

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕДИАТОРЫ ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЫ

Богдан М.В., Колб А.В.

Белорусский государственный медицинский университет,
кафедра биологической химии, г. Минск

Ключевые слова: обогащенная тромбоцитами плазма, фибробласты, тромбоцитарные факторы роста, фактор некроза опухоли.

Резюме: Проведенными исследованиями установлен высокий уровень концентрации тромбоцитарного фактора роста-BB в обогащенной тромбоцитами плазме, который сохраняется на протяжении трех суток. Выявлено стимулирующее влияние обогащенной тромбоцитами плазмы на синтез фактора некроза опухоли- α в культуре фибробластов кожи человека.

Resume: High concentration of platelet-derived growth factor-BB in platelet-rich plasma, which lasts for three days is established by the conducted researches. The stimulating effect of platelet-rich plasma on the synthesis of tumor necrosis factor- α in the culture of human skin fibroblasts was identified.

Актуальность. Обогащенная тромбоцитами плазма (ОТП) представляет собой биологический продукт, получаемый из аутологичной крови человека и содержащий высокое число тромбоцитов (более 1 000 000/мкл) в небольшом количестве плазмы. Стимулирующий эффект ОТП обусловлен высоким содержанием биологических медиаторов (ростовых факторов), которые высвобождаются из альфа-гранул при активации тромбоцитов. Практический интерес представляет определение биологических медиаторов как в ОТП, так и в культуре фибробластов с ОТП (как экспериментальной модели *in vitro* лишенной посторонних влияний) с оценкой динамики их изменения [1-3].

Цель: установить динамику изменения уровня биологических медиаторов в обогащенной тромбоцитами плазме изолированно и при культивировании в ней фибробластов кожи человека.

Задачи: 1. Сравнить уровень концентрации тромбоцитарного фактора роста-BB в обогащенной тромбоцитами плазме и плазме крови; 2. Установить длительность сохранения достаточного уровня концентрации тромбоцитарного фактора роста-BB в обогащенной тромбоцитами плазме; 3. Установить влияние обогащенной тромбоцитами плазмы на фактор некроза опухоли- α в культуре клеток фибробластов кожи человека.

Материал и методы. В качестве материала для исследования использовали обогащенную тромбоцитами плазму и культуру фибробластов кожи человека.

Забор биологического материала (фрагмент кожи размером 1 см²) выполняли под местной анестезией у 5 пациентов (все женщины, средний возраст 52,9±4,3 лет) во время операции после оформления информированного согласия.

Для выделения фибробластов полученный материал инкубировали в 0,25% диспазе в течение 24 часов для расслоения по базальной мембране и отделения дермы от эпидермиса. Дерму нарезали на участки размером 0,5 см² и инкубировали в

течение 2 часов с 0,2% раствором коллагеназы I типа (Sigma, США) в фосфатном буфере.

Для культивирования фибробластов кожи человека культуры фибробластов ($n=5$) высевали в концентрации 2×10^4 клеток на 1 см^2 в культуральной среде DMEM-LG (Sigma, США), содержащей 2 mM L-глутамина, антибиотика (50 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина и 100 мкг/мл неомицина) и в 10% аутологичной обогащенной тромбоцитами плазме в культуральные чашки диаметром 60 мм (рис. 1).

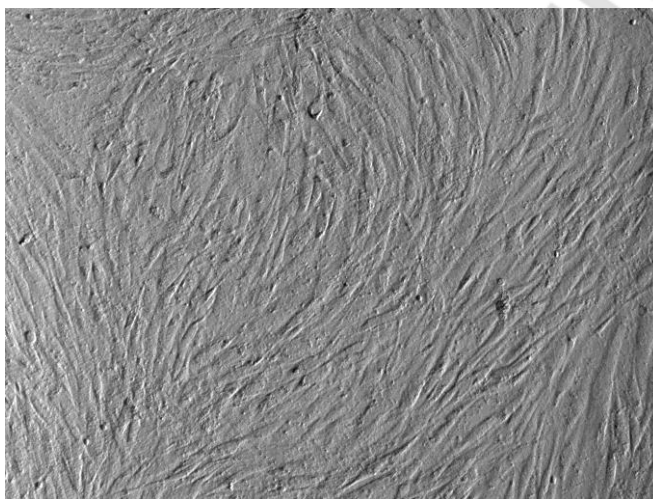


Рис. 1 – Культура фибробластов кожи человека (увеличение $\times 100$)

Получение обогащенной тромбоцитами плазмы проводили путем забора 6 мл крови пациента в стерильные пластиковые пробирки, содержащие 1 мл 3,8% раствора цитрата натрия в качестве антикоагулянта. Затем проводили центрифугирование пробирок в течение 20 минут с числом оборотов 2000 в минуту. После центрифугирования в пробирках происходило разделение крови на три слоя (рис. 2).

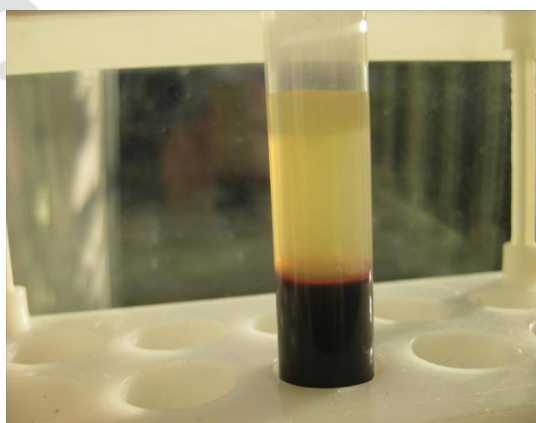


Рис. 2 – Образец центрифугированной крови с 3,8% раствором цитрата натрия

Два верхних слоя (за исключением нижнего – эритроцитарного) собирали шприцем и разводили в необходимом количестве плазмы.

Количественное определение концентрации тромбоцитарного фактора роста-ВВ(ТФР-ВВ) проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием тест-системы производства RgDSystems (США). Результаты ИФА регистрировали с помощью спектрофотометра BRIO-SIRIO (SEAC, Италия), измеряя оптическую плотность при длине волны 450 нм.

Продукция фактора некроза опухоли- α (ФНО- α) оценивалась в 3-х дневных супернатантах культур фибробластов кожи. Количественное определение концентрации ФНО- α проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием тест-системы производства «Вектор-Бест» (Россия). Результаты регистрировали на спектрофотометре BRIO-SIRIO (SEAC, Италия), измеряя оптическую плотность в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – 620 нм.

Определение концентрации ТФР-ВВ и ФНО- α проводили в 10% ОТП изолированно и при культивировании в ней фибробластов кожи человека.

Статистическая обработка данных осуществлена с применением прикладного программного пакета «STATISTICA 6,0». Для сравнения динамики изменения показателя в исследуемых группах использовали критерий Уилкоксона для парных сравнений. При сравнении показателей в независимых группах применяли U тест Манна-Уитни. Результаты представлены в формате Me (25-й-75-й процентиля). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В 10% обогащенной тромбоцитами плазме выявлена более высокая ($p < 0,05$) концентрация ТФР-ВВ (3012,2 (2874,4-3125,4) пг/мл) в сравнении с плазмой крови (425,3 (197,4-531,5) пг/мл) (рис. 3).



Рис. 3 – Образцы цельной крови обогащенной тромбоцитами плазмы

Количественное определение концентрации ТФР-ВВ в культуре фибробластов кожи человека в среде с 10% ОТП позволило установить его прогрессирующее снижение вплоть до полного исчезновения на 6 сутки наблюдения, при достоверном ($p < 0,05$) падении концентрации в 2,6 раза на 3 сутки культивирования до 1198,4 (1023,8-2874,4) пг/мл (рис. 4).

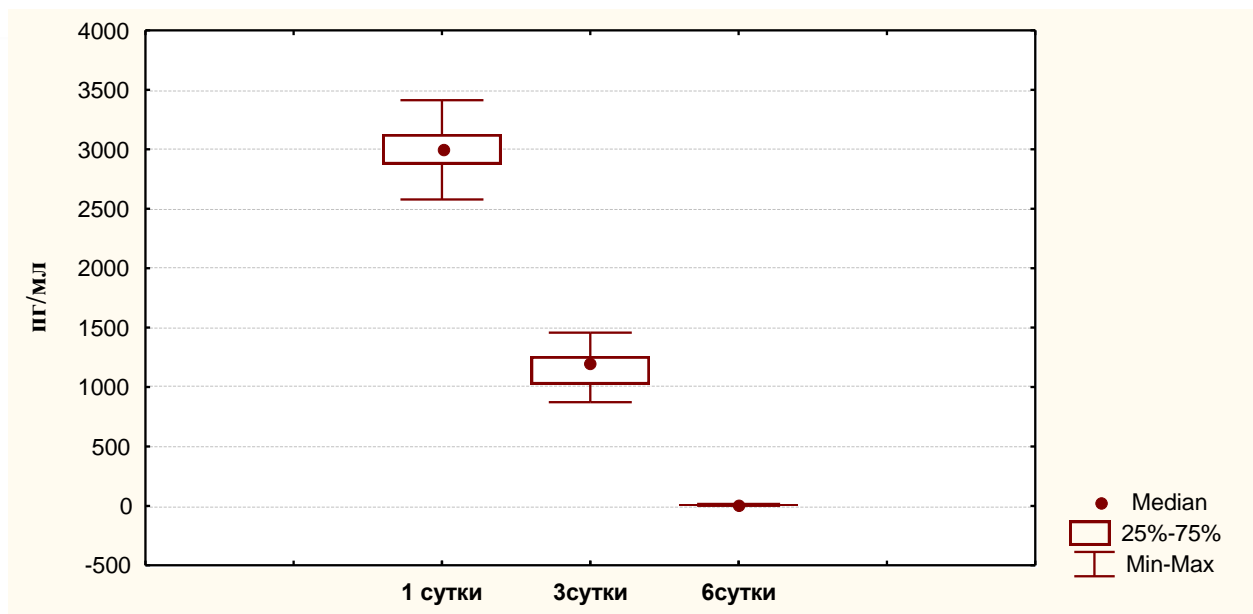


Рис. 4 – Концентрация тромбоцитарного фактора роста-BB в культуре фибробластов кожи человека в среде с 10% обогащенной тромбоцитами плазмой на 1, 3 и 6 сутки культивирования

Культивирование фибробластов кожи в 10% ОТП приводило к повышению ($p < 0,05$) в 2,9 раза исходного уровня ФНО- α (3,2 (2,3-4,4) пг/мл) до 7,3 (6,2-8,8) пг/мл (рис 5.).

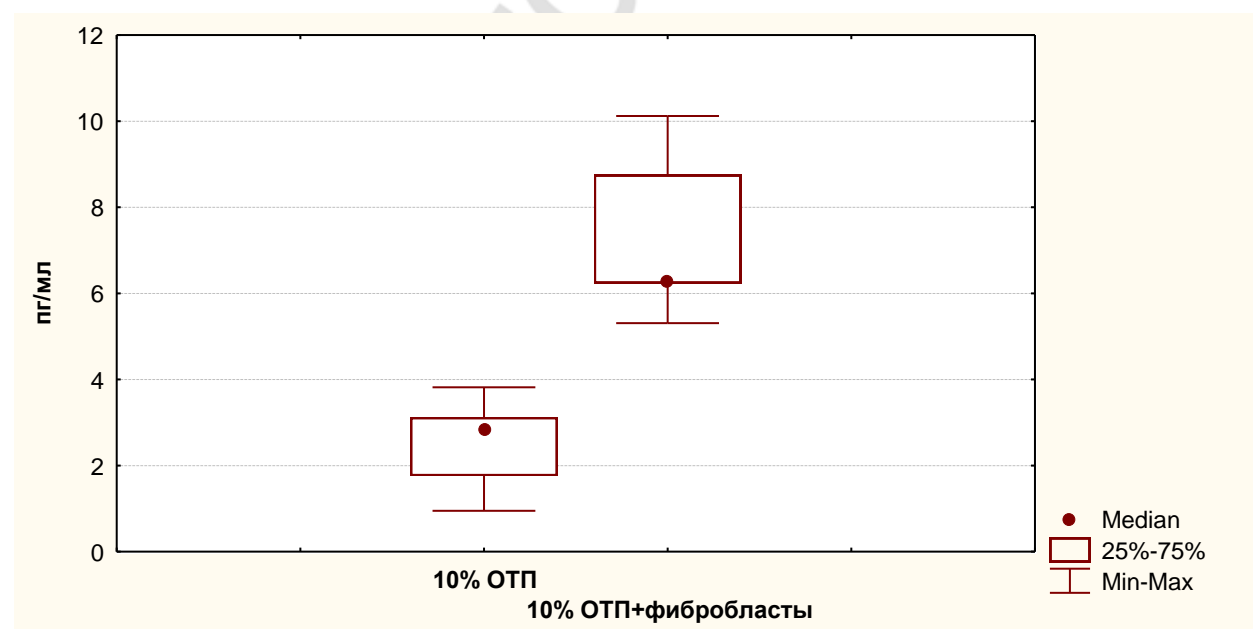


Рис. 5 – Концентрация фактора некроза опухоли- α в 10% обогащенной тромбоцитами плазме изолированно и в культуре фибробластов кожи человека в среде с 10% обогащенной тромбоцитами плазмой

Выводы: 1. Обогащенная тромбоцитами плазма характеризуется более высоким по сравнению с плазмой крови уровнем концентрации тромбоцитарного фактора роста-BB. 2. Длительность сохранения достаточного уровня концентрации тромбоцитарного фактора роста-BB в обогащённой тромбоцитами плазме не превышает трех суток. 3. Обогащённая тромбоцитами плазма активирует синтез фактора некроза опухоли- α в культуре фибробластов кожи человека.

Литература

1. Толстов, Д.А. Тромбоцитарные концентраты: классификация, технологии получения, биологические эффекты / Д.А. Толстов, В.Г. Богдан // Военная медицина. – 2012. - №3. – С.141-144.
2. Dohan, E. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) / E. Dohan, L. Rasmuson, T. Albrektsson // Trends Biotechnol. – 2009. – Vol.27, №3. – P.158-167.
3. Marx, R.E. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? / R.E. Marx // Implant dentistry. – 2001. – Vol.10, №4. – P.225-228.