



ХИРУРГИЯ

УДК: 576.524:612.111.7

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2025.2.364

СРАВНИТЕЛЬНАЯ СПОСОБНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОБРАЗЦОВ КРОВИ, СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ ЦИТРАТОМ НАТРИЯ, ЭДТА ИЛИ ГЕПАРИНОМ, К АГРЕГАЦИИ В ОТВЕТ НА АКТИВАЦИЮ НЕКОТОРЫМИ АГОНИСТАМИ

Минина А.О. * – канд. ветеринар. наук, доц. каф. общей, частной и оперативной хирургии (ORCID 0000-0002-4176-4053); **Бокарев А.В.** – д-р ветеринар. наук, доц. каф. общей, частной и оперативной хирургии (ORCID 0000-0002-4623-5388); **Холодный Р.Д.** – соиск. каф. общей, частной и оперативной хирургии (ORCID 0000-0002-2906-4716).

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»

*bluzma-nast@yandex.ru

Ключевые слова: тромбоциты, антикоагулянты, тромбоцитарная плазма, активация, агрегация, регенеративная терапия, тромбин, тромбоксан-А2.

Keywords: platelets, anticoagulants, platelet plasma, activation, aggregation, regenerative therapy, thrombin, thromboxane-A2.

Поступила: 28.03.2025

Принята к публикации: 06.06.2025

Опубликована онлайн: 20.06.2025



РЕФЕРАТ

Исследована способность к активации тромбоцитов, выделенных из образцов крови стабилизированных цитратом натрия, ЭДТА или гепарином и находящихся в плазме, содержащей тот же антикоагулянт. Тромбоциты, находящиеся в плазме, индуцировали к активации *in vitro* путем добавления таких агонистов как адреналин, тромбин или тромбин+тромбоксан-А2. В качестве маркера активации использовали способность тромбоцитов образовывать агрегаты, которые визуализировали микроскопически в фазовом контрасте. Исследования показали, что тромбоциты выделенные из образцов крови стабилизированных любым из выше указанных антикоагулянтов не агрегировали в ответ на добавление адреналина. Тромбоциты, выделенные из крови, стабилизированной цитратом натрия и ЭДТА, сохраняли способность к агрегации после рекальцификации плазмы, но не агрегировали в ответ на добавление тромбина. Но тромбоциты, выделенные из крови, стабилизированной цитратом натрия, в отличии от тром-

боцитов, выделенных из крови, стабилизированной ЭДТА агрегировали в ответ на добавление тромбина вместе с тромбоксаном-А2. Тромбоциты, выделенные из крови стабилизированной гепарином умеренно агрегировали на активацию тромбином и очень сильно на активацию тромбин + тромбоксан-А2. Результаты исследования, полученные в модели *in vitro*, свидетельствуют о том, что тромбоциты, выделенные из образцов крови стабилизированных цитратом натрия или ЭДТА, после их введения в ткани пациента в составе плазмы содержащей тот же антикоагулянт, смогут активироваться и реализовать свой регенеративный потенциал только при условии быстрой рекальцификации. А тромбоциты, полученные в форме плазмы, обогащенной тромбоцитами из образцов крови стабилизированных гепарином, смогут активироваться и реализовать свой регенеративный потенциал только в том случае, если введенный антикоагулянт не будет препятствовать процессам плазменного и тромбоцитарного гемостаза в месте введения и, соответственно синтезу тромбина и тромбоксана-А2.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Одним из перспективных методов регенеративной медицины является PRP-терапия. PRP это аббревиатура от *platelet-rich plasma*, что в переводе с английского означает плазму, обогащенную тромбоцитами [1, 2]. Такую плазму невозможно получить из нестабилизированной крови. Так как нестабилизированная кровь образует сгустки еще до того, как плазма с тромбоцитами будет отделена от эритроцитов и лейкоцитов путем центрифугирования. Поэтому в кровь добавляют антикоагулянты, такие как цитрат натрия, гепарин или ЭДТА [3]. Механизмы антикоагулянтного действия цитрата натрия, гепарина и ЭДТА отличаются. И они по-разному влияют не только на плазму, но и на тромбоциты [4]. Исходя из выше сказанного можно предположить, что тромбоциты полученные из образцов крови стабилизированных разными антикоагулянтами и более того находящиеся в плазме с тем же антикоагулянтом, с точки зрения активации и высвобождения факторов роста, могут по-разному реагировать на эндогенные агонисты после попадания в организм пациента. Соответственно и терапевтические результаты от такого введения могут отличаться. На сегодняшний день, многочисленные исследования, проведенные *in vitro* на тромбоцитах крыс, свиней, лошадей и человека демонстрируют, противоречивые данные на предмет морфологической и функциональной сохранности тромбоцитов (в том числе на способность сохранять и выделять факторы роста) в зависимости

от того какой антикоагулянт был использован при их выделении из цельной крови [1]. Таким образом на настоящий момент времени не существует бесспорных и объективных данных о том, какой из антикоагулянтов в наименьшей степени препятствует, тем функциям тромбоцитов, которые обеспечивают их регенеративный потенциал. А это в свою очередь ограничивает понимание того, какой из антикоагулянтов предпочтительнее использовать при получении плазмы, обогащенной тромбоцитами для последующего проведения PRP терапии. Исследования, проводимые *in vivo*, т.е., в условиях клинического эксперимента так же не дают ответа на поставленный вопрос, поскольку серьезные сообщения о связи между выбором антикоагулянта и клиническими эффектами PRP терапии отсутствуют [1]. Более того, в публикациях о результатах клинических исследований такой аргумент как выбор антикоагулянта практически игнорируется. Одни исследователи без объяснения своего выбора используют цитрат натрия [5, 6, 7, 8, 9], другие гепарин [10,11], а третьи ЭДТА [12, 13, 14, 15]. Проблема объективной оценки влияния вида антикоагулянта на клинический результат PRP-терапии усугубляется ещё и тем, что в части исследований такая плазма вводится пациенту без предварительной активации [5, 6, 10, 11, 12]. При этом видимо предполагается, что тромбоциты, введенные пациенту, будут активироваться *in situ* благодаря контакту с предсуществующими эндогенными активаторами такими как кальций и адрена-

лин и/или индуцируемыми активаторами как тромбин и тромбоксан-A2 синтезирующимися в микрогематомах вокруг сосудов, поврежденных инъекционной иглой [16]. В других случаях такие активаторы (обычно кальций, тромбин и адреналин) добавляли в плазму, обогащенную тромбоцитами перед введением [7]. Но ни в первом, ни во втором случае авторы исследований так же никак не аргументировали свои действия. Анализ всего выше изложенного логично подводит к тому, что для дальнейшего эффективного и научно-обоснованного использования плазмы, обогащенной тромбоцитами в PRP-терапии необходимо выяснить, могут ли вообще тромбоциты, выделенные из крови, стабилизированной цитратом натрия, гепарином или ЭДТА и находящиеся в плазме с соответствующими антикоагулянтами индуцироваться к активации агонистами, которые имеются или могут появиться в месте введения плазмы, обогащенной тромбоцитами в ткани пациента. Очевидно, что объективный результат такого исследования может быть получен только в замкнутой системе *in vitro*, где отсутствует влияние макроорганизма на инактивацию антикоагулянтов или снижение их концентрации путем диффузии в системный кровоток.

С клинической точки зрения результат подобного исследования может стать рекомендацией к тому, какой конкретно агонист или агонисты, причем в строгой корреляции с тем с каким антикоагулянтом была получена плазма, обогащенная тромбоцитами и в присутствии, которого она была инъецирована пациенту, целесообразно использовать, для её активации.

Цель исследования – определить способность тромбоцитов, выделенных из крови, стабилизированной такими антикоагулянтами как цитрат натрия, гепарин или ЭДТА и находящимися в соответствующей антикоагулянтной среде проявлять, такой начальный признак активации как агрегация при контакте с классическими агонистами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Объектом исследования были тромбоциты, выделенные из крови крыс линии Вистар (n=50). Забор крови (по 1.0 - 2.0 мл от каждого животного) осуществляли из хвостовой вены. Манипуляции по взятию крови выполняли под севофлурановым наркозом. Взятую кровь помещали в пробирки с цитратом натрия, ЭДТА и гепарином. Подсчет клеточных элементов в крови и в тромбоцитарной плазме проводили на гематологическом анализаторе МЕК-6550. Плазму, обогащенную тромбоцитами, получали методом, адаптированным к малым объемам крови (Патент на изобретение RU 2789518 C1). В качестве активаторов тромбоцитарной агрегации использовали адреналин, тромбин и смесь тромбина с тромбоксаном A2. Аптечный адреналин (1 мг адреналина – 5.5 мкмоль/мл) разводили с физиологическим раствором в соотношении 4.8 мл физиологического раствора + 0.2 мл адреналина. Получали рабочий раствор, содержащий 20 мкг адреналина в 1 мл (0.11 мкмоль/мл). В качестве тромбина использовали сыворотку, приготовленную из бесклеточной цитрированной плазмы путем ее рекальцификации. В качестве источника смеси тромбина с тромбоксаном A2 использовали сыворотку, приготовленную из тромбоцитарной цитрированной плазмы путем ее рекальцификации. Образцы тромбоцитарной плазмы смешивали с активаторами. К 0.45 мл тромбоцитарной плазмы добавляли 0.05 мл активатора. Образцы перемешивали. В количестве 0.05 мл помещали на предметное стекло. Накрывали покровным стеклом и исследовали агрегацию. Способность тромбоцитов к агрегации определяли качественным экспресс-методом визуальной оценки на предметном стекле по методу А. С. Шитиковой наблюдая процесс под фазовым контрастом. В качестве количественных и качественных характеристик агрегации использовали размер и плотность скоплений тромбоцитов.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Согласно результатам исследования, полученным при помощи светооптической микроскопии в фазовом контрасте, ни в одном из образцов плазмы, обогащенной тромбоцитами приготовленных из крови стабилизированных такими антикоагулянтами как цитрат натрия, гепарин и ЭДТА не наблюдалось признаков спонтанной агрегации тромбоцитов (Рисунок 1).

При добавлении к полученным образцам плазмы, обогащенной тромбоцитами кальция, адреналина или двух образцов сыворотки, сыворотки полученной из безтромбоцитарной плазмы и сыворотки полученной из тромбоцитарной плазмы, были получены следующие результаты.

Тромбоциты, полученные из крови, стабилизированной цитратом натрия и

находящиеся в замкнутой системе *in vitro* в цитрированной плазме, не агрегировали ни при добавлении адреналина, ни при добавлении сыворотки полученной из безтромбоцитарной плазмы (Рисунок 2а). При добавлении к цитрированной тромбоцитарной плазме сыворотки, полученной из плазмы, обогащенной тромбоцитами, наблюдалась слабая стимуляция агрегации. Которая проявлялась только через 15 – 20 минут и визуализировалась как небольшие рыхлые агрегаты. Тромбоциты, внутри которых не плотно прилегали друг к другу (Рисунок 2б-в). При рекальцификации цитрированной плазмы, обогащенной тромбоцитами добавлением хлористого кальция, практически сразу визуализировалась агрегация тромбоцитов в виде плотных скоплений средней величины (Рисунок 2).

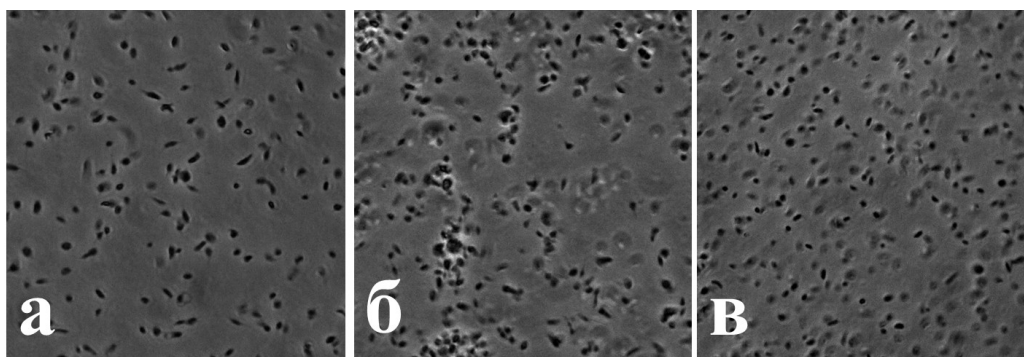


Рисунок 1 – Внешний вид тромбоцитов, выделенных из образцов крови стабилизированных разными антикоагулянтами; а – тромбоциты, выделенные из крови стабилизированной цитратом натрия; б - тромбоциты, выделенные из крови стабилизированной гепарином; в - тромбоциты, выделенные из крови, стабилизированной ЭДТА. (Фазовый контраст. Увеличение $\times 400$).

Тромбоциты, полученные из крови, стабилизированной ЭДТА, и так же находящиеся в замкнутой системе *in vitro* в плазме с тем же антикоагулянтом, не агрегировали ни при добавлении адреналина (Рисунок 3а), ни при добавлении сыворотки полученной из безтромбоцитарной плазмы (Рисунок 3б), ни при добавлении сыворотки полученной из тромбоцитарной плазмы (Рисунок 3в). Но при рекаль-

цификации добавлением хлористого кальция, тромбоциты ЭДТА- плазмы, практически сразу образовывались агрегаты средней величины. Однако эти агрегаты были представлены тромбоцитами, не образующими между собой плотных контактов (Рисунок 3г). И значительная часть тромбоцитов не была вовлечена в формирование таких агрегатов и оставалась в свободном дискретном состоянии.

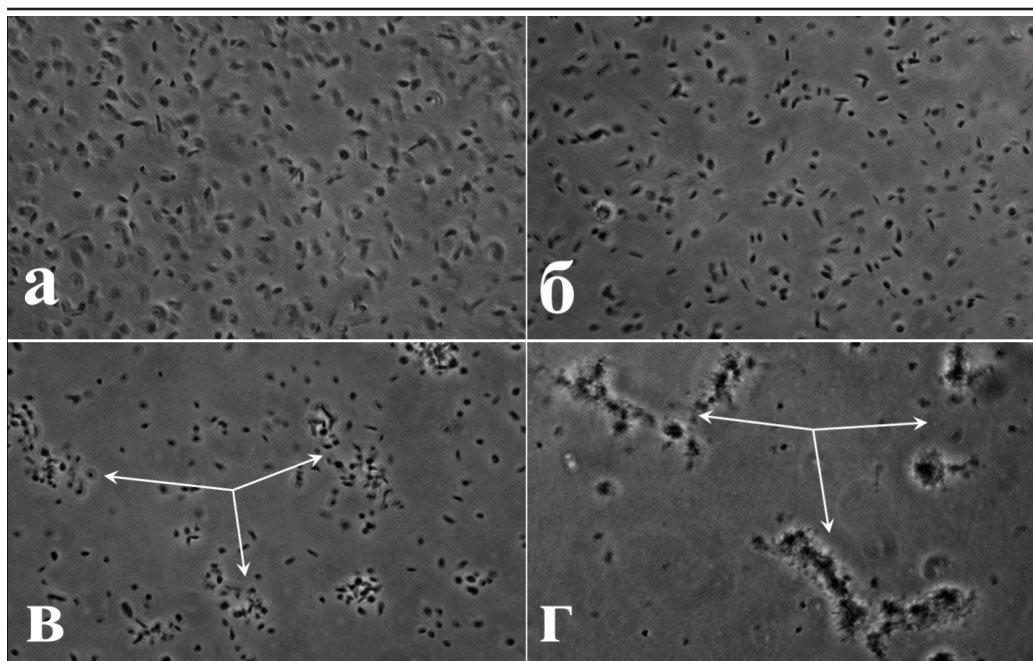


Рисунок 2 – Способность к агрегации тромбоцитов, выделенных из крови стабилизированной цитратом натрия и находящихся в цитрированной плазме, в ответ на некоторые агонисты активации; а – сходная картина отсутствия агрегации тромбоцитов в плазме после добавления адреналина и после добавления сыворотки приготовленной из безтромбоцитарной плазмы (источника тромбина); б – отсутствие агрегации тромбоцитов сразу после добавления сыворотки приготовленной из тромбоцитарной плазмы (источника тромбина и тромбоксана-А2); в – появление небольших тромбоцитарных агрегатов через 20 минут после добавления сыворотки приготовленной из тромбоцитарной плазмы (источника тромбина и тромбоксана-А2); г – появление тромбоцитарных агрегатов средней величины сразу после добавления кальция. (Фазовый контраст. Увеличение $\times 400$).

Тромбоциты, полученные из крови, стабилизированной гепарином и находящиеся в гепаринизированной плазме, не показали агрегации под воздействием такого агониста как адреналин (Рисунок 4а). При добавлении к тромбоцитам гепаринизированной плазмы сыворотки, полученной из безтромбоцитарной плазмы, визуализировалась слабая агрегация. Которая наступала только через 15 – 20 минут и была представлена мелкими и средними скоплениями, в которых тромбоциты не плотно прилегали друг к другу и визуализировались как отдельные клеточные элементы (Рисунок 4б-в). При добавлении к гепаринизированной плаз-

ме, обогащенной тромбоцитами сыворотки, полученной из тромбоцитарной плазмы, возникала быстрая и сильная агрегация тромбоцитов, представленная крупными скоплениями клеточных элементов, сливающимися друг с другом в сплошную практически однородную массу (Рисунок 4г).

Метод исследования количественных и качественных характеристик агрегации тромбоцитов, а также, определение скорости их образования, называется агрегатометрией. Агрегатометрия используется как метод определения функциональной способности самих тромбоцитов активироваться в ответ на действие стандартных

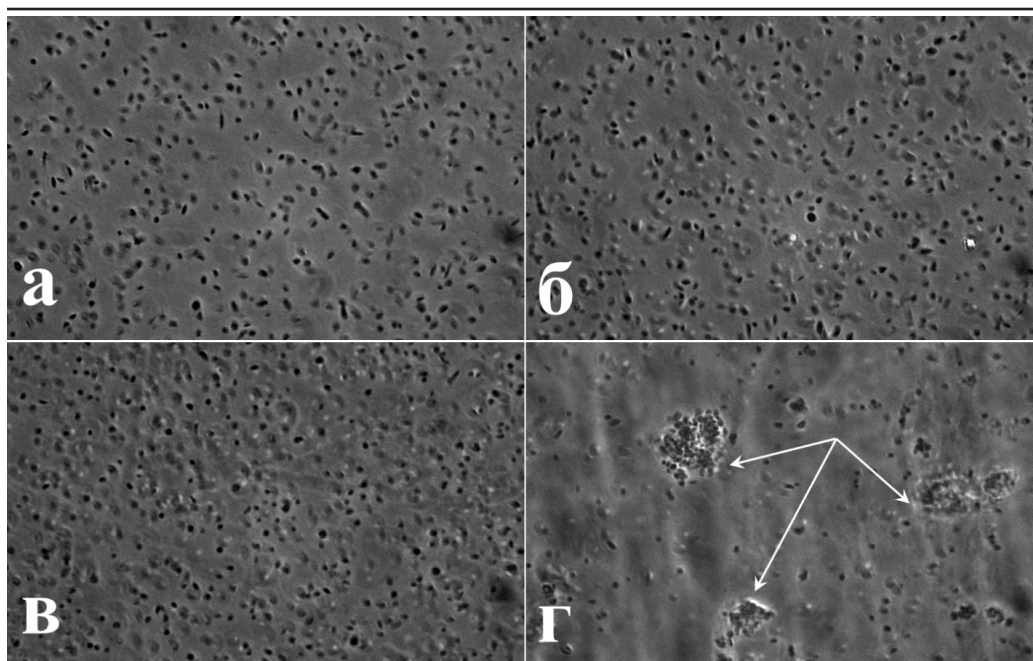


Рисунок 3 – Способность к агрегации тромбоцитов, выделенных из крови стабилизированной ЭДТА и находящихся в цитрированной плазме, в ответ на некоторые агонисты активации; а – отсутствия агрегации тромбоцитов после добавления адреналина; б - отсутствия агрегации тромбоцитов после добавления сыворотки приготовленной из безтромбоцитарной плазмы (источника тромбина); в – отсутствия агрегации тромбоцитов после добавления сыворотки приготовленной из тромбоцитарной плазмы (источника тромбина и тромбоксана-А2); г – появление тромбоцитарных агрегатов средней величины сразу после добавления кальция. (Фазовый контраст. Увеличение $\times 400$).

агонистов. А также с целью исследования различных биологически активных веществ на предмет их способности выступать в качестве агонистов тромбоцитарной активации.

Представленные результаты исследования показали, что, тромбоциты, выделенные из образцов крови с цитратом натрия, ЭДТА или гепарином и находящиеся в плазме с тем же антикоагулянтом, в условиях *in vitro* проявили сходство только в том, что не индуцировались к активации (т.е., не агрегировали) в ответ на действие такого агониста как адреналин. Потенциальная способность к активации, выраженная в агрегации под

воздействием других агонистов, у тромбоцитов, выделенных из крови, стабилизированной вышеуказанными антикоагулянтами, отличалась или качественно, и/или количественно (Таблица 1).

Тромбоциты выделенные из образцов крови стабилизированных такими декальцинирующими антикоагулянтами как цитрат натрия и ЭДТА, и находящиеся в замкнутой системе *in vitro* в соответствующей плазме, проявили сходство в том, что не агрегировали под воздействием такого активатора как сыворотка, полученная из безтромбоцитарной плазмы (Рисунок 2а; Рисунок 3а, б).

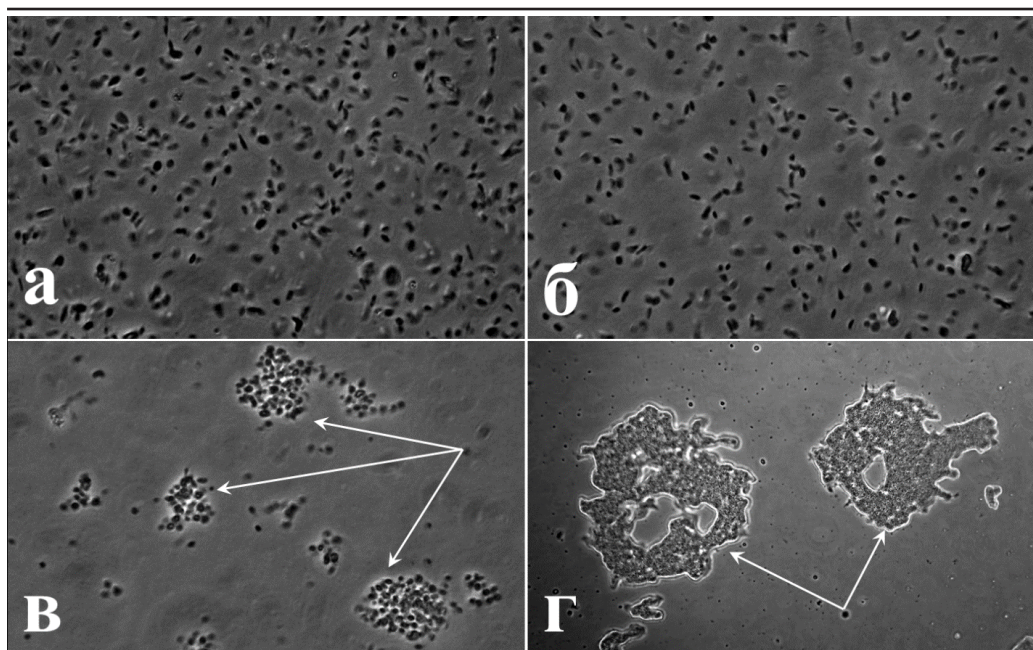


Рисунок 4 – Способность к агрегации тромбоцитов, выделенных из крови стабилизированной гепарином и находящихся в гепаринизированной плазме, в ответ на некоторые агонисты активации; а – отсутствие агрегации тромбоцитов в плазме после добавления кальция или адреналина; б – отсутствие агрегации тромбоцитов сразу после добавления сыворотки приготовленной из безтромбоцитарной плазмы (источника тромбина); в – появление тромбоцитарных агрегатов через 15 минут после добавления сыворотки приготовленной из безтромбоцитарной плазмы (источника тромбина); г – появление тромбоцитарных агрегатов сразу после добавления сыворотки приготовленной из тромбоцитарной плазмы (источника тромбина и тромбоксана-A2). (Фазовый контраст. Увеличение $\times 400$).

Таблица 1 – Сравнительная агрегация тромбоцитов, выделенных из образцов крови стабилизированных различными антикоагулянтами, в ответ на различные активаторы

	Кальций	Адреналин	Сыворотка из безтромбоцитарной плазмы (тромбин)	Сыворотка из тромбоцитарной плазмы (тромбин+Тр-A2)
Цитратная-ПОТ	++	-	-	\pm^*
ЭДТА-ПОТ	++	-	-	-
Гепарин-ПОТ	-	-	\pm^*	+++

«-» - полное отсутствие признаков агрегации.
 «+» - мелкие агрегаты Тр и наличие большого количества неагрегированных Тр.
 «++» - агрегаты Тр средней величины и наличие неагрегированных Тр.
 «+++» - крупные агрегаты Тр и отсутствие неагрегированных Тр.
 * - появление мелких агрегатов Тр после 10 минутного инкубирования при $t = +37.0^{\circ}\text{C}$.

Учитывая, что в сыворотке, полученной из полностью бесклеточной плазмы, в процессе ферментативного каскада свертывания появляется такой стимулятор тромбоцитарной активации как тромбин, можно заключить, что декальцификация делает тромбоциты нечувствительными к активации данным агонистом. Рекальцификация обоих образцов тромбоцитарной плазмы, практически сразу индуцирует находящиеся в них клетки к агрегации (Рисунок 2г; Рисунок 3г). Но, в то же время результаты исследования показывают, что ЭДТА сильнее подавляет способность тромбоцитов к активации, чем цитрат натрия. Это проявляется в том, что тромбоциты из ЭДТА-плазмы, в сравнении с тромбоцитами из цитрированной плазмы, при рекальцификации образуются агрегаты с менее плотными межклеточными контактами (Рисунок 2г; Рисунок 3г). А также, в том, что тромбоциты, полученные из крови, стабилизированной цитратом натрия, в отличии от тромбоцитов, полученных из крови, стабилизированной ЭДТА, хоть и слабо, но агрегируют в ответ на добавление к ним сыворотки приготовленной из тромбоцитарной плазмы, (Рисунок 2б, в; Рисунок 3в). А учитывая, что сыворотка, приготовленная из тромбоцитарной плазмы кроме тромбина, содержит еще и тромбоксан-А2, образующийся в тромбоцитах и являющийся их мощным аутокринным и паракринным стимулятором [6, 7], логично заключить, что цитрат натрия (в отличии от ЭДТА) не способен полностью подавить способность тромбоцитов к активации в ответ на суммарное действие этих двух агонистов. Более сильное негативное влияние ЭДТА на способность тромбоцитов к активации, вероятно, является следствием того, что ЭДТА имеет очень высокую константу связывания с кальцием. Значительно выше, чем у цитрата натрия. А это в свою очередь может усилить конкурентную роль магния, который замещая кальций, не только подавляет активность таких факторов свертывания как № II, № VII, № VIII, № IX, № X, № XI, № XIII, но и уменьшает актив-

ность непосредственно тромбоцитов. В том числе за счет ингибирования каскада арахидоновой кислоты и, соответственно, снижения уровня синтеза тромбоксана-А2 [17, 18]. В противоположность ЭДТА-тромбоцитарной плазмы, для цитрированной плазмы, обогащенной тромбоцитами связывание экстрацеллюлярного кальция, является только относительным ограничивающим фактором активации тромбоцитов. Поскольку, как показано, хоть и с задержкой, но такой начальный признак активации тромбоцитов как агрегация индуцируется комбинацией тромбина и тромбоксаном-А2 даже без рекальцификации (Рисунок 2б, в). Можно предположить, что для совокупного действия перечисленных агонистов достаточно того кальция, который депонирован внутри самих тромбоцитов.

Способность к начальным признакам активации в форме агрегации у тромбоцитов, полученных из крови, стабилизированной гепарином и находящиеся в замкнутой системе *in vitro* в гепаринизированной плазме, как уже было указано выше, отличается от агрегационной способности тромбоцитов, полученных вместе с плазмой из декальцинированной крови (Таблица 1). Это отличие состоит в том, что у них сохраняется способность образовывать агрегаты в ответ на тромбин (сыворотка, полученная из безтромбоцитарной плазмы) (Рисунок 4в). А также тем, что они очень сильно агрегируют в ответ на комбинацию тромбина с тромбоксаном-А2, (сыворотка, полученная из тромбоцитарной плазмы) (Рисунок 4г). Обращает на себя внимание то, что степень выраженности агрегации у тромбоцитов гепаринизированной плазмы, в ответ на комбинацию тромбина с тромбоксаном-А2 значительно выше той, которую визуализирую тромбоциты из цитрированной плазмы, и ЭДТА- плазмы, в ответ на рекальцификацию (Рисунок 4г; Рисунок 2г; Рисунок 3г). И это, не смотря на то что тромбоциты цитрированной плазмы и ЭДТА- плазмы агрегируют не на сам кальций (кальций не является агонистом), а на те же тромбин с тромбкса-

ном-A2 синтез которых становится возможным после рекальцификации. Так же тромбоциты гепаринизированной плазмы, демонстрируют степень агрегации в ответ только на один тромбин, более выраженной чем тромбоциты цитрированной плазмы в ответ на двойную активацию тромбином с тромбоксаном-A2 (Рисунок 4в; Рисунок 2в). Что, видимо, связано с тем, что внеклеточные и внутриклеточные механизмы активации тромбоцитов гепаринизированной плазмы не подавлены абсолютным уменьшением кальция и относительным увеличением магния. Таким образом, еще раз подтверждается то, что отсутствие или понижение концентрации кальция является сильным, и возможно основным фактором, лимитирующим активацию тромбоцитов. С другой стороны, это является свидетельством того, что тромбоцитам, выделенным из крови, стабилизированной гепарином и инъецируемым пациенту в форме гепаринизированной плазмы, обогащенной тромбоцитами, для активации, и соответственно, секреции факторов роста, требуется стимуляция тромбином и тромбоксаном-A2.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

1. Тромбоциты полученные из образцов крови стабилизированных цитратом натрия, ЭДТА или гепарином и находящиеся в плазме, содержащей тот же антикоагулянт, сохраняют потенциальную способность к агрегации. Что означает то, что они способны к активации и, соответственно, по средству высвобождения факторов роста, к реализации своего регенеративного потенциала.

2. Для тромбоцитов, полученных вместе с плазмой из крови, стабилизированной разными антикоагулянтами, требуются и разные условия активации.

Т.е., чувствительность тромбоцитов к активирующим агонистам, отличается в зависимости от того, с каким антикоагулянтом они были выделены из крови и в какой антикоагулянтной среде они находятся в плазме. А от этого, по всей видимости, могут зависеть количественные характеристики высвобождения факторов

роста и, соответственно, терапевтическая эффективности полученной тромбоцитарной плазмы.

Примечание. Ответ на вопрос, существует или нет объективная необходимость в активации плазмы, обогащенной тромбоцитами перед её инъекцией пациенту, не рассматривался в контексте представленного исследования. И может быть дан в дополнительных исследованиях, проведенных *in vivo*. По-видимому, все зависит от того, на сколько быстро в незамкнутой системе *in vivo* происходит инактивация использованных антикоагулянтов и/или их диффузия в окружающие ткани. Конкретней, на сколько быстро произойдет рекальцификация образцов тромбоцитарной плазмы, которые были получены из крови, стабилизированной цитратом натрия или ЭДТА. И на сколько быстро образцы тромбоцитарной плазмы, полученные из крови, стабилизированной гепарином и, соответственно, содержащие этот антикоагулянт, перестанут оказывать местное антикоагулянтное действие на окружающие ткани. Если данные процессы происходят быстро, то предварительная (перед введением пациенту) активация плазмы, обогащенной тромбоцитами, не требуется. Если медленно или не происходят совсем, то априори такая активация необходима. И выбор активаторов для тромбоцитов цитрированной плазмы, ЭДТА- плазмы и гепаринизированной плазмы, должен быть дифференцирован и ориентирован на результаты, полученные в исследованиях, проведенных *in vitro* (Таблица 1).

COMPARATIVE AGGREGATION CAPABILITY OF PLATELES ISOLATED FROM BLOOD SAMPLES STABILIZED WITH SODIUM CITRATE, EDTA OR HEPARIN IN RESPONSE TO ACTIVATION BY SOME AGONISTS

Minina A.O. * – Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor of the Department of General, Private and Operative Surgery (ORCID 0000-0002-4176-4053); **Bo-karev A.V.** – Doctor of Veterinary Sciences, Associate Professor of the Department of General, Private and Operative Surgery

(ORCID 0000-0002-4623-5388); **Kholodny R.D.** – the applicant of the Department of General, Private and Operative Surgery (ORCID 0000-0002-2906-4716).

St. Petersburg State University of Veterinary Medicine

*Bluzma-nast@yandex.ru

ABSTRACT

The ability to activate platelets isolated from blood samples stabilized with sodium citrate, EDTA or heparin and located in plasma containing the same anticoagulant was studied. Platelets found in plasma were induced to activate in vitro by adding agents such as epinephrine, thrombin, or thrombin+thromboxane-A2. The ability of platelets to form aggregates, which were microscopically visualized in phase contrast, was used as an activation marker. The studies showed that platelets isolated from blood samples stabilized with any of the above-mentioned anticoagulants did not aggregate in response to the addition of adrenaline. Platelets isolated from blood stabilized with sodium citrate and EDTA retained the ability to aggregate after plasma recalcification, but did not aggregate in response to the addition of thrombin. However, platelets isolated from sodium citrate-stabilized blood, unlike platelets isolated from EDTA-stabilized blood, aggregated in response to the addition of thrombin along with thromboxane-A2. Platelets isolated from heparin-stabilized blood were moderately aggregated for thrombin activation and very strongly for thrombin + thromboxane-A2 activation. The results of the study obtained in an in vitro model indicate that platelets isolated from blood samples stabilized with sodium citrate or EDTA, after their introduction into the patient's tissues as part of plasma containing the same anticoagulant, will be able to activate and realize their regenerative potential only under the condition of rapid recalcification. And platelets obtained in the form of plasma enriched with platelets from heparin-stabilized blood samples will be able to activate and realize their regenerative potential only if the injected anticoagulant does not

interfere with the processes of plasma and platelet hemostasis at the injection site and, accordingly, the synthesis of thrombin and thromboxane-A2.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Lei, H. The effect of anticoagulants on the quality and biological efficacy of platelet-rich plasma / Lei H., Gui L., Xiao R. // *Clinical Biochemistry*. – 2009. - № 42. – p. 1452–1460.
2. Sharda, A. The life cycle of platelet granules / A. Sharda, R. Flaumenhaft // *F1000Res*. – 2018. – V. 28. – № 7. – P. 236.
3. Основы клинической ветеринарной гематологии: учебное пособие для вузов / С. П. Ковалев, А. В. Туварджиев, В. А. Коноплев, Р. М. Васильев. - 2-е изд., стер. - Санкт-Петербург: Лань, 2023. - 120 с. - ISBN 978-5-507-47198-0
4. Активаторы, рецепторы и пути внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах крови / В.И. Шатурный, С.С. Шахиджанов, А.Н. Свешникова, М.А. Пантелеев // *Биомедицинская химия*. – 2014. – Т. 60, № 2. – С. 182-200.
5. Рагимов, Г.А. Неактивированная тромбоцитарно-лейкоцитарная аутоплазма в лечении нерубцовых алопеций / Рагимов Г.А., Олисова О.Ю., Егорова К.Г. // *Российский журнал кожных и венерических болезней*. – 2016. - № 9(6). – с. 369-377.
6. Evaluation of subcutaneous infiltration of autologous platelet-rich plasma on skin-wound healing in dogs / Farghali H., Kader N., Khattab M., [e.t.c.] // *Bioscience Reports*. – 2017. - № 37. – p. 1 – 13.
7. Evaluation of Three Methods of Platelet-Rich Plasma for Treatment of Equine Distal Limb Skin Wounds / Pereira R., Côte F., Brass K., [e.t.c.] // *Journal of Equine Veterinary Science*. – 2019. - № 72. – p.1-7.
8. Subconjunctival application of plasma platelet concentrates in the treatment of ocular burns: Preliminary results / Marquez-De-Aracena R., Montero-De-Espinosa I., Munoz M., Pereira G. // *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*. – 2007. – V. 82. - № 8. – p. 475-481.
9. Monteiro, S. Effects of platelet-rich plasma on the repair of wounds on the distal

- aspect of the forelimb in horses / Monteiro S., Lepage O., Theoret C. // *American Journal of Veterinary Research*. – 2009. - № 70 (2). – p. 277-82.
10. Комаровский, В. А. Система "Плазмолифтинг" в комплексном лечении травм сухожильно-связочного аппарата у лошадей / Комаровский В. А., Кранина В. А. // *Аграрное образование и наука для агропромышленного комплекса: материалы республиканской научно-практической конференции. Белорусская агропромышленная неделя БЕЛАГРО-2024, Индустриальный парк "Великий камень", 5 июня 2024 г.* / Белорусская государственная сельскохозяйственная академия [и др.]. - Горки: БГСХА, 2024. - С. 117-120.
11. Фефелов, А.А. Оценка эффективности плазмолифтинга в модели экспериментального пародонтита / Фефелов А.А., Цыбиков Н.Н., Фефелова Е.В. // *Актуальные проблемы патофизиологии. Сборник научных статей Международной научно-практической конференции. Под общей редакцией Н.В. Ларёвой.* Чита, 2022. - С. 152-157.
12. Эффективность применения лизата богатой тромбоцитами плазмы (БоТП) у пациентов с эрозией роговицы или посттравматическим рубцеванием тканей век / Боровкова Н.В., Филатова И.А., Ченцова Е.В., и др. // *Российский офтальмологический журнал*. – 2020. № 13(3). – с. 8-14.
13. Обогащенные тромбоцитарной плазмой альгинатные скаффолды и гипоксически активированные фибробласты в терапии хронических раневых дефектов кожи / Е.В. Соловьева, О.И. Кляйн, К.А. Дариенко и др. // *Вестник Военного инновационного технополиса «ЭРА»*. - 2023. - Т. 4. - № 2. – С. 136-145.
14. Возможности богатой тромбоцитами плазмы в лечении дефектов роговицы (экспериментальное исследование) / Е.В. Федосеева, Е.В. Ченцова, Н.В. Боровкова и др. // *Точка зрения. Восток - Запад*. - 2019. - № 1. - С. 51-53.
15. Оптимизация способа получения богатой тромбоцитами плазмы для использования в клинической практике / К.И. Бурыкин, Н.В. Боровкова, М.С. Макаров и др. // *Неотложная медицинская помощь. Журнал им. Н.В. Склифосовского*. - 2023. - Т. 12. - № 2. - С. 268-273.
16. Крячко, О.В. Патологическая физиология животных. Краткий курс лекций по типовым патологическим процессам: учебное пособие / О. В. Крячко, Л. А. Лукоянова; МСХ РФ, СПбГУВМ. - Санкт-Петербург: Изд-во СПбГУВМ, 2024. - 98 с.
17. Дефицит магния и гиперкоагуляционные состояния: метрический анализ данных выборки пациентов 18–50 лет лечебно-профилактических учреждений России / О.А. Громова, И.Ю. Торшин, Ж.Д. Кобалава и др. // *Кардиология*. – 2018. – Т. 58. - № 4. – С. 20 – 32.
18. Shechter, M. The role of magnesium as antithrombotic therapy / M. Shechter // *Wiener Medizinische Wochenschrift*. – 2000. – V. 150. - № 15-16. – P. 343-347.

REFERENCES

1. Lei, H. The effect of anticoagulants on the quality and biological efficiency of platelet-rich plasma / Lei H., Gui L., Xiao R. // *Clinical Biochemistry*. – 2009. - No. 42. – p. 1452 –1460.
2. Sharda, A. The life cycle of platelet granules / A. Sharda, R. Flaumenhaft // *F1000Res*. – 2018. – V. 28. - No. 7. – P. 236.
3. *Fundamentals of Clinical Veterinary Hematology: a textbook for universities* / S. P. Kovalev, A. V. Tuvardzhiev, V. A. Konoplev, R. M. Vasiliev. - 2nd ed., reprinted. - Saint Petersburg: Lan, 2023. - 120 p. - ISBN 978-5-507-47198-0
4. Activators, receptors and intracellular signaling pathways in blood platelets / V.I. Shaturny, S.S. Shakhidzhanov, A.N. Sveshnikova, M.A. Panteleev // *Biomedical chemistry*. - 2014. - Vol. 60, No. 2. - P. 182-200.
5. Ragimov, G.A. Non-activated platelet-leukocyte autoplasm in the treatment of non-scarring alopecia / Ragimov G.A., Olisova O.Yu., Egorova K.G. // *Russian Journal of Skin and Venereal Diseases*. - 2016. - No. 9 (6). - p. 369-377.
6. Evaluation of subcutaneous infiltration of

- autologous platelet-rich plasma on skin-wound healing in dogs / Farghali H., Kader N., Khattab M., [e.t.c.] // *Bioscience Reports*. – 2017. - No. 37. – r. 1 – 13.
7. Evaluation of Three Methods of Platelet-Rich Plasma for Treatment of Equine Distal Limb Skin Wounds / Pereira R., Côte F., Brass K., [e.t.c.] // *Journal of Equine Veterinary Science*. – 2019. - No. 72. – pp. 1-7.
8. Subconjunctival application of plasma platelet concentrate in the treatment of ocular burns: Preliminary results / Marquez-De-Aracena R., Montero-De-Espinosa I., Munoz M., Pereira G. // *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*. – 2007. – V. 82. - No. 8. – p. 475-481.
9. Monteiro, S. Effects of platelet-rich plasma on the repair of wounds on the distal aspect of the forelimb in horses / Monteiro S., Lepage O., Theoret C. // *American Journal of Veterinary Research*. – 2009. - No. 70 (2). – r. 277-82.
10. Komarovskiy, V. A. The "Plasmolifting" system in the complex treatment of tendoligament apparatus injuries in horses / Komarovskiy V. A., Kranina V. A. // *Agrarian education and science for the agro-industrial complex: materials of the republican scientific and practical conference. Belarusian agro-industrial week BELAGRO-2024, Industrial Park "Great Stone", June 5, 2024 / Belarusian State Agricultural Academy [and others]*. - Gorki: BGSHA, 2024. - P. 117-120.
11. Fefilov, A. A. Evaluation of the effectiveness of plasmolifting in the model of experimental periodontitis / Fefilov A. A., Tsybikov N. N., Fefelova E. V. // *Actual problems of pathophysiology. Collection of scientific articles of the International Scientific and Practical Conference. General editor N.V. Lareva. Chita, 2022*. - P. 152-157.
12. Efficiency of using platelet-rich plasma (PRP) lysate in patients with corneal erosion or post-traumatic scarring of eyelid tissues / Borovkova N.V., Filatova I.A., Chentsova E.V., et al. // *Russian Ophthalmological Journal*. - 2020. No. 13 (3). - P. 8-14.
13. Platelet-rich plasma alginate scaffolds and hypoxic activated fibroblasts in the therapy of chronic wound skin defects / E.V. Solovieva, O.I. Klein, K.A. Darienko et al. // *Bulletin of the Military Innovation Technopolis "ERA"*. - 2023. - Vol. 4. - No. 2. – Pp. 136-145.
14. Possibilities of platelet-rich plasma in the treatment of corneal defects (experimental study) / E.V. Fedoseeva, E.V. Chentsova, N.V. Borovkova et al. // *Point of view. East - West*. - 2019. - No. 1. - Pp. 51-53.
15. Optimization of the method for obtaining platelet-rich plasma for use in clinical practice / K.I. Burykin, N.V. Borovkova, M.S. Makarov et al. // *Emergency medical care. Journal named after N.V. Sklifosovskiy*. - 2023. - V. 12. - No. 2. - P. 268-273.
16. Kryachko, O. V. Pathological physiology of animals. A short course of lectures on typical pathological processes: a tutorial / O. V. Kryachko, L. A. Lukyanova; Ministry of Agriculture of the Russian Federation, St. Petersburg State University of Medicine. - St. Petersburg: Publishing house of St. Petersburg State University of Medicine, 2024. - 98 p.
17. Magnesium deficiency and hypercoagulable states: metric analysis of data from a sample of patients aged 18–50 years in medical and preventive institutions of Russia / O. A. Gromova, I. Yu. Torshin, Zh. D. Kobalava et al. // *Cardiology*. – 2018. – T. 58. – No. 4. – P. 20 – 32.
18. Shechter, M. The role of magnesium as antithrombotic therapy / M. Shechter // *Wiener Medizinische Wochenschrift*. – 2000. – V. 150. - No. 15-16. – P. 343-347.