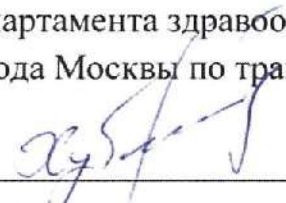


ПРАВИТЕЛЬСТВО МОСКВЫ
ДЕПАРТАМЕНТ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ГОРОДА МОСКВЫ

СОГЛАСОВАНО

Главный внештатный специалист
Департамента здравоохранения
города Москвы по трансплантологии



25.10 2021 г. М.Ш. Хубутия

РЕКОМЕНДОВАНО

Экспертным советом по науке
Департамента здравоохранения 



20 апреля 2022 г.

**ВЫБОР И ИЗГОТОВЛЕНИЕ ТРОМБОЦИТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ**

Методические рекомендации № 23

Москва - 2022

УДК: 611-018.51: 615.387

ББК: 53.535.2

авторский знак: В-92

Организация-разработчик:

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы
«Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского
Департамента здравоохранения города Москвы»

Авторы:

Боровкова Наталья Валерьевна, д.м.н., заведующая научным отделением биотехнологий и трансфузиологии ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы»

Макаров Максим Сергеевич, к.б.н., старший научный сотрудник научного отделения биотехнологий и трансфузиологии ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы»

Пономарев Иван Николаевич, к.м.н., старший научный сотрудник научного отделения биотехнологий и трансфузиологии ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы»

Андреев Юлий Вадимович, к.м.н., старший научный сотрудник научного отделения биотехнологий и трансфузиологии ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы»

Сторожева Майя Викторовна, научный сотрудник отделения биотехнологий и трансфузиологии ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы»

Рецензенты:

Оболенский Владимир Николаевич, к.м.н., зав. отделением гнойной хирургии ГБУЗ «Городская клиническая больница №13» ДЗ г. Москвы

Паршиков Михаил Викторович, д.м.н., профессор, заслуженный изобретатель РФ, руководитель ФДПО кафедры травматологии, ортопедии и медицины катастроф МГМСУ им. А.И. Евдокимова

Выбор и изготовление тромбоцитных препаратов для использования в регенеративной медицине. Методические рекомендации / сост. Н.В. Боровкова, М.С. Макаров, И.П. Пономарев [и др.]. – М.: ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ», 2022. – 27 с.

Данные методические рекомендации содержат теоретический и иллюстративный материал по изготовлению препаратов на основе аутологичных тромбоцитов для стимуляции процессов репаративной регенерации у пациентов с дефектами тканей. Методические материалы предназначены для освоения теоретических знаний и профессиональных практических навыков, необходимых для врачей-хирургов, травматологов, комбустиологов при проведении терапии препаратами на основе аутологичных тромбоцитов в условиях стационара или поликлиники

Методические рекомендации разработаны в ходе выполнения научно-исследовательской работы «Совершенствование процессов изготовления и повышение регенераторного потенциала тканевых трансплантатов, используемых в лечении больных с неотложными состояниями».

ОГЛАВЛЕНИЕ

1	Введение.....	5
2	Выбор формы тромбоцитного препарата и другие аспекты планирования его получения.....	7
3	Инструментарий, необходимый для получения тромбоцитных препаратов.....	9
4	Оптимизация методики выделения тромбоцитов.....	12
5	Получение тромбоцитарных лизатов.....	13
6	Цитокиновый состав тромбоцитарных лизатов, полученных разными способами.....	13
7	Получение тромбофибриновых сгустков, обладающих рост- стимулирующими свойствами.....	16
	7.1 Получение тромбофибринового сгустка с ростовыми факторами из неконсервированной крови.....	16
	7.2 Получение тромбофибринового сгустка, насыщенного факторами роста.....	20
8	Заключение.....	25
9	Литература.....	26

1. Введение

Тромбоциты человека содержат большой объем биологически активных веществ, включая факторы роста и дифференцировки клеток, цитокины, ангиогенные факторы [4, 14], и способны стимулировать многие репаративные процессы [17, 19-23]. В настоящее время ведется активная работа по разработке биопрепаратов на основе тромбоцитов для решения различных задач регенеративной медицины. Исходным материалом для получения биопрепаратов выступает богатая тромбоцитами плазма (БоТП), полученная из аутологичной крови пациента. При этом отсутствует стандартная методика получения БоТП для клинического применения. Чаще всего БоТП выделяют из венозной крови путем центрифугирования при разных режимах. Разработаны и используются коммерческие наборы для получения БоТП, в состав которых входят пробирки с антикоагулянтами и центрифуга, позволяющие предотвратить возможную контаминацию. Недостатком этого подхода является отсутствие оценки качества и количества клеток в составе БоТП [3,8,9, 13,15]. Выделяемые тромбоцитами факторы являются короткоживущими и нестабильными соединениями, поэтому во многих работах тромбоциты совмещают с различными матриксами и носителями [2,12,23]. Простейшим способом получения тромбоцит-содержащей матрицы является стимуляция БоТП индуктором коагуляции *in vitro* [19]. Полученный в результате активации БоТП препарат имеет гелеобразную консистенцию, поэтому в литературе такой препарат часто называют «тромбоцитарный гель» [11,21]. В литературе можно также встретить термины «platelet-rich fibrin, PRF» (богатый тромбоцитами фибрин), L-PRF (PRF, полученный из БоТП с лейкоцитами) [13]. Тромбоцитарный гель является удобным для использования биологического потенциала тромбоцитов в травматологии, хирургии, при производстве аппликативных биопрепаратов и биоконструкций [11, 17, 20-23]. Тромбоцитарный гель легко распадается на две фракции: сыворотку и тромбофибриновый сгусток (ТФ), который также имеет гелевую нерастворимую консистенцию. К настоящему моменту показана клиническая

эффективность тромбоцитарного геля при лечении хронических трофических ран, при диабетических переломах, при диабетической остеоартропатии и других дефектах губчатой кости [8, 10, 12, 21]. Вместе с тем, актуальной задачей остается разработка методик получения ТФ с высоким содержанием факторов репарации.

Другой распространенной формой препарата на основе тромбоцитов человека являются тромбоцитарные лизаты. Тромбоцитарные лизаты получают путем разрушения аутологичных тромбоцитов пациента при низких или ультранизких температурах [3, 9, 17]. Тромбоцитарные лизаты могут быть приготовлены из образцов с очень высоким содержанием тромбоцитов, что позволяет получать препараты, насыщенные ростовыми факторами. Однако наряду с факторами роста в тромбоцитарных лизатах присутствуют многочисленные провоспалительные факторы, протеолитические ферменты, которые могут заметно снижать репаративный эффект лизата. Актуальной задачей является получение тромбоцитарных лизатов с высоким содержанием факторов роста и репарации тканей и низким содержанием провоспалительных факторов.

В процессе разработки тромбоцитных препаратов необходимо проводить комплексное исследование тромбоцитов, которое должно включать биохимические и морфофункциональные характеристики. Для оценки качества тромбоцитов мы использовали методику оценки морфофункционального статуса тромбоцитов с помощью витального окрашивания [5], а также методы иммуноцитохимии для оценки содержания биологически активных веществ в тромбоцитных препаратах.

Освоение данных методических рекомендаций позволит свободно ориентироваться в разнообразии форм препаратов на основе аутологичных тромбоцитов, предназначенных для использования в регенеративной медицине, а также организовать надлежащее их изготовление на высоком методологическом уровне.

2. Выбор формы тромбоцитного препарата и другие аспекты планирования его получения

Планирование проводится на основе клинических данных и является неотъемлемым этапом получения эффективных тромбоцитных препаратов. Оценивая характер патологии, локализацию и размер тканевого дефекта, специалист первоначально выбирает способ применения тромбоцитного препарата. Возможны следующие подходы:

- инъекция – внутримышечное или внутрисуставное введение жидкого препарата с помощью шприца.
- распыление – нанесение препарата на поверхность раны с формированием аэрозольных частицы размером 1–2 мкм.
- инстилляция – капельное введение (нанесение) препарата на раневую поверхность или в полость раны.
- аппликация – укрытие раневой поверхности препаратом с нерастворимой основой. Такой препарат может быть получен в результате полимеризации фибрина плазмы или путем совмещения жидкого препарата с твердым носителем/субстратом *in vitro* или *in situ*.
- имплантация – помещение в ткани препарата с нерастворимой основой. Препарат может быть приготовлен тем же способом, как и при получении аппликативных препаратов, также возможно инкорпорирование тромбоцитов или их компонентов внутри твердой матрицы.

Исходя из решения о способе применения, специалист выбирает форму тромбоцитарного препарата:

- Суспензия с нативными клетками – взвесь клеток в плазме крови или другом растворе. Преимуществом препарата является возможность высвобождения тромбоцитарных факторов непосредственно внутри раны, возможность насыщения раневых покрытий тромбоцитами.
 - Богатая тромбоцитами плазма (БТП) – препарат на основе плазмы крови с высоким содержанием тромбоцитов (не менее $1000 \cdot 10^9/\text{л}$) и низким содержанием лейкоцитов (не более $1 \cdot 10^9/\text{л}$). При

- концентрации лейкоцитов более $1 \cdot 10^9/\text{л}$ препарат следует считать «Богатой тромбоцитами и лейкоцитами плазмой» (ЛейкоБоТП).
- Бесплазменный концентрат тромбоцитов – препарат на основе суспензии тромбоцитов в физиологическом растворе. Аналогично БоТП, характеризуется концентрацией тромбоцитов не менее $1000 \cdot 10^9/\text{л}$, лейкоцитов не более $1 \cdot 10^9/\text{л}$.
 - Бесклеточная суспензия – взвесь тромбоцитарных компонентов в плазме крови или другом растворе. Преимуществом препарата является наличие факторов роста в растворенной форме.
 - Активированная БоТП (сыворотка) – препарат, полученный из БоТП путем активации свертывающей системы с последующим удалением тромбофибринового сгустка.
 - Лизат БоТП (ЛейкоБоТП) – препарат, полученный из БоТП (ЛейкоБоТП) путем криодеструкции тромбоцитов при низких температурах.
 - Бесплазменный лизат тромбоцитов – препарат, полученный из бесплазменного концентрата тромбоцитов путем криодеструкции тромбоцитов при низких температурах.
 - Тромбоцитарный гель (ТГ) или тромбофибриновый сгусток (ТФ) – препарат гелевидной формы, полученный в результате полимеризации фибрина БоТП. Первоначально активация плазменного и клеточного звена гемостаза вызывает полимеризацию всего объема БоТП с образованием ТГ, который целиком имеет гелевидную консистенцию. При механическом давлении происходит разделение ТГ на жидкую фракцию и тромбофибриновый сгусток, который также имеет гелевидную консистенцию. Благодаря фибриновой матрице ТФ и ТГ способны удерживать факторы роста и другие репаративные факторы, выделенные тромбоцитами.

Тромбоцитные препараты могут быть использованы как самостоятельно, так и в комбинации с твердыми носителями (табл. 1).

Таблица 1 – Способы применения различных форм препаратов на основе тромбоцитов человека

Способ применения препарата	Форма препарата	Необходимость дополнительных носителей
Интъекции	Суспензия	Нет
Распыление		
Инстиляция		
Аппликация	Суспензия	Да
	ТГ / ТФ	Нет
Имплантация	Суспензия	Да
	ТГ / ТФ	Нет

Среднее количество крови, необходимое для получения 1 мл суспензии с концентрацией тромбоцитов не менее $1000 \cdot 10^9/\text{л}$, составляет 10 мл. Объем конечного препарата зависит от размера раны, клинических данных, а также от выбора тактики лечения. Для выбора оптимального препарата тромбоцитов следует также учитывать его цитокиновый состав, о чем будет сказано ниже.

3. Инструментарий, необходимый для получения тромбоцитных препаратов

Стерильные вакуумные пробирки

Одноразовые вакуумные пробирки используются для быстрого и безопасного взятия венозной крови. Цвета крышек указывают на состав реагентов, находящихся внутри (рис. 1). В зависимости от типа тромбоцитного препарата используют следующие пробирки:

- С антикоагулянтом ЭДТА (сиреневая крышка) или цитратом (голубая крышка) – следует использовать для получения суспензии нативных тромбоцитов (БоТП и бесплазменный концентрат тромбоцитов).
- Без антикоагулянта (белая крышка) – следует использовать для получения сыворотки или ТФ из неконсервированной крови. Также могут

быть использованы для получения ТФ и ТГ из БоТП, получения тромбоцитарных лизатов, для хранения и транспортировки любых готовых тромбоцитных препаратов.

- С активатором свертывания (красная крышка) – следует использовать в случаях, когда сыворотку требуется получить в короткие сроки.



Рисунок 1 – Цветовая маркировка крышек пробирок.

Шприцы медицинские (одноразовые, стерильные) объемом от 2 до 20 мл. Используются для аспирации биоматериала из вакуумных пробирок. Необходимо чтоб максимальный объем шприца соответствовал объему 1 пробирки с набранной кровью.

Иглы для спинальной анестезии (одноразовые, стерильные) размером 18-22 G, длиной не менее 75 мм. Используются для стерильного забора из пробирок исходной плазмы с тромбоцитами, ресуспендирования осадка тромбоцитов, изготовления тромбоцитных препаратов. Для работы предпочтительно использовать иглы с карандашной заточкой, также допустимы иглы со срезом Квинке или двухполостным срезом (рис. 2).

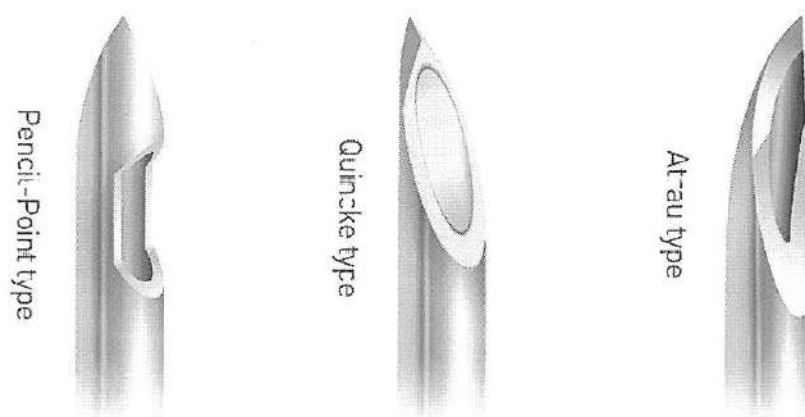


Рисунок 2 – Типы заточек игл для спинальной анестезии.

Лабораторная центрифуга необходима для выделения из крови плазмы с тромбоцитами, а также бесклеточной плазмы. Центрифуга должна иметь адаптеры для работы со стандартными вакуумными пробирками и обеспечивать ускорение (g, RCF - relative centrifugal force) от 100 до 3000 g в течение 20 минут. Если центрифуга поддерживает настройку только в режиме «обороты в минуту» (об/мин, RPM – rounds per minutes), следует сделать пересчет ускорения из RPM в RCF с учётом радиуса ротора (R) по стандартной формуле: $RCF = 11,18 \times R \times (RPM/1000)^2$.

Гематологический анализатор необходим для оценки клеточного состава суспензий с тромбоцитами. Количественная оценка биологически полноценных тромбоцитов позволяет оценить их суммарный репаративный потенциал, оценить содержание в них ростовых факторов, позволяет рассчитывать конечный объем препарата.

Медицинский морозильник (-40/-80°C) необходим для криодеструкции тромбоцитов, а также для длительного хранения готовых тромбоцитных препаратов (тромбоцитарные лизаты, сыворотка, ТФ).

Медицинский холодильник (+2/+4°C) необходим для разморозки суспензии тромбоцитов при получении тромбоцитарных лизатов, а также для временного хранения готовых препаратов.

4. Оптимизация методики выделения тромбоцитов

На сегодняшний день центрифугирование применяется практически во всех методиках изготовления тромбоцитных препаратов. Нами было показано, что однократное центрифугирование крови с ускорением до 1000 g не влияет на морфофункциональный статус тромбоцитов БоТП и не вызывает их дегрануляции [5,6]. После центрифугирования крови с ускорением 300-500 g общая концентрация тромбоцитов в плазме варьирует от 300 до $800 \cdot 10^9/\text{л}$, что может быть недостаточным и требует дополнительного концентрирования тромбоцитов. В большинстве работ осаждение тромбоцитов проводится при ускорении 2000-4000 g [3,9,17,20]. Однако проведенный анализ тромбоцитов показал, что центрифугирование плазмы с ускорением 2000-4000 g вызывает изменения в структуре тромбоцитов, в первую очередь, содержащих гранулы. После центрифугирования 2000-4000 g уровень тромбоцитов с гранулами достоверно снижается – в среднем на $23 \pm 1\%$ ($p < 0,05$); тромбоциты в осадке тесно ассоциированы друг с другом, их ресуспендирование весьма затруднительно. Двухэтапное центрифугирование при 300-500 g и 700-1000 g с последующим ресуспендированием осадка тромбоцитов плазмой позволяет получить БоТП с общей концентрацией клеток от 1200 до $1800 \cdot 10^9/\text{л}$ [1]. После такого двухэтапного центрифугирования значения морфофункциональных параметров тромбоцитов были достоверно ниже, чем в исходной крови, однако в процентном исчислении это снижение было незначительным, в готовой БоТП тромбоциты имели нормальный морфофункциональный статус.

Базовая методика получения БоТП включает два этапа:

1. **Выделение плазмы с тромбоцитами.** Пробирки с исходной кровью пациента, консервированной на цитрате или ЭДТА, центрифугируют 4-10 минут с ускорением 300-350 g и отбирают супернатантную плазму с тромбоцитами.
2. **Концентрирование БоТП.** БоТП, выделенную при 300-350 g, переносят в новую стерильную центрифужную пробирку и центрифугируют 10-20 минут при 700 g с целью осаждения

тромбоцитов. Из пробирки отбирают верхнюю часть плазмы (бедную тромбоцитами, БедПл), затем ресуспендируют осадок тромбоцитов в оставшемся объеме плазмы. В итоге из 10 мл венозной крови удается получить 1-1,2 мл БоТП и 2-4 мл БедПл.

Для получения концентрированной суспензии тромбоцитов в бесплазменной среде (отмытые от плазмы тромбоциты, ОтмТр) проводят двухэтапное центрифугирование тромбоцитов с теми же режимами, как и при получении БоТП. После получения осадка тромбоцитов из образцов удаляют всю жидкую фракцию и вносят равный ей объем фосфатно-солевого раствора PBS с рН=7,3 или изотонического 0,9%-ного раствора хлорида натрия, проводят ресуспендирование осадка до полного исчезновения тромбоцитарных конгломератов. Для ресуспендирования осадка рекомендуется использовать шприц.

5. Получение тромбоцитарных лизатов

Для получения тромбоцитарных лизатов могут быть использованы образцы богатой и бедной тромбоцитами плазмы (БоТП и БедПл), а также тромбоциты, отмытые от плазмы (ОтмТр). Криодеструкцию тромбоцитов проводят при температуре -40/-80°C, при этой же температуре образцы хранят и размораживают непосредственно перед исследованием. Разморозку проб проводят в медленном режиме при +2/+4°C в течение 12 часов, после этого пробы центрифугируют при 3000 g в течение 20 минут с целью удаления всех клеточных фрагментов. Полученный супернатат представляет собой готовый препарат (тромбоцитарный лизат).

6. Цитокиновый состав тромбоцитарных лизатов, полученных разными способами

В разных источниках приводят разные данные относительно содержания в тромбоцитных лизатах факторов роста и других биологически активных веществ, несмотря на то, что концентрация тромбоцитов в исходных БоТП почти везде является идентичной [3, 9, 11, 13]. В связи с этим для оптимизации

методик получения лизатов необходимо проводить цитохимическое исследование. Мы исследовали цитокиновый состав лизатов, приготовленных на основе БоТП, БедПл и ОтмГр, также исследовали образцы сыворотки, выделенной из неконсервированной крови тех же доноров. Содержание цитокинов оценивали с помощью мультиплексного анализа на платформе Lumiplex 200 (технология xMAP). Определяли концентрацию тромбоцитарного фактора роста (PDGF), фактора роста фибробластов (FGF-2), эпидермального фактора роста (EGF), трансформирующего фактора роста (TGF- α), фактора некроза опухолей (TNF- α), интерлейкинов 1, 6, 8 (IL1 α , IL6, IL8), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в пг/мл. Для статистической обработки вычисляли медиану (M), квартили (25%;75%), коэффициент корреляции Спирмена (R). Для оценки различий использовали U-критерий Манна-Уитни. Различия значений считали достоверными при $p < 0,05$.

Анализ цитокинового состава показал, что в сыворотке крови уровень всех ростовых факторов, за исключением PDGF, был низким и не превышал 100 пг/мл. При сравнении цитокинового состава сыворотки и тромбоцитных препаратов выявлено, что концентрация всех исследуемых цитокинов в препаратах БоТП и ОтмГр была значительно выше, чем в сыворотке (табл. 2). В образцах БедПл уровень PDGF был в 3 раза ниже по сравнению с сывороткой, однако концентрация всех остальных факторов в лизатах БедПл достоверно превышала аналогичные значения для сыворотки. Таким образом, для изготовления репаративных биопрепаратов более оправдано использовать концентрированные суспензии тромбоцитов, а не сыворотку крови.

Между лизатами БоТП и БедПл главное различие наблюдалось по уровню PDGF и EGF – концентрация этих факторов в БоТП была выше в 7,4 раза и в 12,1 раз соответственно ($p < 0,05$). Концентрации FGF-2, IL 6, IL 8, TNF- α в БоТП и БедПл достоверно не различались. Это может быть связано с частичной дегрануляцией тромбоцитов в процессе двухэтапного центрифугирования и выходом части факторов из тромбоцитов в плазму еще до криодеструкции клеток. Лизаты БедПл также имели более высокую

концентрацию факторов VEGF и TGF- α по сравнению с БоТП. В среднем, уровень VEGF и TGF- α в БедПл превышал аналогичные значения для БоТП в 1,6 раз и 2,5 раз соответственно ($p < 0,05$). С учетом того, что VEGF и TGF- α играют значительную роль в неоангиогенезе [14], можно заключить, что лизат БедПл может быть использован для стимуляции роста сосудов, наряду с БоТП.

Таблица 2 – Содержание секретируемых тромбоцитами факторов в тромбоцитных препаратах разных типов

Фактор	сыворотка	БоТП	БедПл	ОтмТр
EGF	77,6 [52; 98] *	812 [804; 926] **	67 [57; 117] *	4297 [4213; 8465] * **
FGF-2	46 [40; 50] * **	237 [149; 297]	266 [179; 300]	724 [387; 1443] *
IL 1- α	6 [4; 9] * **	12 [4; 23] **	24 [17; 35] *	4 [3; 10] * **
IL 6	0,01 [0,01; 63] * **	0,04 [0,02; 75]	0,04 [0,01; 77]	0,025 [0,01; 0,06] **
IL 8	3 [2; 22] * **	7 [6; 27]	5 [4; 24]	8 [8; 9]
TGF- α	0,8 [0,3; 1,3] * **	1,4 [1,3; 2,9]	3,5 [2,2; 5,2] * **	0,6 [0,6; 1,3] * **
TNF- α	5 [3; 7] * **	20 [15; 28]	24 [23; 39]	20 [22; 37]
VEGF	83 [82; 119] * **	145 [116; 160]	226 [152; 233] *	387 [116; 549] *
PGDF	387 [368; 422] * **	967 [534; 984] **	130 [91,8; 134] *	4110 [2769; 5369] * **
* - различия с БоТП достоверны (критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$)				
** - различия с БедПл достоверны (критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$)				

В лизатах, где тромбоциты ресуспендировали в бесплазменной среде (ОтмТр), концентрация большинства ростовых факторов была заметно выше, чем в лизатах БоТП: PDGF – в 4,2 раза, FGF-2 – в 3,1 раз, EGF – в 5,3 раз,

VEGF – в 2,7 раз соответственно ($p < 0,05$) [1]. Одновременно с этим, концентрация IL1 α снижалась в 3 раза, IL 6 – в 1,6 раз ($p < 0,05$). Таким образом, отмывание тромбоцитов от плазмы после двухэтапного центрифугирования позволило заметно увеличить содержание ростовых факторов и одновременно с этим снизить содержание провоспалительных интерлейкинов в конечном тромбоцитарном лизате.

Корреляционный анализ показал, что существует достоверная прямая связь концентраций PDGF и EGF как между собой ($R=0,801$, $p=0,000$), так и с количеством функционально полноценных тромбоцитов с гранулами (для EGF – $R=0,626$, $p=0,000$, для PDGF – $R=0,419$, $p=0,001$) [1]. Таким образом, основным источником EGF и PDGF в крови являются функционально полноценные тромбоциты с гранулами. При этом концентрация EGF и PDGF в лизатах не коррелировала с общим количеством тромбоцитов в исходных образцах. Это указывает на то, что общая концентрация клеток в БоТП не позволяет адекватно оценить репаративный потенциал препарата на основе тромбоцитов и необходимо проводить комплексный морфофункциональный анализ исходных тромбоцитов.

7. Получение тромбофибриновых сгустков, обладающих рост-стимулирующими свойствами

7.1. Получение тромбофибринового сгустка с ростовыми факторами из неконсервированной крови

В практике ЛПУ зачастую доступен только самый простой инструментарий и отсутствует возможность асептического выделения БоТП в стерильных условиях. В этих случаях весьма востребованы методики получения тромбоцитарных препаратов из неконсервированной крови. Показано, что центрифугирование неконсервированной крови при комнатной температуре (20-22°C) с ускорением 100-500 g позволяет получать сгустки без примеси лейкоцитов и эритроцитов [19]. С другой стороны, использование неконсервированной крови заметно сокращает время необходимых

манипуляций, не позволяет оценить качество исходных тромбоцитов и рассчитать их оптимальную дозу. Кроме того, образование ТФ непосредственно из неконсервированной крови сопровождается быстрой дегрануляцией тромбоцитов, что увеличивает риск потери тромбоцитарных компонентов. Поэтому для получения ТФ из неконсервированной крови оправдано использовать методики, увеличивающие срок полимеризации фибрина *in vitro*.

Известно, что гипотермия позволяет существенно увеличить время свертывания крови без использования антикоагулянтов. При температуре ниже 20°C в плазме активируются факторы, препятствующие полимеризации фибрина, образованию фибриновых сетей, а также частично блокируют контакт тромбоцитов с фибрином [18]. Необходимо было подобрать адекватную температуру, при которой сохранность гранул в тромбоцитах без антикоагулянта будет максимально пролонгирована. Кровь доноров сразу после забора помещали в центрифугу с внутренней температурой от 4°C до 16°C, неконсервированную кровь центрифугировали при 300 g в течение 5 минут, выделяли плазму с тромбоцитами и проводили их морфофункциональный анализ. Полученные образцы плазмы экспонировали при 4°C до 16°C в течение 60 мин, после чего повторно исследовали качество тромбоцитов. В условиях 4-16°C образование ТФ в плазме не наблюдалось в течение 1 часа и более. Морфофункциональный анализ показал, что в процессе выделения БоТП из неконсервированной крови при 8-12°C значительная часть тромбоцитов (свыше 70%) сохраняет гранулы в своем составе (табл. 3). Наиболее эффективными был диапазон от 10°C до 12°C, где сохранялось свыше 80% тромбоцитов с гранулами. При других температурах сохранность гранул была гораздо ниже. Во всех пробах можно было наблюдать мелкие тромбоцитарные конгломераты и агрегаты, однако при температуре от 8°C до 12°C клетки в составе таких агрегатов сохраняли большую часть гранул и не снижали яркости свечения при витальном окрашивании. Этот же эффект наблюдался и после 1 часа экспозиции БоТП в отсутствие антикоагулянтов. При 10-12°C сохранность

тромбоцитов с гранулами в БоТП была выше 60%, тогда как при 8°C этот параметр составил 44%, при других температурах – менее 30%. Таким образом, выделение и хранение плазмы с тромбоцитами из неконсервированной крови наиболее оптимально проводить при температуре 10-12°C.

Таблица 3 – Сохранность тромбоцитов с гранулами в ходе получения БоТП из неконсервированной крови при низкوپоложительных температурах

Тип образца	Содержание тромбоцитов с гранулами, %	Сохранность тромбоцитов с гранулами относительно их исходного уровня в крови, %
Исходная кровь	45,5±4,3	-
БоТП непосредственно после выделения из неконсервированной крови		
БоТП при +4°C	18,0±2,5	39
БоТП при +8°C	32,5±7,5	71
БоТП при +10°C	38,0±5,9	83
БоТП при +12°C	40,7±4,9	89
БоТП при +14°C	20,0±1,6	44
БоТП при +16°C	21,3±2,6	46
БоТП после выделения из неконсервированной крови и 60 мин хранения		
Выделение и хранение БоТП при +4°C	6,8±5,4	15
Выделение и хранение БоТП при +8°C	20,1±6,0	44
Выделение и хранение БоТП при +10°C	29,0±4,9	63
Выделение и хранение БоТП при +12°C	30,5±5,9	67
Выделение и хранение БоТП при +14°C	13,3±2,5	29
Выделение и хранение БоТП при +16°C	5,0±3,7	11

Оценку рост-стимулирующего действия тромбофибриновых сгустков проводили на примере мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток человека (ММСК). Было установлено, что ТФ из неконсервированной крови, полученный стандартным способом при комнатной температуре, *in vitro*

увеличивал рост клеток лишь в 1,1 раза (табл. 3). В то же время, ТФ, полученный с использованием предложенной методики, увеличивал пролиферативную активность диплоидных клеток человека в 1,2-1,4 раз без видимого нарушения жизнеспособности клеток (табл. 4).

Таблица 4 – Оценка рост-стимулирующего эффекта тромбофибриновых сгустков в культуре клеток ММСК

Параметры оценки культуры ММСК	Способ получения ТФ из неконсервированной крови					
	Контроль (Без ТФ)		Выделение БоТП при 20-22°C		Выделение БоТП при 10-12°C	
	Через 1 сутки	Через 3 суток	Через 1 сутки	Через 3 суток	Через 1 сутки	Через 3 суток
Целостность клеточных мембран	33,1±1,0	32,8±1,1	33,0±1,0	32,2±1,1	33,0±1,0	32,8±1,0
Количество клеток в культуре, тыс/см ²	8,0±0,5	15,0±1,4	8,0±0,9	15,9±1,9	8,0±0,5	19,2±0,7*
* Достоверно относительно контроля при p<0,05						

Таким образом, немедленное охлаждение *in vitro* неконсервированной крови до 8-12°C и последующее поддержание указанного температурного диапазона в течение 60 минут существенно снижает активность факторов свертывающей системы крови и сохраняет значимую долю тромбоцитов с гранулами. Это позволяет транспортировать биоматериал от места забора до центрифуги и выделять из него богатую тромбоцитами плазму без использования антикоагулянтов. При этом самостоятельная трансформация БоТП в гель по мере нагрева до температуры окружающей среды позволяет отказаться от использования активаторов свертывания и получать трансплантат непосредственно *in situ*.

Способ получения тромбофибринового сгустка из нестабилизированной крови включает следующие процедуры: забор венозной крови в пробирку без антикоагулянта, ее охлаждение посредством размещения в камере при температуре 8-12°C с возможностью поддержания указанной температуры до 60 мин, центрифугирование образца крови с ускорением 300 g в течение 5 мин

при температуре 8-12°C и отбором БоТП из нижней части пробирки в объеме 1/10 от исходного количества крови в пробирке. Для получения геля образцы БоТП экспонируют при комнатной температуре в течение 15-20 мин.

7.2 Получение тромбофибринового сгустка, насыщенного факторами роста

В настоящее время для получения тромбоцитарного геля и ТФ чаще всего используют консервированную кровь. Методики получения тромбоцитарного геля из аутологичной БоТП являются простыми и широкодоступными [8, 11]. Однако во всех известных методиках тромбоцитарный гель получают в условиях 37°C, когда происходит очень быстрая дегрануляция тромбоцитов. При такой активации основная часть тромбоцитарных компонентов выходит в раствор, который очень легко отделяется от геля в процессе ретракции тромбофибринового сгустка. Это не позволяет получить ТФ с высоким содержанием ростовых факторов. Поэтому актуальным было разработать такую методику получения тромбоцитарного геля, чтобы активация и агрегация тромбоцитов проходила без полной их дегрануляции в процессе полимеризации фибрина и образования геля.

Ранее нами было установлено, что *in vitro* тромбоциты человека могут быть активированы даже при 20-22°C, при этом интенсивная агрегация не всегда сопровождается быстрым выбросом гранул [7]. Среди известных препаратов, потенциально способных активировать тромбоциты, был выбран препарат для инъекций «Адреналина гидрохлорид-Виал». В состав препарата входит эпинефрин (адреналин) в концентрации 1 мг/мл, дисульфит натрия, хлорид натрия, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), хлористоводородная кислота, вода для инъекций. Адреналин вызывает активацию тромбоцитов *in vivo* и *in vitro* путем воздействия на специфические адреналин-зависимые рецепторы [4]. Дисульфит натрия и хлористоводородная кислота обладают выраженными восстановительными (электрон-донорскими) свойствами, что также может способствовать активации тромбоцитов [16].

Таким образом, препарат «Адреналина гидрохлорид-Виал» потенциально способен запускать активацию тромбоцитов разными путями, причем совмещение этих путей может оказывать синергетический эффект и усиливать образование тромбоцитарного геля.

При внесении 1 мМ адреналина препарата «Адреналина гидрохлорид-Виал» при 22°C через 5 минут в БоТII формировались многочисленные агрегаты диаметром до 20 мкм, при этом подавляющее число клеток в таких агрегатах сохраняли гранулы в своем составе (рис. 3А). Если препарат «Адреналина гидрохлорид-Виал» вносили в плазму вместе с 30-40 мМ хлорида кальция, то уже через 10-15 мин в плазме наблюдалась интенсивная агрегация тромбоцитов, которая приводила к образованию тромбоцитарного геля при 20-22°. Стоит особо подчеркнуть, что на начальных стадиях образования геля в БоТII можно было видеть одиночные фибриновые нити, к которым прикреплены многочисленные мелкие агрегаты тромбоцитов, которые содержат гранулы (рис. 3Б). Гранулы также можно было выявить уже в готовом геле (рис. 4). В плазме с нормальным уровнем тромбоцитов с гранулами (35-75%) тромбоцитарный гель под действием 1 мМ адреналина и 35 мМ хлорида кальция формировался через 20-30 мин. Если уровень тромбоцитов с гранулами были снижен (10-35%), время образования геля увеличивалось до 50 мин. Если содержание тромбоцитов с гранулами в плазме составляло менее 10%, тромбоцитарный гель не формировался даже при очень длительной экспозиции. Таким образом, для получения тромбоцитарного геля наиболее пригодна плазма, полученная из крови с нормальным уровнем биологически полноценных тромбоцитов. Для формирования тромбоцитарного геля в образце БоТII общее содержание тромбоцитов с гранулами должно составлять не менее 100 тыс/мкл. На примере культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека (ММСК) нами установлено, что ТФ, полученные стандартным способом при 37°C, *in vitro* увеличивали рост клеток лишь в 1,1 раза (рис. 5а). В то же время, ТФ, полученный из БоТII с использованием оригинальной методики, увеличивал пролиферативную активность диплоидных

клеток человека в 1,5-1,8 раза без видимого нарушения жизнеспособности клеток (рис. 5б, табл. 5).

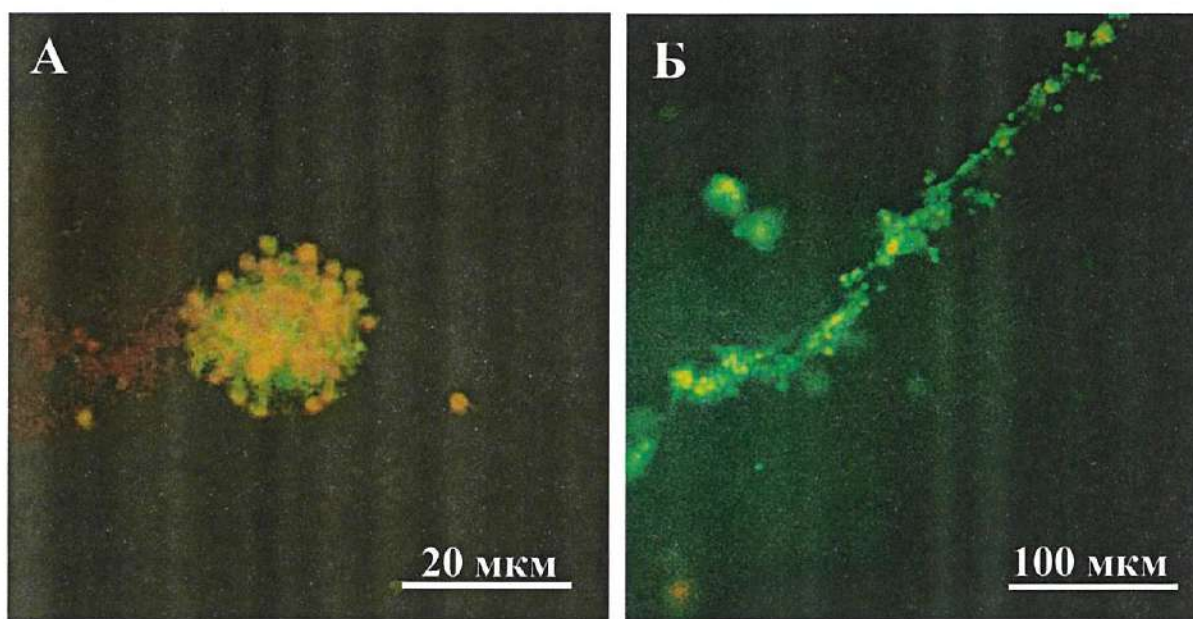


Рисунок 3 – Активация тромбоцитов с помощью 1 мМ адреналина препарата «Адреналина гидрохлорид Виал» при 22°C. Витальное окрашивание триафлавином-акридиновым оранжевым.

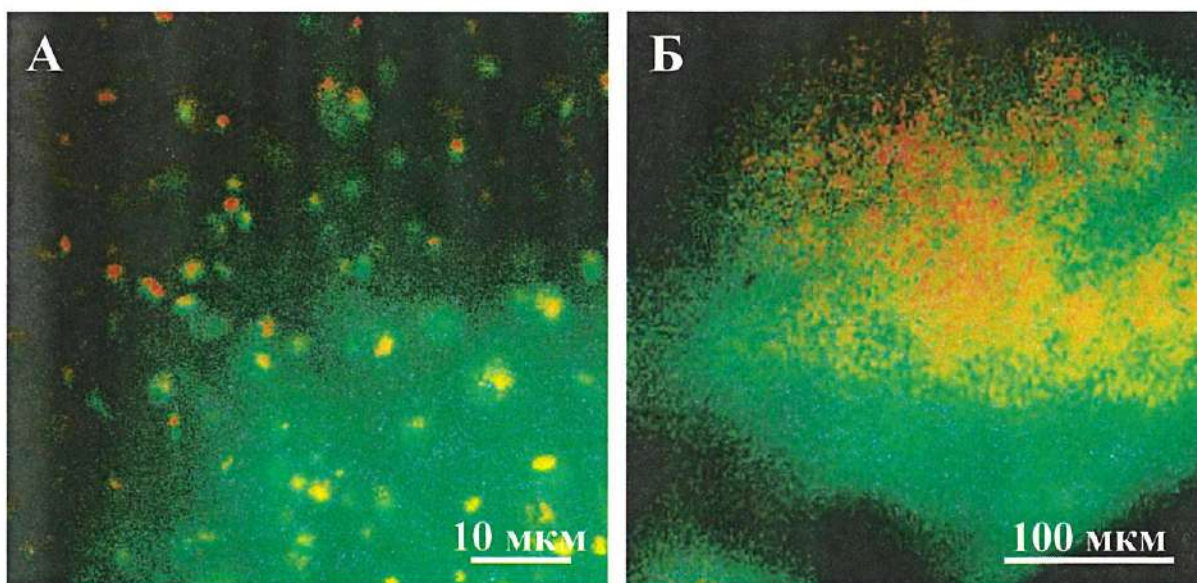


Рисунок 4 – Сохранение гранул в составе тромбоцитарного геля, полученного при 22°C. Витальное окрашивание триафлавином-акридиновым оранжевым. А – исходные тромбоциты; Б – фрагмент тромбоцитарного геля, полученного с использованием препарата «Адреналина гидрохлорид Виал» и 10% ного раствора хлорида кальция.

Таблица 5 – Оценка рост-стимулирующего эффекта тромбофибриновых сгустков в культуре клеток ММСК.

Параметры оценки культуры ММСК	Способ получения ТФ					
	Контроль (Без ТФ)		При 37°С		При 20-22°С	
	Через 1 сутки	Через 3 суток	Через 1 сутки	Через 3 суток	Через 1 сутки	Через 3 суток
Целостность клеточных мембран (норма–28-42 балла)	34,9±1,0	34,8±1,1	35,3±1,0	35,3±1,2	35,2±1,0	35,0±1,3
Количество клеток в культуре, тыс/см ²	8,1±0,5	15,6±1,4	8,2±0,7	17,2±1,3*	8,0±0,5	25,7±0,7* ⁺
Содержание PDGF в ТФ, полученном из 0,5 мл БотП, пг	нет		32±2		145±3	
* Достоверно относительно контроля при p<0,05						
⁺ Достоверно относительно прототипа при p<0,05						

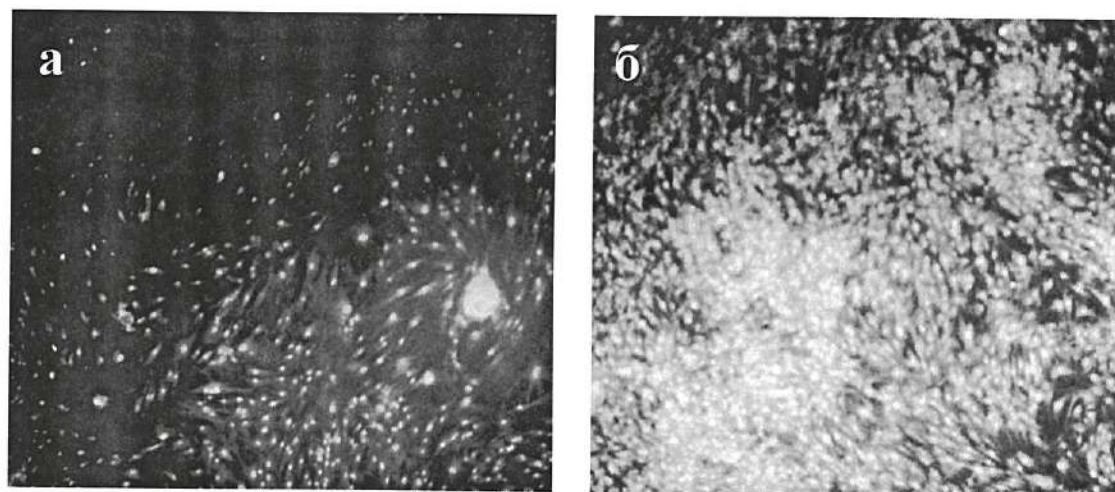


Рисунок 5 – Оценка пролиферативной активности клеток ММСК через 3 дня культивирования в присутствии и в отсутствии ТФ. Витальное окрашивание трипифлавином и акридиновым оранжевым. Увеличение x40. а – без ТФ (контроль); б – ТФ, полученный при 20-22°С.

Также оценивали насыщенность образцов ТФ ростовыми факторами, в частности тромбоцитарным фактором роста (PDGF). Для этого методом мультиплексного анализа оценивали уровень PDGF в лизате БотП до

образования ТФ и в сыворотке после получения ТФ при 37°C и при 20-22°C. Уровень PDGF в составе ТФ определяли по разнице уровня PDGF в лизате исходной БоТП и в сыворотке, полученной после выделения ТФ. Установлено, что уровень PDGF в ТФ, изготовленном при 20-22°C, в среднем был в 4,5 раз выше, чем в ТФ, полученном из той же БоТП при 37°C (табл. 5). Если при стандартной методике получения тромбоцитарного геля в составе ТФ сохранялось менее 12% от всего объема PDGF исходной БоТП, то при использовании оригинальной методики сохранность PDGF в ТФ превышала 50%. Таким образом, предложенная нами методика приготовления тромбоцитарного геля позволяет получать тромбофибриновые сгустки, обладающие выраженным рост-стимулирующим эффектом. При этом получение тромбоцитарного геля не требует инкубации БоТП в термостате, использует широкодоступные в клинической практике реагенты и может быть осуществлено с помощью простого инструментария. Разработанный способ представляется весьма актуальным для изготовления раневых покрытий, насыщенных ростовыми факторами, а также при производстве тромбоцит-насыщенных биотрансплантатов.

Приготовление тромбоцитарного геля и ТФ при 20-22°C включает следующие этапы:

1. Забор 5 мл венозной крови пациента в стандартную пробирку с антикоагулянтом CPD (цитрат) или ЭДТА в соотношении 7:1.
2. Выделение богатой тромбоцитами плазмы (БоТП), для получения которой образцы крови пациента центрифугируют при 300-400 g в течение 4-5 минут, после чего отбирают верхнюю фракцию.
3. Введение в БоТП раствора 10%-ного хлорида кальция и препарата для инъекций «Адреналина гидрохлорид-Виал» из расчета 5-7 мкл 10%-ного хлорида кальция и 20-25 мкл препарата «Адреналина гидрохлорид-Виал» на 100 мкл БоТП.
4. Инкубация активированной БоТП при комнатной температуре (20-22°C) в пробирке, эппендорфе или емкости с плоским дном. Для

получения тромбоцитарного геля время инкубации БоТП составляет 20-30 мин при содержании тромбоцитов с гранулами свыше 35%, при содержании тромбоцитов с гранулами от 10 до 35% (включительно) время инкубации БоТП составляет 30-50 мин.

5. Выделение тромбофибринового сгустка. Для выделения тромбофибринового сгустка образованный гель дополнительно инкубируют в тех же условиях (20-22°C) в течение 10-20 мин, после чего в стерильных условиях пинцетом отбирают тромбофибриновый сгусток.

8. Заключение

Предложенные нами способы получения тромбоцитных препаратов являются простыми и широкодоступными в практике ЛПУ. Разработанный способ получения тромбоцитарного геля и тромбофибринового сгустка позволяет быстро изготавливать аппликативные биопрепараты, содержащие факторы роста и другие биологически активные вещества. Также есть возможность инъекционного введения активированной БоТП в полость тканевого дефекта еще до формирования геля с последующим образованием сгустка непосредственно в ране. Двухэтапное центрифугирование позволяет получать одновременно БоТП и БедПл, которая также содержит биологически активные вещества, в частности, факторы ангиогенеза. Отмывание тромбоцитов от плазмы резко увеличивает репаративный потенциал готового лизата. Тромбоцитарные лизаты могут быть использованы как для инъекционного введения, так и в процессе изготовления комбинированных биоконструкций.

9. Литература

1. Боровкова Н.В., Макаров М.С., Андреев Ю.В. [и др.] Оценка цитокинового состава сыворотки крови и препаратов на основе тромбоцитов человека // Молекулярная медицина. –2021. –Т. 19, № 3. –С. 51-57.
2. Бухарова Т.Б., Волков А.В., Антонов Е.Н. [и др.] Тканеинженерная конструкция на основе мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани, полилактидных носителей и тромбоцитарного геля // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. –2013. –№ 4. –С.61-68.
3. Калмыкова Н.В. Скоробогатая Е.В., Берестовой М.А.[и др.] Сравнительная характеристика тромбоцитарных лизатов от разных доноров // Клеточные технологии в биологии и медицине. –2011. –№ 2. –С. 114-117.
4. Мазуров, А.В. Физиология и патология тромбоцитов [Текст] // – М.: Литерра, 2011. –248с.
5. Макаров, М.С. Особенности морфофункционального статуса тромбоцитов человека в норме и патологии [Текст]: Дис. ... канд. биол. наук: 14.01.21 – Гематология и переливание крови / Макаров Максим Сергеевич – М. 2014. –124с.
6. Макаров М.С., Боровкова Н.В., Хватов В.Б., Кобзева Е.Н. Влияние центрифугирования на биологическую полноценность тромбоцитов человека // Вестник службы крови России. –2015. –№ 1. –С. 41-44.
7. Макаров М.С. Неканонические способы активации тромбоцитов человека // Медицинский алфавит. –2015. –Т. 3, №11. –С. 30-35.
8. Оболенский В.Н. Современные методы лечения хронических ран. Медицинский Совет // – 2016. –№10. –С. 148-154.
9. Сергеева Н.С., Шанский Я.Д., Свиридова И.К. [и др.] Биологические эффекты тромбоцитарного лизата при добавлении в среду культивирования клеток человека // Гены и клетки.–2014. –Т. 9, № 1.–С. 77-85.
10. Юрченко М.Ю., Шумский А.В. Хирургическое лечение пародонтита с применением плазмы, обогащенной тромбоцитами // Клини стоматол. –2003. –№ 2 –Р. 46-48.
11. Amable P.R., Carias R.B., Teixeira M.V. [et al.] Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors // Stem Cell Res Ther. –2013. –№ 4. –P.67.
12. Civinini R., Macera A., Nistri L. [et al.] The use of autologous blood-derived growth factors in bone regeneration // Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism. –2011. –Vol. 8, № 1. –P. 25-31.

13. Dohan Ehrenfest D.M., Pinto N.R., Pereda A. [et al.] The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane // *Platelets*. –2018. –Vol. 29, № 2. – P. 171-184.
14. Golebiewska E.M., Poole A.W. Secrets of platelet exocytosis – what do we really know about platelet secretion mechanisms? // *Br J Haematol*. –2014. –Vol. 165, № 2. –P. 204-216.
15. Etulain J., Mena H.A., Meiss R.P. An optimised protocol for platelet-rich plasma preparation to improve its angiogenic and regenerative properties // *Sci Rep*. –2018. –Vol. 8, № 1. – P. 1513.
16. Jones D.P. Redox sensing: Orthogonal control in cell cycle and apoptosis signaling // *J Intern Med*. –2010. –Vol. 268, № 5. –P. 432-448.
17. Klätte-Schulz F., Schmidt T., Uckert M. [et al.] Comparative Analysis of Different Platelet Lysates and Platelet Rich Preparations to Stimulate Tendon Cell Biology: An In Vitro Study // *Int J Mol Sci*. –2018. –Vol. 19, №1. –P. E212.
18. Lai B.F., Zou Y., Yang X. [et al.] Abnormal blood clot formation induced by temperature responsive polymers by altered fibrin polymerization and platelet binding // *Biomaterials*. –2014. –Vol. 35, № 8. –P. 2518-2528
19. Malhotra A., Pelletier M., Oliver R. [et al.] Platelet-rich plasma and bone defect healing // *Tissue Eng Part A*. –2014. –№ 20(19-20). –P. 2614-2633.
20. Rothenberg J.B., Godha K., Civitarese D.M. [et al.] Pain and functional outcomes of the sacroiliac joint after platelet-rich plasma injection: a descriptive review // *Regen Med*. –2021.– Vol. 16, № 1. –P.87-100.
21. Santhakumar M., Yayathi S., Retnakumari N. A clinicoradiographic comparison of the effects of platelet-rich fibrin gel and platelet-rich fibrin membrane as scaffolds in the apexification treatment of young permanent teeth // *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. –2018. –Vol. 36, № 1. –P. 65-70.
22. Slaninka I., Fibír A., Kaška M. Use of autologous platelet-rich plasma in healing skin graft donor sites // *J Wound Care*. –2020. –Vol. 29, № 1. –P. 36-41.
23. Wang D., Jiang H., Wang S. [et al.] Construction of tissue-engineered bone using a bioreactor and platelet-rich plasma // *Exp Ther Med*. –2014. –Vol. 8, № 2. –P. 413-418.