

А. А. Троянов, М. П. Потаннев, Г. Г. Кондратенко,
Ж. А. Ибрагимова, А. А. Арабей, Т. С. Колесникова,
Е. В. Ходосовская, Ж. Ф. Цыркунова, Л. А. Хватова

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ И РАНОЗАЖИВЛЯЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ПЛАЗМЫ, ОБОГАЩЕННОЙ РАСТВОРИМЫМИ ФАКТОРАМИ ТРОМБОЦИТОВ, В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРГЛИКЕМИИ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

В экспериментах in vitro изучено влияние нативной плазмы доноров, плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов (ПОРФТ) и лизата тромбоцитов на пролиферацию фибробластов кожи животных и человека, исследовано антибактериальное действие ПОРФТ. У крыс с гипергликемией (12 ммоль/л и более), вызванной введением стрептозоцина, оценили способность ПОРФТ усиливать заживление инфицированных кожных ран. Установлено, что ПОРФТ in vitro обладает достоверным прямым рост-стимулирующим действием в отношении фибробластов кожи человека и проявляет умеренную антибактериальную активность в отношении штаммов St. aureus, E. coli, Ps. aeruginosa. Местное применение ПОРФТ способствует уменьшению площади кожной раны, а также повышает выживаемость животных. Сделан вывод о выраженном локальном лечебном действии ПОРФТ при инфицированных кожных ранах в условиях модели сахарного диабета (СД).

Ключевые слова: *крысы; гипергликемия, вызванная стрептозоцином; плазма, обогащенная растворимыми факторами тромбоцитов человека, фибробласты, антибактериальная активность, заживление ран*

**A. A. Troyanov, M. P. Potannev, G. G. Kondratenko,
Zh. A. Ibragimova, A. A. Arabey, T. S. Kolesnikova,
E. V. Hodosovskaya, Zh. Ph. Zyrkunova, L. A. Hvatova**

BIOLOGICAL EFFECTS AND HEALING ACTION OF PLASMA ENRICHED WITH SOLUBLE FACTORS, PLATELETS, IN CONDITIONS OF EXPERIMENTAL HYPERGLYCEMIA

In experiments in vitro influence of plasma donors, human platelet-rich plasma (PRP) and platelets on the proliferation of fibroblasts from the skin of animals and humans, investigated the antibacterial

action of PRP. In rats with hyperglycemia (12 mmol/l or more) caused by the introduction of streptozotocin, rated the ability PRP to enhance healing of infected skin wounds. It is established that PRP in vitro has reliable direct growth-stimulating effect on human skin fibroblasts and shows moderate antibacterial activity against strains of St. aureus, e. colli, Ps aeruginosa. The application of PRP helps to reduce the area of skin wounds, as well as increases the survival of animals. The conclusion expressed by local health action PRP infected skin wounds in terms of a model of diabetes mellitus.

Key words: rats, streptozotocin-induced diabetes mellitus, human platelet-rich plasma, fibroblasts, antibacterial activity, wound healing.

Проблема лечения хронических поражений кожи (язв) до сих пор остается актуальной, поскольку они возникают при многих заболеваниях, включая сахарный диабет (СД), артериальную и венозную недостаточность, травматические поражения и т. д. Согласно опубликованным данным, в США ими страдают от 2,4 до 4,5 миллионов человек [1]. Эффективность лечения кожных язв при СД зависит от коррекции патогенетических механизмов основного заболевания, вызвавшего их образование, и устранения локальных патологических процессов, участвующих в поддержании хронических изменений. По современным представлениям, тромбоциты периферической крови, мигрируя в очаги поражения, оказывают не только гемостатическое, но и различное другое физиологическое действие. Разрушение тромбоцитов в очаге поражения вызывает высвобождение растворимых факторов тромбоцитов (РФТ), которые способны оказывать противовоспалительное, обезболивающее, ангиогенное, регенеративное влияние [2, 3]. Это послужило основанием рассматривать тромбоциты периферической крови как источник биологически активных РФТ для лечения длительно незаживающих ран кожи. В зарубежных источниках последних лет уже появились сообщения о применении отдельных растворимых факторов тромбоцитов (PDGF, FGF, EGF) для стимуляции заживления кожных язв после их достаточной хирургической обработки [4–6]. Белорусскими учеными недавно был разработан [21] и запатентован оригинальный способ получения ПОРФТ. В этой связи целесообразно было подробно исследовать биологические свойства и экспериментально изучить ранозаживляющее действие данного средства при индуцированной гипергликемии.

Цель исследований – выявление биологических свойств ПОРФТ и связанного с ними заживляющего действия на инфицированные раны кожи экспериментальных животных в условиях модели СД.

Для достижения поставленной цели были выполнены экспериментальные исследования: 1) *in vitro* изучено влияние ПОРФТ на пролиферацию фибробластов кожи животных и фибробластов кожи человека, оценены антибактериальные свойства ПОРФТ; 2) *in vivo* изучен процесс заживления инфицированных ран при воздействии ПОРФТ у животных с индуцированной гипергликемией.

Материалы и методы

Для приготовления ПОРФТ использовали концентрат тромбоцитов, полученный в отделении переливания крови УЗ «9-я городская клиническая больница» г. Минска. Образцы ПОРФТ содержали тромбоциты в концентрации около $1,5 \times 10^9$ /мл. Для контроля использовали образцы цельной плазмы тех же доноров, не содержащей тромбоциты и их растворимые факторы. В качестве средства сравнения *in vitro* использовали лизат тромбоцитов (ЛТ)

из лаборатории биологии и генетики стволовых клеток (зав. – к. м. н. Космачева С.М.) РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий, полученный при лизисе тромбоцитов здоровых лиц (доноров крови) в питательной среде DMEM при концентрации тромбоцитов $5,0 \times 10^9$ /мл [10].

В исследованиях *in vitro* оценивали действие ПОРФТ на пролиферацию фибробластов кожи крыс. Получение клеток кожи животных проводили по методу, описанному Baden [9]. Для этого кусочки кожи усыпленных эфиром новорожденных крыс (эмбрионов) промывали 10 раз в ФСБ с добавлением антибиотика. Кожу переносили в чашку Петри, содержащую несколько слоёв фильтровальной бумаги, смоченной 2,4 ЕД/мл диспазы в ФСБ и раскладывали дермой вниз. Инкубировали 18 часов до полного расслоения, затем переносили в чашку с питательной средой, отмывали от диспазы и пинцетом отделяли эпидермис от дермы. Дерму промывали в среде DMEM, измельчали ножницами и помещали в раствор коллагеназы 625 ЕД/мл. Инкубировали в течение 30–60 минут при 37 °С с периодическим встряхиванием, ресуспендировали в среде с фетальной бычьей сывороткой (ФБС), центрифугировали при 1500 оборотах в минуту в течение 5 минут. Полученные в осадке фибробласты подсчитывали с 0,04 % трипановым синим и переносили в чашки Петри для культивирования в среде DMEM с 10 % ФБС.

Для оценки влияния ПОРФТ на пролиферацию фибробластов кожи животных, клетки взвешивали в концентрации 30 000/мл в среде DMEM + 10 % ФБС со смесью антибиотиков/антимикотиков. Тест ставили в 12-луночных микропланшетах (Sarstedt). ПОРФТ, средства сравнения и контроля вносили в конечном разведении 1:20, клетки культивировали в течение 3 суток. По окончании культивирования фибробласты крыс открепляли от дна лунок с помощью 0,25 % трипсина/0,02 % ЭДТА, клетки подсчитывали с 0,04 % трипановым синим. Эксперимент повторяли трехкратно.

Влияние ПОРФТ на пролиферацию фибробластов кожи человека исследовали следующим образом [12]. Образцы ткани, взятые в Банке тканей РНПЦ «Трансплантации органов и тканей», выдерживали в растворе 2,4 ЕД/мл диспазы в течение 18–20 часов при +4 °С для отделения эпидермиса от дермы кожи. Затем эпидермис отделяли от дермы по линии базальной мембраны с захватом клеток базальной мембраны. При этом получали клетки кожи – кератиноциты с примесью фибробластов. Ткань дермы измельчали на отдельные фрагменты, заливали смесью 0,25 % раствора трипсина и 0,01 % раствора ЭДТА (1:1), (Sigma, США) на 4–10 минут при + 37 °С. По истечении времени добавляли 10 % ЭТС для нейтрализации действия раствора трипсина и ЭДТА. Полученную суспензию клеток осаждали центрифугированием при 1000 оборотах в минуту в течение 10 минут. При этом посевная доза

клеток составляла $200-500 \times 10^3$ на флакон в объеме 5 мл. В качестве ростовой среды использовали среду MCDB 153 с добавлением эпидермального фактора роста (hEGF, 10 нг/мл) (Stem Cell Technologies, Канада), инсулин-селенит-трансферриновой смеси (10 мкг/мл) (Sigma, США), фактора роста кератиноцитов (KGF, 20 нг/мл, Stem Cell Technologies, Канада), 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Sigma, США), гидрокортизона (0,5 мкг/мл). Дермальные фибробласты с примесью кератиноцитов повторно пересеивали на питательную среду DMEM с 15 % ЭТС, 4,5 % глюкозы, гентамицином – 50 мкг/мл. В процессе культивирования сохранялись только фибробласты, которые использовали для тестирования. Пролиферативную активность оценивали по количеству клеток и их приросту на 1 мл среды. Эксперимент повторяли двукратно.

Для оценки антибактериальных свойств ПОРФТ использовали метод ингибирования бактериального роста в диск-диффузионном тесте [11]. Метод заключался в нанесении на поверхность мясо-пептонного агара (кровяного агара или агара Мюллера Хинтона) взвеси бактерий: *S. aureus* (10^8 КОЕ/мл), *E. coli* (10^7 КОЕ/мл), *P. aeruginosa* (10^6 КОЕ/мл) для обеспечения сплошного бактериального роста. На поверхность агара отдельно наносили ПОРФТ и нативную плазму в объеме 20 мкл без разведения. После инкубации 18 часов ($+37^\circ\text{C}$), оценивали наличие или снижение бактериального роста в месте нанесения изучаемых средств. Полученные результаты документировали фотографированием. Зоны отсутствия (подавления) роста бактерий измеряли в мм, оценивали также частоту положительных результатов (наличие бактерицидного эффекта по снижению количества выросших бактерий в месте нанесения).

Для изучения ранозаживляющего действия ПОРФТ использовали животных (крыс-самцов) линии Wistar с массой тела 250–350 г из вивария Белорусского государственного медицинского университета (БГМУ). Исследования на животных проводились с разрешения и одобрения Комитета по биомедицинской этике БГМУ.

В исследовании *in vivo* использовали крыс с экспериментальным СД, который вызывали однократным внутривенным стрептозотоцином (Sigma) из расчета 50 мг/кг веса [7]. Через 4 дня после введения стрептозотоцина осуществляли контроль уровня глюкозы в периферической крови животных. Отбирали животных с уровнем глюкозы не менее 20,0 мг/л ($\approx 11,9$ ммоль/л) [8] при повторных измерениях к моменту создания кожной раны и началу местного лечения. Рану кожи спины животных диаметром 1,5 см создавали путем иссечения кожи под местной анестезией 0,25 % раствором новокаина, затем инфицировали ее нанесением бактериальной взвеси, содержащей $2-3 \times 10^8$ КОЕ *S. aureus*. Через 3 дня после создания раны оценивали уровень бактериального обсеменения, он составлял $5-6 \times 10^5$ КОЕ/кг веса, и начинали проводить местное лечение.

В зависимости от вида местного лечения животных распределяли на 3 группы. В группе 1 ($n = 15$) кожную рану промывали 6 % раствором перекиси водорода, затем – слабым раствором перманганата калия. В группе 2 ($n = 12$) рану промывали 6 % раствором перекиси водорода, обрабатывали 50 мкл 10 % раствора глюконата кальция. Затем, на рану наносили 150 мкл нативной плазмы и покрывали 75 мкл раствора тромбина с активностью 20 ЕД/мл

для формирования в течение 20–40 секунд защитного гелеобразного слоя, под которым происходило дальнейшее заживление раны кожи. В группе 3 ($n = 17$), рану санировали 6 % раствором перекиси водорода, обрабатывали 50 мкл 10 % раствора глюконата кальция, затем наносили 150 мкл ПОРФТ и покрывали 75 мкл раствора тромбина с активностью 20 ЕД/мл для гелеобразования.

Динамику заживления кожных ран в начале лечения и через 7, 14, 21, 28 дней раны документировали фотографированием, размеры определяли планиметрически. Для измерения площади раневого дефекта кожи использовали программу Colour-Science Image Editor v 3.01.02 Professional (SoftoRoom). Уровень глюкозы крови у животных измеряли с помощью глюкометра Fine test premium (Infopia).

Статистические методы обработки данных включали определение средних значений, ошибку среднего значения ($M \pm SE$). Проверку однородности выборок показателей групп животных проверяли с использованием критерия χ^2 Пирсона. Различия показателей групп животных оценивали с помощью парного *t*-критерия Стьюдента при достоверности при $p < 0,05$. При проведении статистической обработки материала использовали пакет программ STATISTICA 10.0.

Результаты и обсуждение

Результаты экспериментов *in vitro*, выполненных для выяснения возможного влияния ПОРФТ человека на пролиферацию фибробластов кожи крыс, представлены в таблице 1.

Таблица 1. Влияние *in vitro* плазмы человека, ПОРФТ и ЛТ на пролиферацию фибробластов кожи крыс

| № эксперимента | Варианты | Исследуемые образцы | Количество клеток, выросших в течение 72 часов <i>in vitro</i> | |
|----------------|----------|---------------------|--|--------------------|
| 1 | А | Контроль клеток | $227,5 \pm 13,15$ | P |
| | Б | Плазма (03.03.15)* | $127,5 \pm 11,09$ | $P_{A,B} = 0,001$ |
| | В | ПОРФТ (03.03.15) | $140 \pm 9,13$ | $P_{A,B} = 0,0016$ |
| | Г | ЛТ (11.14) | $500 \pm 10,8$ | $P_{A,G} < 0,0001$ |
| 2 | А | Контроль клеток | $107,5 \pm 4,79$ | |
| | Б | Плазма (05.02.15) | $45 \pm 2,89$ | $P_{A,B} < 0,0001$ |
| | В | ПОРФТ (05.02.15) | $117,5 \pm 7,5$ | $P_{A,B} = 0,3$ |
| | Г | ЛТ (12.14) | $190 \pm 10,0$ | $P_{A,G} < 0,0001$ |
| 3 | А | Контроль клеток | $85 \pm 2,89$ | |
| | Б | Плазма (17.03.15) | $47,5 \pm 2,5$ | $P_{A,B} < 0,0001$ |
| | В | ПОРФТ (17.03.15) | $45 \pm 2,89$ | $P_{A,B} < 0,0001$ |
| | Г | ЛТ (02.15) | $172,5 \pm 4,79$ | $P_{A,G} < 0,0001$ |

Примечание: * все исследуемые образцы тестированы в конечной 5 % концентрации.

Установлено, что как плазма крови человека, так и образцы ПОРФТ оказывали в большинстве случаев угнетающее действие на рост фибробластов кожи крыс. Наиболее вероятно это связано со значительными (видовыми) отличиями чужеродных белков плазмы человека, являющимися ксеногенными по отношению к фибробластам кожи крыс. Данное предположение подтверждается тем, что ЛТ, не содержащий белки плазмы крови человека, вызывал 2-кратное увеличение количества пролиферирующих фибробластов кожи крыс во всех проведенных экспериментах.

Выявленные факты указывали на целесообразность проведения подобных исследований с фибробластами кожи человека. В сравнительном плане нами изучено влияние цельной плазмы, ПОРФТ и ЛТ *in vitro* на пролиферацию фибробластов кожи человека, результаты которого представлены в таблице 2.

Таблица 2. Влияние препаратов растворимых факторов тромбоцитов на рост фибробластов кожи человека *in vitro*

| № эксперимента | Варианты | Исследуемые образцы | Количество выросших клеток (×1000/мл) | |
|----------------|----------|----------------------|---------------------------------------|-------------------|
| | | | Контроль | Р |
| 1 | А | Контроль клеток | 65 ± 5,0 | Р |
| | Б | Плазма (27.01.2015)* | 65 ± 5,0 | $P_{Б,А} > 0,05$ |
| | В | ПОРФТ (27.01.2015) | 110 ± 7,1 | $P_{В,А} = 0,002$ |
| | Г | ЛТ (26.02.2015) | 90 ± ± 4,1 | $P_{Г,А} = 0,008$ |
| 2 | А | Контроль клеток | 62,5 ± 6,3 | |
| | Б | Плазма (27.01.15) | 60 ± 4,1 | $P_{Б,А} > 0,05$ |
| | В | ПОРФТ (27.01.15) | 125 ± 8,7 | $P_{В,А} = 0,001$ |
| | Г | ЛТ (17.01.15) | 70 ± 7,1 | $P_{Г,А} > 0,05$ |

Примечание: * все исследуемые образцы тестированы в конечной 5 % концентрации.

Как следует из таблицы 2, только образцы ПОРФТ обладали достоверным рост-стимулирующим действием в отношении фибробластов кожи человека *in vitro*. Несмотря на достоверность отличий в сравнении с контролем в эксперименте 1 ($p < 0,05$), ЛТ оказывал менее выраженное действие на пролиферацию фибробластов

кожи человека. Таким образом установлено, что *in vitro* ПОРФТ обладает наиболее выраженным прямым рост-стимулирующим действием в отношении фибробластов кожи человека.

По данным литературы положительное влияние РФТ на заживление ран может быть связано с антибактериальным действием [13, 14, 16]. Однако, полученные образцы ПОРФТ на предмет их антибактериального действия ранее не исследовались. Поэтому в сравнительном плане нами была оценена их антибактериальная активность (таблица 3).

Согласно полученных данных, приведенных в таблице 3, как образцы ПОРФТ, так и образцы бессывороточного ЛТ, проявляют антибактериальную активность в 20–40 % случаев в тесте микродиффузии в агаре в отношении *St. aureus* ATCC 259237, *E. coli*. ATCC 11229, *P. aeruginosa* ATCC 15412. При этом антибактериальная активность изучаемых образцов ПОРФТ и ЛТ превышала таковую образцов плазмы.

На рисунке показано подавление роста бактерий в местах нанесения ПОРФТ и бессывороточного ЛТ.

При исследовании влияния изучаемых средств на процесс заживления инфицированных ран у животных с гипергликемией вначале были проведены предварительные эксперименты. Выявлены значительные колебания ответа крыс на индукцию гипергликемии под действием стрептозотоцина и высокую токсичность последнего, вызывающего гибель части животных, что наблюдали и другие исследователи [15]. Только у 50–65 % крыс развивалась гипергликемия с уровнем глюкозы в перифериче-

Таблица 3. Антибактериальная активность нативной плазмы, ПОРФТ и ЛТ

| Вид бактерий | Параметры оценки | Контроль | Плазма | ПОРФТ | ЛТ |
|----------------------|---|----------|-----------------------------------|---|--------------------------------|
| <i>S. aureus</i> | Размеры зоны ингибиции роста бактерий (в мм)* | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 1,3 ± 0,97 $P_{1-3} = 0,18$ | 4,3 ± 3,68 $P_{1-4} = 0,23$ |
| | Частота положительных проб †† | 0/10 | 0/12 | 2/12 $P_{1-3} = 0,18$ $P_{2-3} = 0,14$ | 2/10 $P_{1-4} = 0,136$ |
| <i>E. coli</i> | Размеры зоны ингибиции роста бактерий (в мм) | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0,9 ± 0,9 $P_{1-4} = 0,33$ |
| | Частота полож. проб | 0/10 | 1/12 | 4/12* $P_{1-3} = 0,044$ $P_{2-3} = 0,132$ | 3/10 $P_{1-4} = 0,06$ |
| <i>P. aeruginosa</i> | Размеры зоны ингибиции роста бактерий (в мм) | 0 ± 0 | 3,65 ± 1,68* $P_{1-2} = 0,043$ | 3,7 ± 1,7* $P_{1-3} = 0,045$ | 2,9 ± 1,92 $P_{1-4} = 0,13$ |
| | Частота полож. проб | 0/10 | 4/10* $P_{1-2} = 0,025$ | 4/10* $P_{1-3} = 0,025$ | 4/9* $P_{1-4} = 0,018$ |

Примечание: представлены суммарные данные 9–12 определений;

† – положительными считали пробы с уменьшением количества бактерий в месте нанесения не менее чем 10 раз;

* – $P < 0,05$

Таблица 4. Выживаемость крыс с гипергликемией, индуцированной введением стрептозотоцина

| № групп | Количество крыс в группе | Количество выживших животных после проведения местной терапии повреждений кожи через | | | | |
|---------|--------------------------|--|---|----------------------------|--|---|
| | | 0 дней | 7 дней | 14 день | 21 день | 28 дней |
| 1 | 15 | 15 | 10 | 9 | 7 | 6 |
| 2 | 12 | 12 | 9 | 8 | 5 | 5 |
| 3 | 17 | 17 | 16 ($P_{1-3} = 0,047$; $P_{2-3} = 0,14$) | 14 ($P_{1-3} = 0,16$) | 13 ($P_{1-3} = 0,082$; $P_{2-3} = 0,057$) | 12 ($P_{1-3} = 0,082$; $P_{2-3} = 0,12$) |

Примечание: здесь и далее оценивали крыс с уровнем глюкозы 20,0 мг/л и более без присоединившейся вторичной микробной инфекции; группа 1 – контрольные крысы; группа 2 – крысы, получавших местное лечение плазмой; группа 3 – крысы, получавшие местное лечение плазмой, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов.

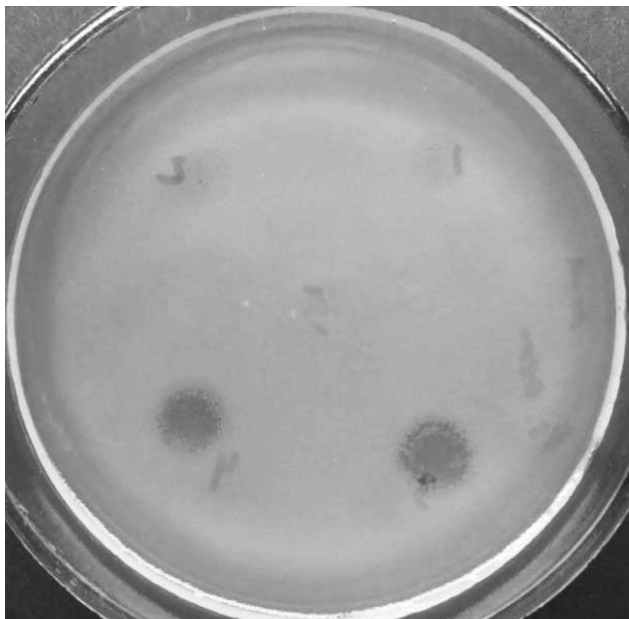


Рисунок. Результаты бактериального роста *P. aeruginosa* (10^6 КОЕ/мл) через 24 часа под действием образцов ПОРФТ и бессывороточного ЛТ

ской крови 11,9 ммоль/л и более при исходном уровне глюкозы 6,2–6,3 ммоль/л. Поэтому на начальном этапе оценено как местная терапия кожных ран влияет на выживаемость экспериментальных животных (таблица 4).

Как видно из таблицы 4, выживаемость животных с гипергликемией не различалась при сравнении контрольной группы и животных с местным использованием плазмы, но достоверно различалась в отдаленные сроки наблюдения (28 дней) после применения ПОРФТ. При этом тенденция к более высокой частоте выживаемости наблюдалась в данной группе и в более ранние сроки (на 14 и 21 дни).

Заживление кожных ран у животных с гипергликемией, как показали предварительные эксперименты, протекает в более отдаленные сроки (на 21–28 день по сравнению с 19–23 дня у здоровых животных).

Нами не выявлено существенных различий количества крыс с зажившими ранами кожи на этапах контроля и к 28 дню, когда у животных всех групп лечения наблюдалось полное заживление ран (таблица 5). Как показано в таблице 5, средний размер ран при учете крыс был меньше в группе крыс, получавших местное лечение ПОРФТ по сравнению с крысами, получавшими лечение плазмой. В ранние сроки наблюдения (через 7 дней после проведения местного лечения) средний размер ран

у крыс, получавших местно ПОРФТ, был достоверно меньше такового у контрольных животных.

В порядке обсуждения полученных результатов следует отметить, что индукция гипергликемии введением стрептозотоцина является общепризнанным подходом для моделирования СД у экспериментальных животных [7, 15, 17, 18]. При этом наблюдаются типичные для СД метаболические нарушения в тканях и органах животных. Моделирование процесса заживления кожных поражений (язв кожи) у таких животных важно для разработки тактики лечения «синдрома диабетической стопы» у пациентов [7, 17]. Полученные данные прежде всего подтвердили высокую токсичность стрептозотоцина, используемого для моделирования СД у крыс [15]. Это обосновало выбор нами наиболее щадящего режима введения стрептозотоцина, вызывающего уровень гипергликемии 20,0 мг/л (11,9 ммоль/л и более), который является клинически значимым для СД [20]. Токсичность стрептозотоцина и нарушения тканевого метаболизма, связанные с гипергликемией, повлияли в наших экспериментах на смертность части животных и замедление сроков заживления кожных ран по сравнению со здоровыми животными. Начиная с 14 дня наблюдалась тенденция к повышению выживаемости крыс при местном лечении кожных ран с использованием ПОРФТ по сравнению с контрольной группой крыс с гипергликемией. К 28 дню наблюдения после проведенного местного лечения различия стали достоверными ($p < 0,05$). Использование местной терапии покрытиями, содержащими белки плазмы крови, само по себе оказывает терапевтический эффект [19]. При этом ПОРФТ, содержащий дополнительно растворимые факторы тромбоцитов, обуславливал тенденцию к усилению лечебного эффекта. Заживление кожной раны у гипергликемизированных животных после обработки ПОРФТ было лучше, чем после нанесения плазмы. Это подчеркивает эффективность влияния ПОРФТ на процесс заживления кожных ран у крыс со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом. При этом в ускорении заживления кожных ран участвуют как растворимые факторы тромбоцитов (ростовые факторы, цитокины, ферменты), так и факторы сыворотки крови [7, 16, 17]. Комплекс этих факторов оказывает действие не только на местные, но и на привлеченные стволовые клетки, участвующие в регенеративном процессе [14, 16, 19].

Выводы

1. ПОРФТ *in vitro* оказывает угнетающее действие на рост фибробластов кожи крыс, что наиболее вероятно связано с видовыми ксеногенными отличиями белков человека.

Таблица 5. Средний размер кожной раны у выживших крыс с гипергликемией в процессе проведения местной терапии

| № группы животных | Размер кожной раны (см ²) крыс после проведения местного лечения через | | | | |
|-------------------|--|--|---|--|---------|
| | 0 дней | 7 дней | 14 дней | 21 день | 28 дней |
| 1 | 2,25 ± 0,06 | 1,035 ± 0,03 | 0,37 ± 0,04 | 0,09 ± 0,046 | 0 |
| 2 | 2,28 ± 0,06 | 0,97 ± 0,06 | 0,43 ± 0,05 | 0,09 ± 0,03 | 0 |
| 3 | 2,24 ± 0,05 | 0,87 ± 0,04 $P_{1-3} = 0,008$ $P_{2-3} = 0,19$ | 0,25 ± 0,01 $P_{1-3} = 0,128$ $P_{2-3} = 0,054$ | 0,025 ± 0,01 $P_{1-3} = 0,1$ $P_{2-3} = 0,037$ | 0 |

Примечание: количество крыс, у которых оценили размеры ран, в группе 1 составило 14, в группе 2 – 10, в группе 3 – 15 особей; * – $p < 0,05$.

□ Оригинальные научные публикации

2. ПОРФТ *in vitro* обладает достоверным прямым рост-стимулирующим действием в отношении фибробластов кожи человека.

3. ПОРФТ проявляет умеренную антибактериальную активность в отношении штаммов *St. aureus*, *E. coli* и наиболее выраженную в отношении штаммов *Ps. aeruginosa*.

4. Местное использование ПОРФТ при инфицированных кожных ранах у крыс с индуцированной гипергликемией положительно влияет на динамику уменьшения площади ран и повышает выживаемость животных.

Литература

1. Frykberg, R. G., Banks J. Challenges in the treatment of chronic wounds // *Advances in wound care*. 2016; 4 (9): 560–582.

2. Nurden, A. T., Nurden P., Sanches M., Andia I., Anitua E. Platelets and wound healing // *Frontiers in bioscience*. 2008; 13: 3525–3548.

3. Потапнев, М. П., Арабей А. А., Кондратенко Г. Г., Троянов А. А., Космачева С. М., Игнатенко С. И., Кохно Е. А., Данилкович Н. Н., Кривенко С. И., Назарова Е. А., Левандовская О. В., Коpecкий И. С., Логинов В. В. Растворимые факторы тромбоцитов и регенеративная медицина // *Здравоохранение*. – 2014. – № 9. – С. 32–40.

4. Crovetti, G., Martinelli G., Issi M., Barone M., Guizzardi M. et al. Platelet gel for hesling cutaneous chronic wounds // *Transfusion and Apheresis Science*. 2004;30: 145–151.

5. Carter, M. J., Fylling C.P., Parnell L.K.S. Use of platelet rich plasma gel on wound healing: a systematic review and meta-analysis // *ePlasty*. 2011; 11: 382–410.

6. Просянникова, Н. В., Липова Е. В., Покровский К. А., Тарасенко Г. Н. Современные методы лечения длительно незаживающих ран кожи // *Рос. журнал кож. и венер. Болезней*. – 2012. – № 6. – С. 47–51.

7. Lan, C-CE., Wu C-S., Huang S-M. [et al.] High-glucose environment enhanced oxidative stress and increased interleukin-8 secretion from keratinocytes // *Diabetes*. 2013; 62: 2530–2538.

8. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus* // *Diabetes care*. 2012; 35 suppl.1: S64–S71.

9. Baden, H. P., Kubilus J. The growth and differentiation of cultured newborn rat keratinocytes // *J. Invest. Dermatol.*, 1983; 80: 124–130.

10. Игнатенко, С. И., Космачева С. М., Потапнев М. П., Кохно Е. А., Гончарова Н. В., Шахмуть Е. А. Ростстимулирующая активность препаратов тромбоцитов в отношении мезенхимальных

стволовых клеток человека *in vitro* / *Весці/Известия НАНБ*. – 2016. – № 1. – С. 52–58.

11. Burnouf, T., Chou M. L., Wu Y. W. [et al.]. Antimicrobial activity of platelet (PLT)-poor plasma, PLT-rich plasma, PLT gel, and solvent/detergent-treated PLT lysate biomaterials against wound bacteria // *Transfusion*. 2013; 53: 138–146.

12. Keira, S. M., Ferreira L. M., Gragnani A. et al. Experimental model for fibroblast culture. *Acta Cirurgica Brasileira* 2004;19(Suppl 1): 11–16.

13. Intravia, J., Allen D. A., Durant T. J. S. [et al.]. In vitro evaluation of the anti-bacterial effect of two preparations of platelet rich plasma compared with cefazolin and whole blood // *Muscles, Ligaments and tendon J*. 2014;4;79–84.

14. Bielecki, T., Dohan Ehrenfest M. D., Everts A. P., Wiczkowski A. The role of leukocytes from L-PRP/L-PRF in wound healing and immune defense: new perspectives // *Current Pharmaceut. Biotechnology*. 2012; 13: 1153–1162.

15. Borzini, P., Mazzucco L. Platelet gels and releasates. *Current Opinion in Hematology*. 2005; 12: 473–479.

16. Brem, H., Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J. Clin Invest*. 2007; 117(5): 1219–1222. Doi: 10.1172/JCI32169.

17. Gibran N. S., Jang Y.-Ch., Isik F. F. [et al.]. Diminished neuro-peptide levels contribute to the impaired cutaneous healing response associated with diabetes mellitus. *Journal of Surgical Research*. 2002; 108: 122–128. Doi: 10.1006/jsre.2002.6525.

18. Пивоварова О. А., Маньковский Б. Н. Морфологическая характеристика эпителия слизистой оболочки бронхиального дерева при стрептококковом диабете. Сахарный диабет. 2013. – № 4. – С. 44–48. Doi: 10.14341/DM2013444-48 [Пивоварова О. А., Маньковский Б. Н. Morphology of bronchial epithelium in rodent streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Diabetes Mellitus*. 2013; (44–48).

19. Roubelakis M. G., Trohatou O., Roubelakis A., Mili E., Kailitopoulos I., Papazoglou G., Pappa K. I., Anagnou N. P. Platelet-rich plasma (PRP) promotes fetal mesenchymal stem/stromal cell migration and wound healing process. *Stem Cell Rev and Rep*. 2014; 10: 417–428. Doi: 10.1007/s12015-013-9494-8.

20. Qiu Z., Kwon A-H., Kamiyama Y. Effects of plasma fibronectin on the healing of full-thickness skin wound in streptozotocin-induced diabetic rats // *J. Surgical Research*. 2007; 138: 64–70. Doi: 10.1016/j.jss.2006.06.034.

21. Потапнев М. П. и соавт. «Инструкция на метод получения плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов» от 11.06.2013, утверждена НТС БГМУ №5 07.06.2013.

Поступила 20.12.2017 г.