

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ  
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

УДК 617.586-001:616.379-008.64:615.382-092.4

**ТРОЯНОВ**  
Алексей Александрович

**ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ПЛАЗМЫ, ОБОГАЩЕННОЙ  
РАСТВОРИМЫМИ ФАКТОРАМИ ТРОМБОЦИТОВ,  
В ЛЕЧЕНИИ РАНЕВЫХ ПОВЕРХНОСТЕЙ  
ПРИ СИНДРОМЕ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ  
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-КЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

по специальности 14.01.17 – хирургия

Минск 2018

Научная работа выполнена в учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет»

**Научный руководитель:** **Кондратенко Геннадий Георгиевич**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий 1-й кафедрой хирургических болезней учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет»

**Официальные оппоненты:** **Гаин Юрий Михайлович**, доктор медицинских наук, профессор кафедры неотложной хирургии, проректор по научной работе государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

**Смотрин Сергей Михайлович**, доктор медицинских наук, профессор 2-й кафедры хирургических болезней учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет»

**Оппонирующая организация:** учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Защита состоится 19 июня 2018 года в 15.00 часов на заседании совета по защите диссертаций Д 03.18.05 при учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет» по адресу: 220116, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83, e-mail: uchsovets@bsmu.by, тел.(017)277-16-21.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 г.

Ученый секретарь совета  
по защите диссертаций,  
доктор медицинских наук, доцент



Н.В. Шаковец

## ВВЕДЕНИЕ

В Республике Беларусь сахарным диабетом (СД) страдает около 3% населения. Число пациентов с СД за последние 15 лет удвоилось и на начало 2017 года по данным официальной статистики достигло уровня 295 000 человек. Ежегодно около 20 тысяч человек пополняют ряды пациентов с СД [И. Н. Игнатович, 2013; Н. Н. Чур, 2018]. Нарушения углеводного обмена у таких пациентов сопровождаются многочисленными и глубокими изменениями в органах и тканях, в результате чего поражения кожи на фоне диабетической ангиопатии приводят к образованию хронических, медленно заживающих раневых дефектов. Патологические изменения в тканях нижних конечностей формируют синдром диабетической стопы (СДС), который встречается у 15% пациентов, что увеличивает риск развития гангрены нижних конечностей примерно в 20 раз. Наибольшая частота поражений кожи стоп отмечена у пациентов в возрасте 45–64 лет, и это приводит к ситуации, в которой доля данной категории пациентов составляет 50–70% общего количества ампутаций нижних конечностей. Число пациентов, умерших в течение первых трех лет после ампутации, достигает 35%, а в течение 5 лет – 60–75%. Средняя продолжительность пребывания в стационаре пациентов с диабетическими язвами стоп превышает таковую пациентов с СД без язв на 59% [М. Ю. Штильман, 2009; И. Н. Игнатович, 2013; К. Neyer, 2015; F. Santosa, 2015; К. Noronen, 2017]. Вышеприведенное свидетельствует о значительной социальной, экономической и медицинской проблеме оказания помощи при диабетических поражениях кожи при СДС. Между тем, эффективность заживления ран под влиянием современного лечебного комплекса при данной патологии остается низкой. Поэтому исследование и внедрение в практику новых более совершенных средств для этой цели до сих пор остается важной и нерешенной задачей [С. А. Сушков, 2012; С. М. Смотрин, 2016].

За последние 10 лет в результате поиска новых подходов к лечению поражений кожи в мировой практике интенсивное развитие приобретает новое направление – регенеративная медицина [Ю. М. Гаин, 2011; С. И. Третьяк, 2012; Е. В. Баранов, 2017] для заживления ран. Экспериментальные и клинические исследования последних лет выявили эффективность применения естественных продуктов тромбоцитов, а именно растворимых факторов тромбоцитов (РФТ) крови человека, которые участвуют в регенеративных процессах путем привлечения в очаг повреждения и усиления пролиферации стволовых клеток [P. Borzini, 2005; A. T. Nurden, 2008; L. Mazzucco, 2012; В. Г. Богдан, 2015]. Однако существующие технологии получения РФТ для применения в клинике характеризуются значительной вариабельностью по количеству забранной крови, применению аутоплазмы,

удалению лейкоцитов, использованию тромбина, хлористого кальция и других компонентов [P. Borzini, 2005; A. Cielic-Bielecka, 2009]. Это требует разработки стандартизированного способа получения плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов (ПОРФТ), из аутокрови пациентов с СД для клинического применения. Изучение лечебных свойств и методов применения ПОРФТ с целью улучшения результатов оказания помощи пациентам с раневыми поражениями кожи при СД ранее не проводилось.

В рамках настоящей диссертационной работы выполнены научные исследования по экспериментальному и клиническому выявлению лечебных свойств и возможностей применения ПОРФТ из аутологичной крови для лечения длительно незаживающих поражений кожи у пациентов с СД.

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Связь работы с крупными научными программами и темами**

Диссертационное исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы 1-й кафедры хирургических болезней УО «Белорусский государственный медицинский университет» по теме «Разработка новых методов диагностики и лечения торакальной, абдоминальной, эндокринной и сосудистой патологии» (№ гос. регистрации в ГУ «БелИСА» 20140451, сроки выполнения – 2014–2018 гг.) и в рамках инновационного проекта по созданию новых технологий, приборов, материалов и социальным проблемам «Разработать и внедрить способ местного лечения длительно незаживающих ран кожных покровов конечностей у пациентов с сахарным диабетом на основе использования аутологичной плазмы, обогащенной тромбоцитами» (№ гос. регистрации в ГУ «БелИСА» 20131794, сроки выполнения – 2013–2015 гг.).

**Цель исследования:** экспериментально и клинически выявить эффективность и обосновать целесообразность применения аутологичной плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов для стимуляции ранозаживления при сахарном диабете.

### **Задачи исследования:**

1. Разработать адаптированный к применению для ранозаживления при сахарном диабете метод получения образцов плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов, выявить их влияние на фибробласты кожи животных и человека и оценить антибактериальную активность данных образцов.

2. Определить влияние плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов от пациентов с сахарным диабетом, на пролиферацию мезенхимальных стволовых клеток человека и выявить оптимальные в этом

отношении концентрации плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов.

3. Разработать из образцов плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов, фиксирующий на раневой поверхности гель и выявить его ранозаживляющее действие при инфицированных ранах в условиях модели индуцированной гипергликемии.

4. Установить клиническую эффективность плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов, для ранозаживления у пациентов с синдромом диабетической стопы.

**Объект исследования:** плазма, обогащенная растворимыми факторами тромбоцитов, фибробласты кожи крыс и человека, мезенхимальные стволовые клетки (МСК) человека, инфицированные кожные раны крыс (n=72) с индуцированной гипергликемией. Гематологические данные пациентов с СДС (n=102) и здоровых лиц (n=115), кожные повреждения при синдроме диабетической стопы (n=44).

**Предмет исследования:** пролиферативная активность ПОРФТ в отношении фибробластов и мезенхимальных стволовых клеток, антибактериальная активность ПОРФТ, гелеобразование образцов ПОРФТ, выживаемость животных, динамика уменьшения площади ран и сроки полного заживления инфицированных ран при экспериментально индуцированной гипергликемии, ранозаживление у пациентов с СДС.

#### **Научная новизна**

Впервые выявлены возможности приготовления аутологичной ПОРФТ от пациентов с сахарным диабетом и разработан адаптированный к этим условиям метод ее получения и хранения.

В результате экспериментальных исследований получены новые научные сведения о пролиферативной активности ПОРФТ в отношении фибробластов кожи животных и человека. Впервые изучено и доказано рост-стимулирующее действие ПОРФТ от пациентов с СД в отношении мезенхимальных стволовых клеток человека, определена оптимальная концентрация ПОРФТ, стимулирующая пролиферацию МСК. Впервые экспериментально выявлен антибактериальный эффект ПОРФТ в отношении штаммов *St. aureus*, *E. coli* и *Ps. aeruginosa*.

Разработан и экспериментально обоснован новый метод образования на поверхности раны геля ПОРФТ, обладающего оптимальными с позиций адгезивности и времени гелеобразования свойствами.

Впервые в эксперименте изучено ранозаживляющее действие ПОРФТ в условиях инфицированных кожных ран у животных с индуцированной гипергликемией, доказано положительное влияние ПОРФТ на динамику раневого процесса и выживаемость лабораторных животных.

Разработан, научно обоснован и внедрен в клиническую практику новый, высокоэффективный способ местного лечения кожных поражений нижних конечностей у пациентов с сахарным диабетом с использованием ПОРФТ (патент на изобретение № 21389 от 30.04.2017), практическое применение которого повышает качество оказания медицинской помощи, сокращает сроки заживления ран и обосновывает экономический эффект.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Образцы ПОРФТ, приготовленные предложенным способом, *in vitro* оказывают угнетающее действие на рост фибробластов кожи крыс, обладают достоверным прямым рост-стимулирующим действием в отношении фибробластов кожи человека и проявляют антибактериальную активность в отношении штаммов *St. aureus*, *E. coli* и *Ps. aeruginosa*.

2. Образцы ПОРФТ из периферической крови страдающих сахарным диабетом пациентов обладают достоверным рост-стимулирующим действием на культивируемые *in vitro* мезенхимальные стволовые клетки человека. Причем оптимальными по пролиферативной активности являются образцы, полученные путем 2-кратного центрифугирования тромбоцитов в конечном разведении 1 : 20.

3. Оптимальным для нанесения на кожные раны при экспериментально индуцированной гипергликемии с позиций гелеобразования и адгезивности является получение геля ПОРФТ путем добавления тромбина 20 ЕД/мл в соотношении 2 : 1 в присутствии глюконата кальция. Местное использование геля ПОРФТ при инфицированных кожных ранах у крыс с индуцированной гипергликемией положительно влияет на динамику уменьшения площади ран и повышает выживаемость животных.

4. Для приготовления аутологичной ПОРФТ у пациентов, страдающих СД, необходим тщательный отбор, так как у 1/2 из них отклонения в периферической крови требуют подготовки для соответствия аутодонорству. Местное лечение с использованием ПОРФТ из аутокрови пациентов с сахарным диабетом оказывает выраженное положительное влияние на динамику и частоту заживления раневых поверхностей кожных покровов нижних конечностей, а также достоверно ( $p < 0,05$ ) сокращает сроки полного заживления.

#### **Личный вклад соискателя**

Соискателем самостоятельно выполнен патентно-информационный поиск, анализ отечественной и зарубежной литературы с оценкой актуальности выбранной темы. Совместно с научным руководителем сформулированы цель и задачи диссертации, определены пути их достижения, разработан план исследования. Автором лично проведен сбор первичных данных, выполнена статистическая обработка и анализ результатов исследования. Экспериментальная часть выполнялась на базе НИЧ БГМУ: изучение

пролиферативной активности ПОРФТ в отношении фибробластов кожи животных и человека, мезенхимальных стволовых клеток; исследование антибактериального действия образцов ПОРФТ; разработка метода получения адгезивного геля ПОРФТ и изучение его ранозаживляющего действия в отношении инфицированных ран у животных с индуцированной гипергликемией. Экспериментальные данные опубликованы в статьях и материалах конференций [3, 4, 5, 7, 9, 11, 12]; вклад диссертанта – 70%. Клиническая часть диссертации выполнялась на базе центра «Диабетическая стопа» УЗ «10-я ГКБ» г. Минска. Соискатель лично изучил данные обследования пациентов с СДС и доноров крови. Анализ соответствия пациентов с СД критериям аутодонорства отражен в статьях и материалах конференций [1, 11, 13]; вклад диссертанта – 90%. Автор принимал непосредственное участие в обследовании и лечении всех пациентов с поражениями кожи при СД, данные о которых включены в диссертационную работу. Результаты клинических исследований по применению ПОРФТ с анализом и обобщением данных представлены в статьях, научных сборниках и материалах конференций; [2, 4, 8, 10, 13, 14, 15]; вклад диссертанта – 80%, инструкции по клиническому применению метода [16]; вклад диссертанта – 80%. По результатам научно-исследовательской работы получен патент Республики Беларусь на изобретение [17]; вклад диссертанта – 70%. В работах, написанных в соавторстве, диссертанту принадлежат сбор данных, анализ результатов, трактовка и формулирование выводов. Написание разделов диссертации, формулировка выводов и практических рекомендаций осуществлялись соискателем лично при участии научного руководителя.

#### **Апробация результатов диссертации и информация об использовании ее результатов**

Результаты проведенного исследования доложены и обсуждены на: научных сессиях УО «Белорусский государственный медицинский университет» (Минск, 2015, 2016, 2017, 2018); XV съезде хирургов Республики Беларусь «Актуальные вопросы хирургии» (Брест, 2014); научно-практической конференции, посвященной 30-летию УЗ «10-я ГКБ» г. Минска «Организация работы многопрофильной клинической больницы на современном этапе» (Минск, 2015); 70-й Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Актуальные проблемы современной медицины и фармации – 2016» (Минск, 2016); научно-практической конференции с международным участием «Трансфузиология: ориентир на эффективность и безопасность» (Минск, 2016); республиканской научно-практической конференции «Актуальные вопросы неотложной хирургии» в рамках XXVII пленума хирургов Республики Беларусь (Молодечно, 2016); заседании общества хирургов г. Минска и Минской области (Минск, 2018).

Основные результаты диссертационного исследования внедрены в лечебную работу отделений гнойной хирургии УЗ «10-я ГКБ» г. Минска, УЗ «4-я ГКБ имени Н. Е. Савченко» г. Минска, ГУ «432 ордена Красной Звезды главный военный клинический медицинский центр Вооруженных Сил Республики Беларусь», УЗ «Брестская областная больница», в работу УЗ «Брестская областная станция переливания крови», а также в учебный процесс 1-й кафедры хирургических болезней УО «БГМУ».

### **Опубликование результатов диссертации**

По материалам диссертации опубликовано 17 научных работ (всего 4,87 авторских листа). Из них 5 статей в рецензируемых научных журналах, соответствующих пункту 18 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь (2,66 авторских листа), 10 статей в журналах, научных сборниках и материалах конференций, 1 инструкция по применению метода, 1 патент на изобретение.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационное исследование написано на русском языке и состоит из введения, общей характеристики работы, 4 глав, заключения, библиографического списка, приложений. Объем диссертации – 105 страниц текста. Диссертационная работа иллюстрирована 8 рисунками, содержит 18 таблиц на 12 страницах. Библиографический список (19 страниц) включает 93 русскоязычных работы и 146 работ зарубежных авторов. Приложение занимает 8 страниц и включает 1 инструкцию по применению, 1 патент на изобретение, 6 актов внедрения результатов исследования в практику здравоохранения и учебный процесс.

## **ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ**

### **Материалы и методы исследования**

Адаптированный к применению для ранозаживления при СД метод получения образцов аутологичной ПОРФТ (инструкция по применению № 085-0915) заключался в заборе у пациентов с СД 350 мл крови в трехкамерный пластиковый контейнер, из нее после центрифугирования получали 30–40 мл концентрата тромбоцитов, повторным центрифугированием достигалось концентрирование в 2 раза. В результате на выходе получали 15–20 мл ПОРФТ, которую переносили в микропробирки по 3 или по 5 мл в зависимости от размера раневой поверхности. Эти образцы замораживали (–20°C) и хранили до использования (срок активности 6 месяцев). Полученные образцы имеют принципиальные отличия: высокую степень очистки от других форменных элементов крови, оптимальную концентрацию растворимых факторов тромбоцитов и достаточное количество для многократного применения.



**Экспериментальный раздел.** Для приготовления ПОРФТ из аутокрови пациентов с СД использовали вышеуказанную методику. В исследованиях *in vitro* оценивали влияние ПОРФТ на пролиферацию фибробластов кожи крыс, в качестве сравнения использовали образцы цельной плазмы тех же пациентов, контролем служил рост числа фибробластов животных в стандартной питательной среде DMEM (n=72). Получение клеток кожи животных проводили по методу, описанному Baden [Н. Р. Baden, 1983]. Тест ставили в 12-луночных микропланшетах (Sarstedt), клетки культивировали в течение 3 суток, потом фибробласты 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 с помощью метода Keira [S. M. Keira, 2004], образцы ткани получали в Банке тканей РНПЦ «Трансплантации органов и тканей». В процессе культивирования выделяли дермальные фибробласты, которые использовали для тестирования. Пролиферативную активность оценивали по количеству клеток и их приросту в 1 мл стандартной питательной среды (контроль), отдельно при добавлении цельной плазмы (тест сравнения) и отдельно при добавлении ПОРФТ (опыт). Эксперимент повторяли двукратно (n=72).

Для оценки антибактериальных свойств ПОРФТ использовали метод ингибирования бактериального роста в диск-диффузионном тесте. На поверхность кровяного агара или агара Мюллера–Хинтона наносили 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. Затем отдельно наносили ПОРФТ и нативную плазму в объеме 20 мкл без разведения. После инкубации 18 часов (+37°C) оценивали частоту бактерицидного эффекта, зоны подавления роста бактерий измеряли в мм.

Изучение пролиферативного влияния ПОРФТ, полученной от пациентов с СД, на мезенхимальные стволовые клетки (МСК) проводили в 24-луночном культуральном планшете («Sarstedt») по методу, описанному Игнатенко [С. И. Игнатенко, 2013]. МСК получали из республиканского банка при РНПЦ «Трансплантации органов и тканей». По окончании культивирования в течение 72 часов при +37°C, проводили подсчет клеток при увеличении в 100 раз в присутствии трипанового синего («Sigma»). Результаты оценивали по количеству выросших МСК в расчете на 1 мл культуры клеток или как индекс стимуляции (ИС), рассчитываемый отношением количества выросших клеток в присутствии исследуемого образца ПОРФТ или цельной плазмы (тест сравнения) к количеству выросших клеток в стандартной культуральной среде (контроль) (n=96).

Для определения наиболее эффективной концентрации ПОРФТ, вызывающей индукцию пролиферации МСК, исследованы образцы ПОРФТ 1 (из 2-кратно концентрированного КТ) и ПОРФТ 2 (из 4-кратно концентрированного КТ). Изучена пролиферация МСК в присутствии цельной плазмы и обоих образцов ПОРФТ в конечном разведении 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40.

Разработка метода создания из образцов ПОРФТ фиксирующего геля состояла в отдельном нанесении на поверхность чашки Петри ПОРФТ и цельной плазмы (контроль). Образцы смешивали с различными активаторами гелеобразования в объемных соотношениях 1 : 1 и 1 : 2. В качестве активаторов использовали: хлорид кальция (10% раствор), глюконат кальция (10% раствор), апротинин (5000 ЕД/мл), тромбин (100 ЕД/мл). Образование геля оценивали визуально, время фиксировали с помощью секундомера, свойство фиксации определяли наклонным положением чашки Петри с углом в 90°, исследования повторяли трехкратно (n=108).

Для изучения ранозаживляющего действия ПОРФТ использовали крыс (n=72), у которых создавали экспериментальную модель стойкой гипергликемии внутрибрюшинным введением стрептозотоцина (Sigma) из расчета 50 мг/кг веса. Отбирали животных с уровнем глюкозы не менее 20,0 мг/л ( $\approx 11,9$  ммоль/л) при повторных измерениях (n=44). 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/мл *S. aureus*. Через 3 дня, при уровне бактериального обсеменения  $5-6 \times 10^5$  КОЕ/мл, начинали местное лечение. В группе 1 (n=15) проводили традиционное местное лечение. В группе 2 (n=12), кроме традиционного лечения, на рану наносили нативную плазму. В группе 3 (n=17) на рану наносили ПОРФТ и покрывали раствором тромбина для гелеобразования. Исследована также выживаемость животных и динамика заживления кожных ран (n=39). В начале лечения и через 7, 14, 21, 28 дней раны документировали фотографированием, размеры определяли планиметрически с использованием программы Colour-Science Image Editor v 3.01.02 Professional (SoftoRoom).

**Клинический раздел.** Для выявления возможностей приготовления аутологичной ПОРФТ от пациентов с СД сплошным методом за одинаковые промежутки времени исследованы гендерные характеристики и гематологические данные 217 лиц обоего пола на соответствие аутодонорству. В качестве контроля рассматривались результаты обследования здоровых доноров крови (n=115). Данные о пациентах с сахарным диабетом и СДС (n=102) получали в городском центре «Диабетическая стопа» УЗ «10-я ГКБ» г. Минска. В сравниваемых группах были оценены пол, возраст, результаты общего анализа крови, включая тромбоциты, уровень гемоглобина, лейкоцитов и СОЭ.

В клиническое исследование ранозаживляющих свойств ПОРФТ включались пациенты (n=44) с I и II степенью распространения раневого дефекта по шкале Wagner и максимальной площадью поражения кожи до 100 см<sup>2</sup> при нейропатической или нейроишемической формах СДС. Противопоказаниями к применению метода являлись: клиничко-метаболическая декомпенсация сахарного диабета (уровень гликированного гемоглобина крови 9% и более, уровень глюкозы более 9,0 ммоль/л); критическая ишемия конечности, требующая реваскуляризации; бактериальная обсемененность раны более 10<sup>4</sup> КОЕ/мл; уровень гемоглобина в периферической крови менее 110 г/л; уровень тромбоцитов крови менее 200 × 10<sup>9</sup>/л; хроническая почечная недостаточность II степени тяжести и выше; сердечная недостаточность ФК III и выше; системные воспалительные заболевания в стадии обострения. Исследование было проспективным, рандомизация проводилась сплошным методом, отказ пациента от применения ПОРФТ служил основанием для включения в группу сравнения (n=21), в основной группе (n=23) местно применяли ПОРФТ. Группы были сопоставимы по возрасту, полу, длительности и тяжести заболевания, размерам раневого дефекта, уровню глюкозы крови, биохимических и морфологических показателей крови (p>0,05). Пациентам обеих групп проводилась однотипная комплексная терапия СД. В группе сравнения местное лечение выполняли общепринятым способом, включающим ежедневные перевязки с обработкой раневой поверхности растворами антисептиков, использованием различных мазевых повязок. Пациентам основной группы местно применяли аутологичную ПОРФТ, которую приготавливали по предложенному методу (инструкция по применению № 085-0915). Перед нанесением ПОРФТ рану промывали физиологическим раствором, просушивали стерильным тампоном и обрабатывали 10% раствором глюконата кальция. На поверхность раны круговыми движениями от периферии к центру шприцем наносили ПОРФТ до полного закрытия поверхности. Затем такими же движениями наносили раствор тромбина (20 ЕД/мл), формировали гелеобразную пленку и при необходимости закрывали марлевой салфеткой. Контроль за раной осуществляли в течение первой недели ежедневно, повторно ПОРФТ наносили через 10–14 дней, в случаях замедления динамики регенеративного процесса и при больших размерах раневого дефекта ПОРФТ наносили еще раз через 2–3 недели. Клиническую эффективность оценивали по динамике и срокам заживления путем планиметрии сфотографированных ран в день применения ПОРФТ, через 7, 14, 21 и 28 суток. Контроль за состоянием ран проводили до полного заживления, а также в срок 3 и 6 месяцев. Для измерения площади раневого дефекта кожи использовали программу Colour-Science Image Editor v 3.01.02 Professional (SoftoRoom).

**Статистическая обработка результатов исследования** производилась с использованием статистических пакетов Microsoft office Excel и Statistica 10.0. Для оценки показателей использовали метод описательной статистики и точного теста Fisher. Проверку однородности выборок показателей групп проверяли с использованием критерия  $\chi^2$  Пирсона. Различия показателей групп оценивали с помощью парного t-критерия Стьюдента. Результаты признавались значимыми при  $p < 0,05$ .

### **Результаты собственных исследований**

В результате экспериментов по определению влияния ПОРФТ человека на пролиферацию фибробластов кожи животных установлено, что как плазма крови человека, так и образцы ПОРФТ оказывали угнетающее действие на рост фибробластов кожи крыс ( $p = 0,001$ ). Наиболее вероятно, это связано со значительными (видовыми) отличиями чужеродных белков плазмы человека, являющимися ксеногенными по отношению к фибробластам кожи крыс.

Сравнительное изучение влияния цельной плазмы и ПОРФТ на пролиферацию фибробластов кожи человека позволило установить, что цельная плазма несущественно влияет на пролиферацию ( $p > 0,05$ ), а образцы ПОРФТ обладают достоверным ( $p = 0,002$ ) рост-стимулирующим действием в отношении фибробластов кожи человека.

Исследование образцов ПОРФТ и цельной плазмы на предмет их антибактериального действия показало, что образцы ПОРФТ проявляют антибактериальную активность в 20–40% случаев в отношении *S. aureus* ATCC 259237, *E. coli*. ATCC 11229, и более выраженную ( $p < 0,05$ ) в отношении штаммов *P. aeruginosa* ATCC 15412. При этом антибактериальная активность ПОРФТ превышала таковую у образцов плазмы.

В сравнительном плане отдельно оценено влияние образцов ПОРФТ от здоровых доноров крови и от пациентов с СД на пролиферацию МСК. В качестве контроля использована плазма, полученная из крови того же донора крови и отдельно от пациента с СД. Предварительно определена наиболее эффективная концентрация ПОРФТ для индукции пролиферации МСК. Установлено, что образцы ПОРФТ в разведении 1 : 20 были наиболее эффективными и достоверно не отличались ( $p > 0,05$ ) по способности стимулировать рост МСК. При более высоком (1 : 40) разведении образцов ПОРФТ их рост-стимулирующее влияние на МСК было существенно меньше. Поэтому для последующего использования в качестве основного образца принята ПОРФТ с конечным разведением 1 : 20 (концентрация тромбоцитов в данных образцах ПОРФТ соответствовала стандартной – около 1,0 млрд/мл), что позволяло из одной дозы цельной крови приготовить больше таких образцов.

Исследования зависимости биологической активности ПОРФТ от сроков хранения показали, что приготовленные образцы обладают способностью стимулировать пролиферацию МСК *in vitro* после хранения при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 6 месяцев. Это обосновывало гарантированную эффективность ее клинического применения в указанные сроки.

При изучении влияния образцов ПОРФТ на пролиферацию МСК установлено, что образцы ПОРФТ, приготовленные из периферической крови пациентов с СД, обладают достоверным ( $p=0,02$ ) стимулирующим действием на культивируемые *in vitro* МСК. При этом стимулирующий эффект образцов ПОРФТ диабетиков достоверно не отличался от эффекта образцов ПОРФТ, полученных от здоровых доноров крови ( $p=0,06$ ).

Для изучения лечебной эффективности в предварительном эксперименте ПОРФТ наносили непосредственно на раневую поверхность у животных. Оказалось, что образцы ПОРФТ, представляющие собой жидкую субстанцию, локально не фиксировались на раневой поверхности и частично вытекали за пределы раны. Это потребовало разработки метода создания из образцов ПОРФТ фиксирующегося геля. В ходе исследований установлено, что хлористый кальций и аprotинин обладали слабовыраженным гелеобразующим действием, в присутствии 10% глюконата кальция время гелеобразования замедлялось, а тромбин обладал наиболее сильным гелеобразующим действием. Однако высокие концентрации тромбина (100 и 50 ЕД/мл) способствовали очень быстрому образованию геля в течение 2–4 секунд, что препятствовало равномерному распределению ПОРФТ на заданной поверхности. Концентрация тромбина 20 ЕД/мл в присутствии 10% раствора глюконата кальция в соотношении 2 : 1 оказалась оптимальной к применению, так как её использование позволяло в течение 15–20 секунд равномерно смешать и распределить компоненты до полного гелеобразования смеси. При этом гель из ПОРФТ имел упругую консистенцию, а также достаточную адгезивную способность и не стекал при наклонном  $90^{\circ}$  положении чашки Петри.

При индуцировании гипергликемии у животных были выявлены значительные колебания ответа крыс на введение стрептозотоцина. Только у 61% крыс развилась стойкая гипергликемия с уровнем глюкозы в периферической крови 11,9 ммоль/л и более (при исходном 6,2–6,3 ммоль/л). Отмечена высокая токсичность стрептозотоцина, вызвавшая гибель до 20% животных. Поэтому была исследована как выживаемость экспериментальных животных, так и динамика заживления инфицированных ран. Установлено, что в ранние сроки выживаемость животных с гипергликемией достоверно ( $p>0,05$ ) не различалась при сравнении с контрольной группой и группой животных с местным использованием плазмы. В отдаленные сроки наблюдения (28 дней) после применения ПОРФТ выживаемость была в 2 раза выше ( $p < 0,05$ ). При

этом общая тенденция к более высокой выживаемости наблюдалась в данной группе и в ранние сроки (на 14 и 21 дни).

Динамика заживления инфицированных ран у выживших животных (n=39) приведена в таблице 1.

Таблица 1. – Средняя площадь кожных раны у выживших крыс с гипергликемией в процессе проведения местного лечения,  $M \pm SE$

№ группы животных	Площадь кожной раны (см <sup>2</sup> ) крыс после проведения местного лечения через				
	0 дней	7 дней	14 дней	21 день	28 дней
1 (n=14)	2,25±0,06	1,035±0,03	0,37±0,04	0,09±0,046	0±0,0
2 (n=10)	2,28±0,06	0,97±0,06	0,43±0,05	0,09±0,003	0±0,0
3 (n=15)	2,24±0,05	0,87±0,04	0,25±0,01	0,025±0,001	0±0,0
Статистическая значимость различий	–	p <sub>1-3</sub> =0,008 p <sub>2-3</sub> =0,19	p <sub>1-3</sub> =0,128 p <sub>2-3</sub> =0,054	p <sub>1-3</sub> =0,1 p <sub>2-3</sub> =0,037	–

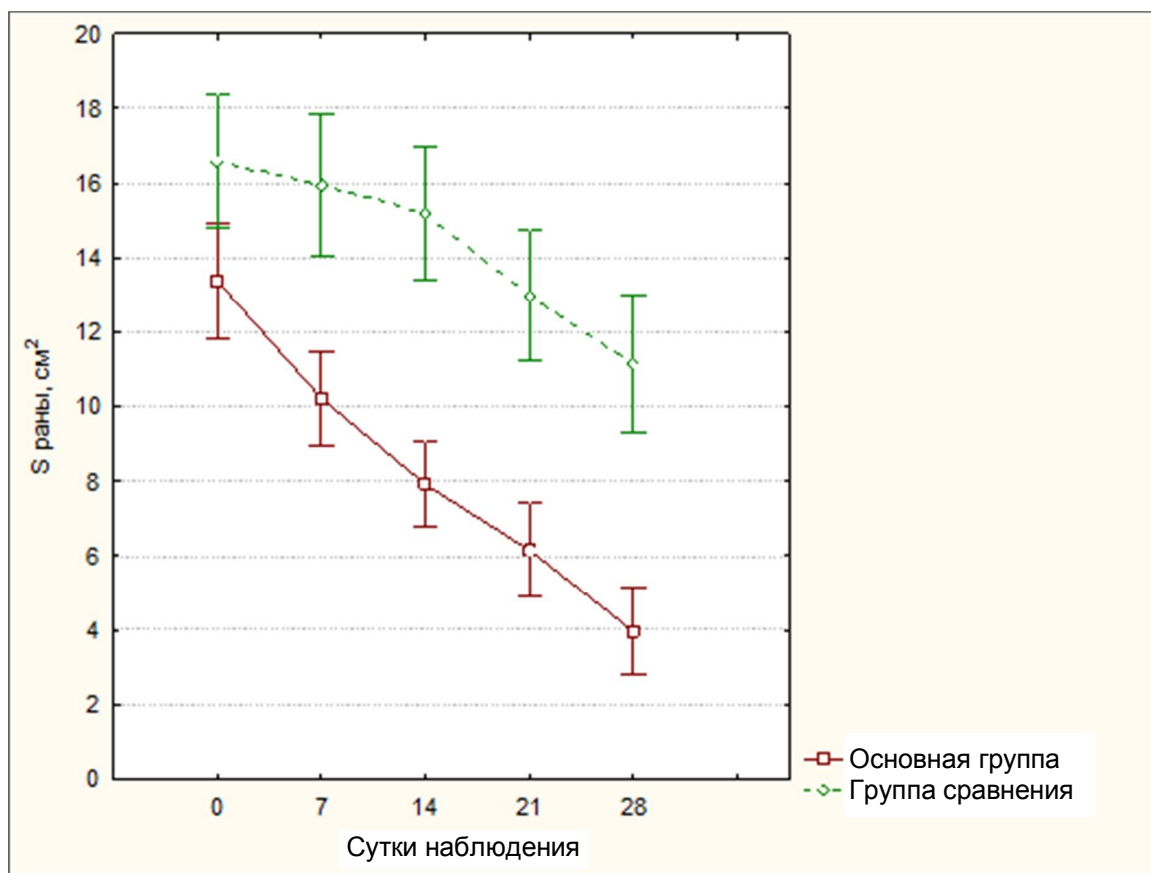
Как следует из таблицы 1, динамика уменьшения средней площади инфицированных ран в группе животных, у которых применяли ПОРФТ, во все сроки наблюдения была лучшей, чем в контрольной группе и группе, получавшей лечение плазмой. В ранние сроки (через 7 дней после начала лечения) средняя площадь ран у животных, получавших местно ПОРФТ (0,87±0,04 см<sup>2</sup>), была достоверно (p=0,008) меньше таковой (1,035±0,03 см<sup>2</sup>) у контрольных животных.

Таким образом, установлено, что местное использование ПОРФТ при инфицированных кожных ранах у крыс с индуцированной гипергликемией положительно влияет на динамику уменьшения площади ран и повышает выживаемость животных.

Получение ПОРФТ от пациентов с СД предполагало аутодонорство цельной крови, в то же время при СД, особенно при наличии поражений кожи, наблюдаются изменения периферической крови, которые могут приводить к несоответствию критериям по заготовке аутологичной крови и её компонентов. Поэтому была исследована перспектива возможности приготовления ПОРФТ от пациентов с СДС. Установлено, что среди женщин с СДС доминируют лица в возрасте 50–60 лет (27/32; 84,4%), а среди здоровых женщин (доноров крови) их существенно меньше (3/23; 13%; p<0,001). Распределение по возрасту мужчин-доноров и мужчин-пациентов с СДС оказалось аналогичным. Для получения ПОРФТ первостепенным является достаточное количество тромбоцитов в периферической крови. Установлено, что доля женщин с СДС, у которых содержание тромбоцитов в периферической крови превышает  $200 \times 10^9/\text{л}$ , составила 78,1%, а женщин-доноров крови – 87,0%. Доля пациентов-мужчин с СДС, у которых содержание тромбоцитов превышает  $200 \times 10^9/\text{л}$ , составила 67,1%, а мужчин-доноров – 89,1% ( $\chi^2=11,85$ ;

$p < 0,001$ ). У пациентов с СДС необходимая величина гемоглобина (нижний порог для допуска к аутодонорству – 110 г/л) наблюдалась у 81,2% женщин и у 91,4% мужчин. Содержание лейкоцитов в периферической крови выходило за рамки необходимых значений у 40,6% страдающих СДС женщин и у 45,7% мужчин. СОЭ, указывающая на наличие системного воспалительного процесса, была в пределах нормы (20 мм/ч) менее чем у половины пациентов с СДС. Полученные данные свидетельствуют о необходимости тщательного обследования и отбора пациентов, страдающих сахарным диабетом и СДС, для получения аутологичной ПОРФТ, а также о необходимости у ряда таких пациентов предварительной специальной терапии с целью подготовки к аутодонорству.

В клиническом исследовании установлено, что комплексное лечение с местным использованием ПОРФТ оказывало выраженное положительное влияние на динамику заживления кожных ран у пациентов с СДС (рисунок 1). Уменьшение площади кожной раны у пациентов основной группы происходило быстрее, чем в группе сравнения, где применяли общепринятое местное лечение (к 28 суткам средняя площадь кожных ран уменьшалась в 3,5 раза против 1,6).



**Рисунок 1. – Динамика заживления ран у пациентов основной группы и группы сравнения**

Сроки полного заживления ран у пациентов основной группы были также достоверно меньше, чем у пациентов, у которых ПОРФТ не применялась. К 28 суткам от начала лечения у пациентов основной группы полное заживление раны произошло в 50% наблюдений, а к 6 месяцам – в 93% случаев, а в группе сравнения – в 15 и 21 % соответственно. Начиная с 21 суток и позже, количество пациентов с полным заживлением хронических ран нижних конечностей в основной группе было достоверно большим ( $p < 0,05$ ). При этом исключалась необходимость традиционно проводимых ежедневных обработок раневой поверхности и перевязок, что обуславливает экономию лекарственных средств и трудозатрат медицинского персонала. Сокращение сроков заживления повреждений кожи при СДС также лежит в основе положительного экономического эффекта. При применении аутологичной плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов, аллергических реакций не отмечено.

Таким образом, результаты экспериментально-клинических исследований свидетельствуют о целесообразности и высокой эффективности применения аутологичной ПОРФТ для местного лечения раневых поражений кожи нижних конечностей у пациентов с сахарным диабетом.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

### **Основные научные результаты диссертации**

1. Разработан адаптированный к применению для ранозаживления при сахарном диабете метод получения образцов плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов. В экспериментальном исследовании *in vitro* установлено, что образцы ПОРФТ человека оказывают угнетающее действие ( $p < 0,001$ ) на пролиферацию фибробластов кожи животных (крыс линии Wistar). В отношении фибробластов кожи человека цельная плазма не оказывает существенного влияния ( $p > 0,05$ ), а ПОРФТ обладает достоверным ( $p = 0,002$ ) рост-стимулирующим действием на фибробласты кожи человека. Образцы ПОРФТ проявляют умеренную (20–40%) антибактериальную активность в отношении штаммов *S. aureus* и *E. coli* и более выраженную ( $p < 0,05$ ) в отношении *Ps. aeruginosa* [3, 12, 16].

2. В результате определения наиболее эффективной концентрации образцов ПОРФТ, полученных из периферической крови пациентов с СД, в отношении способности вызывать пролиферацию мезенхимальных стволовых клеток человека выявлено, что 2-кратно концентрированные образцы ПОРФТ в разведении 1 : 20 являются оптимальными. Они обладают достоверным ( $p = 0,02$ ) стимулирующим действием на культивируемые *in vitro* МСК человека, при этом их эффект достоверно ( $p = 0,06$ ) не отличается от такового у образцов ПОРФТ, полученных от здоровых доноров крови [4, 15].



3. В ходе разработки метода создания из образцов ПОРФТ фиксирующегося на раневой поверхности геля установлены оптимальные активаторы гелеобразования, их концентрации и объемные соотношения. Концентрация тромбина 20 ЕД/мл в присутствии 10% раствора глюконата кальция в соотношении 2 : 1 является наиболее приемлемой к использованию по времени гелеобразования (15–20 сек.) и адгезивной способности [5, 17].

4. В условиях экспериментально индуцированной гипергликемии установлено, что динамика уменьшения размера инфицированных ран в группе животных, где применялась ПОРФТ, была лучшей, чем в контрольной группе и группе, где местно использовали нативную плазму. Через 7 дней с момента применения ПОРФТ средняя площадь ран ( $0,87 \pm 0,04 \text{ см}^2$ ) была достоверно ( $p=0,008$ ) меньше таковой ( $1,035 \pm 0,03 \text{ см}^2$ ) у контрольных животных. Через 28 дней после применения ПОРФТ выживаемость животных с индуцированной гипергликемией была в два раза выше ( $p < 0,05$ ) [3, 7, 9, 11, 12].

5. Исследования возможности приготовления аутологичной ПОРФТ от пациентов с синдромом диабетической стопы показали, что из гематологических показателей лимитирующим является содержание лейкоцитов в периферической крови (за рамками необходимых значений 40,6% пациентов-женщин и 45,7% пациентов-мужчин) и показатель СОЭ (менее чем у 1/2 пациентов). Полученные данные свидетельствуют о необходимости отбора пациентов и/или предварительной специальной терапии для подготовки к аутодонорству [1, 4, 8, 10, 13, 14].

6. В клиническом исследовании установлено, что комплексное лечение с местным использованием ПОРФТ оказывало выраженное положительное влияние на частоту, динамику и сроки заживления ран у пациентов с СД. Начиная с 21 суток и позже количество пациентов с полным заживлением хронических ран нижних конечностей в основной группе было достоверно большим ( $p < 0,05$ ). К 28 суткам от начала лечения у пациентов основной группы полное заживление раны произошло в 50% наблюдений, а к 6 месяцам – в 93% случаев, а в группе сравнения – в 15 и 21 % соответственно. При применении ПОРФТ случаев аллергических и других нежелательных патологических реакций отмечено не было [2, 4, 11, 15, 16].

### **Рекомендации по практическому использованию результатов**

1. Для получения достаточного количества аутологичной ПОРФТ, имеющей высокую степень очистки от других форменных элементов крови и существенно большую концентрацию растворимых факторов тромбоцитов, рекомендуется использовать адаптированный к применению для ранозаживления при СД метод [2, 4, 6, 16].

2. Рекомендуется образцы плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов, расфасовывать в микропробирки по 3–5 мл в зависимости от размера поражения кожи (или диабетической язвы) и хранить замороженными ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) в течение 6 месяцев до использования, включая повторные применения в стационарных или амбулаторных условиях [2, 4, 16].

3. ПОРФТ рекомендуется применять при нейропатической и нейроишемической формах СДС с I и II степенью распространения раневого дефекта по шкале Wagner и максимальной площадью поражения кожи до  $100\text{ см}^2$  при отсутствии клинико-метаболической декомпенсации СД, критической ишемии, требующей реваскуляризации и бактериальной обсемененности менее  $10^4$  КОЕ/мл [2, 4, 15, 16].

4. Перед нанесением аутологичной плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов, хроническую рану (или диабетическую язву) рекомендуется промыть физиологическим раствором, просушить стерильным тампоном и обработать 10% раствором глюконата кальция. На раневую поверхность следует шприцем круговыми движениями от периферии к центру наносить ПОРФТ до полного закрытия поверхности. Затем такими же движениями нанести раствор тромбина (20 ЕД/мл) для гелеобразования. Закрывать салфеткой из медицинской марли [2, 4, 5, 15, 16,17].

5. Перед получением аутологичной ПОРФТ от пациентов, страдающих сахарным диабетом и СДС, следует выполнить обследование и отбор таких пациентов на соответствие аутодонорству. При наличии отклонения содержания лейкоцитов периферической крови и повышении СОЭ, необходимо провести предварительное противовоспалительное лечение с целью подготовки к аутодонорству [1, 4, 8, 10, 13,14].

## **СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **Статьи в научных журналах**

1. Возможности аутодонорства крови при получении плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов, для лечения диабетических язв кожи / М. П. Потапнев, Г. Г. Кондратенко, А. А. Троянов, А. Д. Карман, С. И. Кривенко, Е. А. Назарова, О. В. Левандовская // Мед. журн. – 2016. – № 2. – С. 91–94.

2. Первый клинический опыт местного лечения кожных поражений при сахарном диабете с помощью плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов / А. А. Троянов, Г. Г. Кондратенко, М. П. Потапнев, И. М. Храпов, С. И. Кривенко, О. В. Левандовская // Мед. журн. – 2018. – № 1. – С. 116–120.

3. Биологические эффекты и ранозаживляющее действие плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов, в условиях экспериментальной гипергликемии / А. А. Троянов, Г. Г. Кондратенко, М. П. Потапнев, Ж. А. Ибрагимова, А. А. Арабей, Т. С. Колесникова, Е. В. Ходосовская, Ж. Ф. Цыркунова, Л. А. Хватова // Мед. журн. – 2018. – № 2. – С. 107–112.

4. Экспериментальное и клиническое обоснование применения плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов, для лечения длительно незаживающих ран при сахарном диабете / А. А. Троянов, Г. Г. Кондратенко, М. П. Потапнев, Т. С. Колесникова, Е. В. Ходосовская, А. А. Арабей, П. С. Неверов // Мед. журн. – 2018. – № 2. – С. 112–118.

5. Троянов А. А. Разработка метода получения геля плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов, для лечения длительно незаживающих ран при сахарном диабете / А. А. Троянов, А. А. Арабей, П. С. Неверов // Воен. медицина. – 2018. – № 2. – С. 121–125.

### **Статьи в журналах, научных сборниках и материалах конференций**

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

7. Оценка у экспериментальных животных (крыс) со стрептозотоцин-индуцированной гипергликемией действия плазмы, обогащенной ростовыми факторами тромбоцитов, на заживление кожных ран / А. А. Троянов, А. А. Арабей, М. П. Потапнев, Е. В. Чегодаева, Ж. Ф. Цыркунова, Д. М. Гордионков // Актуальные вопросы хирургии : материалы XV съезда

хирургов Респ. Беларусь, Брест, 16–17 окт. 2014 г. / под ред. А. С. Карпицкого. – Брест, 2014. – С. 49–50.

8. Оценка возможности применения плазмы крови, обогащенной тромбоцитами, в лечении кожных повреждений при сахарном диабете / А. А. Троянов, Г. Г. Кондратенко, М. П. Потапнев, М. П. Величко, П. С. Неверов, Д. М. Гордионюк // Актуальные вопросы хирургии : материалы XV съезда хирургов Респ. Беларусь, Брест, 16–17 окт. 2014 г. / под ред. А. С. Карпицкого. – Брест, 2014. – С. 50–51.

9. Заживление кожных ран с использованием плазмы, обогащенной ростовыми факторами тромбоцитов, при сахарном диабете в эксперименте / А. А. Троянов, Г. Г. Кондратенко, А. А. Арабей, М. П. Потапнев // Организация работы многопрофильной клинической больницы на современном этапе : материалы науч.-практ. конф., посвящ. 30-летию УЗ «10-я многопрофильная клиническая больница», Минск, 28 мая 2015 г. / УЗ «10-я городская клиническая больница», Белорус. гос. мед. ун-т, Белорус. мед. акад. последиплом. образования ; под ред. В. П. Исачкина. – Минск, 2015. – С. 160–162.

10. Троянов, А. А. Применение плазмы, обогащенной ростовыми факторами тромбоцитов, в лечении повреждений кожных покровов у пациентов с сахарным диабетом. Гематологические критерии отбора пациентов / А. А. Троянов, Г. Г. Кондратенко, И. М. Храпов // Организация работы многопрофильной клинической больницы на современном этапе : материалы науч.-практ. конф., посвящ. 30-летию УЗ «10-я многопрофильная клиническая больница», Минск, 28 мая 2015 г. / УЗ «10-я городская клиническая больница», Белорус. гос. мед. ун-т, Белорус. мед. акад. последиплом. образования ; под ред. В. П. Исачкина. – Минск, 2015. – С. 162–165.

11. Экспериментальное обоснование использования плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов (ПОРФТ), для заживления ран кожи лабораторных животных и первый опыт медицинского применения ПОФРТ у пациентов с синдромом диабетической стопы / М. П. Потапнев, А. А. Троянов, Г. Г. Кондратенко, А. А. Арабей, Ж. А. Ибрагимова, Т. С. Колесникова, Е. В. Ходосовская, Л. В. Бутько, О. В. Левандовская, С. И. Кривенко // БГМУ в авангарде медицинской науки и практики : сб. науч. тр. / Белорус. гос. мед. ун-т ; под ред. А. В. Сикорского, О. К. Дорониной. – Минск, 2016. – Вып. 6. – С. 251–254.

12. Роль растворимых факторов тромбоцитов в пролиферации клеток кожи *in vitro* и регенерации кожной раны у крыс *in vivo* / М. П. Потапнев, Т. С. Колесникова, Е. В. Ходосовская, Л. А. Хватова, А. А. Троянов, Ж. Ф. Цыркунова, А. А. Арабей, С. М. Космачева, Н. Н. Данилкович, Е. А. Шахмуть, О. В. Левандовская, С. И. Кривенко // Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии : материалы Всерос. науч.-практ. конф.

с междунар. участием, Санкт-Петербург, 23–24 июня 2016 г. – [Опубл. в журн.] Вестн. гематологии. – 2016.– Т. 12, № 2. – С. 49.

13. Возможности применения плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов, для лечения повреждений кожи при сахарном диабете / А. А. Троянов, М. П. Потапнев, Г. Г. Кондратенко, М. В. Малиновский // Актуальные вопросы неотложной хирургии : материалы пленума хирургов Респ. Беларусь и Респ. науч.-практ. конф., 3–4 нояб. 2016 г., г. Молодечно / Мин-во здравоохранения Респ. Беларусь, Белорус. ассоц. хирургов ; редкол.: Г. Г. Кондратенко [и др.]. – Минск, 2016. – С. 497–499.

14. Троянов, А. А. Применение плазмы, обогащенной ростовыми факторами тромбоцитов, в лечении повреждений кожных покровов у пациентов с сахарным диабетом. Гематологические критерии отбора пациентов / А. А. Троянов, Г. Г. Кондратенко, И. М. Храпов // Актуальные вопросы неотложной хирургии : материалы пленума хирургов Респ. Беларусь и Респ. науч.-практ. конф., 3–4 нояб. 2016 г., г. Молодечно / Мин-во здравоохранения Респ. Беларусь, Белорус. ассоц. хирургов ; редкол.: Г. Г. Кондратенко [и др.]. – Минск, 2016. – С. 499–501.

15. Плазма, обогащенная растворимыми факторами тромбоцитов, – новый подход в восстановительной терапии / М. П. Потапнев, В. Г. Богдан, Г. Г. Кондратенко, С. И. Кривенко, О. В. Левандовская, А. А. Троянов, И. Н. Северин, С. М. Космачева // Современные аспекты трансфузиологии : материалы науч.-практ. конф., посвящ. 50-летию учреждения здравоохранения «Слоним. обл. станция переливания крови», 25 нояб. 2016 г. / Респ. науч.-практ. центр трансфузиологии и мед. биотехнологий. – Минск, 2016. – С. 20–22.

### **Инструкция по применению**

16. Метод местного лечения диабетических язв кожи у пациентов с сахарным диабетом: инструкция по применению № 085-0915 : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 04.11.2015 г. [Электронный ресурс] / Белорус. гос. мед. ун-т; сост. : Г. Г. Кондратенко, М. П. Потапнев, А. А. Троянов, А. А. Арабей, И. М. Храпов. – Минск, 2016. – 4 с. – Режим доступа: <http://med.by>

### **Патент**

17. Способ лечения поверхностной язвы кожных покровов : пат. ВУ 21389 / М. П. Потапнев, А. А. Арабей, Г. Г. Кондратенко, А. А. Троянов, Ж. А. Ибрагимова. – Опубл. 30.10.2017.

**РЭЗІЮМЭ****Траянаў Аляксей Аляксандравіч****Абгрунтаванне прымянення плазмы, узбагачанай растваральнымі фактарамі трамбацытаў, у лячэнні раневых паверхняў пры сіндроме дыябетычнай ступні (эксперыментальна-клінічнае даследаванне)**

**Ключавыя словы:** цукровы дыябет, пашкодванні скуры, плазма, узбагачаная раставымі фактарамі трамбацытаў.

**Мэта даследавання:** эксперыментальна і клінічна выявіць эфектыўнасць і абгрунтаваць мэтазгоднасць прымянення плазмы, узбагачанай растваральнымі фактарамі трамбацытаў для стымуляцыі раназагаення пры цукровым дыябеце.

**Аб'ект даследавання:** плазма, узбагачаная растваральнымі фактарамі трамбацытаў, фібрабласти скуры пацукоў і чалавека, мезенхімальныя ствалавыя клеткі чалавека, інфіцыраваныя скурныя раны пацукоў (n=72) з індуцыраванай гіперглікеміяй. Гематалагічныя даныя пацыентаў з СДС (n=102) і здаровых асоб (n=115), скурныя пашкодванні пры сіндроме дыябетычнай ступні (n=44).

**Метады даследавання:** эксперыментальны, клінічны, лабараторны, мікрабіялагічны, планіметрычны, статыстычны.

**Атрыманыя вынікі і іх навізна.** Вызначаны магчымасці падрыхтоўкі аўталагічнай ПУРФТ ад пацыентаў з ЦД, распрацаваны адаптаваны да гэтых умоў метады атрымання. У выніку эксперыментальных даследаванняў выяўлены антыбактэрыяльны эфект ПУРФТ, атрыманы новыя навуковыя звесткі аб праліфератыўнай актыўнасці ПУРФТ у дачыненні да фібраблестаў скуры жывёл і чалавека, даказана прамое рост-стымулюючае дзеянне ПУРФТ ад пацыентаў з ЦД на мезенхімальныя ствалавыя клеткі чалавека, вызначана аптымальная канцэнтрацыя ПУРФТ для гэтых мэтаў. Распрацаваны метады утварэння на паверхні раны геля ПУРФТ, які валодае аптымальнай адгезіўнасцю і часам гелеўтварэння. У эксперыменце даказана раназагойваючае дзеянне і станоўчы ўплыў ПУРФТ на выжывальнасць лабараторных жывёл з індуцыраванай гіперглікеміяй. Распрацаваны і ўкаранены ў клінічную практыку новы, высокаэфектыўны метады мясцовага лячэння скурных пашкоджанняў у пацыентаў з СДС з выкарыстаннем ПУРФТ, практычнае прымяненне якога павышае якасць аказання медыцынскай дапамогі і скарачае тэрміны гаення ран.

**Рэкамендацыі па выкарыстанні:** атрыманыя вынікі рэкамендуецца выкарыстоўваць у працы аддзяленняў гнойнай хірургіі стацыянараў, хірургічных кабінетаў паліклінік і эндакрыналагічных дыспансераў.

**Галіна прымянення:** практычная хірургія, навукова-адукацыйная медыцына.

## РЕЗЮМЕ

**Троянов Алексей Александрович**

**Обоснование применения плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов, в лечении раневых поверхностей при синдроме диабетической стопы (экспериментально-клиническое исследование)**

**Ключевые слова:** сахарный диабет, повреждения кожи, плазма, обогащенная ростовыми факторами тромбоцитов.

**Цель исследования:** экспериментально и клинически выявить эффективность и обосновать целесообразность применения плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов для стимуляции ранозаживления при сахарном диабете.

**Объект исследования:** плазма, обогащенная растворимыми факторами тромбоцитов, фибробласты кожи крыс и человека, мезенхимальные стволовые клетки человека, инфицированные кожные раны крыс (n=72) с индуцированной гипергликемией. Гематологические данные пациентов с СДС (n=102) и здоровых лиц (n=115), кожные повреждения при синдроме диабетической стопы (n=44).

**Методы исследования:** экспериментальный, клинический, лабораторный, микробиологический, планиметрический, статистический.

**Полученные результаты и их новизна.** Определены возможности приготовления аутологичной ПОРФТ от пациентов с СД, разработан адаптированный к этим условиям метод ее получения. В результате экспериментальных исследований выявлен антибактериальный эффект ПОРФТ, получены новые научные сведения о пролиферативной активности ПОРФТ в отношении фибробластов кожи животных и человека, доказано прямое рост-стимулирующее действие ПОРФТ от пациентов с СД на мезенхимальные стволовые клетки человека, определена оптимальная концентрация ПОРФТ для этих целей. Разработан метод образования на поверхности раны геля ПОРФТ, обладающего оптимальной адгезивностью и временем гелеобразования. В эксперименте доказано ранозаживляющее действие и положительное влияние ПОРФТ на выживаемость лабораторных животных с индуцированной гипергликемией. Разработан и внедрен в клиническую практику новый, высокоэффективный метод местного лечения кожных повреждений у пациентов с СДС с использованием ПОРФТ, практическое применение которого повышает качество оказания медицинской помощи и сокращает сроки заживления ран.

**Рекомендации по использованию:** полученные результаты рекомендуется использовать в работе отделений гнойной хирургии стационаров, хирургических кабинетов поликлиник и эндокринологических диспансеров.

**Область применения:** практическая хирургия, научно-образовательная медицина.

## SUMMARY

**Troyanov Alexey Alexandrovich**

### **Substantiation of the use of platelet-rich plasma in the treatment of wound surfaces in diabetic foot syndrome (experimental and clinical study)**

**Key words:** diabetes mellitus, skin lesions, platelet-rich plasma.

**The aim of the study** was to experimentally and clinically identify efficacy and substantiate the advisability of using platelet-rich plasma to stimulate wound healing in diabetes mellitus.

**Object of the study:** platelet-rich plasma, rat and human skin fibroblasts, human mesenchymal stem cells, infected cutaneous wounds of rats (n=72) with induced hyperglycemia. Hematological data of patients with SDS (n=102) and healthy subjects (n = 115), skin lesions in diabetic foot syndrome (n=44).

**The results obtained and their novelty.** The possibilities of preparation of autologous PRP from patients with diabetes have been determined, a method of its preparation adapted to these conditions has been developed. As a result of experimental studies, the antibacterial effect of PRP was revealed, new scientific information was obtained on PRP proliferative activity in relation to animal and human skin fibroblasts, direct growth-stimulating effect of PRP from patients with DM on human mesenchymal stem cells was proved, and the optimal concentration of PRP for these purposes was determined. A method for the formation of a PRP gel on the wound surface with optimal adhesiveness and gel time has been developed. In the experiment, the wound healing effect and the positive effect of PRP on the survival of laboratory animals with induced hyperglycemia was demonstrated. A new, highly effective method for local treatment of skin lesions in patients with VDS using PRP has been developed and introduced into clinical practice. Its practical application improves the quality of medical care and shortens the healing time for wounds.

**Recommendations for use:** the results obtained are recommended to be used in the departments of purulent surgery of hospitals, surgical offices of polyclinics and endocrinology dispensaries.

**Field of application:** practical surgery, scientific and educational medicine.



Подписано в печать 14.05.18. Формат 60×84/16. Бумага писчая «Снегурочка».  
Ризография. Гарнитура «Times».  
Усл. печ. л. 1,39. Уч.-изд. л. 1,4. Тираж 60 экз. Заказ 295.

Издатель и полиграфическое исполнение: учреждение образования  
«Белорусский государственный медицинский университет».  
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,  
распространителя печатных изданий № 1/187 от 18.02.2014.  
Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.