

## БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ТРОМБОЦИТАРНЫХ КОНЦЕНТРАТОВ В КУЛЬТУРЕ ФИБРОБЛАСТОВ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА

Военно-медицинский факультет

в УО «Белорусский государственный медицинский университет»,<sup>1</sup>

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»<sup>2</sup>

---

Выявленное нами многофакторное биологическое влияние тромбоцитарных концентратов на культуру фибробластов кожи является экспериментальным обоснованием целесообразности использования обогащенной тромбоцитами плазмы и обогащенного тромбоцитами фибринового матрикса в клинической практике для стимуляции процессов естественной репарации.

**Ключевые слова:** фибробласты кожи, тромбоцитарные концентраты, тромбоцитарный фактор роста, фактор некроза опухоли- $\alpha$ , стимуляция репарации.

**V. G. Bogdan, D. A. Tolstoi, S. S. Bagatka, M. M. Zafranskaya**

### **BIOLOGICAL EFFECTS OF PLATELET CONCENTRATES IN THE CULTURE OF HUMAN DERMAL FIBROBLASTS**

*The multiple-factor biological influence of platelet concentrates revealed by us on culture skin fibroblasts is experimental justification of expediency of use platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in clinical practice for stimulation of processes of a natural reparation.*

**Key words:** skin fibroblasts, trombositarny concentrates, platelet growth factor, tumor necrosis factor- $\alpha$ , stimulation of reparation.

---

Существующие многочисленные методы в определенной степени позволили решить проблему лечения трофических язв с сохранением длительных сроков заживления язвенных дефектов. Основной причиной этого является отсутствие прямого позитивного влияния на сниженные репаративные процессы в области язвы [1-3]. Естественная регенерация ран является сложным биологическим механизмом с многоступенчатой регуляцией факторами роста. Существующие коммерческие препараты рекомбинантных (экзогенных) ростовых факторов для стимуляции естественной репарации при локальном использовании не нашли широкого применения в клинической практике по ряду причин: кратковременность действия вследствие раз-

рушения в кислой среде раневого экссудата, быстрое вымывание из раны, высокая стоимость препарата, неэффективность при обширных трофических язвах из-за отсутствия клеток-мишеней в зоне повреждения [4].

Наиболее доступными носителями биологических факторов роста являются тромбоциты. Среди веществ, высвобождаемых при дегрануляции  $\alpha$ -гранул тромбоцитов важное значение имеют факторы роста, которые влияют на тканевую регенерацию посредством аутокринного и паракринного механизмов. В клинической практике используют различные варианты получения тромбоцитарных концентратов, с содержанием тромбоцитов не ниже  $1 \times 10^6$  /мкл, которые разделяют на 2 основные категории: обогащенная тромбо-

цитами плазма (platelet-rich plasma-PRP) и обогащенный тромбоцитами фибрин (platelet-rich fibrin-PRF). Отдельные исследователи дополнительно выделяют ещё 2 вида: плазма, обогащенная тромбоцитами и лейкоцитами (leucocyte-rich PRP, L-PRP) и фибрин, обогащенный тромбоцитами и лейкоцитами (leucocyte-rich PRF, L-PRF) [5, 6].

В свете современных представлений о фибропластическом диффероне фибробласты рассматриваются в качестве ключевого эффектора, так и точки приложения разнообразных биологических воздействий в регенерационной медицине [7]. Опубликованные результаты исследований, проведенных *in vitro*, установили различный характер влияния обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП) на пролиферацию целого ряда клеток: остеобластов, фибробластов, мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и жировой ткани, хондроцитов-как стимулирующей, так и ингибирующей направленности. В настоящее время этот вопрос по-прежнему остается открытым, в т.ч. из-за множества протоколов получения концентратов. Эта причина является основной и в большой разбежке уровня концентрации основных ростовых факторов, содержащихся в ОТП, которые и определяют биологические эффекты [8-11].

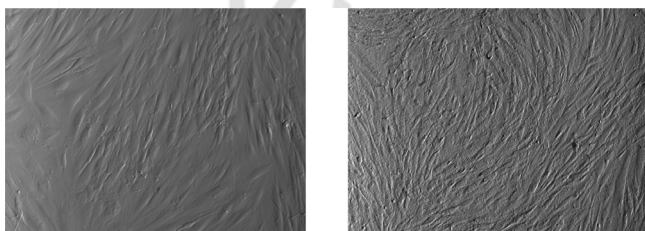
К важнейшим факторам роста относится тромбоцитарный фактор роста (ТФР), который является мощным стимулятором митогенеза фибробластов и репарации тканей, регулирует секрецию и синтез коллагена [5]. Фактор некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ) способствует ускорению наступления фазы регенерации, активирует пролиферацию фибробластов и продукцию профиброгенных факторов (ИЛ-1 $\beta$ , фактора роста фибробластов), компонентов внеклеточного матрикса, участвует в ремоделировании синтезируемой соединительной ткани [12-15].

Кроме того, представляет практический интерес определение биологических медиаторов именно в культуре фибробластов с ОТП (как экспериментальной модели *in vitro* лишенной посторонних влияний) с оценкой динамики их изменения. Недостаточно изученным так же является распределение и жизнеспособность фибробластов при длительном их нахождении в гелевой структуре тромбоцитарного концентрата (обогащенного тромбоцитами фибринового матрикса), представляющая собой 3D-матрикс из перекрещенных волокон фибрина. Изучение проблемных вопросов позволит обосновать целесообразность применения тромбоцитарных концентратов в клинической практике с целью стимуляции процессов регенерации и с уточнением параметров методики их применения.

**Цель исследования** – оценить влияние тромбоцитарных концентратов на культуры фибробластов кожи человека в экспериментальной модели *in vitro*.

**Материал и методы**

Культуры фибробластов кожи пациентов с трофическими язвами венозной этиологии.



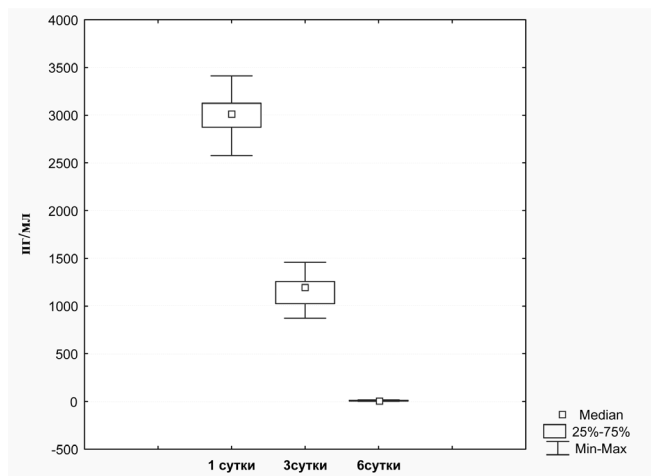
**Рисунок 1**-Морфология фибробластов кожи человека (3-й пассаж) при культивировании на 5 сутки в среде DMEM с 10% эмбриональной телячьей сывороткой (А) и с 10% обогащенной тромбоцитами плазмой человека (Б), ув.100.

**Выделение фибробластов кожи человека.** Забор биологического материала (фрагмент кожи размером 1см<sup>2</sup>) выполняли под местной анестезией у 5 пациентов (все женщины, средний возраст 52,9±4,3 лет) во время операции по закрытию хронической язвы кожным лоскутом после оформления информированного согласия. Для выделения фибробластов полученный материал инкубировали в 0,25% диспазе в течение 24 часов при 4°С для расслоения по базальной мембране и отделения дермы от эпидермиса. Дерму нарезали на участки размером 0,5см<sup>2</sup> и инкубировали в течение 2 часов с 0,2% раствором коллагеназы I типа (Sigma, США) в фосфатном буфере при 37°С.

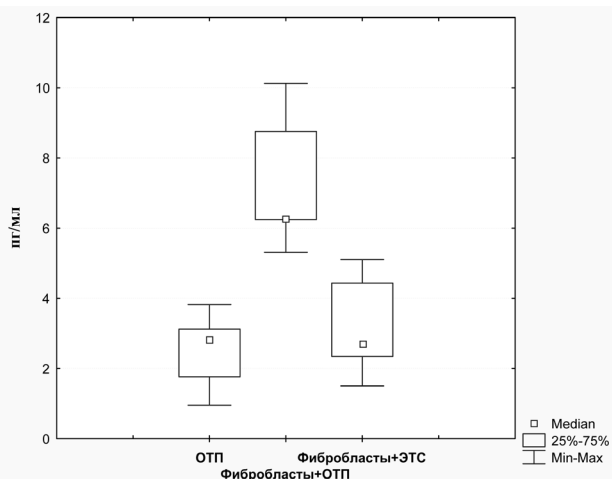
**Получение обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП).** В стерильные пластиковые пробирки, содержащие 1 мл 3,8% раствора цитрата натрия в качестве антикоагулянта, набирали по 6 мл крови пациента. Затем проводили центрифугирование пробирок в течение 20 минут с числом оборотов 2000 в минуту. После центрифугирования в пробирках происходило разделение крови на три слоя. Два верхних слоя (за исключением нижнего – эритроцитарного) собирали шприцем и разводили в необходимом количестве плазмы.

**Получение обогащенного тромбоцитами фибринового матрикса (ОТФМ).** К полученной ранее ОТП добавляли 10% раствор хлористого кальция для рекоагуляции из расчета 4 капли на 1 мл плазмы. В течение 5 минут происходила полимеризация смеси и превращение её в гель.

**Варианты культивирования фибробластов кожи человека.** Культуры фибробластов (n=5) высевали в концентрации 2x10<sup>4</sup> клеток на 1 см<sup>2</sup> в различные культуральные среды. В качестве среды-контроля использовали среду DMEM-LG (Sigma, США), содержащую 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 2 мМ L-глутамин, антибиотика (50 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина и 100 мкг/мл неомицина) в культуральные чашки диаметром 60 мм. Для оценки влияния тромбоцитарных концентратов на культуры фибробластов в пролиферативной среде проводили замену 10% ЭТС на 10% ОТП человека. Для оценки морфологии и жизнеспособности фибробластов, инкорпорированных в ПОТФ, полученной из аутоплазмы, клетки были разведены в ОТП, непосредственно перед добавлением 10% раствора хлористого кальция и полимеризацией фибриновых волокон с последующим культивированием в течение 2-х недель. Полная замена среды проводилась на 8 сутки куль-



**Рисунок 2**-Концентрация тромбоцитарного фактора роста-BB в культуре фибробластов кожи человека в среде с 10% обогащенной тромбоцитами плазмой на 1, 3 и 6 сутки культивирования



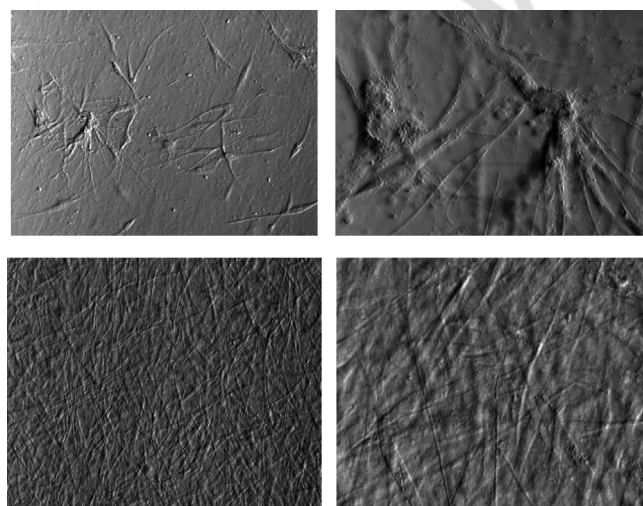
**Рисунок 3**—Концентрация фактора некроза опухоли- $\alpha$  в 10% обогащенной тромбоцитами плазме, культуре фибробластов кожи человека в среде с 10% обогащенной тромбоцитами плазмой и 10% эмбриональной телячьей сывороткой на 6 сутки культивирования

тивирования.

**Микроскопия и мониторинг клеточных культур.** Культуры исследовали на универсальном инвертированном микроскопе Carl Zeiss Axiovert 200 (Германия) с применением методов светлого поля, бокового освещения, фазового и Varel-контрастов.

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

**Оценка концентрации фактора некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ).** Продукция ФНО- $\alpha$  оценивалась в 3-х дневных супернатантах культур фибробластов кожи. Количественное

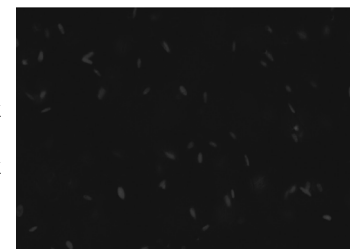


**Рисунок 4**—Морфология фибробластов человека 3-го пассажа, культивированных в обогащенной тромбоцитами фибриновом матриксе. Примечание: А – 1-е сутки культивирования, ув.100; Б – 1-е сутки культивирования, ув.400; В – 12-е сутки культивирования, ув.100; Г – 12-е сутки культивирования, ув.400.

определение концентрации ФНО- $\alpha$  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.

**Оценка жизнеспособности клеток.** Для оценки жизнеспособности клеток применялись методы витальной окраски с использованием различных красителей: трипанового синего, флюоресцентных красителей (акридинового оранжевого и Хекста 33342/пропидий йодида). При окрашивании трипановым синим 20 мкл суспензии исследуемых клеток смешивали с 20 мкл 0,2% раствора трипанового синего («Serva», Германия), приготовленного на забуференном физиологическом растворе (pH 7,4) с добавлением 0,02% (от объема) азида натрия, и подсчитывали общее число и число живых клеток в камере Горяева.

**Статистическая обработка данных.** Статистическую обработку полученных результатов исследований проводили с применением пакета прикладных программ «STATISTICA» (Version 6-Index, StatSoft Inc.). Данные проведенных исследований представлены в виде медиана (Me) и интерквартильный размах (25-й;-75-й проценти-ли). Для сравнения динамики изменения показателя в исследуемых группах использовали критерий Уилкоксона для парных сравнений (Wilcoxon matched pairs test). Для сравнения трех связанных групп использовали ранговый дисперсионный анализ по Фридмену. При сравнении показателей в независимых группах применяли U тест Манна-Уитни (Mann-Whitney U-test). Различия считали достоверными при  $p < 0,05$  [16].



**Рисунок 5**—Витальная окраска фибробластов человека 3-го пассажа, в обогащенной тромбоцитами фибриновом матриксе, 7 дней культивирования, ув.100.

### Результаты и обсуждение

Морфологический анализ культур фибробластов кожи человека при различных вариантах культивирования не выявил различий в полученных культурах, которые были представлены отростчатыми клетками веретенообразной формы (рис. 1). Вместе с тем, пролиферация клеток в ОТП характеризовалась формированием равномерного культурального слоя с высокой плотностью фибробластов, тогда как при нахождении в ЭТС отмечалось отсутствие однородности с многочисленными участками гипо-и гиперконфлюэнтности.

Выявленные качественные отличия в морфологической характеристике культур фибробластов подтверждаются динамикой изменения количества клеток при различных вариантах культивирования. Так, добавление в пролиферативную среду 10% обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП) на 6 сутки культивирования приводило к достоверному ( $p < 0,05$ ) увеличению концентрации фибробластов кожи ( $6,5 \times 10^4$  ( $6,2 \times 10^4$ - $9,2 \times 10^4$ ) клеток на  $1 \text{ см}^2$ ) по сравнению со средой контроля ( $3,4 \times 10^4$  ( $2,6 \times 10^4$ - $4,3 \times 10^4$ ) клеток на  $1 \text{ см}^2$ ) и содержанием при первичном посеве ( $2 \times 10^4$  клеток на  $1 \text{ см}^2$ ) в 1,9 и в 3,3 раза, соответственно.

Значительно более высокая ( $p < 0,05$ ) концентрация тромбоцитарного фактора роста-BB (ТФР-BB) в 10% ОТП (3012,2 (2874,4-3125,4) пг/мл) в сравнении с плазмой крови (425,3

(197,4-531,5) пг/мл подтвердило эффективность используемой для получения ОТП методики.

Количественное определение концентрации ТФР-ВВ в культуре фибробластов кожи человека в среде с 10% ОТП позволило выявить прогрессирующее снижение содержания основного ростового фактора вплоть до полного его 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. 2).

Проведенное исследование показало, что ФНО- $\alpha$  содержится в 10% ОТП в небольших по сравнению с ТФР-ВВ концентрациях. Пассирование фибробластов в стандартных условиях в 10% ЭТС не сопровождается ростом концентрации ФНО- $\alpha$ . В месте с тем, при культивировании фибробластов кожи в 10% ОТП уровень ФНО- $\alpha$  достоверно ( $p < 0,05$ ) возрастает в 2,9 раза до 7,3 (6,2-8,8) пг/мл, при этом превышая значения ( $p < 0,05$ ) и при нахождении клеток в среде контроля (3,2 (2,3-4,4) пг/мл) (рис. 3).

Добавление раствора хлористого кальция к ОТП приводило к активации каскада свертывания с образованием фибрина из фибриногена, а также к активации и последующей дегрануляции тромбоцитов. Приготовленный таким образом фибриновый гель-ОТФМ приобретал гомогенную структуру. В первые дни культивирования в ОТФМ фибробласты имели веретеновидную форму со значительно удлиненными отростками с равномерным распределением клеток по всему объему матрикса (рис. 4А, Б). Дальнейшее нахождение клеток в матриксе приводило к миграции клеток из геля на поверхность культурального пластика. Кроме того, длительное культивирование проводило к формированию густой сети в толще ОТФМ, представленной как отростками фибробластов, так и многочисленными фибриновыми и коллагеновыми волокнами (рис. 4В, Г).

Проведена оценка жизнеспособности фибробластов, культивированных в обогащенном тромбоцитами фибриновом матриксе, с помощью методов витальной окраски клеток флуоресцентными красителями: Хекстом 33342 и йодистым пропидием (рис. 5).

Жизнеспособность клеток составила 95,8 (93,1-97,8)%.

### Выводы

1. Используемая нами методика эффективна для получения обогащенной тромбоцитами плазмы с высоким содержанием основного ростового фактора-тромбоцитарного фактора роста-ВВ.

2. Нами установлено, что одним из биологических эффектов влияния обогащенной тромбоцитами плазмы на фибробласты кожи является стимуляция их клеточной пролиферации без изменения морфологических особенности клеток.

3. Проведенные исследования установили, что вызывая повышение функциональной активности фибробластов кожи человека с ростом концентрации фактора некроза опухоли- $\alpha$ , обогащенная тромбоцитами плазма ускоряет наступления фазы регенерации, активирует пролиферацию фибробластов и продукцию компонентов внеклеточного матрикса.

4. Динамика изменения концентрации тромбоцитарно-

го фактора роста-ВВ в условиях в экспериментальной модели *in vitro* обосновывает временной интервал влияния (до 3 суток) и реализации эффекта биологического медиатора с необходимостью повторного введения на 6 сутки обогащенной тромбоцитами плазмы для продления позитивного влияния на репарацию тканей человека.

5. Фибробласты кожи, инкорпорированные в обогащенный тромбоцитами фибриновый матрикс, сохраняют высокий уровень жизнеспособности с высокой функциональной активностью.

6. Выявленное нами многофакторное биологическое влияние тромбоцитарных концентратов на культуру фибробластов кожи является экспериментальным обоснованием целесообразности использования обогащенной тромбоцитами плазмы и обогащенного тромбоцитами фибринового матрикса в клинической практике для стимуляции процессов естественной репарации.

### Литература

1. Основы клинической флебологии / Под ред. Ю. Л. Шевченко, Ю. М. Стойко, М. И. Лыткина – М.: Медицина, 2005.-С. 202 – 222.
2. Чур, Н. Н. Трофические язвы нижних конечностей / Н. Н. Чур, И. Н. Гришин, С. Н. Чур. – Мн.: Асобы, 2008. – 148 с.
3. Coleridge Smith P. D. Microcirculation in Venous Disease / P. D. Coleridge Smith. – Landes. Bioscience, 1998. – 234p.
4. Зорин, В. Л. Дermalные фибробласты для лечения дефектов кожи / В. Л. Зорин и др. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2009. – т.IV, №4. – – С.26 – 31.
5. Дудко, А. С. Обогащенная тромбоцитами плазма /А. С. Дудко // Стоматология. – 2003.-№3 (12). – С.2 – 5.
6. Dohan, DM Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF) / DM. Dohan, L. Rasmusson, T. Albrektsson // Trends Biotechnol. – 2009.-№3. – P.158 – 167.
7. Фибробласты дермы: особенности цитогенеза, цитофизиологии и возможности клинического применения /А.И. Зорина и др. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – т.6, №2. – С.15-25.
8. Platelet gel stimulates proliferation of human dermal fibroblasts in vitro / M. Krasna [et al.] // Acta Dermatovenereol. Alp. Panonica Adriat. – 2007. – №16. – P.105 – 110.
9. Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis / K. Akeda [et al.] // Osteoarthritis Cartilage – 2006.-№14. – P.1272 – 1280.
10. Effects of activated platelet concentrates on human primary cultures of fibroblasts and osteoblasts / E. Cenni [et al.] // J. Periodontol. – 2005. – №76. – P.323 – 328.
11. Effects of activated and nonactivated platelet-rich plasma on proliferation of human osteoblasts in vitro / J. Slapnicka [et al.] // J. Oral Maxillofac. Surg. – 2008.-№66. – P.297 – 301.
12. Салина, Т. Ю. Особенности продукции фактора некроза опухоли  $\alpha$  при туберкулезе легких и внелегочных локализациях / Т. Ю. Салина, Т. И. Морозова // Цитокины и воспаление. – 2010. – № 1. – P. 36-42.
13. Кевра, М. К. Фактор некроза опухоли: изучение роли в организме / М.К. Кевра // Медицинские новости. – 1995. – №8. – С. 3-22.
14. Kim, Y. S. TNF-alpha enhances engraftment of mesenchymal stem cells into infarcted myocardium / Y.S. Kim [et al.] // Front Biosci. – 2009. – Vol. 14. – № 14. – P. 2845-2856.
15. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  suppresses the induction of connective Tissue Growth Factor by Transforming Growth Factor- $\beta$  in normal and scleroderma fibroblasts / D.J. Abraham et al. // J. of biological chemistry – 2000. – Vol. 274, №20. – P. 15220-15225.
16. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с.