

УДК 616-003.93-001.4:616-003.213  
DOI 10.52419/ISSN2072-2419.2022.4.427

## ВЛИЯНИЕ ЛЕЙКОЦИТАРНОЙ ПРИМЕСИ НА РАНОЗАЖИВЛЯЮЩИЙ ЭФФЕКТ ТРОМБОЦИТАРНОГО СГУСТКА

А.В. Бокарев - д.в.н., доцент кафедры общей, частной и оперативной хирургии (ORCID: 0000-0002-4623-5388), М.В. Свердлова (ORCID: 0000-0002-4835-9915), А.О. Минина - к.в.н., ассистент кафедры общей, частной и оперативной хирургии (ORCID: 0000-0002-4176-4053), Р.Д. Холодный - аспирант кафедры общей, частной и оперативной хирургии (ORCID: 0000-0002-2906-4716).  
ФГБОУ ВО СПбГУВМ

**Ключевые слова:** ожог, рана, крысы, тромбоциты, лейкоциты, сгусток, регенерация, эпителизация.

**Keywords:** burn, wound, rats, platelets, leukocytes, clot, regeneration, epithelization.



### РЕФЕРАТ

Задачей представленного исследования было выяснить, влияют ли лейкоциты, находящиеся в тромбоцитарном сгустке на заживление осложненной раны. Исследование проводилось на крысах линии «Вистар». Раны наносили живот-

ным, погруженным в ной области скальпелем, предварительно нагретым в пламени газовой горелки до, примерно, 300,00С. Через трое суток после нанесения раны, для уменьшения количества клеточного детрита, проводили, вначале, ферментативную некроэктомию путем 60-ти минутных аппликаций раствор трипсина (10.0 мг/мл), а затем хирургическую некроэктомию. Животных распределяли на 4 группы: контрольная группа № 1 (раны не ушивались), контрольная группа № 2 (раны ушивали, но без внесения фибринового сгустка), опытная группа № 1 (раны ушивали, предварительно поместив в них тромбоцитарный сгусток), опытная группа № 2 (раны ушивали, предварительно поместив в них тромбоцитарно-лейкоцитарный сгусток). Результат проведенного исследования показал, что в обеих опытных группах заживление раневого дефекта наступало быстрее, чем в контроле. Однако при сравнении заживляющего воздействия чисто тромбоцитарного и тромбоцитарно-лейкоцитарного сгустков результат был неоднозначный. Тромбоцитарно-лейкоцитарный сгусток, в сравнении с чисто тромбоцитарным, несколько замедлял заживление раны за счет индуцирования раннего отторжения швов и замедления ремоделирования рубца. По результатам проведенного исследования можно сделать вывод, что лейкоциты, находящиеся в сгустке действительно могут осуществлять клиринг раны. Но в случае аппликации такого сгустка на рану, поверхность которой была предварительно подвергнута интенсивной некроэктомии, его лейкоцитарный компонент может направить свое провоспалительное действие не на патогенную микрофлору и некротический детрит, а на здоровые ткани, индуцировав гиперэргическое воспаление и замедлив заживление. Полученный результат свидетельствует о том, что исследование следует расширить, используя в качестве моделей раны различной степени инфицированности и с различной степенью некроза в области раневого канала.

## ВВЕДЕНИЕ

Ранее нами было показано, что инъекции тромбоцитарной плазмы в неповрежденную ткань индуцируют только слабый транзиторный воспалительный ответ, не приводящий к серьезным патоморфологическим изменениям [4]. А при использовании инъекций такой плазмы, при лечении ожоговой раны, ускоряются процессы регенерации и ремоделирование рубца [2]. Наоборот, если в тромбоцитарной плазме присутствуют лейкоциты, то при ее инъекции в неповрежденную ткань индуцируется сильный местный воспалительный ответ вплоть до некроза [3, 6]. Последнее априори делает невозможным использование тромбоцитарно-лейкоцитарной плазмы в форме инъекций. Различие в противоположном действии тромбоцитарной и тромбоцитарно-лейкоцитарной образцов плазмы, не смотря на их аутологичность, можно объяснить с точки зрения механизма индукции, развития и затухания воспалительной реакции. В большей степени эти процессы напрямую зависят от соотношения провоспалительных и противовоспалительных медиаторов и цитокинов, которые выделяются клетками [1, 4, 9]. В случае индукции воспаления превалируют 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 экссудации и индуцирующие процессы пролиферации [7, 10]. 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 и тем самым индуцировать вторичную альтерацию.

Таким образом, понятно, что в случае попадания большого количества лейкоцитов в толщу здоровой ткани или патологического очага, не содержащего гноеродной микрофлоры и/или некротического детрита, они будут индуцировать гиперэргическое воспаление и за счет сильной вторичной альтерации задерживать процессы регенерации и ремоделирования.

Однако, с другой стороны, те же, выше озвученные экспериментальные и теоретические предпосылки, наводят на мысль, что тромбоцитарно-лейкоцитарную композицию целесообразно исследовать на ее способность ускорять заживление тех ран, поверхность которых имеет сильное микробное загрязнение и/или значительное количество некротического детрита. Такие раны не заживают по первичному натяжению, так как должны пройти стадию клиринга.

Наши исследования показали, что основные компоненты сгустка, как то фибрин, тромбоциты, и лейкоциты, и по отдельности, и в совокупности, обладают способностью фиксировать и устранять микроорганизмы [3]. Если аппроксимировать эти клиринговые свойства тромбоцитарно-лейкоцитарного сгустка и на клеточно-тканевой детрит, то логично предположить, что срок заживления осложненных ран может уменьшиться за счет сокращения времени их самоочищения.

Задачей представленного исследования было выяснить, как различные клеточные компоненты фибринового сгустка влияют на течение раневого процесса осложненного асептическими некротическими процессами.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на крысах линии «Вистар». Предварительно наркотизированным крысам в межлопаточной области наносили резано-ожоговую рану. Рану наносили скальпелем, нагретым в пламени газовой горелки до, примерно, 300,00С. Длина раны составляла 14 – 15 мм. Через трое суток после нанесения раны проводили вначале ферментативную некроэктомию путем 60-ти минутных аппликаций раствор трипсина (10.0

мг/мл), а затем хирургическую некроэктомию. После окончания процедуры некроэктомии животных распределяли на четыре группы. В каждой группе по 10 крыс. У первой группы крыс (контроль №1) раны не ушивали. У второй группы крыс (контроль №2) раны ушивали, но без введения фибринового сгустка. Двум другим группам крыс раны ушивали, предварительно поместив в них сгустки. У третьей группы крыс (опыт №1) раны ушивали, предварительно поместив в них тромбоцитарный сгусток. У четвертой группы крыс (опыт №2) раны ушивали, предварительно поместив в них тромбоцитарно-лейкоцитарный сгусток. Течение раневого процесса оценивали по характеру местных реакций (отек, экссудация, контракция, состояние струпа, состоятельность швов).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты проведенного исследования показали, что максимально выраженное различие в патоморфологическом течении раневого процесса между группами наблюдалось на 14 день после некроэктомии и лечения. В контрольной группе №1 раневой дефект уменьшился в размерах и оставался под струпом (Рисунок 1В; Рисунок 2А(2)). Признаки эпителизации поверхности раны находящейся под струпом выражены не были. У животных контрольной группы №2 раны вскрылись вследствие несостоятельности швов (Рисунок 1Ж). Ввиду чего образовался раневой просвет, а при микроскопическом исследовании четко выражена деструкция коллагеновых волокон (Рисунок 2В(4)).

У животных опытной группы №1 происходило, практически, полное заживление раны (Рисунок 1Л). При этом на гистологических препаратах визуализируется восстановление волосяных фолликулов (Рисунок 2В(3)) и эпителизация раневого дефекта (Рисунок 2В(5)). В то же время на этой стадии раневого процесса еще заметно менее структурированное положение коллагеновых волокон (Рисунок 2В(6)).

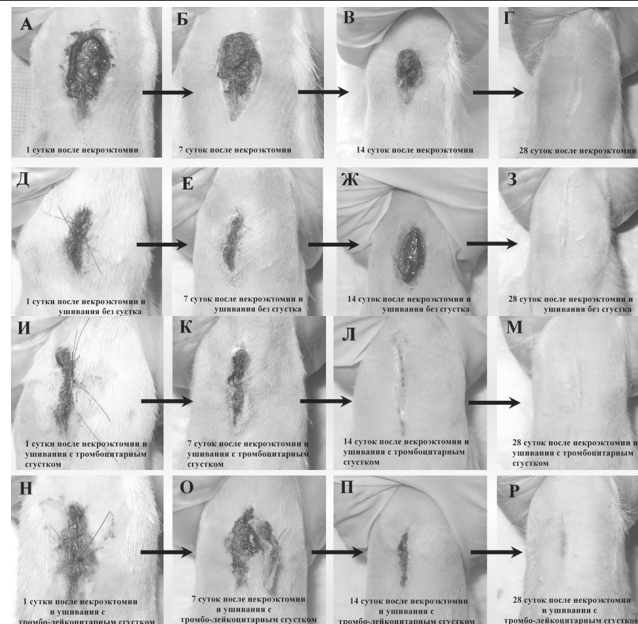
У животных опытной группы №2 на

данный момент времени так же наблюдалось значительное, в сравнении с контрольными группами, заживление раны, но с неоконченной эпителизацией рубца (Рисунок 1П; Рисунок 2Г(5)). Эпителизация проходила под струпом (Рисунок 2Г(2)), что связано с ранним (на седьмые сутки лечения) отторжением шовного материала (Рисунок 1О). В опытной группе №2 на четырнадцатый день лечения структура коллагеновых волокон в области рубца выглядит менее плотно упакованной нежели чем у опытной группы №1 (Рисунок 2Г(6)).

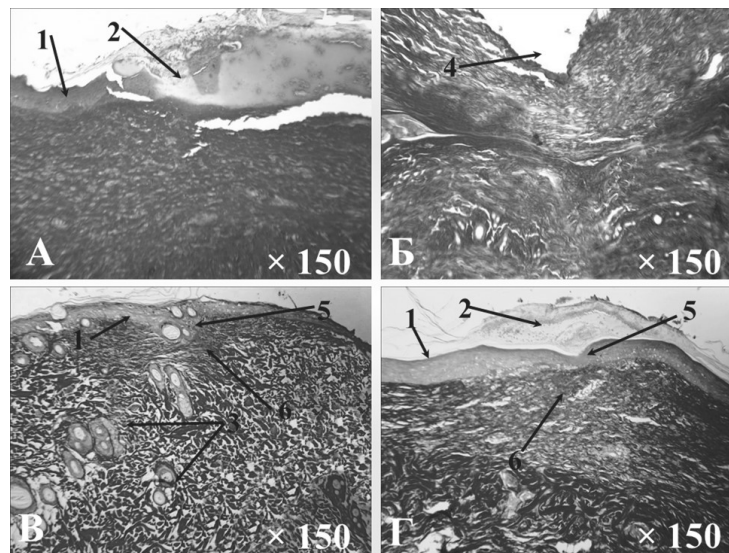
К 28 дню наблюдения во всех четырех группах раны зажили полностью. Однако, максимальное ремоделирование рубца отмечено только в опытной группе №3, где в качестве индуктора заживления был использован тромбоцитарный сгусток (Рисунок 1М). В обеих контрольных группах на момент наблюдения рубец оставался более грубым с явными признаками атрофии волосяных фолликулов (Рисунок 1Г,3). 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.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперимент, целью которого было сравнить заживляющие свойства тромбоцитарного и тромбоцитарно-лейкоцитарного сгустка в отношении комбинированной резано-ожоговой раны, в целом подтвердил предположение, высказанное выше о том, что лейкоциты находящиеся в сгустке могут осуществлять клиринг раны. Однако выяснилось, что в данном конкретном эксперименте конечный результат был более позитивен в отношении тромбоцитарного сгустка, который профилактировал гнойное осложнение, не индуцировал несостоятельность швов и способствовал более быстрой эпителизации и ремоделированию рубца (Рисунок 1М; Рисунок 2В). А тромбоцитарно-лейкоцитарный сгусток хоть показал ранозаживляющие свойства в сравнении с контрольными группами,



**Рис. 1.** Динамика заживления резано-ожоговой раны после некрэктомии. А, Б, В, Г – без ушивания (контроль 1); Д, Е, Ж, З – ушивание без сгустка (контроль 2); И, К, Л, М – ушивание с тромбоцитарным сгустком (Опыт 1); Н, О, П, Р – ушивание с тромбоцитарно-лейкоцитарным сгустком (Опыт 2).



**Рис. 2.** Гистоморфологическая картина резано-ожоговой раны на 14 день лечения. А – контроль №1 (без лечения). Б – контроль №2 (ушивание без сгустка). В – опыт №1 (ушивание с тромбоцитарным сгустком). Г – опыт №2 (ушивание с тромбоцитарно-лейкоцитарным сгустком). 1 – эпидермис, 2 – струи, 3 – волосные фолликулы, 4 – раневой просвет, эпителизация раны, 6 – коллагеновые волокна рубцовой ткани.



но по сравнению с чисто тромбоцитарным сгустком, на седьмой день наблюдения вызывал десквамацию эпителия (Рисунок 1О), а так же задерживал эпителизацию и ремоделирование рубца (Рисунок 1П,Р; Рисунок 2Г). Объяснением такой разницы в ранозаживляющей эффективности тромбоцитарного и тромбоцитарно-лейкоцитарного сгустков может быть характер самой раны и способ ее лечения. В качестве модели раны была использована комбинированная резано-ожоговая рана, которая перед началом лечения подвергалась ферментативной и хирургической некроэктомии, а затем ушивалась. Таким образом, на момент начала лечения рана была практически стерильна и имела незначительное количество некротического детрита. Такое количество некротического детрита оказалось достаточным, чтобы в отсутствие сгустка индуцировать гнойное воспаление и следующую за ней несостоятельность швов у животных контрольной группы №2 (Рисунок 1Ж). В опытной группе №1 ферментативных и фагоцитарных свойств тромбоцитов оказалось достаточно, чтобы осуществить «мягкий» клиринг раны от детрита и предотвратить сильное воспаление, несостоятельность швов и одновременно индуцировать и ускорить процессы пролиферации и эпителизации. В то же время присутствие большого количества лейкоцитов (опытная группа №2), в случае использования тромбоцитарно-лейкоцитарного сгустка привело к быстрому и слишком сильному процессу самоочищения раны, что можно описать как гиперэргическую воспалительную реакцию. Однако такой результат действия тромбоцитарно-лейкоцитарного сгустка свидетельствует о том, что их (тромбоцитарно-лейкоцитарные сгустки) можно использовать в виде аппликаций на потенциально инфицированные и/или некротизированные раны с целью ускорения их очищения по аналогии с методом биологической некроэктомии проводимой с использованием стерильных личинок зеленой бутылочной мухи [5, 8].

## ВЫВОДЫ

По результатам наших исследований можно сделать вывод, что лейкоциты, находящиеся в сгустке могут осуществлять клиринг раны. Однако, в данном эксперименте конечный результат был более позитивен в отношении тромбоцитарного сгустка, который в отличие от тромбоцитарно-лейкоцитарного сгустка не индуцировал несостоятельность швов и способствовал более быстрой эпителизации и ремоделированию рубца, а также профилактировал гнойное осложнение. Использование тромбоцитарно-лейкоцитарного сгустка вызывает гиперэргическую воспалительную реакцию, которая может быть использована на потенциально инфицированные и/или некротизированные раны с целью ускорения их очищения.

## THE EFFECT OF LEUKOCYTE ADMIXTURE ON THE WOUND HEALING EFFECT OF A PLATELET CLOT

**A.V. Bokarev, Doctor of Veterinary Sciences, Associate Professor of the Department of General, Private and Operative Surgery; M.V. Sverdlova; A.O. Minina, Candidate of Veterinary Sciences, Assistant of the Department of General, Private and Operative Surgery; R.D. Kholodnyi, postgraduate student of the Department of General, Private and Operative Surgery; Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "St. Petersburg State University of Veterinary Medicine".**

## ABSTRACT

The objective of the presented study was to find out whether the leukocytes in the platelet clot affect the healing of a complicated wound. The study was conducted on Wistar rats. Before the wound was inflicted, the animals were immersed in sevoflurane anesthesia. Wounds were inflicted in the interscapular area with a scalpel preheated in the flame of a gas burner to about 300.00 C. Three days after the wound was inflicted, in order to reduce the amount of cellular detritus, enzymatic necroectomy was performed first by 60-minute applications of trypsin solution (10.0 mg /ml), and then surgical necroectomy. The animals were divided into 4 groups: control group No. 1 (wounds were

not sutured), control group No. 2 (wounds were sutured, but without the introduction of a fibrin clot), experimental group No. 1 (wounds were sutured after placing a platelet clot in them), experimental group No. 2 (wounds were sutured after placing a platelet clot in them leukocyte clot). According to the results of the study, it was shown that in both experimental groups, the healing of the wound defect occurred faster than in the control. However, when comparing the healing effects of pure platelet and platelet-leukocyte clots, the result was ambiguous. A platelet-leukocyte clot, in comparison with a purely platelet clot, somewhat slowed down wound healing by inducing early rejection of sutures and slowing down scar remodeling. According to the results of the study, it can be concluded that the leukocytes in the clot can actually clear the wound. But in the case of application of such a clot to a wound, the surface of which was previously subjected to intensive necroectomy, its leukocyte component can direct its pro-inflammatory effect not on pathogenic microflora and necrotic detritus, but on healthy tissues. Thereby inducing hyperergic inflammation and slowing healing. The obtained result suggests that the study should be expanded, using wounds of varying degrees of infection and with varying degrees of necrosis in the wound canal area as models.

#### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

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

2. Влияния бесклеточной и тромбоцитарной плазмы на заживление ожоговой раны у крыс / М.В. Свердлова, А.А. Стекольников, А.О. Минина, А.В. Бокарев. - Текст : непосредственный // Международный вестник ветеринарии. - 2022 - № 2 - С. 188-194.

3. Гистологическое исследование микробоцидной функции структурных и клеточных компонентов кровяного сгустка / А.В. Бокарев, А.А. Стекольников, М.В. Свердлова [и др.]. - Текст : непосредственный // Ветеринарный фармакологи-

ческий вестник. - 2022. - № 1 (18). - С. 162-178.

4. Глухов, А. А. Патологическая физиология 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.

5. 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.

6. 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.

7. 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-regulyatory-vospalitelnyh-i-immunnyh-reaktsiy-chast-1-osnovnye-harakteristiki-trombotsitov-kak> (дата обращения 16.07.2022).

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

9. 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.

10. 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

ra [et al.]. - Text : electronic // Stem Cell Research & Therapy. - 2013. - № 4. - P. 67. - URL: <http://stemcellres.com/content/4/3/67> (дата обращения 13.07.2022).

#### REFERENCES

1. Belotsky, S. M. Inflammation. Cell mobilization and clinical effects / S. M. Belotsky, R. R. Avtalion. - Moscow: BINOM, 2008. - 240 p. - Text : direct.
2. Influence of cell-free and platelet plasma on the healing of a burn wound in rats / M.V. Sverdlov, A.A. Stekolnikov, A.O. Minina, A.V. Bokarev. - Text: direct // International Bulletin of Veterinary Medicine. - 2022 - No. 2 - S. 188-194.
3. Histological study of the microbicidal function of the structural and cellular components of a blood clot / A.V. Bokarev, A.A. Stekolnikov, M.V. Sverdlov [i dr.]. - Text: direct // Veterinary pharmacological bulletin. - 2022. - No. 1 (18). - S. 162-178.
4. Glukhov, A. A. Pathophysiology of non-healing wounds and modern methods of wound process simulation / A. A. Glukhov, M. V. Aralova. - Text: direct // News of surgery. - 2015. - V. 23, No. 6. - S. 673-679.
5. Privolnev, V.V. Basic principles of local treatment of wounds and wound infection / V.V. Privolnev, E.V. Karakulin. - Text: direct // Clinical microbiology and antimicrobial chemotherapy. - 2011. - V. 13, No. 3. - S. 214-222.
6. The reaction of the skin of rats to the introduction of autologous cell-free blood plasma or plasma containing platelets and

other leukocytes / M.V. Sverdlov, A.V. Bokarev, A.A. Stekolnikov, A.O. Minin. - Text: direct // Issues of legal regulation in veterinary medicine. - 2021. - No. 3. - S. 92-93.

7. Platelets as activators and regulators of inflammatory and immune reactions. PART 1. Main characteristics of platelets as inflammatory cells / Serebryanaya N.B., Shanin S.N., Fomicheva E.E., Yakutseni P.P. - Text: electronic // Medical Immunology. - 2018. - V. 20, No. 6. - S. 785-796. - URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/trombotsity-kak-aktivatory-i-regulyatory-vospalitelnyh-i-immunnyh-reaktsiy-chast-1-osnovnye-harakteristiki-trombotsitov-kak> (accessed 07/16/2022).

8. Khramilin, V.N. Local treatment of wounds: a textbook for doctors and nurses / V.N. Khramilin. - Moscow: "Prospekt Publishing House", 2012. - 64 p. - Text : direct.

9. Chernigov, S.V. The role of pro-inflammatory mediators in the development of septic complications in animals / S.V. Chernigov, Yu.V. Chernigov. - Text: direct // Veterinary pathology. - 2011. - No. 1-2. - S. 92-96.
10. 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. - No. 4. - P. 67. - URL: <http://stemcellres.com/content/4/3/67> (accessed 13.07.2022).