

ТРОМБОЦИТАРНЫЕ КОНЦЕНТРАТЫ: КЛАССИФИКАЦИЯ, ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ, БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ

Военно-медицинский факультет

в УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Минск, Беларусь

В статье содержится обзор литературы о способах получения тромбоцитарных концентратов для местного лечения. Приводятся рабочая классификация тромбоцитарных концентратов и различия между ними. Рассматриваются точки приложения факторов роста, содержащихся в тромбоцитах, к биологическим мишеням.

Ключевые слова: *тромбоцитарные концентраты, обогащенная тромбоцитами плазма, тромбоцитарные факторы роста.*

The article reviews the literature on how to obtain platelet concentrates for local treatment. Provides working classification of platelet concentrates and the differences between them. Considered the point of application of growth factors contained in platelets to biological targets.

Key words: *trombotsitarny concentrates, platelet rich plasma, platelet growth factors.*

Использование препаратов и компонентов крови для лечения ран и стимуляции заживления началось с использования фибринового клея, который впервые описан более 40 лет назад и состоял из концентрированного фибриногена (полимеризация была достигнута при помощи тромбина и кальция [19]. В настоящее время фибриновый клей, приготовленный из плазмы человека, используется достаточно широко. Такой клей получил признание из-за низкого риска контаминации, но его применение ограничено сложностью получения и стоимостью [14]. Поэтому в последнее десятилетие для улучшения заживления в качестве замены фибриновым клеям изучается возможность использование тромбоцитарных концентратов (ТК) [25].

Тромбоцитарные концентраты в трансфузиологии используются для лечения тромбоцитопении различного происхождения. Стандартный тромбоцитарный концентрат содержит 0.5×10^{11} тромбоцитов в одной дозе [1, 9]. При этом существует расхождение в названии окончательного продукта – ряд исследователей называют его плазмой с высоким содержанием тромбоцитов или обогащенная тромбоцитами плазма, БоТП (platelet-rich plasma – PRP) [9], другие исследователи [1] под БоТП понимают только промежуточный продукт, а конечный называют концентратом тромбоцитов (КТ). В статье мы будем придерживаться термина «обогащенная тромбоцитами

плазма» как конечного продукта.

Тромбоциты содержат в высоких концентрациях ростовые факторы, такие как PDGF-AB (тромбоцитарный фактор роста AB), TGF β -1 (трансформирующий фактор роста β -1) и VEGF (фактор роста эндотелия сосудов). Эти факторы способны стимулировать клеточную пролиферацию и ангиогенез [13].

Все существующие протоколы получения БоТП содержат общие ключевые моменты (рис. 1) [9]. Кровь собирается, к ней добавляется антикоагулянт, далее выполняется двухкратное центрифугирование крови в срок, минимально приближенный ко времени забора. Время, необходимое для приготовления тромбоцитарного концентрата, может варьироваться, но всегда составляет не более часа. Центрифугирование на первом этапе выполняется для разделения крови на три слоя: эритроциты (нижний слой), бесклеточная плазма (бедная тромбоцитами плазма, PPP; верхний слой) и средний слой, в котором концентрируются тромбоциты, так называемый «buffy coat» (BC-слой). Следующий этап может быть различным, но основной целью является отделение среднего слоя от эритроцитов и бесклеточной плазмы. Финальным этапом является аппликация полученного тромбоцитарного концентрата на раневую поверхность вместе с факторами, запускающими активацию тромбоцитов и полимеризацию фибрина, такими как тромбин.

Методика получения обогащенного тромбоцитами фибрина (БоТФ, PRF) является дальнейшим совершенствованием техники приготовления тромбоцитарных концентратов [7]. В данном случае кровь собирается без антикоагулянта и немедленно однократно центрифугируется. Естественный процесс образования сгустка позволяет получить тромбоцитарный концентрат без использования антикоагулянтов и субстанций, запускающих коагуляцию. Эта методика наиболее простая и наименее дорогая. Тем не менее, возможна некоторая путаница из-за того, что разные исследователи используют схожие названия для различных конечных продуктов (например, обогащенная тромбоцитами фибриновая матрица, PRFM) [17].

Для классификации тромбоцитарных концентратов используются 3 группы параметров [9]. Первая группа связана с методикой сбора и центрифугирования крови. Она включает в себя длительность центрифугирования, стоимость оборудования, необходимого для этого, эргономичность набора для забора и центрифугирования крови, класс самой центрифуги. Эти факторы очень важны с точки зрения ежедневного рутинного использования метода. Вторая группа параметров связана с содержанием тромбоцитарного концентрата. Сюда входит определение конечного объема концентрата, количество тромбоцитов и лейкоцитов в концентрате и их сохранность. Третья группа параметров связана с качеством фибринового матрикса, который является основой при выполнении аппликации на раневую поверхность. Эта группа включает в себя концентрацию фибриногена и процесс полимеризации фибрина. В соответствии с этими параметрами конечные продукты могут быть классифицированы на четыре категории: простая БоТП (п-БоТП), обогащенная лейкоцитами БоТП (л-БоТП), простой БоТФ (п-БоТФ) и обогащенный лейкоцитами БоТФ (л-БоТФ).

Простая (безлейкоцитарная) БоТП. П-БоТП впервые была использована для местного лечения в челюстно-лицевой хирургии [25]. Возможно ее получение как в автоматическом режиме, так и в ручном [23].

В первом случае метод по сути является методом плазмофереза. При этом различные компоненты крови, такие как тромбоциты, лейкоциты и эритроциты, сначала отделяются от бесклеточной плазмы, которая затем реинфузируется пациенту. Клеточные элементы, в свою очередь, разделяются для получения максимальной концентрации тромбоцитов. Такой метод позволяет получить около 40мл п-БоТП из 450мл цельной крови. Несмотря на технологию разделения, конечный продукт всегда содержит остаточные эритроциты и лейкоциты. Кроме того, этот метод достаточно громоздкий и трудозатратный, и в ряде случаев требует помощи трансфузиолога. Для повседневного использования с точки зрения приготовления ТК для местного лечения

метод практически не пригоден.

Второй метод был описан в 1999 году для получения предшественника БоТП - плазмы, обогащенной факторами роста (plasma rich in growth factors,

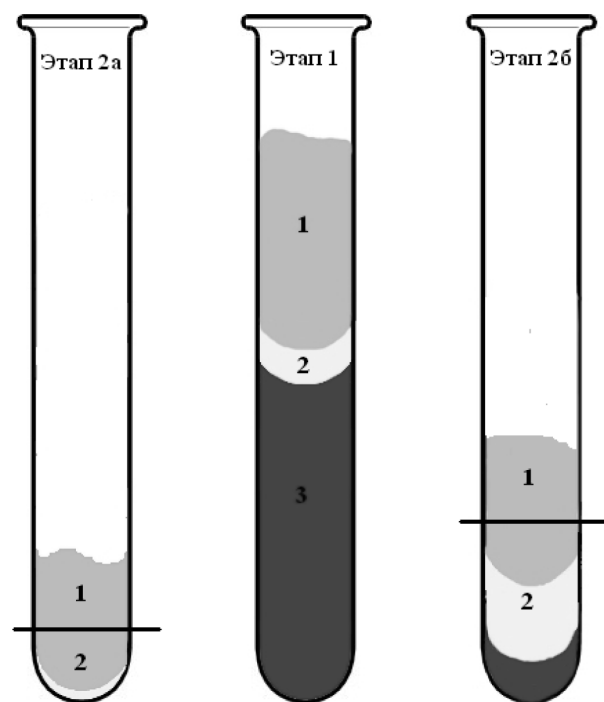


Рис. 1 — Классическая схема получения БоТП с использованием двухэтапного центрифугирования) [23].
 Этап 1: цельная кровь собирается в пробирку с антикоагулянт и центрифугируется в «мягком» режиме. При этом происходит разделение крови на три слоя: бесклеточная плазма (1), ВС-слой (2), эритроциты (3). ВС-слой обычно светлого оттенка и содержит основную часть тромбоцитов и лейкоцитов. Этап 2а: для получения простой БоТП бесклеточную плазму и поверхностно расположенную часть ВС-слоя переносят в другую пробирку. После центрифугирования этой пробирки в «жестком» режиме большая часть бесклеточной плазмы (1) удаляется. Конечный продукт (2) содержит большое количество тромбоцитов, растворенных в небольшом количестве обогащенной фибрином плазмы (п-БоТП). Большая часть лейкоцитов в этом случае в конечный продукт не попадает. Этап 2б: для получения обогащенной лейкоцитами БоТП в пробирку переносят бесклеточную плазму, ВС-слой и небольшое количество эритроцитов. После центрифугирования в «жестком» режиме бесклеточная плазма (1) удаляется. Конечный продукт (2) содержит целиком ВС-слой, в котором находятся большая часть тромбоцитов и лейкоцитов, и оставшиеся эритроциты, растворенные в небольшом количестве обогащенной фибрином плазмы (л-БоТП). Учитывая, что контроль на этапе разделения слоев осуществляется только визуальным способом, метод может привести к случайному получению как простой БоТП, так и БоТП, обогащенной лейкоцитами.

PRGF) [5]. Изначально двухэтапное центрифугирование не применялось, а метод заключался в том, что после добавления антикоагулянта и однократного центрифугирования цельная кровь делилась на три стандартных слоя. После чего верхняя часть бесклеточной плазмы называлась плазма, обедненная факторами роста (*plasma poor in growth factors*, PPGF). Она удалялась из каждой пробирки. Оставшаяся бесклеточная плазма называлась плазмой, обогащенной факторами роста (PRGF), и без ВС-слоя собиралась в отдельную пробирку под визуальным контролем. В настоящее время используется методика, описанная как этап 2а на рис.1. Метод недорогой и может применяться повседневно. Недостатком является необходимость в большом наборе компонентов (пробирок, пипеток и др.) для приготовления конечного продукта.

Обогащенная лейкоцитами БоТП. Л-БоТП так же может быть получена как в автоматическом режиме, так и в ручном.

При ручном варианте л-БоТП получают способом, указанным как этап 2б на рис. 1. В ряде исследований использовались специальные вещества для создания консистенции геля без использования прокоагулянтов, таких как тромбин [24]. Такой протокол получения л-БоТП требует значительных затрат времени и включает большую последовательность действий. Кроме того, объем конечного продукта получается небольшим. Также негативным моментом является значительная зависимость качества конечного продукта от действий врача: например, если ВС-слой будет отобран неполностью, содержание тромбоцитов будет невелико (будет получен п-БоТП вместо л-БоТП).

Были разработаны автоматические системы получения л-БоТП [24]. В таких системах после разделения крови на три слоя центрифугированием, при помощи повышенного давления происходит отделение поверхностного слоя (бесклеточной плазмы и ВС-слоя), затем отделенный слой центрифугируется повторно. В дальнейшем из этого слоя отделяется бесклеточная плазма. Конечный продукт насыщен тромбоцитами и лейкоцитами. Говорить о доступности такой системы для повседневного применения не приходится.

Простой (безлейкоцитарный) БоТФ. Существует только один протокол получения такого концентрата [17]. Необходимо две пробирки – одна для сбора крови, вторая – для образования п-БоТФ. Обычно небольшое количество крови (9мл) собирается в пробирку, которая содержит цитрат натрия и специальный гель. Пробирка центрифугируется. Получают три типичных слоя. ВС-слой и бесклеточную плазму переносят в другую пробирку с хлоридом кальция, который запускает свертывающий каскад. Пробирка немедленно центрифугируется, после чего формируется п-БоТФ. По утверждению авторов метода, таким образом формируется «естествен-

ный» ТК благодаря отсутствию бычьего тромбина. Однако такое утверждение спорно т.к. кровь изначально смешивается с антикоагулянтом и специальным гелем.

Обогащенный лейкоцитами и тромбоцитами фибрин (л-БоТФ). Такой продукт может рассматриваться как следующее поколение тромбоцитарных концентратов, т.к. метод не требует использования антикоагулянтов и желирующих веществ. Кровь собирается в стеклянную пробирку и центрифугируется. В отсутствие антикоагулянтов происходит немедленная полимеризация фибрина. При этом образуются стандартные три слоя. Отличие заключается в формировании ВС-слоя в виде сгустка. Такой сгусток легко извлекается пинцетом, и может быть уложен на рану целиком (рис. 2) или быть отжат между салфетками с образованием прочной мембраны. Метод позволяет получить большое количество л-БоТФ за небольшой промежуток времени. Стоимость метода также невысока.

По мнению многих исследователей [9] многие параметры получения БоТП, такие как количество оборотов центрифугирования и ее длительность, выбирались эмпирически и оценить их объективно в сравнении с другими не представляется возможным. Более того, не всегда можно понять, какой из ТК получался в итоге – л-БоТП или п-БоТП [12].

Первые опубликованные исследования, проведенные *in vitro*, демонстрировали способность БоТП стимулировать пролиферацию целого ряда клеток: остеобластов [8], фибробластов [15], мезенхимальных стволовых клеток костного мозга [18], хондроцитов [4] и других. В то же время, были получены и противоположные результаты [6]. Скорее всего, это связано со значительным количеством способов получения БоТП, что, в свою очередь, может приводить к различным конечным продуктам. Положительный эффект, оказываемый на дифференциров-



Рис. 2 — Обогащенный тромбоцитами фибрин, уложенный на раневую поверхность

ку клеток, так же подвергается сомнению, т.к. ряд исследований демонстрировали такое влияние на остеобласты [8], в то время как другие – показали обратный эффект [6]. Ряд клинических исследований продемонстрировал возможность уменьшения отека [11], ускорения заживления мягких тканей и усиления регенерации костной ткани под влиянием БоТП [16]. Однако схожие эффекты были получены ранее при использовании фибринового клея [14].

Основная разница между л-БоТП и п-БоТП связана с содержанием лейкоцитов и потенциальными эффектами лейкоцитов на процессы пролиферации, дифференцировки, наличием антимикробного эффекта. Однако из-за большого количества методов получения эти эффекты не подвергались системной оценке. В ряде исследований указывается на ключевую роль лейкоцитов в БоТП как в отношении антимикробной защиты, так и иммунной регуляции [8]. Последние исследования говорят, что л-БоТП может быть использована при лечении воспалительных заболеваний связочного аппарата [21].

Еще одним важным фактором является продукция лейкоцитами больших количеств VEGF, что может быть очень важным фактором влияния на ангиогенез. Но соответствующие эффекты тромбоцитов и лейкоцитов в БоТП еще окончательно не проанализированы [10].

Наиболее простым с точки зрения использования в повседневной хирургической практике является получение л-БоТФ. Однако данный вариант тромбоцитарного концентрата может быть использован только для аппликации и воздействия на поверхностные слои раны или язвы. Существует необходимость изучения возможности инъекционного введения тромбоцитарного концентрата с целью воздействия на более глубокие ткани. Еще одним нерешенным вопросом остается возможность использования тромбоцитарных концентратов для лечения язвенных дефектов больших размеров. Простая аппликация БоТФ на язву не приведет к ускорению эпителизации из-за отсутствия субстрата, на который могут влиять выделяющиеся из тромбоцитов факторы роста.

Таким образом, существует несколько видов тромбоцитарных концентратов для местного хирургического лечения. Одно влияние этих препаратов на заживление мягких тканей до конца не изучено и требует дополнительного анализа.

Литература

1. Клиническая трансфузиология / А. Г. Румянцев [и др.]. – М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 1997.
2. 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.
3. Толстов, Д. А. Биологические эффекты тромбоцитарных концентратов в культуре фибробластов кожи человека / В.Г. Богдан, М.М. Зафранская, Д.А. Толстов, С.С. Багатка // Медицинский журнал. – 2012. -№2. – С.22-25.
4. Akeda, K. et al. (2006) Platelet-rich plasma stimulates porcine

articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis. *Osteoarthritis Cartilage* 14, 1272–1280

5. Anitua, E. (1999) Plasma rich in growth factors: preliminary results of
6. Cenni, E. et al. (2005) Effects of activated platelet concentrates on human primary cultures of ?broblasts and osteoblasts. *J. Periodontol.* 76, 323–328
7. Choukroun, J, Adda F,Schoefer C,Vervelle A. Une opportunit?e en parodontologie: le PRF. *Implantodontie* 2000; 42:55-62
8. Clausen, C. et al. (2006) Homologous activated platelets stimulate differentiation and proliferation of primary human bone cells. *Cells Tissues Organs* 184, 68–75
9. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* 2009 Mar; 27(3):158-67. Epub 2009 Jan 31. Review.
10. El-Sharkawy, H. et al. (2007) Platelet-rich plasma: growth factors and pro- and anti-inflammatory properties. *J. Periodontol.* 78, 661–669
11. Everts, P. A. et al. (2007) Autologous platelet gel and ?brin sealant enhance the efficacy of total knee arthroplasty: improved range of motion, decreased length of stay and a reduced incidence of arthro?brosis. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 15, 888–894
12. Everts, P. A. et al. (2008) What do we use: platelet-rich plasma or platelet-leukocyte gel? *J.Biomed.Mater.Res.A* 85, 1135–1136
13. Frechette JP, Martineau I, Gagnon G. Platelet-rich plasmas: growth factor content and roles in wound healing. *J Dent Res.* 2005; 84:434–9
14. Gible, J. W. and Ness, P.M. (1990) Fibrin glue: the perfect operative sealant? *Transfusion* 30, 741–747
15. Krasna, M. et al. (2007) Platelet gel stimulates proliferation of human dermal ?broblasts in vitro. *Acta Dermatovenerol. Alp. Panonica Adriat.* 16, 105–110
16. Lindeboom, J. A. et al. (2007) In?uence of the application of platelet-enriched plasma in oral mucosal wound healing. *Clin.Oral Implants Res.* 18, 133–139
17. Lucarelli, E, Beretta R, Dozza B, Tazzari PL, O'Connel SM, Ricci F, Pierini M, Squarzone S, Pagliaro PP, Oprita EI, Donati D. A recently developed bifacial platelet-rich fibrin matrix. *Eur Cell Mater.* 2010 Jul 1; 20:13-23.
18. Lucarelli, E. et al. (2003) Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials* 24, 3095–3100
19. Matras, H. (1970) Die Wirkungen verschiedener Fibrinpraparate auf Kontinuitat-strennungen der Rattenhaut. *Osterr. Z. Stomatol.* 67, 338–359
20. Mazzucco, L. et al. (2008) Platelet-rich plasma and platelet gel preparation using Plateltex. *VoxSang.* 94, 202–208
21. Mishra, A.and Pavelko, T. (2006) Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. *Am. J. Sports Med.* 34, 1774–1778
22. Thor, A. et al. (2007) Early bone formation in human bone grafts treated with platelet-rich plasma: preliminary histomorphometric results. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 36, 1164–1171
- use in the preparation of future sites for implants. *Int. J. Oral Maxillofac.Implants* 14, 529–535
23. Weibrich, G. et al. (2003) Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point of a replatelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasankit, with preparations received from a local blood bank. *Clin.Oral Implants Res.* 14, 357–362
24. Weibrich, G. et al. (2005) Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-in-growth-factors kit to produce platelet-richplasma: a technical report. *Int.J.Oral Maxillofac.Implants* 20,118–123
25. Whitman, D. H. et al. (1997) Platelet gel: an autologous alternative to ?brin glue with application sinoral and maxillofacial surgery. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 55, 1294–1299
26. Whitman, D. H. et al. (1997) Platelet gel: an autologous alternative to ?brin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J.Oral Maxillofac.Surg.* 55, 1294–1299

Поступила 31.08.2012