

ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ»

УДК 616.14-009.85-003.93:616-089.843

Толстов
Даниил Александрович

**СТИМУЛЯЦИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ ТРОФИЧЕСКИХ ЯЗВ
ВЕНОЗНОЙ ЭТИОЛОГИИ АУТОЛОГИЧНЫМИ
ТРОМБОЦИТАРНЫМИ КОНЦЕНТРАТАМИ
(экспериментально-клиническое исследование)**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

по специальности 14.01.17 – хирургия

Минск 2015

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

Научный руководитель: **Богдан Василий Генрихович**, доктор медицинских наук, доцент, заместитель начальника факультета по учебной и научной работе – начальник учебного отдела военно-медицинского факультета в учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Официальные оппоненты: **Петухов Владимир Иванович**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой хирургии факультета повышения квалификации и переподготовки кадров учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Чур Николай Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, профессор 1-й кафедры хирургических болезней учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Оппонирующая организация: учреждение здравоохранения “9-я городская клиническая больница” г. Минска

Защита диссертации состоится «20» мая 2015 г. в 14.00 часов на заседании совета по защите диссертаций Д 03.15.03 при государственном учреждении образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования» по адресу: 220013, г. Минск, ул. П. Бровки, 3/3; тел. (017) 2830068; e-mail: rimwlad@gmail.com.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Автореферат разослан «17» апреля 2015 г.

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций
кандидат медицинских наук



В.В. Римашевский

ВВЕДЕНИЕ

Трофические язвы (ТЯ) нижних конечностей (НК) венозной этиологии являются актуальной проблемой хирургии [Савельев В.С. и соавт., 2001, Светухин А.М., 2002, Гришин И.Н. и соавт., 2005, Чур Н.Н. и соавт., 2008, Богданец Л.И., 2009, Dias T.Y. et al., 2014, van Gent W. et al., 2015].

Полученные в последние годы данные о биологических процессах, протекающих в хронических ранах на клеточно-молекулярном уровне, позволили расширить представления о патогенезе ТЯ и предложить новые подходы к лечению [Оболенский В.Н., 2013, Raffetto J.D., 2009]. Наиболее оправданным и перспективным в лечении длительно незаживающих язв является применение методов регенеративной медицины, в том числе основанных на использовании аутологичных тромбоцитарных концентратов (ТК), содержащих факторы роста в естественных биологических концентрациях [Андреев Д.Ю. и соавт., 2009, Потапнев М.П. и соавт., 2014, Martinez-Zapata M.J. et al., 2009, Anitua E. et al., 2011, O'Brien J. et al., 2014].

Несмотря на применение ТК в виде обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП) и обогащенного тромбоцитами фибринового матрикса (ОТФМ) в различных областях медицины, результаты проведенных исследований не позволяют сформировать целостное представление о структуре и составе концентратов, объективно оценить производимые ими эффекты [Marx R.E., 2001, Dohan D.M. et al., 2006, Arora N.S. et al., 2009, Lucarelli E. et al., 2010]. Окончательно не обоснована целесообразность локального использования ТК для стимуляции регенерации ТЯ, не разработаны методы применения основных форм ТК в зависимости от площади язвенного дефекта, отсутствуют доказательства клинической значимости включения новых методов регенеративной медицины в комплексное лечение ТЯ венозной этиологии [Крайник И.В. и соавт., 2014, Севрюкова Н.И. и соавт., 2014, Naik B. et al., 2013, Sarvajnamurthy S. et al., 2013, San Sebastian K.M. et al., 2014].

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами и темами

Диссертационное исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы кафедры военно-полевой хирургии военно-медицинского факультета в УО «Белорусский государственный медицинский университет»: «Разработать и внедрить новые инновационные методы диагностики и комплексного лечения пациентов с острой и хронической хирургической патологией» (номер государственной регистрации 20110630, срок выполнения 2011 – 2015 гг.).

Тема диссертационной работы соответствует п.п. 4.2, 4.4 «Перечня приоритетных направлений научных исследований Республики Беларусь на

2011-2015 гг.» (согласно постановлению Совета Министров Республики Беларусь от 19.04.2010 г. №585).

Цель и задачи исследования

Цель исследования: улучшение результатов комплексного лечения пациентов с трофическими язвами венозной этиологии путем разработки, обоснования и внедрения в клиническую практику новых методов стимуляции регенерации с помощью аутологичных тромбоцитарных концентратов.

Задачи исследования:

1. Определить структурные особенности клеточного компонента основных форм тромбоцитарных концентратов.

2. Провести *in vitro* оценку влияния аутологичных тромбоцитарных концентратов на пролиферативные, морфологические и функциональные характеристики культур фибробластов кожи пациентов с трофическими язвами венозной этиологии с обоснованием целесообразности их применения для стимуляции регенеративных процессов.

3. Разработать и внедрить в клиническую практику новые методы стимуляции регенерации трофических язв венозной этиологии с помощью тромбоцитарных концентратов аутологичного происхождения в зависимости от величины площади язвенного дефекта.

4. Оценить медицинскую и социальную эффективность применения разработанных методов регенерации с помощью аутологичных тромбоцитарных концентратов в комплексном лечении пациентов с трофическими язвами венозной этиологии.

Научная новизна

1. Расширены представления об особенностях организационной структуры клеток в основных формах тромбоцитарных концентратов, объясняющие с новых позиций продолжительность и спектр их действия.

2. Научно обоснована целесообразность использования аутологичных тромбоцитарных концентратов для активации регенеративных процессов на основании установленного их многофакторного влияния на культуру фибробластов кожи пациентов с трофическими язвами венозной этиологии.

3. Разработаны новые медицинские инструменты и методы стимуляции регенерации трофических язв венозной этиологии различными формами аутологичных тромбоцитарных концентратов с учетом площади язвенного поражения.

4. Доказана высокая эффективность клинического применения разработанных методов использования аутологичных тромбоцитарных концентратов, позволившая улучшить результаты комплексного лечения пациентов с венозными трофическими язвами.

Положения, выносимые на защиту

1. Неоднородная электронная плотность внутриклеточных секреторных гранул тромбоцитов и зернистых лейкоцитов в сочетании с уменьшением величины среднего объема клеток подтверждает присутствие различных стадий дегрануляции клеточного компонента с либерализацией биологически активных веществ, стимулирующих кожную регенерацию, и является дополнительным фактором, определяющим пролонгацию действия и спектр биологических эффектов основных форм тромбоцитарных концентратов.

2. Аутологичные тромбоцитарные концентраты, полученные с помощью разработанных технологий, активируют пролиферацию, синтетическую и функциональную активность фибробластов кожи пациентов с трофическими язвами венозной этиологии при сохранении стабильности морфологии и высокой жизнеспособности культур.

3. Разработанные 3 новых метода стимуляции регенерации трофических язв венозной этиологии с помощью тромбоцитарных концентратов аутологичного происхождения, включающие инъекционное локальное введение обогащенной тромбоцитами плазмы по периметру язвы в сочетании с дополнительным (в зависимости от величины площади язвенного дефекта) аппликационным нанесением на рану обогащенного тромбоцитами фибринового матрикса, либо закрытием раны комбинированным тромбоцитарно-фибриновым комплексом с фрагментами кожи или расщепленным кожным лоскутом, позволяют улучшить клинические результаты лечения по основным показателям, характеризующим течение процесса заживления хронической язвы.

4. Применение предложенных методов использования аутологичных тромбоцитарных концентратов в комплексном лечении пациентов с трофическими язвами венозной этиологии обеспечивает сокращение продолжительности стационарного лечения и повышение качества жизни пациентов в отдаленном периоде после операции.

Личный вклад соискателя ученой степени

Автором выполнен патентно-информационный поиск, анализ литературы по теме диссертации (личный вклад в публикациях – 85%) [1, 3]. Совместно с научным руководителем определена цель и задачи диссертации, разработан дизайн исследования. Соискателем лично разработаны информационные карты учета пациентов с трофическими язвами, проведен сбор первичного материала, сформирована компьютерная база данных. При консультативной помощи научного руководителя проведена статистическая обработка и анализ результатов исследования.

Получение всех образцов тромбоцитарных концентратов для экспериментальных и клинических исследования выполнено автором самостоятельно (личный вклад – 100%).

Электронная микроскопия образцов обогащенного тромбоцитами фибринового матрикса проведена на базе лаборатории «Центр электронной и световой микроскопии» ГНУ «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси» совместно с кандидатом медицинских наук Новаковской С.А. В обсуждении полученных результатов принимали участие кандидат медицинских наук, доцент Студеникина Т.М., Мельников И.А. (личный вклад автора в публикации – 75%) [8].

Исследования клеточных культур (культивирование, микроскопия, оценка жизнеспособности, иммуноферментный анализ супернатантов) проведены на базе научно-исследовательской лаборатории ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования» совместно с кандидатом медицинских наук, доцентом Зафранской М.М., Багаткой С.С. (личный вклад – 75%) [2, 6, 8, 13, 18, 19].

Автором лично выполнен отбор пациентов в исследование, осуществлен контроль всех этапов лечения и динамическое наблюдение за пациентами, проведено персональное анкетирование всех пациентов с оценкой качества жизни по опроснику CIVIQ-20 при поступлении в стационар и в отдаленном периоде. Разработанные методы лечения с помощью аутологичных тромбоцитарных концентратов применены автором самостоятельно у всех 55 пациентов основных групп (личный вклад – 100%). Соискатель принимал участие в проведении хирургического лечения в качестве оператора или ассистента у 64 пациентов из 104 прооперированных (61,5%).

Непосредственно соискателем подготовлены публикации, в которых выполнена оценка эффективности применения разработанных методов использования аутологичных тромбоцитарных концентратов в комплексном лечении пациентов с трофическими язвами венозной этиологии. Личное участие автора в публикациях – 85% [4, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17].

Автором совместно с научным руководителем и соавторами разработаны и запатентованы новые медицинские инструменты и методы лечения трофических язв с помощью аутологичных тромбоцитарных концентратов (личный вклад – 50%) [21, 22, 23, 24].

По теме диссертации разработана и утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь инструкция по применению «Метод лечения трофических язв с использованием аутологичных тромбоцитарных концентратов» регистрационный номер 117-0912 от 28.09.2012 [20] – личный вклад 80%.

Все основные научные результаты диссертации, положения, выносимые на защиту, выводы и практические рекомендации получены автором лично. Вклад автора в опубликованных работах составил в среднем 80%.

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов

Результаты исследований и основные положения диссертации доложены и обсуждены на: IX научно-практической конференции ассоциации флебологов России (г. Москва, 18-19 мая, 2012 г.), XXVI Пленуме хирургов Республики Беларусь (г. Бобруйск, 27-28 сентября 2012), научных сессиях БГМУ (г. Минск, 29 января 2013 г., 28 января 2014 г.), международной научной конференции, посвященной 60-летию Института физиологии НАН Беларуси «Фундаментальные науки – медицине» (г. Минск, 17 мая 2013 г.), обществе хирургов города Минска и Минской области (г. Минск, 21 ноября 2013 г.), XV съезде хирургов Республики Беларусь, (г. Брест, 16-17 октября 2014 г.)

Результаты диссертации используются в лечебном процессе (4 акта внедрения) УЗ «2-я городская клиническая больница», УЗ «4-я городская клиническая больница им. Н.Е. Савченко», УЗ «11-я городская клиническая больница», ГУ «432 ордена Красной Звезды главный военный клинический медицинский центр Вооруженных Сил Республики Беларусь» и в учебном процессе (2 акта внедрения) на военно-медицинском факультете в УО «Белорусский государственный медицинский университет» и ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования».

Опубликованность результатов диссертации

По теме диссертации опубликовано 8 статей в рецензируемых научных журналах, включенных в перечень ВАК Республики Беларусь (4,4 авторских листа), 1 статья в рецензируемом сборнике, 6 работ в материалах съездов, конгрессов, конференций, 4 тезиса докладов. Получено 2 патента Республики Беларусь на изобретения и полезные модели, 2 уведомления о положительном результате предварительной экспертизы по заявке на выдачу патента, разработана и утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь 1 инструкция по применению.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 121 странице, состоит из введения, общей характеристики работы, 5 глав, заключения, библиографического списка (19 страниц), включающего 203 наименования работ, из них 126 – на русском языке, 77 – на иностранных языках и 24 публикаций соискателя (21 на русском и 3 на английском языке), 7 приложений (14 страниц). Диссертационная работа содержит 8 таблиц (2 страницы), 31 рисунок (9 страниц) и 11 формул.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Проведение исследований по разработке и обоснованию новых методов применения аутологичных биологических медиаторов, содержащихся в ТК, является одним из направлений, обеспечивающим прогресс регенеративной медицины в комплексном лечении пациентов с венозными ТЯ [1, 3].

Материал и методы исследования

Получение ТК, клиническое применение новых методов их использования проводили с соответствии с утверждённой Министерством здравоохранения Республики Беларусь инструкцией по применению «Метод лечения трофических язв с использованием аутологичных тромбоцитарных концентратов», регистрационный номер 117-0912 от 28.09.2012.

Для получения ОТП использовали однократное центрифугирование с числом оборотов 2000 в минуту венозной крови с 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 6:1 в течение 20 минут. После центрифугирования средний слой, расположенный над эритроцитарной массой собирали в стерильную пробирку.

ОТФМ получали путем однократного центрифугирования венозной крови пациента без антикоагулянта в течение 10 минут с числом оборотов 3000 в минуту. Формирование ОТФМ происходило в виде сгустка над слоем эритроцитов.

Для получения комбинированного тромбоцитарно-фибринового комплекса (КТФК) с фрагментами аутокожи проводили центрифугирование в течение 10 минут с числом оборотов 3000 в минуту венозной крови с 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 6:1. Верхний слой из всех пробирок собирали шприцем и переносили в отдельную емкость, куда помещали предварительно забранные фрагменты аутокожи толщиной 0,4-0,6 мм и 10% раствор хлористого кальция из расчета 4 капли на 1 мл плазмы. В течение 5 минут смесь превращалась в гель.

В экспериментальной части исследования *in vitro* проведено определение количества тромбоцитов и тромбоцитарных индексов в образцах периферической венозной крови (n=12) и ОТП (n=12), электронная микроскопия образцов ОТФМ (n=5), выделение, культивирование, микроскопия, мониторинг фибробластов кожи пациентов с ТЯ венозной этиологии с оценкой морфологии и жизнеспособности клеточных культур методами витальной окраски, иммуноферментный анализ количественного определения концентрации тромбоцитарного фактора роста ВВ (ТФР-ВВ), интерлейкина 10 (ИЛ-10) в образцах ОТП (n=5), плазме крови (n=5) и супернатантах (n=15) культур фибробластов кожи в различных условиях и сроках культивирования, фактора некроза опухоли α (ФНО- α) в образцах ОТП (n=5) и супернатантах культур фибробластов кожи (n=10), концентрации

коллагена I и III типов в супернатантах (n=16) первичных культур фибробластов в различных условиях культивирования с расчетом отношения коллагена I/III типа.

В клиническое исследование включены 104 пациента (46 мужчин (44,2%) и 58 женщин (55,8%)) с ТЯ НК, возникшими на фоне варикозной (87 пациентов (83,7%)) или посттромбофлебитической болезни (17 пациентов (16,3%)), проходивших плановое лечение в отделении гнойной хирургии УЗ «4-я городская клиническая больница им. Н.Е. Савченко» и в гнойном хирургическом отделении УЗ «2-я городская клиническая больница» г. Минска в период с января 2011 по сентябрь 2014 года.

В зависимости от величины площади ТЯ все пациенты были разделены на три категории: А) до 10 см² (58 пациентов (55,8%)), Б) от 10 до 20 см² (26 пациентов (25%)), и В) более 20 см² (20 пациентов (19,2%)). Методом простой рандомизации (с помощью генератора случайных чисел) в каждой категории пациенты были распределены на 2 группы – четные числа соответствовали основной группе, нечетные – группе сравнения.

У всех 104 пациентов (100%) проведено патогенетическое хирургическое лечение, направленное на устранение причины развития ТЯ. Разработанные методы стимуляции регенерации аутологичными ТК дополнительно включены в комплексное лечение 55 пациентов (52,9%) (три основные группы) с ТЯ; 49 пациентов (47,1%) вошли в состав трёх групп сравнения.

Оценка эффективности комплексного лечения проведена у всех 104 пациентов по клиническим показателям, характеризующим процессы заживления ТЯ (динамика изменения площади язвенного дефекта на 7-е, 10-е, 14-е и 21-е сутки, скорость эпителизации и время полной эпителизации язвы), критериям приживления трансплантатов (длительность периода фиксации кожных трансплантатов, полнота и площадь их приживления, количество раневых послеоперационных осложнений, время), длительности стационарного лечения. Качество жизни оценивали, используя русскоязычную версию предметно-ориентированного опросника CIVIQ-20, до начала лечения у всех 104 пациентов (100%) и через 6 месяцев после завершения лечения у 80 пациентов (76,9%).

Лечение пациентов с трофическими язвами площадью до 10 см². В основной группе (30 пациентов) дополнительно применяли сочетанное использование двух форм аутологичных ТК по разработанному методу. В группе сравнения (28 пациентов) выполняли только основной комплекс лечебных мероприятий.

Лечение пациентов с трофическими язвами площадью от 10 до 20 см². В основную группу вошли 15 пациентов, у которых пластическое закрытие ТЯ проводили по разработанному методу КТФК с фрагментами аутокожи и

параульценоарным введением аутологичной ОТП. В ходе оперативных вмешательств у пациентов основной группы для уменьшения травматизации тканей по краям ран использовали разработанный хирургический ретрактор-крючок. Группу сравнения составили 11 пациентов, которым выполняли аутодермопластику расщепленным кожным лоскутом.

Лечение пациентов с трофическими язвами площадью более 20 см². Основная группа представлена 10 пациентами, у которых для закрытия язвенного дефекта выполняли аутодермопластику расщепленным кожным лоскутом по разработанному методу с дополнительным введением аутологичной ОТП. Группу сравнения составили 10 пациентов, которым выполняли аутодермопластику ТЯ расщепленным кожным лоскутом.

Для статистической обработки полученных результатов использовали пакет прикладных программ «STATISTICA» (Version 6-Index, StatSoft Inc., лицензионный номер AXXR012E829129FA). Применяли параметрические критерии: t-критерий Стьюдента, корреляционный метод Пирсона (r), и непараметрические тесты: U тест Манна-Уитни, критерий Вилкоксона с поправкой Бонферрони, двусторонний тест точного критерия Фишера, анализ вариаций (ANOVA), метод ранговой корреляции Спирмена (ρ). Различия считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$.

Результаты собственных исследований

Организационная структура клеточного компонента ОТФМ. По данным электронной трансмиссионной микроскопии установлено, что структура ОТФМ представлена густой сетью фибриновых нитей, в толще которой располагались обширные и многочисленные скопления тромбоцитов с измененной в результате центрифугирования формой. Помимо тромбоцитов клеточный состав ОТФМ включал зернистые лейкоциты (гранулоциты) и немногочисленные эритроциты. Значительное количество клеток находилось на стадии дегрануляции и были практически лишены секреторных гранул с наличием сферических зон просветления в цитоплазме. Вместе с тем, сохранялись отдельные тромбоциты и гранулоциты, содержащие электронноплотные секреторные гранулы, что подтверждало незавершенность процесса дегрануляции и возможность продления биологических эффектов ОТФМ, связанных с различным составом клеток и их неоднородным функциональным состоянием.

Показатели тромбоцитарных индексов, концентрации ростовых факторов и противовоспалительных цитокинов в образцах венозной крови и в полученной из неё ОТП. Однократное центрифугирование исследуемых образцов крови с добавлением 3,8% раствора цитрата натрия приводило к увеличению в полученной ОТП общего количества тромбоцитов и тромбокрита до уровня $1066,1 \times 10^9 \pm 55,5 \times 10^9 / \text{л}$ и $0,37 \pm 0,02$, соответственно, который

превышал в 3,9 раза ($p < 0,001$) и в 2,3 раза ($p < 0,001$) первичные значения венозной крови. Выявленное снижение в 1,7 раза ($p < 0,001$) среднего объема тромбоцитов в ОТП по сравнению с показателями в венозной крови связано с выходом содержимого секреторных α -гранул во внеклеточное пространство. Медианные значения ширины распределения тромбоцитов по объему в исследуемых биологических субстратах были сопоставимы ($p > 0,05$). В ходе проведения корреляционного анализа не установлено взаимосвязи между уровнем тромбоцитов и значениями тромбоцитарных индексов венозной крови и аналогичными показателями полученной из неё ОТП. Установлено увеличение концентрации ТФР-ВВ в ОТП в сравнении с плазмой крови (30122 (28744÷31254) пг/мл и 425,3 (197,4÷531,5) пг/мл, соответственно, $p < 0,05$). Аналогичная тенденция отмечена в отношении накопления в ОТП ИЛ-10, содержание которого превышало уровень в плазме крови в 2,7 раза (13,9 (12,7÷16,7) пг/мл и 5,1 (3,6÷6,8) пг/мл соответственно, при $p < 0,05$).

Влияние аутологичной ОТП на пролиферативные характеристики фибробластов кожи пациентов с ТЯ. Пролиферация клеток в 10% ОТП характеризовалась формированием равномерного культурального слоя с высокой плотностью без существенных морфологических различий фибробластов, тогда как в среде с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) отмечалось отсутствие однородности с неравномерными участками гипо- и гиперконфлюэнтности. Установлен стимулирующий характер влияния аутологичной ОТП на культуру фибробластов кожи с увеличением количества клеток до $6,5 \times 10^4$ ($6,2 \times 10^4 \div 9,2 \times 10^4$) на 1 см^2 при добавлении в среду 10% ОТП, что превышало в 1,9 раза уровень среды с ЭТС и в 3,3 раза содержание клеток при первичном посеве ($p < 0,05$).

Морфологические свойства и жизнеспособность фибробластов кожи пациентов с ТЯ, инкорпорированных в аутологичный ОТФМ. В первые сутки культивирования в ОТФМ фибробласты равномерно распределялись по всему объему матрикса. В дальнейшем отмечено формирование в толще ОТФМ густой сети, представленной отростками фибробластов, фибриновыми и коллагеновыми волокнами. Длительное нахождение фибробластов в ОТФМ не приводило к снижению концентрации жизнеспособных клеток, которая на 7-е сутки культивирования составляла 94,2% (93,4÷96,8)%, что сопоставимо ($p > 0,05$) с исходным уровнем (96,5% (95,9÷98,4)%).

Влияние аутологичной ОТП на уровень цитокинов в культуре фибробластов кожи пациентов с ТЯ. Количественное определение концентрации ТФР-ВВ в культуре фибробластов кожи пациентов с трофическими язвами венозной этиологии в среде с 10% аутологичной ОТП позволило выявить прогрессирующее снижение содержания основного ростового фактора вплоть до его следовых значений к 6 суткам наблюдения

($p=0,0067$) со значимым уменьшением в 2,6 раза его концентрации на 3 сутки культивирования фибробластов с 3012,2 (2874,4÷3125,4) пг/мл до 1198,4 (1023,8÷2874,4) пг/мл ($p<0,05$). Пассирование фибробластов кожи в среде с ЭТС не сопровождалось ($p>0,05$) ростом концентрации ФНО- α (2,7 (2,3÷4,4) пг/мл) в сравнении с содержанием цитокина в ОТП (2,8 (1,8÷3,1) пг/мл). При культивировании фибробластов кожи в 10% аутологичной ОТП уровень ФНО- α в супернатантах возрастал до 6,3 (6,2÷8,8) пг/мл, при этом в 2,3 раза ($p<0,05$) превышая его значение как в ОТП, так и при нахождении клеток в среде контроля. Установленные закономерности указывали на стимулирующее влияние, оказываемое ОТП на синтетическую функцию клеток.

Особенности влияния аутологичной ОТП на синтез коллагена I и III типа фибробластами кожи пациентов с ТЯ. Установлено увеличение в 3 раза содержания коллагена I типа при нахождении клеточных культур в среде, содержащей ОТП, в сравнении с использованием ЭТС (3,38 (2,33÷5,65) пг/мл и 10,3 (8,1÷50,94) пг/мл соответственно, $p<0,05$). Кроме того, отмечен выраженный рост (в 7,7 раза) уровня концентрации коллагена III типа с 3,76 (1,45÷11,95) пг/мл при культивировании в стандартной среде до 29,3 (14,45÷57,6) пг/мл в среде с ОТП ($p<0,05$). Выявленные изменения являлись подтверждением сохраняющейся восприимчивости клеток к активирующему действию биологических медиаторов. Сохраняющееся без статистически значимых изменений ($p>0,05$) отношение коллагена I/III типа 0,74 (0,36÷1,95) – среда с ЭТС и 0,49 (0,29÷1,1) – среда с ОТП, указывало на отсутствие влияния комплекса аутологичных ростовых факторов на структуру и состав вновь образованной соединительной ткани.

Клиническое использование разработанного метода применения аутологичной ОТП и ОТФМ в лечении пациентов с ТЯ площадью до 10 см². С целью стимуляции регенерации ТЯ разработан метод сочетанного использование двух форм аутологичных ТК в виде аппликационного нанесения ОТФМ и инъекционного (локального) введения ОТП в объеме 0,2 мл на одну инъекцию в четырёх точках по периметру язвенного дефекта. В дальнейшем процедуру повторяли трехкратно с интервалом в 3-е суток.

Клиническое использование аутологичных ТК, полученных из венозной крови, позволило в 3 раза относительно группы сравнения (0,03 (0,02÷0,04) см²/сут) увеличить ($p<0,05$) скорость эпителизации ТЯ до 0,09 (0,04÷0,16) см²/сут (рисунок 1). В месте с тем, лишь к 21-м суткам наблюдения сформировались статистически значимые различия по площади язвенной поверхности у пациентов основной группы с уменьшением на 46,7% от исходного значения и на 35,1% по отношению к значению группы сравнения к этому времени ($p<0,05$).

Продолжительность стационарного лечения в обеих группах была сопоставима и составила 7 (5÷11) и 7,5 (5÷21) суток ($p>0,05$) соответственно. Время наступления полного заживления язв в основной группе оказалось меньше ($p<0,05$) на 10 суток, относительно группы сравнения (64,0 (58÷70,5) и 54,0 (41,0÷65,0) суток, соответственно).

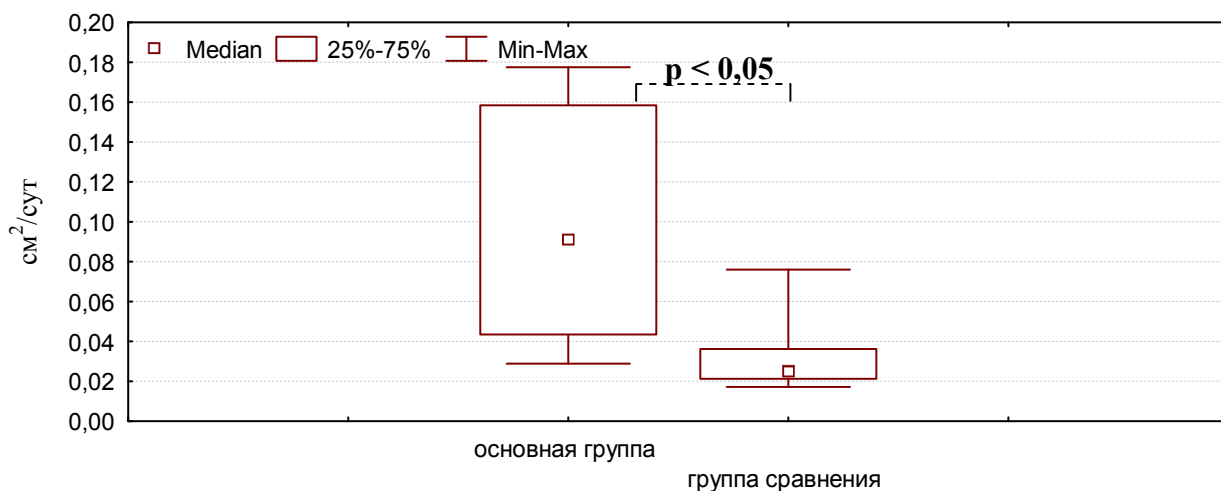


Рисунок 1. - Скорость эпителизации трофической язвы у пациентов основной группы и группы сравнения

Включение в состав комплексной программы лечения ТЯ локального применения ТК, привело к улучшению ($p<0,05$) качества жизни пациентов в сравнении с исходным уровнем и относительно группы сравнения по общей оценке опросника CIVIQ-20. В основной группе отмечены статистически значимые в сравнении с уровнем при поступлении в стационар ($p<0,05$) изменения значений болевого показателя на 1 балл, физического на 2,5 балла, психологического на 9 баллов и социального на 2 балла. Улучшение психологического состояния и социальной адаптации у пациентов основной группы подтверждено достоверным характером изменений значений компонентов опросника CIVIQ относительно группы сравнения на 6 баллов и на 1 балл соответственно (при $p<0,05$).

Клиническое использование разработанного метода применения аутологичной ОТП и КТФК с фрагментами аутокожи в лечении пациентов с ТЯ площадью от 10 до 20 см². Разработан альтернативный аутодермопластике метод, отличающийся закрытием ТЯ КТФК с фрагментами аутокожи с инъекционным параульцерарным введением аутологичной ОТП в объеме 0,2 мл на одну инъекцию с расстоянием до 1 см между местами укола с повтором процедуры трехкратно с интервалом через 3-е суток.

У всех пациентов основной группы применение КТФК с фрагментами аутокожи и ОТП осуществляли одновременно в ходе выполнения патогенетического оперативного вмешательства, тогда как в сравниваемой

группе в лечении использовался этапный подход и аутодермопластику выполняли спустя 12 (10÷16) суток как самостоятельную операцию. В целом, время, затраченное на оперативное вмешательство в основной группе, составило 70 (50÷90) минут, что на 20 минут меньше ($p < 0,05$) суммарной продолжительности операций у пациентов группы сравнения (90 (90÷105) минут). Использование в ходе оперативных вмешательств у пациентов основной группы разработанного хирургического ретрактора-крючка позволило избежать возникновения местных раневых осложнений в послеоперационном периоде (2 случая (18,2%) краевого некроза кожи послеоперационных ран в сравниваемой группе), минимизировать травматизацию кожи по краям разреза с возможностью забора необходимого количества кожных фрагментов ткани для формирования КТФК. Клиническое использование оригинального метода закрытия язвенного дефекта привело к более ранней (на 1 сутки) фиксации КТФК с фрагментами аутокожи относительно группы сравнения при фиксации аутодермального лоскута (3,0 (3,0÷4,0) суток и 4,0 (4,0÷5,0) суток соответственно, $p < 0,05$). Полное приживление трансплантатов отмечено в обеих группах за исключением 2 пациентов группы сравнения (2 из 11 пациентов (18,2%)), у которых отмечен краевой лизис лоскута. Стимулирующее влияние аутологичных ТК привело к уменьшению на 4 суток ($p < 0,05$) длительности периода полной эпителизации раны, которая составила у пациентов основной группы 10,0 (8,0÷11,0) суток, тогда как в группе сравнения его продолжительность было равна 14,0 (12,0÷15,0) суткам (рисунок 2).

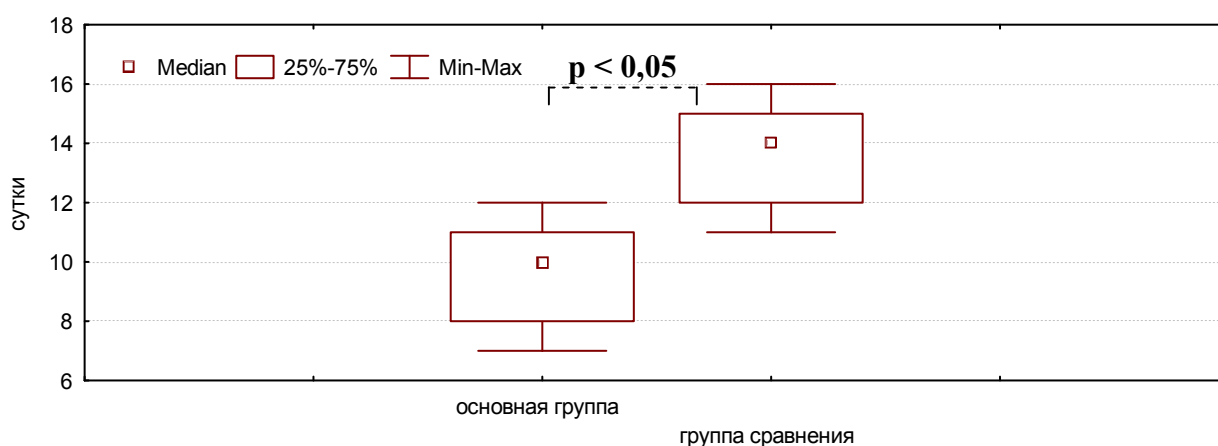


Рисунок 2. – Длительность полного заживления (эпителизации) трофической язвы у пациентов основной группы и группы сравнения

Отсутствие местных осложнений, а также более ранняя фиксация и полное приживление КТФК у пациентов основной группы позволило сократить длительность стационарного лечения после операции по закрытию язвенного

дефекта на 5 койко-дней по отношению к показателям группы сравнения (11 (10÷13) койко-дней и 16 (14÷41) койко-дней соответственно, $p < 0,05$). Применение закрытия ТЯ по разработанному методу характеризовалось сочетанным улучшением по всем компонентам опросника CIVIQ-20 ($p < 0,05$): болевого на 4 балла, физического на 3 балла, психологического на 9 баллов и социального на 3 балла. Кроме того, уровень качества жизни у пациентов основной группы оказался достоверно выше, чем в сравниваемой группе как по общей оценке на 5,3 балла ($p < 0,05$), так и по болевому (на 2 балла), физическому (на 1 балл) и социальному (на 2 балла) показателю (при $p < 0,05$).

Клиническое использование разработанного метода свободной кожной пластики в лечении пациентов с ТЯ площадью более 20 см². Для повышения эффективности свободной кожной пластики разработан метод закрытия ТЯ расщепленным кожным лоскутом с дополнительным введение аутологичной ОТП в объеме 0,2 мл на одну инъекцию в участках перфораций трансплантата и по периметру закрываемой раневой поверхности. Повторные инъекции ОТП проводили трехкратно с интервалом в 3-е суток.

Локальное инъекционное введение аутологичной ОТП в область выполнения аутодермопластики позволило снизить ($p < 0,05$) длительность периода фиксации кожного лоскута на 1 сутки с 6,0 (5,0÷6,0) в группе сравнения до 5,0 (4,0÷5,0) в основной группе. У пациентов основной группы полное приживление аутодермального лоскута отмечено ($p < 0,05$) во всех случаях (100%), тогда как в группе сравнения приживление трансплантата на площади более 90% установлено только у 1 пациента (10%). Процент площади прижившегося аутодермального лоскута у пациентов с использованием ОТП был на 13,3 % больше ($p < 0,05$), чем в случаях с изолированной пластикой ($91,5 \pm 3,8$ % и $78,2 \pm 6,5$ % соответственно) (рисунок 3).

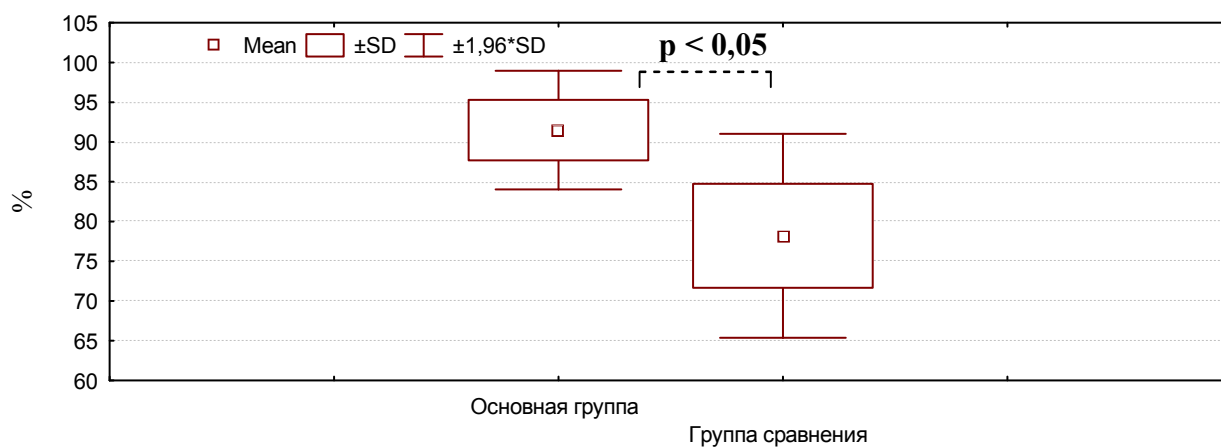


Рисунок 3. - Процент площади прижившегося аутодермального лоскута у пациентов основной группы и группы сравнения

Использование ОТП привело к более ранней эпителизации ТЯ и позволило сократить в 1,4 раза ($p < 0,05$) время, необходимое для полного заживления раны ($28,9 \pm 7,8$ суток в основной группе и $40,8 \pm 8,1$ суток в группе сравнения). Медицинская эффективность применения сочетанного использования аутодермопластики и ОТП подтверждена сокращением ($p < 0,05$) продолжительности стационарного лечения после операции по закрытию язвенного дефекта в основной группе на 6,7 койко-дней по отношению к показателям группы сравнения ($14,9 \pm 4,1$ койко-дней и $21,6 \pm 7,5$ койко-дней соответственно). Значительное улучшение качества жизни установлено у пациентов основной группы по сравнению как с первичными показателями своей группы ($p < 0,05$), так и соответствующими значениями группы сравнения ($p < 0,05$). Кроме того, в оценке качества жизни у пациентов основной группы установлено повышение ($p < 0,05$) психологического показателя на 68,9%, болевого на 51,9%, физического на 50%, социального на 52% и общей оценки на 58,1% от уровня при поступлении в стационар.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Однократное центрифугирование венозной крови приводит к формированию обогащенного тромбоцитами фибринового матрикса, структура которого представлена густой сетью фибриновых нитей с включением гетерогенного по составу клеточного компонента, состоящего из тромбоцитов, гранулярных лейкоцитов и единичных эритроцитов. Пролонгацию действия и спектр биологических эффектов обогащенного тромбоцитами фибринового матрикса определяет различное функциональное состояние тромбоцитов и гранулярных лейкоцитов, большая часть из которых находится на стадии дегрануляции с наличием сферических зон просветления в вакуолизированной цитоплазме. Незавершенность процессов дегрануляции и активации с возможностью постепенного высвобождения биологических факторов роста и медиаторов подтверждает наличие в отдельных клетках электронноплотных секреторных гранул. Технология однократного центрифугирования венозной крови с добавлением 3,8% раствора цитрата натрия позволяет получать обогащенную тромбоцитами плазму из образцов венозной крови с содержанием в ней тромбоцитов в пределах значений физиологической нормы для взрослых, независимо от изначального количества тромбоцитов, уровня тромбоцитарных индексов и тромбокриты. Получаемая обогащенная тромбоцитами плазма характеризуется повышенным ($p < 0,001$) в 3,9 раза уровнем тромбоцитов и в 2,3 раза величиной тромбокриты по сравнению с венозной кровью. Дополнительным подтверждением происходящих процессов дегрануляции тромбоцитов в обогащенной тромбоцитами плазме является снижение

($p < 0,001$) в 1,7 раза величины среднего объема тромбоцитов по сравнению с показателями венозной крови с отсутствием изменений значений ширины распределение тромбоцитов по объему. Основу биологических эффектов обогащенной тромбоцитами плазмы с активацией пролиферации фибробластов, стимулированием синтеза коллагена и противовоспалительным действием определяет увеличение ($p < 0,001$) по сравнению с плазмой крови концентрации тромбоцитарного фактора роста ВВ и интерлейкина 10 [8].

2. В условиях эксперимента *in vitro* на модели культур фибробластов кожи пациентов с трофическими язвами венозной этиологии обоснована целесообразность применения аутологичных тромбоцитарных концентратов для стимуляции регенеративных процессов. Установлено, что аутологичная обогащенная тромбоцитами плазма в культуральной среде стимулирует пролиферацию фибробластов кожи с увеличением ($p < 0,05$) количества клеток по сравнению со средой контроля в 1,9 раза и содержанием при первичном посеве в 3,3 раза, без изменения морфологических особенностей. Длительное нахождение фибробластов кожи пациентов с трофическими язвами венозной этиологии в аутологичном обогащенном тромбоцитами фибриновом матриксе не приводит ($p > 0,05$) к снижению уровня жизнеспособности клеток, достигающего 94,2% (93,4÷96,8)%. Аутологичная обогащенная тромбоцитами плазма ускоряет наступление фазы регенерации, активировывает пролиферацию клеток фибропластического дифферона и продукцию компонентов внеклеточного матрикса, вызывая повышение функциональной активности фибробластов кожи с ростом ($p < 0,05$) концентрации фактора некроза опухоли α . Культивирование фибробластов кожи в аутологичной обогащенной тромбоцитами плазме сопровождается снижением ($p < 0,05$) концентрации тромбоцитарного фактора роста ВВ вплоть до следовых значений к 6-ым суткам, что является обоснованием для её повторного введения при локальном лечении трофической язвы для продления стимулирующего влияния на регенерацию тканей [2].

Выявлено сохранение восприимчивости фибробластов кожи пациентов с трофическими язвами венозной этиологии к стимулирующему действию биологических ростовых факторов, содержащихся в аутологичной обогащенной тромбоцитами плазме, с активацией ($p < 0,05$) продукции коллагенов I и III типа и синтезом соединительной ткани без изменения её структуры и состава [6].

3. Разработаны и внедрены в клиническую практику 3 новых метода стимуляции регенерации трофических язв венозной этиологии в зависимости от величины площади язвенного дефекта, основанные на локальном использовании основных форм аутологичных тромбоцитарных концентратов.

Предложенный метод сочетанного применения обогащенной тромбоцитами плазмы и обогащенного тромбоцитами фибринового матрикса в лечении пациентов с трофическими язвами венозной этиологии площадью до 10 см^2 позволяет повысить ($p < 0,05$) до $0,09 (0,04 \div 0,2) \text{ см}^2/\text{сут}$ скорость эпителизации дефекта кожи, значительно уменьшить ($p < 0,05$) площадь язвенного поражения в динамике, сократить ($p < 0,05$) на 10 суток время наступления полного заживления язвы [4].

Разработан метод пластического закрытия венозных трофических язв с площадью дефекта от 10 до 20 см^2 , с использованием комбинированного тромбоцитарно-фибринового комплекса с фрагментами аутокожи, позволяющий исключить необходимость нанесения дополнительной раны для забора кожного трансплантата, сократить ($p < 0,05$) на 20 минут суммарную продолжительность операций, уменьшить ($p < 0,05$) на 1 сутки период фиксации и на 4 суток продолжительность полного приживления трансплантата к раневой поверхности, избежать развития местных послеоперационных осложнений. Использование в ходе выполнения комбинированной флебэктомии и субфасциальной венодиссекции перфорантных вен разработанного хирургического ретрактора-крючка уменьшает травматизацию кожи по краям разреза и создает условия для осуществления забора жизнеспособных фрагментов кожи для формирования комбинированного тромбоцитарно-фибринового комплекса [5].

Разработанный метод выполнения свободной кожной пластики для лечения пациентов с трофическими язвами венозной этиологии площадью дефекта более 20 см^2 обладает преимуществами клинического применения в сравнении с использованием классической методики расщепленного кожного лоскута, что позволило снизить ($p < 0,05$) на 1 сутки длительность периода фиксации кожного лоскута, добиться у всех пациентов полного приживления аутодермального лоскута и увеличения ($p < 0,05$) площади приживления на 13,3%, снизить ($p < 0,05$) в 1,4 раза длительности эпителизации хронической язвы после аутодермопластики [7].

4. Клиническое внедрение новых методов стимуляции регенерации поврежденных тканей с помощью аутологичных тромбоцитарных концентратов позволяет повысить эффективность комплексного лечения пациентов с трофическими язвами венозной этиологии, сократить ($p < 0,05$) продолжительность стационарного лечения на 5-6,7 койко-дней (по сравнению с аутодермопластикой расщепленным кожным лоскутом), добиться положительного социального эффекта - повысить ($p < 0,05$) качество жизни пациентов по всем показателям предметно-ориентированного опросника CIVIQ-20 в отдаленном периоде после операции. Новые методы основаны на простых по выполнению и доступных по использованию технологиях, не

требуют существенных материальных затрат и длительного периода освоения [4, 5, 7].

Разработанные методы пластического закрытия венозных трофических язв с площадью дефекта более 10 см² являются рациональной альтернативой классической аутодермопластике [5, 7].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Эффективным методом стимуляции регенерации у пациентов с трофическими язвами венозной этиологии площадью до 10 см² является локальное инъекционное введение аутологичных образцов обогащенной тромбоцитами плазмы совместно с аппликационным нанесением обогащенного тромбоцитами фибринового матрикса по разработанной схеме [20, 24].

2. Пластическое закрытие венозной трофической язвы площадью от 10 до 20 см² целесообразно проводить комбинированным тромбоцитарно-фибриновым комплексом с фрагментами аутокожи в сочетании с инъекционным введением аутологичной обогащенной тромбоцитами плазмы по периметру язвы в соответствии с разработанным методом [20, 23].

3. Свободную кожную пластику у пациентов с трофическими язвами венозной этиологии площадью более 20 см² выполняемую с использованием расщепленного кожного лоскута следует дополнять инъекционным введением аутологичной обогащенной тромбоцитами плазмы по разработанному методу [20, 22].

4. Для снижения риска возникновения интраоперационных осложнений и уменьшения травматизации кожи по краям разреза при выполнении комбинированной флебэктомии рекомендуется использование разработанного хирургического ретрактора-крючка [20, 21].

5. Необходимым условием для эффективного применения аутологичных тромбоцитарных концентратов в комплексном лечении патентов с трофическими венозными язвами, является обязательное предварительное выполнение радикального патогенетического хирургического лечения, направленного на устранение причины развития язвы [20].

Список публикаций соискателя ученой степени

Статьи в научных журналах

1. Толстов, Д. А. Стимуляция репаративных процессов в комплексном лечении трофических язв венозной этиологии / Д. А. Толстов, В. Г. Богдан // Военная медицина. – 2012. – № 2. – С. 34–38.
2. Биологические эффекты тромбоцитарных концентратов в культуре фибробластов кожи человека / В. Г. Богдан, Д. А. Толстов, С. С. Багатка, М. М. Зафранская // Медицинский журнал. – 2012. – № 2. – С. 22–25.
3. Толстов, Д. А. Тромбоцитарные концентраты: классификация, технологии получения, биологические эффекты / Д. А. Толстов, В. Г. Богдан // Военная медицина. – 2012. – № 3. – С. 141–144.
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. Толстов, Д. А. Комбинированный тромбоцитарно-фибриновый комплекс и обогащенная тромбоцитами плазма в комплексном лечении трофических язв венозной этиологии / Д. А. Толстов, В. Г. Богдан // Хирургия. Восточная Европа. – 2014. – № 3. – С. 45–56.
6. Богдан, В. Г. Оценка стимулирующего влияния обогащенной тромбоцитами плазмы в экспериментальной модели культур фибробластов пациентов с трофическими язвами венозной этиологии / В. Г. Богдан, Д. А. Толстов, М. М. Зафранская // Медицинские новости. – 2014. – № 9. – С. 87–89.
7. Богдан, В. Г. Клиническая эффективность аутодермопластики с использованием обогащенной тромбоцитами аутоплазмы при пластическом закрытии трофических язв венозной этиологии больших размеров / В. Г. Богдан, Д. А. Толстов // Военная медицина. – 2015. – № 2. – С. 65–69.
8. Тромбоцитарные концентраты: особенности биологических характеристик и структуры / В. Г. Богдан, Д. А. Толстов, М. М. Зафранская, Т. М. Студеникина, И. А. Мельников, С. А. Новаковская // Военная медицина. – 2015. – № 2. – С. 17–20.

Статьи в рецензируемых сборниках

9. Толстов, Д. А. Обогащенная тромбоцитами плазма в лечении трофических язв венозной этиологии / Д. А. Толстов, В. Г. Богдан, Ю. В. Кузьмин // Актуальные проблемы хирургии : сб. статей республ. научн.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 50-летию 1-й кафедры

хирургических болезней, Гродно, 30 ноября 2012 г. / ГрГМУ ; отв. ред. Н. И. Батвинков. – Гродно:, 2012. – С. 251–253.

Материалы съездов, конгрессов, конференций

10. Богдан, В. Г. Собственный опыт применения аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, в комплексном лечении трофических язв при варикозной болезни нижних конечностей / В. Г. Богдан, Д. А. Толстов, Ю. В. Кузьмин // Материалы IX науч.-практ. конф. ассоциации флебологов России с междунар. участ., Москва, 18-19 мая 2012 г. – [Опубл. в журн.] : Флебология. – 2012. - № 2. – С. 96.

11. Богдан, В. Г. Применение аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, в комплексном лечении трофических язв венозной этиологии / В. Г. Богдан, Д. А. Толстов, Ю. В. Кузьмин // Актуальные вопросы гнойно-септической хирургии : материалы XXVI пленума хирургов Республики Беларусь и республ. научн-практ. конф. Бобруйск, 27-28 сент. 2012 г. – [Опубл. в журн.] : Хирургия. Восточная Европа. – 2012. – № 3. – С. 154–155.

12. Богдан, В. Г. Опыт применения аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, в комплексном лечении трофических язв при варикозной болезни нижних конечностей / В. Г. Богдан, Д. А. Толстов, Ю. В. Кузьмин // Раны и раневая инфекция : материалы I междунар. конгресса, посвящ. 90-летию проф. Б. М. Костючёнка, Москва, 11-13 октября 2012 г. / редсовет В. А. Митиш [и др.] – М., 2012. – С. 51–52.

13. Влияние тромбоцитарных концентратов на фибробласты кожи человека / В. Г. Богдан, Д. А. Толстов, М. М. Зафранская, С. С. Багатка // Фундаментальные науки - медицине: материалы междунар. конф., Минск, 17 мая 2013 г. : в 2 ч. / Нац. Акад. Наук Беларуси, Ин-т физиологии ; редкол.: И. В. Залуцкий [и др.]. – Минск, 2013. – Ч. 1. – С. 94–98.

14. Толстов, Д. А. Обогащенная тромбоцитами аутоплазма в лечении трофических язв венозной этиологии / Д. А. Толстов, В. Г. Богдан, Ю. В. Кузьмин // Духовное и врачебное наследие Святителя Луки (Войно-Ясенецкого) : сб. материалов Пятой междунар. науч.-практ. конф., Купавна, 6 июня 2013 г. / Филиал № 3 ФГКУ «Главный военный клинический госпиталь им. акад. Н. Н. Бурденко МО РФ» ; под общ. ред. И. Б. Максимова, В. М. Мануйлова. – Купавна, 2013. – С. 298–299.

15. Толстов, Д. А. Эффективность клинического применения аутологичных тромбоцитарных концентратов для стимуляции регенерации трофических язв венозной этиологии / Д. А. Толстов, В. Г. Богдан // Актуальные вопросы хирургии : материалы XV съезда хирургов Республики Беларусь, Брест, 16-17 окт. 2014 г. / под ред. А. С. Карпицкого. – Брест, 2014. – С. 48–49.

Тезисы докладов

16. Bogdan, V. G. Autoplatelet concentrates in treatment of patients with trophic ulcers in chronic venous insufficiency / V. G. Bogdan, D. A. Tolstov // EWMA Journal (22nd Conference of the European Wound Management Association, Vienna, 23-25 May, 2012). – 2012. – Vol. 12, № 2 (supl.). – P. 40.

17. Толстов, Д. А. Аутоплазма, обогащенная тромбоцитами, в лечении трофических язв венозной этиологии / Д. А. Толстов, В. Г. Богдан, Ю. В. Кузьмин // Проблеми військової охорони здоров'я (Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Військова хірургія – сучасна концепція надання екстреної та високоспеціалізованої медичної допомоги», Одеса, 10-12 жовтня, 2012). – 2012. – Т. 2, № 34. – С. 306–307.

18. Biological effects of concentrate platelet-rich plasma in fibroblast's cultures / V. G. Bogdan, D. A. Tolstov, M. M. Zafranskaya, O. Stasievich // EWMA Journal (23rd Conference of the European Wound Management Association, Copenhagen, 15-17 May, 2013). – 2013. – Vol. 13, № 1 (supl.). – P. 258.

19. Functional status of fibroblasts of patients with trophic ulcers of the venous etiology / V. G. Bogdan, D. A. Tolstov, M. M. Zafranskaya, Y. V. Kuzmin, A. V. Stasievich // EWMA Journal (23rd Conference of the European Wound Management Association, Copenhagen, 15-17 May, 2013). – 2013. – Vol. 13, № 1 (supl.). – P. 258.

Инструкции по применению

20. Богдан, В. Г. Метод лечения трофических язв с использованием аутологичных тромбоцитарных концентратов : инструкция по применению : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 28.09.2012 / В. Г. Богдан, Д. А. Толстов, Ю. В. Кузьмин. – Минск : БГМУ, 2012. – 4 с.

Патенты Республики Беларусь

21. Хирургический ретрактор-крючок : полезная модель 8460 Респ. Беларусь : МПК А 61В 17/00 (2006.01), А 61В 17/06 (2006.01) / В. Г. Богдан, М. В. Шкода, А. Д. Авдиевич, Д. А. Толстов ; дата публ. : 30.08.2012.

22. Способ выполнения свободной кожной пластики : пат. 18544 Респ. Беларусь : МПК А 61В 17/00 (2006.01), А 61К 35/16 (2006.01) / В. Г. Богдан, Д. А. Толстов, Ю. В. Кузьмин ; дата публ. : 30.06.2013.

Уведомления о положительном результате предварительной экспертизы по заявке на выдачу патента Республики Беларусь

23. Способ лечения длительно незаживающей раны : заявка 20120894 Респ. Беларусь : МПК А 61В 17/00 (2006.01) / В. Г. Богдан, Д. А. Толстов, Ю. В. Кузьмин ; дата публ. : 28.02.2014.

24. Способ лечения трофической язвы : заявка 20121474 Респ. Беларусь : МПК А 61В 17/00 (2006.01) / В. Г. Богдан, Д. А. Толстов ; дата публ. : 30.06.2014.

РЭЗІЮМЭ

Талстоў Данііл Аляксандравіч

Стымуляцыя рэгенерацыі трафічных язваў вянознай этыялогіі аўталагічнымі трамбацытарнымі канцэнтратамі (эксперыментальна-клінічнае даследаванне)

Ключавыя словы: трафічныя язвы ніжніх канечнасцяў вянознай этыялогіі, аўталагічныя трамбацытарныя канцэнтраты, свабодная скураная пластыка, стымуляцыя рэгенерацыі.

Мэта працы: паляпшэнне вынікаў комплекснага лячэння пацыентаў з трафічнымі язвамі вянознай этыялогіі шляхам распрацоўкі, абгрунтавання і ўкаранення ў клінічную практыку новых метадаў стымуляцыі рэгенерацыі з дапамогай аўталагічных трамбацытарных канцэнтратаў.

Метады даследавання і апаратура: клінічны, эксперыментальны, культуральны, цыталагічны, імуналагічны, марфалагічны; электронны трансмісійны мікраскоп JEM 100CX (Японія), лабараторная цэнтрыфуга ЦР-02Л (НВА "Цэнтр", Рэспубліка Беларусь), аўтаматычны гематалагічны аналізатар MEK-6410K (Nihon Kohden, Японія), спектрафатометар «BRIO-SIRIO» (SEAC, Італія).

Атрыманыя вынікі і іх навізна: пашыраны прадстаўленне пра асаблівасці арганізацыйнай структуры клетак у асноўных формах трамбацытарных канцэнтратаў. Упершыню праведзена комплексная ацэнка *in vitro* шматфактарнага ўплыву аўталагічных трамбацытарных канцэнтратаў на культуру фібрабластаў скуры пацыентаў з трафічнымі язвамі вянознай этыялогіі з навуковым абгрунтаваннем мэтазгоднасці іх выкарыстання для актывацыі рэгенератыўных працэсаў. Распрацаваны і ўкаранены ў клінічную практыку новыя медыцынскія інструменты і метады стымуляцыі рэгенерацыі трафічных язваў вянознай этыялогіі рознымі формамі аўталагічных трамбацытарных канцэнтратаў з улікам плошчы язвавага паражэння. Даказана высокая медыцынская і сацыяльная эфектыўнасць прымянення распрацаваных метадаў рэгенерацыі з дапамогай аўталагічных трамбацытарных канцэнтратаў у комплексным лячэнні пацыентаў з трафічнымі язвамі вянознай этыялогіі.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: комплекснае лячэнне пацыентаў з трафічнымі язвамі вянознай этыялогіі ў хірургічных аддзяленнях лячэбных устаноў, навучальны працэс медыцынскіх ВНУ.

Вобласць прымянення: агульная, гнойная і сасудзістая хірургія, гематалогія.

РЕЗЮМЕ

Толстов Даниил Александрович

Стимуляция регенерации трофических язв венозной этиологии аутологичными тромбоцитарными концентратами (экспериментально-клиническое исследование)

Ключевые слова: трофические язвы нижних конечностей венозной этиологии, аутологичные тромбоцитарные концентраты, свободная кожная пластика, стимуляция регенерации.

Цель работы: улучшение результатов комплексного лечения пациентов с трофическими язвами венозной этиологии путем разработки, обоснования и внедрения в клиническую практику новых методов стимуляции регенерации с помощью аутологичных тромбоцитарных концентратов.

Методы исследования и аппаратура: клинический, экспериментальный, культуральный, цитологический, иммунологический, морфологический; электронный трансмиссионный микроскоп JEM 100CX (Япония), лабораторная центрифуга ЦР-02Л (НПО «Центр», Республика Беларусь), автоматический гематологический анализатор MEK-6410K (Nihon Kohden, Япония), спектрофотометр «BRIO-SIRIO» (SEAC, Италия).

Полученные результаты и их новизна: расширены представления об особенностях организационной структуры клеток в основных формах тромбоцитарных концентратов. Впервые проведена комплексная оценка *in vitro* многофакторного влияния аутологичных тромбоцитарных концентратов на культуру фибробластов кожи пациентов с трофическими язвами венозной этиологии с научным обоснованием целесообразности их использования для активации регенеративных процессов. Разработаны и внедрены в клиническую практику новые медицинские инструменты и методы стимуляции регенерации трофических язв венозной этиологии различными формами аутологичных тромбоцитарных концентратов с учетом площади язвенного поражения. Доказана высокая медицинская и социальная эффективность применения разработанных методов регенерации с помощью аутологичных тромбоцитарных концентратов в комплексном лечении пациентов с трофическими язвами венозной этиологии.

Рекомендации по использованию: комплексное лечение пациентов с трофическими язвами венозной этиологии в хирургических отделениях лечебных учреждений, учебный процесс медицинских ВУЗов.

Область применения: общая, гнойная и сосудистая хирургия, гематология.

SUMMARY

Tolstov Daniil Aleksandrovich **Stimulation of regeneration of venous ulcers** **with autologous platelet concentrates** **(experimental and clinical trial)**

Key-words: venous leg ulcers, autologous platelet concentrates, skin grafting, stimulation of regeneration.

Aim of the trial: improvement of patient outcomes with venous leg ulcers by development, justification and introduction new methods of stimulation of regeneration into clinical practice using autologous platelet concentrates.

Methods of trial and equipment: clinical, experimental, cultural, cytological, immunological, morphological; electron transmission microscope of JEM 100CX (Japan), TsR-02L laboratory centrifuge (NPO Center, Republic of Belarus), MEK-6410K automatic hematological analyzer (Nihon Kohden, Japan), spectrophotometer of "BRIO-SIRIO" (SEAC, Italy).

Obtained results and their novelty: new aspects of organizational structure of cells in the main forms of the platelet concentrates have been established. For the first time the evaluation of multivariate influence of autologous platelet concentrates on culture of skin fibroblasts of patients suffering from venous leg ulcers have been carried out in vitro with the aim of scientific justification of expediency of using them for activation of regenerative processes. New surgical tools and stimulation methods of regeneration using different forms of autologous platelet concentrates according to the area of venous leg ulcer have been developed and introduced into clinical practice. High medical and social efficiency of the use of the recently developed methods of regeneration with the help of autologous platelet concentrates have been proved in treatment of patients suffering from venous leg ulcers.

Recommendations for use: treatment of patients suffering from venous leg ulcers in surgical departments and clinics, educational process of medical universities.

Field of application: general, septic and vascular surgery, hematology.