

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПЛАЗМЫ,
ОБОГАЩЕННОЙ РАСТВОРИМЫМИ ФАКТОРАМИ ТРОМБОЦИТОВ (ПОРФТ)
ДЛЯ ЗАЖИВЛЕНИЯ РАН КОЖИ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ
И ПЕРВЫЙ ОПЫТ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ПОРФТ
У ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ**

*Потапнев М.П.¹, Троянов А.А.¹, Кондратенко Г.Г.¹, Арабей А.А.¹, Ибрагимова Ж.А.¹, Колесникова Т.С.¹,
Ходосовская Е.В.¹, Бутько Л.В.¹, Левандовская О.В.², Кривенко С.И.²*

¹Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь;

²Учреждение здравоохранения «9-я городская клиническая больница», Минск, Республика Беларусь

Реферат. В статье представлены результаты экспериментальных исследований на здоровых животных и крысах с экспериментальным диабетом, а также результаты клинических исследований на пациентах с синдромом диабетической стопы, указывающие на способность плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов крови человека, стимулировать заживление кожных ран. На это указывают сокращение времени заживления кожных ран у здоровых крыс, размеров кожных ран на этапах заживления у крыс с стрептозотоцин-индуцированной гипергликемией, тенденцией к более высокой частоте заживления диабетических язв через 1 и 3 мес. после местной терапии с использованием плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов.

Ключевые слов: плазма, обогащенная растворимыми факторами тромбоцитов человека, крысы, диабет, кожные раны, пациенты с диабетическими язвами, заживление.

Введение. Биологические препараты, содержащие растворимые факторы тромбоцитов (РФТ) все шире используются в медицинской практике. Наибольший интерес привлекает их использование для наружного применения с целью стимуляции регенерации длительно незаживающих кожных ран [1–4]. При этом как технология применения препаратов РФТ, так и способ их нанесения на рану различаются [3]. Нами были проведены экспериментальные исследования по отработке способа получения плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов (ПОРФТ), и метода ее нанесения на кожную рану у экспериментальных животных (крыс). Затем были проведены клинические испытания аутологичной ПОРФТ у пациентов с синдромом диабетической стопы (СДС).

Цель работы — определение условий эффективного применения ПОРФТ для заживления кожных ран у экспериментальных животных и у пациентов с СДС.

Материалы и методы. ПОРФТ получали из концентрата тромбоцитов (КТ) периферической крови доноров Отделения переливания крови учреждения здравоохранения «9-я городская клиническая больница» г. Минска (для экспериментальных исследований) или из КТ крови пациентов с СДС (для клинических исследований). Для экспериментальных исследований использовали крыс линии Wistar с массой тела 250–350 г, которых получали из вивария учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет» (БГМУ). Исследования на животных проводились с разрешения и одобрения Комитета по биомедицинской этике БГМУ (протокол № 7 от 14.10.2013). Испытания с включением пациентов были одобрены Комитетом по биомедицинской этике Учреждения здравоохранения «10-я городская клиническая больница» (УЗ «10-я ГКБ») г. Минска (протокол № 21 от 11.12.2014). ПОРФТ приготавливали из КТ путем стандартизации концентрации тромбоцитов до 1×10^9 /мл и последующего замораживания-оттаивания при температуре -20°C . Биологическую активность ПОРФТ оценивали по способности в разведении 1:20 вызывать *in vitro* усиление пролиферации мезенхимальных стволовых клеток человека. Через 3 сут оценивали количество выросших клеток, которое должно быть не менее чем в 1,5 раза больше по сравнению со стандартными условиями культивирования в присутствии сыворотки эмбрионов коров (СЭК). В экспериментах на животных использовали как интактных, так и крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом. Диабет вызывали однократным внутривенным введением стрептозотоцина (50 мг/кг веса) с последующим отбором животных, имевших стабильно не менее 11,9 ммоль/л (более 20,0 мг/л) глюкозы в периферической крови. У животных в области спины формировали рану диаметром 15 мм, дополнительно инфицировали ее нанесением бактериальной взвеси, содержащей $2-3 \times 10^8$ КОЕ *S. aureus*. Для местного лечения ПОРФТ однократно наносили на рану и добавляли тромбин (20 Ед/мл) (в сравнении с контролями — 0,9% раствором хлорида натрия или аналогичной плазмы). Оценивали динамику заживления раны в течение 28 дней. Результаты заживления кожных ран фотографировали, размеры оценивали планиметрически.

Клинические испытания аутологичного ПОРФТ проводили на базе УЗ «10-я ГКБ» г. Минска. ПОРФТ изготавливали на базе УЗ «9-я ГКБ» г. Минска после получения информированного согласия у пациентов и забора 350 мл крови. У пациентов санировали кожные язвы нижних конечностей, промывали 0,9% раствором хлорида натрия, затем 10% раствора глюконата кальция. ПОРФТ наносили на всю поверхность раны и сразу добавляли раствор человеческого тромбина (20 Ед/мл) для формирования плотного геля. При необходимости ПОРФТ наносили повторно через 14 дней. Оценивали динамику заживления ран через 1 и 3 мес. Полученные результаты заживления ран обрабатывали с помощью пакета программ Statistica 10.0.

Результаты и их обсуждение. Образцы ПОРФТ, полученные от здоровых лиц (доноров крови), обладали выраженной способностью стимулировать пролиферацию МСК *in vitro*. Они усиливали пролиферацию клеток в 2,73 раза по сравнению с контролем клеток, содержащих СЭК, и в 1,55 раза по сравнению с контролем клеток, культивированных в присутствии плазмы этих здоровых лиц ($n = 20$, данные не представлены). Использование этих образцов ПОРФТ для заживления кожных ран крыс показало, что среднее время заживления раны составило $19,875 \pm 1,1$ сут ($n = 8$; $p = 0,02$ к контролю), в то время как у контрольных крыс, не имевших специального покрытия ран, — $23,375 \pm 0,75$ дня ($n = 8$), а у крыс, у которых раны покрывали плазмой, — $21,125 \pm 1,14$ сут ($n = 8$; $p = 0,12$ к контролю). При оценке динамики заживления (таблица 1) на конечных этапах (21 день) площадь раны у крыс, пролеченных с использованием ПОРФТ или плазмы, имела тенденцию к уменьшению по сравнению с крысами, не получавшими местное лечение. При этом через 21 день лечения в группе контрольных крыс полное заживление отмечено у 2 из 8 животных, у крыс, получавших лечение местно плазмой или ПОРФТ, — у 5 из 8 животных ($p = 0,13$).

Таблица 1. — Динамика заживления кожных ран у крыс, получавших местную терапию

№ группы животных	Размер кожной раны (см ²) крыс после местного лечения через				
	0 дней	7 дней	14 дней	21 день	28 дней
1 — контроль) ($n = 8$)	2,105±0,089	1,031±0,06	0,383±0,058	0,116±0,03	0
2 — плазма, ($n = 8$)	2,01±0,067	0,91±0,05	0,264±0,0365	0,039±0,019	0
3 — ПОРФТ ($n = 8$)	2,03±0,066	0,97±0,05 ($p_{1-3} = 0,49$)	0,274±0,052 ($p_{1-3} = 0,186$)	0,049±0,029 ($p_{1-3} = 0,138$) ($p_{1-2} = 0,054$)	0

Эксперименты, проведенные с крысами, у которых индуцировали стойкую гипергликемию (20,0 мг/л), выявили различия между животными, получавшими или не получавшими местную терапию кожных ран с использованием ПОРФТ или плазмы. Как показано в таблице 2, в присутствии ПОРФТ отмечено ускоренное заживление кожных ран, начиная с 7-го дня заживления. Оно сохранилось в течение 21 дня наблюдения, когда тенденция к ускоренному заживлению наблюдалась как по отношению к контролю животных, не получавших местную терапию, так и животных, получавших местную терапию плазмой. Через 21 день полное заживление ран наблюдалось у 7 из 15 крыс, получавших местную терапию ПОРФТ. В то время как в контроле без лечения — 3 из 14 животных ($P = 0,15$), а при местном лечении плазмой — 1 из 10 крыс ($P = 0,054$).

Таблица 2. — Средний размер кожной раны у выживших крыс с гипергликемией в процессе местной терапии

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

Количество крыс, у которых оценили размеры ран, в группе 1 составило 14, в группе 2 — 10, в группе 3 — 15 особей.

Полученные экспериментальные и имеющиеся литературные данные послужили основой для клинических испытаний ПОРФТ у пациентов с СДС. Перед местным лечением с использованием ПОРФТ каждый пациент был проинформирован о методе лечения, подписано «Информированное согласие» на сдачу крови для получения ПОРФТ и ее применения. Использованный метод лечения аутологичной ПОРФТ осуществлялся в соответствии с заявкой на патент (01.02.29016, получено Уведомление о положительном результате предварительной экспертизы по заявке № а 20150471 от 28.09.2015 на выдачу патента на изобретение «Способ лечения пациентов с поверхностными язвами кожных покровов») и инструкцией по применению, утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь («Метод местного лечения диабетических язв кожи у пациентов с сахарным диабетом», утв. 04.11.2015, рег. № 085-0915). В большинстве случаев через 2 недели проводили повторное нанесение ПОРФТ на всю поверхность заживающей раны и/или в местах краевой мацерации раневой поверхности. Характеристика пациентов, включенных в клиническое испытание ПОРФТ, представлена в таблице 3. Как видно, клиническая характеристика пациентов исследовательской группы и группы сравнения к моменту начала местного лечения кожных язв была одинакова.

Применение нового метода лечения кожных повреждений при СД, как видно из таблицы 4, имело выраженный положительный клинический эффект. Через 1 мес. наблюдения после применения предлагаемого метода полное заживление раны наблюдалось в 37,5% случаев, в группе сравнения заживления ран не отмечено ($p = 0,055$). Через 3 мес. наблюдения заживление ран наблюдалось в 62,5 % случаев, в то время как при стандартном лечении полное заживление в течение такого же периода отмечено лишь в 25% случаев ($p = 0,13$).

Таблица 3. — Характеристика пациентов с синдромом диабетической стопы, включенных в исследование

Характеристика пациентов	Пациенты, получавшие стандартное местное лечение (n = 8)	Пациенты, получавшие местно ПОРФТ (n = 8)
Средний возраст, годы	56,2 (23–65)	54,1 (28–63)
Пол (муж./жен.)	6/2	5/3
Стадия/тяжесть состояния по шкале Wagner	I	I
Средняя длительность заболевания с момента установки диагноза, годы	11,2 (3–20)	10,4 (2–15)
Средний размер кожных язв нижних конечностей, см ²	17,1 (11,2–34,5)	15,2 (9,4–31,3)
Средняя длительность периода наличия кожных язв, годы	2,5 (0,25–5,0)	2,2 (0,5–5,0)
Уровень глюкозы в крови, ммоль/л	7,6 (5,2–8,9)	7,4 (4,7–9,0)
Уровень гликированного гемоглобина периферической крови на момент начала местного лечения, %*	7,2 (6,3–8,1)	6,8 (6,1–7,5)
Уровень лейкоцитов крови, $\times 10^9$ /л	8,1 (6,8–8,9)	8,5 (6,4–9,0)

Примечание — * — уровень гликированного гемоглобина, повышенный при поступлении пациентов, был снижен до <9,0 ммоль/л перед местным лечением кожных ран; данные представлены как медиана (минимальное–максимальное) значения.

При более длительных сроках наблюдения другие авторы констатировали заживление кожных ран под действием ПОРФТ у более 80% пациентов [2, 5]. В результате процесса заживления отмечено улучшение общего состояния, снизились жалобы на боли в ногах в 100% случаев. В то же время у пациентов группы сравнения жалобы на боли в ногах в процессе консервативного лечения регистрировались в 62,5% случаев ($p = 0,055$). Достоверных различий лабораторных показателей периферической крови не отмечено. Уровни глюкозы и гликиро-

ванного гемоглобина в периферической крови также не отличились в сравниваемых группах пациентов. Таким образом, первый опыт клинического применения показал преимущества ПОРФТ у пациентов с СДС, заключающееся в улучшении общего состояния и некоторому ($p>0,05$) усилению процесса заживления диабетических язв.

Таблица 4. — Характеристика клинической эффективности местного лечения пациентов с диабетическими поражениями кожи нижних конечностей

Параметры	Пациенты, получавшие стандартное местное лечение (n = 8)	Пациенты, получавшие местно ПОРФТ (n = 8)
Заживление диабетических язв кожи через 1 мес. / % пациентов с полным заживлением раны	0/8 (0%)	3/8 (37,5%)
Заживление диабетических язв кожи через 3 мес. / % пациентов с полным заживлением раны	2/8 (25%)	5/8 (62,5%)
Улучшение общего состояния (% случаев)	5/8 (62,5%)	8/8 (100%)
Уровень глюкозы в крови через 1 мес. после начала лечения (ммоль/л)	7,2 (6,5–7,9)	6,6 (6,2–7,1)
Уровень гликированного гемоглобина периферической крови через 1 мес. после начала лечения (%)	7,1 (6,4–7,5)	6,9 (6,1–7,3)
Уровень лейкоцитов крови через 1 мес. после начала лечения ($\times 10^9/\text{л}$)	7,7 (6,3–8,8)	7,2 (5,8–8,4)

Заключение. Результаты показали, что в экспериментальных исследованиях на здоровых животных и крысах с диабетом, а также у пациентов с синдромом диабетической стопы с использованием плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов, для местной терапии оказывало благоприятный эффект на заживление кожных ран.

Литература

1. The use of autologous platelet gel to treat difficult-to-heal wounds: a pilot study / L. Mazzucco [et al.] // *Transfusion*. — 2004. — Vol. 44, № 7. — P. 1013–1018.
2. Carter, M.J. Use of platelet rich plasma gel on wound healing: a systemic and meta-analysis / M.J. Carter, C.P. Fything, L.K. Parnell // *Eplasty*. — 2011. — Vol. 11. — e38.
3. Растворимые факторы тромбоцитов и регенеративная медицина / М.П. Потапнев [и др.] // *Здравоохранение*. — 2014. — № 9. — С. 32–40.
4. Богдан, В.Г. Проспективное рандомизированное клиническое исследование эффективности применения аутологичных тромбоцитарных концентратов для стимуляции регенерации трофических язв венозной этиологии / В.Г. Богдан, Д.А. Толстов // *Новости хирургии*. — 2014. — Т. 22, № 3. — С. 344–350.
5. Our treatment strategy for critical limb ischemia / T. Yamada [et al.] // *Int. J. Vasc. Med.* — 2013. — doi: 10.1155/2013/437471.

EXPERIMENTAL RATIONALE FOR PLATELET-RICH PLASMA (PRP) USE FOR WOUND HEALING IN LABORATORY ANIMALS AND FIRST EXPERIENCE IN CLINICAL APPLICATION THE PRP FOR PATIENTS WITH DIABETIC FOOT SYNDROME

Potapnev V.P.¹, Troyanov A.A.¹, Kondratenko G.G.¹, Arabey A.A.¹, Ibragimova Zh.A.¹, Kolesnikova T.S.¹, Hodosovskaya E.V.¹, Butjko L.V.¹, Levandovskaya O.V.², Krivenko S.I.²

¹Educational Establishment "The Belarusian State Medical University", Minsk, Republic of Belarus;

²Institution of Health "9th City Clinical Hospital", Minsk, Republic of Belarus

The article presents data of experimental study with healthy and diabetic (streptozotocin-induced) Wistar rats as well as clinical data of platelet-rich plasma (PRP) application for patients with diabetic foot syndrome, that demonstrates the ability of PRP to stimulate skin wound healing. Shortage of term the wound healing in healthy rats, reduction of wound size at different timepoints of skin ulcer healing in diabetic rats and tendency of higher frequency of diabetic ulcers' healing one and three months post local therapy the skin ulcers in patients with diabetic foot syndrome confirms evidence of efficient medical application the PRP.

Keywords: platelet-rich human plasma, rats, diabetes mellitus, skin wound, patients with diabetic foot syndrome, healing.

Поступила 19.05.2016