

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего  
образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной  
медицины»

На правах рукописи

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

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель –  
доктор ветеринарных наук  
Бокарев Александр Владимирович

Санкт-Петербург – 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	11
1.1 Общая характеристика ран и раневого процесса у животных .....	11
1.2 Классификация ран .....	12
1.3 Патогенез раневого процесса и его исходы .....	12
1.4 Методы исследования раневого процесса .....	16
1.5 Рутинные общепринятые подходы и методы лечения ран .....	18
1.6 Лечение ран с использованием методов регенеративной медицины .....	20
1.7 Использование тромбоцитарной плазмы и тромбоцитарных сгустков для лечения ран .....	23
1.8 Способы получения тромбоцитарной плазмы и тромбоцитарных сгустков .....	26
1.9 Недостатки и осложнения лечения ран тромбоцитарной плазмой и тромбоцитарными сгустками .....	29
2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	32
2.1 Материалы и методы исследования .....	32
2.2 Результаты собственных исследований .....	36
2.2.1 Отработка и усовершенствование метода получения тромбоцитарной плазмы из крови животных .....	36
2.2.2 Отработка и усовершенствование метода получения тромбоцитарных сгустков из крови животных .....	44
2.2.3 Исследование <i>in vitro</i> микробоцидной роли основных клеточных и молекулярных компонентов кровяного сгустка .....	48
2.2.4 Влияние различных образцов цитратной аутоплазмы на здоровую кожу крыс .....	55
2.2.4.1 Исследование влияния бесклеточной и тромбоцитарной аутоплазмы на здоровую кожу крыс при внутрикожном введении .....	55
2.2.4.2 Исследование влияния бесклеточной, тромбоцитарной и тромбоцитарно-лейкоцитарной плазмы на здоровую кожу крыс при подкожном введении .....	58
2.2.5 Влияние различных образцов цитратной аутологичной плазмы на поврежденную кожу лабораторных крыс .....	62
2.2.5.1 Исследование эффективности различных образцов тромбоцитарной плазмы для лечения ожоговых ран у лабораторных крыс .....	63

2.2.5.2 Исследование эффективности фибриновых сгустков различного клеточного состава для лечения резано-ожоговых ран у лабораторных крыс .....	68
2.2.6 Определение ранозаживляющей эффективности тромбоцитарной плазмы, тромбоцитарных и тромбоцитарно-лейкоцитарных сгустков при лечении ран различного этиопатогенеза у мелких домашних животных в условиях клиники .....	71
3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	78
3.1 Обсуждение результатов исследований .....	79
3.2 Выводы .....	89
3.3 Практические предложения .....	90
3.4 Перспективы дальнейшей разработки темы .....	92
4. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	93
5. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	94

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы.** Лечение ран остается актуальной проблемой как для гуманной, так и для ветеринарной медицины [1, 30]. Регенерация тканей и ускорение заживления ран являются объектами значительной части научных исследований. Актуальность темы обусловлена значительным количеством пациентов с ранами различного генеза. К ним относятся пациенты с острыми и хроническими термическими, механическими, химическими, лучевыми, аутоиммунными повреждениями кожного покрова, которые требуют незамедлительного и эффективного лечения современными методами. Надлежащая диагностика и лечение необходимы для ускорения заживления ран и предотвращения дальнейших осложнений [37]. Стоит отметить, что традиционные методы лечения и диагностики хронических ран показали ограниченную эффективность [30]. Следовательно, существует необходимость в разработке диагностических и терапевтических инноваций в лечении ран.

В последние годы научно-технический прогресс способствует изучению, созданию и внедрению в клиническую практику новых перспективных методов лечения ран, основанных на использовании биотехнологий. Наиболее перспективным направлением в этой области считается применение методов регенеративной медицины. Данные методы направлены на то, чтобы максимально быстро обеспечить регенерацию поврежденной в следствии ранения ткани с максимальным восстановлением тканеспецифичности, то есть по типу реституции. К таким методам относятся инъекции тканеспецифических факторов роста, а также введение в область тканевого дефицита стромально-васкулярных клеточных фракций или мезенхимальных стволовых клеток. Но наиболее доступным методом является использование плазмы крови, обогащенной тромбоцитами. По современным представлениям тромбоциты являются источником большого количества биологически активных веществ, которые обладают противовоспалительным, микробоцидным и митогенным действиями [24].

Немаловажным является их высокая концентрация в области повреждения для оказания выраженного ранозаживляющего эффекта.

На сегодняшний день имеется широкий арсенал средств, которые применяются для очищения ран в первой фазе заживления. Однако, препаратов, которые бы влияли на процесс грануляции и эпителизации тканей, недостаточно. Актуальность научной работы связана с исследованием передовых методов в лечении ран различного генеза, обладающих атравматическими свойствами и способными значительно ускорить процесс регенерации тканей с восстановлением их функций.

Многими учеными с давних времен изучается вопрос применения плазмы, обогащённой тромбоцитами, для лечения различных патологий в организме животных. Помимо основной роли в регуляции гемостаза в организме животных они также являются промежуточным звеном в процессе заживления поврежденной ткани благодаря способности выделять из своих  $\alpha$ -гранул факторы роста. Тромбоциты содержат пулы хранения для различных видов факторов роста. Также источником цитокинов, хемокинов и многих других белков, по-разному вовлеченных в стимулирование хемотаксиса, пролиферацию клеток и созревание, модуляцию подстрекательских молекул и привлечение лейкоцитов, являются альфа-гранулы [122]. В настоящее время изучается влияние тромбоцитарной плазмы на различные патологии в организме. Так, внедрение методов лечения плазмой и сгустками, обогащёнными тромбоцитами, нашло применение в ортопедии, стоматологии и регенерации мягких тканей. Тем не менее, отсутствует информация по оптимальным методам получения тромбоцитарной плазмы для разных видов животных, о влиянии на здоровые или поврежденные ткани таких образцов плазмы, которые не содержат тромбоциты или в которых дополнительно присутствуют лейкоциты; не определены критерии, в соответствии с которыми следует использовать в качестве индуктора регенерационных процессов тромбоцитарную плазму или тромбоцитарный сгусток; недостаточно данных о влиянии тромбоцитарной плазмы и тромбоцитарных сгустков на заживление ран в зависимости от различий в их этиопатогенезе. 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 для 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 исследования.** 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 внутрикожном 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.** 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 на 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 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 здорового кожного покрова, находящегося в процессе

заживления после экспериментального повреждения. Получены данные о том, что основные компоненты кровяного сгустка такие, как фибрин, тромбоциты и лейкоциты вместе, а также 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 исследования.** 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 апробации 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.** Диссертационная работа включает в себя результаты исследований, проведенных 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. Также были изучены механизмы влияния плазмы с различным клеточным составом (обогащенная тромбоцитами плазма, тромбоцитарно-лейкоцитарная плазма, и фибриновая плазма без тромбоцитов) на здоровую и на поврежденную кожу лабораторных крыс.

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.

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Общая характеристика ран и раневого процесса у животных

Раной называют повреждение тела животного или человека травмирующим фактором, которое в обязательном порядке сопровождается нарушением целостности покровных тканей, а именно: кожи или слизистых оболочек [1, 3, 101, 141]. Клиническими признаками раневой патологии принято считать зияние кожи или слизистых, боль и кровотечение [1, 10, 15, 109]. Кожа является естественным защитным механизмом организма, который при повреждении перестает выполнять свою функцию в полном объеме [1]. Так, в очаг повреждения может попасть бактериальная микрофлора, которая существенно затруднит процесс восстановления. Поверхностные повреждения кожи или слизистой оболочки называют ссадинами или царапинами [161].

Учитывая, что при ранах помимо местного повреждения тканей возникают и общие нарушения в организме (лихорадка, интоксикация и др.), то введено понятие раневая болезнь. В это понятие включен весь симптомокомплекс местных и общих повреждений в организме животных. Ряд авторов выделяют структурные элементы ран. Так различают края, стенки, дно и полость раны. Поврежденная кожа с подкожной клетчаткой образует края раны, а стенки выделяются мышцами, фасциями и расположенной между ними рыхлой клетчаткой. Дно раны представляет собой наиболее глубокую ее часть. Границы раневой полости идут по дну и стенки раны. Длинное расстояние между стенками раны получило название раневого канала [1].

Наличие болевой реакции при ранах возникает на фоне повреждения нервных окончаний. Болевая реакция чаще всего зависит от силы и характера повреждающего действия, но также на степень боли может повлиять состояние нервной системы (реактивности) животного. Так при повреждениях кожи, надкостницы, брюшины или плевры, которые в значительной степени содержат нервные окончания, болевая реакция будет сильной. При повреждении менее иннервированных участков боль будет значительно ниже. Сила ранения напрямую

зависит от предмета, которым было нанесено повреждение, а также от его остроты [28].

## **1.2 Классификация ран**

По происхождению раны принято подразделять на хирургические (операционные), которые наносятся с целью лечения, и на случайные, которые возникают у животного вопреки воле владельца или врача [14, 18, 28, 35, 58, 92, 94, 95, 121, 123, 128, 131].

Так же раны принято классифицировать по: виду повреждающего фактора (механические, термические, химические, лучевые, комбинированные и трофические язвы, возникающие вследствие хронического давления); по локализации (головы, шеи, туловища и конечностей, внутренних органов и сочетанные); по характеру повреждения (резаные, колотые, ушибленные, размозженные, рваные, рубленые, укушенные, огнестрельные); по характеру раневого канала (сквозные, слепые и касательные); по отношению к полостям тела (проникающие и непроникающие, с повреждением или без повреждения внутренних органов). В зависимости от времени от возникновения и до оказания квалифицированной помощи раны подразделяют на: свежие (не более 24 часов); поздние (более 24 часов). По степени обсемененности все раны делятся на: асептические и контаминированные. В зависимости от фаз раневого процесса и характера течения выделяют гранулирующие, гнойно-некротические, длительно незаживающие и другие раны [1, 3, 4, 8, 9, 10, 18, 20, 29, 30, 33, 55, 72, 76, 88, 133, 153, 155].

## **1.3 Патогенез раневого процесса и его исходы**

Вне зависимости от этиологии и морфологического характера ран при их заживлении прослеживается определенная закономерность [15]. В соответствии с этим раневой процесс принято делить на три фазы (Рисунок 1) [1, 9, 20, 33, 109]. Однако, продолжительность каждой фазы в отдельности и всего процесса

заживления раны в целом зависит от массы факторов. С одной стороны скорость и качество заживления зависят от состояния самой раны, а с другой - от состояния организма, которому рана была нанесена [3, 4, 8, 10, 11, 20, 30, 43, 47, 56, 89, 96, 115, 128, 131].

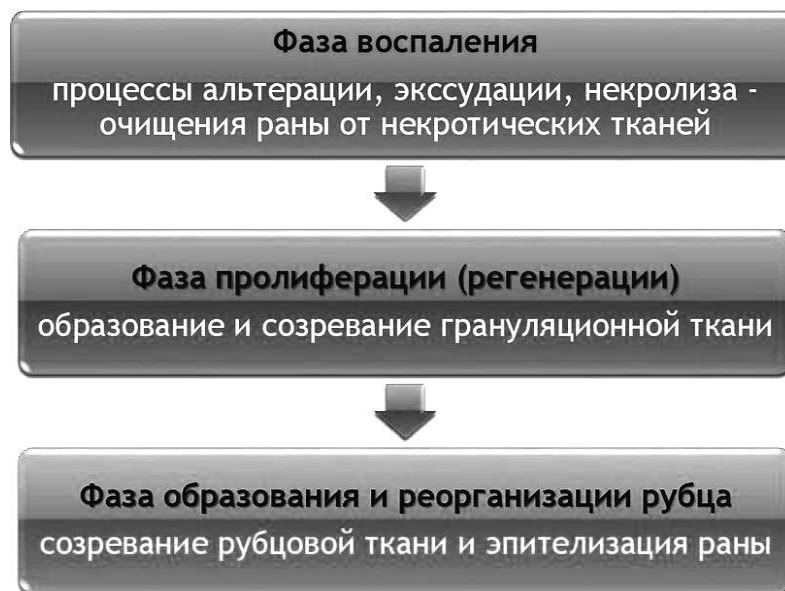


Рисунок 1 – Фазы раневого процесса.

Обе эти составляющие, состояние раны и состояние макроорганизма, определяют то, как рана будет заживать. В современной хирургии принято рассматривать четыре вида заживления ран: первичным натяжением, задержанным первичным, вторичным натяжением, под струпом [1, 15, 18, 20, 29, 33, 35, 40, 41, 48, 60, 71, 101, 109].

Заживление первичным натяжением - это заживление без нагноения, но с образованием тонкого рубца. Оно происходит в стерильных ранах с ровными краями (например операционные раны).

Задержанное первичное (заживление по типу первичного натяжения) - это также заживление без гнойного воспаления, но при несколько отсроченном наложении швов.

Заживление вторичным натяжением - типичное заживления после самоочистения раны путем гнойного воспаления и последующим развитием грубого соединительнотканного рубца. По такому типу заживают инфицированные

раны и кожные патологии, имеющие обширные дефекты тканей, не допускающие первичного сопоставления краев раны.

Заживление под струпом происходит в скарифицированных ранах при сохраненном базальном слое кожи, поэтому такие раны заживают без образования рубца. Быстрая регенерация эпидермиса происходит благодаря тому, что струп, состоящий из фибрина и форменных элементов крови, защищает базальные клетки и стимулирует их пролиферацию и дифференцировку.

Вне зависимости от того, по какому типу заживает рана, в основе этого процесса лежит определенный стандартный алгоритм: 1 – в ране должно остановиться кровотечение, 2 – рана должна очиститься от погибших и нежизнеспособных клеток и поврежденного внеклеточного матрикса, а так же микрофлоры, находящейся в ране, 3 – раневой дефект должен заполниться пролиферирующими клетками, предшественниками фибробластов, эндотелиоцитов и других, 4 – первичный пролиферат должен реорганизоваться и покрыться эпителием, то есть приобрести тканеспецифичность (Рисунок 1, 3) [3, 4, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 18, 20, 28, 29, 33, 35, 52, 55, 66, 71, 74, 76, 77, 82, 125, 129, 145, 150, 153].



Рисунок 2 – Фазовый алгоритм раневого процесса от повреждения до заживления.

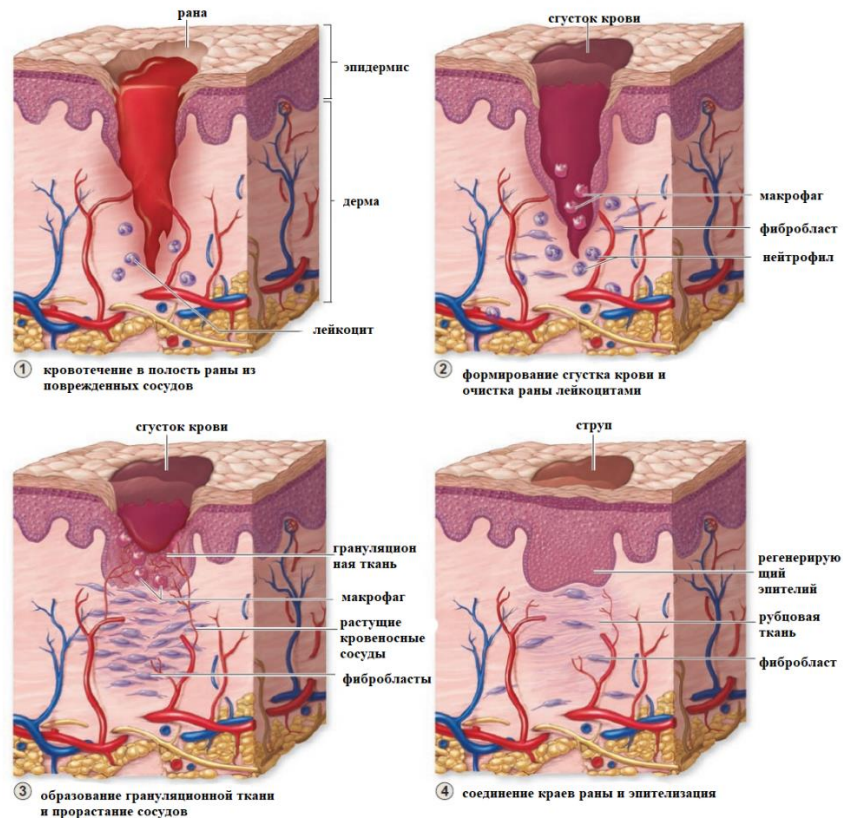


Рисунок 3 – Динамика морфологических изменений раны в процессе заживления.

Скорость заживления раны может сильно варьировать в зависимости от: места локализации раны, ее размера, степени повреждения окружающих тканей, количества некротизированных тканей, состояния организма животного и его возраста. Наиболее быстро заживают раны первичным натяжением. Этот процесс длится 7 – 10 суток. Заживление ран вторичным натяжением может продолжаться более 14 суток.

Если рана не заживает в упорядоченный набор стадий, и в предсказуемый промежуток времени, обычного для заживления повреждений подобного типа, или локализации, то такие раны называют хроническими или ДНР (длительно незаживающими ранами) [20, 30, 47, 89, 96]. Хронические/ДНР раны часто остаются в стадии воспаления слишком долго. При острых ранах существует точный баланс между производством и деградацией клеток. При хронических ранах этот баланс теряется и деградация идет с одной скоростью или быстрее, чем пролиферация и синтез [34, 40, 48, 71, 72, 82, 90, 145]. Чтобы преодолеть эту стадию

и запустить процесс заживления, необходимо учитывать ряд таких факторов, как бактериальная нагрузка, наличие некротизированных тканей и баланс влаги во всей ране [112, 120, 123, 124, 125, 126, 137, 138, 141, 144]. Хронические раны могут никогда не заживать или на это могут уйти годы. В связи с этим, активно изучается влияние плазмы, обогащенной тромбоцитами при лечении ран различного происхождения, в том числе длительно не заживающих.

#### **1.4 Методы исследования раневого процесса**

В ветеринарной медицине применяют различные методы для определения стадии раневого процесса, наличия раневой инфекции и оценки степени заживления раны. Существуют как субъективные, так и объективные методы исследования раневого процесса.

К субъективным методам оценки течения раневого процесса относят такие признаки, как нормализация температуры тела, уменьшение воспалительных явлений, очищение раны и появление грануляций, по началу эпителизации, а также по данным гемограммы [13]. Предложено множество методов для объективизации клинических данных и отслеживанию скорости заживления ран. Планиметрический метод – тест Л. Н. Поповой, наиболее часто применяемый. Для выполнения метода на раневую поверхность накладывают стерильный лист целлофана, обрисовывают контуры раны чернилами, затем накладывают целлофан с обрисованными контурами на миллиметровую бумагу с целью определения размера раны путем подсчета количества квадратных миллиметров внутри контура. На следующий день аналогичным образом проводят измерение. Так вычисляют процентное соотношение уменьшения поверхности раны за сутки по отношению к предыдущему показателю. Контакт пленки с раневой поверхностью является существенным осложнением при выполнении метода ввиду болезненности процедуры, а также применением довольно сложной математической формулы. Кроме размеров дефекта, при оценке течения раневого процесса кожи, необходимо определить динамику уменьшения отека, признаков



перифокального воспаления по краям раны, скорость эпителизации. Значительно усложняет эту методику и занимает большое количество времени изучение и сравнение данных параметров. С целью облегчения описанного метода некоторые авторы применяют фотографирование ран с сеткой (1 см<sup>2</sup> сетки разделен на 25 квадратов по 1 мм<sup>2</sup>). Для определения площади некроза кожи при осложненном воспалении применяют инновационный метод цифровой идентификации раневых поверхностей. Метод осуществляется с помощью цифровой фотокамеры. Так делаются снимки поврежденного участка кожи с последующей загрузкой материалов в электронное устройство. На компьютере применяют программу GNU Image Manipulation Program, которая предназначена для создания и обработки растровой графики, частично поддерживающая работы с векторной графикой. Выполняется фотосъемка поврежденного участка кожи, предварительно разместив рядом с повреждением сантиметровую ленту или полоску размером, или делениями. Для определения площади перифокального воспаления находят общую площадь воспаления, которая состоит из суммы площадей зоны некроза и зоны перифокального воспаления, тем же способом из значения общей площади вычитают площадь повреждения кожи.

Применение в лечебной практике описанного метода повышает точность измерения площади повреждения кожи. Ежедневное определение площади перифокального воспаления делает возможным объективно оценивать эффективность консервативного лечения и, при необходимости, предоставляет возможность своевременного изменения схемы лечения.

Также для исследования раневого процесса определяют динамику клинимоρφологических показателей. Одним из методов оценки наличия патогенной микрофлоры в области повреждения является бактериологическое исследование [54]. При этом, важна оценка качественных и количественных параметров микрофлоры в ране. Наиболее точными считаются цитологический и гистологический методы. Образцы окрашивают, как правило, в двух вариациях – по Романовскому–Гимзе, и гематоксилином и эозином. Для определения числа клеточных элементов в поле зрения с указанием типа цитограммы применяют

метод окрашивания по Романовскому-Гимзе [29]. Картину объективизируют с помощью регенеративно-дегенеративного индекса с учетом взаимодействия лейкоцитарных элементов. Для гистологического исследования подходят окрашивания как одним, так и другим представленными методами. Для определения местной температуры в очаге воспаления применяют как точечную электротермометрию с применением термометра, так и диагностику при помощи тепловизора. Так представляется возможным оценка температурного режима в разных областях раны и сопоставление ее с окружающими неповрежденными тканями, а также отслеживание динамики по ее снижению или повышению.

### **1.5 Рутинные общепринятые подходы и методы лечения ран**

Представления о лечении ран прошли три основных этапа. Каждый из этапов не опровергает, а дополняет предыдущий.

I этап. Теория влажного заживления ран. Показано преимущество заживления раны в условиях влажной среды по сравнению с сухой повязкой. Появление новых перевязочных материалов, мазей на гидрофильной основе. Снижение роли липофильных субстанций.

II этап. Дифференцированный подход к лечению ран согласно стадии раневого процесса. Выбор метода лечения ран в зависимости от этиологии и стадии раневого процесса. Появление современных перевязочных средств. Начало применения к ранам технологий генной инженерии, биосинтетических аналогов кожи.

III этап. Теория обработки основания раны заключается в необходимости перевода хронической раны в острую. Открытие высокого уровня протеаз в экссудате и фенотипической несостоятельности клеток основания и краёв хронических ран. Таким образом, на современном этапе по отношению к ранам, не заживающим в течение более двух недель, рекомендуется следующая стратегия: хирургическая обработка – некрэктомия; адекватное дренирование; ведение раны с влажной средой; использование оптимальных антисептиков; отказ от

цитотоксических средств; использование современных перевязочных средств согласно стадиям раневого процесса; транспорт в рану необходимых веществ при помощи мазей и перевязочного материала; использование дополнительных средств с доказанной эффективностью для лечения ран. Некрэктомия выполняется с анестезией в стационаре с соблюдением асептики и антисептики с целью перевода хронической раны в острую [52]. Экссудация значительно сокращается и можно получить адекватный материал для микробиологического исследования.

Восстановление в кратчайшие сроки является целью лечебных мероприятий [1, 15, 30, 76]. Для того, чтобы добиться поставленной цели, необходимо остановить кровотечение, предупредить развитие раневой инфекции или подавить уже возникший инфекционный процесс в ране, при наличии соответствующих показаний и условий выполнить частичное или полное восстановление нарушенных и анатомических соотношений тканей [1, 10, 67]. Лечение больных с открытыми повреждениями представляет собой систему мероприятий, включающую в себя первую медицинскую помощь, хирургическую обработку раны, комплекс мер, направленных на повышение резистентности организма, предупреждение инфекции или борьбу с ней и другими осложнениями, применение методов физиотерапии и др. [67]. Степень использования этих мероприятий, их последовательность, время выполнения определяются характером и локализацией раны и состоянием больного, а в военное время – боевой и медицинской обстановкой. Выделяют: 1. Оперативный метод лечения ран. 2. Консервативный метод лечения ран. 3. Комбинированный метод лечения ран. Хирургическое и медикаментозное лечение гнойной раны не являются конкурирующими или взаимозаменяемыми методами лечения. Их нужно рассматривать только как взаимодополняющие компоненты комплексной терапии – гнойной раны. Лишь в редких случаях, при незначительной степени развития гнойного процесса, удастся добиться эффекта только с помощью антибактериальной терапии или каких-либо химиопрепаратов. Лечение гнойной раны редко ограничивается оперативным лечением без комплексной терапии включающей антибиотики. И все же, в подавляющем большинстве случаев лишь оперативное лечение может обеспечить

необходимые условия для оптимального течения раневого процесса и заживления раны первичным натяжением. Адекватное хирургическое вмешательство создает и наилучшие условия для действия антибактериальных средств, ликвидируя возможности для развития раневой микрофлоры [144].

## **1.6 Лечение ран с использованием методов регенеративной медицины**

Врачи во все времена пытались найти способы ускорить заживление ран. Особенно это касается ран заживающих по вторичному натяжению и хронических/ДНР ран. Сначала эти способы основывались исключительно на наблюдении и случайно найденных методиках. Но в настоящее время усовершенствование старых способов и нахождение новых базируется на строгих научных исследованиях.

В современной как в гуманной, так и в ветеринарной медицине наиболее перспективным направлением в этой области считается применение регенеративных технологий [2, 6, 13, 34, 80, 82, 90, 108, 110, 113, 126, 153].

В основе регенеративной медицины как метода лечения лежит тот научный факт, что в организме животных самой природой заложен механизм обновления и восстановления молекулярных и клеточных структур, благодаря которым он (организм) способен функционировать как единое целое гораздо дольше, чем его отдельные структурные элементы, заложенные от рождения [13, 161, 164]. Сам этот механизм невероятно сложен и представлен системой, которая состоит из множества подсистем, которые в свою очередь также включают системы еще более низкого порядка. Все эти системы и подсистемы сами структурно представлены множеством факторов молекулярной или клеточной природы, в задачу которых входит осуществлять физиологическую регенерацию в процессе естественного старения и репаративную регенерацию в случаях болезней (то есть поддерживать структурно-функциональное постоянство внутренней среды организма). И, исходя из выше представленного, можно сказать, что эти вещества и/или клетки можно условно назвать эндогенными «лекарственными препаратами». В условиях болезни,

например, при появлении механического или иного повреждения, данные эндогенные «лекарства» должны быстро и эффективно устранить проблему. Однако, все эти эндогенные «лекарства» в здоровом организме содержатся в относительно незначительных количествах. И не всегда способны быстро увеличиться в количественном отношении и/или быстро сконцентрироваться в зоне протекания патологического процесса. Современная и гуманная, и ветеринарная регенеративная медицина работают над тем, чтобы научиться быстро и безопасно концентрировать эти эндогенные «лекарственные препараты» в зоне протекания патологического процесса [6, 161, 162, 164, 166, 170]. Конечной целью регенеративной медицины является максимально быстрое осуществление регенерации, утерянной вследствие ранения или другого повреждения ткани и с максимальным восстановлением тканеспецифичности [2, 6, 9, 29, 49, 51, 53, 56, 67, 82, 124, 148, 149, 151], то есть по типу реституции, поскольку только реституция может гарантировать максимальное восстановление функций.

В свою очередь, роль эпидермиса при регенерации кожи определяется его участием в закрытии раневого дефекта и восстановлении целостности кожных покровов. Морфофункциональное состояние кожи характеризуется повышением пролиферативной активности покровного эпителия и изменением гистохимических показателей на уровне эпидермиса [3]. Использование различных физических факторов (светотерапия, магнитотерапия) при оптимальных режимах стимулирует пролиферацию эпидермиса и способствует образованию качественного регенерата.

Стоит отметить, что на сегодняшний день накоплен большой опыт по получению и применению различных типов клеток для регенерации эпидермиса. К таким клеткам относятся кератиноциты, фибробласты, мезенхимальные и стромальные структурно-функциональные единицы [36]. К методам регенеративной медицины относятся инъекции тканеспецифических факторов роста или продуктов секрета, выращенных *in vitro* фибробластов, а также стромально-васкулярных клеточных фракций или мезенхимальных стволовых клеток и другие [16, 17, 19, 34, 47, 74, 80, 82, 90, 108, 110, 114, 123, 124, 133, 160,

166]. Используют как аллогенные, так и аутогенные фибробласты. Однако, применение аутодермальных фибробластов показывает значительно лучшие результаты без значительной элиминации факторов роста и иных стимуляторов регенерации по сравнению с аллогенными фибробластами [34]. Без всякого сомнения, наиболее доступным для широкого круга, даже неспециализированных ветеринарных клиник, является способ лечения ран с использованием аутологичной плазмы крови обогащенной тромбоцитами [6, 36, 54, 102, 126, 152, 162, 171].

В частности, значительный эффект при лечении ран, особенно ожогов третьей степени, может быть достигнут за счет применения БЦ (бактериальной целлюлозы). Гель - пленка БЦ способствует поддержанию оптимального баланса влажности, стимуляции заживления, а также свободно пропускает жидкости и газы, безболезненно наносится и также безболезненно удаляется, активно насыщается лекарственными препаратами и свободно отдает их в поврежденную зону, сильно поглощает продукты распада тканей и служит почти непреодолимым физическим барьером для инфекции. БЦ находит свое применение не только в регенеративной медицине, но и в других областях.

Также имеются исследования по лечению ран с применением аллогенных биоматериалов, а именно «Аллоплант для каркасной пластики век» (из аллогенной дермы кожи – ДК) и «Аллосухожильные нити» (из аллогенных сухожилий – АС) для фиксирующей пластики, которые предварительно подготавливаются в лабораторных условиях [74]. Было установлено, что компоненты и экстрагируемые из аллогенных биоматериалов вещества влияют на регенерацию в тканях. При лечении ожоговых ран при помощи аллогенных биоматериалов происходит ингибирование грубого рубцевания тканей и формируется структурно-функциональный регенерат.

Значительную роль в регенеративной медицине занимает применение мезенхимальных стволовых клеток. Стволовыми клетками принято считать незрелые клетки, которые имеют возможность развиваться в специализированные клетки организма. Важнейшим восстановительным резервом в организме их можно

считать за счет способности преобразовываться в различные клетки. Также они применяются в трансплантационных целях за счет плюри- и мультипотентности. В организме мезенхимальные стволовые клетки можно обнаружить в жировой ткани, красном костном мозге и др. [74]. Они являются универсальными клетками, по-видимому, поступающими с кровотоком в органы или ткани, которым требуется регенерация. История применения мезенхимальных стволовых клеток берет свои истоки в 2002 году, когда американский ученый впервые предложил применять жировую ткань человека в качестве источника стволовых клеток. В 2003 году в Японии также начали исследовать возможность применения стволовых клеток, выделенных из жировой ткани. Таким образом, учитывая, что в организме имеется жировая ткань, пациент может являться собственным донором, что исключает вероятность иммунологической несовместимости. Однако не жировая, а костномозговая ткань рассматривается, как желаемый источник выделения мезенхимальных стволовых клеток. Стоит отметить, что проведение исследований по выделению стволовых клеток из костномозговой ткани является затруднительным, ввиду сложности отбора материала для исследования и выделения его в достаточном количестве. Однако, стволовые клетки, полученные из жировой ткани, подобно костномозговым, имеют морфологию фибробластов, поддерживаются и размножаются *in vitro* в стандартной среде, способны к мультилинейной дифференцировке.

### **1.7 Использование тромбоцитарной плазмы и тромбоцитарных сгустков для лечения ран**

Плазма крови, обогащенная тромбоцитами (синонимы: богатая тромбоцитами плазма, обогащённая тромбоцитами плазма, тромбоцитный концентрат, тромбоцитный гель, PRP - platelet-rich plasma,), это плазма, в которой содержание тромбоцитов выше, чем их содержание в исходном образце крови [6, 186].

История прихода к самой идеи и создания методики лечения при помощи плазмы, обогащенной тромбоцитами, достаточно запутана. Слишком много исследователей претендуют на первенство в этой области [6, 162,186].

Истоки метода PRP берут начало в аутогемотерапии, которая представляет собой подкожное или внутримышечное введение пациенту собственной крови, взятой из вены. Еще во время русско-японской войны в начале 20 века русский хирург Валентин Феликсович Воин-Ясенецкий использовал аутогемотерапию с целью лечения солдат от вялотекущих гнойных процессов. Несколько позже появился метод аутосеротерапии – метод лечение специально приготовленной собственной сывороткой больного. Считалось, что аутосеротерапия способствует повышению неспецифического иммунитета, оказывает стимулирующее влияние на кроветворение и систему гемостаза. Концепция и описание непосредственно PRP зародились в области гематологии. Термин PRP появился в 1970-х годах, чтобы описать плазму с количеством тромбоцитов выше, чем в периферической крови, которая первоначально использовалась в качестве продукта для переливания крови с целью лечения пациентов с тромбоцитопенией. Сегодня достаточно сложно выяснить что больше: клинический опыт или фундаментальные исследования, которые легли в основу современных представлений о терапевтической роли PRP. Но научно обоснованная концепция применения аутоплазмы с тромбоцитами началась именно с того момента, как появилось открытие того факта, что тромбоциты содержат и при активации выделяют в окружающую среду множество белковых и небелковых факторов, которые инициируют регенеративный процесс в тканях при повреждениях различной этиологии [6, 186, 188, 195]. Именно факт того, что тромбоциты являются носителями и источниками разнообразных факторов роста является базовым аргументом во всех дискуссиях о потенциальной терапевтической эффективности PRP.

В конце 1980 годов R. E. Marx с соавторами одними из первых стали применять плазму в виде гелевого сгустка. Исследователи использовали гелевые формы плазмы, содержащей тромбоциты, с целью устранения дефектов челюсти величиной более 5 см. А в 2001 году во Франции впервые профессором Джозефом



Чукруном и его группой был описан протокол производства фибринового сгустка, обогащенного тромбоцитами [162]. В 2003 году российскими учеными, профессором доктором медицинских наук Ренатом Рашитовичем Ахмеровым и кандидатом медицинских наук Романом Феликсовичем Зарудием, был разработан и применен один из вариантов инъекционной формы тромбоцитарной аутоплазмы, называемый Plasmolifting™ [6].

В настоящее время как гуманная, так и ветеринарная медицина проводят большое количество клинических исследований лечебного действия аутологичной плазмы крови, обогащенной тромбоцитами. Многочисленные публикации в отечественных и зарубежных медицинских журналах констатируют то, что плазма, обогащенная тромбоцитами, позитивно действует на патологический процесс при лечении самых разнообразных заболеваний. Например, артрит, артроз, тендинит и тендовагинит, переломы костей, раневой процесс и т.д. [26, 31, 44, 46, 50, 54, 70, 83,84, 183, 184, 185, 187, 192]. В аналогичных направлениях активно проводят исследования и представители зарубежной ветеринарной медицины [169, 170, 173, 174, 180, 190, 191, 194, 196].

Отечественная ветеринарная медицина несколько отстает по количеству опубликованных результатов исследований по тематике PRP. Но следует отметить, что в последние годы количество публикаций постепенно возрастает. Спектр исследований, в которых напрямую или косвенно затрагивается тема плазмы обогащенной тромбоцитами, достаточно широк. Так, например, рассматриваются вопросы усовершенствования методов получения PRP из крови животных разных видов. Такими исследованиями занимались Семенов Б. С., Гусева В. А., Кузнецова Т. Ш., Свердлов М. В., Захаров А. Ю., Стекольников А. А., Бокарев А. В., Нарусбаева М. А., Блузма А. О. [23, 85, 168].

Эффективность применения PRP при лечении болезней глаз животных отражена в исследованиях Шилкина А. Г., Войтеха М. А., Павловой Т. Н., Ротанова Д. А., Новиковой К. А., Ерина И. С., Ватникова Ю. А., Паршиной В. И., Ворониной Ю. Ю. [22, 38, 63, 99, 102]. Лечение при помощи PRP болезней сухожильно-

связочного аппарата занимались Шихина С. Н., Семенов Б. С., Гусева В. А., Рыбин Е. В., Кузнецова Т. Ш., Гладких Е. С., Романова О. В. [24, 62, 104, 152].

Вопросы регенерации костной ткани отражены в исследованиях Горохова В. Е., Бокарева А. В., Стекольников А. А., Катаргина Р. С., Ивановской М. М. [87].

Сравнительная морфология бесклеточных, тромбоцитарных и тромбоцитарно-лейкоцитарных сгустков рассмотрена в работах Бокарева А. В., Стекольников А. А., Свердловой М. В., Горохова В. Е., Мининой А. О., Нарусбаевой М. А. [181].

Возможность и эффективность лечения при помощи PRP раневой патология и других болезни кожи проверена в клинических экспериментах Семенова Б. С., Рыбина Е. В., Гусевой В. А., Кузнецовой Т. Ш. Виденина В. Н., Батракова А. Я. [32, 61, 78, 103, 121, 158]. Антимикробная активность тромбоцитарных факторов изучалась Сычёвой М. В., Шейда Е. В., Карташовой О. Л., Жуковым А. П. [5]. Интегральная антимикробная активность тромбоцитарных и тромбоцитарно-лейкоцитарных сгустков изучалась и представлена в работе Бокарева А. В., Стекольников А. А., Свердловой М. В., Горохова В. Е., Мининой А. О., Холодного Р. Д. [27].

Зачастую при лечении ран методом введения плазмы, обогащенной тромбоцитами, не измеряется количество тромбоцитов в исходном образце крови и в полученной плазме. Также стоит отметить, что само понятие «плазма, обогащенная тромбоцитами», до конца не верифицировано [79, 93, 97, 162, 171, 172].

### **1.8 Способы получения тромбоцитарной плазмы и тромбоцитарных сгустков**

На сегодняшний день предложено большое количество способов получения продукта под условным названием «аутологичная плазма богатая тромбоцитами». Сходством между этими способами является только то, что плазма, получается из периферической венозной крови, и то, что отделение плазмы и тромбоцитов от

эритроцитов проводится при помощи центрифугирования [6, 172]. Далее сходство заканчивается, и начинаются отличия, которые в сумме комбинаций дают очень большое разнообразие. Разные способы отличаются используемым антикоагулянтом (гепарин или цитрат натрия), объёмом и формой пробирок, в которых производится выделение, диаметром ротора центрифуги, скоростью центрифугирования, количеством центрифугирований и временем центрифугирования [6, 172, 173, 186, 188]. Кроме обычных пробирок выпускаются и специальные пробирки с разделительным гелем или целые устройства для получения PRP (Рисунок 4). Такое многообразие продукта под общим названием «PRP» даже в гуманной медицине часто усложняет, а иногда делает невозможным сравнение результатов полученных как в лабораторных, так и в клинических экспериментах проведенных разными исследователями [172, 186, 188]. Высказывается даже обоснованное опасение того, что «коммерческие интересы [авторов методов и производителей систем выделения PRP] могут скрыть отсутствие истинных клинических преимуществ в некоторых случаях» [79, 171].

Еще в большей степени выше сказанное касается ветеринарной медицины. Дело в том, что физико-химические свойства крови животных, включающие вязкость плазмы и плотность форменных элементов, не только отличаются от таковых человека, но имеют и межвидовое различие. Эта проблема хорошо известна иммунологам, занимающимся разделением лейкоцитов в градиенте плотности [157]. Но при анализе публикаций по ветеринарной регенеративной медицине приходится констатировать то, что только врачи иппологи (и то незначительная их часть) занимаются критическим анализом и вопросами адаптации методов получения PRP [168, 173, 191, 194]. Поэтому результаты многих ветеринарных исследований, в которых было прямое копирование протоколов получения PRP, взятых из гуманной медицины, не всегда выглядят корректными и очень часто невоспроизводимыми.

Анализируя научные или рекламные публикации, можно обнаружить некую вариабельность в названиях продуктов, выступающих под общим названием PRP.

Однако, наиболее простой и интуитивно понятной для специалистов классификацией является разделение PRP на четыре вида [162, 171, 172].

1 - P-PRP (чистая богатая тромбоцитами плазма). Жидкий препарат не содержит или содержит мало лейкоцитов и много тромбоцитов

2 - L-PRP (богатая лейкоцитами плазма). Жидкий препарат содержит много лейкоцитов и много тромбоцитов

3 - P-PRF (чистый богатый тромбоцитами фибрин). Гелеобразный препарат не содержит или содержит мало лейкоцитов и много тромбоцитов

4 - L-PRF (богатый лейкоцитами и тромбоцитами фибрин). Гелеобразный препарат содержит много лейкоцитов и много тромбоцитов. В отечественной научной литературе интуитивно понимаемая терминология типа «тромбоцитарная плазма», «тромбоцитарный сгусток», «фибриновый сгусток», «лейкотромбоцитарный фибриновый сгусток» и другие [107, 116, 117, 118, 119, 121, 130, 132, 142, 158].

Регенеративная, как гуманная, так и ветеринарная медицина, на сегодняшний день накопила достаточно большое количество как научных, так и клинических данных, чтобы утверждать, что применение плазмы, обогащенной тромбоцитами, оказывает позитивный эффект на течение патологических процессов при многих заболеваниях. Факт того, что тромбоциты являются носителями и источниками разнообразных факторов роста, основными из которых являются тромбоцитарный фактор роста (PDGF), трансформирующий фактор роста (TGF- $\beta$ ), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста эпителия (EGF), фактор роста фибробластов (FGF), инсулиноподобный фактор роста (IGF), сегодня является наиболее сильным аргументом в пользу применения методики PRP [19, 93, 105, 114, 130, 188]. А открытие того, что тромбоциты могут по средствам нетоза и высвобождения дифензинов и тромбоцидинов осуществлять микробоцидное действие, а также вступать в кооперацию с лейкоцитами в процессе воспаления и иммунного ответа, наметило перспективу расширения сферы применения PRP [5, 7, 21, 27, 47, 117, 122, 139, 140, 163, 165, 175, 177, 179, 189].

## **1.9 Недостатки и осложнения лечения ран тромбоцитарной плазмой и тромбоцитарными сгустками**

Однако, не смотря на наличие огромного количества научной и клинической информации по методике PRP, остается еще множество невыясненных аспектов этой методики лечения. Часть таких вопросов возникает в процессе рутинной клинической практики в связи с получением результата, отличающегося от ожидаемого. Так, например, несмотря на то, что есть некое устоявшееся мнение о том, что чем выше концентрация тромбоцитов в водимой плазме, тем сильнее терапевтический эффект, часть исследований опровергает это. При экспериментальном лечении разрыва передней крестовидной связки у свиней разница в концентрации тромбоцитов почти в два раза не привела к ощутимому различию в лечебном эффекте [190]. В другом исследовании показано, что действие активированной тромбоцитарной плазмы на пролиферацию фибробластов и остеобластов зубодесневого соединения находится в узком диапазоне концентраций [176].

В другом исследовании, в котором модельным объектом патологического процесса были кожные раны у лошадей, плазма с высоким содержанием тромбоцитов показала меньший заживляющий эффект, чем плазма бедная тромбоцитами [180]. В данном исследовании у тех лошадей, которым вводили плазму с более высокой концентрацией тромбоцитов, замедление заживление раневого дефекта было обусловлено избыточным разрастанием первичной грануляционной ткани и замедлением эпителизации. Еще один аспект, который является предметом дискуссий, может ли причиной отсутствия лечебного эффекта или индукции негативного эффекта быть присутствия в плазме наряду с тромбоцитами еще и лейкоцитов. И, если да, то в какой концентрации, и в каком соотношении с тромбоцитами. Решению этого вопроса посвящены не только клинические исследования, но и исследования направленные на улучшение методики получения PRP таким образом, чтобы в конечном продукте содержалось как можно больше тромбоцитов и как можно меньше лейкоцитов [85, 97, 111, 162,

173, 188, 191, 194]. Однако, следует отметить, что в ряде публикаций описывается наоборот позитивное эффект от присутствия лейкоцитов, но не в тромбоцитарной плазме, а в тромбоцитарном сгустке. В данном случае речь идет о профилактике гнойных осложнений в постоперационном периоде [7, 21, 100, 116, 117].

Обращает на себя внимание то, что количество исследований в области получения и клинического использования плазмы превалирует над количеством исследований, направленных на исследование и клиническое применение сгустков. В тоже время достаточно часто обсуждается вопрос о необходимости (или отсутствие этой необходимости) активировать тромбоциты плазмы перед использованием [106, 142, 170]. Такая активация производится при помощи адреналина, тромбина и ионов кальция, вместе или по отдельности внесенных в полученную плазму [130, 132, 171, 172]. Но, даже если экзогенные активаторы не вносятся в предварительно приготовленную плазму, считается, что активация все равно происходит под действием эндогенных факторов, таких как кальций межклеточной жидкости, а также тканевой и сывороточный тромбопластин. Поэтому понятно, что эндогенно активированные таким образом тромбоциты априори приведут к переходу фибриногена в фибрин и по факту образуется тот же сгусток [64, 65, 75, 91, 98, 127, 134, 167, 182]. А из этого следует, что в качестве лечебной субстанции, мы в любом случае имеем дело со сгустком, только в одном случае, образовавшемся через некоторое время в толще ткани из инъецированной плазмы, а в другом случае, со сгустком приготовленном специально для помещения в/на раневой дефект.

Как мы уже отметили выше, количество научных публикаций, в которых рассматриваются вопросы получения и клинического использования плазмы, превалирует над количеством научных публикаций, анализирующих получение и клиническое применение сгустков. Если круг вопросов, обсуждаемых в контексте использования PRP, касается очень большого круга проблем, включающих такие как факторы роста, регенерация, ангиогенез, эпителизация и ремоделирование, то наиболее обсуждаемыми вопросами применения сгустков являются индукция раневого гемостаза, использование сгустка в качестве фибринового клея,

обеспечивающего консолидацию краев раны или эффективность фибриновых волокон сгустка как матрицы для клеток первичного пролиферата [75, 91, 107, 119]. Некоторая часть статей, имеющихся в свободном доступе, посвящены вопросам индукции регенерации. Но практически все они освещают вопросы костной патологии и имеют отношение к гуманной медицине [25, 46, 50, 91, 130, 136]. Биологические и терапевтические эффекты, присутствующих в сгустке тромбоцитов и лейкоцитов, изучаются и анализируются в значительно меньшей степени [27]. Априори понятно, что плазма (содержащая тромбоциты и/или лейкоциты) может быть использована только в виде инъекций. А применение ее в виде орошений раневого дефекта или в виде аппликаций не может быть эффективно по ряду причин. Также понятно, что уже готовый сгусток не может быть введен в патологический очаг путем инъекции, но может быть помещён в него и/или на него и быть фиксирован швами или повязкам. Однако, вопрос преферентного применения тромбоцитарного концентрата в форме плазмы или форме сгустков, в зависимости от этиопатогенеза раневой патологии, остается открытым. Равно как остается открытым вопрос об эффективности, целесообразности и безопасности присутствия лейкоцитов в тромбоцитарной плазме или в тромбоцитарном сгустке, в зависимости от этиологии, патогенеза и патоморфогенеза патологического очага.

## 2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Материалы и методы исследования

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	-	-	-	3	3	-	6
Исследование влияния образцов 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 образцов плазмы на заживление ран различного этиопатогенеза					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, а 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, объем которой составляет от 0,4% до 0,55% от исходного объема крови, 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.

Получение фибриновых сгустков с различным клеточным составом: бесклеточный, тромбоцитарный и тромбоцитарно-лейкоцитарный, осуществлялось 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 (раздел 2.2.4.2). 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 300,00<sup>0</sup>С 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 волокон 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 ScorePhoto 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 (Рисунок 4).

Однако результат исследования показал, что в плазме, полученной таким способом, происходит значительная потеря тромбоцитов (Рисунок 6 в, Рисунок 7 в, Таблица 2, Таблица 3), а также может остаться некоторое количество лейкоцитов, которые прилипают к поверхности разделительного геля и смываются в процессе отбора плазмы (Рисунок 5).

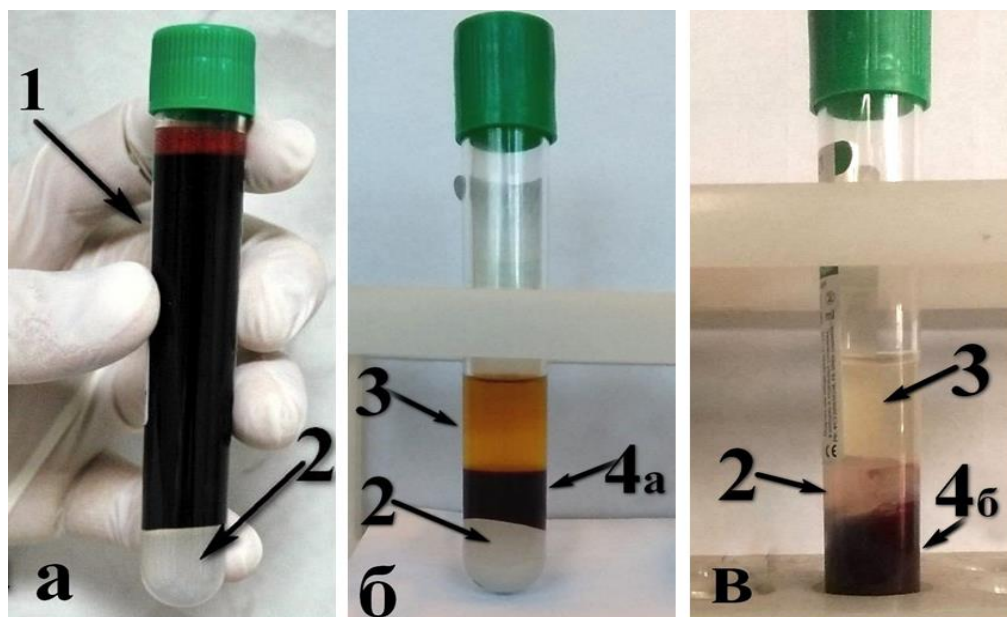


Рисунок 4 – Получение плазмы обогащенной тромбоцитами в специальных пробирках с разделительным гелем.

а – пробирка до центрифугирования, б – пробирки после центрифугирования при 1000, 0 и 1500,0 об/мин в течение 10 минут, в – пробирка после центрифугирования при 3000,0 об/мин в течение 10 минут. 1- цельная кровь; 2 – разделительный гель; 3 – плазма; 4а - эритроциты с лейкоцитами не прошедшие разделительный гель; 4б - эритроциты с лейкоцитами прошедшие разделительный гель.

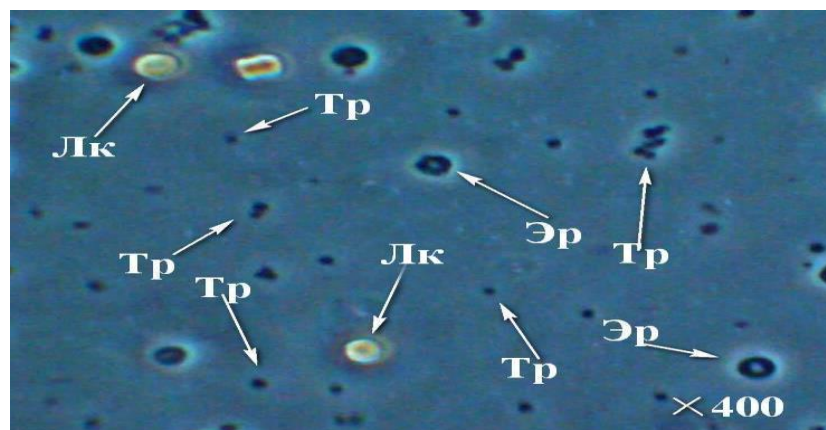


Рисунок 5 - Фазово-контрастная микроскопия образца плазмы полученной из крови собаки в пробирках с разделительным гелем на центрифуге ОПН-3 после центрифугирования при 3000,0 об/мин в течение 10 минут.

Эр – эритроциты, Тр – тромбоциты, Лк – лейкоциты.

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 (Рисунок 6 б, Рисунок 7 б, Таблица 2, Таблица 3).

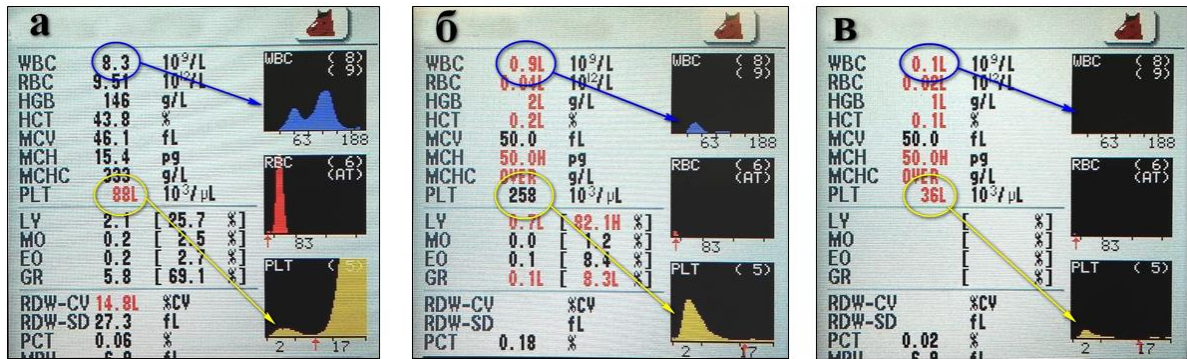


Рисунок 6 – Количественные характеристики тромбоцитарной плазмы, полученной в пробирках для плазмолифтинга при различных скоростях центрифугирования из крови лошади. а - Параметры цельной крови; б - Плазма полученная после центрифугирования 1500 об/мин; в - Плазма полученная после центрифугирования 3000 об/мин. Синими кругами и стрелками выделены лейкоциты. Желтыми кругами и стрелками выделены тромбоциты. Показано, что при скорости центрифугирования 1500 об/мин количество тромбоцитов в единице объема плазмы крови выше, чем в единице объема цельной крови, но имеется значительное количество лейкоцитов. При скорости центрифугирования 3000 об/мин лейкоциты в плазме отсутствуют, но количество тромбоцитов в единице объема плазмы крови значительно ниже, чем в единице объема цельной крови.

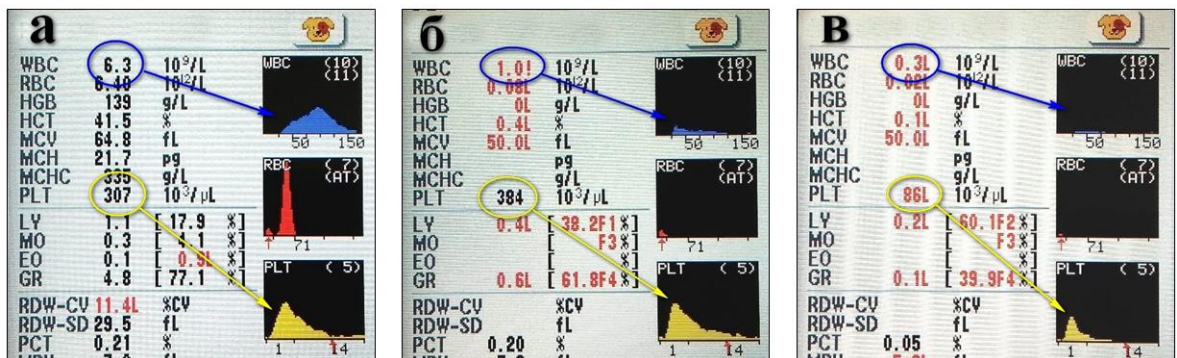


Рисунок 7 – Количественные характеристики тромбоцитарной плазмы, полученной в пробирках для плазмолифтинга при различных скоростях центрифугирования из крови собаки. а - Параметры цельной крови; б - Плазма полученная после центрифугирования 1500 об/мин; в - Плазма полученная после центрифугирования 3000 об/мин. Синими кругами и стрелками выделены лейкоциты. Желтыми кругами и стрелками выделены тромбоциты. Показано, что при скорости центрифугирования 1500 об/мин количество тромбоцитов в единице объема плазмы крови выше, чем в единице объема цельной крови, но имеются лейкоциты. При скорости центрифугирования 3000 об/мин лейкоциты в плазме отсутствуют, но количество тромбоцитов в единице объема плазмы крови значительно ниже, чем в единице объема цельной крови.



Таблица 2 – Абсолютное содержание тромбоцитов и лейкоцитов в 1,0 мкл плазмы, выделенной из цельной крови в пробирках с разделительным гелем при разных режимах центрифугирования

Вид животного	Цельная кровь		1500 об/мин 10 мин**		3000 об/мин 10 мин	
	Тр×10 <sup>3</sup>	Лк×10 <sup>3</sup>	Тр×10 <sup>3</sup>	Лк×10 <sup>3</sup>	Тр×10 <sup>3</sup>	Лк×10 <sup>3</sup>
Лошади (N=30)	118,20± 42,18	9,26± 2,02	187,20± 43,79	1,29± 0,47	52,60± 21,23	0,23± 0,22
Коровы (N=25)	523,8± 108,0	7,36± 2,80	671,5± 134,6	1,74± 0,95	162,9± 68,47	0,39± 0,33
Собаки (N=20)	349,60± 94,56	8,76± 1,93	419,40± 145,00	1,33± 0,61	136,40± 60,97	0,83± 0,48

Тр – тромбоциты, Лк – лейкоциты.

\*\* - При скорости центрифугирования 1500 об/мин эритроциты проходят через гель в небольшом количестве случаев. При работе с кровью лошадей эритроциты прошли через разделительный гель только в 8 случаях из 30. При работе с кровью коров эритроциты прошли через разделительный гель только в 7 случаях из 25. При работе с кровью собак эритроциты прошли через разделительный гель только в 7 случаях из 20.

Таблица 3 – Относительное (в %) количество тромбоцитов и лейкоцитов в 1 мкл плазмы, выделенной из цельной крови в пробирках с разделительным гелем при разных режимах центрифугирования, по отношению к количеству тромбоцитов и лейкоцитов в цельной крови \*

Вид животного	1500 об/мин 10 мин **		3000 об/мин 10 мин	
	Тр (%)	Лк (%)	Тр (%)	Лк (%)
Лошади (N=30)	169,00 ± 71,62	14,01 ± 4,77	45,05 ± 11,47	2,362 ± 1,79
Коровы (N=25)	130,20 ± 11,90	27,09 ± 15,32	31,68 ± 11,50	6,17 ± 5,70
Собаки (N=20)	118,80 ± 11,77	18,26 ± 13,29	40,75 ± 21,69	9,61 ± 5,26

\* - Относительное количество тромбоцитов и лейкоцитов в единице объёма цельной крови принято за 100%. Тр – тромбоциты, Лк – лейкоциты.

\*\* - При скорости центрифугирования 1500 об/мин эритроциты проходят через гель в небольшом количестве случаев. При работе с кровью лошадей эритроциты прошли через разделительный гель только в 8 случаях из 30. При работе с кровью коров эритроциты прошли через разделительный гель только в 7 случаях из 25. При работе с кровью собак эритроциты прошли через разделительный гель только в 7 случаях из 20.

Кроме перечисленных недостатков способа получения плазмы, обогащенной тромбоцитам, 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 8). Данный способ позволяет получать плазму в объеме, составляющем от 35,0% до 50,0% от исходного объёма крови (Рисунок 8 б), значительно обогащенную тромбоцитами (обогащение может превышать 150,0% (Таблица 4, Таблица 5)) и содержащую лейкоциты в очень малом количестве (Рисунок 8, Таблица 4, Таблица 5).



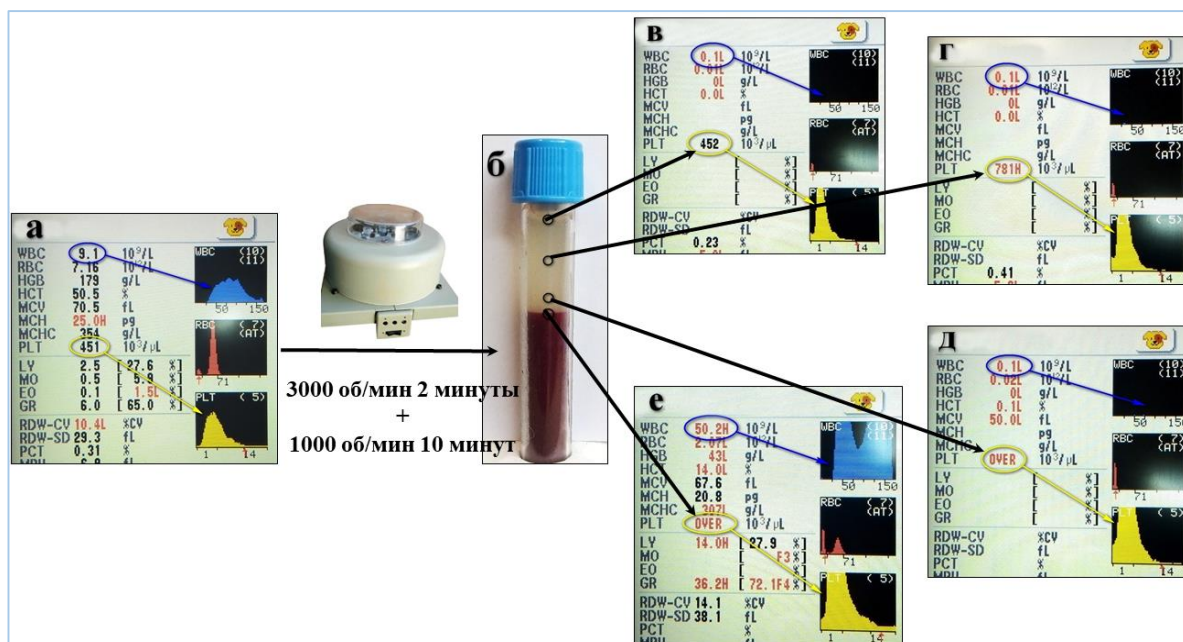


Рисунок 8 – Количественные характеристики тромбоцитарной плазмы полученной в цитратных пробирках без разделительного геля:  
 а - параметры цельной крови; б – кровь после центрифугирования; в, г, д, е – количественные параметры тромбоцитарной плазмы, полученные из разных участков плазмы; синими кругами 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 алиquotы плазмы с малым (Рисунок 8 в), средним (Рисунок 8 г) и большим (Рисунок 8 д) 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 (Рисунок 8 е). 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 (Таблица 4, Таблица 5). Из всех образцов плазмы можно легко приготовить сгустки путем простого добавления кальция в форме раствора кальция хлорида.

Таблица 4 – Абсолютное содержание тромбоцитов и лейкоцитов в 1,0 мкл плазмы, выделенной из цельной крови в пробирках с цитратом натрия при режиме центрифугирования 3000 об/мин/две мин +1000 об/мин/10 мин.

Вид животного	Цельная кровь		Плазма		Лейкоцитарная пленка *	
	Тр×10 <sup>3</sup>	Лк×10 <sup>3</sup>	Тр×10 <sup>3</sup>	Лк×10 <sup>3</sup>	Тр×10 <sup>3</sup>	Лк×10 <sup>3</sup>
Лошади (N=20)	118,50± 36,65	9,25± 2,10	186,70± 47,19	0,17± 0,13	203,65± 67,65	45,75± 29,80
Коровы (N=20)	483,20± 92,38	7,20± 2,53	653,30± 130,30	0,25± 0,17	522,45± 109,47	43,32± 19,53
Кролики (N=15)	287,30± 61,89	7,81± 2,35	430,20± 79,11	0,12± 0,10	807,86± 231,81	37,83± 25,41
Крысы (10)	458,10± 87,89	9,30± 2,16	700,00± 112,30	0,16± 0,11	758,76± 363,85	29,37± 27,15
Собаки (N=25)	321,40± 73,41	8,26± 2,27	459,30± 119,80	0,33± 0,45	526,64± 173,47	38,55± 23,47
Кошки (12)	298,80± 59,61	8,16± 2,22	460,20± 105,60	0,22± 0,32	326,71± 93,31	28,47± 12,34

Тр – тромбоциты, Лк – лейкоциты.  
\* - при подсчете гематологических параметров лейкоцитарной пленки наблюдается большой разброс величин. Это обусловлено тем, что отобрать пипеткой клетки только лейкоцитарной пленки технически невозможно по причине ее малой толщины. Вследствие этого в каждый вариант отбора попадает некоторое количество лежащей выше тромбоцитарной плазмы и лежащих ниже эритроцитов.

Таблица 5 – Относительное (в %) к цельной крови количество тромбоцитов и лейкоцитов в 1,0 мкл плазмы, выделенной в пробирках с цитратом натрия при режиме центрифугирования 3000 об/мин/две мин. + 1000 об/мин/10 мин. \*

Вид животного	Плазма		Лейкоцитарная пленка	
	Тр (%)	Лк (%)	Тр (%)	Лк (%)
Лошади (N=20)	157,55±39,82	1,84±1,41	171,86±57,09	494,59±322,16
Коровы (N=20)	135,20±26,97	3,47±2,36	108,12±22,65	601,67±271,25
Кролики (N=15)	149,74±27,54	1,54±1,28	281,19±80,69	484,38±325,35
Крысы (10)	152,81±24,51	1,72±1,18	165,63±79,43	315,81±291,94
Собаки (N=25)	142,91±37,27	4,00±5,45	163,86±53,97	466,71±284,14
Кошки (12)	154,02±35,34	2,70±3,92	109,34±31,23	348,90±151,23

\* - Относительное количество тромбоцитов и лейкоцитов в единице объема цельной крови принято за 100%.  
Тр – тромбоциты, Лк – лейкоциты.

С учетом того, что в качестве пациентов врача ветеринарной медицины выступают и очень мелкие и миниатюрные животные, у которых сложно получить

кровь объёмом более 1,0 мл был разработан и апробирован способ получения плазмы обогащенной тромбоцитами в инсулиновых шприцах (Рисунок 9).

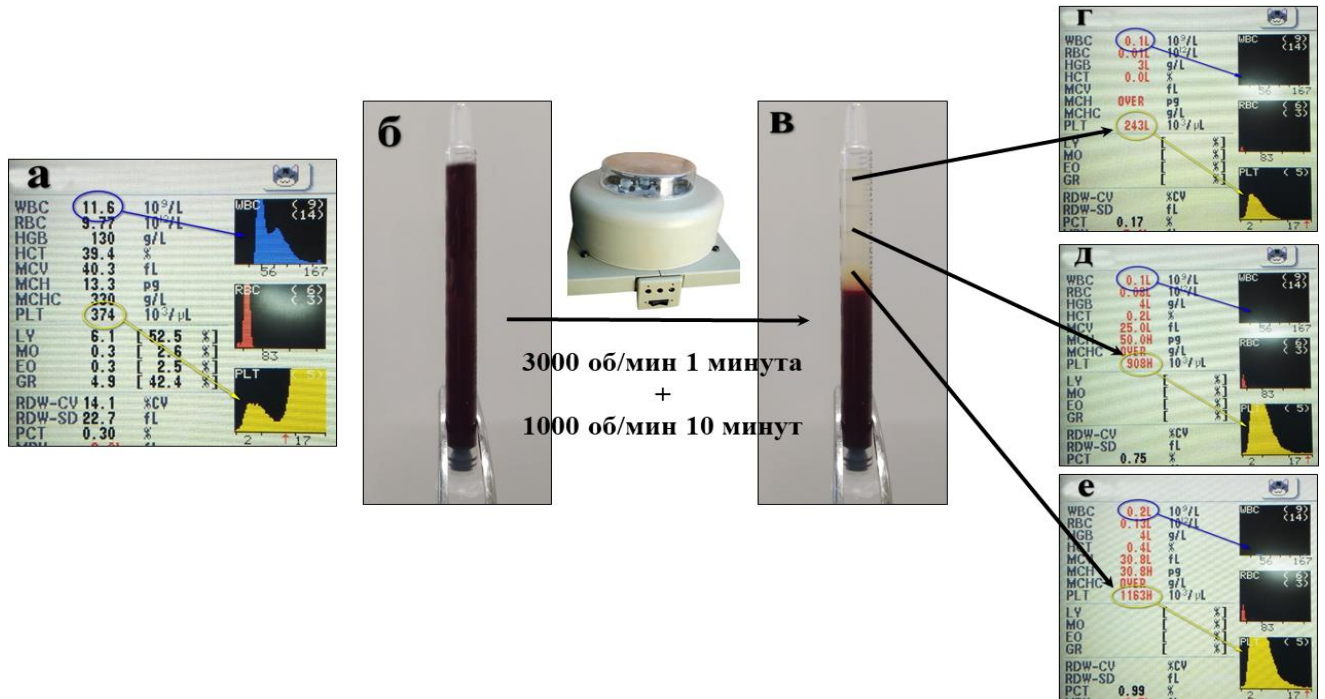


Рисунок 9 – Количественные характеристики тромбоцитарной плазмы полученной в инсулиновых шприцах:

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 объёмом 1,0 мл (Рисунок 9 (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 введя туда иглу производится забор плазмы объём которой составляет от 0,4% до 0,55% от исходного объёма крови (Рисунок 9 (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 получаются при использовании вакуумных пробирок с цитратом натрия описанные выше (Рисунок 8 (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. Априори понятно, что нестабилизированная кровь не подходит для обозначенных целей исследования, так как из нее можно получить только либо простой сгусток крови, либо безэритроцитарный фибриновый сгусток (если кровь сразу после взятия быстро поместить в центрифугу), но с неизвестным тромбоцитарно-лейкоцитарным составом. 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 (раздел 2.2.1.). 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 (Таблица 6).

Таблица 6 – Время образования сгустка из рекальцинированной плазмы крови в зависимости от количественного и качественного состава лейкоцитов

	Примерное время начала коагуляции (минут)	Примерное время образования сгустка (минут)	Примерное время ретракции сгустка (минут)
бесклеточная плазма	Сложно определить *	138,00±81,06	отсутствует
плазма с малым количеством тромбоцитов ( $\leq 10 \times 10^3/\text{мкл}$ )	18,00±5,70	47,00±16,04	Ретракция слабо выражена
плазма с большим количеством тромбоцитов ( $\geq 300 \times 10^3/\text{мкл}$ )	4,80±1,92	12,60±7,83	53,20±9,20
плазма с большим количеством тромбоцитов ( $\geq 300 \times 10^3/\text{мкл}$ ) и лейкоцитами	1,32±0,30	5,80±2,80	42,00±11,51
* - сложно определить так как время образования сгустка очень длительное.			

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 промежуточная (Рисунок 10).

Исследование гистологических препаратов приготовленных из сгустков показало следующее.

1 - В бесклеточном сгустке визуализируются участки низкой и плотной конденсации нитей фибрина, которые образуют крупноячеистую сеть (Рисунок 11).



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 (Рисунок 12).

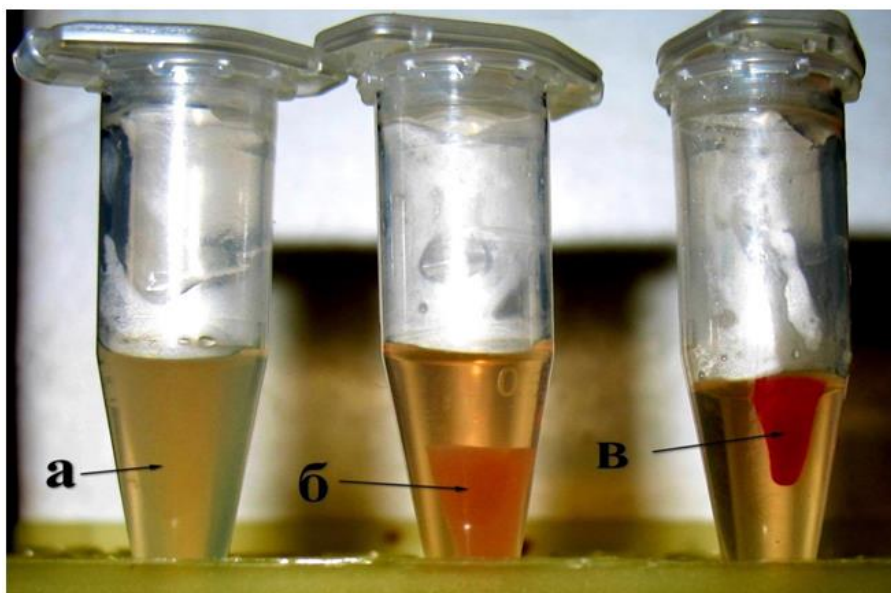


Рисунок 10 – Макроморфология фибриновых сгустков, имеющих различный тромбоцитарно-лейкоцитарный состав:

а – бесклеточный сгусток (ретракция сгустка не выражена); б – тромбоцитарный сгусток (отчетливая ретракция сгустка); в - тромбоцитарно-лейкоцитарный сгусток (очень сильная ретракция сгустка).

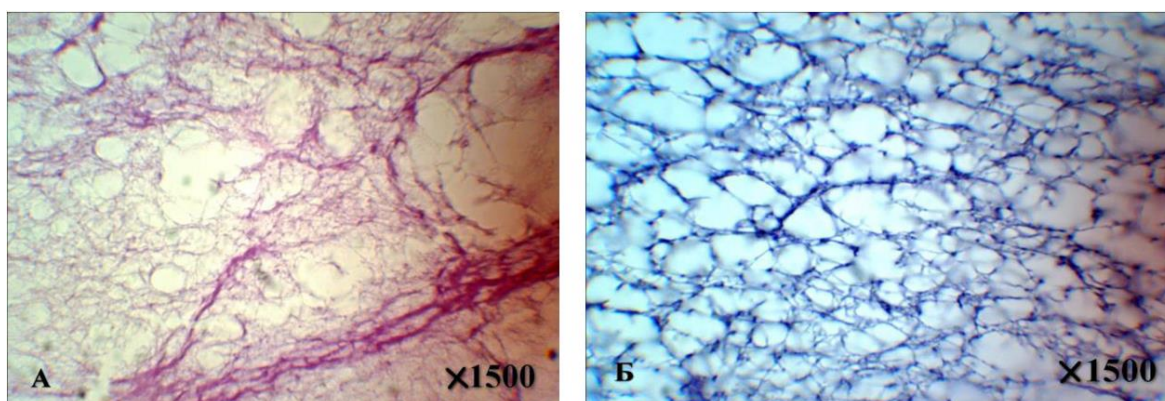


Рисунок 11 – Структура бесклеточного сгустка приготовленного из цитратной плазмы:

А – окраска на волокна по Ван Гизону; Б – окраска гематоксилином и эозином.

В бесклеточном сгустке нити фибрина структурированы в крупноячеистую сеть с участками низкой и плотной конденсации фибрина.

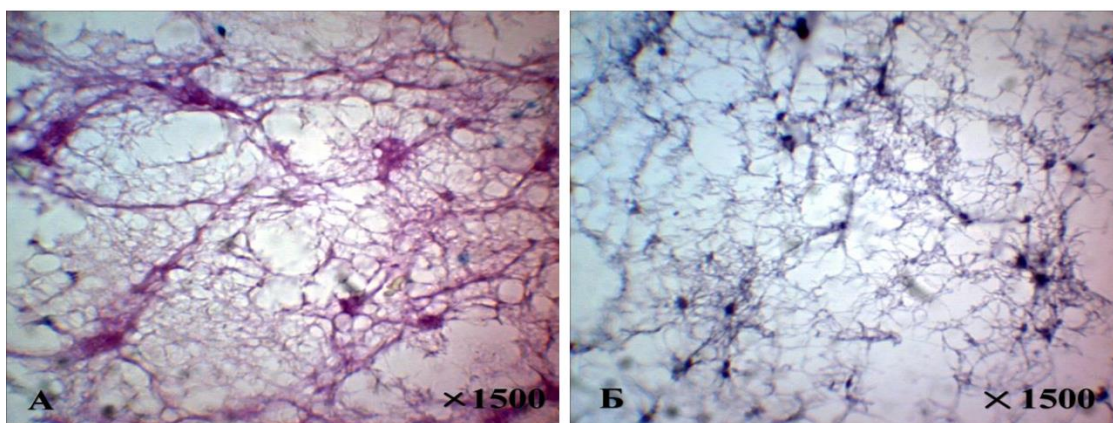


Рисунок 12 – Гетероморфная структура тромбоцитарного сгустка, приготовленного из цитратной тромбоцитарной плазмы:

А – окраска на волокна по Ван Гизону; Б – окраска гематоксилином и эозином.

Неструктурированная сеть нитей фибрина (А, Б). Во всех участках препаратов визуализируются тромбоциты и их конгломераты конденсирующие вокруг себя мелкоячеистую сеть из нитей фибрина.

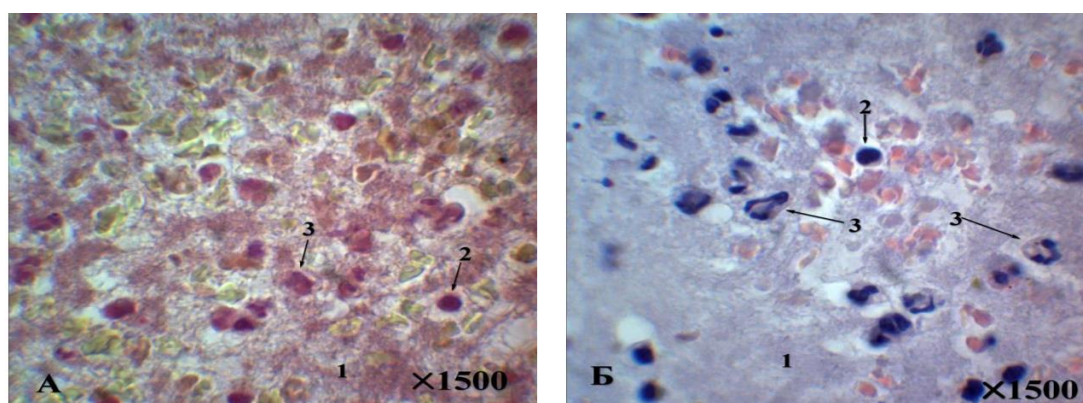


Рисунок 13 – Структура тромбоцитарно-лейкоцитарного сгустка, приготовленного из цитратной тромбоцитарно-лейкоцитарной плазмы:

А – окраска Ван Гизон; Б – Окраска гематоксилином и эозином.

Нити фибрина располагаются плотно, и визуализируются не как волокна, а как сплошная гомогенная масса (1). Тромбоциты не визуализируются. Лимфоциты (2) и нейтрофилы (3) сохраняют свою привычную клеточную форму.

3 - Структура тромбоцитарно-лейкоцитарного сгустка отличается от таковой бесклеточного и тромбоцитарного сгустков (Рисунок 13). В тромбоцитарно-лейкоцитарном сгустке нити фибрина за счет сильной ретракции располагаются так плотно, что визуализируются не как волокна, а как сплошная гомогенная масса (Рисунок 13 (1)). 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 (Рисунок 13 (2, 3)).

### **2.2.3 Исследование *in vitro* микробицидной роли основных клеточных и молекулярных компонентов кровяного сгустка**

Как было описано в разделе «Обзор литературы», различные образцы сгустков полученных из плазмы крови применяют при лечении хирургических патологий, как в гуманной, так и ветеринарной хирургии [88]. С одной стороны, кровь и ее продукты могут являться хорошей питательной средой для микроорганизмов, попавших в рану. Но с другой стороны, имеют место многочисленные сообщения, что раневые дефекты в присутствии сгустков заживают быстрее и реже дают гнойные осложнения [47]. Возникает закономерный вопрос, связан ли данный позитивный эффект только с продуктами типа лизоцима и иммуноглобулинами или свой вклад вносят и основные молекулярные и клеточные элементы сгустка?

Для выяснения этого вопроса был поставлен эксперимент, в котором морфологическим методом изучались бактерицидные свойства трех образцов сгустков: бесклеточного, тромбоцитарного и тромбоцитарно-лейкоцитарного. Кровь от крыс линии «Вистар» брали из сердца под ингаляционным наркозом с применением изофлурана. Затем кровь вносили в пробирки с цитратом натрия. Объекты фагоцитоза готовили из пекарских дрожжей после их инактивации кипячением и трехкратным отмыванием физиологическим раствором натрия хлорида. Подсчет клеток в цельной крови и в вариантах полученной плазмы, а также клеток пекарских грибов проводили на автоматическом гематологическом анализаторе МЕК-6550. Центрифугирование крови проводили на центрифуге ОПН-3. Получали три варианта плазмы: 1 - плазма лишенная всех форменных элементов крови; 2 - плазма обогащенная тромбоцитами; 3 - плазма, содержащая большое количество тромбоцитов и лейкоциты. Чистую бесклеточную плазму крови получали путем центрифугирования при 3000 об/мин 20 минут.



Тромбоцитарную плазму крови получали путем сочетанного комбинированного центрифугирования сначала при 3000 об/мин полторы минуты и затем 1000 об/мин 10 минут. Тромбоцитарно-лейкоцитарную плазму крови получали путем отбора клеток лейкоцитарной (надэритроцитарной) пленки из второго варианта центрифугирования и их последующего суспендирования в чистой бесклеточной плазме, полученной в первом варианте центрифугирования. Перед приготовлением смеси образцов плазмы и дрожжевых клеток взвесь последних в нужной концентрации готовилась в физиологическом растворе. После этого взвесь центрифугировалась и надосажок, содержащий физиологический раствор, сливался. К осадку, содержащему нужное количество дрожжевых клеток/объектов фагоцитоза, добавляли необходимое количество плазмы. Конечная концентрация дрожжевых клеток в тромбоцитарной плазме была  $\approx 4,0 - 5,0 \times 10^3$  клеток в мкл, тромбоцитов  $\approx 1,0 \times 10^6$  клеток. Конечная концентрация дрожжевых клеток в тромбоцитарно-лейкоцитарной плазме была  $\approx 20,0 - 25,0 \times 10^3$  клеток в мкл, лейкоцитов  $5,0 - 7,0 \times 10^3$  клеток в мкл и тромбоцитов  $\approx 1,0 \times 10^6$  клеток. После приготовления смеси образцов плазмы с дрожжевыми клетками содержание последних измерялось на гематологическом анализаторе. Далее для активации процесса свертывания во все образцы добавляли 10% хлорид кальция из расчета 0,05 мл на каждый миллилитр плазмы, пробирки помещали в водяную баню на один час при  $t = 37,0^\circ\text{C}$ . После образования и ретракции сгустков их извлекали и помещали в раствор формалина приготовленного на фосфатном буфере pH – 7,4. В отделившейся сыворотке повторно измеряли количество дрожжевых клеток. Из сгустков готовили гистологические препараты толщиной черыте-пять мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином и по Грам-Вейгерту. Микроскопию проводили на микроскопе Люам И-2, оборудованном 5 мегапиксельной цифровой камерой. Просмотр изображений и их цифровую фиксацию осуществляли на персональном компьютере с программным обеспечением ScopePhoto Image Software Ver 3.1.386, 2009.

Исследования показали, что все дрожжевые клетки, исходно равномерно распределены в безтромбоцитарной цитратной плазме (Рисунок 14 А), но уже

после активации процесса фибриногенеза путем добавления хлористого кальция - отсутствуют в жидкой фракции, отделившейся от сгустка после его образования и ретракции (Рисунок 14 Б). Аналогичная картина наблюдается и в случае использования плазмы богатой тромбоцитами или тромбоцитарно-лейкоцитарной плазмы. И дрожжевые клетки, и тромбоциты практически полностью оказываются заключёнными в сгустке, а в отделившейся сыворотке визуализируются только их следовые количества (Рисунок 15).

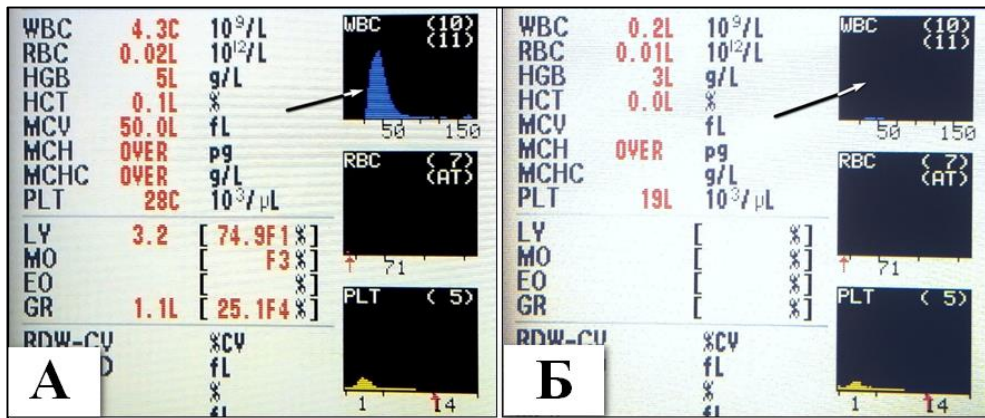


Рисунок 14 –А - исходное содержание дрожжевых клеток в цитратной плазме, которые визуализируются в верхнем - лейкоцитарном окне гистограммы (указано стрелкой). Б - отсутствие дрожжевых клеток в отделившейся сыворотке после образования и ретракции фибринового сгустка (указано стрелкой).

При гистологическом исследовании безтромбоцитарных сгустков видно, что дрожжевые клетки оказываются зафиксированными между нитями фибрина, которые вплотную прилегают к их поверхности (Рисунок 16 А, В, Г(а)) или образуют вокруг них капсулу (Рисунок 16 Б, Г(б)). В тромбоцитарном сгустке дрожжевые клетки оказываются в плотном окружении агрегированных тромбоцитов (Рисунок 17 (а)). Причем, по аналогии с бесклеточным сгустком, вокруг некоторых дрожжевых клеток агрегированные тромбоциты также формируют подобие капсулы (Рисунок 17 (б)).

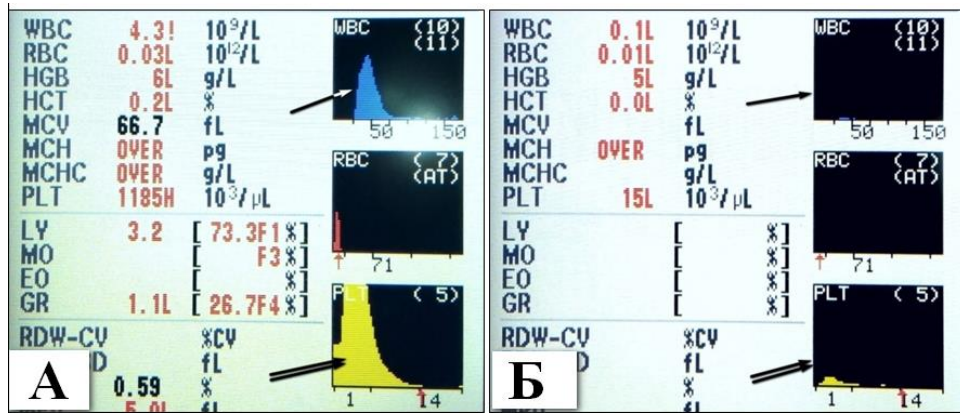


Рисунок 15 – А - исходное содержание дрожжевых клеток в цитратной тромбоцитарной плазме, которые визуализируются в верхнем - лейкоцитарном окне гистограммы (указано стрелкой) В нижнем окне гистограммы двойными стрелками указаны тромбоциты. Б - отсутствие дрожжевых клеток в отделившейся сыворотке после образования и ретракции фибриново-тромбоцитарного сгустка (указано стрелкой).

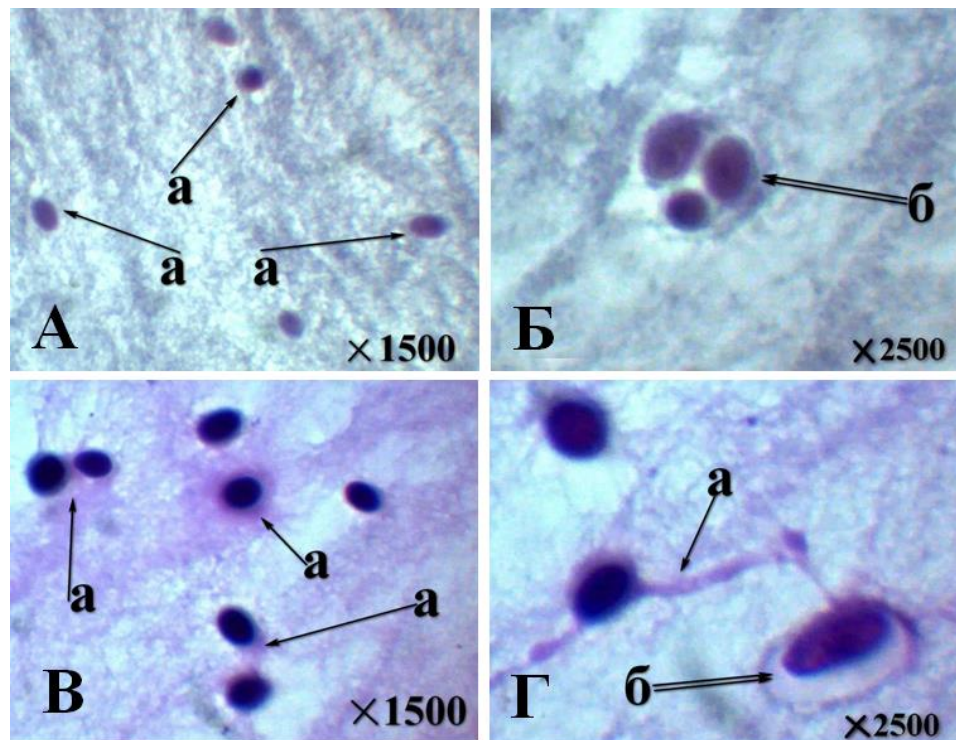


Рисунок 16 – Морфология фибриновых сгустков, образовавшихся из плазмы, в которую были добавлены инактивированные кипячением клетки пекарских дрожжей: а - дрожжевые клетки оказываются плотно зафиксированными между нитями фибрина, которые плотно прилегают к их поверхности или разует вокруг них капсулу – б; А и Б – окраска гематоксилином и эозином; В и Г – окраска по Грам-Вейгерту. Использовано дополнительное цифровое увеличение микрофотографий.

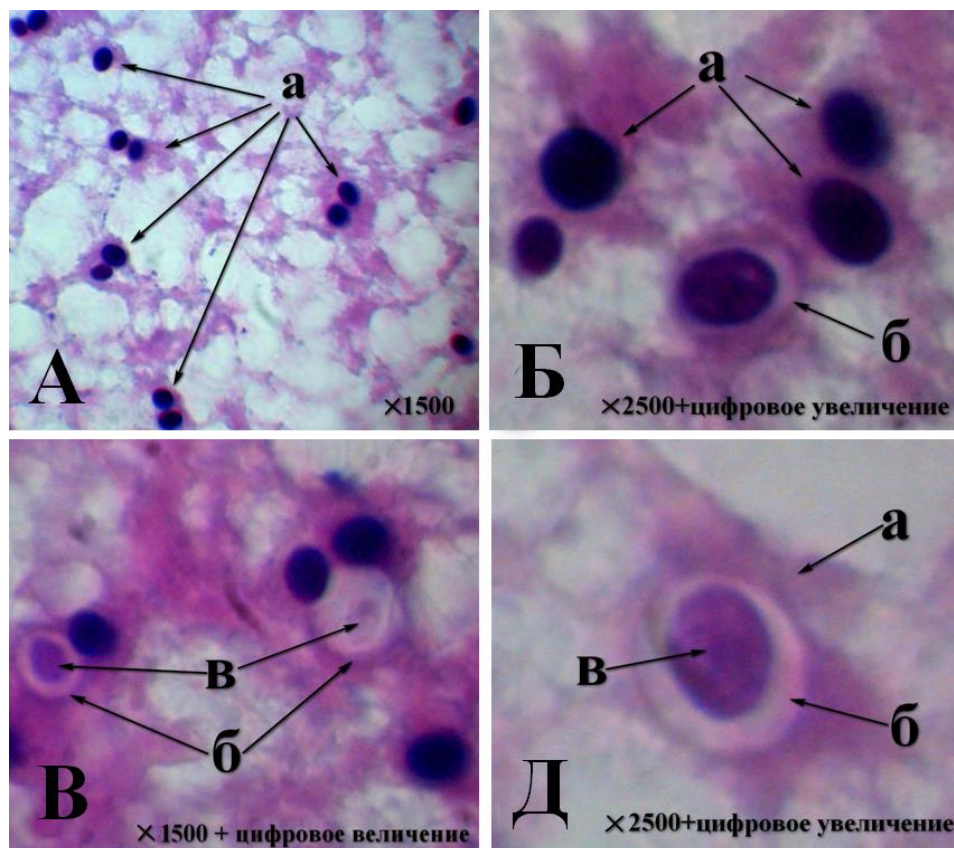


Рисунок 17 – Морфология фибриново-тромбоцитарных сгустков, образовавшихся из плазмы, в которую были добавлены инактивированные кипячением клетки пекарских дрожжей: а - дрожжевые клетки плотно зафиксированные между агрегированными тромбоцитами; б - капсулы образованные агрегированными тромбоцитами вокруг дрожжевых клеток. в – слабоокрашенные по Граму дрожжевые клетки находящиеся в капсулах образованных агрегированными тромбоцитами.

Окраска по Грам-Вейгерту. Использовано дополнительное цифровое увеличение микрофотографий.

Некоторая часть дрожжевых клеток, находящихся в таком тромбоцитарном окружении, гораздо слабее окрашиваются по Граму, что может свидетельствовать о процессе разрушения пептидогликана их оболочки (Рисунок 17 (в)). При исследовании гистологического материала, приготовленного из фибрин-тромбоцитарно-лейкоцитарных сгустков, в которые были добавлены клетки пекарских дрожжей (Рисунок 18 а), отчетливо визуализируется процесс фагоцитоза последних (Рисунок 18 б).



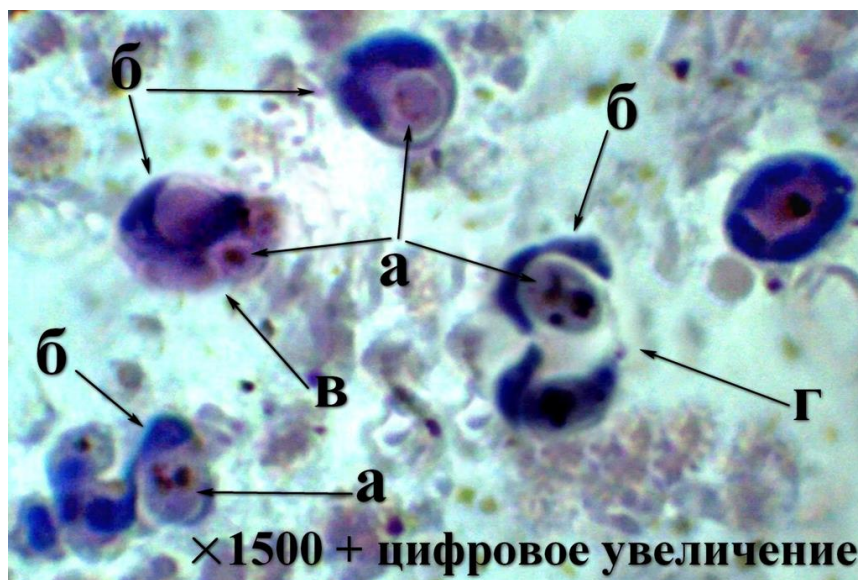


Рисунок 18 – Морфология тромбоцитарных-лейкоцитарных сгустков образовавшихся из плазмы, в которую предварительно были добавлены инактивированные кипячением клетки пекарских дрожжей. На представленном гистологическом препарате видно, что дрожжевые клетки (а) активно фагоцитируются присутствующими лейкоцитами (б). Встречаются лейкоциты фагоцитирующие сразу несколько дрожжевых клеток (в), а так же фагоцитоз одной дрожжевой клетки двумя лейкоцитами (г). Окраска гематоксилином-эозином. Использовано дополнительное цифровое увеличение микрофотографий.

Фагоцитарную активность лейкоцитов сгустка можно охарактеризовать, как активную, так как в некоторых полях зрения встречаются лейкоциты фагоцитирующие сразу несколько дрожжевых клеток (Рисунок 18 в), а также фагоцитоз одной дрожжевой клетки двумя лейкоцитами (Рисунок 18 г). Дополнительное исследование на *in vitro* модели, в которой сгусток, приготовленный из крови обогащенной лейкоцитами, имитирующий раневой сгусток, тесно контактировал с тромбоцитарным сгустком, имитирующим стенку раны (Рисунок 19), показал, что гранулоциты из лейкоцитарного сгустка скапливаются на его периферии (Рисунок 20), а затем мигрируют в тромбоцитарный сгусток (Рисунок 20).

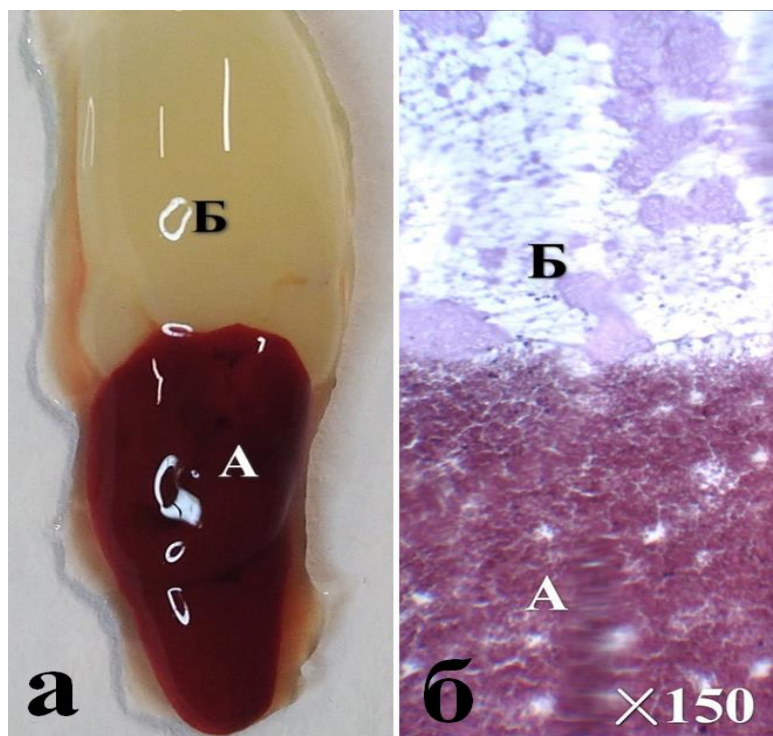


Рисунок 19 – Морфология комбинированного сгустка:  
 а – макроморфологическая картина комбинированного сгустка; б - гистологическая картина контакта между тромбоцитарным сгустком и сгустком приготовленным из лейкоцитарной пленки образовавшийся после центрифугирования крови; А – лейкоцитарный сгусток; Б – тромбоцитарный сгусток. Окраска по гематоксилином и эозином.

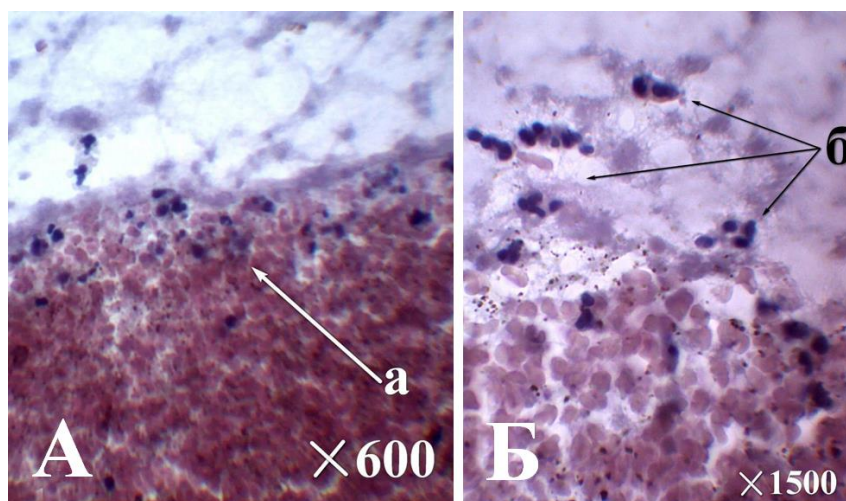


Рисунок 20 – Морфология комбинированного сгустка после 60-минутной инкубации при  $t = 37^{\circ}\text{C}$ :  
 А - гранулоциты лейкоцитарного сгустка, скопившиеся на его периферии (а); Б – гранулоциты лейкоцитарного сгустка, мигрировавшие в тромбоцитарный сгусток (б). Окраска по гематоксилином и эозином.

## 2.2.4 Влияние различных образцов цитратной аутоплазмы на здоровую кожу крыс

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

Как было описано в разделе «Обзор литературы», 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 (Рисунок 21).

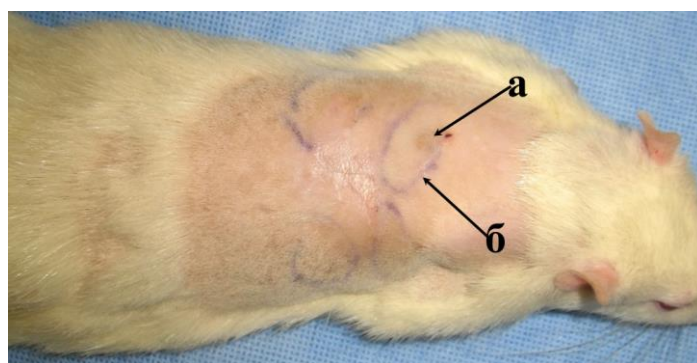


Рисунок 21 – Лабораторная крыса после внутрикожного введения образцов плазмы:  
а – место введения образца плазмы; б – маркировка зоны введения плазмы.

Наблюдение вели в течение 10 суток. Через трое суток на максимуме макро морфологических со стороны кожных покровов, 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 макро морфологических 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 (Рисунок 22 Б (а), Д (б), З (б)). Напротив, в коже животных, которым вводили тромбоцитарную плазму, лейкоцитарный инфильтрат хоть и был, но в очень незначительном количестве, и визуализировался только при значительном увеличении (Рисунок 22 Е (в), и И (в)).

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 (Рисунок 23). Ретроспективный анализ клеточного состава плазмы, введенной этим животным показал наличие в ней достаточно большое количество лейкоцитов (Рисунок 24).

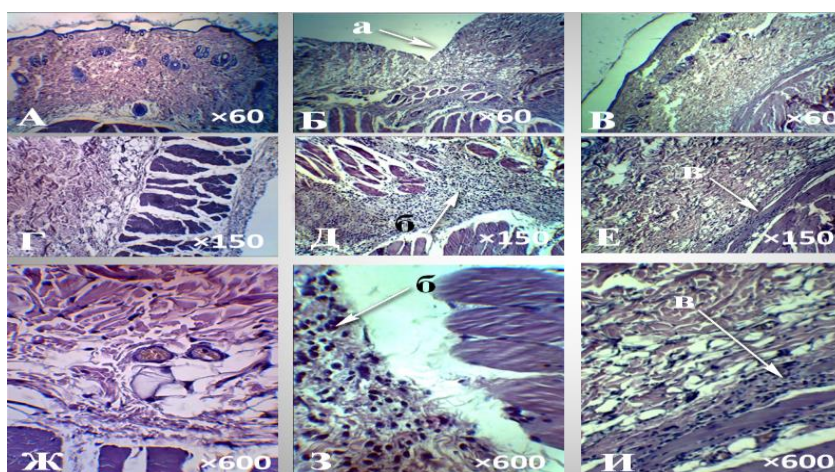


Рисунок 22 – Морфологические изменения в коже здоровых крыс через три дня после внутрикожного введения бесклеточного или тромбоцитарного образцов плазмы: А, Г, Ж – интактная кожа под разным увеличением; Б, Д, З – кожа после введения бесклеточной плазмы. В, Е, И – кожа после введения тромбоцитарной плазмы. Окраска гематоксилином и эозином.



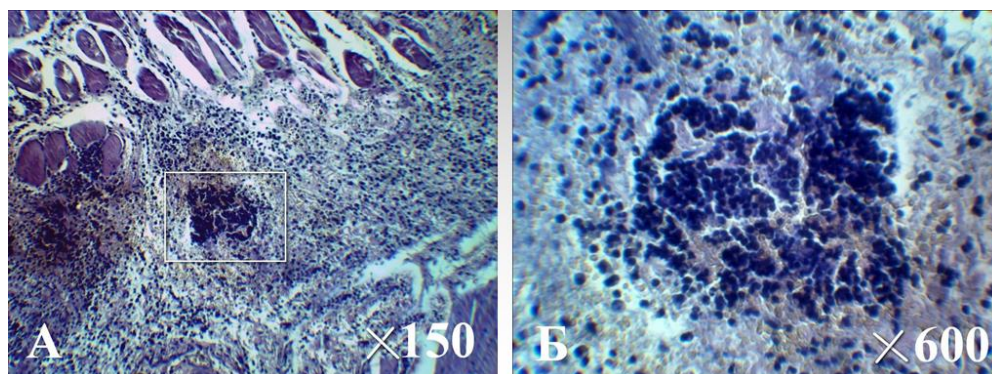


Рисунок 23 – Микроабсцесс в толще кожи после введения тромбоцитарной плазмы контаминированной лейкоцитами:

А – выделенный участок локализации микроабсцесса;

Б – увеличенный участок локализации микроабсцесса. Окраска гематоксилином и эозином.

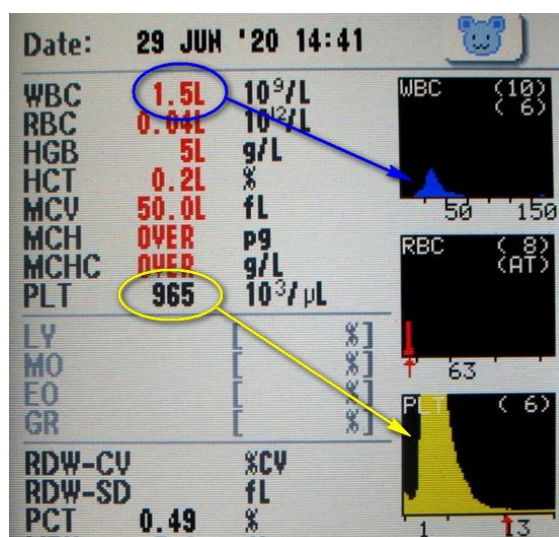


Рисунок 24 – Гистограмма гематологических параметров тромбоцитарной плазмы полученной из цитратной крови методом центрифугирования.

Гистограмма показывает, что среди тромбоцитов (выделены желтым цветом) имеет место большое количество лейкоцитов (выделены синем цветом).

### 2.2.4.2 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 несколько измененными условиями эксперимента (Рисунок 25).

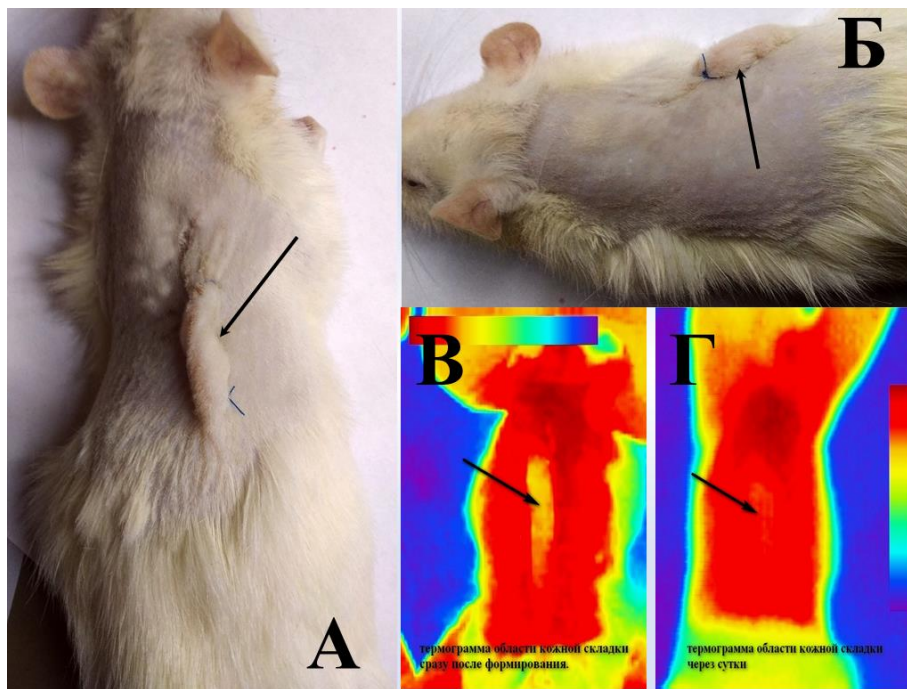


Рисунок 25 – Подготовка кожной складки для последующего введения образцов плазмы: А, б – внешний вид кожной складки, подготовленной для введения образцов полученной плазмы; В – термограмма кожной складки сразу после приготовления. Температура понижена вследствие нарушения кровотока; Г - термограмма кожной складки через сутки после приготовления. Температура нормализовалась вследствие восстановления кровотока.

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 (Рисунок 26). Биопсийный материал кожи для последующего гистологического исследования брали через одни, трое и семь суток после инъекции.

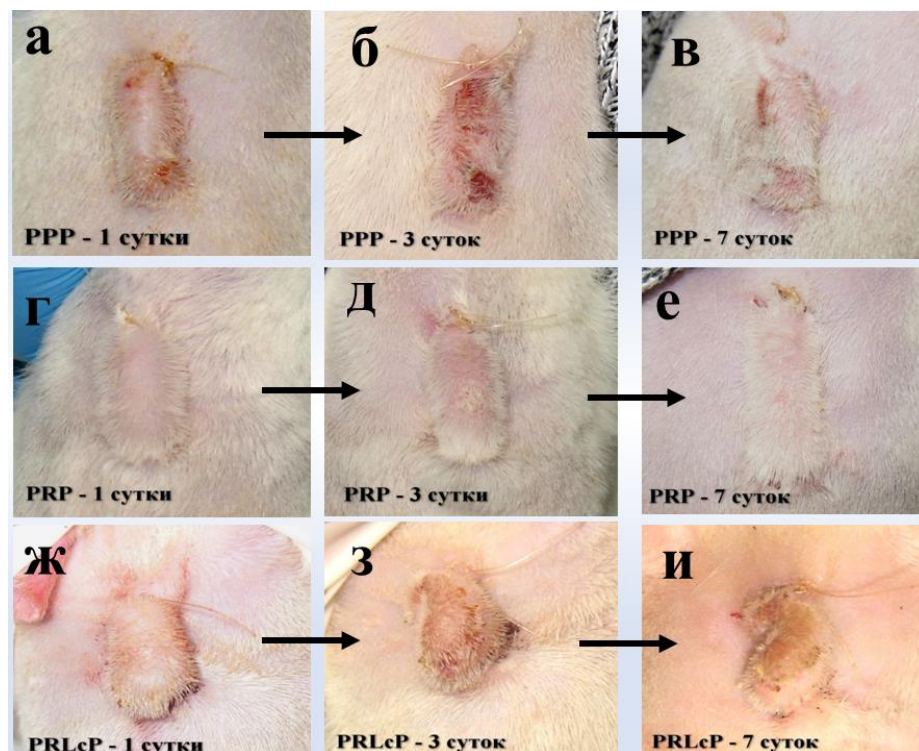


Рисунок 26 – Состояние кожного покрова крыс в первые сутки (а, г, ж), третьи сутки (б, д, з) и седьмые сутки (в, е, и) после введения различных образцов плазмы:

а, б, в - Реакция кожного покрова крыс на введения бесклеточной плазмы; г, д, е - Реакция кожного покрова крыс на введения плазмы обогащенной тромбоцитами; ж, з, и - Реакция кожного покрова крыс на введения тромбоцитарно-лейкоцитарной плазмы.

Согласно полученным результатам, через сутки после введения все образцы плазмы и бесклеточная, и тромбоцитарная, и тромбоцитарно-лейкоцитарная на макроморфологическом уровне индуцировали сходную местную реакцию, сопровождающуюся отеком (Рисунок 26 а, г, ж). Однако, микроскопические исследования биоптатов показали, что при введении тромбоцитарной плазмы,



реактивные изменения сопровождались только умеренной лейкоцитарной инфильтрацией дермы (Рисунок 28 А (а)). В то время как при введении бесклеточной и тромбоцитарно-лейкоцитарной плазмы, визуализировалась очень сильная лейкоцитарная инфильтрация на границе эпидермиса и дермы (Рисунок 27 А(б), Рисунок 29 А(б)), приводящая к концу третьих суток к еще большей инфильтрации в случае введения бесклеточной плазмы (Рисунок 27 Б (б) и к полному отслаиванию участков эпидермиса в случае введения тромбоцитарно-лейкоцитарной плазмы (Рисунок 29 Б(б)). Макроморфологически это проявлялось десквамативным дерматитом (Рисунок 26 б, з). Через семь суток от начала эксперимента кожа животных, которым вводили тромбоцитарную плазму макро- и гистоморфологически, соответствовала состоянию близкому к норме (Рисунок 26 Е), (Рисунок 28 В). В случае введения бесклеточной плазмы через семь суток от начала эксперимента на фоне исчезновения подэпидермальной лейкоцитарной инфильтрации (Рисунок 27 В(б)) уменьшались и макроморфологические признаки десквамативного дерматита (Рисунок 26 В).

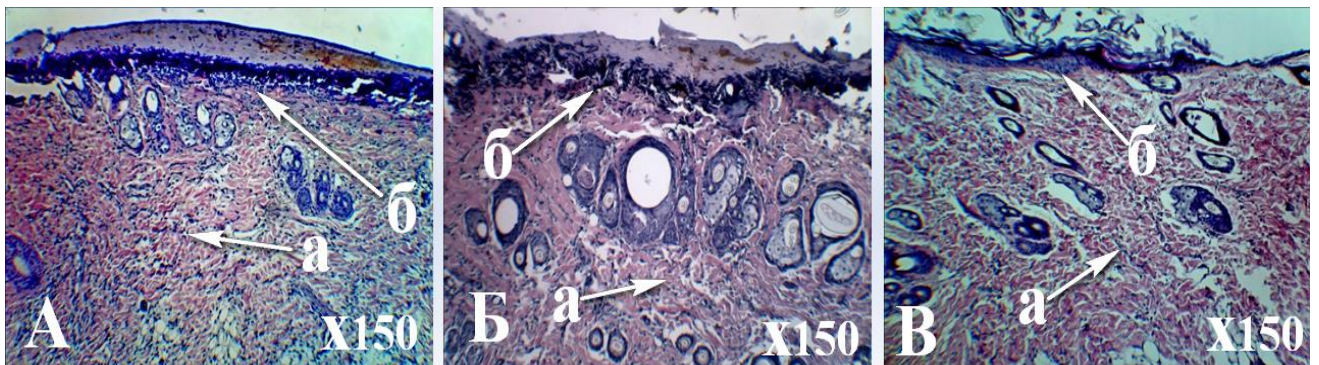


Рисунок 27 – Гистоморфология кожи крыс через сутки (А), через трое суток (Б) и через неделю (В) после введения бесклеточной аутологичной плазмы:

а - морфология дермы; б – морфология эпидермиса. Окраска препаратов гематоксилином и эозином.

В тех вариантах эксперимента, где была инъецирована тромбоцитарно-лейкоцитарная плазма через семь суток, макроморфологические признаки дерматита не уменьшились (Рисунок 26 И), а микроскопически визуализировалось усиление лейкоцитарной инфильтрации дермы (Рисунок 29 В (а)).

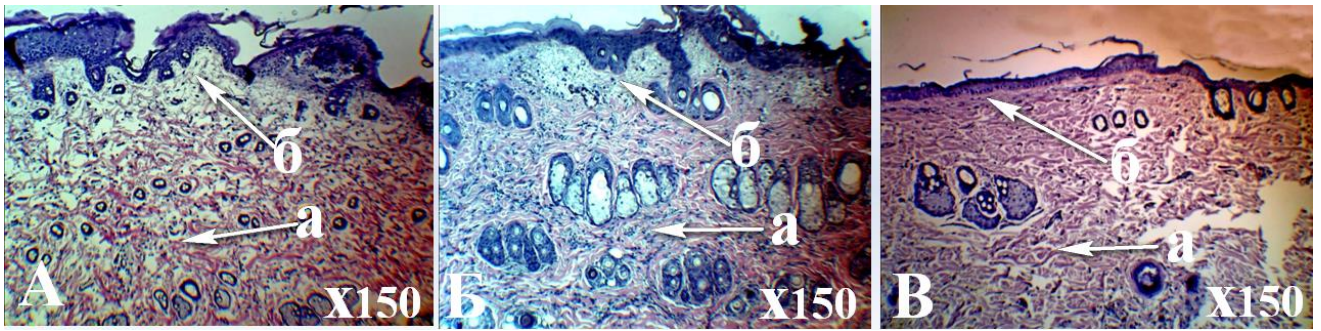


Рисунок 28. Гистоморфология кожи крыс через сутки (А), через трое суток (Б) и через неделю (В) после введения аутологичной плазмы обогащенной тромбоцитами:

а - морфология дермы; б – морфология эпидермиса. Окраска препаратов гематоксилином и эозином.

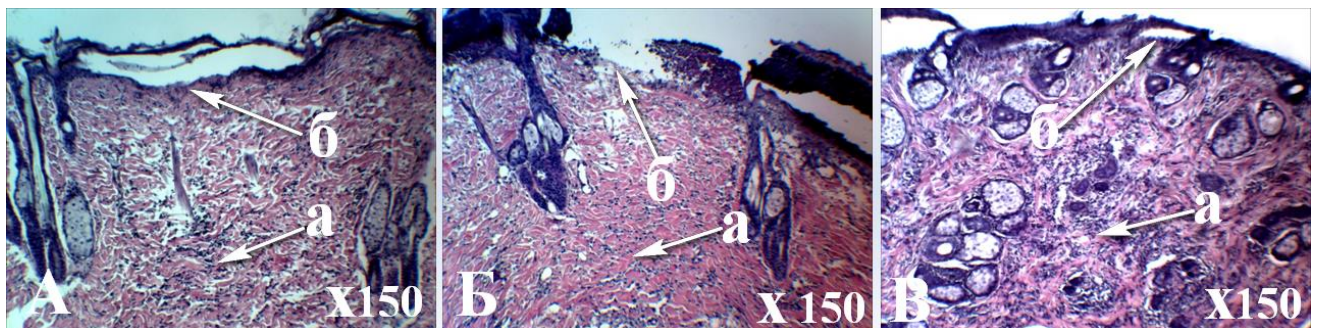


Рисунок 29 – Гистоморфология кожи крыс через сутки (А), через трое суток (Б) и через неделю (В) после введения аутологичной тромбоцитарно-лейкоцитарной плазмы:

а - морфология дермы; б – морфология эпидермиса. Окраска препаратов гематоксилином и эозином.

Эксперименты с внутрикожным и подкожным введением образцов плазмы, качественно и количественно отличающихся различным клеточным содержанием, показали, что только плазма, обогащенная тромбоцитами и не имеющая лейкоцитов, не обладает или обладает слабым флогогенным эффектом по отношению к тканям, в которые была введена. Напротив, бесклеточная плазма и плазма, содержащая кроме тромбоцитов еще и лейкоциты, индуцируют по месту их введения сильную воспалительную реакцию. Причем воспаление, индуцируемое введением тромбоцитарно-лейкоцитарной плазмы, может быть настолько сильным, что проявляться, в том числе, и некрозами. Если причина сильной воспалительной реакции, индуцируемой тромбоцитарно-лейкоцитарной плазмой, может быть объяснена с точки зрения лейкоцитарных медиаторов воспаления, провоспалительных цитокинов и выделяемых в межклеточную среду

протеолитических ферментов, то причина флогогенного эффекта чистой плазмы остается дискуссионной, поскольку противоречит общепринятому мнению, что аутологичный продукт не должен вызывать воспалительной реакции. Наиболее вероятным объяснением данного артефакта представляется то, что введение бесклеточной плазмы с одной стороны чисто механически за счет увеличения межтканевого давления оказывают травмирующий эффект, а с другой - тем, что локально введенный фибрин воспринимается резидентными клетками врожденного иммунитета как молекулярный паттерн повреждения. Обе перечисленные причины являются триггерами воспалительной реакции, которая не нивелируется противовоспалительными цитокинами тромбоцитов.

Из всего вышесказанного, следует сделать вывод, что с лечебной целью в форме инъекций следует использовать только тромбоцитарную плазму. Необходимо избегать инъекирования тех образцов тромбоцитарной плазмы, которые контаминированы лейкоцитами. А в отношении бесклеточной плазмы следует проявлять осторожность. Вероятно, ее можно использовать для введения в ткани низкой плотности, например, в подкожную клетчатку, где вероятность высокого интрацеллюлярного травмирующего давления будет минимизирована. И не следует вводить в ткани высокой плотности, например, такие как сухожилия и связки.

### **2.2.5 Влияние различных образцов цитратной аутологичной плазмы на поврежденную кожу лабораторных крыс**

При моделировании кожных ран в эксперименте нами была изучена возможность применения асептической резаной раны у пяти лабораторных крыс. Было установлено, что данная модель раневого дефекта не может быть использована в эксперименте ввиду слишком быстрого заживления таких ран (в течение двух, трех дней, что не позволяет достоверно оценить эффективность ранозаживляющих препаратов).



Для оценки эффективности тромбоцитарной плазмы с разным клеточным составом нами были применены следующие модели ран – ожоговая и резано-ожоговая.

### 2.2.5.1 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.

Образец тромбоцитарно-лейкоцитарной плазмы был исключен из эксперимента по причине, как это было установлено ранее, его слишком сильного флогогенного эффекта в том случае, когда такая плазма вводится в ткани инъекционно. В качестве предмета, наносящего термическую травму, использовали омедненный диск диаметром 20,0 мм нагретый в пламени газовой горелки до температуры 300,0<sup>0</sup>С (Рисунок 30).

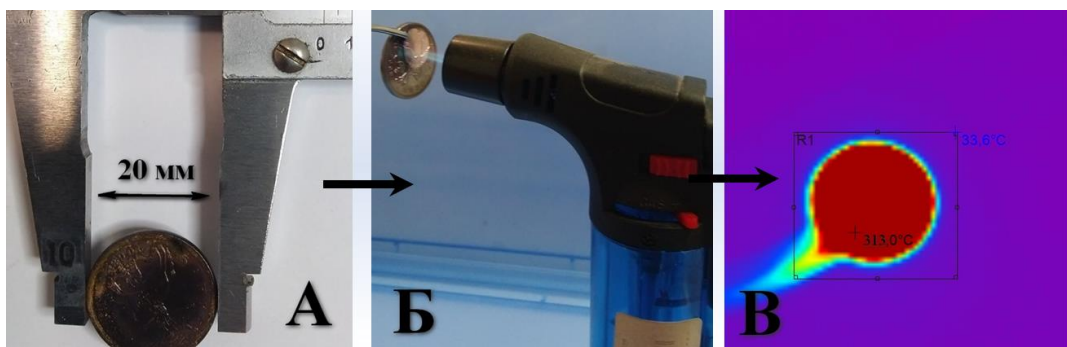


Рисунок 30 – Подготовительные процедуры нанесения ожоговой раны лабораторным крысам: А – омедненный диск диаметром 20 мм. (50-ти копеечная монета); Б – помещение омедненного диска в пламя газовой горелки; В – нагрев омедненного диска в пламени газовой горелки, примерно, до 300,0<sup>0</sup>С (термографическое изображение).

Нагретый диск прикладывали на две-три секунды к предварительно выбритой коже крыс в межлопаточной области (Рисунок 31А). Производили фото фиксацию полученных повреждений, а также термографию с целью последующего мониторинга их размера в процессе лечения (Рисунок 31 Б). Лечение ожоговых ран начинали через пять суток после нанесения травмы. Опытным животным один раз в пять, семь дней вводили образцы плазмы вокруг и под патологический очаг в объеме 0,1 мл. Бесклеточная плазма – опытная группа № 1. Плазма, обогащенная тромбоцитами – опытная группа № 2. Контрольным животным лечение не проводилось.

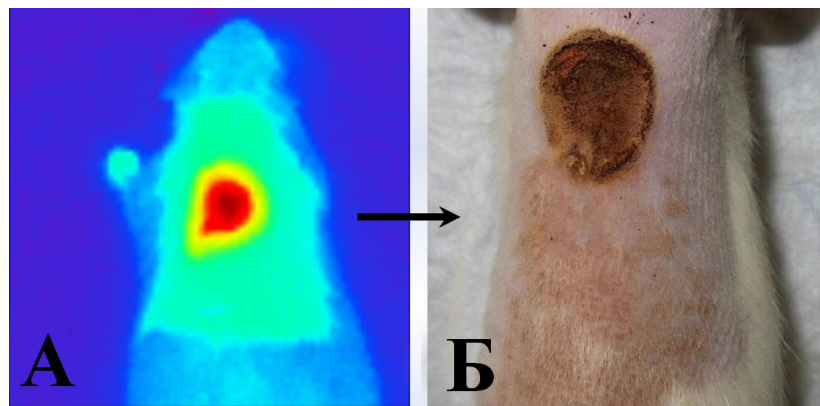


Рисунок 31 – Методика нанесения ожоговой раны третьей степени лабораторным крысам:  
 А – аппликация нагретого омедненного диска на кожу животного на две-три секунды (термографическое изображение); Б – внешний вид ожоговой раны сразу после ее нанесения.

Мониторинг и оценку заживления ран осуществляли путем измерения их площади, используя программное обеспечение для планиметрических исследований IpSquare v5.0 for Windows from LProSoft. Фото фиксацию и фото документирование осуществляли на момент нанесения ожоговой раны и далее на пятый день после травмы (первое введение образцов плазмы), на 14 день после травмы, на 23 день после травмы и на 30 день после травмы. По окончании эксперимента все фотографии загружались в программу для планиметрических исследований. Программа настраивалась по графическому объекту с известной площадью (Рисунок 32 А). Далее у каждого животного проводился расчет площади раневых дефектов, зафиксированных в динамике на протяжении всего периода исследований (Рисунок 32 Б).



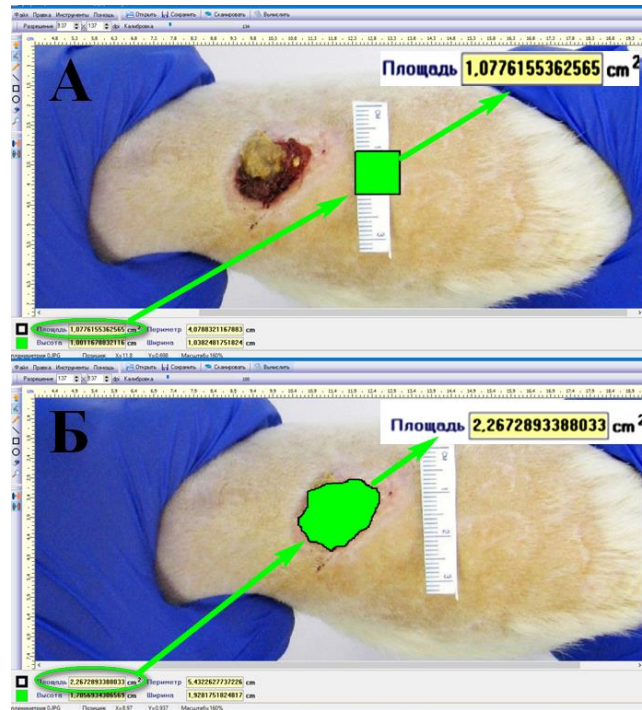


Рисунок 32 – Методика планиметрических исследования раневого процесса с использованием программы IpSquare v5.0 for Windows from LProSoft:  
 А – настройка программы по объекту с известной величиной площади; Б - расчет площади раневого повреждения.

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 33 (И, К, Л, М) в сравнении с бесклеточной плазмой (Рисунок 33 (Д, Е, Ж, З)) контракция краев раневого дефекта и реорганизация рубца (Таблица 7) происходит быстрее.



Рисунок 33 – 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.

Таблица 7 - Изменение в процессе лечения площади раневого дефекта, вызванного термической травмой. Экспериментальный объект крысы линии «Вистар».

N	Вид лечения	n	Размер раны на момент исследования (см <sup>2</sup> ) *				Размер рубца на 30 день (см <sup>2</sup> )
			5 суток	14 суток	23 суток	30 суток	
1	Контроль (без лечения)	n=10	4,54± 0,26	4,43± 0,16	0,99± 0,17	0,48± 0,07	3,45± 0,46
2	Группа №1 (бесклеточная плазма)	n=10	4,32±0,42	2,92±0,58	1,00±0,29	0,10±0,05	2,88±0,47
3	Группа №2 (тромбоцитарная плазма)	n=10	4,67±0,27	1,23±0,47	0,20±0,07	0,02±0,03	0,24±0,07
* - на момент создания средний размер ожоговой раны всех животных (n = 30) составлял 4,25 ± 31 см <sup>2</sup> .							
<b>ДОСТОВЕРНОСТЬ РАЗЛИЧИЯ</b> Множественные сравнения - критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони			и 2: t= 3.03 P<0.05 и 1: t= 1.51 P>0.05 и 1 и 2: t= 1.51 P>0.05	и 1 и 3: t= 16.23 P<0.05 и 1 и 2: t= 10.86 P<0.05 и 2 и 3: t= 25.38 P<0.05	и 2 и 3: t= 9.02 P<0.05 и 2 и 1: t= 0.11 P>0.05 и 1 и 3: t= 8.91 P<0.05	и 1 и 3: t= 11.18 P<0.05 и 1 и 2: t= 4.62 P<0.05 и 2 и 3: t= 6.56 P<0.05	и 1 и 3: t= 19.56 P<0.05 и 1 и 2: t= 16.15 P<0.05 и 2 и 3: t= 3.40 P<0.05

На 30 сутки с момента нанесения ожога у животных, которым в качестве лечения применяли инъекции плазмы, обогащенной тромбоцитами, контракция краев раны происходила полностью, а рубец имел минимальные размеры (Таблица 7). Раневой дефект у тех животных, которым в качестве лечения применяли инъекции бесклеточной плазмы, к 30 дню не закрылся полностью, но был значительно ( $\approx$  в 5 раз) меньше, чем у животных контрольной группы. В то же время площадь рубца у этой опытной группы хоть и была достоверно меньше по сравнению с площадью рубца в группе контроля, но оставалась значительной (Таблица 7).

Графическое представление динамики раневого процесса в сравниваемых группах показывает, что резкая активная контракция краев раневого дефекта наблюдается только у тех животных, которым в качестве лечения использовали введение плазмы, обогащенной тромбоцитами (Рисунок 34). В контрольной (не леченой) группе активный процесс сокращения площади раневого дефекта начинался только с 14 дня. До 14 дня раневой дефект хоть и сокращался в размерах, но происходило это медленно (Рисунок 34). В группе животных, которым в качестве лечения использовали введение бесклеточной плазмы, скорость контракции краев раневого дефекта занимала среднее положение в сравнении с нелеченым контролем и группой, которую лечили введением плазмы, обогащенной тромбоцитами (Рисунок 34).

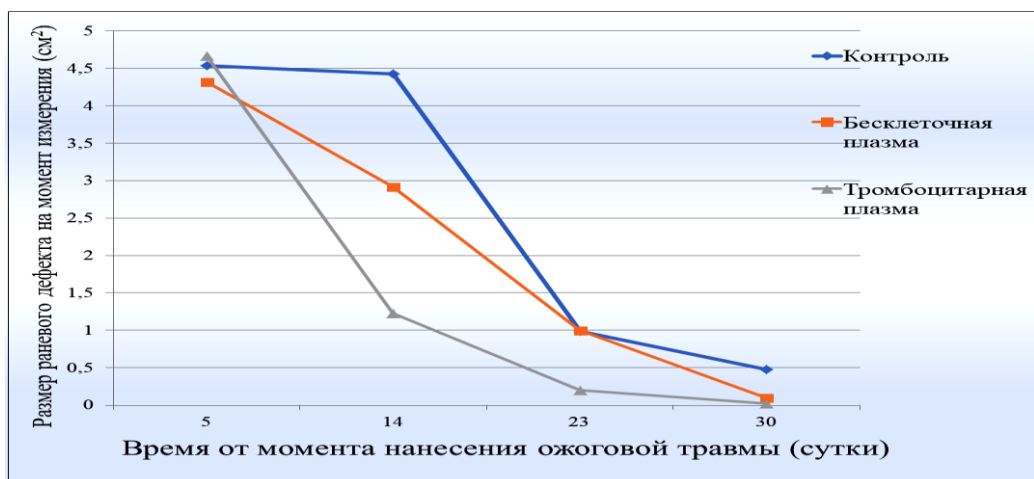


Рисунок 34 – Графическое отображение динамики заживления ожоговой раны при лечении бесклеточной и тромбоцитарной плазмой.

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

Исследование проводилось на крысах линии «Вистар». Задачей исследования было выяснить, как различные компоненты кровяного сгустка влияют на течение раневого процесса.

С этой целью было сформировано четыре группы животных. Под общей анестезией крысам в межлопаточной области наносили резано-ожоговую рану. Рану наносили скальпелем, нагретым в пламени газовой горелки до, примерно, 300,0<sup>0</sup>С (Рисунок 35 А). Длина раны составляла 14,0 – 15,0 мм (Рисунок 35 Б). Через трое суток после нанесения раны (Рисунок 35 В) проводили вначале ферментативную некрэктомию путем 60 минутных аппликаций раствор трипсина (10,0 мг/мл), а затем хирургическую некрэктомию (Рисунок 35 Г). После окончания процедуры некрэктомии животных распределяли на четыре группы. В каждой группе по 10 крыс. У первой группы крыс (Контроль № 1) раны не ушивали (Рисунок 35 Д). У второй группы крыс (Контроль № 2) раны ушивали, но без внесения фибринового сгустка (Рисунок 35 Е). Двум другим группам крыс раны ушивали, предварительно поместив в них сгустки (Рисунок 35 Ж). У третьей группы крыс (Опыт №1) раны ушивали, предварительно поместив в них тромбоцитарный сгусток (Рисунок 35 З). У четвертой группы крыс (Опыт № 2) раны ушивали, предварительно поместив в них тромбоцитарно-лейкоцитарный сгусток (Рисунок 35 И). Течение раневого процесса оценивали по характеру местных реакций (отек, экссудация, контракция, состояние струпа, состоятельность швов).

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 37 Л, П) по сравнению с контролем № 1 и контролем № 2 (Рисунок 36 В, Ж). К 28 дню во всех четырех группах раны зажили полностью. Однако, максимальное ремоделирование рубца отмечено в опытной группе № 3, где был использован тромбоцитарный сгусток (Рисунок 37 М).



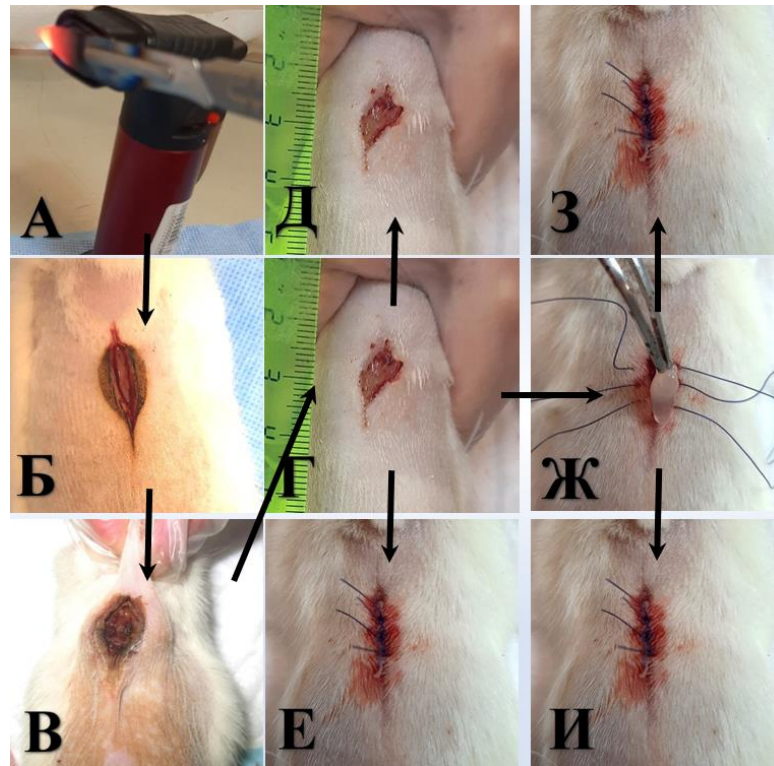


Рисунок 35 – Подготовительные этапы эксперимента по определению ранозаживляющей эффективности тромбоцитарного и тромбоцитарно-лейкоцитарного сгустков:  
 А – Подготовка скальпеля; Б – Нанесение ожоговой резаной раны; В – Внешний вид раны через двое суток после нанесения; Г – Внешний вид раны после ферментативной и хирургической некрэктомии (3 суток); Д – Контроль № 1. Рана, оставленная без ушивания (3 суток); Е – Контроль № 2. Рана ушитая без сгустка (третьи сутки); Ж – Этап помещения сгустка в рану (третьи сутки); З – Опыт № 1. Рана ушитая с тромбоцитарным сгустком (третьи сутки); И – Опыт № 2. Рана ушитая с тромбоцитарно-лейкоцитарным сгустком (третьи сутки).

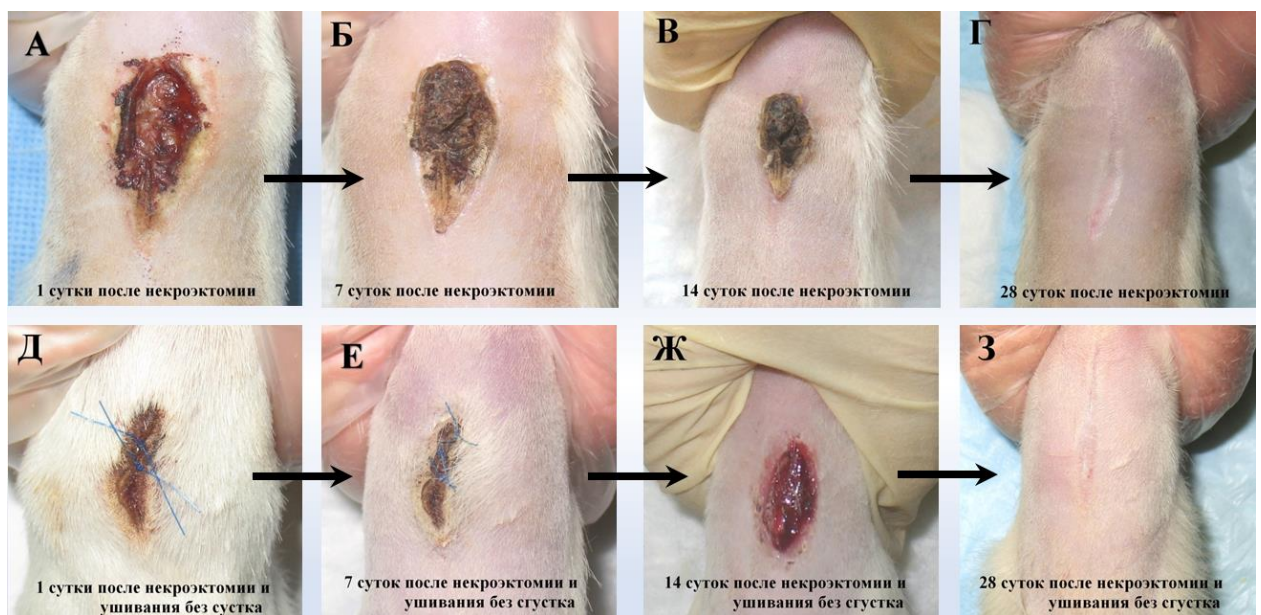


Рисунок 36 – Динамика заживления резано-ожоговой раны после некрэктомии:  
 А, Б, В, Г – без ушивания (Контроль 1); Д, Е, Ж, З – ушивание без сгустка (Контроль 2).

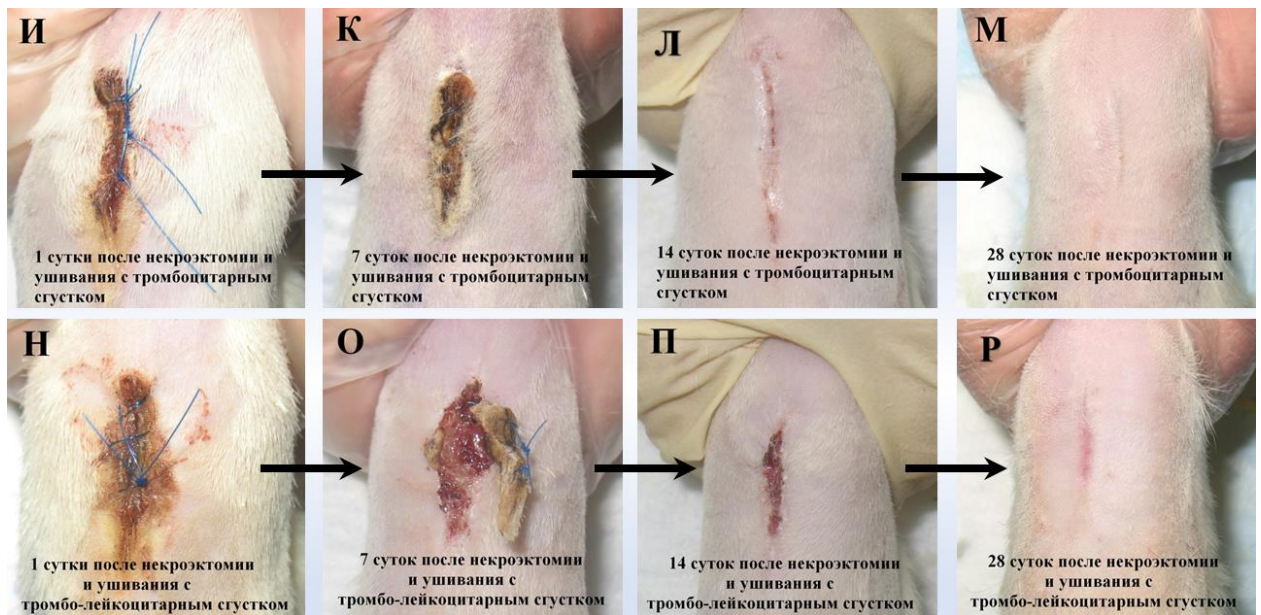


Рисунок 37 – Динамика заживления резано-ожоговой раны после некрэктомии:  
И, К, Л, М – ушивание с тромбоцитарным сгустком (Опыт 1); Н, О, П, Р – ушивание с  
тромбоцитарно-лейкоцитарным сгустком (Опыт 2).

В обеих контрольных группах на данный момент наблюдения рубец оставался более грубым с явными признаками атрофии волосяных фолликулов (Рисунок 36 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 37 О), как это наблюдалось в контрольной группе № 2 на 14 день (Рисунок 36 Ж). Кроме этого, рубец, образовавшийся у животных опытной группы №2 к 28 дню опыта, имел явные признаки избыточной васкуляризации. Вследствие чего, в отличии от рубцов у других групп животных, имел ярко выраженный красный цвет.

При исследовании фибриновых сгустков с различным клеточным составом были подтверждены их антибактериальные свойства. Тромбоцитарный и тромбоцитарно-лейкоцитарный сгустки при их введении в раневой дефект ускоряют заживление раны. К 28 дню после нанесения ожоговой раны у всех групп крыс заживление раны произошло целиком. Немаловажным является максимальная регенерация тканей при введении тромбоцитарного сгустка по сравнению со сгустками с другим составом.

## **2.2.6 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 38) 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.

**Заживление стерильной резаной операционной раны по первичному натяжению после введение в раневой канал тромбоцитарного сгустка.** Исследования проводились на животных в процессе выполнения им плановых операций. Всего было прооперировано пять собак и семь кошек с диагнозами доброкачественные новообразования. До оперативного вмешательства у животного проводили забор крови и выполняли процедуры по выделению тромбоцитарной плазмы и приготовлению из неё тромбоцитарного сгустка.

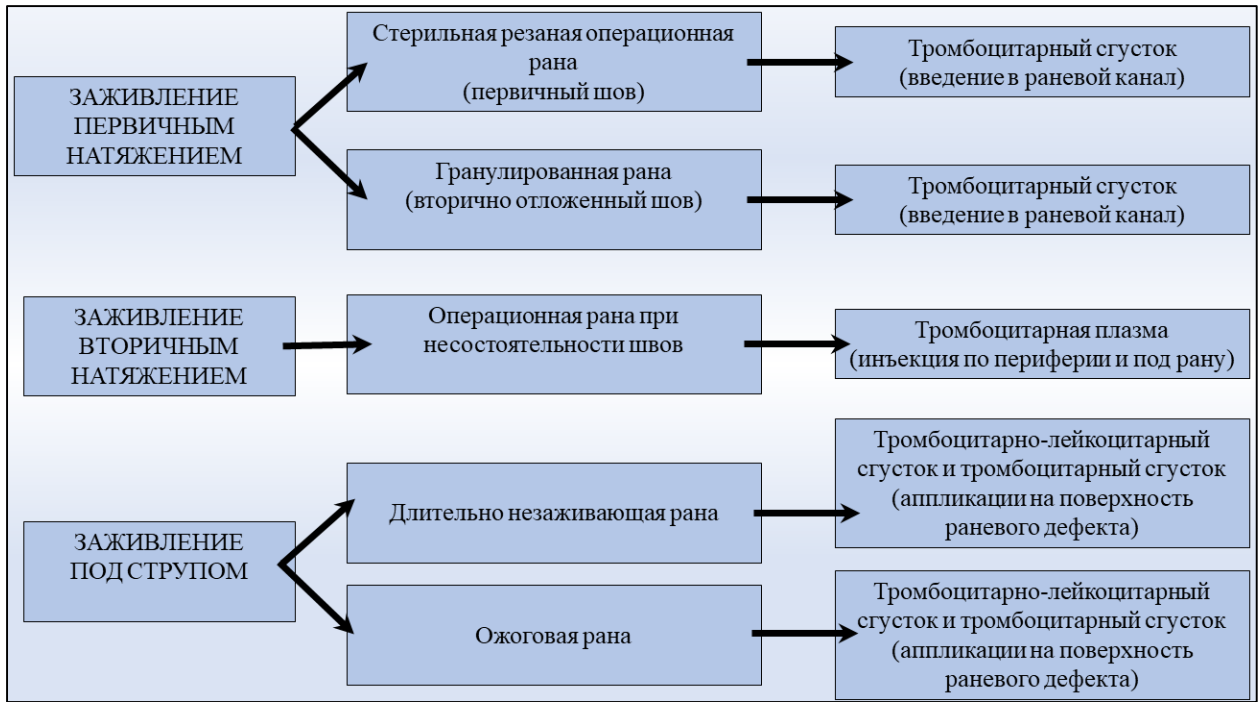


Рисунок 38 – Способ применения тромбоцитарной плазмы и тромбоцитарного или тромбоцитарно-лейкоцитарного сгустков в зависимости от этиопатогенеза раны.

По окончании основной части оперативного вмешательства сгусток закладывали в раневой дефект и проводили ушивание (Рисунок 39 (а, б, в, г)). Результаты исследования показали, что ни в одном из случаев не наблюдалось осложнений в виде воспалительной реакции, несостоятельности швов или серомы. Методика позволяет снимать швы уже на пятый день (Рисунок 39 (д, е)).



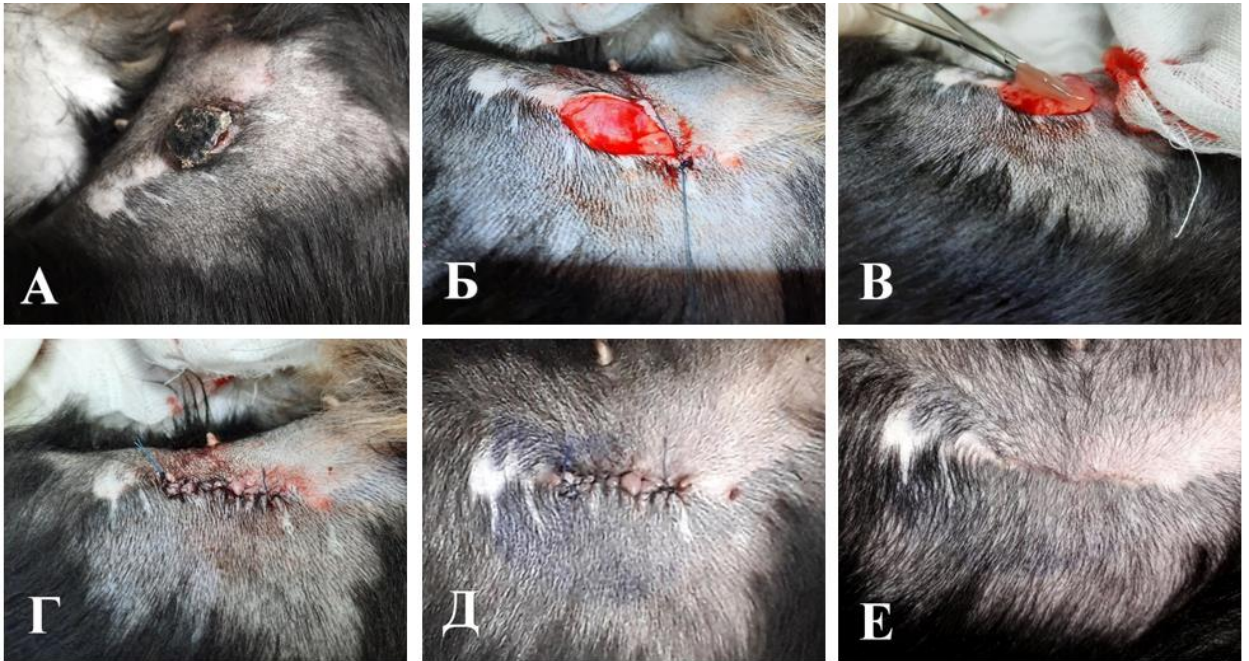


Рисунок 39 – Пример заживления стерильной резаной операционной раны по первичному натяжению у собаки после введение в раневой канал тромбоцитарного сгустка:

А – вид до операции; Б – хирургическая рана; В – внесение тромбоцитарного сгустка до ушивания раны; Г – ушитая рана; Д – внешний вид раны через трое (3) суток после операции; Е – внешний вид рана через неделю после операции и двое (2) суток после снятия швов.

**Заживление гранулирующей раны по первичному натяжению после хирургической некрэктомии, введения в раневой канал тромбоцитарного сгустка и наложения вторичных швов.** Исследования проводились на животных в процессе оперативного лечения ран с патологическими грануляциями. Всего в процессе работы над диссертацией было прооперировано 12 кошек и восемь собак. Операции проводились с целью предотвращения образования грубого рубца в случае заживания раны по вторичному натяжению. До оперативного вмешательства у животного проводили забор крови и выполняли процедуры по выделению тромбоцитарной плазмы и приготовлению из не тромбоцитарного сгустка. Непосредственно в период операции проводили ферментативную и оперативную некрэктомию. По окончании основной части оперативного вмешательства сгусток закладывали в раневой дефект и проводили ушивание (Рисунок 40 (а, б, в, г)). Результаты исследования показали, что эффективность данного лечения аналогичны тем, которые наблюдаются при лечении стерильной резаной раны (Рисунок 40 (д, е)).

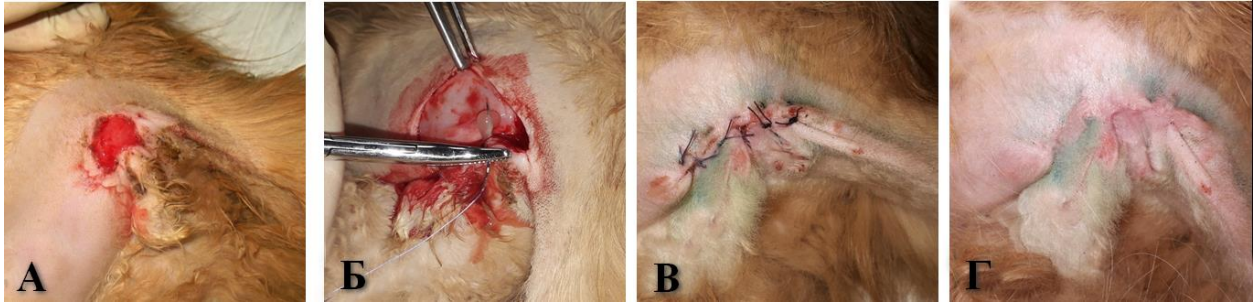


Рисунок 40 – Пример заживления гранулирующей раны по первичному натяжению у кота после хирургической обработки, и введения в раневой канал тромбоцитарного сгустка, и наложения вторичных швов:

А – внешний вид раны до хирургической обработки; Б – внесение тромбоцитарного сгустка перед ушиванием раны; В – внешний вид рана через двое суток после операции. Г - внешний вид рана через шесть (6) суток после операции и двое суток после снятия швов.

**Лечение ран заживающих по вторичному натяжению путем введения тромбоцитарной плазмы.** Исследования проводились на животных с наличием ран, состояние которых было несовместимо с заживлением по первичному натяжению. В частности ран, образовавшихся вследствие несостоятельности хирургических швов, но без явных признаков гнойного воспаления (Рисунок 41 А). Всего за время подготовки диссертационного материала данному методу лечения было подвергнуто девять кошек и четыре собаки. 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 аутолиза тканей краев раны. К седьмым суткам визуализируется интенсивное образование первичного пролиферата (Рисунок 41 Б). Окончательное заживление раны происходит в относительно быстрые, но разные сроки, что зависит от размера раны её локализации и состояния на момент лечения. Практически у всех животных, принимавших участие в исследовании, раны зажили без образования грубого соединительнотканного рубца (Рисунок 41 Е).



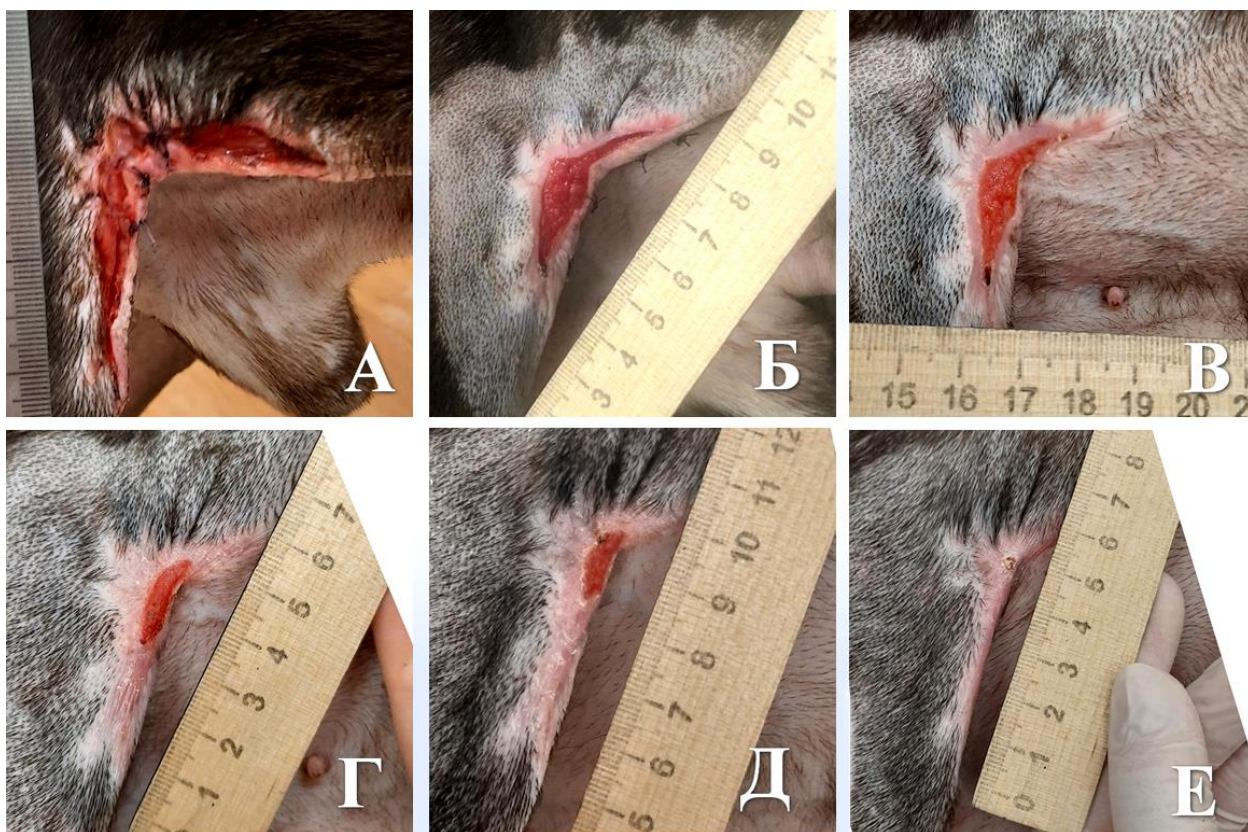


Рисунок 41 – Пример заживление раны по вторичному натяжению у собаки после введения по ее периферии тромбоцитарной плазмы один раз в пять-семь дней:

А – внешний вид до лечения; Б – внешний вид раны через неделю после начала лечения; В – внешний вид раны через 11 суток после начала лечения; Г – внешний вид раны через 19 суток после начала лечения; Д – внешний вид рана через 23 суток после начала лечения; Е - внешний вид раны через 30 суток после начала лечения.

**Лечение поверхностных ран осложненных большим количеством некротизированной ткани.** Исследования проводились на животных с наличием ран, состояние которых было несовместимо с заживление по первичному натяжению, а заживление по вторичному натяжению замедляло наличие большого количества некротизированной ткани. Всего лечению было подвергнуто три кошки и одна собака с ожоговыми ранами третьей степени. 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. Для защиты сгустка от высыхания и соответственно потери его биологической активности сверху крепили водонепроницаемый пластырь, после чего производили бинтование. Результаты

исследования показали, что под действием сгустков, обогащенных лейкоцитами, быстро происходило очищение раны от некротизированной ткани и образовывалась молодая грануляционная ткань.

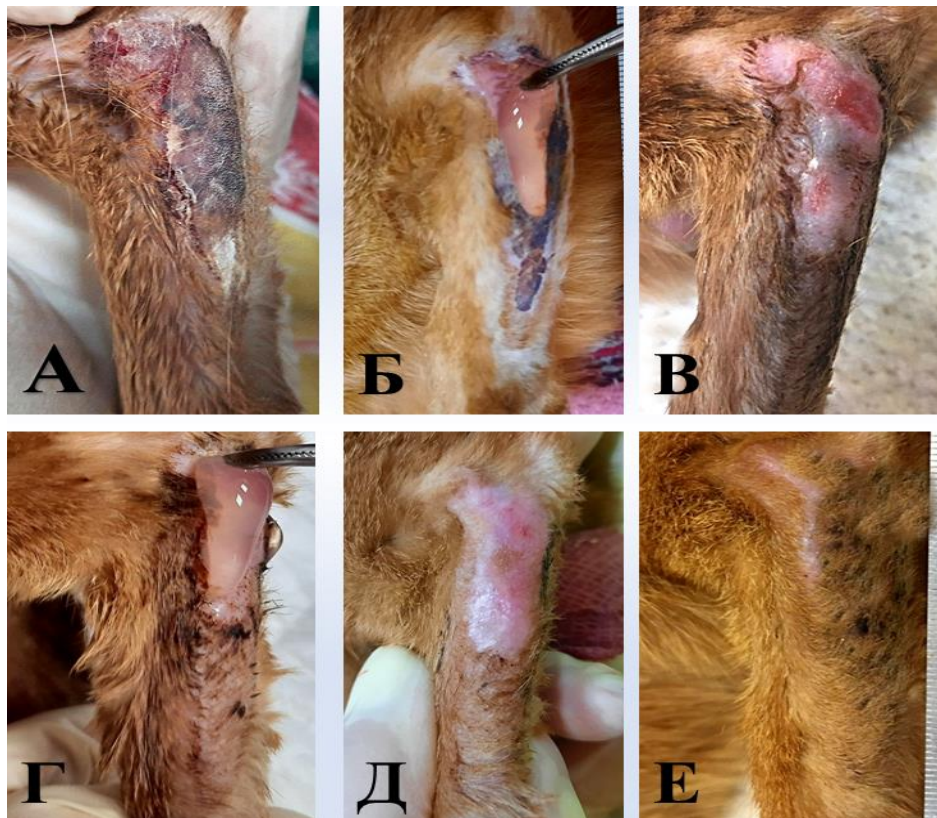


Рисунок 42 – Пример лечение ожоговой раны у кота методом аппликации каждые три-пять дней тромбоцитарно-лейкоцитарных сгустков для очищения раны и тромбоцитарных сгустков для регенерации и эпителизации:

А – внешний вид до лечения и аппликация тромбоцитарно лейкоцитарного сгустка; Б - внешний вид раны после первичной обработки и аппликации тромбоцитарно-лейкоцитарного сгустка; В – внешний вид раны через 12суток после лечения путем аппликаций тромбоцитарно-лейкоцитарных сгустков; Г - аппликация на очищенную и гранулирующую рану тромбоцитарного сгустка; Д - внешний вид раны через 17 суток после начала лечения (пять суток после начала использования тромбоцитарного сгустка); Е - внешний вид раны через 35 суток после начала лечения.

Замена на этой стадии лечения тромбоцитарно-лейкоцитарного сгустка на тромбоцитарный (Рисунок 42 Г) приводила к быстрой эпителизации раны (Рисунок 42 (Д)) и ремоделированию рубца (Рисунок 42 Е).

**Лечение длительно незаживающей раны.** Исследования проводились на животных с наличием длительно незаживающих ран идиотипической этиологии. Всего в исследовании участвовало девять собак с данной патологией. 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. С момента начала лечения и до выраженных признаков очищения раны и появления грануляционной ткани использовали тромбоцитарно-лейкоцитарные сгустки. Далее до конца лечения использовали тромбоцитарные сгустки. Для защиты сгустков от высыхания и соответственно потери их биологической активности сверху крепили водонепроницаемый пластырь, после чего производили бинтование.

Результаты исследования показали, что под действием сгустком, обогащенных лейкоцитами, уменьшалась воспалительная реакция, происходило очищение раны, начинались процессы гранулирования и краевой и контракция краев (Рисунок 43 В). На стадии появления молодой грануляционной ткани лечение продолжали путем аппликации тромбоцитарного сгустка, что индуцировало быструю эпителизацию раны (Рисунок 43 Ж) и последующее ремоделирование рубца (Рисунок 43 З).



Рисунок 43 – Пример лечения длительно незаживающей раны у собаки методом аппликации каждые три-пять дней фибриновых сгустков с различным клеточным составом.

### 3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведённых исследований нам удалось изучить возможность адаптации ранее известных методов получения тромбоцитарной плазмы, используемых в гуманной медицине, для получения PRP из крови животных различных видов. В ходе эксперимента было установлено, что существующие на рынке пробирки для плазмолифтинга с гепарином и разделительным гелем дают нестабильный выход тромбоцитов. Также было установлено, что в тромбоцитарной плазме, полученной в пробирках для плазмолифтинга, остается значительное количество лейкоцитов. Стоит отметить, что содержащийся антикоагулянт в вышеописанных пробирках делает невозможным получение фибриновых сгустков. Значительным недостатком является невозможность получения плазмы из небольшого объема крови при использовании пробирок для плазмолифтинга. В связи с выявленными недочетами существующего метода получения тромбоцитарной аутоплазмы нами был разработан и предложен метод выделения PRP с применением цитрата натрия 3,8% в качестве антикоагулянта. В том числе подобраны оптимальные параметры получения бесклеточных, тромбоцитарных и тромбоцитарно-лейкоцитарных сгустков из стабилизированной крови животных различных видов. В условиях лаборатории (на лабораторных крысах) исследовано влияние инъекций бесклеточной, тромбоцитарной и тромбоцитарно-лейкоцитарной аутологичной плазмы на состояние здоровой и поврежденной кожи крыс.

Значительным достижением, которого мы достигли в ходе проведения ряда экспериментов, является выделение тромбоцитарного сгустка из цитратной крови. Макроморфологические и гистологические виды изучения его позволили нам оценить потенциальную возможность применения сгустка для регенерации тканей. Нами были даны рекомендации по его приготовлению и внедрению с лечебный процесс при различных видах ран.

### 3.1 Обсуждение результатов исследований

Как показано в разделе 2.2.1, в процессе рутинных исследований нами получен результат и на основании его сделан вывод, что пробирки с разделительным гелем, называемые пробирками для плазмолифтинга, не подходят для получения плазмы обогащенной тромбоцитами из крови животных. Как мы считаем, есть два основных недостатка этих пробирок, ограничивающих их применение в ветеринарной медицине. Первый недостаток заключается в том, что удельная плотность разделительного геля данных пробирок адаптирована исключительно под удельную плотность клеток крови человека. Здесь следует уточнить, что удельная плотность разделительного геля должна быть меньше чем удельная плотность эритроцитов и лейкоцитов крови человека, вследствие чего они беспрепятственно проходят через него под действием центробежной силы. Но она должна быть больше, чем удельная плотность тромбоцитов, вследствие чего последние остаются на поверхности геля и могут быть отобраны вместе с плазмой [79]. Однако, дело в том, что удельная плотность клеток крови у животных хоть и незначительно, но отличается от удельной плотности клеток крови человека. А также имеют место межвидовые различия. Это давно известно из исследований по выделению и фракционному разделению лимфоцитов/лейкоцитов крови животных в градиенте плотности [157]. Вследствие выше сказанного получения плазмы, обогащённой тромбоцитами, в пробирках такого типа из крови животных дает нестабильный результат как в отношении количества тромбоцитов, так и в отношении наличия в ней (плазме) лейкоцитов (Таблица 1). Более того, не смотря на то, что все пробирки такого типа должны быть адаптированы под удельную плотность клеток крови человека, но как пишут специалисты гуманной медицины, даже в этом случае результат бывает непредсказуем по причине неправильно приготовленного геля (79). Что касается пробирок для получения плазмы, обогащенной тромбоцитами, адаптированных под кровь животных, то таковых промышленность не производит.

Второй недостаток пробирок для плазмолифтинга с разделительным гелем, имеющих в продаже, заключается в том, они рассчитаны на объём крови не менее 9.0 мл. Однако, врач ветеринарной медицины не редко имеет дело с пациентами, размер которых столь мал, что не позволяет взять кровь в таком объёме. В том же случае, когда в такие пробирки вносится количество крови объёмом менее, чем девять миллилитров, уменьшается дистанция пробега форменных элементов крови, необходимой для их четкого разделения под действием центробежной силы. То есть уменьшается расстояние от поверхности разделительного геля до верхней границы столбика крови. И нормального разделения не происходит. Кроме этого, и количество антикоагулянта (гепарина), находящегося в пробирках, рассчитано на определенное количество крови и увеличение его относительной концентрации в том случае, если крови в пробирку внесено меньше, что может привести к изменению функциональной активности тромбоцитов. Дополнительно следует отметить, что пробирки с разделительным гелем, предназначенные для получения плазмы, обогащенной тромбоцитами, имеющиеся в продаже на Российском рынке, как уже было сказано выше, в качестве антикоагулянта содержат гепарин, который не позволяет впоследствии приготовить из полученной плазмы сгустки.

Собственные исследования в области поисков простых в исполнении и экономически целесообразных способов получения плазмы, обогащенной тромбоцитами, позволили остановиться на том, что таковым является метод, в котором используются пробирки с цитратом натрия в качестве антикоагулянта, рассчитанные на четыре-пять миллилитров крови. А оптимальный режим центрифугирования на центрифуге ОПН-3 (на центрифугах другого типа режим центрифугирования необходимо подбирать индивидуально) составляет 3000,0 об/мин/две минуты+1000 об/мин/10 минут (Рисунок 8). Данный способ позволяет получать стабильные результаты выделения тромбоцитарной плазмы, вне зависимости от вида животного. Хотя следует отметить, что индивидуальные нюансы выделения, связанные с концентрацией эритроцитов и вязкостью крови, могут иметь место.



Данный способ позволяет получать плазму крови, которая превышает содержание в ней тромбоцитов от 35,0% до 50,0% от исходного объема крови (Рисунок 8 б). Обогащение тромбоцитами может превышать 150,0% и не содержащую лейкоцитов или содержащую их в очень малом количестве (Рисунок 8, Таблица 3, Таблица 4). Учитывая то, что концентрация тромбоцитов в единице объема полученной плазме возрастает в направлении к лейкоцитарной пленке, можно дифференцированно извлекать аликвоты плазмы с малым (Рисунок 9 в), средним (Рисунок 9 г) и большим (Рисунок 9 д) 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 (Рисунок 8 е). 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 (Таблица 3, Таблица 4). Из всех образцов плазмы можно легко приготовить сгустки путем простого добавления кальция в форме раствора кальция хлорида.

Как уже было сказано выше, врачам ветеринарной медицины достаточно часто приходится работать с объемами крови, не превышающими одного миллилитра. Поэтому был разработан и апробирован способ получения плазмы, обогащенной тромбоцитами, в инсулиновых шприцах (Рисунок 9). Основные параметры центрифугирования и количественные характеристики образцов плазмы, полученных данным методом, близки к тем, которые получаются при использовании вакуумных пробирок с цитратом натрия, описанные выше (Рисунок 8 (г, д, е)).

Все последующие экспериментальные и клинические эксперименты, описанные в диссертационной работе, проводились с образцами плазмы, полученными либо в цитратных пробирках на четыре-пять миллилитра, либо в инсулиновых шприцах.

В контексте цели и задач представленной диссертационной работы подбор и презентация способов получения данных сгустков отражает преаналитическую стадию исследования. И в случае подтверждения первоначальной гипотезы о том,

что разные фибриновые сгустки, отличающиеся качественно и количественно тромбоцитарно-лейкоцитарным составом, могут оказывать разное влияние на процессы воспаления и регенерации, методы сепарации клеток при получении плазмы крови следует улучшить, упростить и стандартизировать. Это необходимо для того, что бы выйти за рамки лабораторного эксперимента и сделать метод приемлемыми для клинической практики. Кроме чисто научных задач имели место задачи чисто прагматического характера. То есть для того, чтобы приготовить сгусток с запланированным клеточным составом, необходимо иметь в запасе достаточно много времени для фракционирования этих клеток в процессе центрифугирования. Однако кровь, взятая без антикоагулянта, достаточно быстро подвергается спонтанной коагуляции, и на проведение четкого разделение клеток не хватает времени. Отсюда следует закономерный вывод, что удобнее готовить сгустки из плазмы, полученной из крови стабилизированной антикоагулянтами. Как показали рутинные исследования, проведенные *in vitro*, сгусток, морфологически идентичный образующемуся в процессе естественной гемокоагуляции, можно приготовить из цитратной плазмы путем внесения ионов кальция в форме раствора кальция хлорида ( $\text{CaCl}_2$ ). Приготовить полноценные сгустки из гепаринизированной плазмы и плазмы, полученной из крови стабилизированной трилоном – Б, не представляется возможным даже после внесения ингибиторов этих антикоагулянтов, протамина и ионов кальция соответственно.

Основные выводы, к которым можно прийти, анализируя результаты лабораторных исследований по получению сгустков из цитратной плазмы, состоят в следующем:

1 – Скорость образования и скорость ретракции сгустка зависит как от количественного, так и от качественного клеточного состава;

2 - Скорость образования сгустка тем выше, чем больше тромбоцитов содержится в исходной плазме;

3 – На скорость образования и скорость ретракции сгустка влияют не только тромбоциты, но также и лейкоциты. В присутствии лейкоцитов сгусток образуется быстрее, и его ретракция происходит быстрее и выражена более сильно;

4 – Архитектоника организации сети фибриновых волокон в фибриново-тромбоцитарном сгустке зависит от количества тромбоцитов и от присутствия других лейкоцитов. Плотность такой сети прямо пропорциональна количеству тромбоцитов в плазме и еще более увеличивается в присутствии лимфоцитов и гранулоцитов;

5 – Лейкоциты в фибриново-тромбоцитарно-лейкоцитарном сгустке полностью сохраняют свои морфологические характеристики;

6 – Структурные различия бесклеточных фибриновых, фибриново-тромбоцитарных и фибриново-тромбоцитарно-лейкоцитарных сгустков указывают на то, что их влияние на раневой процесс может отличаться.

Результаты экспериментов по введению тромбоцитарной плазмы в неповрежденную ткань индуцируют только слабый транзиторный воспалительный ответ, не приводящий к серьезным морфологическим изменениям. А при местном введении тромбоцитарной плазмы в случае лечения ожоговой раны, такая плазма ускоряет процесс регенерации и реорганизации рубца (раздел 2.2.4). Наоборот, инъекции тромбоцитарно-лейкоцитарной плазмы в неповрежденную ткань индуцируют сильный местный воспалительный ответ, вплоть до некроза, что априори делает невозможным ее применение для ускорения регенеративных процессов. Различие в столь противоположном действии тромбоцитарной и тромбоцитарно-лейкоцитарной образцов плазмы (не смотря на то, что оба образца были аутологичны по отношению к реципиенту) могут быть вполне объяснимы с точки зрения молекулярно-клеточного механизма воспаления. То есть в большей степени индукция, стабилизация и затухание воспалительной реакции напрямую зависят от соотношения провоспалительных и противовоспалительных медиаторов и цитокинов, которые выделяются клетками [15]. В случае индукции воспаления преобладают провоспалительные медиаторы и цитокины. В случае затухания – противовоспалительные. Известно, что и тромбоциты, и лейкоциты содержат

множество биологически активных молекул, в том числе как с провоспалительным так и противовоспалительным действием. Но в тромбоцитах преобладают медиаторы и цитокины, подавляющие процессы альтерации и эксудации и индуцирующие процессы пролиферации [19]. В то время как лейкоциты являются типичными клетками воспаления, способными выделять в межклеточное пространство не только провоспалительные медиаторы и цитокины, но и вещества, в том числе ферменты и активные формы кислорода, которые могут оказывать прямое повреждающее действие на соседние клетки и межклеточный матрикс [39], и тем самым индуцировать вторичную альтерацию.

Однако, учитывая, что подобная провоспалительная активность лейкоцитов имеет функционально-адаптивное значение в процессе самоочищения ран от микроорганизмов и клеточного детрита логично предположить, что тромбоцитарно-лейкоцитарную композицию можно использовать при лечении комбинированных ран, которые обычно не заживают по первичному натяжению.

Исследования по оценке эффективности фибриновых сгустков с различным клеточным составом показали, что и фибрин, и тромбоциты, и лейкоциты сгустка и по отдельности, и в совокупности обладают антибактериальными свойствами. Если аппроксимировать эти клиринговые свойства тромбоцитарно-лейкоцитарного сгустка и на клеточно тканевой детрит, то логично предположить, что срок заживления комбинированных ран уменьшится за счет сокращения времени самоочищения раны.

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 по сравнению с контролем № 1 и контролем № 2. К 28 дню во всех четырех группах раны зажили полностью. Однако, максимальное ремоделирование рубца отмечено в опытной группе № 3, где был использован тромбоцитарный сгусток.

В обеих контрольных группах на данный момент наблюдения рубец оставался более грубым с явными признаками атрофии волосяных фолликулов.

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, как это наблюдалось в контрольной группе животных № 2 на 14 день. 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.

Изучение бактерицидных свойств сгустков привело нас к следующим размышлениям и выводам.

Общеизвестным фактом является то, что изливание крови в область раневого дефекта и последующее образование тромба является защитным механизмом и направлено на остановку кровотечения [1, 43, 64, 65, 91, 119, 169].

Но также фактом, не требующим доказательств, является то, что кровь, излившаяся в раневой канал, имеет такой же набор молекул и клеток, который присутствует и в циркулирующей крови. То есть такие же молекулы и клетки, которые при диффундировании через стенку сосуда в процессе воспалительной реакции, формируют гнойный экссудат и обеспечивают реакции врожденного иммунитета [1, 8, 10, 12, 13, 109]. Из вышесказанного можно сделать предположение, что молекулы и клетки сгустка крови, образовавшегося в ране, могут выполнять аналогичные функции врожденного иммунитета, что и молекулы, и клетки воспалительного экссудата если их функциональные свойства сохраняются.

Результаты исследования проведенного *in vitro* модели показали, что если микрофлора раневого контамината свободно распределена в крови, излившейся в раневой канал, то в результате последующей гемокоагуляции эта микрофлора практически полностью перераспределяется в образовавшийся сгусток и отсутствует в отделившейся сыворотке. Аппроксимируя результаты полученные *in vitro* на реальную клиническую ситуацию, следует допустить, что контакт между раневым контаминатом и молекулами и клетками, локализующимися

непосредственно в сгустке, может минимизировать индукцию гнойного воспаления.

Результаты последующего морфологического исследования сгустков показали, что фибрин, тромбоциты и лейкоциты сгустка вместе и по отдельности вносят свой вклад в антимикробную защиту.

На примере безтромбоцитарных сгустков показано, что сеть из нитей фибрина жестко фиксирует дрожжевые клетки, вплотную прилегая к их поверхности. В некоторых участках этой сети фибриновые волокна формируют вокруг дрожжевых клеток капсулоподобные образования. Подобная фиксация, по-видимому, выполняет ту же функцию, что и внеклеточные ловушки фагоцитов. Так называемые «NETs-ловушки» (NETs, от англ. Neutrophil Extracellular Trap), в которых улавливающая сеть формируется из нитей ДНК [179, 193]. Очевидно, фибриновая сеть препятствует выходу за пределы сгустка микроорганизмов. Особенно тех, которые обладают подвижностью.

В тромбоцитарном сгустке дрожжевые клетки оказываются в плотном окружении агрегированных тромбоцитов. Причем по аналогии с бесклеточным сгустком, вокруг некоторых дрожжевых клеток агрегированные тромбоциты также формируют подобие капсулы (Рисунок 4 (2б, 3б, 4б)). Наиболее интересно то, что некоторая часть дрожжевых клеток, находящихся внутри такой тромбоцитарной капсулы, гораздо слабее окрашиваются по Граму, что свидетельствует о процессе разрушения пептидогликана их оболочки. Данная находка гармонично согласуется с теми фактами, что активированные тромбоциты высвобождают антибактериальные вещества, в том числе так называемые тромбоцидины, и дифензины аналогичные тем антимикробным белкам, которые ранее были обнаружены в нейтрофилах [5, 45, 64, 105, 122, 163, 189]. А образование вокруг дрожжевых клеток камер из агрегированных тромбоцитов, по всей видимости, позволяет тромбоцидинам и дифензинам локально накапливаться до концентраций бактериостатического и бактериолитического уровня.

Исследование тромбоцитарно-лейкоцитарных сгустков, показало, что фагоциты сгустка сохраняют свою активность и поглощают дрожжевые клетки,

фиксированные в фибрино-тромбоцитарной сети. Данная фагоцитарная реакция лейкоцитов сгустка достаточно активна. При микроскопии гистологических препаратов, приготовленных из таких сгустков, в некоторых полях зрения встречаются лейкоциты, фагоцитирующие сразу несколько дрожжевых клеток, несмотря на значительную величину последних, а так же фагоцитоз одной дрожжевой клетки двумя лейкоцитами. Визуализируемую высокую активность фагоцитов сгустка можно объяснить двумя причинами. Первая - это то, что активированные тромбоциты способны индуцировать и усиливать функции фагоцитов, выделяя цитокины и/или опсонизируя патогены [19, 140, 165, 175, 177, 179]. Вторая, как было показано нами ранее, лейкоциты и тромбоциты действуют синергично в отношении ретракции сгустка [181]. Соответственно, усиление ретракции сгустка приводит к более выраженному сближению патогена и фагоцита, что априори должно ускорить и облегчить процесс фагоцитоза.

Дополнительное исследование на *in vitro* модели, в которой сгусток, приготовленный из крови обогащенной лейкоцитами, имитирующий раневой сгусток, тесно контактировал с тромбоцитарным сгустком, имитирующим стенку раны, показал, что гранулоциты из лейкоцитарного сгустка скапливаются на его периферии, а затем мигрируют в тромбоцитарный сгусток. Наличие у лейкоцитов сгустка возможности мигрировать за его пределы указывает на то, что они могут реализовывать функцию врожденного иммунитета и в отношении микрофлоры, оставшейся на стенках раны, а также, в отношении так называемых молекулярных паттернов повреждения - DAMPs (DAMPs - damage-associated molecular-pattern molecules).

Таким образом, проведенные исследования позволяют предположить, следующий механизм санирующего действия кровяного сгустка в ране. Излившаяся кровь механически смывает микроорганизмы со стенки раны и смешивается с ними. После образования сгустка и его ретракции, микроорганизмы оказываются плотно зафиксированными в сети фибриновых волокон и окружены агрегатами из тромбоцитов. Внутри ловушек из агрегированных тромбоцитов микроорганизмы подвергаются воздействию антимикробных тромбоцитарных

молекул белковой и небелковой природы. Тромбоциты также выделяют цитокины, которые действуют на лейкоциты хемотаксически и активационно. Зафиксированные и опсонизированные тромбоцитами микроорганизмы уничтожаются активированными гранулоцитарными лейкоцитами путем фагоцитоза. Часть лейкоцитов сгустка мигрирует за его пределы, где осуществляет фагоцитоз патогенов (PAMPs), оставшихся на стенках раневого канала, а также молекул и молекулярных агрегатов относящихся к DAMPs. При высокой активности фагоцитов раневого сгустка последующая воспалительная реакция минимизируется, так как большая часть DAMPs и PAMPs будет устранена еще до того, как они индуцируют цитокиновый воспалительный каскад, связавшись с DAMPs и PAMPs рецепторами на резидентных макрофагах.

Правильность данного вывода подтверждена в клиническом эксперименте при лечении ран, содержащих большое количество некротизированной ткани. Последовательные аппликации сначала тромбоцитарно-лейкоцитарных сгустков до очищения раны, а затем тромбоцитарных сгустков для стимуляции пролиферации и эпителизации, согласно нашим исследованиям, привели к хорошему клиническому результату. В целом, наши экспериментальные и клинические исследования показали, что выбор метода лечения ран: тромбоцитарная плазма, тромбоцитарные сгустками или тромбоцитарно-лейкоцитарные сгустки, зависит от её (раны) состояния и локации. Так как для индукции и поддержания лечебного эффекта сгустки должны некоторое время удерживаться на поверхности раневого дефекта, их невозможно применить там, где невозможно наложить стабильную повязку. При лечении ран, не сопровождающихся сильным гнойным воспалением, теоретически можно применять как инъекции тромбоцитарной плазмы, так и аппликации тромбоцитарных сгустков. Но, в то же время, учитывая, что инъекционный продукт плазмы после введения в ткани стабильно удерживается в ней, чисто технически инъекция плазмы выглядит предпочтительнее. С другой стороны, инъекции тромбоцитарно-лекоцитарной плазмы могут индуцировать сильное, вплоть до некроза, воспаления, поэтому по нашему мнению при лечении гнойно



некротических ран абсолютное предпочтение следует отдавать тромбоцитарно-лейкоцитарным сгусткам в виде аппликаций.

В заключении можно отметить, что количество способов и эффективность лечения ран с использованием клеток и фибрина, полученных из крови пациента, можно расширить путем различных комбинаций инъекций и аппликаций плазмы и сгустков. Такая работа уже провидится на нашей кафедре.

### 3.2 Выводы

Методичный подход к исследовательской работе и наличие возможности проведения опытов на лабораторных крысах, а также применение современного диагностического оборудования позволили нам провести ряд экспериментов и сделать следующий вывод: чистые бесклеточные, тромбоцитарные и тромбоцитарно-лейкоцитарные образцы плазмы и сгустки по разному действуют на неповрежденные ткани и на раневой процесс. Данные отличия следует учитывать при лечении раневых повреждений различного этиопатогенеза. Выше сказанное можно подитожить 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;

2 – Тромбоцитарная плазма, при ее внутрикожном или подкожном введении, вызывает только транзиторное быстропроходящее легкое воспаление;

3 – Тромбоцитарная плазма, при ее введении вокруг и под раневой дефект, ускоряет образование рубца и эпителизацию;

4 – Основные структурные и клеточные элементы тромбоцитарно-лейкоцитарного сгустка обладают микробоцидными свойствами. Нити фибрина формируют сеть для фиксации микроорганизмов. Тромбоциты в процессе адгезии друг к другу, в 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 профилактуют 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.

### **3.3 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 скорость 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.

### 3.4 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 иммуностропными свойствами.

#### 4. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

PRP - плазма обогащенная тромбоцитами

ДНР - длительно незаживающая рана

БЦ - бактериальная целлюлоза

Эр - эритроциты

Тр - тромбоциты

Лк - лейкоциты

NETs-ловушки - от англ. Neutrophil Extracellular Trap – вид программируемой клеточной гибели, происходящей у нейтрофилов

DAMPs - от англ. Damage-associated molecular-pattern molecules – молекулярный фрагмент, ассоциированный с повреждениями

PPP - от англ. - Platelet-Poor Plasma - плазма с пониженной концентрацией тромбоцитов

## 5. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абаев, Ю. К. Справочник хирурга. Раны и раневая инфекция / Ю. К. Абаев. - Ростов-на-Дону: Феникс, 2006. - 427 с. - Текст: непосредственный.
2. Алексеев, А. А. Регенеративная медицина в комбустиологии: состояние, проблемы и перспективы / А. А. Алексеев, А. Э. Бобровников. - Текст: электронный // Комбустиология: электронный журнал. - Москва. -2013. - URL: [http://combustiolog.ru/number\\_journal/nomer-49-50-2013/](http://combustiolog.ru/number_journal/nomer-49-50-2013/) (дата обращения 21.03.2022).
3. Алексеева, Н. Т. Гистохимическая характеристика эпидермиса при заживлении кожных ран под действием различных региональных факторов / Н. Т. Алексеева, Д. Б. Никитюк, С. В. Ключкова. - Текст: непосредственный // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. - 2016. - № 6 (3). - С. 10-14.
4. Алексеева, Н. Т. Отдаленные результаты регенераторного процесса в коже при заживлении асептических ран / Н. Т. Алексеева. - Текст : непосредственный // Журнал анатомии и гистопатологии. - 2012. - № 2. - С. 15-17.
5. Антимикробная активность тромбодифензинов разных видов животных / М. В. Сычев, Е. В. Шейда, О. Л. Карташова, А. П. Жуков. - Текст : непосредственный // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. - 2009. - № 4(24). - С. 177-179.
6. Ахмеров, Р. Р. Регенеративная медицина на основе аутологичной плазмы. Технология Plasmolifting ТМ. / Р. Р. Ахмеров. - Москва: Литтерра, 2014. - 203 с. - Текст : непосредственный.
7. Базилян, Э. А. Сравнительный анализ применения в клинической практике обогащенного лейкоцитами и тромбоцитами фибринового сгустка при заполнении лунок удаленных зубов / Э. А. Базилян, И.И. Тарба, Г. А. Воложин. - Текст : непосредственный // Российская стоматология. - 2020. - Т. 13, № 1. - С. 16-17.
8. Безина, Н. М. Клинико-гематологический статус собак при лечении ожоговой травмы / Н. М. Безина. - Текст : непосредственный // Ветеринарная медицина агропромышленному комплексу: материалы международной научно-



практической конференции (Троицк, 2017) / [ответственный редактор М. Ф. Юдин]. - Троицк: ФГБОУ ВО «Южно-Уральский ГАУ», 2017. - С. 35-39.

9. Безрук, Е. Л. Гистологическая характеристика репаративной регенерации гнойных ран у крупного рогатого скота при различных способах лечения / Е. А. Безрук. - Текст : непосредственный // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. - 2017. - № 8 (154). - С. 151-155.

10. Безрук, Е. Л. Клиническая характеристика течения раневого процесса у животных со свежими ранами при различных способах дренирования / Е. А. Безрук. - Текст : непосредственный // Международный журнал экспериментального образования. - 2016. - № 9-2. - С. 274-276.

11. Безрук, Е. Л. Морфологическая характеристика процессов репарации гнойных ран у крупного рогатого скота при различных способах лечения / Е. Л. Безрук. - Текст : непосредственный // Вестник КрасГАУ. - 2017. - № 8 (131). - С. 27-31.

12. Безрук, Е. Л. Сравнительная характеристика некоторых способов глубокой антисептики свежих инфицированных ран у животных / Е. Л. Безрук. - Текст : непосредственный // Международный журнал экспериментального образования. - 2016. - № 9-2. - С. 277-279.

13. Белоцкий, С. М. Воспаление. Мобилизация клеток и клинические эффекты / С. М. Белоцкий, Р. Р. Авталион. - Москва : БИНОМ, 2008. - 240 с. - Текст : непосредственный.

14. Бокарев, А. В. Моделирование раневого процесса на лабораторных крысах / А. В. Бокарев, М. В. Свердлова. - Текст : непосредственный // Материалы национальной научной конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов СПбГУВМ (Санкт-Петербург, 25-29 января 2021 г.) / [ответственный редактор А. А. Стекольников]. - Санкт-Петербург: СПбГУВМ, 2021. - С. 8-9.

15. Бордаков, В. Н. Рана. Раневой процесс. Принципы лечения ран : учебно-методическое пособие / В. Н. Бордаков. - Минск : БГМУ, 2014. - 31 с. - Текст : непосредственный.

16. Борхунова, Е. Н. Особенности заживления раневого дефекта кожи под влиянием аутологичных клеточных продуктов мультипотентных мезенхимных стромальных клеток и стромально-васкулярной фракции / Е. Н. Борхунова, Д. В. Надеждин. - Текст : непосредственный // Ветеринария Кубани. - 2021. - № 1. - С. 30-32.

17. Борхунова, Е. Н. Особенности заживления раневого дефекта кожи под влиянием мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток / Е. Н. Борхунова, Д. В. Надеждин. - Текст : непосредственный // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. - 2020. - № 11. - С. 18-22.

18. Брайловская, Т. В. Морфологическая характеристика течения раневого процесса при экспериментальном моделировании резаных и рвано-ушибленных кожных ран / Т. В. Брайловская, Т. А. Федорина. - Текст : непосредственный // БИОМЕДИЦИНА. - 2009. - № 1. - С. 68-74.

19. Вайцнер, Е. Ю. Клинико-лабораторное исследование влияния ангиогенного фактора роста тромбоцитарной плазмы на восстановление микроциркуляции при лечении хронического пародонтита хирургическими методами : 14.01.14: автореферат на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Вайцнер Елена Юрьевна. - Москва, 2013. - 28 с. - Текст : непосредственный.

20. Виденин, В. Н. Осложнение операционных ран у животных :16.00.05 : автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук / Виденин Владимир Николаевич. - Санкт-Петербург, 2005. - 32 с. - Текст : непосредственный.

21. Витковский, Ю. А. Патогенетическое значение лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии / Ю. А. Витковский, Б. И. Кузник, А. В. Солпов - Текст : непосредственный // Медицинская Иммунология. - 2006. - Т. 8, № 5/6. - С. 745-753.

22. Влияние аутологичной плазмы, обогащенной тромбоцитами, на уровень слезопродукции при сухом кератоконъюнктивите у собак / И.С. Ерин, Ю. А. Ватников, В. И. Паршина, Ю. Ю. Воронина. - Текст : непосредственный // Ветеринария. - 2018. - № 8. - С. 58-61.

23. Влияние внешних условий хранения на концентрацию тромбоцитов в тромбоцитарной аутоплазме / Б.С. Семёнов, В.А. Гусева, Е.В. Рыбин, Т.Ш. Кузнецова. - Текст : непосредственный // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. - 2019. - № 1. - С. 282-285.

24. Влияние тромбоцитарной аутоплазмы на рост соединительной ткани кожи у здоровых кроликов / Б.С. Семенов, Е.В. Рыбин, В.А. Гусева, Т.Ш. Кузнецова. - Текст : непосредственный // Актуальные проблемы ветеринарной медицины: сборник научных трудов № 150 (Санкт-Петербург, 2019 г.) / редакционная коллегия: А.А. Стекольников (ответственный редактор), А.А. Сухинин, Л.Ю. Карпенко. - Санкт-Петербург: СПбГАВМ, 2019. - С. 46-49.

25. Влияние фибринового сгустка при повреждении кости нижней челюсти в эксперименте / И.В. Майбородин, И.С. Колесников, Б.В. Шеплев [и др.]. - Текст : непосредственный // Стоматология. - 2011. - Т. 90, № 4. - С. 9-12.

26. Внутрисуставные инъекции богатой тромбоцитами плазмы в сравнении с препаратами гиалуроновой кислоты при лечении патологии хряща / Е. Кон, Б. Манделбаум, Р. Буда [и др.]. - Текст : электронный // PRPLab, 2015. - 16 с. - URL : <http://www.prplab.ru/docs/vnutrisustavnye-inekicii-bogatoy-trombocitami-plazmy.pdf> (дата обращения 07.04.2022).

27. Гистологическое исследование микробоцидной функции структурных и клеточных компонентов кровяного сгустка / А.В. Бокарев, А.А. Стекольников, М.В. Свердлова [и др.]. - Текст : непосредственный // Ветеринарный фармакологический вестник. - 2022. - № 1 (18). - С. 162-178.

28. Глуткин, А.В. моделирование глубокого ожога у крысят / А.В. Глуткин, В.И. Ковальчук, О.Б. Островская. - Текст : непосредственный // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. - 2012. - № 2. - С. 51-53.

29. Глухов, А.А. Гистохимические изменения при заживлении ран / А.А. Глухов, Р.Н. Фролов, Н.Т. Алексеева, А.А. Андреев. - Текст : непосредственный // Журнал анатомии и гистопатологии. - 2013. - Т. 2, № 2. - С. 38-43.

30. Глухов, А. А. Патология длительно не заживающих ран и современные методы симуляции раневого процесса / А. А. Глухов, М. В. Аралова. - Текст : непосредственный // Новости хирургии. - 2015. - Т. 23, № 6. - С. 673—679.
31. Горбатенко, А.И. Локальная терапия остеоартроза коленных суставов богатой тромбоцитами аутоплазмой / А.И. Горбатенко. - Текст : электронный // PRPLab, 2016. - 3 с. - URL : <http://www.prplab.ru/docs/lechenie-osteoartroza-kolennykh-sustavov-gorbatenko-a.doc> (дата обращения 17.04.2022).
32. Гусева, В.А. Моно- и комплексная терапия ран у кроликов тромбоцитарной аутоплазмой / В.А. Гусева. - Текст : непосредственный // Международный вестник ветеринарии. - 2015. - № 2. - С. 14-19.
33. Данилов, Р. К. Раневой процесс: гистогенетические основы : монография / Р. К. Данилов. - Санкт-Петербург : ВМА им. С. М. Кирова, 2008. - 380 с. - Текст : непосредственный.
34. Дермальные фибробласты для лечения дефектов кожи / В. Л. Зорин, А.И. Зорина, О.С. Петракова, В.Р. Черкасов. - Текст : непосредственный // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2009. - Т. IV, № 4. - С. 26-40.
35. Добрейкин, Е. А. Экспериментальное обоснование способа моделирования инфицированной ожоговой раны кожи у лабораторных животных / Е.А. Добрейкин. - Текст : непосредственный // Саратовский научно-медицинский журнал. - 2013. - Т. 9, № 2. - С. 204 - 208.
36. Доступность инновационных технологий лечения ран / С. Б. Богданов, А.А. Завражнов, А.В. Поляков [и др.]. - Текст : электронный // Комбустиология: электронный журнал. - Москва, 2013. - С. 14-15. - URL: [http://combustiology.ru/number\\_journal/nomer-49-50-2013/](http://combustiology.ru/number_journal/nomer-49-50-2013/) (дата обращения 12.04.2022).
37. Еньчсва, Ю.А. Эффективность комбинированного хирургического лечения ожогов III степени : 14.01.17, 03.02.03 : автореферат на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Еньчева Юлия Абыталиновна. - Пермь, 2017. - 23 с. - Текст : непосредственный.

38. Ерин, И.С. Временная obturация слезных канальцев в сочетании с аутологичной плазмой, обогащенной тромбоцитами при лечении сухого кератоконъюнктивита собак средней и лёгкой степени / И.С. Ерин, Ю.А. Ватников. - Текст : непосредственный // Известия Международной академии аграрного образования. - 2018. - № 42-2. - С. 135-140.

39. Житлова, Е.А. Количественная этапная оценка костного регенерата в зоне индуцированной травмы при введении препарата на основе дифосфатов / Е.А. Житлова, Ф.В. Шакирова. - Текст : непосредственный // Иппология и ветеринария. - 2016. - № 3 (21). - С. 43-48.

40. Заживление кожи при использовании раневых покрытий на основе коллаген-хитозанового комплекса / Е.С. Шамова, И.Н. Большаков, Н.С. Горбунов, С.М. Насибов. - Текст : непосредственный // Сибирское медицинское обозрение. - 2003. - Т. 29, № 4. - С. 25-27.

41. Зеленовский, Н.В. Анатомия и физиология животных: учебное пособие / Н.В. Зеленовский, А.П. Васильев, Л.К. Логинова. - 2-е издание, исправленное - Москва: Академия, 2005. - 464 с. - ISBN 978-5-7695-5760-6. - Текст : непосредственный.

42. Зеленовский, Н.В. Международная ветеринарная анатомическая номенклатура на латинском и русском языках. *Nomina Anatomica Veterinaria*. (Пятая редакция) : учебник для вузов / Н.В. Зеленовский. - Санкт-Петербург: Лань, 2013. - 400 с. - Текст : непосредственный.

43. Ибрагимова, Л.И. Состояние системы гемостаза лошадей при ранах / Л.И. Ибрагимова, А.В. Пономаренко, Е.М. Марьин. - Текст : непосредственный // Международный студенческий научный вестник. - 2016. - № 4-3. - С. 279-280.

44. Изучение влияния богатой тромбоцитами аутоплазмы на иммунный статус полости рта пациентов с несъемными зубными протезами / Ю.С. Шишкова, О.И. Филимонова, А.С. Емелина [и др.]. - Текст : непосредственный // Российский иммунологический журнал. - 2011. - Т. 11 (20), № 3. - С. 577 - 579.

45. Изучение роли дефенсинов млекопитающих и антибиотических пептидов простейших в реализации и контроле реакций неспецифической защиты:

отчет о научно-исследовательской работе / НИИ физиологии им. А.А. Ухтомского Санкт-Петербургского университета. - № ГР 95-04-11611. - Санкт\_Петербург, 1995. - Текст : непосредственный.

46. Использование фибринового сгустка для регенерации поврежденной кости в эксперименте / И.В. Майбородин, Б.В. Шеплев, М.Н. Дровосеков [и др.]. - Текст : непосредственный // Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина. - 2011. - Т. 9, № 2. - С. 195-202.

47. Каримова, М.Х. Метод лечения пациентов с длительно незаживающими ранами с применением плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов (ПОРФТ) / М.Х. Каримова. - Текст : непосредственный // Актуальные проблемы биологической и химической экологии: материалы VII Международной научно-практической конференции (Москва, 18-19 февраля 2021 г.) / [ответственный редактор Д.Б. Петренко]. - Москва: МГОУ, 2021. - С. 231-234.

48. Каскаев, А.В. Перспективы применения современных раневых покрытий у ожоговых больных / А.В. Каскаев, Д.В. Черданцев, И.Н. Большаков. - Текст : непосредственный // Сибирское медицинское обозрение. - 2011. - Т. 68, № 2. - С. 3-6.

49. Ковальчук, А.О. Морфометрические показатели кожи животных с экспериментальной ожоговой травмой при проведении раннего хирургического лечения с использованием гидрогелевых повязок и полиуретановых адсорбентов / А.О Ковальчук. - Текст : непосредственный// Экспериментальная хирургия. - 2016. - Т.24, № 2. - С. 109-119.

50. Колесников, И.С. Морфологические изменения десны при дентальной имплантации с применением обогащенного тромбоцитами фибринового сгустка : 14.01.15 : автореферат на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Колесников Иван Сергеевич. - Новосибирск, 2006. - 32 с. - Текст : непосредственный.

51. Колсанов, А.В. Применение фитотерапевтических раневых покрытий в местном лечении ран и раневой инфекции кожи и мягких тканей в



эксперименте / А. В. Колсанов, А. В. Толстов. - Текст : непосредственный // Морфология: Материалы XI Конгресса Международной ассоциации морфологов (Самара, 29 мая-1 июня 2012 г.). - Самара, 2012. - С. 36.

52. Комплексное лечение глубоких ожогов на основе применения хирургической некрэктомии и современных биотехнологических методов / А.А. Алексеев, К.З. Салахиддинов, Б.К. Гаврилюк, Ю.И. Тюрников. - Текст : непосредственный // Анналы хирургии. - 2012. - № 6. - С. 41-45.

53. Коробейникова, Д.А. Компьютерная томография регенерата в зоне травмы у животных при введении препарата на основе этидронатов ионов лантаноидов и кальция / Д.А. Коробейникова, Е.А. Житлова, Ф.В. Шакирова. - Текст : непосредственный // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. - 2019. - № 12 (182). - С. 81-86.

54. Коссев, П. Плазма, обогащенная тромбоцитами (PRP) в ортопедии и травматологии : методические рекомендации / П. Коссев, Ц. Соколов. - Москва: РусВиск, 2017. - 20 с. - URL : <http://www.prplab.ru/docs/plazma-obogachennaya-trombocitami.pdf> (дата обращения 02.03.2022). - Текст : электронный.

55. Крутиков, М.Г. Местное лечение ран и ожогов / М.Г. Крутиков, А.Э. Бобровников. - Текст : непосредственный // Скорая медицинская помощь. 2008. - № 5. - С. 41-42.

56. Крутых, Е.Г. Особенности строения кожи крыс в условиях воздействия дёгтя берёзового : 03.00.25: автореферат на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Крутых Евгений Геннадьевич. - Москва, 2008. - 39 с. - Текст : непосредственный.

57. Курамева, У.К. Этиопатогенетическое обоснование применения биологическиактивных веществ при термических ожогах кожи : 14.00.16 :диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук : защищена 04.09.2009 / Курамева Ульяна Кудайкуловна. -Бишкек, 2009. - 155 с. - Текст : непосредственный.

58. Лабораторные животные : учебное пособие / под редакцией А.А. Стекольниковой ; 2-е издание, стереотипное. - Санкт-Петербург: Лань, 2017.-316 с. - Текст : непосредственный.

59. Лазаренко, В.А. Влияние синтетического аналога индолицидина на репаративную регенерации кожи при ожоговой травме / В.А. Лазаренко, Ю.Д. Ляшев, Н.И. Шевченко. - Текст : непосредственный // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. - 2014. - № 7(4). - С. 342-349.

60. Лечение гнойных ран с применением раневых покрытий «Биотравм» и «Ресорб» (экспериментальное исследование) / В.А. Лазаренко, А.И. Бежин, А.З. Гусейнов [и др.]. - Текст : непосредственный // Вестник новых медицинских технологий. - 2010. - Т. 17, № 3. - С. 200-203.

61. Лечение первичной себореи у собак с применением тромбоцитарной аутоплазмы / Б.С. Семенов, Е.В. Рыбин, В.А. Гусева, Т.Ш. Кузнецова. - Текст : непосредственный // Аграрная наука в условиях модернизации и инновационного развития АПК России: сборник материалов Всероссийской научно-методической конференции с международным участием, посвященной 100-летию высшего аграрного образования в Ивановской области (Иваново, 28-29 ноября 2018 г.).- Иваново: ФГБОУ ВПО Ивановская ГСХА, 2018. - С. 488-490.

62. Лечение тендинита поверхностного сгибателя пальца у лошадей с использованием тромбоцитарной аутоплазмы / Б.С. Семёнов, В.А. Гусева, Е.В. Рыбин [и др.]. - Текст : непосредственный // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. - 2017. - № 1 (147). - С. 125-132.

63. Лечение тяжелых форм сухого кератоконъюнктивита собак с применением аутологичной плазмы, обогащенной тромбоцитами / И.С. Ерин, Ю.А. Ватников, В.И. Паршина [и др.]. - Текст : непосредственный // Актуальные проблемы ветеринарной медицины, зоотехнии и биотехнологии: сборник научных трудов Международной учебно-методической и научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня основания ФГБОУ ВО МГАВМиБ - МВА имени К.И. Скрябина (Москва, 20-22 ноября 2019 г.). - Москва: ФГБОУ ВО «МГАВМиБ», 2019. - С. 115-117.

64. Липатова, Н.А. Агрегация тромбоцитов / Н.А. Липатова. - Москва: ЗАО «Лаборатории ЦИР», 2008. - URL : <https://www.cirlab.ru/doctors/presentations/thrombocyte.pdf> (дата обращения 07.04.2022). - Текст : электронный.
65. Литвинов, Р.И. Введение в биохимию свертывания крови и фибринолиза / Р.И. Литвинов. - Казань: КФУ, 2013. - URL : [https://kpfu.ru/docs/F1574806525/PRESENTATION.MAIN\\_new.pdf](https://kpfu.ru/docs/F1574806525/PRESENTATION.MAIN_new.pdf) (дата обращения 07.04.2022). - Текст : электронный.
66. Максюта, В.А. Синтетические раневые покрытия после поздней некрэктомии при глубоких ожогах / В.А. Максюта, Ю.Р. Скворцов, И.В. Чмырев. Текст : непосредственный // Вестник Российской военно-медицинской академии. - 2012. - № 1 (37). - С. 140-144.
67. Местное лечение ран и раневой инфекции по результатам анонимного анкетирования хирургов России / В.В. Привольнев, Ю.С. Пасхалова, А.В. Родин, В.А. Митиш. - Текст : непосредственный // Раны и раневые инфекции. Журнал имени проф. БМ. Костючёнка. - 2016. - Т. 3, № 1. - С. 19-24.
68. Методология научного исследования: учебное пособие / под редакцией Н.А. Слесаренко; 2-е издание, стереотипное. - Санкт-Петербург: Лань, 2018. - 268 с. - Текст : непосредственный.
69. Модифицированный серебром монтмориллонит: получение, антимикробная активность и медицинское применение в биоактивных раневых покрытиях / К.Н. Касанов, В.А. Попов, Р.А. Евсеев [и др.]. - Текст : непосредственный // Научные ведомости. - 2013. - № 18 (161). - С. 188-197.
70. Морфогенез гиалинового хряща коленного сустава на фоне внутрисуставного введения обогащенной тромбоцитами аутологичной плазмы и/или препарата гиалуроновой кислоты у крыс с экспериментальным остеоартрозом / С.А. Демкин, Д.А. Маланин, Л.Н. Рогова [и др.]. - Текст : непосредственный // Травматология и ортопедия России. - 2016. - Т. 22, № 4. - С. 76-87.

71. Морфологическая оценка влияния коллагеновой повязки на заживление ожоговых ран IIIа степени / Е.Г. Колокольчикова, М.В. Сычевский, Е.А. Жиркова [и др.]. - Текст : непосредственный // Трансплантология. - 2010. - № 3-4. - С. 64-71.

72. Морфологический анализ заживления ожоговой раны при применении коллаген-хитозанового раневого покрытия / А.К. Кириченко, И.Н. Большаков, А.Э. Али-Риза, А.А. Власов. - Текст : непосредственный // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2012. - Т. 154, № 11. - С. 652-656.

73. Муразян, Р.И. Экстренная помощь при ожогах : учебное пособие / Р.И. Муразян, Н.Р. Панченков. - Москва: Медицина, 2003. - 127 с. - Текст : непосредственный.

74. Мусина, Л.А. Заживление ожоговых ран при применении аллогенных биоматериалов (экспериментально-морфологическое исследование) / Л.А. Мусина, А.Б. Нураева. - Текст : непосредственный // Вестник Оренбургского государственного университета. - 2015. - № 12 (187). - С. 142-145.

75. Навдаев, А.В. Особенности развития фибринового сгустка в плазме крови IN VITRO : 03.00.04 : автореферат на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Навдаев Алексей Владимирович. - Москва, 1997. - 23 с. - Текст : непосредственный.

76. Надеждин, Д.В. Заживление индуцированного раневого повреждения кожи под влиянием клеток стромально-васкулярной фракции : 06.02.01: автореферат на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук / Надеждин Дмитрий Валерьевич. - Москва, 2022. - 24 с. - Текст : непосредственный.

77. Назаренок, Г.И. Рана. Повязка. Больной : учебное пособие / Г.И. Назаренко, И.Ю. Сугурова, С.П. Глянцев -. Москва: Медицина, 2002. - 472 с. - Текст : непосредственный.

78. Некоторые морфологические аспекты заживления кожных ран у лошадей под влиянием тромбоцитарной аутоплазмы / Б.С. Семёнов, В.Н. Виденин,

А.Я. Батраков [и др.]. - Текст : непосредственный // Иппология и ветеринария. - 2017. - № 3 (25). - С. 31-35.

79. Неэффективный Плазмолифтинг. Гель-зло! : сайт. - Киев: Cross-D, 2018. - URL : <https://cross-dental.com/posts/2765747/> (дата обращения 16.04.2022).

80. Никитенко, И.Е. Аутодермопластика глубоких термических ожогов с использованием препарата «Винфар», содержащего фактор роста фибробластов: экспериментальное исследование : 14.01.17 : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Никитенко Иван Евгеньевич. - Оренбург, 2012. - 27 с. - Текст : непосредственный.

81. Новицкий, С.В. Применение криотехнологий в лечении и реабилитации лошадей / С.В. Новицкий, С.Ю. Концевая. - Текст : непосредственный // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. - 2022. - № 1 (53). - С. 35-39.

82. Нураева, А.Б. Биоматериалы аллоплант ингибиторы рубцевания кожи после ожогов / А.Б. Нураева, Л.А. Мусина, Е.М. Гареев. - Текст : непосредственный // Офтальмологические ведомости. - 2017. - Т. 10, № 2. - С. 22-28.

83. Обогащенная тромбоцитами аутологичная плазма в лечении пациентов с гонартрозом III стадии / Д.А. Маланин, В.В. Новочадов, С.А. Демкин [и др.]. - Текст : непосредственный // Травматология и ортопедия России. - 2014. - Т. 73, № 3. - С. 52-59.

84. Обогащенная тромбоцитами аутологичная плазма в лечении пациентов с остеоартрозом коленного сустава II стадии / Д.А. Маланин, С.А. Демкин, М.В. Демещенко, К.В. Байдова. - Текст : непосредственный // Гений ортопедии. 2017. - Т. 23, № 1. - С. 44-51.

85. Оптимизация метода получения плазмы, обогащенной тромбоцитами (PRP) из крови лошадей / А.Ю. Захаров, А.В. Бокарев, А.А. Стекольников [и др.]. - Текст : непосредственный // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. - 2020. - № 4. - С. 89-92.

86. Оптимизация методики приготовления тромбоцит-насыщенных биотрансплантатов на основе дермального матрикса / М.С. Макаров, М.В. Сторожева, Н.В. Боровкова [и др.]. - Текст : непосредственный // Роль больниц скорой помощи и научно-исследовательских институтов скорой медицинской помощи в снижении предотвратимой смертности среди населения: материалы 4-го съезда конференции (19-20 октября 2018 г., Москва)/ [ответственный редактор М.Ш. Хубутя]. - Москва: НПО ВНМ, НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ, 2018. - С. 80-81.

87. Опыт лечения асептического некроза головки бедренной кости у собаки аутологичными мезенхимальными стволовыми клетками с применением rgr-терапии / В.Е. Горохов, А.В. Бокарев, А.А. Стекольников [и др.]. - Текст : непосредственный // Сборник научных трудов 11-й Международной межвузовской конференции по клинической ветеринарии в формате Purina Partners: сборник научных трудов конференции (Москва, 08 декабря 2021 г.) / редакционная коллегия : С.В. Позябин, Л.А. Гнездилова, П.Н. Абрамов. - Москва: ООО «АКАДЕМИЯ ПРИНТ», 2021. - С. 220-227.

88. Особенности гистологического строения кожных покровов и молочной железы безволосых крыс / Г.И. Блохин, Д.А. Беляев, М.М. Пекелис [и др.]. - Текст : непосредственный // Биомедицина. - 2011. - № 3. - С. 50-53.

89. Особенности патогенеза длительно незаживающих ран / Ю.С. Винник, А.Б. Салмина, А.И. Дробушевская [и др.]. - Текст : непосредственный // Новости хирургии. - 2011. - Т. 19, № 3. - С. 101-110.

90. Особенности течения раневого процесса при использовании разных способов локальной трансплантации фибробластов кожи у лабораторных животных / Е.В. Баранов, А.В. Буравский, З.Б. Квачева [и др.]. - Текст : непосредственный // Новости медико-биологических наук. - 2017. - Т. 15, № 2. - С. 8-18.

91. Пантелеев, М.А. Тромбоциты и гемостаз / М.А. Пантелеев, А.Н. Свешникова. - Текст : непосредственный // Онкогематология. - 2014. - № 4. - С. 65-73.

92. Патент № 2104701 С1. Российская Федерация. МПК6 А 61 К 35/14. Способ ввода фибринового сгустка (его варианты) и комплект средств для ввода (его вариант) : № 5052729/14 : заявл. 02.01.1991 : опубл. 20.02.1998 / Бренда М.С., А.Дениз Т., Роберт Т.М. ; заявитель и патентообладатель Криолайф, Инк. - 9 с. - Текст : непосредственный.

93. Патент № RU2679616С1 Российская Федерация, А61К 35/00 (2006.01) А61Р 17/02 (2006.01). Способ приготовления тромбофибринового сгустка, обладающего ростстимулирующими свойствами : № 2018123988 : заявл. , 02.07.2018 : опубликовано 12.02.2019 / Макаров М.С., Сторожева М.В., Боровкова Н.В., Пономарев И.Н. ; заявитель Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы. - 11 с. : ил. - Текст : непосредственный.

94. Патент №22472232. Российская Федерация. МПК G09В 23/28, А61N 5/06. Способ моделирования термической ожоговой раны кожи у лабораторных животных : № 2011110925/14 : заявл. 24.03.2011 : опубл. 10.01.2013, бюл. № 1 / Колсанов А.В., Алипов В.В., Лебедев М.С. [и др.] ; заявитель и патентообладатель ГОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет». - 6 с. - Текст : непосредственный.

95. Патогенетический анализ в контроле терапии случайных гнойных ран у кошек / П.А. Руденко, А.А. Руденко, Ю.А. Ватников, Е.В. Куликов. - Текст : непосредственный // Сборник научных трудов 11-й Международной межвузовской конференции по клинической ветеринарии в формате Purina Partners (Москва, 08 декабря 2021 г.) / редакционная коллегия: С.В. Позябин, Л.А. Гнездилова, П.Н. Абрамов, К.В. Племяшов, А.А. Стекольников, Ю.А. Ватников, М.Д. Качалин. - Москва: ООО «Академия принт», 2021. - С. 118-124.

96. Патологические аспекты процесса заживления ран в норме и при синдроме диабетической стопы / Н.В. Максимова, А.В. Лундуп, Р.О. Любимов [и др.]. - Текст : непосредственный // Вестник РАМН. - 2014. - Т. 69, № 11-12. -С. 110-117.



97. Пестриковски М. Плазмолифтинг: побочные эффекты и как их избежать / М. Пестриковски. - Текст : электронный // Valikhnovski. Институт хирургии. - URL : <https://valikhnovski-md-med.ru/plazmolifting/info/pobochnye-ehffekty.html> (дата обращения 08.03.2022).

98. Петрунина, Н.А. Роль тромбоцитов в регуляции тромбина и роста фибринового сгустка / Н.А. Петрунина, Ф.И. Атауллаханов, А.Н. Баландина. - Текст : электронный // Материалы XXIII съезда Физиологического общества им. И. П. Павлова с международным участием: электронный сборник научных статей (18-22 сентября 2017 г., Воронеж). - Воронеж: Истоки, 2017. - С. 1521-1523. - URL: <https://publications.hse.ru/books/211292106> (дата обращения 10.04.2022).

99. Плазма, обогащенная тромбоцитами, в комплексной терапии заболеваний глаз у собак и кошек / А.Г. Шилкин, Т.Н. Павлова, Д.А. Ротанов, К.А. Новикова. - Текст : непосредственный // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. - 2015. - № 3. - С. 11-14.

100. Потапнев, М.П. Иммунные механизмы стерильного воспаления / М.П. Потапнев. - Текст : непосредственный // Иммунология. - 2015. - Т. 36, № 5. - С. 312–318.

101. Привольнев, В.В. Основные принципы местного лечения ран и раневой инфекции / В.В. Привольнев, Е.В. Каракулина. - Текст : непосредственный // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2011. - Т. 13, № 3. - С. 214-222.

102. Применение плазмы, обогащенной тромбоцитами, в ветеринарной офтальмологии / А.Г. Шилкин, М.А. Войтеха, Т.Н. Павлова [и др.]. - Текст : непосредственный // Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные/ - 2017. - № 2. - С. 6-9.

103. Применение тромбоцитарной аутоплазмы при болезнях кожи мелких домашних животных: учебное пособие / Б.С. Семенов, Е.В. Рыбин, В.А. Гусева, Т.Ш. Кузнецова. - Санкт-Петербург: Лань, 2018. - 48 с. - (Учебники для вузов. Специальная литература). - Текст : непосредственный.

104. Применение тромбоцитарной аутоплазмы при лечении сухожильно-связочного аппарата у лошадей: учебное пособие / Б.С. Семёнов, В.А. Гусева, Е.В. Рыбин [и др.]. - Санкт-Петербург: Лань, 2018. - 60 с. - (Учебники для вузов. Специальная литература). - Текст : непосредственный.

105. Противовоспалительное действие клопидогрела при атеросклерозе / Л.И. Бурячковская, А.Б. Сумароков, И.А. Учитель, У.М. Гупало. - Текст : непосредственный // Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии. -2011. - № 7(6). - С. 677-685.

106. Рагимов, Г.А. Неактивированная тромбоцитарно-лейкоцитарная аутоплазма в лечении нерубцовых алопеций / Г.А. Рагимов, О.Ю. Олисова, К.Г. Егорова. - Текст : электронный // Российский журнал кожных и венерических болезней. - 2016. - Т. 19, № 6. - С. 369-377. - URL : <https://journals.eco-vector.com/1560-9588/article/viewFile/37208/24944> (дата обращения 29.03.2022).

107. Рагимова, Т.М. Структура десны и периодонта при лечении острого гнойного периостита челюсти одонтогенного генеза с применением фибринового сгустка : 14.00.21 : автореферат на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Рагимова Тамила Микаиловна. - Новосибирск, 2009. - 26 с. - Текст : непосредственный.

108. Разработка и экспериментальное обоснование использования клеточнотканевых комплексов для лечения дефектов кожи / Д.Я. Алейник, К.В. Кулакова, С.Н. Бугров [и др.]. - Текст : электронный // Комбустииология : электронный журнал. - Москва. - 2015. URL: <http://combustiolog.ru/journal/oglavlenie-sbornika-rabot-konferentsii-aktual-ny-e-voprosy-lecheniya-termicheskoy-travmy-2/> (дата обращения 21.03.2022).

109. Раны и раневая инфекция : учебное пособие / И. Н. Пиксин, А. В. Пигачев, А. И. Кисткин, И. Ю. Ипполитов. - Саранск: Мордов. гос. ун-т, 2012. - 122 с. - Текст : непосредственный.

110. Расулов, М. Ф. Трансплантация мезенхимальных стромальных клеток костного мозга для лечения термических ожогов кожи : 14.00.41, 14.00.16 : автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук

/ Расулов Масрур Фазлетдинович. - Москва, 2007. - 43 с. - Текст : непосредственный.

111. Реакция кожного покрова крыс на введение аутологичной бесклеточной плазмы крови или плазмы содержащей тромбоциты и другие лейкоциты / М.В. Свердлова, А.В. Бокарев, А.А. Стекольников, А.О. Минина. - Текст : непосредственный // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. - 2021. - № 3. - С. 92-93.

112. Ревякин, И. В. Клинико-морфологическая оценка эффективности применения новых методов лечения кожных ран у животных в сравнительном аспекте / И.В. Ревякин, Л.В. Медведева, В.А. Петренко. - Текст : непосредственный // Вестник алтайского государственного аграрного университета. - 2017. - № 9. - С. 165-170.

113. Регенеративная медицина для лечения лошадей с респираторными заболеваниями / А.В. Травкина, С.Ю. Концевая, А.А. Лаврик, С.Г. Али. - Текст : непосредственный // Инновационные решения актуальных проблем в области ветеринарии: материалы Всероссийской (национальной) научно-практической конференции (Курск, 25-26 февраля 2021 г.) / [ответственный редактор С.Н. Петрова]. - Курск: Курская ГСХА им. И.И. Иванова, 2021. - С. 259-263.

114. Рочев, Д.Л. Роль регуляторных пептидов (PRO-GLY-PRO-LEU И LEU-PRO-GLY-PRO) в процессах фибринообразования, фибринолиза и липидного обмена в норме и при гиперхолестеринемии : 03.03.01: автореферат на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Рочев Дмитрий Леонидович. - Москва, 2013. - 20 с. - Текст : непосредственный.

115. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств : монография / Н.Д. Бунятян, А.Н. Васильев, О.Л. Верстакова [и др.]. - Москва : Гриф и К, 2012. - 914 с. - Текст : непосредственный.

116. Савотченко, А.М. Наш опыт получения и использования фибринового сгустка аутокрови при лечении пациентов с энхондромами костей кисти / А.М. Савотченко, И.Ю. Мигулева, А.М. Файн. - Текст : непосредственный // Хирургия повреждений, критические состояния. Спаси и сохрани: сборник

материалов Пироговского форума (Москва, 25-26 мая 2017 г.) / редакционная коллегия: В.И. Зоря [и др.]. - Воронеж: Издательско-полиграфический центр «Научная книга», 2017. - С. 431-432.

117. Савотченко, А.М. Наш первый опыт получения и применения лейкотромбоцитарного фибринового сгустка в практике экстренной хирургии кисти / А.М. Савотченко, И.Ю. Мигулева, А.М. Файн. - Текст : непосредственный // Роль больниц скорой помощи и научно исследовательских институтов в снижении предотвратимой смертности среди населения: материалы 4-го съезда врачей неотложной медицины с международным участием (Москва, 19-20 октября 2018 г.) / редакционная коллегия : С.С. Петриков, С.А. Кабанова, М.Л. Рогаль, Ю.С. Гольдфарб, П.М. Богопольский. - НИИ СП им. Н.В. Склифосовского; НИИ СП им. И.И. Джанелидзе, 2018. - С. 95-96.

118. Савушкин, А.В. Концентрация фибриногена и свойства фибринового сгустка / А.В. Савушкин. - Текст : непосредственный // Гематология и трансфузиология. - 2003. - Т. 48, № 3. - С. 29-32.

119. Савушкин, А.В. Фибриновые сгустки как гидравлическая преграда / А.В. Савушкин. - Текст : непосредственный // Гематология и Трансфузиология. - 2006. - Т. 51, № 5. - С. 26-30.

120. Самаева, Е.В. Современные подходы в лечении ожоговых ран / Е.В. Самаева, И.В. Пак. - Текст : непосредственный // Вестник КРСУ. - 2017. - Т. 17, №10. - С. 203-204.

121. Семенов, Б.С. Лечение кожных экспериментальных ран с применением тромбоцитарной аутоплазмы / Б.С. Семенов, Т.Ш. Кузнецова, В.А. Гусева. - Текст : непосредственный // Международный вестник ветеринарии. - 2014. - №3. - С. 19-23.

122. Серебряная, Н.Б. Роль тромбоцитов в патогенезе бактериальных инфекций / Н.Б. Серебряная, П.П. Якуцени, Н.Н. Климко. - Текст : непосредственный // ЖУРНАЛ ИНФЕКТОЛОГИИ. - 2017. - Т.9, № 4. - С. 5-13.

123. Слесаренко, Н.А. Заживление индуцированного раневого повреждения кожи под влиянием аутологичных клеток стромально-васкулярной

фракции / Н.А. Слесаренко, Е.Н. Борхунова, Н.В. Вологжанина. - Текст : непосредственный // Российская сельскохозяйственная наука. - 2019. - № 4. - С. 59-62.

124. Слесаренко, Н.А. Морфо-биомеханические корреляции ахиллова сухожилия при использовании аутологичного клеточного продукта в условиях индуцированного повреждения / Н.А. Слесаренко, Е.Н. Борхунова, А.М. Жариков. - Текст : непосредственный // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. - 2020. - № 10. - С. 22-27.

125. Смирнова, Н.А. Оптимизация лечения повреждений кожи различного генеза в комбустиологии и дерматологии / Н.А. Смирнова, А.Ш. Николаева, Н.В. Леонова. - Текст : непосредственный // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. - 2011. - № 2. - С. 52-55.

126. Современные биотехнологии в лечении ран / Н.В. Островский, Р.Д. Бодун, А.Б. Шиповская [и др.]. - Текст : непосредственный // Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. - 2007. - № 4. - С. 88-90.

127. Современные представления о регуляции тромбоцитарного гемостаза / А.Н. Свешникова, А.А. Якушева, А.А. Рябых [и др.]. - Текст : электронный // Креативная кардиология. - 2018. - Т 12, №3. - Р. 260–74. - URL : <https://cardiology-journal.com/catalog/web/viewer.php> (дата обращения 26.03.2022).

128. Солошенко, В.В. Экспериментальное исследование раневого процесса в ожоговой ране при комбинированной травме / В. В. Солошенко. - Текст : непосредственный // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. - 2016. - Т. 15, № 3. - С. 39-45.

129. Спиридонова, Т.Г. Консервативное лечение ожоговых ран / Т.Г. Спиридонова. - Текст : непосредственный // Российский медицинский журнал. - 2003. - Т. 9, № 13-14. - С. 560-563.

130. Способ приготовления тромбофибринового сгустка, обладающего рост-стимулирующими свойствами, для использования в неотложной и регенеративной медицине / М.С. Макаров, М.В. Сторожева, Н.В. Боровкова, И.Н.

Пономарев. - Текст : непосредственный // Роль больниц скорой помощи и научно-исследовательских институтов скорой медицинской помощи в снижении предотвратимой смертности среди населения: материалы 4-го съезда конференции (19-20 октября 2018 г., Москва)/ [ответственный редактор М.Ш. Хубутя]. - Москва: НПО ВНМ, НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ, 2018. - С. 262-263.

131. Сравнительная характеристика способов моделирования термических ожогов на крысах в условиях проведения эксперимента студентами / Е.И. Колупаева, Л.Е. Механтьева, А.В. Масалытин [и др.]. - Текст : электронный // Международный студенческий научный вестник. - 2016. № 4. - С. 152-153. - URL : <https://eduherald.ru/ru/article/view?id=16080> (дата обращения 01.04.2022).

132. Стоматов, А.В. Эффективность использования аутогенного тромбоцитарного геля в сочетании с внутрикостным введением натрия гипохлорита при хирургическом лечении больных хроническим пародонтитом : 14.01.14: автореферат на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Стоматов Александр Владимирович. - Волгоград, 2012. - 23 с. - Текст : непосредственный.

133. Структурные преобразования термической ожоговой раны у крыс в условиях воздействия нейропептидов семакс и селанк / А.К. Ажикова, Б.В. Фельдман, Л.А. Андреева [и др.]. - Текст : электронный // Фармация и фармакология. - 2019. - Т. 7, № 6. - С. 321-331. - URL : <https://www.pharmpharm.ru/jour/article/viewFile/552/582> (дата обращения 26.03.2022).

134. Субботина, Т.Ф. Влияние двухвалентных катионов на образование и лизис фибринового сгустка / Т.Ф. Субботина, Л.В. Галевская, И.Г. Щербак. - Текст : непосредственный // Биомедицинская химия. - 2005. - Т. 51, № 1. - С. 60-65.

135. Субконъюнктивальное применение аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами при лечении ожогов глаз / Р. Маркес-Де-Арасена, И. Монтеро-Де-Эспиноса, М. Муньос, ДЖ. Перейра. - Текст : электронный // PRPLab, 2014. - 8 с. - URL : <http://www.prplab.ru/docs/rusvisk-ofthalmologiya-prp.pdf> (дата обращения 17.04.2022).

136. Ткани десны после дентальной имплантации с применением обогащенного тромбоцитами фибринового сгустка (БТФС) / И.В. Майбородин, И.С. Колесников, Б.В. Шеплев [и др.]. - Текст : непосредственный // Современные наукоемкие технологии. - 2006. - № 5. - С. 83-84.

137. Толстов, А.В. Разработка способов местной профилактики лечения ожоговых ран / А.В. Толстов, А.В. Колсанов. - Текст : непосредственный // Вестник российской военно-медицинской академии. - 2011. - №1 (33). - С. 146.

138. Толстов, А.В. Совершенствование способов профилактики и лечения ожоговой инфекции : 14.01.17 : автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Толстов Андрей Владимирович. - Москва, 2010. - 39 с.

139. Тромбоциты как активаторы и регуляторы воспалительных и иммунных реакций. ЧАСТЬ 1. Основные характеристики тромбоцитов как воспалительных клеток / Серебряная Н.Б., Шанин С.Н., Фомичева Е.Е., Якуцени П.П. - Текст : электронный // Медицинская иммунология. - 2018. - Т. 20, № 6. - С. 785-796. - URL : <https://cyberleninka.ru/article/n/trombotsity-kak-aktivatory-i-regulatory-vospalitelnyh-i-immunnyh-reaktsiy-chast-1-osnovnye-harakteristiki-trombotsitov-kak> (дата обращения 16.03.2022).

140. Тромбоциты как активаторы и регуляторы воспалительных и иммунных реакций. Часть 2. Тромбоциты как участники иммунных реакций / Серебряная Н.Б., Шанин С.Н., Фомичева Е.Е., Якуцени П.П. - Текст : электронный // Медицинская иммунология. - 2019. - Т. 21, № 1. - С. 9-20. - URL : <https://cyberleninka.ru/article/n/trombotsity-kak-aktivatory-i-regulatory-vospalitelnyh-i-immunnyh-reaktsiy-chast-2-trombotsity-kak-uchastniki-immunnyh-reaktsiy> (дата обращения 16.03.2022).

141. Туманов, В.П. Методическое руководство по лечению ран / В.П. Туманов, Г.Б. Герман. - Москва : Пауль Хартманн, 2000. -123 с. - Текст : непосредственный.

142. Фибриновые технологии в ускорении регенерации поврежденной кости в эксперименте / И.В. Майбородин, Б.В. Шеплев, М.Н. Дровосеков [и др.]. -



Текст : непосредственный // Бюллетень сибирской медицины. - 2012. - Т. 11, № 4. - С. 49-56.

143. Хабриев, Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Р.У. Хабриев. - Москва: Медицина, 2005. - 354 с. - Текст : непосредственный.

144. Храмин, В.Н. Местное лечение ран: учебное пособие для врачей и медицинских сестер / В.Н. Храмин. - Москва : «Издательство «Прспект», 2012. - 64 с. - Текст : непосредственный.

145. Чернигова, С.В. Динамика метаболизма коллагена при термических ожогах / С.В. Чернигова, У.Ю. Сидельская, Ю.В. Чернигов. - Текст : непосредственный // Актуальные вопросы ветеринарной хирургии: материалы международной научно-практической конференции, посвященной Дню российской науки ФГБОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина» (05 февраля 2016 г., Омск). - Омск: ООО «Литера», 2016. - С. 191-196.

146. Чернигова, С.В. Динамика перекисного окисления липидов при термических ожогах (экспериментальное исследование) / С.В. Чернигова, Ю.В. Чернигов, У.Ю. Сидельская. - Текст : непосредственный // Современные проблемы развития фундаментальных и прикладных наук : материалы международной научно-практической конференции (18 января 2016 г., Прага). - Praha, Czech Republic: Printing house, 2016. - Т. 2. - С. 25-30.

147. Чернигова, С.В. Роль провоспалительных медиаторов в развитии септических осложнений у животных / С.В. Чернигова, Ю.В. Чернигов. - Текст : непосредственный // Ветеринарная патология. - 2011. - № 1-2. - С. 92-96.

148. Шакирова, Ф.В. Динамический ультрасонографический контроль заживления кожных ран / Ф.В. Шакирова, Н.З. Файзуллина, М.П. Мечов. - Текст : непосредственный // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. - 2012. - Т. 210. - С. 290-294.

149. Шакирова, Ф.В. Морфологический контроль за репаративными процессами в костной ткани / Ф.В. Шакирова, С.В. Тимофеев. - Текст :

непосредственный // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. - 2010. - Т. 203. - С. 284-287.

150. Шакирова, Ф.В. Морфологический контроль заживления мягких тканей в зоне перелома в условиях чрескостного остеосинтеза / Ф.В. Шакирова. - Текст : непосредственный // Ветеринарная медицина. - 2010. - № 2. - С. 52-54.

151. Шаматкова, С.В. Оптимизация регенерационных процессов в мягких тканях / С.В. Шаматкова. - Текст : непосредственный // Журнал анатомии и гистопатологии. - 2013. - № 8(4). - С. 60-63.

152. Шихина, С.Н. Способ лечения острых асептических тендовагинитов у лошадей с применением PRP-терапии / С.Н. Шихина. - Текст : непосредственный // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. - 2019. - № 5. - С. 207-209.

153. Шмакова, О.В. Динамика заживления ран у животных при лечении тканевыми препаратами / О.В. Шмакова, С.Ю. Концевая. - Текст : непосредственный // Наука аграрному производству: актуальность и современность: материалы национальной международной научно-производственной конференции (Майский, 25 мая 2018 г.) / [председатель редакционного совета А.В. Колесников]. - Майский: Белгородский ГАУ им. В.Я. Горина, 2018. - С. 36-38.

154. Шнякина, Т.Н. Экспериментальный способ лечения ожоговой травмы у собак / Т.Н. Шнякина, Н.М. Безина. - Текст : непосредственный // Инновационная деятельность в модернизации АПК : материалы Международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (07-09 декабря 2016 г., Курск). - Курск: Курская ГСХА им. И.И. Иванова, 2017. - С. 278-281.

155. Шнякина, Т.Н. Гематологические и клинические исследования при лечении экспериментальной ожоговой раны у собак / Т.Н. Шнякина, Н.М. Безина, П.Н. Щербаков. - Текст : непосредственный // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. - 2017. - №4. - С. 127-131.

156. Шнякина, Т.Н. Местное лечение термических ожогов у собак в эксперименте / Т.Н. Шнякина, Н.М. Безина, П.Н. Щербаков - Текст : непосредственный // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. - 2016. - №12. - С. 107-111.

157. Эккерт, Р. Разделение клеток иммунной системы / Р. Эккерт. - Текст : непосредственный // Иммунологические методы; под редакцией Г. Фримеля. - Москва: «Медицина», 1987. - С. 226-254.

158. Эффективность применения тромбоцитарной аутоплазмы при лечении ран у крупного рогатого скота / Б.С. Семенов, Е.В. Рыбин, В.А. Гусева, Т.Щ. Кузнецова. - Текст : непосредственный // ЭФФЕКТИВНЫЕ И БЕЗОПАСНЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА В ВЕТЕРИНАРИИ: материалы V-го Международного конгресса ветеринарных фармакологов и токсикологов (Санкт-Петербург, 22-24 мая 2019 г.) / [председатель редакционного совета А.А. Стекольников]. - Санкт-Петербург: СПбГАВМ, 2019. - С. 187-189.

159. Эффективность терапии при моделировании ожогов III степени у лабораторных животных / В.В. Мельников, С.Ю. Концевая, А.А. Лаврик, Н.В. Явников. - Текст : непосредственный // Иппология и ветеринария. - 2021. - № 2 (40). - С. 147-155.

160. Юрьева, С.Ю. Применение тканевых препаратов в ветеринарной медицине / С.Ю. Юрьева, С.Ю. Концевая. - Текст : непосредственный // Инновационные решения актуальных проблем в области ветеринарии: материалы Всероссийской (национальной) научно-практической конференции (Курск, 25-26 февраля 2021 г.) / [ответственный редактор С.Н. Петрова]. - Курск: Курская ГСХА им. И.И. Иванова, 2021. - С. 263-264.

161. Ямскова, В.П. К вопросу о механизмах, лежащих в основе процессов восстановления и репарации в тканях / В.П. Ямскова, М.С. Краснов, И.А. Ямсков. - Текст : непосредственный // Клеточные технологии в биологии и медицине. - 2010. - №1. - С. 32-35.

162. Alves, R. A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification / R. Alves, R. Grimalt. - Text : electronic // Skin

appendage disorders. - 2018. - № 4(1). - P. 18-24. - URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29457008/> (дата обращения 24.04.2022).

163. Antimicrobial action of autologous platelet-rich plasma on MRSA-infected skin wounds in dogs / H. A. Farghali, N. A. AbdElKader, H. O. AbuBakr [et al.]. - Text : electronic // Scientific Reports. - 2019. - № 9(1). - P. 12722. - URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31481694/> (дата обращения 02.04.2022).

164. Chronic stress primes innate immune responses in mice and humans / T.J. Barrett, E.M. Corr, C.V. Solingen [et al.]. - Text : electronic // Cell reports. - 2021. - Vol. 36 (10). - P. 109595. - URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34496250/> (дата обращения 14.03.2022).

165. D'Atri, L.P. Platelet toll-like receptors in thromboinflammation / L.P. D'Atri, M. Scattner. - Text : electronic // Frontiers in bioscience (Landmark edition). - 2017. - Vol. 1, № 22(11). - P. 1867-1883. - URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28410150/> (дата обращения 26.03.2022).

166. Delivery of affordable and scalable encapsulated allogenic/autologous mesenchymal stem cells in coagulated platelet poor plasma for dental pulp regeneration / I. Angelopoulos, C.Trigo, M.I. Ortuzar [et al.]. - Text : electronic // Scientific Reports. - 2022. - Vol. 12, № 1. - P. 435. - URL : <https://www.wikidata.org/wiki/Q110596242> (дата обращения 02.04.2022).

167. Development of an animal model for assessment of the hemostatic efficacy of fibrin sealant in vascular surgery / B.S. Kheirabadi, R. Pearson, K. Rudnicka [et al.]. - Text : electronic // The journal of surgical research. - 2001. - № 100(1). - P. 84-92. - URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11516209/> (дата обращения 09.04.2022).

168. Effect of anticoagulant type and centrifugation speed on platelet-rich plasma of cats and dogs blood / M. Sverdlova, A. Zakharov, A. Stekolnikov [et al.] - Text: electronic // EurAsian Journal of BioSciences. - 2020. - Vol. 14, № 2. - P. 7589-7593. - URL : <https://www.ejobios.org/article/effect-of-anticoagulant-type-and-centrifugation-speed-on-platelet-rich-plasma-of-cats-and-dogs-blood-8554> (дата обращения 30.03.2022).

169. Effect of platelet-rich and platelet-poor plasma on peri-implant innervation in dog mandibles / D. Song, Y. Huang, J.V. Dessel [et al.]. - Text : electronic // International Journal of Implant Dentistry. - 2019. - № 5. - P. 40. - URL : <https://journalimplantdent.springeropen.com/articles/10.1186/s40729-019-0193-3> (дата обращения 15.04.2022).

170. Effects of activated platelet concentrates on human primary cultures of fibroblasts and osteoblasts / E. Cenni, G. Ciapetti, S. Pagani [et al.]. - Text : electronic // Journal of periodontology. - 2005. - Vol. 76, № 3. - P. 323-8. - URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15857063/> (дата обращения 13.03.2022).

171. Egle, K. From Blood to Regenerative Tissue: How Autologous Platelet-Rich Fibrin Can Be Combined with Other Materials to Ensure Controlled Drug and Growth Factor Release / K. Egle, I. Salma, A. Dubnika. - Text : electronic // International Journal of Molecular Sciences. - 2021. - № 22(21). - P. 11553. - URL : <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/21/11553> (дата обращения 24.04.2022).

172. Ehrenfest, D.M.D. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) / D.M.D. Ehrenfest, L. Rasmsson, T. Albrektsson. - Text : electronic // Trends Biotechnology. - 2009. - № 27(3). - P. 158-67. - URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19187989/> (дата обращения 27.03.2022).

173. Equine platelet concentrate preparation and validation / R. Bozorgmanesh, K.G. Magdesian, J.W. Sutton-Burges [et al.]. - Text : electronic // Journal of veterinary internal medicine. - 2019. - Vol. 33(3). - P. 1500-1506. - URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30868640/> (дата обращения 12.04.2022).

174. Evaluation of subcutaneous infiltration of autologous platelet-rich plasma on skin-wound healing in dogs / H.A. Farghai, N.A. AbdElKader, M.S. Khattab, H.O. AbuBakr. - Text : electronic // Bioscience reports. - 2017. - № 37(2). - P. BSR20160503. - URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28246352/> (дата обращения 06.04.2022).

175. Guo, L. The Era of Thromboinflammation: Platelets Are Dynamic Sensors and Effector Cells During Infectious Diseases / L. Guo, M.T. Rondina. - Text : electronic

// *Frontiers in immunology*. - 2019. - № 10. - P. 2204. - URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31572400/> (дата обращения 15.03.2022).

176. In vitro effects of different concentration of PRP on primary bone and gingival cell lines. Preliminary results / F. Graziani, S. Cei, M.R. Giuca [et al.]. - Text : electronic // *Minerva stomatologica*/ - 2005. - Vol. 54, № 1-2. - P. 15-22. - URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15902059/> (дата обращения 05.04.2022).

177. Innate immune receptors in platelets and platelet-leukocyte interactions / P.R.B. Dib, A.C. Quirino-Teixeira, L.B. Merij [et al.]. - Text : electronic // *Journal of leukocyte biology*. - 2020. - Vol. 108, № 4. - P. 1157-1182. - URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32779243/> (дата обращения 04.04.2022).

178. Intra-articular Injections of Platelet-rich Plasma in Patients with Knee Pain of Articular Cartilage Origin (degenerative chondropathy and early OA) / K.S. Lee, A.A. Shetty, S.J. Kim [et al.]. - Text : electronic // *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. - 2013. - Vol. 10, № 6. - P. 1-7. - URL : <http://www.prplab.ru/docs/prp-clinical-trial-paper.pdf> (дата обращения 05.04.2022).

179. Kim, S.J. Role of platelets in neutrophil extracellular trap (NET) production and tissue injury / S.J. Kim, C.N. Jenne. - Text : electronic // *Seminars in Immunology*. - 2016. - Vol. 28, № 6. - P. 546-554. - URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1044532316300896?via%3Dihub> (дата обращения 27.03.2022).

180. Monteiro, S.O. Effects of platelet-rich plasma on the repair of wounds on the distal aspect of forelimb in horses / S.O. Monteiro, O.M. Lepage, C. Theoret. - Text : electronic // *American Journal of Veterinary Research*. - 2009. - Vol. 70, № 2. - P. 277-82. - URL : [https://www.researchgate.net/publication/24029784\\_Effects\\_of\\_platelet-rich\\_plasma\\_on\\_the\\_repair\\_of\\_wounds\\_on\\_the\\_distal\\_aspect\\_of\\_forelimb\\_in\\_horses](https://www.researchgate.net/publication/24029784_Effects_of_platelet-rich_plasma_on_the_repair_of_wounds_on_the_distal_aspect_of_forelimb_in_horses) (дата обращения 05.04.2022).

181. Morphology of fibrin and fibrin-platelet & fibrin-platelet-leukocyte clots / M. Sverdlova, A. Bokarev, A. Stekolnikov [et al.]. - Text : electronic // *International Transaction Journal of Engineering, Management and Applied Sciences and*

Technologies. - 2021. Vol. 12, № 7. - P. 12A7N. - URL : <https://tuengr.com/V12/12A7N.pdf> (дата обращения 21.04.2022).

182. Mosesson, M.W. Fibrinogen and fibrin structure and functions / M.W. Mosesson. - Text : electronic // Journal of Thrombosis Haemostasis. - 2005. - № 3(8). - P. 1894-904. - URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16102057/> (дата обращения 09.03.2022).

183. O'Connell, B. The use of PRP injections in the management of knee osteoarthritis / B. O'Connell, N.M. Wragg, S.L. Wilson. - Text : electronic // Springer Link. - 2019. - Vol. 376, №2. - P. 143-152. - URL : <https://link.springer.com/article/10.1007/s00441-019-02996-x> (дата обращения 02.04.2022).

184. Oryan, A. Platelet-rich plasma for bone healing and regeneration / A. Oryan, S. Alidadi, A. Moshiri. - Text : electronic // Expert Opinion on Biological Therapy. - 2016/ - Vol. 16, № 2. - P. 213-32. - URL : <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14712598.2016.1118458> (дата обращения 05.03.2022).

185. Platelet-activity dependence on the age of rats with experimental dyslipidemia / S.Y. Zavalishina, N.V. Kutafina, Y.A. Vatnikov [et al.]. - Text : electronic // Biology and Medicine. - 2016. - Vol. 8, № 6. - С. 326. - URL : <https://repository.rudn.ru/en/records/article/record/4305/> (дата обращения 21.04.2022).

186. Platelet-Rich Plasma / A.D.K. Le, L. Enweze, M.R. DeBaun, J.L. Dragoo - Text : electronic // Clin Sports Med. - 2019. - № 38(1). - P. 17-44. - URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30466721/> (дата обращения 04.03.2022).

187. Platelet-rich Plasma in Orthopaedic Applications: Evidence-based Recommendations for Treatment / W.K. Hsu, A. Mishra, S.R. Rodeo [et al.]. - Text : electronic // Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons. - 2013. - Vol. 21, № 12. - P. 739-748. - URL : [https://journals.lww.com/jaaos/Abstract/2013/12000/Platelet\\_rich\\_Plasma\\_in\\_Orthopaedic\\_Applications\\_.4.aspx](https://journals.lww.com/jaaos/Abstract/2013/12000/Platelet_rich_Plasma_in_Orthopaedic_Applications_.4.aspx) (дата обращения 02.03.2022).



188. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors / P.R. Amable, R.B.V. Carias, M.V.T. Teixeira [et al.]. - Text : electronic // *Stem Cell Research & Therapy*. - 2013. - № 4. - P. 67. - URL: <http://stemcellres.com/content/4/3/67> (дата обращения 13.03.2022).

189. Recent Advances in the Discovery and Function of Antimicrobial Molecules in Platelets / A.S. Aquino-Domínguez, M.A. Romero-Tlalolini, H. Torres-Aguilar, S.R. Aguilar-Ruiz. - Text : electronic // *International Journal of Molecular Sciences*. - 2021. - № 22. - P. 10230. - URL : <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/19/10230> (дата обращения 28.03.2022).

190. Reduced platelet concentration does not harm PRP effectiveness for ACL repair in a porcine in vivo model / A.N. Mastrangelo, P. Vavken, B.C. Fleming [et al.]. - Text : electronic // *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. - 2011. - Vol. 29, № 7. - P. 1002-1007. - URL : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jor.21375> (дата обращения 06.04.2022).

191. Simple tube centrifugation for processing platelet-rich plasma in the horse / R.L. Fontenot, C.A. Sink, S.R. Werre [et al.]. - Text : electronic // *The Canadian veterinary journal*. - 2012. - Vol. 53, № 12. - P. 1266-72. - URL : [https://www.researchgate.net/publication/237014131\\_Simple\\_tube\\_centrifugation\\_for\\_processing\\_platelet-rich\\_plasma\\_in\\_the\\_horse](https://www.researchgate.net/publication/237014131_Simple_tube_centrifugation_for_processing_platelet-rich_plasma_in_the_horse) (дата обращения 22.03.2022).

192. The clot thickens: Autologous and allogeneic fibrin sealants are mechanically equivalent in an ex vivo model of cartilage repair / R.M. Irwin, L.J. Bonassar, I. Cohen [et al.]. - Text : electronic // *Plos One*. - № 14(11). - P. e0224756. - URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31703078/> (дата обращения 09.04.2022).

193. The cytochemical study of oxygen-dependent and oxygen-independent components of bactericidal activity of dog peripheral blood leukocytes / A. Bokarev, A. Stekolnikov, A. Kudryashov [et al.] - Text: electronic // *International Journal of Veterinary Science*. - 2022. - Vol. 11. - № 1. - С. 104-109. URL : <https://tuengr.com/V12/12A7N.pdf> (дата обращения 20.04.2022).

194. The influence of environmental variables on platelet concentration in horse platelet-rich plasma / R. Rinnovati, N. Romagnoli, F. Gentilini [et al.]. - Text :

electronic // Acta Veterinaria Scandinavica. - 2016. - Vol. 58, № 1. - P. 45. - URL : <https://actavetscand.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s13028-016-0226-3.pdf> (дата обращения 07.03.2022).

195. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields / E. Anitua, M. Sanchez, G. Orive, I. Andia. - Text : electronic // Biomaterials. - 2007. - № 28. - P. 4551-4560. - URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0142961207005339> (дата обращения 27.03.2022).

196. Use of platelet-rich plasma for the treatment of prostatic cysts in dogs / E. Bigliardi, A.M. Cantoni, V.D. Cesaris [et al.]. - Text : electronic // Canadian journal of veterinary research. - Vol. 82, № 4. - P. 264-270. - URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30363366/> (дата обращения 03.04.2022).