



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.13.3.016>
УДК 617.7-002-085.382-092.0



Семак Г.Р.¹, Сментина А.В.², Потапнев М.П.³, Рындова Д.В.⁴ ✉, Павлов К.И.¹

¹ Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

² 432 ордена Красной Звезды главный военный клинический медицинский центр Вооруженных Сил Республики Беларусь, Минск, Беларусь

³ Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Минск, Беларусь

⁴ 11-я городская клиническая больница, Минск, Беларусь

Экспериментальные доказательства эффективности плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов, при лечении воспалительных заболеваний глаз

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования – Г.Р. Семак, М.П. Потапнев, К.И. Павлов; сбор материала, редактирование – Г.Р. Семак, А.В. Сментина, Д.В. Рындова, М.П. Потапнев; обработка, написание текста – Г.Р. Семак, А.В. Сментина, Д.В. Рындова.

Подана: 21.08.2023

Принята: 28.08.2023

Контакты: dasharyndova@bk.ru

Резюме

Введение. Анатомически роговичный и конъюнктивальный эпителии глаза представляют собой непрерывный монослой и разделены зоной лимба. Эта зона обогащена лимбальными стволовыми клетками, обеспечивающими регенерацию роговичного эпителия. К настоящему времени появились способы ускорения процессов репарации тканей глазной поверхности за счет применения аутологичных препаратов крови, содержащих факторы роста.

Цель. Установить влияние плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов / platelet-rich plasma (ПОРФТ/PRP), на мезенхимальные стволовые/стромальные клетки (МСК) *in vitro* и на процессы восстановления роговицы у кроликов при экспериментально индуцированном кератите.

Материалы и методы. Эксперименты *in vitro* проводили с МСК костного мозга человека. МСК культивировали в среде DMEM с 10,0% фетальной бычьей сывороткой и антибиотиками в течение 72 часов при +37 °С в атмосфере воздуха с 5% CO₂ в присутствии или отсутствии ПОРФТ/PRP. По окончании инкубации культуры клеток оценивали микроскопически, жизнеспособность оценивали окрашиванием с 0,2% трипановым синим. Эксперименты на кроликах включали травматически-инфекционное моделирование кератита, которое оценивалось по диаметру язвенного дефекта роговицы, а также в балльных критериях по гнойному отделяемому из глаз, отеку конъюнктивы, степени гиперемии конъюнктивы при различных условиях терапии, включавшей антибиотики, кортикостероиды, ПОРФТ/PRP.

Результаты. В культуре МСК *in vitro* внесение ПОРФТ/PRP не оказывало токсического действия на клетки, вызывало усиление их пролиферативной активности по

сравнению с контролем. Применение ПОРФТ/PRP в комплексном лечении кератита у кроликов в эксперименте способствовало сокращению времени восстановления прозрачности роговицы и воспаления по сравнению с контрольной группой и группой со стандартным лечением.

Заключение. Эксперименты *in vitro* подтвердили витальное и рост-стимулирующее действие ПОРФТ/PRP на МСК человека. В эксперименте на кроликах показаны противовоспалительный, ремодулирующий, регенеративный эффекты ПОРФТ/PRP при раннем включении в комплексное лечение кератита (кератоконъюнктивита).

Ключевые слова: плазма, обогащенная растворимыми факторами тромбоцитов, мезенхимальные стволовые/стромальные клетки человека, кератоконъюнктивит кроликов

Semak G.¹, Smiantsina A.², Potapnev M.³, Ryndova D.⁴ ✉, Pavlov K.¹

¹ Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

² 432 Order of the Red Star Main Military Clinical Medical Center of the Armed Forces of the Republic of Belarus, Minsk, Belarus

³ Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies, Minsk, Belarus

⁴ City Clinical Hospital №11, Minsk, Belarus

Experimental Justification the Effectiveness of Platelet-Rich Plasma for Treatment of Inflammatory Eye Diseases

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: concept and design of the study – G. Semak, M. Potapnev, K. Pavlov; collection of material, editing – G. Semak, A. Smiantsina, D. Ryndova, M. Potapnev; processing, writing the text – G. Semak, A. Smiantsina, D. Ryndova.

Submitted: 21.08.2023

Accepted: 28.08.2023

Contacts: dasharyndova@bk.ru

Abstract

Introduction. Anatomically, the corneal and conjunctival epithelium of the eye are a continuous monolayer and are separated by a limbus zone. This zone is enriched with limbal stem cells that provide regeneration of the corneal epithelium. To date, there have been elaborated approaches to accelerate the processes of repair of ocular surface tissues by the use of autologous blood preparations containing growth factors.

Purpose. To determine the effects of plasma enriched with soluble platelet factors/platelet-rich plasma (PORFT/PRP) on mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) *in vitro* and on cornea repair in rabbits with experimentally induced keratitis.

Materials and methods. *In vitro* experiments were conducted with human bone marrow-derived MSCs. MSCs were cultured in DMEM medium with 10.0% fetal bovine serum and antibiotics for 72 hours at +37 °C in the air atmosphere with 5% CO₂ in the presence or absence of PORFT/PRP. At the end of incubation, cell cultures were evaluated



microscopically, cell viability was assessed by staining with 0.2% trypan blue. Experiments with rabbits included traumatic-infectious modeling of keratitis, which was evaluated by the calculation of diameter the corneal ulcerative defect, as well as in the scoring criteria for purulent discharge from the eyes, conjunctival edema, degree of conjunctival hyperemia under various conditions of therapy, including antibiotics, corticosteroids, PORFT/PRP.

Results. In the culture of MSCs in vitro the presence of PORFT/PRP did not reveal toxic effects on the cells, but induced increase in their proliferative activity compared with the control. The use of PORFT/PRP in the complex treatment of experimental keratitis in rabbits contributed to a reduction in the recovery time of corneal transparency and inflammation when compared to the control group and the group with standard treatment.

Conclusion. In vitro experiments have confirmed a vital and growth-stimulating effect of PORFT/PRP on human MSCs. In the experiments with rabbits, the anti-inflammatory, remodulatory, regenerative effects of PORFT/PRP were shown while early inclusion in the complex treatment of keratitis (keratoconjunctivitis).

Keywords: platelet-rich plasma, human mesenchymal stem/stromal cells, rabbit keratoconjunctivitis

■ ВВЕДЕНИЕ

Роговица – уникальная ткань глазного яблока, обладающая оптическими свойствами и прозрачностью. Важными характеристиками являются отсутствие кровеносных сосудов, малое количество клеток различного генеза, четкая организация коллагеновых волокон. Неороговевающий роговичный эпителий защищает строму от механических повреждений и других внешних воздействий. Анатомически роговичный и конъюнктивальный эпителии представляют собой непрерывный монослой. Они фенотипически различны, экспрессируют разные типы цитокератина (цитокератин 3 и 12 в роговице, цитокератин 13 в конъюнктиве) и разделены зоной лимба [1]. Эта зона содержит лимбальные стволовые клетки, которые находятся в специальном микроокружении (нише), обеспечивающем их активность. За счет данных стволовых клеток и происходит регенерация роговичного эпителия. Стромальная ткань в зоне лимба образует инвагинации, называемые палисадами Фогта. Строма там обильно васкуляризована и содержит отличные от стромы роговицы компоненты экстрацеллюлярного матрикса, которые играют роль в поддержании жизнедеятельности лимбальных стволовых клеток. Мезенхимальные стволовые/стромальные клетки (МСК), расположенные в глубоких слоях лимба, сходны с МСК костного мозга и отвечают за процессы самоподдержания пула эпителиальных стволовых/стромальных клеток и процессы физиологической и репаративной регенерации роговицы [2]. Клетки лимба активно участвуют в процессах регенерации, обеспечение гомеостаза осуществляется за счет стволовых клеток глазной поверхности, включая камбиальные стволовые клетки лимба [3].

В литературе описаны способы применения аутологических препаратов крови, содержащих факторы роста, для ускорения процессов регенерации тканей глаза, в том числе плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов / platelet rich plasma (ПОРФТ/PRP) [4]. Использование ПОРФТ/PRP в клинике глазных болезней пока находится на стадии изучения.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установить влияние плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов / platelet-rich plasma (ПОРФТ/PRP), на мезенхимальные стволовые/стромальные клетки (МСК) *in vitro* и на процессы восстановления роговицы у кроликов при экспериментально индуцированном кератите.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты *in vitro* проводились с МСК костного мозга человека из коллекции клеток лаборатории биологии и генетики стволовых клеток РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий Министерства здравоохранения Республики Беларусь (РНПЦ ТиМБ). Для оценки пролиферации МСК человека в лунки 24-луночного культурального планшета (Sarstedt) вносили образцы ПОРФТ/PRP (ПОРФТ аллогенной) производства РНПЦ ТиМБ в конечной 5% концентрации и доводили до объема 0,9 мл питательной среды, включавшей среду DMEM (Sigma), содержащую 10,0% термоинактивированной фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (Bioclot), 100,0 мкг/мл стрептомицина и 100,0 ЕД/мл пенициллина, 2,0 мМ L-глутамин (Gibco), гепарин (Белмедпрепараты) из расчета 10,0 ЕД/мл среды. МСК 2–3 пассажей с исходной жизнеспособностью не менее 95% добавляли в лунки в количестве 3×10^4 клеток в объеме 0,1 мл питательной среды DMEM с добавками. Каждый вариант постановки культуры клеток ставили в двух повторах. Клетки культивировали в течение 72 часов при +37 °C в CO₂-инкубаторе (5% CO₂; 95% воздуха; 99% влажности). По окончании инкубации культуры клеток оценивали микроскопически, затем из лунок удаляли супернатант, клеточный монослой отмывали раствором ФСБ (Lonza). Клетки ресуспендировали 0,25% раствором трипсина в 0,02% ЭДТА-К, отмывали центрифугированием при 900 об/мин в течение 5 минут и ресуспендировали в 1,0 мл питательной среды DMEM. Для подсчета жизнеспособных МСК 20,0 мкл взвеси клеток смешивали с 20,0 мкл 0,2% раствора трипанового синего (Sigma). Микроскопический учет живых (не окрашенных в синий цвет) клеток проводили в камере Горяева при увеличении в 40 раз. Подсчет клеток проводили параллельно два независимых исследователя.

Для проведения экспериментального исследования на животных были отобраны и пронумерованы 15 кроликов породы шиншилла (исключены кролики-альбиносы) весом от 2 до 3 кг. Проведение исследований на животных одобрено Комитетом по биомедицинской этике учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет» (протокол № 2 от 23.09.2022). Всем животным проведено первичное офтальмологическое обследование (биомикроскопия вспомогательного аппарата, роговицы, определение прозрачности сред). В качестве экспериментальной модели кератита глаз кроликов была использована методика с нарушением целостности роговицы [5]. Она позволила создать патогенетически обоснованную модель воспаления без грубой травматизации глубоких слоев роговой оболочки глаза и учитывает проникновение инфекции с передних наружных слоев роговицы. Воспроизведение воспаления роговицы проводилось на правом глазу, левый оставался интактным в качестве контроля. В условиях операционной вивария БГМУ с целью седации кроликам внутривенно вводили 1,0% тиопентал натрия 10,0 мл. Местная анестезия проводилась двукратной инстилляцией 2,0% раствора лидокаина в конъюнктивальную полость правого глаза с перерывом в 3 минуты, устанавливался



векорасширитель. В центральной области при помощи трепана производилось удаление поверхностных слоев тканей роговицы диаметром 5 мм на глубину до 1/3 толщины стромы. После этого в конъюнктивальную полость инстиллировали взвесь *S. aureus* в объеме 1 мл с концентрацией $1,0 \times 10^9$ микробных тел на $1,0 \text{ см}^3$. Наблюдение за подопытными животными проводили на 1, 3, 5-е сутки после начала лечения с помощью фоторегистрации и протоколирования клинического течения воспалительного процесса. Динамика изменений переднего отдела глаз кроликов оценивалась в баллах по гнойному отделяемому из глаз, хемозу (отеку конъюнктивы), степени гиперемии конъюнктивы [6]. Диаметр язвенного дефекта роговиц измерялся в мм после предварительной инстилляции в конъюнктивальную полость 1,0% раствора флюоресцеина.

Кролики с моделированным кератитом в зависимости от проводимого местного лечения были разделены на 3 группы:

- 1-я (контрольная) группа (3 кролика) – лечение не проводилось на протяжении всего периода наблюдения;
- 2-я группа (6 кроликов) – проводилось стандартное лечение (антибиотик/ципрофлоксацин 0,3% и кортикостероид/дексаметазон 0,1% по 1 капле 4 раза в день в правый глаз, начиная с 1-х суток после введения кроликов в эксперимент) в течение 5 суток;

Таблица 1
Критерии оценки кератита в эксперименте на кроликах
Table 1

Criteria for evaluating keratitis in rabbits

Симптомы повреждения	Характеристика выраженности симптомов	Оценка, балл
Гнойное отделяемое из глаз	Отсутствие отделяемого	0
	Минимальное количество отделяемого в углу глаза	1
	Обильное количество отделяемого увлажняет веки	2
	Обильное количество выделений увлажняет веки и окружающие ткани	3
Отек конъюнктивы	Отсутствие отека	0
	Слегка заметный отек	1
	Выраженный отек с частичным выворотом век	2
	В результате отека глаз закрыт наполовину	3
	В результате отека глаз закрыт полностью	4
Степень гиперемии конъюнктивы	Бледно-розовая, соответствующая физиологической норме	0
	Слабовыраженная гиперемия	1
	Умеренно выраженная гиперемия	2
	Выраженная гиперемия	3
Диаметр язвенного дефекта, мм	Отсутствует	0
	1	1
	2	2
	3	3
	4	4
	5	5

- 3-я группа – дополнительно к стандартному лечению (антибиотик и кортикостероид по 1 капле 4 раза в день в правый глаз, начиная с 1-х суток после введения кроликов в эксперимент) были добавлены инстилляции ПОРФТ/PRP по 1 капле 6 раз в день в течение 5 суток.
Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета статистических программ Statistica 10.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние ПОРФТ/PRP на МСК человека, культивированные in vitro

МСК, культивированные в питательной среде, характеризовались к концу культивирования высокой степенью жизнеспособности (93–97%). Внесение в культуру МСК человека ПОРФТ/PRP в конечной 5% концентрации повышало витальность клеток и увеличивало их количество в 1,26–2,65 раза ($p<0,05$) к концу культивирования в течение 3 суток. В то же время количество МСК, культивированных без ПОРФТ/PRP, в контроле оставалось прежним (табл. 2). При микроскопическом анализе морфологии растущей культуры МСК присутствие ПОРФТ/PRP не оказывало токсического действия на пролиферирующие стволовые/стромальные клетки.

Влияние ПОРФТ/PRP на течение экспериментально индуцированного кератита у кроликов

Первичный осмотр обоих глаз всех кроликов не выявил признаков патологического процесса, роговица была прозрачная. Через 1 сутки после воспроизведения модели кератита на правом глазу у кроликов всех групп наблюдались: обильное количество гнойного отделяемого из конъюнктивальной полости, которое склеивало веки; выраженный отек конъюнктивы с частичным выворотом век или закрытием глаза наполовину; умеренно-выраженная гиперемия конъюнктивы. Диаметр язвенного дефекта роговицы не изменился и составлял 5,0 мм. При этом левые глаза оставались интактными (рис. 1).

Через 1 сутки после назначенного лечения, согласно дизайну эксперимента, начали проявляться различия в клинической картине кератоконъюнктивита между группами кроликов. Проявления воспалительного процесса вспомогательного

Таблица 2
Пролиферация in vitro мезенхимальных стволовых/стромальных клеток человека в присутствии плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов
Table 2
Proliferation of human mesenchymal stem/stromal cells in vitro in the presence of platelet-rich plasma

№ экспери-мента	Количество клеток (×1000/мл)		Примечание
	Контроль	+ПОРФТ, 5% в питатель-ной среде	
1	111,75±4,50	141±4,24	Индекс стимуляции = 1,26, $p=0,0001$
2	139,5±5,2	182,25±4,5	Индекс стимуляции = 1,3, $p<0,0001$
3	35±2	93±3,83	Индекс стимуляции = 2,65, $p<0,0001$



A



B

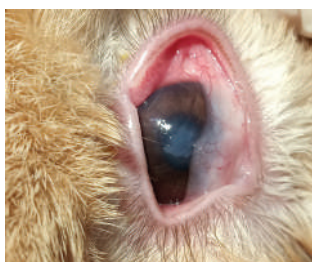


C

Рис. 1. Состояние глазной поверхности глаз кроликов первой (А), второй (В), третьей (С) групп после введения их в эксперимент
Fig. 1. The state of surface of the eyeballs of rabbits first (A), second (B), third (C) groups post their introduction into the experiment



A



B



C

Рис. 2. Состояние глазной поверхности глаз кроликов первой (А), второй (В), третьей (С) групп через 3 суток от начала лечения
Fig. 2. The state of surface of the eyeballs of rabbits first (A), second (B), third (C) groups after 3 days post their introduction into the experiment



A



B



C

Рис. 3. Состояние глазной поверхности глаз кроликов первой (А), второй (В), третьей (С) групп через 5 суток от начала лечения
Fig. 3. The state of surface of the eyeballs of rabbits first (A), second (B), third (C) groups after 5 days post starting of experimental therapy

аппарата глаз были менее выражены в группе с применением ПОРФТ/PRP. Среднее значение этого показателя составило 6,0 балла, в то время как во 2-й группе он был равен 8,2, а в 1-й – 7,7. Уже на первые сутки проводимой терапии среднее значение диаметра язвенного дефекта роговицы в 3-й группе уменьшилось на 1,0 мм и составило 4,0 мм. В то же самое время данный показатель не изменился ни в 1-й, ни во 2-й экспериментальных группах, он оставался равным 5,0 мм.

Существенные различия в течении кератита между группами кроликов были выявлены на 3-и сутки лечения. Таким образом, экспериментальная группа № 3 с применением ПОРФТ/PRP имела минимальные показатели проявления как воспалительного процесса, так и язвенного дефекта роговицы (среднее значение воспаления – 3,2 балла, диаметр язвы – 1,9 мм). Данные показатели значительно отличались от таковых у кроликов в остальных 2 группах. Так, во 2-й группе среднее значение показателя активности воспалительного процесса вспомогательного аппарата составило 5,0 балла, средний диаметр язвенного дефекта был равен 3,5 мм. Наибольшие значения исследуемых проявлений кератита были зарегистрированы в 1-й контрольной группе, в которой отсутствовало лечение. Среднее значение проявлений воспаления составило 7,7 балла, а средний диаметр язвенного дефекта роговицы был равен 3,7 мм. Кроме этого, у кроликов в 3-й и 2-й группах на 3-и сутки отсутствовало гнойное отделяемое из конъюнктивальной полости, в то время как в 1-й группе гной определялся в углу глаз (рис. 2).

Через 5 суток лечения проявления воспалительного процесса в 3-й экспериментальной группе, где дополнительно применялась ПОРФТ/PRP, были минимальные и представлены сохраняющейся, слабовыраженной, поверхностной гиперемией конъюнктивы. Среднее же значение воспаления составило 1,7 балла. Этот показатель был в 2 раза больше в группе кроликов, которым проводилась стандартная терапия (3,7 балла), и в 3 раза – в контрольной группе ($p < 0,05$). Среднее значение диаметра язвенного дефекта роговицы также было меньше в экспериментальной группе с применением ПОРФТ и составляло 0,6 мм. Данный показатель был значительно выше как во 2-й, так и в 1-й группах (2,8 мм и 2,7 мм соответственно) (рис. 3).

Таким образом, проведенные с кроликами исследования показали, что моделирование кератита с помощью мягкого травмирования и дополнительного инфицирования с использованием *S. aureus* позволяет воспроизводить патоморфологическую картину, аналогичную таковой у человека. Стандартная местная терапия с использованием антибиотиков и кортикостероидов не дает полного восстановления структуры и функции роговицы глаза в течение 5 суток. Дополнительное применение ПОРФТ/PRP оказывало терапевтический эффект.

Описаны несколько механизмов положительного влияния ПОРФТ на глазную поверхность при болезни сухого глаза (БСГ), в том числе нейротрофический эффект [7]. В наших исследованиях *in vitro* был подтвержден один из основных местных лечебных эффектов ПОРФТ/PRP – стимуляция пролиферации МСК [8]. Данный эффект проявлялся в увеличении количества культивируемых МСК в 1,26–2,65 раза.

В экспериментах на кроликах были подтверждены ремодулирующий, ранозаживляющий, противовоспалительный эффекты ПОРФТ/PRP. При применении ПОРФТ/PRP патоморфологическое состояние глаз при кератите было минимальным уже к 3–5-м суткам лечения, в то время как воспалительный процесс глаз в группах кроликов без применения активаторов регенерации оставался активным. Средние значения



показателя воспаления и диаметра язвенного дефекта роговицы более чем в 2 раза были меньше в группе с применением ПОРФТ/PRP в сравнении с контрольной группой и группой животных со стандартным лечением. Это свидетельствует об эффективности местного применения ПОРФТ/PRP при кератите и дает основание для ее дальнейшего применения в клинической практике не только при воспалительных процессах, но и для улучшения трофики тканей глаза в раннем послеоперационном периоде, в качестве предоперационной подготовки пациентов с хроническими воспалительными процессами глазной поверхности при БСГ, эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы, блефаритах.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Плазма, обогащенная растворимыми факторами тромбоцитов, не оказывает ингибирующего действия на МСК человека *in vitro*. Она не только поддерживает их жизнедеятельность, но и потенцирует при этом пролиферативную активность. Стимуляцию пролиферации МСК можно рассматривать как один из механизмов действия ПОРФТ/PRP при острых воспалительных процессах глазной поверхности. В экспериментах на кроликах с индуцированным кератитом ПОРФТ/PRP оказывала выраженное противовоспалительное, ремодулирующее и регенеративное действие, что привело к восстановлению прозрачности роговицы. Полученные экспериментальные данные обосновывают необходимость дальнейшего применения ПОРФТ/PRP в клинических условиях для лечения офтальмологических пациентов.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Dziasko M.A., Daniels J.T. Anatomical features and cell-cell interactions in the human limbal epithelial stem cell niche. *Ocul. Surf.* 2016;14(3):322–330. doi: 10.1016/j.jtos.2016.04.002.
2. Branch M.J., Hashmani K., Dhillon P., Jones D.R., Dua H.S., Hopkinson A. Mesenchymal stem cells in the human corneal limbal stroma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2012;53(9):5109–5116. doi: 10.1167/iovs.11-8673.
3. Majo F., Rochat A., Nicolas M., Jaoudé G.A., Barrandon Y. Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *Nature*. 2008;456(7219):250–254. doi: 10.1038/nature07406.
4. Semak G., Potapnev M., Zherka I., Marushko A., Smentina A., Asaevich V. Application of platelet rich plasma in the ocular surface diseases treatment. *Ophthalmology. Eastern Europe*. 2021;11(1):59–66. doi: <https://doi.org/10.34883/PI.2021.11.1.006>. (in Russian).
5. Volkovich T.K., Samsonova I.V. A method for modeling a bacterial corneal ulcer in a rabbit. Pat. BY № 16186. Publ. 30.08.2012. (in Russian).
6. Evaluation of the irritating effect of chemical compounds on the mucous membranes of the eyes of rabbits. Adj. 32 to Instruction 1.1.11-12-35-2004 «Requirements for setting up experimental studies for primary toxicological assessment and hygienic regulation of substances». Approved by the decision of Ch. State orderly doctor Rep. Belarus, 14 Dec. 2004 № 131. Available at: https://minzdrav.gov.by/upload/lfiles/text_tnpa/%D0%98%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D0%B8%D1%8F_1.1.11-12-35-2004.pdf. (in Russian).
7. Whitman D.H., Berry R.L., Green D.M. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 1997;55(11):1294–1299. doi: 10.1016/s0278-2391(97)90187-7.
8. Kapur R., Semple J.W. The nonhemostatic immune functions of platelets. *Semin. Hematol.* 2016;53 Suppl. 1:S2–S6. doi: 10.1053/j.seminhematol.2016.04.002.
9. Potapnev M.P., Krivenko S.I., Bogdan V.G., Kosmacheva S.M., Shlyaga O.L., Karpenko F.N. Platelet-rich derived plasma: manufacture and medical applications. *Healthcare*. 2018; (10):38–44. (in Russian).