

диабетической стопы в группе пациентов, пролеченных традиционным методом (группа сравнения) и в группе, где на фоне комплексной терапии применяли биопластический материал Коллост (основная группа). Применение Коллоста в основной группе способствовало быстрее появлению грануляций – в 1,3 раза, уменьшению площади раневого дефекта и появлению краевой эпителизации – в 1,3 раза, снижения сроков пребывания пациента в стационаре – в 1,4 раза.

Выводы. Лечение препаратом «Коллост» показало преимущества перед другими методиками. Простота использования, уменьшение сроков заживления ран, уменьшение числа перевязок, уменьшение площади и заживление трофических язв, сокращение сроков пребывания пациентов в стационаре, снижение повторных обращений в специализированные хирургические стационары пациентов с синдромом диабетической стопы, что в конечном итоге отражается на экономической целесообразности данной методики лечения.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ПЛАЗМЫ, ОБОГАЩЕННОЙ РАСТВОРИМЫМИ ФАКТОРАМИ ТРОМБОЦИТОВ, ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ В ОТНОШЕНИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Троянов А. А.¹, Кондратенко Г. Г.¹, Потапнев М. П.¹,
Арабей А. А.¹ Колесникова Т. С.¹, Ходосовская Е. В.¹,
Храпов И. М.², Журов С. М.²

1УО «Белорусский государственный медицинский университет»

г. Минск, Республика Беларусь

2УЗ «10-я городская клиническая больница»,

г. Минск, Республика Беларусь

Введение. В Республике Беларусь сахарным диабетом (СД) страдает около 3% населения. Число пациентов с СД за последние 15 лет удвоилось, и на начало 2017 г., по данным официальной статистики, достигло уровня 295000 человек. Для

решения проблемы длительно незаживающих раневых поражений при сахарном диабете необходим поиск новых, более эффективных методов местного лечения этой патологии. Течение раневого процесса у пациентов с СД имеет свои особенности, характеризующиеся снижением пролиферативной активности клеток и замедлением регенерации тканей. Поэтому в последние годы все более широкое распространение получает местное применение биологически активных препаратов для стимуляции процессов ранозаживления. Одним из перспективных методов биологической стимуляции регенерации является применение плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов (ПОРФТ). Среди многочисленного перечня вариантов биологической активности ПОРФТ наиболее распространенным считается их влияние на пролиферацию мезенхимальных стволовых клеток (МСК). В связи с этим целесообразно изучение *in vitro* влияния образцов ПОРФТ пациентов с СД на пролиферацию МСК человека.

Цель исследования: выявить оптимальную концентрацию и определить влияние ПОРФТ от пациентов с СД на пролиферацию МСК человека.

Материал и методы. Проведена оценка пролиферативного действия ПОРФТ, полученной от пациентов с СД и здоровых лиц (доноров крови), приготовленных отдельно. Оценку биологической активности ПОРФТ и образцов цельной плазмы проводили по их способности усиливать спонтанную пролиферацию МСК жировой ткани человека, полученных из Республиканского банка мезенхимальных стволовых клеток при РНПЦ «Трансплантации органов и тканей». Для этого в лунки 24-луночного культурального планшета («Sarstedt») вносили образцы ПОРФТ (или контрольной плазмы) в конечном разведении 1:20 или 1:40 и доводили до объема 0,9 мл в полной питательной среде (ППС), включавшей среду DMEM («Sigma»), содержащую 20% термоинактивированной фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (Bioclot), 100 мкг/мл стрептомицина и 100 ЕД/мл пенициллина, 2 мМ L-глутамина («Gibco»), гепарин («Белмедпрепараты») из расчета 10 ЕД/мл среды. МСК, 3-5 пассажей с исходной жизнеспособностью не менее 95%,

добавляли в лунки в количестве 3×10^4 клеток в объеме 0,1 мл ППС. Каждый вариант постановки культуры клеток ставили в двух повторах. Клетки культивировали в течение 72-х часов при $+37^\circ\text{C}$ в CO_2 -инкубаторе (5% CO_2 ; 99% влажности). По окончании инкубации из лунок удаляли супернатант, клеточный монослой отмывали раствором ФБР («Lonza»). Клетки ресуспендировали с помощью раствора 0,25% трипсина/0,02% ЭДТА, отмывали с помощью центрифугирования и ресуспендировали в 1 мл ППС. Микроскопический учет живых (неокрашенных в синий цвет) клеток проводили в камере Горяева при увеличении в 100 раз. Результаты экспериментов оценивали по количеству выросших МСК или как индекс стимуляции, рассчитываемый как отношение количества выросших клеток в присутствии исследуемого образца ПОРФТ или цельной плазмы (контроль плазмы) к количеству выросших клеток в культуральной среде с ЭТС (контроль клеток). Для исследования использовали 12 серий образцов ПОРФТ, каждый вариант постановки культуры клеток ставили в двух повторах ($n=96$).

Результаты и обсуждение. Поскольку белки плазмы крови сами по себе обладают способностью вызывать пролиферацию МСК *in vitro*, для выявления биологической активности образцов ПОРФТ от здоровых доноров крови и от пациентов с СД в сравнительном плане отдельно оценено их влияние на пролиферацию стволовых клеток. При этом в качестве контроля использована плазма, полученная из крови того же донора крови и отдельно от пациента с СД.

Задачей первой серии экспериментов было определение наиболее эффективной концентрации ПОРФТ для индукции пролиферации МСК. Исследованы образцы ПОРФТ 1 (из 2-кратно концентрированного КТ) и ПОРФТ 2 (из 4-кратно концентрированного КТ). Изучена пролиферация МСК в присутствии контрольной плазмы и обоих образцов ПОРФТ в конечном разведении 1:5, 1:10, 1:20, 1:40. Добавление в культуру МСК образцов ПОРФТ 2 в разведении 1:20 приводило к достоверному и наибольшему повышению количества МСК. Таким образом, было определено, что разведение 1:20 образцов ПОРФТ 2 является оптимальным для обеспечения выраженного

рост-стимулирующего действия в отношении МСК человека. Образцы ПОРФ 2 и ПОРФТ 1 в разведении 1:20 были наиболее эффективными и достоверно не отличались по способности стимулировать рост МСК *in vitro*. Поэтому для последующего использования в качестве основного образца принята ПОРФТ 1 с конечным разведением 1:20. При этом расчетная концентрация тромбоцитов при приготовлении таковых образцов ПОРФТ соответствует стандартной (около 1,0 млрд/мл). При более высоком (1:40) разведении образцов ПОРФТ 1 и ПОРФТ 2 их рост-стимулирующее влияние на МСК было существенно меньше, чем при разведении 1:20. В то же время, в образцах ПОРФТ 1 степень концентрации тромбоцитов была меньшей, что позволяло из одной дозы цельной крови приготовить больше таких образцов. Нами также оценено влияние на концентрацию МСК образцов ПОРФТ, полученных от пациентов с СД, в сравнении с и аналогичными образцами, полученными от здоровых доноров крови. Образцы ПОРФТ, приготовленные из тромбоцитов периферической крови пациентов с СД, обладают достоверным 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 ($p=0,064$).

Выводы:

1. Образцы ПОРФТ из периферической крови страдающих сахарным диабетом пациентов обладают достоверным стимулирующим действием на культивируемые *in vitro* МСК человека.

2. Образцы ПОРФТ, полученные путем 2-кратного центрифугирования тромбоцитов, в конечном разведении 1:20 являются оптимальными по пролиферативной активности в отношении МСК человека.