургии, акушерства и патологии мелких животных ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н. Э. Баумана»; на кафедре внутренних болезней и хирургии «Удмуртский государственный аграрный университет»; на кафедре общей, частной и оперативной хирургии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины». Результаты исследований с положительным эффектом применяются в ветеринарной клинике «СофиВет» г. Санкт-Петербург.

Публикации результатов исследований. По теме диссертационной работы опубликовано семь научных трудов. Из них в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации – три работы (Международный вестник ветеринарии – две; Ветеринарный фармакологический вестник – одна); индексируемых в базе цитирования Scopus – две работы (EurAsian Journal of BioSciences – одна; International Transaction Journal of Engineering, Management and Applied Sciences and Technologies – одна); региональной печати – одна работа, патент – один.

Личный вклад соискателя. В работе представлены результаты научных исследований, проведенных на кафедре общей, частной и оперативной хирургии СПбГУВМ в период с 2018-2023 годы. Цель и задачи научной работы обозначены соискателем самостоятельно. Все исследования проводились соискателем лично. Были проведены многочисленные опыты по выделению тромбоцитарной плазмы и тромбоцитарных сгустков для лечения ран животных, а также на протяжении всей научной деятельности опытным путем в ходе экспериментов на лабораторных крысах и на других животных с ранами различной этиологии были изучены механизмы влияния тромбоцитарной плазмы, тромбоцитарно-лейкоцитарной, а также плазмы без тромбоцитов. Немаловажным является изучение и описание влияния тромбоцитарных сгустков на длительно незаживающие раны. Личный вклад соискателя при подготовке научной работы составляет 80,0%.

Соответствие работы паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует паспорту научной специальности 4.2.1. Патология животных, морфология, физиология, фармакология и токсикология, а именно ее пунктам 6, 7, 10, 15.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 123 страницах компьютерного текста. Состоит из обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, практических предложений, рекомендаций и перспектив дальнейшей разработки темы, списка литературы, включающего 196 источников, в том числе 161 отечественный и 35 иностранных. Диссертация содержит 7 таблиц и 43 рисунка.

2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2.1 Материалы и методы исследований

Исследования проводились при кафедре общей, частной и оперативной хирургии ФГБОУ ВО СПбГУВМ в период с 2018 по 2023 гг.

Объектом исследований были лабораторные крысы линии «Вистар» содержащиеся в виварии СПбГУВМ, собаки и кошки разных пород, пола и возраста, которые поступали в ветеринарную клинику «СофиВет». Для отработки способов выделения плазмы и сгустков с различным клеточным составом использовали кровь лошадей, коров, кроликов, крыс, собак и кошек (Таблица 1).

Таблица 1 – Характеристика и методы исследуемого материала

	Лошади	Коровы	Кролики	Крысы	Собаки	Кошки	Итого
Отработка метода выделения тромбоцитарной плазмы в пробирках с разделительным гелем	30	25	-	-	20	-	75
Отработка метода получения тромбоцитарной плазмы в пробирках с цитратом натрия	20	20	15	10	25	12	102
Отработка метода получения тромбоцитарной плазмы из малых объемов крови в инсулиновых шприцах	-	-	10	15	17	15	57
Отработка метода получения сгустков из цитратной плазмы	15	10	14	17	15	27	98
Гистоморфологические исследования сгустков из разных образцов плазмы	-	-	-	5	5	-	10
Гистоморфологические исследования микробоцидных свойств сгустков из разных образцов плазмы	-	-	-	3	3	-	6
Исследование влияния плазмы на заживление стерильной резанной раны	-	-	-	5	-	-	5
Исследование влияния плазмы при внутрикожном и подкожном введении	-	-	-	50	-	-	50
Исследование влияния плазмы на заживление ожоговой раны	-	-	-	30	-	-	30
Исследование влияния плазмы на заживление резано-ожоговой раны	-	-	-	40	-	-	40
Исследование влияния плазмы на заживление ран различного этиопатогенеза в условиях ветеринарной клиники	-	-	-	-	24	31	55
Итого животных	65	55	39	175	109	85	528

Для отработки способов выделения плазмы и сгустков с различным клеточным составом использовали кровь лошадей, коров, кроликов, крыс, собак и кошек. За весь период научной работы было исследовано 109 собак, 85 кошек, 39 кроликов, 175 крыс, 65 лошадей, 55 коров.

Работы по получению тромбоцитарной плазмы и тромбоцитарных сгустков проводили с использованием различных пробирок. В том числе вакуумных пробирок с цитратом, с гепарином, с КЗ-ЭДТА, а также пробирок для плазмолифтинга с разделительным гелем. Для центрифугирования использовали лабораторную центрифугу ОПН-3. Для создания стандартных температурных условий при приготовлении сгустков использовали регулируемый лабораторный водяной термостат. Лабораторные исследования проводили на автоматическом гематологическом анализаторе МЕК-6550.

Обогащенную тромбоцитами плазму получали из стабилизированной 3,8% цитратом натрия крови животных, которую затем подвергали центрифугированию на скорости не менее 3000 об/мин в течение двух минут, затем сразу 1000 об/мин/ 10 минут на центрифуге ОПН-3. Тромбоцитарную плазму также выделяли из малых объемов крови 1,0 мл по авторской методике. На которую был получен нами патент на изобретение. В стерильный инсулиновый шприц объемом 1,0 мл, содержащий 0,05 мл (50 мкл) 3,8% цитрата натрия помещали кровь. Шприц плотно закрывается, а оттянутый поршень шприца обрезается. Далее шприц помещается в стакан центрифуги ОПН-3 иглой вверх и центрифугируется одну минуту при 3000 об/мин и сразу без остановки центрифуги 10 минут при 1000 об/мин. После остановки центрифуги шприц извлекается, снимается игла с колпачком и другим шприцом через отверстие наконечника, введя туда иглу, производится забор плазмы объём которой составляет от 0,4% до 0,55% от исходного объёма крови, что было бы невозможно при использовании стандартной пробирки с цитратом натрия 3,8%, рассчитанной на больший объём крови. Плазма извлекается аккуратно, не захватывая верхний эритроцитарный слой, в котором содержится большое количество лейкоцитов.

Получение фибриновых сгустков с различным клеточным составом: бесклеточный, тромбоцитарный и тромбоцитарно-лейкоцитарный, путем центрифугирования по вышеописанному методу, после чего коагуляционные свойства плазмы легко восстанавливаются путем добавления на каждые 0,5 мл плазмы 25,0 мкл 10,0% хлористого кальция. Фибриновые сгустки, полученные из такой плазмы макроморфологически сходны с фибриновыми сгустками, приготовленными из плазмы крови нестабилизированной антикоагулянтами.

Исследование реакции здоровой кожи на введение плазмы с различным клеточным составом (бесклеточная, тромбоцитарная, тромбоцитарно-лейкоцитарная) проводили путем внутрикожной инъекции 0,1 мл предварительно приготовленной клеточной взвеси, с последующим макро- и гистоморфологическим исследованием кожных изменений.

Для исследования влияния бесклеточной, тромбоцитарной и тромбоцитарно-лейкоцитарной плазмы на здоровую кожу крыс при подкожном введении использовали животных с предварительно приготовленной кожной складкой. Образцы подготовленной плазмы с различным клеточным составом вводили внутрь кожной складки. Мониторинг реакции кожного покрова на

введение образцов плазмы проводили путем макро- и гистоморфологического исследования.

Для оценки эффективности лечения ожоговых ран у лабораторных крыс методом введения плазмы с различным клеточным составом (бесклеточная и тромбоцитарная плазма крови) разделяли крыс на три группы, предварительно нанося ожоги третьей степени. В контрольную группу включали животных, которым не проводилось лечение, в первую группу – животных, которым вводили бесклеточную плазму, во вторую группу – крыс, которым вводили тромбоцитарную плазму крови. Термическое повреждение кожи осуществляли при помощи прикладывания на две-три секунды к выбритой коже крыс в межлопаточной области нагретого на газовой горелке до 300,00⁰С омедненного диска. Спустя пять дней после нанесения повреждения крысам вводили предварительно приготовленную плазму крови в объеме 0,1 мл вокруг и под патологический очаг кожного покрова. Инъекции повторяли через пять, семь суток. Лечение проводили в течение 30 дней. Оценку степени заживления ран проводили с помощью фотофиксации, термографии и планиметрического исследования.

Для исследования эффективности фибриновых сгустков различного клеточного состава для лечения резано-ожоговых ран у лабораторных крыс были сформированы четыре группы. У первой группы крыс (Контроль № 1) раны не ушивали. У второй группы крыс (Контроль № 2) раны ушивали, но без внесения фибринового сгустка. У третьей группы крыс (Опыт №1) раны ушивали, предварительно поместив в них тромбоцитарный сгусток, четвертой группы крыс (Опыт № 2) раны ушивали, предварительно поместив в них тромбоцитарно-лейкоцитарный сгусток. Оценку течения раневого процесса производили по характеру местных реакций организма подопытных животных.

Нанесение ран различного генеза лабораторным крысам проводили под севофлурановым наркозом. Термографическое исследование проводили при помощи тепловизора СЕМ DT 980. Моделирование термических и операционных ран лабораторным животным выполняли по методикам, рекомендованным в научных публикациях, в собственной модификации. Гистологические исследования проводили по стандартной процедуре: взятие биоптата, фиксирование материала в 10,0% растворе формалина, приготовленном на фосфатном буфере рН-7,2 – 7,4, изготовление парафиновых блоков, приготовление гистологических срезов, окраска срезов, анализ гистологических препаратов путем микроскопии. Обзорное окрашивание гистологических препаратов проводили гематоксилином и эозином. Специальное окрашивание на выявление волокон коллагена проводили по Ван Гизону. Специальное окрашивание на выявление фибрина проводили по Граму-Вейгерту. Микроскопирование препаратов проводили на микроскопе Люмам И-2 со встроенной цифровой камерой 5 МП. Фотофиксацию и фотодокументирование полученных изображений проводили на персональном компьютере с использованием программного обеспечения ScopePhoto 3.1. Морфометрические исследования гистологических препаратов проводили с

использованием программы ScreenMeter 1.0. Планиметрические исследования раневых дефектов проводили с использованием программы IpSquare v5.0 for Windows from LProSoft. Статистический анализ полученного материала проводили с использованием программы BioStat Le 6.9.1.0.

Все экспериментальные манипуляции с лабораторными животными проводили согласно Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях).

2.2 Результаты собственных исследований

2.2.1 Отработка и усовершенствование метода получения тромбоцитарной плазмы из крови животных

На начальном этапе работы была проверена возможность получения плазмы, обогащенной тромбоцитами, в пробирках для плазмолифтинга с разделительным гелем. Исследования проводились на крови собак, лошадей и коров. Результаты исследования показали, что только при скорости центрифугирования не менее 3000 об/мин в течение 10 минут на центрифуге ОПН-3, что соответствовало фактору разделения $g=1000,0$, эритроциты во всех случаях полностью проходили через разделительный гель. Однако результат исследования показал, что в плазме, полученной таким способом, происходит значительная потеря тромбоцитов, а также может остаться некоторое количество лейкоцитов, которые прилипают к поверхности разделительного геля и смываются в процессе отбора плазмы.

При уменьшении скорости центрифугирования до 1500,0 об/мин, что соответствует фактору разделения $g=260,0$, разделительный гель пробирок отдельного типа позволяет отделить эритроциты от плазмы. Абсолютное количество тромбоцитов в такой плазме возрастает. И даже превышает их исходное количество в цельной крови. Но параллельно возрастает как абсолютное, так и относительное количество лейкоцитов.

Кроме перечисленных недостатков способа получения плазмы, обогащенной тромбоцитами, в пробирках с разделительным гелем, критичным также является то, что такие пробирки рассчитаны на большие объёмы крови восемь-девять мл. Такое количество крови сложно, а иногда невозможно получить от животных небольшого размера. А с уменьшением количества крови, добавленной в такие пробирки, уменьшается расстояние от поверхности разделительного геля до верхней границы столбика крови. То есть уменьшается дистанция пробега форменных элементов крови, необходимой для их четкого разделения под действием центробежной силы. Дополнительно следует отметить, что пробирки с разделительным гелем, предназначенные для получения плазмы, обогащенной тромбоцитами, имеющиеся в продаже на Российском рынке, в качестве антикоагулянта содержат гепарин, который не позволяет впоследствии приготовить из полученной плазмы сгустки.

Собственные рутинные поиски методов получения плазмы, обогащенной тромбоцитами, позволили определить, что наиболее простым и эффективным методом получения плазмы, обогащенной тромбоцитами, является метод, в

котором используются пробирки с цитратом натрия в качестве антикоагулянта, рассчитанные на четыре-пять мл крови. Оптимальный режим выделения на центрифуге ОПН-3 (на центрифугах другого типа режим центрифугирования необходимо подбирать индивидуально) составляет 3000,0 об/мин/ две минуты + 1000 об/мин/десять минут (Рисунок 1). Данный способ позволяет получать плазму в объеме, составляющем от 35,0% до 50,0% от исходного объема крови, значительно обогащенную тромбоцитами (обогащение может превышать 150,0% и содержащую лейкоциты в очень малом количестве.

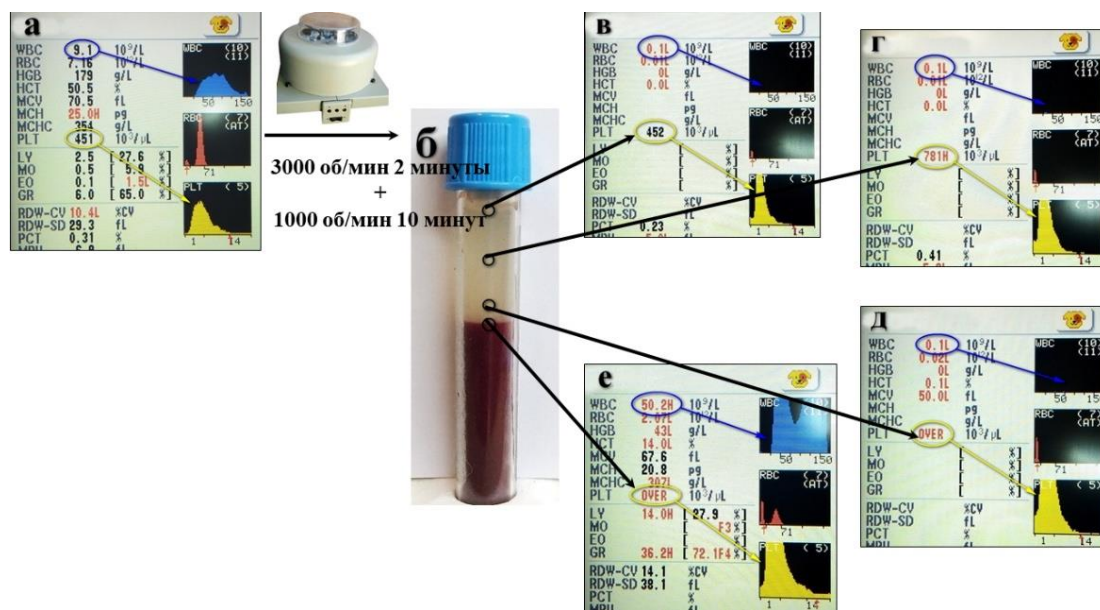


Рисунок 1 – Количественные характеристики тромбоцитарной плазмы, полученной в цитратных пробирках без разделительного геля:

а – параметры цельной крови; б – кровь после центрифугирования; в, г, д, е – количественные параметры тромбоцитарной плазмы, полученные из разных участков плазмы; синими кругами и стрелками выделены лейкоциты; желтыми кругами и стрелками выделены тромбоциты.

Учитывая то, что концентрация тромбоцитов в единице объема полученной плазмы возрастает в направлении к лейкоцитарной пленке, можно дифференцированно извлекать аликвоты плазмы с малым, средним и большим содержанием тромбоцитов (кроме плазмы, полученной из крови лошадей).

Кроме этого, данный метод позволяет получить тромбоцитарно-лейкоцитарную плазму из той же пробы, не прибегая к повторному центрифугированию. Концентрация лейкоцитов в такой плазме может превышать исходную концентрацию в три-пять раз и достигать $45,75 \pm 29,80 \times 10^3$ в мкл. Из всех образцов плазмы можно легко приготовить сгустки путем простого добавления кальция в форме раствора кальция хлорида.

С учетом того, что в качестве пациентов врача ветеринарной медицины выступают и очень мелкие и миниатюрные животные, у которых сложно получить кровь объемом более 1,0 мл был разработан и апробирован способ получения плазмы обогащенной тромбоцитами в инсулиновых шприцах (Рисунок 2).

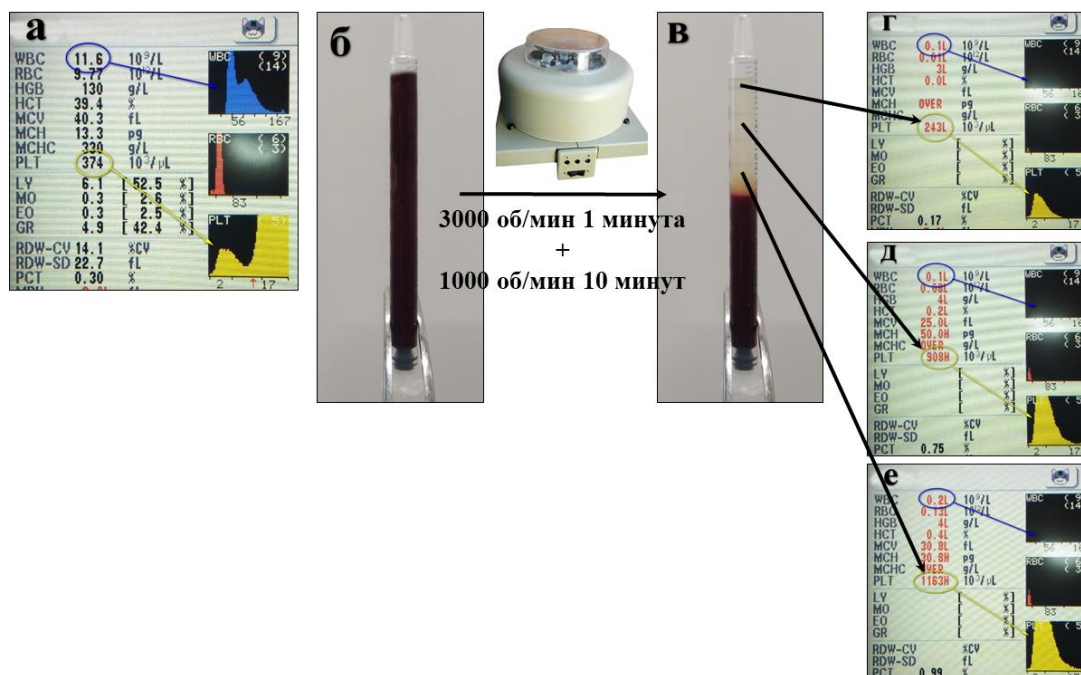


Рисунок 2 – Количественные характеристики тромбоцитарной плазмы полученной в инсулиновых шприцах:

а – параметры цельной крови; б – инсулиновый шприц с кровью центрифугирования; в – инсулиновый шприц после центрифугирования; г, д, е – количественные параметры тромбоцитарной плазмы, полученные из разных участков плазмы; синими кругами и стрелками выделены лейкоциты; желтыми кругами и стрелками выделены тромбоциты.

После того, как в стерильный инсулиновый шприц объемом 1,0 мл (Рисунок 2 (б)), содержащий 0,05 мл (50,0 мкл) 3,8% цитрата натрия производится забор крови, закрывается иглой с защитным колпачком, а шток поршня шприца обрезается. Далее шприц помещается в стакан центрифуги ОПН-3 иглой вверх и центрифугируется одну минуту при 3000 об/мин и сразу без остановки центрифуги 10 минут при 1000 об/мин. После остановки центрифуги шприц извлекается, снимается игла с колпачком и другим шприцом через отверстие наконечника вводя туда иглу производится забор плазмы объем которой составляет от 0,4% до 0,55% от исходного объема крови (Рисунок 2 (в)), что было бы невозможно при использовании стандартной пробирки с цитратом натрия 3,8%, рассчитанной на больший объем крови. Плазма извлекается аккуратно, не захватывая верхний эритроцитарный слой, в котором содержится большое количество лейкоцитов. Основные параметры полученных образцов плазмы аналогичны тем, которые получают при использовании вакуумных пробирок с цитратом натрия описанные выше (Рисунок 1 (г, д, е)).

2.2.2 Отработка и усовершенствование метода получения тромбоцитарных сгустков из крови животных

Для выполнения заявленной цели исследования следовало три вида сгустков: полностью бесклеточный, тромбоцитарный и тромбоцитарно-лейкоцитарный. Предварительные исследования показали, что образцы плазмы, полученные из крови стабилизированной гепарином и трилоном-Б (ЭДТА), не подходят по причине того, что даже после внесения ингибиторов

антикоагуляторной активности, таких как протамин или хлорид кальция, соответственно, фибриновые сгустки либо не образуются вообще, либо макроморфологически они значительно отличаются от сгустков, образовавшихся из нестабилизированной плазмы.

Согласно полученным результатам, оптимальным источником приготовления фибриновых сгустков с заданным тромбоцитарно-лейкоцитарным составом является цитратная плазма, полученная путем центрифугирования.

Качественный и количественный клеточный состав такой плазмы легко определяется на гематологическом анализаторе, после чего коагуляционные свойства плазмы легко восстанавливаются путем добавления на каждые 0,5 мл плазмы 25,0 мкл 10,0% хлористого кальция. Фибриновые сгустки, полученные из такой плазмы, макроморфологически сходны с фибриновыми сгустками, приготовленными из плазмы крови нестабилизированной антикоагулянтами.

Исследования по получению сгустков из цитратной плазмы показали, что время за которое происходит коагуляция и ретракция, значительно отличается в зависимости от того, есть ли в плазме тромбоциты и лейкоциты. Минимальная скорость и, соответственно, максимальное время образования и ретракции сгустков наблюдается в полностью бесклеточной плазме. Максимальная скорость и, соответственно, минимальное время образования и ретракции сгустков наблюдается в плазме обогащенной тромбоцитами и лейкоцитами.

Также показано, что бесклеточные, тромбоцитарные, тромбоцитарно-лейкоцитарные сгустки отличаются как внешним видом, так и степенью ретракции. Самая высокая степень ретракции и, соответственно, самый малый размер после нее, наблюдался у тромбоцитарно-лейкоцитарных сгустков. Бесклеточные фибриновые сгустки ретракции практически не подвергались. У тромбоцитарных сгустков степень ретракции была промежуточной.

Исследование гистологических препаратов приготовленных из сгустков показало следующее:

- 1 – В бесклеточном сгустке визуализируются участки низкой и плотной конденсации нитей фибрина, которые образуют крупноячеистую сеть;
- 2 – Структура тромбоцитарного сгустка более гетероморфна. Среди крупноячеистой сети фибриновых волокон визуализируются участки напоминающие паутину, в центре и в узловых соединениях которой находятся скопления тромбоцитов;
- 3 - Структура тромбоцитарно-лейкоцитарного сгустка отличается от таковой бесклеточного и тромбоцитарного сгустков. В тромбоцитарно-лейкоцитарном сгустке нити фибрина за счет сильной ретракции располагаются так плотно, что визуализируются не как волокна, а как сплошная гомогенная масса. Тромбоциты не визуализируются, что может быть связано с тем, что их экранирует плотноупакованный фибрин, или с тем, что в данном типе сгустка мембраны тромбоцитов разрушаются. Лейкоциты сохраняют свою привычную клеточную форму.

2.2.3 Исследование влияния бесклеточной и тромбоцитарной аутоплазмы на здоровую кожу крыс при внутрикожном введении

Как было описано в разделе «Обзор литературы» диссертации, для лечения разнообразной хирургической патологии плазму вводят под и вокруг патологического очага, после чего производят мониторинг состояния последнего. Однако, следует отметить, что введение дополнительной молекулярно-клеточной взвеси в толщу здоровой ткани не может не вызывать травмирующее воздействие. Исходя из данной предпосылки, было принято решение проверить, как реагирует здоровая кожа крыс на бесклеточную и тромбоцитарную аутологичную плазму при их введении внутрикожно в дозе 0,1 мл на инъекцию. С этой целью мы разделили животных на две группы по 10 голов в каждой. Первой группе животных вводили бесклеточную плазму. Второй группе животных вводили тромбоцитарную плазму. Для контроля на расстоянии одного-полутора мм от места введения плазмы вводили физиологический раствор хлорида натрия и раствор цитрата натрия. Места введения маркировали. Наблюдение вели в течение 10 суток. Через трое суток брали биопсийный материал, который после обработки и окрашивания микроскопировали, и анализировали полученный результат.

Результаты исследования показали, что у всех животных наблюдались признаки транзиторного воспаления, наиболее интенсивно выраженного на третьи-четвертые сутки. Однако, отчетливых макроморфологических различий не визуализировалось. В то же время, анализ гистологического материала показал, что на максимуме воспалительной реакции в коже животных, которым вводили бесклеточную плазму визуализировались истончение эпителия и обильный лейкоцитарный инфильтрат. Напротив, в коже животных, которым вводили тромбоцитарную плазму, лейкоцитарный инфильтрат хоть и был, но в очень незначительном количестве, и визуализировался только при значительном увеличении. В то же время, было отмечено, что у трех (30%) животных из группы, которой вводили тромбоцитарную плазму, патоморфологические изменения в коже были выражены гораздо сильнее и представлены не только очень сильной лейкоцитарной инфильтрацией, но и микроабсцессами. Ретроспективный анализ клеточного состава плазмы, введенной этим животным показал наличие в ней достаточно большое количество лейкоцитов.

2.2.4 Исследование влияния бесклеточной, тромбоцитарной и тромбоцитарно-лейкоцитарной плазмы на здоровую кожу крыс при подкожном введении

В вышеописанном эксперименте были получены предварительные данные о том, что в случае наличия лейкоцитов в плазме, обогащенной тромбоцитами, при ее введении в здоровые ткани может индуцироваться местная воспалительная реакция. С целью подтверждения или опровержения данной находки было проведено дополнительное исследование с несколькими измененными условиями эксперимента.

Для этого была приготовлена тромбоцитарная плазма с содержанием лейкоцитов близким по количеству к референтной величине цельной крови. По условиям эксперимента плазма вводилась в предварительно подготовленную кожную складку в дозе (0,1 мл на животное) как в предыдущем эксперименте.

С этой целью было сформировано три группы животных по 10 голов в каждой. Первой группе животных вводили бесклеточную плазму. Второй группе животных вводили тромбоцитарную плазму. Третьей группе животных вводили тромбоцитарно-лейкоцитарную плазму.

Оценку состояния кожи экспериментальных животных проводили ежедневно на протяжении семи дней. Биопсийный материал кожи для последующего гистологического исследования брали через одни, трое и семь суток после инъекции.

Введение бесклеточной плазмы индуцирует выраженный отек и экссудативный дерматит, максимально визуализируемый через трое суток, который постепенно затухает к седьмому-десятому дню (Рисунок 3 а, г).

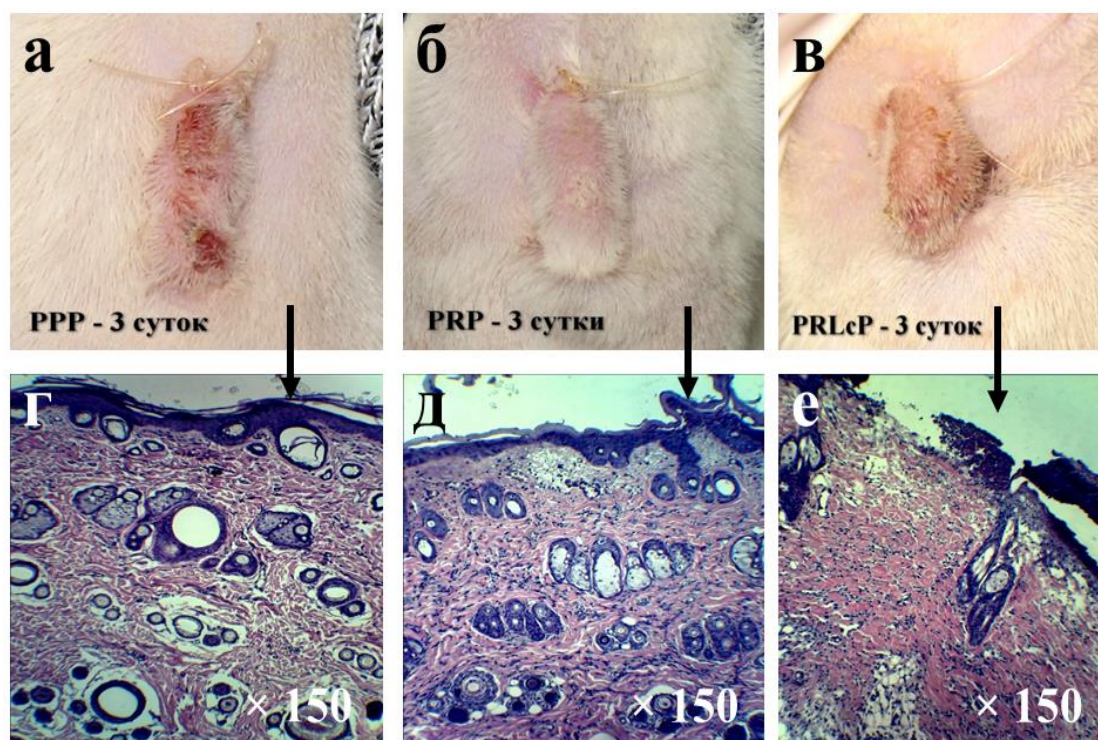


Рисунок 3 - Реакция кожного покрова крыс через 3 суток после введения различных образцов плазмы:

а; б; в – макроморфологическая картина; г; д; е – гистологическая картина в образце кожи в введенным PPP (плазма без тромбоцитов); (а; г) наблюдается выраженный отек дермы, гиперкератоз; (б; д) образец кожи после введения PRP (тромбоцитарная плазма) с незначительным отеком и небольшой лейкоцитарной инфильтрацией дермы; (в; е) образец кожи после введения PRLcP (тромбоцитарная плазма с лейкоцитами) с сильной лейкоцитарной инфильтрацией и некрозами в области дермы и эпидермиса. (Окраска гистологических

В случае введения в складку плазмы, обогащенной только тромбоцитами, уже через сутки также наблюдается незначительный отек, но без каких-либо кожных патологий. Признаки дерматита в этой группе не наблюдаются вплоть

до конца эксперимента. На протяжении всего периода наблюдения кожа складки остается такой же, как и кожа других областей тела подопытных животных (Рисунок 3 б, д).

Введение плазмы, в которой наряду с тромбоцитами присутствуют лейкоциты, индуцирует сильный воспалительный отек, который на третьи сутки переходит в экссудативно-некротический дерматит (Рисунок 3 в, е). В последующие дни в зоне введения наблюдаются как макро-, так и гистоморфологические признаки некроза.

Таким образом, полученные результаты исследования свидетельствуют о том, что: 1 – даже бесклеточная аутологичная плазма может обладать флогогенными свойствами и вызывать воспаление при ее местном введении; 2 – присутствие тромбоцитов подавляет развитие воспаления, индуцированного локальным введением плазмы; 3 – контаминация тромбоцитарной плазмы лейкоцитами гранулоцитарного и лимфоцитарного ряда может быть причиной развития сильной воспалительной реакции, приводящей к некрозу тканей.

2.2.5 Исследование эффективности различных образцов тромбоцитарной плазмы для лечения ожоговых ран у лабораторных крыс

С целью выяснения ранозаживляющей эффективности плазмы, обогащенной тромбоцитами, ее действие сравнивали с бесклеточной плазмой на модели ожоговой раны третьей степени. С этой целью было сформировано три группы животных по 10 голов в каждой. Контрольной группе животных лечения не проводили. Первой группе животных вводили бесклеточную плазму. Второй группе животных вводили тромбоцитарную плазму.

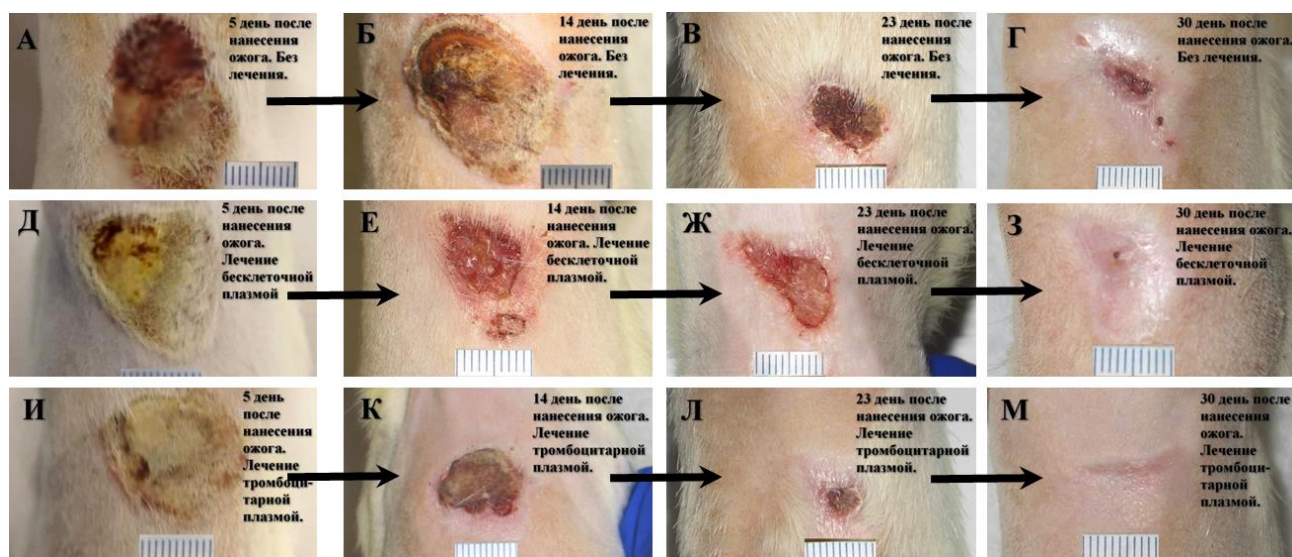


Рисунок 4 - Влияние бесклеточной и тромбоцитарной аутологичной плазмы на динамику заживления ожоговых ран у лабораторных крыс:

А, Б, В, Г – контрольные животные (Лечение не проводилось); Д, Е, Ж, З – бесклеточная плазма; И, К, Л, М – плазмы обогащенная тромбоцитами. Плазму вводили в дозе 0,1 мл каждые пять-семь дней, начиная с пятого дня после нанесения термической травмы. Визуальная оценка результата указана на 5, 14, 23 и 30 день после нанесения ожога.

Результаты проведенного эксперимента показали, что и бесклеточная и тромбоцитарная образцы плазмы при ее введении вокруг и под раневой дефект,

ускоряют образование рубца и эпителизацию в сравнении с нелеченым контролем. Однако, в случае применения тромбоцитарной плазмы (Рисунок 4 (И, К, Л, М) в сравнении с бесклеточной плазмой (Рисунок 4 (Д, Е, Ж, З)) контракция краев раневого дефекта и реорганизация рубца происходит быстрее. Таким образом к 30 суткам после нанесения ожоговой раны размер кожного рубца у животных контрольной группы, составлял $3,45 \pm 0,46 \text{ см}^2$. У животных опытной группы №1, лечение которым проводили инъецируя бесклеточную фибриновую плазму - $2,88 \pm 0,47 \text{ см}^2$. У животных опытной группы №2, лечение ожоговых ран которым проводили путем введения плазмы, обогащенной тромбоцитами - $0,24 \pm 0,07 \text{ см}^2$.

2.2.6 Исследование эффективности фибриновых сгустков различного клеточного состава для лечения резано-ожоговых ран у лабораторных крыс

Резано-ожоговую рану наносили в межлопаточной области скальпелем, нагретым в пламени газовой горелки до примерно $300,0^{\circ} \text{ C}$. Длина раны составляла 14,0 – 15,0 мм. Через трое суток после нанесения раны проводили биологическую (фермент трипсин) и хирургическую некрэктомию. После этого у одной группы крыс раны не ушивали (Контроль № 1). У второй группы крыс раны ушивали, но без внесения фибринового сгустка (контроль № 2). У третьей группы крыс раны ушивали, предварительно поместив в них тромбоцитарный сгусток (Опыт № 1). У четвертой группы крыс раны ушивали, предварительно поместив в них тромбоцитарно-лейкоцитарный сгусток (Опыт № 2).

Результаты проведенного исследования показали, что и тромбоцитарный, и тромбоцитарно-лейкоцитарный сгустки при их введении в раневой дефект ускорили контракцию краев раны и образование рубца, которые наблюдались уже на 14 день после некрэктомии (Рисунок 6 л, п) по сравнению с контролем № 1 и контролем № 2 (Рисунок 5 в, ж).

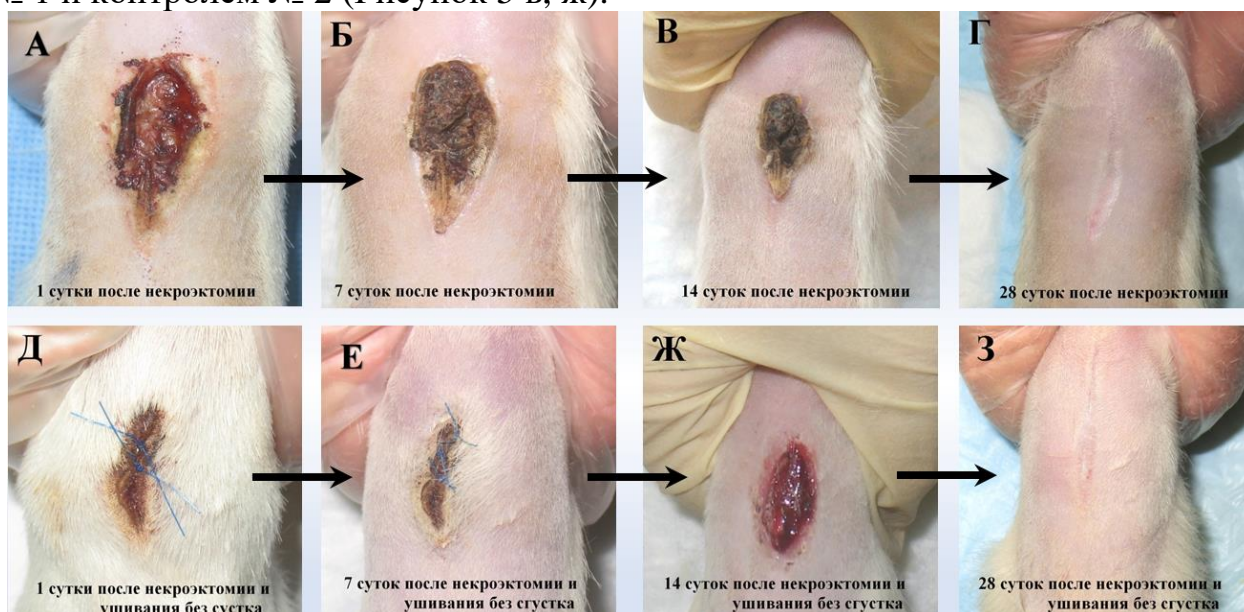


Рисунок 5 – Динамика заживления резано-ожоговой раны после некрэктомии:
А, Б, В, Г – без ушивания (Контроль 1); Д, Е, Ж, З – ушивание без сгустка (Контроль 2).

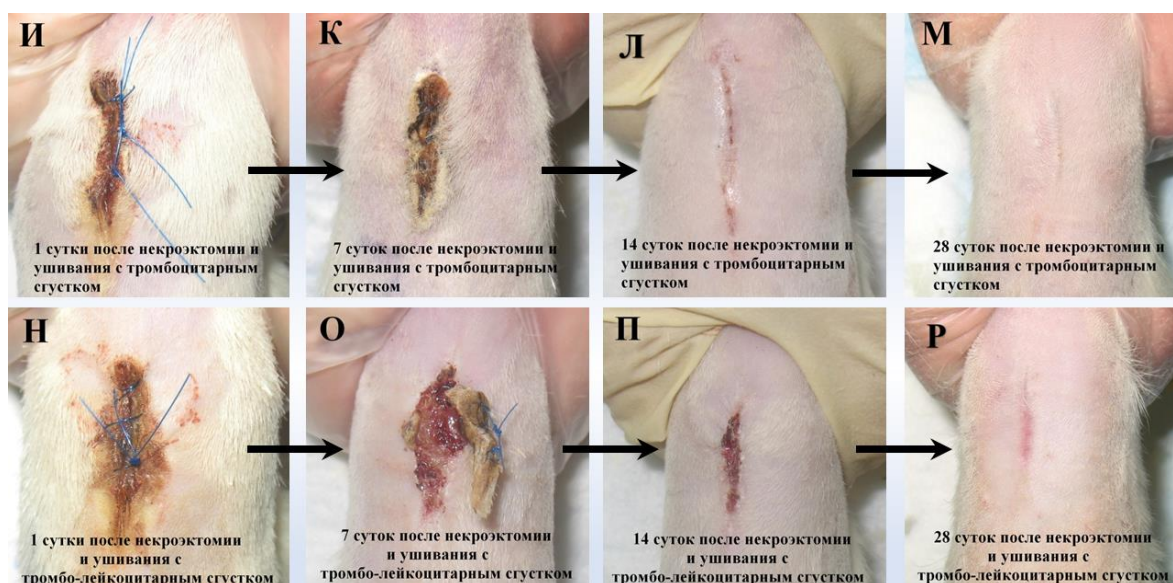


Рисунок 6 – Динамика заживления резано-ожоговой раны после некрэктомии:
И, К, Л, М – ушивание с тромбоцитарным сгустком (Опыт 1); Н, О, П, Р – ушивание с
тромбоцитарно-лейкоцитарным сгустком (Опыт 2).

К 28 дню во всех четырех группах раны зажили полностью. Однако, максимальное ремоделирование рубца отмечено в опытной группе №1, где был использован тромбоцитарный сгусток (Рисунок 6 м). В обеих контрольных группах на данный момент наблюдения рубец оставался более грубым с явными признаками атрофии волосяных фолликулов (Рисунок 5 г, з). Тромбоцитарно-лейкоцитарный сгусток, который был помещен в рану перед ее ушиванием (опытная группа № 2), к седьмому дню вызвал отторжение струпа, но без расхождения глубоких слоев кожи (Рисунок 6 о), как это наблюдалось в контрольной группе № 2 на 14 день (Рисунок 5 ж). Кроме этого, рубец, образовавшийся у животных опытной группы № 2 к 28 дню опыта, имел явные признаки избыточной васкуляризации, вследствие чего, в отличие от рубцов у других групп животных, имел ярко выраженный красный цвет.

2.2.7 Определение ранозаживляющей эффективности тромбоцитарной плазмы, тромбоцитарных и тромбоцитарно-лейкоцитарных сгустков при лечении ран различного этиопатогенеза у мелких домашних животных в условиях клиники

Результаты экспериментов проведенных на лабораторных крысах позволили сделать четыре основополагающих вывода:

1 – плазма, обогащенная тромбоцитами, при инъекции ее в здоровую ткань вызывает легкое транзиторное воспаления, а при её введение под и вокруг раневого дефекта ускоряет заживление последнего,

2 – тромбоцитарный сгусток, введенный в раневой канал, ускоряет контракцию краев раны и ремоделирование рубца,

3 – тромбоцитарно-лейкоцитарная плазма при её инъекции в здоровую ткань вызывает сильное воспаление сопровождающееся некрозом.

4 – тромбоцитарно-лейкоцитарный сгусток, введенный в раневой канал, обладает микробоцидным действием, индуцирует воспалительную реакцию, но ускоряет процесс очищения раны.

Эти четыре вывода стали основой для разработки схемы (Рисунок 7) лечения ран с использованием тромбоцитарной плазмы и тромбоцитарных и тромбоцитарно-лейкоцитарных сгустков основываясь на их (ран) этиопатогенезе. Эффективность предложенной схемы лечения была проверена при лечении мелких домашних животных в условиях ветеринарной клиники.

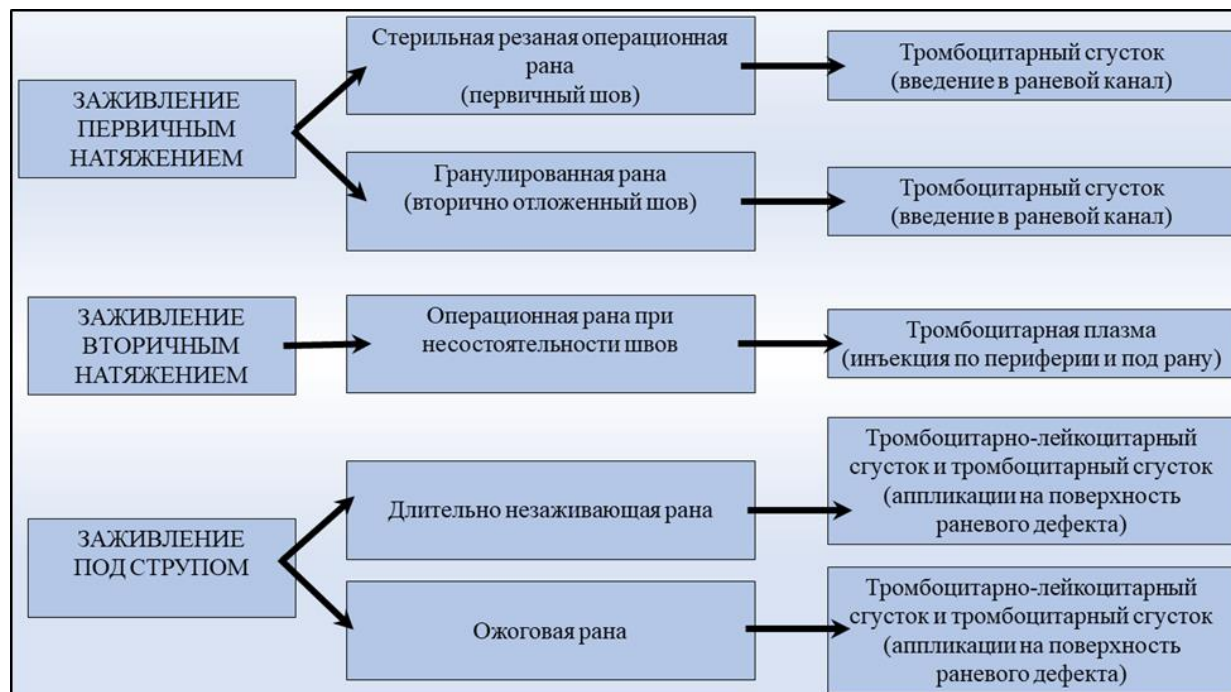


Рисунок 7 – Способ применения тромбоцитарной плазмы и тромбоцитарного или тромбоцитарно-лейкоцитарного сгустков в зависимости от этиопатогенеза раны.

2.2.8 Заживление гранулирующей раны по первичному натяжению после хирургической обработки, введения в раневой канал тромбоцитарного сгустка и наложения вторичных швов

Исследования проводились на животных в процессе оперативного лечения ран с патологическими грануляциями. До оперативного вмешательства у животного проводили забор крови и выполняли процедуры по выделению тромбоцитарной плазмы и приготовлению тромбоцитарного сгустка. Непосредственно в период операции проводили ферментативную и оперативную некроэктомию. По окончании основной части оперативного вмешательства сгусток закладывали в раневой дефект и проводили ушивание раны. Результаты исследования показали, что эффективность данного лечения аналогичны тем, которые наблюдаются при лечении стерильной резаной раны.

Также исследования проводились на животных с наличием ран, состояние которых было несовместимо с заживлением по первичному натяжению, в частности ран, образовавшихся вследствие несостоятельности хирургических швов. На фоне системного лечения у животных каждые пять-семь дней проводили забор крови и выполняли процедуры по выделению тромбоцитарной плазмы. Плазму, обогащенную тромбоцитами, сразу после приготовления инъецировали по периферии и под раневой дефект. Результаты исследования показали, что уже через 24-48 часов исчезают признаки

аутолизиса тканей краев раны и выражена их контракция. Интенсивно идет образование первичного пролиферата. Рана заживает в относительно быстрые сроки и без образования грубого рубца.

Кроме того, исследования проводились на животных с наличием ран, состояние которых было несовместимо с заживлением по первичному натяжению, а заживление по вторичному натяжению замедляло наличие некротизированной ткани, в частности ожоговых ран. На фоне системного лечения у животных каждые пять-семь дней проводили забор крови и выполняли процедуры по выделению тромбоцитарно-лейкоцитарной или тромбоцитарной плазмы. Из полученной плазмы готовили сгустки, которые методом аппликации наносили на поверхность раны. Результаты исследования показали, что под действием сгустков, обогащенных лейкоцитами, быстро происходило очищение раны от некротизированной ткани и образовывалась молодая грануляционная ткань. Замена на этой стадии лечения тромбоцитарно-лейкоцитарного сгустка на тромбоцитарный приводило к быстрой эпителизации раны и ремоделированию рубца.

2.2.9 Лечение длительно незаживающей раны

Исследования проводились на животных с наличием длительно незаживающих ран идиотипической этиологии. На фоне системного лечения у животных каждые пять-семь дней проводился забор крови и выполнялись процедуры по выделению тромбоцитарно-лейкоцитарной или тромбоцитарной плазмы. Из полученной плазмы готовили сгустки, которые методом аппликации наносили на поверхность раны. Результаты исследования показали, что под действием сгустков, обогащенных лейкоцитами, уменьшалась воспалительная реакция, происходило очищение раны, начинались процессы гранулирования и краевой эпителизации. На стадии появления молодой грануляционной ткани лечение продолжали путем аппликации тромбоцитарного сгустка, что индуцировало быстрое ремоделирование рубца и эпителизацию раны.

Заключение

Результаты проведенных исследований, показали, что чистые бесклеточные, тромбоцитарные и тромбоцитарно-лейкоцитарные образцы плазмы крови и фибриновые сгустки по разному действуют на неповрежденные ткани и на раневой процесс. Данные отличия следует учитывать при лечении раневых повреждений различного этиопатогенеза. Выше сказанное можно подытожить в следующих выводах:

1. Бесклеточная и тромбоцитарно-лейкоцитарная аутологичные образцы плазмы могут обладать флогогенными свойствами и вызывать местное воспаление, вплоть до некроза при их внутрикожном или подкожном введении крысам линии «Вистар». Введенная внутрикожно или подкожно бесклеточная плазма оказывает местный травмирующий эффект, который возникает в результате повышенного межтканевого давления, а фибрин, присутствующий в плазме, является паттерном повреждения. Тромбоцитарно-лейкоцитарная

плазма, в свою очередь, вызывает воспалительную реакцию за счет присутствия в ней лейкоцитарных медиаторов воспаления – провоспалительных цитокинов;

2. Тромбоцитарная плазма при ее внутрикожном или подкожном введении крысам вызывает только транзиторное быстропроходящее легкое воспаление. Данное явление наблюдается в результате наличия тромбоцитов в аутоплазме, которые не вызывает транзиторное воспаление;

3. Тромбоцитарная плазма при ее введении вокруг и под раневой дефект крысам линии «Вистар» ускоряет образование рубца и эпителизацию;

4. Основные структурные и клеточные элементы тромбоцитарно-лейкоцитарного сгустка обладают микробицидными свойствами. Нити фибрина формируют сеть для фиксации микроорганизмов. Тромбоциты в процессе адгезии друг к другу и к нитям фибрина создают вокруг микроорганизмов капсулы и участвуют в их лизисе. Лейкоциты осуществляют окончательный клиринг путем фагоцитоза;

5. Тромбоцитарные сгустки, приготовленные из цитратной плазмы, ускоряют заживление раны по первичному натяжению и профилактируют несостоятельность швов в случае помещения их (сгустков) в раневой канал перед наложением швов;

6. Тромбоцитарно-лейкоцитарные сгустки, приготовленные из цитратной плазмы, в случае помещения их в раневой канал ускоряют очищение раны и ее грануляцию, но замедляют реорганизацию рубца;

7. Тромбоцитарно-лейкоцитарные сгустки, нанесенные в виде аппликаций, ускоряют очищение (осуществляют биологическую некроэктомию) ожоговых и длительно незаживающих ран;

8. Тромбоцитарные сгустки, нанесенные в виде аппликаций, ускоряют заживление ожоговых и длительно незаживающих ран прошедших, стадию очищения и находящихся на стадии пролиферации.

Практические предложения

1. При использовании такого метода регенеративной ветеринарной медицины как PPP (плазма с пониженной концентрацией тромбоцитов) или PRP (тромбоцитарная плазма) следует обязательно проверять на присутствие лейкоцитов в образце плазмы, предназначенном для введения. При наличии таковых, данный образец плазмы не следует использовать, так как он может обострить воспалительный процесс и удлинить сроки заживления раны.

2. Наиболее простой и эффективный способ получения тромбоцитарной плазмы (кроме крови лошадей) состоит в том, что: 1 - в качестве антикоагулянта используется цитрат натрия; 2 – используется центрифуга с бакетным ротором; 3 -центрифугирование проводится двустадийно. Сначала проводится кратковременное (одна-две минуты) при 3000 об/мин и затем сразу 10 минут при 1000 об/мин.

4. Столбик крови в центрифужной пробирке должен быть не менее восьми сантиметров.

3. Для получения тромбоцитарной плазмы из малых объёмов крови (одного мл) следует вместо центрифужной пробирки использовать инсулиновый шприц для получения столбика крови в восемь сантиметров.

4. Для получения тромбоцитарной плазмы из крови лошадей целесообразно пробирки с кровью оставить на 60-90 минут для естественного осаждения эритроцитов скоростью оседания, которая у лошадей очень высокая. Плазма, полученная естественным путем, содержит кроме тромбоцитов и лейкоциты, которые устраняют путем центрифугирования в течение пяти минут при 1000 об/мин.

5. Чистые фибриновые, тромбоцитарные и тромбоцитарно-лейкоцитарные сгустки можно приготовить только из плазмы, полученной из крови, стабилизированной цитратом натрия путем добавления в нее (плазму) эквивалентного количества хлорида кальция. Плазма, полученная из проб крови стабилизированной ЭДТА и гепарином, не образует сгустков даже после добавления ингибиторов данных антикоагулянтов – кальций и протамин соответственно. Для получения фибринового сгустка из кошачьей плазмы в ней должно содержаться небольшое количество тромбоцитов.

6. Для ускорения заживления операционной раны по первичному натяжению, а так же для профилактики несостоятельности швов непосредственно перед наложением последних целесообразно вводить в раневой канал тромбоцитарный сгусток.

7. В условиях невозможности определения точного клеточного состава полученного образца плазмы, применение сгустков в виде аппликаций предпочтительнее, чем плазмы, так как исключает вероятность обострения воспалительного процесса, индуцируемого присутствующими лейкоцитами.

8. При лечении длительно незаживающих и ожоговых ран следует сначала вплоть до очищения поверхности раны и до проявления отчетливых признаков грануляций использовать в виде аппликаций тромбоцитарно-лейкоцитарные сгустки. А затем вплоть до полной эпителизации раны тромбоцитарные сгустки.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Исходя из результатов проведённых исследований, перспективой для дальнейшей разработки темы является:

1. Точное определение того количества лейкоцитов, присутствие которого в плазме, обогащенной тромбоцитами и предназначенной для PRP-терапии может вызывать осложнения в виде обострения воспалительного процесса или приводить к возникновению очаговых некрозов;

2. Точное определение роли мононуклеарных лейкоцитов и гранулоцитарных лейкоцитов как в негативных эффектах при применении PRP-терапии, так и позитивных эффектах при использовании лейкоцитарно-тромбоцитарных сгустков в виде аппликаций при лечении гнойно-некротических ран;

3. Возможность усиления терапевтического/ранозаживляющего эффекта плазмы, обогащенной тромбоцитами и лейкоцитарно-тромбоцитарных сгустков

за счет внесения ксеногенных или биогенных активаторов, обладающих иммуно тропными свойствами.

**Список работ, опубликованных по теме диссертации
Публикации в рецензируемых журналах согласно перечню ВАК
Российской Федерации**

1. Бокарев, А. В. Гистологическое исследование микробоцидной функции структурных сгустков и клеточных компонентов кровяного сгустка / А. В. Бокарев, А. А. Стекольников, М. В. Свердлова, Е. В. Горохов, А. О. Минина, Р. Д. Холодный // Ветеринарный фармакологический вестник. – Санкт-Петербург, 2022. – № 1. – С. 162-178.

2. Свердлова, М. В. Влияние бесклеточной и тромбоцитарной плазмы на заживление ожоговой раны у крыс / М. В. Свердлова, А. А. Стекольников, А. О. Минина, А. В. Бокарев // Международный вестник ветеринарии. – Санкт-Петербург, 2022. – № 2. – С. 121-126.

3. Бокарев, А. В. Влияние лейкоцитарной примеси на ранозаживляющий эффект тромбоцитарного сгустка / А. В. Бокарев, М. В. Свердлова, А. О. Минина, Р. Д. Холодный // Международный вестник ветеринарии. – Санкт-Петербург, 2022. – № 4. – С. 427-433.

Статьи в изданиях, индексируемых в базах научного цитирования Scopus

1. Sverdlova, M. Morphology of Fibrin and Fibrin-Platelet & Fibrin-Platelet-Leukocyte Clots / M. Sverdlova, A. Bokarev, A. Stekolnikov, A. Minina, K. Sidorenko // International Transaction Journal of Engineering, Management and Applied Sciences and Technologies. 2021. – Т. 12. – № 7. – p. 12A7N.

2. Sverdlova, M. Effect of Anticoagulant Type and Centrifugation Speed On Platelet-Rich Plasma of Cats and Dogs Blood / M. Sverdlova, A. Zakharov, A. Stekolnikov, A. Bokarev, M. Narusbaeva // EurAsian Journal of BioSciences. 2020. – Т. 14. – № 2. – p. 7589-7593.

Статьи в сборнике научных трудов

Бокарев, А. В. Моделирование раневого процесса на лабораторных крысах / А. В. Бокарев, М. В. Свердлова // Материалы национальной научной конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов СПбГУВМ, – Санкт-Петербург, 2021. – С. 8-9.

Патент Российской Федерации на изобретение

Патент на изобретение RU 2789518 С1 Российская Федерация. Способ получения плазмы, обогащенной тромбоцитами, из малых объемов крови заявл.13.05.2022, опубл. 06.02.2023. Бюл. №4 / Стекольников А. А., Бокарев А. В., Горохов В. Е., Минина А. О., Свердлова М. В., Захаров А. Ю. заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины ФГБОУ ВО СПбГУВМ.