

УДК 615.38:617-001.17/.18:599.323.45
DOI: 10.52419/issn2072-2419.2022.2.188

ВЛИЯНИЕ БЕСКЛЕТОЧНОЙ И ТРОМБОЦИТАРНОЙ ПЛАЗМЫ НА ЗАЖИВЛЕНИЕ ОЖГОВОЙ РАНЫ У КРЫС

М.В. Свердлова - аспирант кафедры общей и частной хирургии (ORCID: 0000-0002-4835-9915), А.А. Стекольников - д.в.н., профессор кафедры общей и частной хирургии (ORCID: 0000-0002-9519-2839), А.О. Минина - к.в.н., ассистент кафедры общей и частной хирургии (ORCID: 0000-0002-4176-4053), А.В. Бокарев - д.в.н., доцент кафедры общей и частной хирургии (ORCID: 0000-0002-4623-5388)
ФГБОУ ВО СПбГУВМ

Ключевые слова: ожог, рана, крысы, тромбоцитарная плазма, безтромбоцитарная плазма, регенерация, эпителизация. **Keywords:** burn, wound, rats, platelet plasma, plasma without platelets, regeneration, epithelization.



РЕФЕРАТ

В представленном исследовании проведен анализ заживляющего эффекта чистой бесклеточной плазмы и плазмы обогащенной тромбоцитами. Исследование проводилось на крысах линии «Вистар». Для проведения эксперимента были сформированы три группы крыс: контрольная и две опытные (№1, № 2). Ожоговые раны наносились животным под севофлурановым наркозом в межлопаточной области омертвевшим диском диаметром 20,0 мм нагретым в пламени газовой горелки до температуры 300,00С путем прикладывания его на 2,0 - 3,0 секунды. В группе контроля лечение ожоговых ран не проводилось, но для уменьшения болевого синдрома использовали поверхностное нанесение аэрозольного 10% лидокаина. Крысам опытных групп № 1 и № 2 лечение ожоговых ран плазмой начинали на 5 сутки после нанесения травмы. Крысам опытной группы №1 проводили лечение путем введения под и вокруг ожога бесклеточной плазмы. Крысам опытной группы №2 лечение проводили путем введения под и вокруг ожога плазмы обогащенной тромбоцитами. Мониторинг и оценку заживления ран осуществляли путем измерения их площади. 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. Результат исследования показал, что и бесклеточная плазма, и плазма обогащенная тромбоцитами ускоряют заживление ожоговой раны в сравнении с контролем. Но тромбоцитарная плазма в сравнении с бесклеточной плазмой оказывает более сильный лечебный эффект значительно ускоряя контракцию краев раны в самые первые дни после введения.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее широко используемых методов регенеративной медицины является введение в область патологического очага пациента его же собственной (аутологичной) плазмы крови обогащенной тромбоцитами [1, 2, 4, 6, 7]. Научным

обоснованием эффективности данного метода является то, что тромбоциты являются природными эндогенными хранилищами и переносчиками большого количества факторов роста, обладающих митогенными свойствами по отношению к клеткам участвующим в процессе регене-

рации [2, 6, 7, 8]. Согласно современным представлениям о процессах индукции регенерации, тромбоциты, попадая в зону патологического очага, связываются с молекулярными потерями повреждения (DAMPs) и друг с другом, активируются и выделяют факторы роста. Которые, в свою очередь, активируют стволовые клетки, способные к пролиферации и дифференцировке. Исходя из этой концепции, среди практикующих врачей закрепилось мнение, что чем больше концентрация тромбоцитов в выделенной плазме, тем выше её ранозаживляющий эффект. Однако это мнение в ряде случаев опровергается некоторыми исследованиями. Так показано, что при экспериментальном лечении повреждения крестовидной связки у свиней, плазма бедная тромбоцитами оказывала то же действие, что и плазма обогащенная тромбоцитами [10]. В другом исследовании показано, что плазма с большим содержанием тромбоцитов замедляла заживление экспериментальных ран у лошадей в сравнении с плазмой содержащей малое количество тромбоцитов [9]. Аналогичная ситуация может иметь место и в том случае, когда сравниваются не концентрации тромбоцитов, а проводится анализ лечебного действия тромбоцитарной плазмы при той или иной патологии. Дело в том, что при анализе литературных источников,

размещенных в свободном доступе, нами было замечено, что при изучении лечебного эффекта аутологичной тромбоцитарной плазмы, исследователи не всегда проверяют клеточный состав конечного продукта. И по факту, анализируя чужие исследования, мы можем исходить из неправильных предпосылок, поскольку не можем быть точно уверены были ли вообще в используемой плазме тромбоциты. И, соответственно, не можем сделать правильный вывод, чем был индуцирован лечебный эффект, сывороточными факторами или факторами тромбоцитов. Ранее мы показали, что аутологичная, но безтромбоцитарная плазма для здоровой кожи крыс обладает флогогенным эффектом [3, 5]. В настоящей работе наше исследование направлено на выяснение заживляющего эффекта бесклеточной плазмы и плазмы обогащенной тромбоцитами при лечении ожоговой раны.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С целью сравнения ранозаживляющей эффективности бесклеточной плазмы и плазмы обогащенной тромбоцитами их действие проверяли на модели ожоговой раны 3 степени. В качестве объектов исследования использовали 30 крыс линии «Вистар», которые были разделены на три группы: контроль и две опытные (№ 1, № 2). В контрольной группе лечение не проводили, но для уменьшения болевого

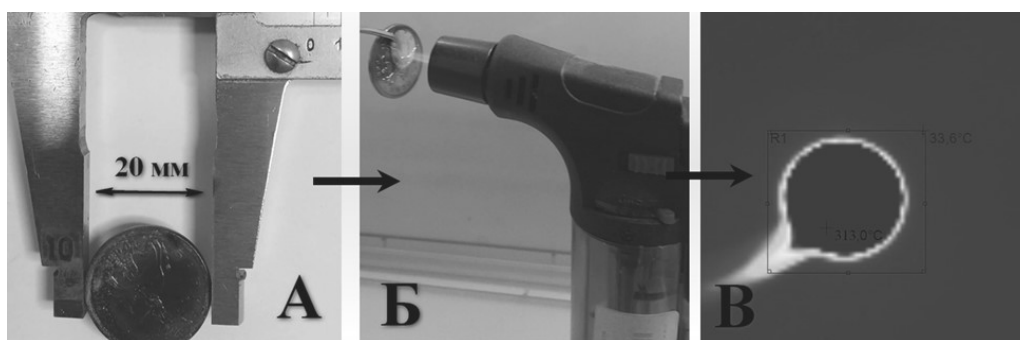


Рис. 1. Подготовительные процедуры нанесения ожоговой раны лабораторным крысам. А - омедненный диск диаметром 20 мм. (50(ти)) копеечная монета), Б - помещение омедненного диска в пламя газовой горелки, В - нагрев омедненного диска в пламени газовой горелки, примерно, до 300,00С (термографическое изображение).

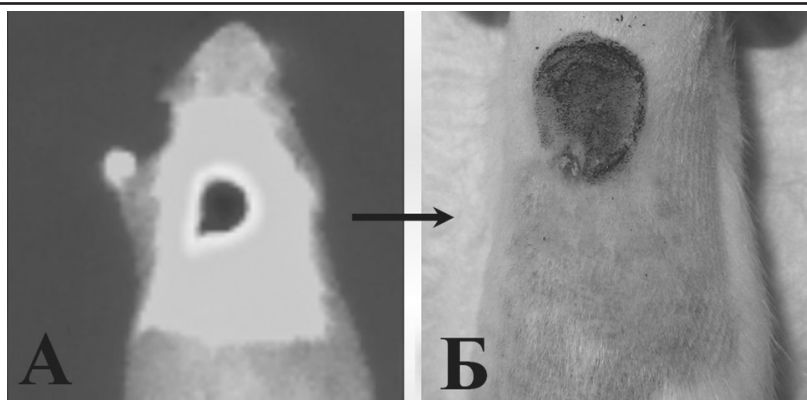


Рис. 2. Методика нанесения ожоговой раны 3-степени лабораторным крысам. А - аппликация нагретого омедненного диска на кожу животного на 2 - 3 секунды (термографическое изображение). Б - внешний вид ожоговой раны сразу после ее нанесения.

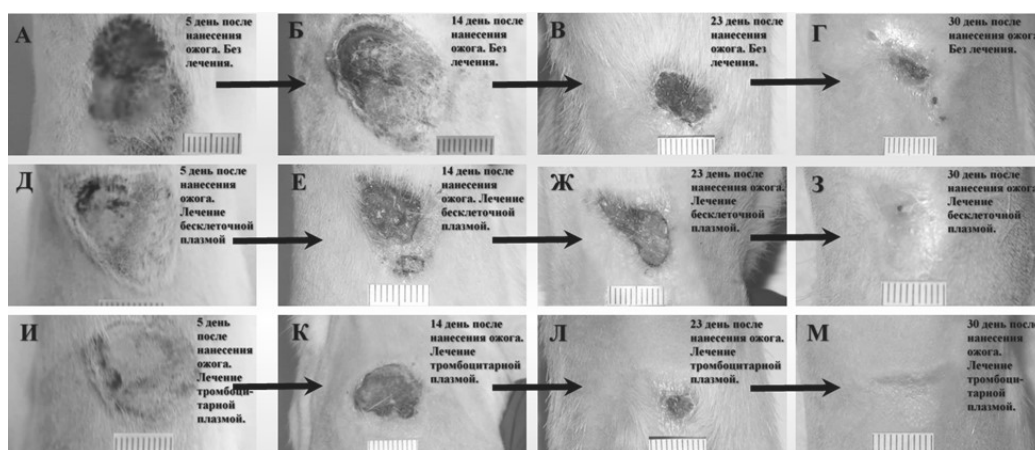


Рис. 3. Влияние бесклеточных и клеточных образцов аутологичной плазмы на динамику заживления ожоговых ран у лабораторных крыс

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 5 - 7 дней начиная с пятого дня после нанесения термической травмы. Визуальная оценка результата указана на 5, 14, 23 и 30 день после нанесения ожога.

синдрома использовали поверхностное нанесение аэрозольного 10% лидокаина, в опытной группе № 1 лечение проводили путем введения вокруг и под ожоговую рану бесклеточной плазмы, в опытной группе № 2 лечение проводили путем введения вокруг и под ожоговую рану плазмы обогащенной тромбоцитами. В качестве предмета наносящего термическую травму использовали омедненный

диск диаметром 20,0 мм нагретый в пламене газовой горелки до температуры 300,00С (Рисунок 1). Перед нанесением ожоговых ран животных вводили в наркоз при помощи севофлурана.

Нагретый диск прикладывали на 2,0 - 3,0 секунды к предварительно выбритой коже крыс в межпальцевой области (Рисунок 2 А). Производили фото фиксацию полученных повреждений с целью

Таблица 1

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 ²)*				Размер рубца на 30 день (см ²)
			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	Опыт №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	Опыт №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 ² .							
ДОСТОВЕРНОСТЬ РАЗЛИЧИЯ Множественные сравнения - критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони			3 и 2: t=3.03 P<0.05 3 и 1: t=1.51 P>0.05 1 и 2: t=1.51 P>0.05	1 и 3: t=16.23 P<0.05 1 и 2: t=10.86 P<0.05 2 и 3: t=25.38 P<0.05	2 и 3: t=9.02 P<0.05 2 и 1: t=0.11 P>0.05 1 и 3: t=8.91 P<0.05	1 и 3: t=11.18 P<0.05 1 и 2: t=4.62 P<0.05 2 и 3: t=6.56 P<0.05	1 и 3: t=19.56 P<0.05 1 и 2: t=16.15 P<0.05 2 и 3: t=3.40 P<0.05

последующего мониторинга их размера в процессе лечения (Рисунок 2 Б).

Лечение ожоговых ран начинали через 5 суток после нанесения травмы. У крысы донора производили отбор крови, которую смешивали с антикоагулянтом цитратом натрия. Цитратную кровь центрифугировали на центрифуге ОПН-3 две минуты при скорости 300 об/мин и сразу 10 минут при скорости 1000 об/мин. Опытным животным плазму вводили один раз в 5 - 7 дней вокруг и под патологический очаг в объеме 0,1 мл. (опытной группе № 1 - бесклеточную плазму; опытной группе № 2 - плазму, обогащенную тромбоцитами). Контрольным животным лечение не проводилось.

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. Далее у каждого животного проводился расчет площади раневых дефектов зафиксированных в динамике на протяжении всего периода исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ

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

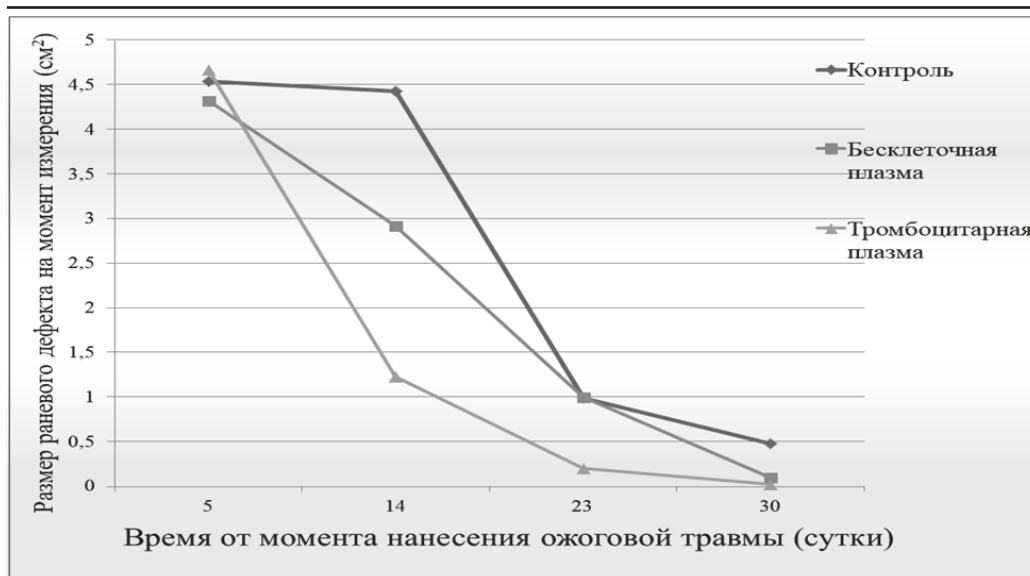


Рис. 4. Графическое отображение динамики заживления ожоговой раны при лечении бесклеточной и тромбоцитарной плазмой. Пояснение в тексте

ют образование рубца и эпителизацию в сравнении с не леченым контролем (Рисунок 3 (А,Б,В,Г)). Однако в случае применения тромбоцитарной плазмы (Рисунок 3 (И,К,Л,М)), в сравнении с бесклеточной плазмой (Рисунок 3 (Д,Е,Ж,З)), более быстро происходит контракция краев раневого дефекта и реорганизация рубца (Таблица 1).

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 1). 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 1).

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 3 (И,К,Л,М)). В контрольной 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 3 (А,Б,В,Г)). В группе животных которым в качестве лечения использовали введение бесклеточной плазмы (Рисунок 3 (Д,Е,Ж,З)) скорость контракции краев раневого дефекта занимала среднее положение в сравнении с контролем и группой которую лечили введением плазмы обогащенной тромбоцитами.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты макро морфологического мониторинга лечения ожоговой раны представляют отчетливые визуально однозначные интерпретируемые данные о том, что инъекции плазмы обогащенной

тромбоцитами дают более высокий заживляющий эффект, чем бесклеточная плазма (Рисунок 3 (М,З)).

Дополнительное количественное 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 4). Что согласуется с современными представлениями о том, что плазма обогащённая тромбоцитами является источником факторов роста, которые после их введения в зону тканевого дефицита моментально индуцируют процессы пролиферации. В контрольной 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 с задержкой на прохождение стадий альтерации, экссудации и накопление факторов роста и дифференцировки (Рисунок 3 (И,К)). В группе животных которым в качестве лечения использовали введение бесклеточной плазмы скорость контракции краев раневого дефекта занимала промежуточное положение в сравнении с контролем и группой которую лечили введением плазмы обогащенной тромбоцитами (Рисунок 3 (З,Г,М)). По всей видимости, ускорение процесса заживления, индуцированное бесклеточной плазмой, обусловлено наличием в ней некоторого количества биологически активных веществ обладающих противовоспалительными и антибактериальными свойствами, а так же свойствами факторов роста.

ВЫВОДЫ

Таким образом, можно сделать вывод, что для лечения ожоговых ран можно использовать как бесклеточные, так и тромбоцитарные образцы аутологичной плазмы. Однако следует отметить, что большей эффективностью в отношении ускорения контракции краев раны и эпителизации обладает тромбоцитарная плазма.

EFFECT OF CELL-FREE AND PLATELET PLASMA ON BURN WOUND HEALING IN RATS

M.V. Sverdlova, postgraduate student of the department of General and Private Surgery; A.A. Stekolnikov, Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of General and Private Surgery; A.O. Minina, Candidate of Veterinary Sciences, Assistant of the Department of General and Private Surgery; A.V. Bokarev, Doctor of Veterinary Sciences, Associate Professor of the Department of General and Private Surgery; Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "St. Petersburg State University of Veterinary Medicine".

ABSTRACT

The presented study analyzes the healing effect of pure cell-free plasma and platelet-rich plasma. The study was conducted on Wistar rats. Three groups of rats were formed for the experiment: a control group and two experimental ones (No. 1, No. 2). Burn wounds were inflicted on animals under sevoflurane anesthesia in the interscapular region with a copper-plated disc with a diameter of 20.0 mm heated in the flame of a gas burner to a temperature of 300.0 °C by applying it for 2.0 - 3.0 seconds. In the control group, treatment of burn wounds was not carried out, but surface application of aerosol 10% lidocaine was used to reduce the pain syndrome. For rats of experimental groups No. 1 and No. 2, treatment of burn wounds with plasma was started on the 5th day after injury. Rats of experimental group No. 1 were treated by injecting cell-free plasma under and around the burn. Rats of experimental group No. 2 were treated by injecting platelet-rich plasma under and around the burn. Monitoring and evaluation of wound healing was carried out by measuring their area. Photo fixation and photo documentation were carried out at the time of the burn wound and then on the fifth day after the injury (the first injection of plasma samples), on the 14th day after the injury, on the 23rd day after the injury and on the 30th day after the injury. The result of the study showed that both cell-free plasma and platelet-rich plasma accelerate the healing of a burn wound in comparison with the control. But platelet plasma, in comparison with cell-

free plasma, has a stronger therapeutic effect, significantly accelerating the contraction of the wound edges in the very first days after administration.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- 1.Алексеев, А.А. Регенеративная медицина в комбустииологии: состояние, проблемы и перспективы / А. А. Алексеев, А. Э. Бобровников. - Текст : электронный // Комбустииология : электронный журнал. - Москва. -2013. - URL: http://combustiology.ru/number_journal/nomer-49-50-2013/ (дата обращения 21.03.2022).
- 2.Ахмеров, Р.Р. Регенеративная медицина на основе аутологичной плазмы. Технология Plasmolifting ТМ. / Р. Р. Ахмеров. - Москва: Литтерра, 2014. - 203 с. - Текст : непосредственный.
- 3.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.
- 4.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.
- 5.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.

- 6.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.

- 7.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).

- 8.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).

- 9.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 (дата обращения 05.04.2022).

- 10.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).