

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ ГЕЛЯ ПЛАЗМЫ, ОБОГАЩЕННОЙ РАСТВОРИМЫМИ ФАКТОРАМИ ТРОМБОЦИТОВ, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ДЛИТЕЛЬНО НЕЗАЖИВАЮЩИХ РАН ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Образцы плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов (ПОРФТ), являющиеся жидкой субстанцией, в предварительном эксперименте при нанесении на раневую поверхность у животных с индуцированным сахарным диабетом (СД) локально не фиксировались и частично вытекали за пределы раны. В этой связи *in vitro* изучены возможности формирования геля из образцов ПОРФТ в присутствии ряда компонентов гелеобразования в разных объемных соотношениях. В качестве активаторов использовали: хлорид кальция (10 % раствор), глюконат кальция (10 % раствор), аprotинин (5000 ЕД/мл), тромбин (100 ЕД/мл). Исследовалось время гелеобразования, способность равномерного распределения по заданной площади и свойство адгезивной локальной фиксации. Разработан удобный по времени гелеобразования и адгезивности метод формирования геля из образцов ПОРФТ. Установлено, что оптимальным для нанесения на кожные раны при модели СД с позиций гелеобразования и адгезивности является метод получения геля ПОРФТ путем добавления тромбина 20 ЕД/мл в соотношении 2:1 в присутствии глюконата кальция.

Ключевые слова: сахарный диабет, плазма, обогащенная ростовыми факторами тромбоцитов, гелеобразование, тромбин, глюконат кальция, раневая поверхность, адгезивность.

A. A. Troyanov, A. A. Arabey, P. S. Neverov

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR OBTAINING PLATELET-RICH PLASMA GEL TO TREAT LONG-TERM HEALING WOUNDS IN DIABETES MELLITUS

Samples of platelet-rich plasma (PRP), which is a liquid substance, when applied to the wound surface in animals with induced diabetes (MD) locally is not recorded and partly flowed outside the wound. In this regard, the *in vitro* formation of gel studied samples of PRP in the presence of a number of components of Gelation in different volumetric ratios. As activators used: calcium chloride (10 % solution), calcium gluconate (10 % solution), aprotinin (5000 ED/ml), Thrombin (100 ED/ml). Gel time, studied the ability of the uniform distribution on the set square and the adhesive properties of the local commit. Developed convenient from the standpoint of Gelation time and method for forming gel adhesiveness of samples PRP. Found that optimal for use on skin wounds with MD models from the positions of Gelation and adhesiveness is a method of obtaining PRP gel by adding Thrombin 20 u/ml in the ratio of 2:1 in the presence of calcium gluconate.

Key words: diabetes mellitus, platelet-rich plasma, gelation, thrombin, calcium gluconate, wound surface, adhesive properties frequently.

Нарушения углеводного обмена у пациентов с сахарным диабетом (СД) сопровождается многочисленными и глубокими изменениями в органах и тканях, в результате чего поражения кожи приводят к образованию хронических, медленно заживающих раневых дефектов. Эффективность заживления ввиду плохой регенерации раневой поверхности при данной патологии остается низкой [1, 2]. Поэтому исследование и внедрение в практику новых более совершенных средств для этой цели до сих пор остается важной и нерешенной задачей. Как известно, тромбоциты крови человека являются клеточными элементами, предназначенными для гемостаза при кровотечениях из мест повреждения тканей организма человека [3; 4; 5]. В 1990-х годах было установлено, что плазма крови, обогащенная тромбоцитами (ПОРФТ), при местном нанесении вызывает ускорение заживления слизистой оболочки ротовой полости, активирует регенерацию костных дефектов после удаления зубов или резекции опухолей, а также ускоряет заживление хронических язв кожных покровов [6, 7, 8]. Такое ускоренное заживление длительно существующих язв кожи в 78 % случаев способствовало предотвращению ампутации нижних конечностей [9]. Стало очевидным, что растворимые факторы, выделяемые из тромбоцитов при их разрушении, участвуют в регенеративных процессах. Эти данные потребовали более подробного изучения тромбоцитов как источника растворимых биологически активных факторов [10, 11]. С другой стороны, в различных областях медицины начал приобретаться клинический опыт применения препаратов, содержащих растворимые факторы тромбоцитов (РФТ). При этом приоритет отдается препаратам, получаемым из аутологичных тромбоцитов, поскольку они обеспечивают совместимость и отсутствие реакций на чужеродный биологический материал [11]. В настоящее время продолжает накапливаться клинический материал по использованию этого естественно-безопасного, в большинстве случаев эффективного лечебного средства во многих отраслях медицины: ортопедии, травматологии, стоматологии, дерматологии, косметологии, спортивной медицине, офтальмологии, неврологии, клеточной терапии (включая трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток), тканевой инженерии. Оценивается также возможность применения препаратов РФТ при сердечной и сосудистой патологии и ее осложнениях. Полученные теоретические и практические знания свидетельствуют о том, что использование РФТ является новым перспективным направлением современной медицины. Между тем, существующие технологии получения РФТ для применения в клинике характеризуются значительной вариабельностью по количеству забранной крови, применению аутоплазмы, удалению лейкоцитов, использованию тромбина, хлористого кальция и других компонентов [12, 13, 14]. Отсутствие стандартизированной полномасштабной технологии полу-

чения аллогенных препаратов РФТ пока сдерживает их широкое применение в лечебной практике. Это потребовало разработки стандартизированного метода получения плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов (ПОРФТ) из аутокрови пациентов для клинического применения, что недавно было осуществлено [15]. В этой связи возникла необходимость изучения лечебных свойств и методов применения данного средства с целью улучшения результатов оказания помощи пациентам с повреждениями кожи при сахарном диабете. Для изучения биологической активности ПОРФТ в предварительном эксперименте необходимо было наносить непосредственно на раневую поверхность у животных. Оказалось, что образцы ПОРФТ представляющие собой жидкую субстанцию при нанесении на раневую поверхность локально не фиксировались и частично вытекали за пределы раны. Это в свою очередь потребовало разработки и изучения *in vitro* возможностей создания из образцов ПОРФТ фиксирующегося геля.

Цель исследования: выявить оптимальные ингредиенты, возможности и условия создания из образцов ПОРФТ геля, пригодного для нанесения на раневую поверхность при СД.

Материалы и методы

ПОРФТ получали из концентрата тромбоцитов (КТ) здоровых доноров крови, приготовленного согласно «Инструкции о порядке осуществления организациями переливания крови заготовки, переработки, хранения, реализации крови и ее компонентов на территории Республики Беларусь», утвержденной постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 19.05.2011 г. № 38. Из дозы цельной крови от здорового донора получали КТ в объеме 40–50 мл. Тромбоциты концентрировали центрифугированием (20 минут при 2500 оборотов в минуту) в 2 и 4 раза от исходного объема КТ. После центрифугирования 50 % супернатанта отбирали для дальнейшего использования в качестве контрольной плазмы. Нижнюю часть плазмы, содержащую осадок из тромбоцитов с примесью лейкоцитов ресуспендировали до гомогенной взвеси для использования в дальнейшем в качестве ПОРФТ.

Методика изучения *in vitro* создания из образцов ПОРФТ фиксирующегося геля состояла в следующем. На поверхность чашки Петри наносили ПОРФТ (рядом для контроля наносили образцы плазмы крови) и смешивали их с различными активаторами гелеобразования в разных объемных соотношениях (1:1 и 1:2). В качестве активаторов использовали: хлорид кальция (10 % раствор), глюконат кальция (10 % раствор), аprotинин (5000ЕД/мл), тромбин (100ЕД/мл). Образование геля после добавления оценивали визуально, время фиксирования с помощью секундомера, свойство фиксации определяли наклонным положением чашки Петри с углом в 90°, исследования повторяли не менее трех раз.

Результаты и обсуждение

В процессе разработки метода получения геля ПОРФТ для нанесения на раневую поверхность при СД использовали следующие варианты постановки эксперимента:

а) На поверхность чашки Петри отдельно наносили 2 капли 10 % раствора хлористого кальция. В одну каплю вносили образец цельной плазмы, в другую – ПОРФТ (использовали образцы № 2385212 от 24.04.13, № 2385637 от 22.05.13, № 2385613 от 04.06.13). Компоненты смешивали в соотношении 1:1 и 1:2.

б) На поверхность чашки наносили 2 капли 10 % раствора глюконата кальция. В одну каплю вносили образец цельной плазмы, в другую – ПОРФТ. Компоненты смешивали в соотношении 1:1 и 1:2.

в) На поверхность чашки наносили 2 капли раствора аprotинина (5000ЕД/мл). В одну каплю вносили образец цельной плазмы, в другую – ПОРФТ. Компоненты смешивали в соотношении 1:1 и 1:2.

г) Данную процедуру повторяли со смесью глюконата кальция и аprotинина в тех же пропорциях.

д) Затем эксперимент выполняли в обратном порядке – вначале на поверхность чашки Петри отдельно наносили по 2 капли образца ПОРФТ и контрольной плазмы. В каждую каплю, круговыми движениями до-

бавляли в соотношении 1:1 и 2:1 раствор тромбина в рабочем разведении 100, 50, 20, 10 или 5 ЕД/мл и смешивали.

е) Процедуру, указанную в пункте д, повторяли в присутствии глюконата кальция.

Результаты эксперимента представлены в таблице 1.

Как следует из таблицы 1, хлористый кальций и аprotинин обладали слабовыраженным гелеобразующим действием в отношении образцов плазмы и ПОРФТ. В присутствии глюконата кальция время гелеобразования было значительно меньше как у образцов ПОРФТ, так и плазмы. Тромбин обладал наиболее сильным гелеобразующим действием. При концентрации тромбина 100 ЕД/мл образцы ПОРФТ имели более быстрое образование геля по сравнению с контрольной плазмой.

Отобранный в качестве подходящего активатора гелеобразования тромбин был использован для дальнейших экспериментов с целью определения эффективной дозы для гелеобразования ПОРФТ в промежутке времени (15–20 секунд), наиболее удобного при нанесении на раны кожи. Результаты изучения гелеобразования ПОРФТ и плазмы крови в зависимости от концентрации тромбина и присутствия глюконата кальция представлены в таблице 2.

Таблица 1. Время формирования геля образцов плазмы или ПОРФТ в присутствии различных активаторов

Активатор образования геля	Время гелеобразования (мин.) [§]			
	Контрольная плазма		ПОРФТ	
	1:1	2:1	1:1	2:1
Хлористый кальций	81±1,73	83±1,15	81±0,58	82,3±0,88
Глюконат кальция	24,7±0,33	14,4±0,51	11,3±0,33 (t = 0,002)*	8,4±0,68 (t = 0,0001)
Аprotинин	Нет реакции	Нет реакции	66±0,58	50±0
Аprotинин с глюконатом кальция	26,3±0,33	17±1,15	13±1,15 (t = 0,0004)	7,7±0,33 (t = 0,0015)
Тромбин 100ЕД/мл	7±2,16	11,75±3,35	2,75±0,85 (t = 0,12)	4,75±0,25 (t = 0,08)
Тромбин 100ЕД/мл с глюконатом кальция	9,5±2,6	15,25±4,6	4±0,41 (t = 0,08)	7±0,41 (t = 0,12)

Примечание: * – показана достоверность различий ПОРФТ и контрольной плазмы в соответствующих разведениях; § – для тромбина время гелеобразования указано в секундах.

Таблица 2. Зависимость времени образования геля плазмы и ПОРФТ от концентрации тромбина и присутствия глюконата кальция

Активатор образования геля	Время гелеобразования (секунды)			
	Плазма крови		ПОРФТ	
	1:1	2:1	1:1	2:1
Тромбин 100 ЕД/мл	7 ±2,16	11,75±3,35	2,75±0,85 (t = 0,12)	4,75±0,25 (t = 0,08)
Тромбин 50 ЕД/мл	10,5 ±6,54	19,5±6,59	5,75±1,03	11,5±1,71
Тромбин 20 ЕД/мл	9,33 ±0,88	30 ±9,46	10±1,22 (t = 0,7)	16,25±1,97 (t = 0,2)
Тромбин 10 ЕД/мл	10,67±0,67	30,3±2,6	14,75±1,7 (t = 0,12)	22±1,47 (t = 0,08)
Тромбин 5 ЕД/мл	18 ±2	36,67±3,33	22,25±2,66	34 ±2,48 (t = 0,08)
Тромбин 100 ЕД/мл с глюконатом кальция	9,5±2,6	15,25±4,6	4±0,41 (t = 0,08)	7 ±0,41 (t = 0,12)
Тромбин 50 ЕД/мл с глюконатом кальция	17 ±7,45	21 ±8,23	7,5±0,87	12,75 ±2,59 (t = 0,082)
Тромбин 20 ЕД/мл с глюконатом кальция	20,75±6,97	27 ±6,65	12,75±1,65	17,5±1,55 (t = 0,21)
Тромбин 10 ЕД/мл с глюконатом Са	24,5±6,96	30±1,15	17±1,78 (t = 0,08)	25 ±2,04 (t = 0,12)
Тромбин 5 ЕД/мл с глюконатом кальция	31,5±8,5	42,75±5,72	24,75±3,77	35,25 ±4,03

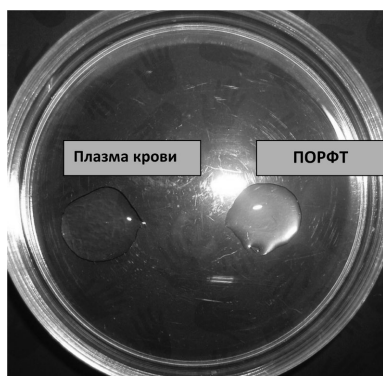


Рис. 1. Гелеобразование из плазмы крови и ПОРФТ с использованием концентрации тромбина 20 ЕД/мл в соотношении 2:1 и присутствии глюконата кальция

Как следует из таблицы 2, гелеобразование плазмы и ПОРФТ замедляется при снижении концентрации тромбина. При этом достоверно различается время образования геля ПОРФТ в присутствии 100 ЕД/мл и 20 ЕД/мл тромбина независимо от присутствия глюконата кальция ($p = 0,0028$ и $p = 0,002$ соответственно). Присутствие глюконата кальция, обычно используемого для активации ПОРФТ, хотя и замедляло, однако существенно не влияло на время гелеобразования в образцах цельной плазмы и ПОРФТ под действием тромбина. Установлено, что высокие концентрации тромбина (100 и 50 ЕД/мл) способствуют очень быстрому образованию геля в образцах ПОРФТ, даже более быстрому по сравнению с образцами контрольной плазмы ($p > 0,05$). Использование таких концентраций тромбина (100 и 50 ЕД/мл) приводило к гелеобразованию ещё в процессе смешивания компонентов, что препятствовало равномерному распределению ПОРФТ на поверхности. Согласно клинических требований, гелеобразные лекарственные вещества для местного применения следует наносить и равномерно распределять по раневой поверхности. Поэтому применение данного варианта ПОРФТ в клинической практике оказалось бы неприемлемым. Концентрация тромбина 20 ЕД в присутствии глюконата кальция в соотношении 2:1 признана оптимальной, так как её использование позволяло равномерно смешать и распределить компоненты на поверхности заданной площади до полного гелеобразования смеси. При этом гель из ПОРФТ имел белесовато-мутный вид и плотную, упругую консистенцию, а также достаточную адгезивную способность и не стекал при наклонном 90° положении чашки Петри. Гель из цельной плазмы имел более прозрачную структуру с выраженными включениями и более жидкую консистенцию (рисунок 1). Добавление в смесь раствора глюконата кальция не оказывало существенно изменения на скорость реакции гелеобразования.

Таким образом, в результате исследования выявлены возможности, условия и метод формирования геля из образцов ПОРФТ для нанесения на раневую поверхность животных с экспериментальной моделью СД.

Выводы

1. При сравнительной оценке установлено, что изученные активаторы оказывают различное влияние на время гелеобразования образцов ПОРФТ, оптимальным для этой цели является тромбин.
2. При исследовании зависимости от объемных соотношений, концентрации тромбина и присутствия солей кальция, выявлен наиболее приемлемый из них вариант.
3. Оптимальным для нанесения на кожные раны при модели СД с позиций гелеобразования и адгезивности является метод получения геля ПОРФТ путем добавления тромбина 20 ЕД/мл в соотношении 2:1 в присутствии глюконата кальция.

Литература

1. Дедов ИИ, Анциферов МБ, Галстян ГР, Токмакова АЮ. Синдром диабетической стопы. – М., ФДЦ МЗ РФ, 1998. – Т. 4. Dedov II, Ancipherov MB, Galstyan GR, Tokmackova AJu. Diabetic foot syndrome. – М. FDC MH RF; 1998. – В. 4.
2. Laing P. The development and complications of diabetic foot ulcers. *American J. Surgery.* 1998; 176 (Suppl 2A): 11S-19S.
3. Воробьев А. И. Руководство по гематологии. – М., Медицина, 1985, т. 2.
4. Pietrzak WS, Eppley BL. Platelet rich plasma: biology and new technology. *J Craniofac Surg* 2005;16:1043–54.
5. Peddinghaus M. E., Tormey C. A. Platelet-related bleeding: an update on diagnostic modalities and therapeutic options. *Clin. Lab. Med.* 2009; 29: 175–191.
6. Knighton DR, Ciresi KF, Fiegel VD et al (1990) Stimulation of repair in chronic non healing cutaneous ulcers using platelet-derived wound healing formula. *Surg Gynecol Obstet* 170(1):56–60.
7. Whitman D. H. et al. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 1997; 55: 1294–1299
8. Marx, R. E. et al. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Ended.* 1998; 85: 638–646
9. Ganio C, Tenewitz FE, Wilson RC et al (1993) The treatment of chronic nonhealing wounds using autologo platelet-derived growth factors. *J Foot Ankle Surg* 32(3):263–267.
10. Anitua E. Plasma rich in growth factors: Preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999; 14: 529–535.
11. Sanchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor: a current review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003;18:93–103.
12. Mazzucco L., Medici D, Serra M., Panizza R., Rivara G., Orecchia S., Libener R., Cattana E., Levis A., Giacomo Betta P., Borzini P. The use of autologous platelet gel to treat difficult-to-heal wounds: a pilot study // *Transfusion.* – 2004. – Vol. 44. – P. 1013–1018.
13. Borzini P., Mazzucco P. Tissue regeneration and in loco administration of platelet derivatives: clinical outcome, heterogeneous products, and heterogeneity of the effector mechanisms // *Transfusion.* – 2005. – Vol. 45. – P. 1759–1767.
14. Cielic-Bielecka A., Cieslik-Bielecka, A., Bielecki T., Gazdzik T. S., Arendt J., Krol W., Szczepanski T. Autologous platelets and leukocytes can improve healing of infected high-energy soft tissue injury.
15. Потанев М. П. и соавт. «Инструкция на метод получения плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов» от 11.06.2013, утверждена НТС БГМУ № 5 07.06.2013. Поступила 13.12.2017 г.