

В. Г. Богдан¹, В. Я. Янушко², А. С. Симоненко¹

ПРИМЕНЕНИЕ ТРОМБОЦИТАРНЫХ КОНЦЕНТРАТОВ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ. ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ

Военно-медицинский факультет

*в УО «Белорусский государственный медицинский университет»¹,
УЗ «4-я городская клиническая больница им. Н. Е. Савченко», г. Минск²*

В статье представлены результаты сравнительного анализа существующих методов получения тромбоцитарных концентратов. Подробно освещены технологии получения обогащенной тромбоцитами плазмы, обогащенного тромбоцитами фибринового матрикса. Определены перспективные направления развития методов получения тромбоцитарных концентратов.

Ключевые слова: *тромбоцитарные концентраты, обогащенная тромбоцитами плазма, обогащенный тромбоцитами фибриновый матрикс.*

V. G. Bogdan, V. Y. Yanushko, A. S. Simonenko

APPLICATION PLATELET CONCENTRATE IN REGENERATIVE MEDICINE. TECHNOLOGYS OF PRODUCTION

The article presents the results of a comparative analysis of existing methods for the preparation of platelet concentrates. Details covered technology for obtaining platelet rich plasma, platelet rich fibrin matrix. Perspective directions of development methods for the preparation of platelet concentrate.

Keywords: *platelet concentrates, platelet rich plasma, platelet rich fibrin matrix.*

Активное развитие регенеративной медицины положило начало формированию нового направления, основанного на использовании тромбоцитарных концентратов (ТК).

Тромбоциты — одни из наиболее многочисленных клеток, присутствующие в ране после повреждения и являющиеся альтернативными источниками более 60 активных субстанций, которые регулируют ключевые аспекты заживления мягких тканей [2, 4, 5, 6, 9, 11].

В тромбоцитах выделяют 3 вида органелл хранения: α-гранулы, электронно-плотные тельца (δ-гранулы) и лизосомы (γ-гранулы). Секретируемые факторы тромбоцитов присутствуют в тромбоцитах в 3 видах гранул хранения. Разные стимуляторы приводят к освобождению содержимого гранул тромбоцитов. После активации тромбоциты выделяют α-гранулы, которые содержат факторы роста (ФР), коагуляционные белки, молекулы адгезии, цитокины и другие [7, 12].

Факторы роста представляют собой белковые молекулы с определенным набором аминокислот. Среди них ФР, которые влияют на тканевую регенерацию посредством аутокринного и паракринного механизмов, являются наиболее важными [4, 7]. Оказывая прямое влияние на хемотаксис, дифференцировку, митогенез, ФР обладают большим потенциалом для использования в клинической практике [1, 3, 5, 11, 12].

Основные ФР, идентифицированные к настоящему времени в α -гранулах: тромбоцитарный фактор роста (ТФР)

PDGF (PDGF-aa, PDGF-bb, PDGF-ab); трансформирующий фактор роста TGF (TGF α , β); эпидермальный фактор роста EGF; фактор роста фибробластов FGF; фактор роста кератиноцитов KGF; инсулиноподобный фактор роста - IGF; фактор роста эндотелия сосудов VEGF; интерлейкин 8 IL-8; фактор некроза опухолей α TNF- α ; фактор роста соединительной ткани CTGF; гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор GM-CSF [4, 6].

Содержащиеся в тромбоцитах основные факторы роста и их функции представлены в таблице.

Таблица. Функции факторов роста, содержащихся в тромбоцитарных гранулах

Фактор роста	Функция
IGF (инсулиноподобный фактор роста)	Стимулирует дифференцирование стволовых клеток, усиливает метаболизм костной ткани и синтез коллагена.
PDGF (тромбоцитарный фактор роста)	Содержит сигнальные пептиды. Продуцируется тромбоцитами и макрофагами. Трансформирует клетки, имеющие соответствующие рецепторы. Активирует пролиферацию и миграцию мезенхимальных (остеогенных) клеток. Стимулирует ангиогенез.
EGF (эпидермальный фактор роста)	Стимулирует пролиферацию фибро- и остеобластов. Стимулирует синтез фибронектина.
FGF (фибробластный фактор роста)	Продуцируется эндотелиальными клетками, макрофагами, остеобластами и тромбоцитами. Вызывает экспрессию в костной ткани, ангиогенеза, оссификации. Индуцирует продукцию TGF в остеобластных клетках
TGF (трансформирующий фактор роста)	Продуцируются тромбоцитами и остеобластами. В большом количестве содержится в тромбоцитах. Содержит сигнальный пептид и 16 доменов, обладающих кальцийсвязывающими сайтами. Многофункциональные факторы, т.к. не только индуцируют дифференцирование мезенхимальных клеток, но и вызывают множество клеточных и межклеточных ответов, включая продукцию других факторов роста. К трансформирующим факторам роста относятся костные морфогенетические белки, часть которых являются выраженными остеиндукторами.
PDEGF (тромбоцитарный фактор роста эндотелиальных клеток)	Фермент, поддерживающий целостность кровеносных сосудов. Оказывает стимулирующее действие на эндотелиальные клетки и обладает ангиогенным эффектом.
VEGF (ростовый фактор эндотелия сосудов)	Имеются 4 вида фактора VEGF-A, -B, -C и -D. Участвуют в ангиогенезе, индуцируют пролиферацию эндотелиальных клеток сосудов. Являются гепарин – связывающими белками.
PLGF-1/-2 (плацентарные ростовые факторы)	Потенцируют действие VEGF, повышают проницаемость сосудистой стенки.
Тромбоспондин	Содержится в тромбоцитах, базальной мембране кровеносных сосудов. Синтезируется остеобластами. Опосредует адгезию костных клеток.
Остеонектин	«Культуральный шоковый протеин» Составляет 15% органического компонента костного матрикса. Содержится в остеобластах, одонтобластах, хондроцитах и тромбоцитах. Регулирует пролиферацию и взаимодействие клеток с матриксом. Биохимически связывается с цепью тромбоцитарного фактора роста.
EGF (эпидермальный фактор роста)	Полипептид с молекулярной массой 6000, молекула которого состоит из 53 аминокислотных остатков; был впервые выделен из слюнных желез мыши. Он представляет собой полипептид с небольшой молекулярной массой, который присутствует во многих тканях организма. Впоследствии он был найден во многих тканях организма. Доказанные и гипотетические функции EGF можно классифицировать как эндокринные и паракринные. EGF содержится в крови, моче, цереброспинальной жидкости, молоке, слюне, желудочном и панкреатическом соке. Рецептор фактора эпидермального роста EGFR относится к семейству рецепторов тирозинкиназ, в которое также входят HER2/erbB2 и HER3/erbB3. Все они являются привлекательными мишенями для стратегий лечения раковых заболеваний. EGFR — это сложная белковая молекула, которая закодирована в одном из генов. Механизм действия следующий: фактор присоединяется к специфическим внеклеточным рецепторам, две внеклеточные части соединяются, активируется тирозинкиназа, сигнальные молекулы взаимодействуют с тирозинкиназой и возникает сигнал к делению клетки.

В плотных тельцах (δ -гранулы) хранятся субстанции, вызывающие, прежде всего, сосудистые реакции и агрегацию тромбоцитов: адениловые нуклеотиды (АТФ, АДФ, АМФ, ц-АМФ, ГДФ), серотонин, адреналин, норадреналин, дофамин, гистамин, Ca^{2+} и др. Высвобождающиеся из пула хранения АТФ и АДФ быстро метаболизируются в плазме до АМФ и аденозина; последние обладают прямым коронарорасширяющим действием. АДФ является важнейшим физиологическим метаболитом, обеспечивающим первичный гемостаз, стимулируя агрегацию тромбоцитов. В лизосомах (γ -гранулы) находятся гидролитические ферменты — пероксидаза, глюкозидазы, галактозидаза или β -глицерофосфатаза, кислая фосфатаза, неспецифическая

эстераза. Лизосомы секретируют хранящийся в них секрет только при необратимой активации.

Тромбоциты способны секретировать содержимое гранул как частично при обратимой активации и в процессе трофических взаимодействий с органной капиллярной сетью, так и полностью при реакции освобождения, связанной с необратимой активацией. После дегрануляции цитоплазма тромбоцитов «опустошена». В неактивированных тромбоцитах цитоплазма может выглядеть «опустошенной» при врожденном дефекте заполнения гранул, приводящем к дефициту пула хранения — синдрому «серых» тромбоцитов. После секреции большинство гранулярных мембран деградирует, гранулы не восстанавливаются,

и тромбоциты теряют свою физиологическую активность. Если они находятся в токе крови, измененная форма способствует их быстрой элиминации в селезенке.

Использование препаратов и компонентов крови для лечения ран и стимуляции заживления началось с использования фибринового клея, который впервые описан более 50 лет назад и состоял из концентрированного фибриногена (полимеризация была достигнута при помощи тромбина и кальция). Фибриновый клей является одним из эффективных средств, достоверно снижающих риск контаминации, но его использование остается ограниченным вследствие сложности производства и высокой стоимости [5, 7].

С 90-х годов прошлого века значительно возрос интерес к использованию ТК как альтернативы фибриновому клею. Все способы получения ТК содержат одинаковые ключевые позиции: забор цельной венозной крови, центрифугирование и разделение ее на несколько слоев с целью получения концентрата тромбоцитов. В последующем путем биологической или химической активации клеток осуществляют дегрануляцию α -гранул тромбоцитов. Для наличия стимулирующего эффекта содержание тромбоцитов не должно быть ниже 1×10^6 /мкл, дальнейшее увеличение количества клеток, по данным разных авторов, не приводит к потенцированию действия ТК [8].

Существующие различные варианты методик получения ТК по конечному продукту можно условно разделить на 2 основные формы или категории: обогащенная тромбоцитами плазма (ОТП, platelet-rich plasma — PRP) и обогащенный тромбоцитами фибриновый матрикс — ОТФМ (platelet-rich fibrin matrix — PRFM) или его модификация обогащенный тромбоцитами фибрин (platelet-rich fibrin — PRF). [5, 7, 8, 9].

В последнее время некоторые авторы классифицируют ТК на основании использования 3-х групп параметров [7]. Первая группа связана с методикой сбора и центрифугирования крови. Она включает в себя длительность центрифугирования, стоимость оборудования, эргономичность набора для забора и центрифугирования крови, класс самой центрифуги. Вторая группа параметров связана с содержанием ТК. Сюда входит определение конечного объема концентрата, количество тромбоцитов и лейкоцитов в концентрате и их сохранность. Третья группа связана с качеством фибринового матрикса, который является основой при выполнении аппликации на раневую поверхность и включает в себя концентрацию фибриногена и описание процесса полимеризации фибрина. В соответствии с этими параметрами конечные продукты могут быть разделены на четыре категории: простая ОТП, обогащенная тромбоцитами и лейкоцитами плазма, простой ОТФМ и обогащенный тромбоцитами и лейкоцитами фибриновый матрикс [5, 7].

Существует возможность получения простой ОТП как в автоматическом, так и в ручном режиме [8]. В первом случае метод, по сути, основан на технологии плазмолеза. 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 простой ОТП из 450 мл 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 слу-

чаев требует помощи трансфузиолога. Для повседневного использования с точки зрения приготовления ТК для местного лечения метод практически непригоден.

Второй метод был описан в 1999 году для получения ОТП [8]. Изначально применялась одноэтапная технология. После однократного центрифугирования венозной крови с предварительно добавленным антикоагулянтом произошло ее разделение на три слоя. Нижний слой представлен эритроцитарной массой, небольшой по объему средний слой — ОТП, верхний слой представлен большей частью бесклеточной плазмы с низким содержанием ФР и тромбоцитов. Полученная ОТП собиралась в отдельную пробирку под визуальным контролем. Метод недорогой и может применяться повседневно.

Обогащенная тромбоцитами и лейкоцитами плазма так же может быть получена как в автоматическом, так и в ручном режиме. В ряде исследований использовались специальные вещества для создания консистенции геля без использования прокоагулянтов, таких как тромбин [10]. Указанный протокол получения 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.

Были разработаны автоматические системы получения обогащенной тромбоцитами и лейкоцитами плазмы. В таких системах после разделения крови на три слоя центрифугированием при помощи повышенного давления происходит отделение поверхностного слоя, затем отделенный слой центрифугируется повторно. Конечный продукт насыщен тромбоцитами и лейкоцитами. Говорить о доступности такой системы для повседневного применения не приходится [12].

В настоящее время существует только один протокол получения простого ОТФМ [7]. Необходимо две пробирки: первая — для сбора крови, вторая — для образования простого ОТФМ. Обычно небольшое количество крови (около 10 мл) собирается в пробирку, которая содержит цитрат натрия и специальный гель. Пробирка центрифугируется. Получают три типичных слоя. Два слоя плазмы без эритроцитов переносят в другую пробирку с хлоридом кальция, который запускает свертывающий каскад. Пробирка немедленно центрифугируется, после чего формируется простой ОТФМ. По мнению авторов метода, таким образом формируется «естественный» ТК благодаря отсутствию бычьего тромбина. Однако такое утверждение спорно т.к. кровь изначально смешивается с антикоагулянтом и специальным гелем [5]. Из-за слабых механических свойств аппликационное использование простого ОТФМ в клинических условиях сопряжено с техническими сложностями и требует её специальной фиксации в месте применения. В противном случае существует возможность вымывания высвобождаемых ФР в процессе операции. Получаемые таким образом формы обычно хрупкие, нестабильные, склонны к быстрому фибринолизу и растворению после нанесения [9].

Обогащенный тромбоцитами и лейкоцитами фибриновый матрикс может рассматриваться как следующее поколение ТК, т.к. метод не требует использования антикоагулянтов и желирующих веществ [7]. Кровь собирается в стеклянную пробирку и центрифугируется. В отсутствие антикоагулянтов происходит немедленная полимеризация фибрина. При этом образуются три стандартных слоя. От-

личие заключается в формировании слоя с повышенным содержанием тромбоцитов в виде сгустка, который легко извлекается пинцетом, и может быть уложен на рану целиком или быть отжат между салфетками. Полученная форма ТК является наиболее удобной для клинического применения. Метод позволяет получить большое количество биологического продукта за небольшой промежуток времени, прост в использовании и наименее затратен [9].

Обобщая историю получения ТК для местного применения, следует отметить, что, по мнению большинства исследователей, многие параметры получения концентратов тромбоцитов, такие как количество оборотов центрифугирования, ее длительность, выбирались эмпирически и оценить их объективно в сравнении с другими не представляется возможным [12]. Более того, не всегда является возможным по описанию технологии точно установить, какая форма ТК получалась в итоге — простая или обогащенная тромбоцитами и лейкоцитами плазма и т.д. Таким образом, существующий уровень знаний о технологиях получения тромбоцитарных концентратов не позволяет в полной мере реализовать в регенеративной медицине весь потенциал применения аутологичных ростовых факторов и медиаторов и нуждается в совершенствовании.

Литература

1. Влияние обогащенной тромбоцитами плазмы на жизнеспособность, скорость роста, морфо-фенотипические и секреторные особенности мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека / В. Г. Богдан [и др.] // Мед. журн. — 2011. — № 1. — С. 27–29.

2. Дудко, А. С. Обогащенная тромбоцитами плазма / А. С. Дудко // Стоматология. — 2003. — № 3 (12). — С. 2–5.

3. Применение аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами в клинической практике / Е. Е. Ачкасов [и др.] // Биомедицина. — 2013. — № 4. — С. 46–59.

4. Растворимые факторы тромбоцитов и регенеративная медицина / М. П. Потапнев [и др.] // Здоровоохранение. — 2014. — № 9. — С. 32–40.

5. 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.

6. Harrison, P. Platelet alpha-granules / P. Harrison, E. M. Cramer // Blood Rev. — 1993. — Vol. 7, № 1. — P. 52–62.

7. In search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes / D. M. Dohan [et al.] // Curr. Pharm. Biotechnol. — 2012. — № 13 (7). — P. 1131–1137.

8. Marx, R. E. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? / R. E. Marx // Implant Dent. — 2001. — Vol. 10, № 4. — P. 225–228.

9. Platelet-rich plasma a literature review / N. S. Arora [et al.] // Implant. Dent. — 2009. — № 18(4). — P. 303–308.

10. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review / P. A. Everts J. Extra. Corpor. Technol. — 2006. — № 38(2). — P. 174–187.

11. Role of Platelet rich fibrin in wound healing: A critical review / B. Naik [et al.] // J. Conserv. Dent. — 2013. — Vol. 16, № 4. — P. 284–293.

12. Wang, L. Platelet-rich plasma for treating acute wounds: a meta-analysis / L. Wang, Z. Gu, C. Gao // Zhonghua Yi Xue Za Zhi. — 2014. — Vol. 22, № 94(28). — P. 2169–2174.