

## Резервуар факторов роста

### ЭФФЕКТИВНАЯ ЗАЩИТА, БЫСТРОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ!

**Cecilia Conz Georgios Karnatzikos Sara Bevilacqua Alberto Gobbi**

#### *Предложение о применении богатой тромбоцитами плазмы крови (PRP) – аутологического ускорителя процесса заживления – для лечения хрящевых повреждений коленного сустава*

В настоящее время в Италии более 7 миллионов человек страдают артрозом: каждый пятый житель в возрасте старше 50 лет имеет нарушения здоровья, связанные со старением суставов, поэтому социальная стоимость артроза чрезвычайно высока и постоянно растет. Сегодня благодаря биоортопедии открываются новые горизонты в лечении старения суставов: новые терапевтические методы лечения повреждений двигательного аппарата и восстановление тканей используют природные возможности защиты и излечения человеческого тела. Действительно, после каждого повреждения или травмы организм приводит в действие серию механизмов восстановления здоровья. В этих процессах тромбоциты, белые кровяные шарики и стволовые клетки играют основную роль. Между клетками, участвующими в механизмах восстановления ткани, присутствуют тромбоциты (рис. 1), которые можно сконцентрировать и использовать как в виде раствора, так и в виде тромбоцитного геля.

#### **Биоортопедический материал:**

Новое средство, способствующее работе природных механизмов излечения посредством изолирования, концентрации или выращивания *in vitro* внутри клеток, позволяющее при этом использовать их как биологический механизм восстановления повреждений.

#### **Тромбоцитные концентраты**

Тромбоцитные концентраты применяются для стимулирования восстановительных процессов ткани в различных участках тела. Поначалу они использовались для лечения гемморрагических состояний, обусловленных тромбоцитопенией, острой лейкемией или в общей хирургии, затем производные крови в виде фибринового клея стали использоваться в качестве герметиков для защиты анастомоза и как стимул для процесса выздоровления и заживление ран (таблица 1). В 1987 году Ferrari e coll. внедрили фибриновый клей в кардиохирургию с целью ограничения кровопотерь, а впоследствии Уитмен применил тромбоцитный концентрат вместо фибринового клея. После этих предварительных экспериментов в результате научного исследования была доказана первостепенная биологическая роль, которую тромбоциты играют в процессе заживления ран. Рациональное зерно применения тромбоцитов в лечебных целях заключается в том, что они способны создавать факторы роста, способные содействовать регенерации тканей. Действительно, следует подчеркнуть, что тромбоциты обладают многочисленными функциями помимо гемостаза: в частности, содержат различные факторы роста: тромбоцитарный фактор (PDGF, *platele-derived growth factor*), инсулиноподобный фактор (IGF-1, *insuline-like growth factor*), бета-трансформирующие факторы (TGF-бета, *transforming growth factor beta*), факторы регенерации клеток эпидермиса (EGF, *epidermal growth factor*), фибробласты (bFGF, *basic fibroblast growth factor*), сосудистые эндотелиальные структуры (VEGF, *vascular endothelial growth factor*). Эти вещества регулируют основные процессы восстановления тканей, хемотаксис, перемещение, дифференциацию клеток и синтез матрицы в клетках.

Таким образом, тромбоцитные концентраты играют роль стимуляторов природного кумулятивного эффекта выздоровления (рис. 2) и восстановления ткани через надфизиологическое выделение факторов, связанных с тромбоцитами, которые могут применяться непосредственно в местах лечебного воздействия. Поврежденная ткань, соприкасающаяся с концентратом, получает положительное воздействие от особого действия факторов роста, которые в состоянии взаимодействовать между собой и индивидуально с рецепторами, расположенными на поверхности клеток, а также с различными протеинами самой матрицы. В связи с многообразием взаимодействия факторов роста с клетками различного типа и влияния на размножение клеток необходимы более полные клинические заключения и научные исследования.

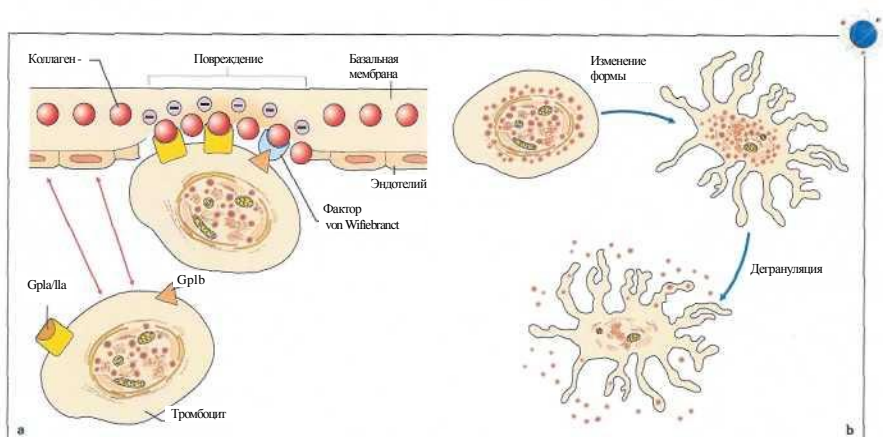
Martinez e coll.” отметили, что научные заключения относительно механизмов воздействия, безопасности и эффективности тромбоцитных концентратов являются еще недостаточными, и что исследования, проведенные на данный момент, имеют различные методологические ограничения: в будущем научный поиск должен быть сфокусирован на рандомизированных перспективных исследованиях, демонстрирующих безопасность и эффективность тромбоцитных концентратов в качестве альтернативы другим методам лечения.

### Приготовление богатой тромбоцитами плазмы крови

Богатая тромбоцитами плазма крови (PRP, *platelet-rich plasma*) готовится посредством забора периферической крови и ее центрифугирования; в последние годы в продаже появились различные устройства для приготовления тромбоцитного геля (ручные, полуавтоматические и полностью автоматизированные), позволяющие стандартизировать методику его получения и сделать ее доступной даже для неспециалистов. Методы и устройства, используемые для приготовления PRP и геля, предназначены для получения высокой плотности собранных тромбоцитов, поскольку различные исследования показали, что лечебное воздействие зависит от концентрации тромбоцитов, которая должна быть не менее чем в четыре-шесть раз выше физиологической концентрации (примерно 200.000 /мкл). Такая концентрация необходима, поскольку содержание факторов роста имеет большую индивидуальную изменчивость; кроме того, тромбоциты чрезвычайно чувствительны к механическим стрессам, связанным с забором и приготовлением, несущими высокий риск нарушения выделения факторов роста.

Рисунок 1

### Тромбоцитная адгезия

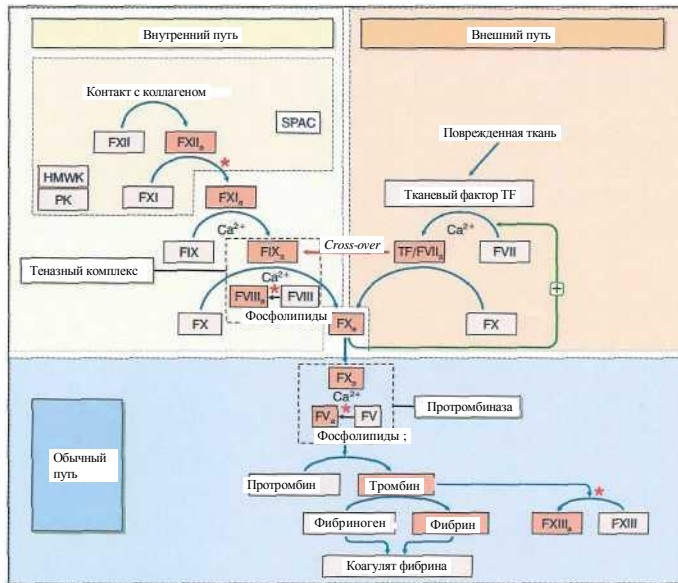


а) Целостный эндотелий и поверхность тромбоцита отталкиваются друг от друга (красные стрелки). Гибель эндотелия вызывает обнажение подэндотелиального коллагена, который связывает GpIa/IIa. GpIa/IIa соединяется с фактором фон Виллебранда (von Willebrand), который в свою очередь связан с коллагеном;

б) В результате адгезии тромбоциты приводят в действие механизмы преобразования, которые приводят к изменению формы и вызывают реакцию дегрануляции. (F. Conti, изд. “Fisiologia medica”, 2-е издание Edi. Ermes).

Рисунок 2

### Кумулятивный эффект коагуляции



SPAC, контактноактивируемая плазматическая система.

Звездочка указывает места действия тромбина. (Из "Fisiologia medica", 2-е издание Edi. Ermes 2010).

**Таблица 1: Фазы реакции тромбоцитов при поражении сосудов**

- ✓ Прилипание тромбоцитов к подэндотелию
- ✓ Активация тромбоцитов посредством инициирования процессов преобразования сигнала
- ✓ Изменение формы с выделением псевдоподий
- ✓ Секреция тромбоцитов с опорожнением содержимого гранул тромбоцитов
- ✓ Агрегация тромбоцитов:
  - первичная (обратимая) с формированием первичной гемостатической пробки
  - вторичная (необратимая) с формированием вторичной гемостатической пробки

Можно индуцировать образование геля, исходя из RPR, используя для этого прокоагулирующие ферменты, при этом структура сети фибрина, полимеризованного тромбоцитным агрегатом, будет зависеть от концентрации фибриногена; действительно, фибрин связывает и, следовательно, выделяет факторы роста производные тромбоцитов аналогично внеклеточной матрице вовлеченных тканей. Кинетика этого процесса поглощения и выделения отражается на возможности использования факторов роста на местном уровне и будет зависеть от концентрации самого фибриногена и от используемых прокоагулирующих ферментов. Для приготовления геля тромбоциты обычно активируются тромбином (аутологичным или животного происхождения), глюконатом кальция и прокоагулирующими ферментами, такими как батроксобин, который может привести к быстрой полимеризации фибрина; непосредственно вводимые растворы RPR могут быть активированы локально тромбином.

Существует несколько широко используемых типов продукта, которые могут отличаться между собой по нескольким параметрам, например: способ центрифугирования, концентрация тромбоцитов и лейкоцитов (объем, эффективность набора и хранения), наличие и концентрация фибрина.

Dohan Ehrenfest e coll. предложили классифицировать RPR по четырем различным категориям на основе содержания лейкоцитов и фибрина (Таблица 2). Те же авторы пришли к выводу, что мир тромбоцитных концентратов, используемых в хирургии, очень большой и нечетко определен, поэтому необходимо внести ясность в различные определения и области применения.

**Таблица 2: RPR: классификация на основе содержаний лейкоцитов и фибрина**

Сокращение	Состав
P-PRP	Плазма богатая тромбоцитами и бедная лейкоцитами
L-PRP	Плазма богатая тромбоцитами и лейкоцитами
P-PRF	Фибриновый гель богатый тромбоцитами
L-PRF	Фибриновый гель богатый лейкоцитами и тромбоцитами

### **Лечение хрящевых повреждений плазмой богатой тромбоцитами**

Гиалиновый хрящ обладает высокими характеристиками скольжения, сопротивления нагрузке и износу, которые обеспечивают прекрасное перемещение противоположных поверхностей. Поэтому при повреждении хряща необходимо восстановить целостность его поверхности для сохранения суставной функции. Однако эта ткань имеет ограниченный потенциал восстановления, а лечение таких повреждений представляет собой довольно трудную проблему для ортопедов. Действительно, в последние десятилетия был распространен метод замены поверхности сустава протезными материалами, характеризующимися ограниченной долговечностью, инвазивностью имплантата и высокой социальной стоимостью.

Сегодня новые технологии тканевой инженерии, возможность брать клетки из организма и выращивать их *in vitro*, или использовать мезенхимальные стволовые клетки (MSC) открыли новые горизонты в лечении травм и суставных заболеваний. Костно-хрящевое повреждение может быстро привести к артрозу, значительному снижению работоспособности и рекреативных способностей человека, что определяет его высокую социальную стоимость. Таким образом, в ближайшие пятьдесят лет необходимо решить задачу, связанную с предотвращением износа сустава и восстановлением поврежденной ткани (хряща, мышцы, связки), улучшая качество жизни человека и сокращая социальные расходы, связанные с установкой протеза и со снижением работоспособности у людей трудоспособного возраста. Перспективной регенеративной терапией и является использование аутологического ускорителя заживления, который используется сегодня для осуществления различных процедур, как хирургических, так и неинвазивных, для лечения мышечно-скелетных патологий с обещающими результатами. В частности, инфилтративный метод лечения с применением PRP в сочетании с подходящей диетой (контроль за массой тела), физической нагрузкой и правильным образом жизни может служить профилактическим средством в отношении дегенеративных суставных заболеваний. Nakagawa et coll. добились эффективности *in vitro* аутологической TRP в стимулировании размножения и синтезе коллагена хондроцитами человека, подсказывая применения этого метода при лечении хрящевых дефектов.

### Используемая технология

В ходе клинического исследования, проведенного в нашем учреждении, была применена швейцарская технология. Специальная технология приготовления геля, содержащегося в пробирках, позволяет, при заборе лишь 8 мл крови, сконцентрировать за один шаг центрифугирования (Рис. 1) оптимальное количество тромбоцитов ( $\geq 95$  % выработки тромбоцитов), сохраняя при этом неизменной метаболическую функциональность и адгезивное свойство.

Это связано, прежде всего, с необходимостью добиться максимальной выработки тромбоцитов, гарантии живучести, безопасности и простоты процесса приготовления.

PRP может быть получена только из крови, обработанной антикоагулянтами. Действительно, невозможно получить PRP ни из предварительно коагулированной цельной крови (поскольку тромбоциты являются неотъемлемой частью коагулята), ни из только одной порции сыворотки.

Приготовление начинается с забора небольшого количества периферической крови у пациента (8 мл) и происходит в самонаполняющейся пробирке. В пробирке находится специально запатентованный тиксотропический гель, предназначенный для разделения гемокомпонентов и 1 мл антикоагулянта (ACD-A аденозина цитрат-декстрозы). Такой состав способен связывать ионы кальция, тормозя таким образом кумулятивный эффект коагуляции. Следующий шаг состоит из единственного шага центрифугирования (150 оборотов x 9 мин.). В результате небольшой манипуляции можно получить 4,5 /5 мл RPR, физически отделенных от эритроцитарной составляющей благодаря разделительному гелю, который по окончании процесса центрифугирования оказывается между двумя этими частями. Прежде чем набрать RPR в шприц, предназначенный для внутрисуставной инъекции (Рис. 2), необходимо получить однородную концентрацию тромбоцитов во всем 5-миллилитровом объеме плазмы, вращая для этого пробирку вокруг оси; при этом по окончании центрифугирования тромбоцитарная и лейкоцитарная составляющая крови концентрируется на поверхности геля. Это явление лежит в основе подразделения 5 мл продукции в плазме бедной тромбоцитами (PPP) и PRP. В зависимости от того, будут ли использованы все полученные 5 мл PRP или часть ее в сплывающей порции будет удалена перед смешиванием, можно получить продукт, характеризующийся концентрацией тромбоцитов, от двух до четырех раз превышающей базовое значение. Применяемый метод является методом замкнутых контуров; итак, для обеспечения стерильности полученного биологического продукта пробирка вообще не открывается.



Рисунок 1  
Центрифугирование и последующее получение богатой тромбоцитами плазмы



Рисунок 2  
Приготовление и инъекция богатой тромбоцитами плазмы

**Таблица 3: Международное общество по восстановлению хрящевой ткани**  
(International Cartilage Repair Society)

**Артроскопическая классификация повреждений хряща**

	<b>Степень</b>	<b>Повреждения хряща</b>
0	Нормальная	Нет
Ia-Ib	Почти нормальная	Поверхностные повреждения
IIa-IIb	Ненормальная	Обширные повреждения в менее чем 50 % толщины хряща
IIIa-IIIb	Очень ненормальная	Обширные повреждения в более чем 50 % толщины хряща
IVa-IVb	Очень ненормальная	Обширные повреждения до подхрящевой кости

Akeda e coll. успешно вырастили хондроциты свиного происхождения с использованием PRP, демонстрируя высокий уровень пролиферации клеток, а также повышенный синтез протеогликанов и коллагена. В исследованиях, проведенных на лошадях, Frisbee e coll. выявили клинические и гистологические улучшения у особей, страдающих артрозом, после проведения курса лечения с использованием PRP. Кроме того, Well. e coll. в экспериментальном исследовании, проведенном на животных, показали, что внутрисуставная инъекция PRP с хондроцитами ведет к образованию новой хрящевой ткани. В различных клинических исследованиях Anitua e coll. показали, что внутрисуставная инъекция PRP может привести к увеличению выработки гиалуроновой кислоты, а также вызвать пролиферацию клеток. Sugat e coll. использовали плазму богатую факторами роста для лечения хрящевых повреждений у спортсменов, получив при этом неплохие результаты.

Kop e coll. изучали группу из 30 пациентов, страдающих дегенеративной симптоматической патологией суставов колена, которые были подвержены лечению недельными циклами из трех внутрисуставных инъекций PRP. Клиническое наблюдение, проведенное в течение 6 месяцев, показало положительный эффект на уровне функции суставов и симптомов, с улучшением на 85 % у пациентов моложе 60 лет, тогда как у пациентов старше 60 лет улучшение составило только 30 %. Недавно те же авторы представили сравнительное исследование, проведенное с гиалуроновой кислотой (HA, hyaluronic acid) и RPR у 91 пациента (средний возраст 50 лет), страдающих дегенеративными повреждениями; лучшие результаты были получены в группе пациентов, к которым применялось лечение с применением RPR.

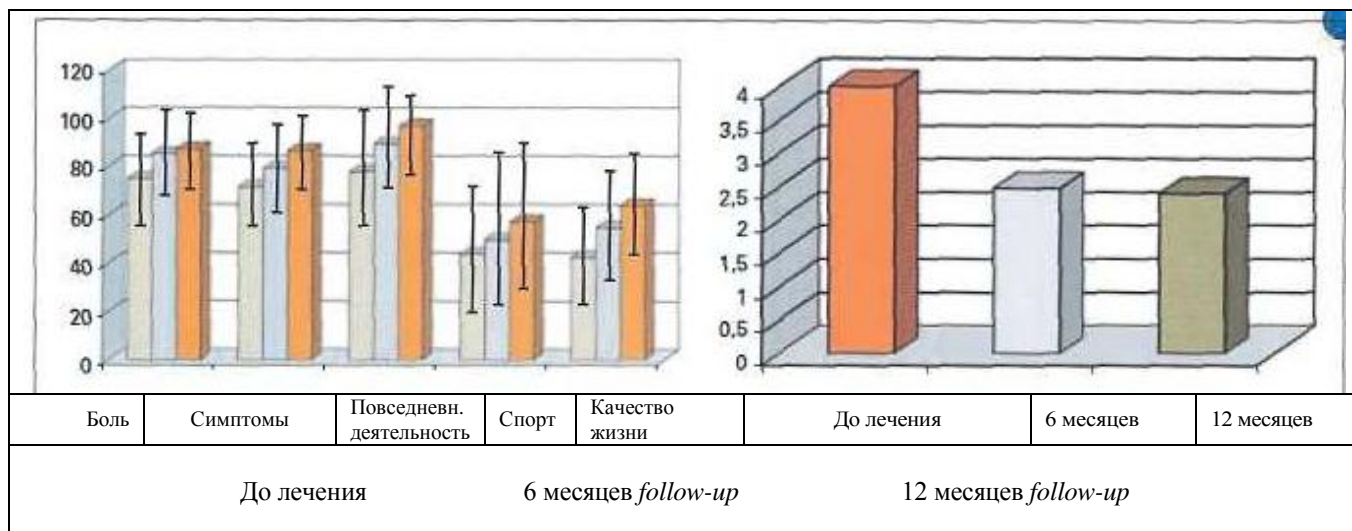
**Таблица 4: Значения по VAS и по вопроснику KOOS**

	<b>До лечения</b>	<b>Клиническое наблюдение после лечения</b>	
		<b>6 месяцев</b>	<b>12 месяцев</b>
<b>VAS</b>	3,8	2,1	2
<b>KOOS</b>			
Боль	71,11 ± 18,3	81,3 ± 17,4	83,5 ± 14,6
Симптомы	69,70 ± 16,9	76,3 ± 19	82,2 ± 14,4
Повсед. активность	76,1 ± 22,5	84,7 ± 21,4	91,1 ± 13,8
Спорт	40,3 ± 25,3	49,9 ± 30,6	55,4 ± 27,6
Качество жизни	38,87 ± 19,8	52,9 ± 21,9	60,13 ± 20,3

Наша группа провела исследование в группе из 50 пациентов (27 мужчин и 23 женщины, средний возраст 46,3 года ± 9,7), у которых с помощью МРТ (MRI) и артроскопии было выявлено повреждение хряща 3-й и 4-й степени в колене (классификация Международного общества по восстановлению хрящевой ткани (International Cartilage Repair Society), Таблица 3). Все пациенты занимались одним или несколькими видами спорта, некоторые даже на профессиональном уровне, половина из них ранее перенесли операции на колено (артроскопия, очищение суставов, обработка ран (*debridement*), микропереломы, частичная менискэктомия, восстановление передней крестообразной связки, вальгизирующая остеотомия большеберцовой кости). Пациентам делали по две внутрисуставные инъекции PRP с интервалом в один месяц. В целях осуществления клинического наблюдения пациентов попросили заполнить, перед лечением и по истечении шести месяцев после прохождения курса лечения (*follow-up*), сравнительную шкалу боли VAS (*Visual Analogue Score*) и вопросник Шкалы исхода травмы и остеоартроза коленного сустава KOOS (*Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score*). VAS позволяет классифицировать боль по десятибалльной системе: от 0 (боль отсутствует) до 10 (боль очень сильная), тогда как KOOS учитывает



субъективную симптоматику, то есть по стобальной системе от 0 (проблемное колено) до 100 (колено в норме) оценивается, как снижается качество повседневной жизни, занятие спортом. Полученные результаты являются исключительно положительными, поскольку показывают, что значения по вопроснику KOOS увеличиваются, в то же время значения по вопроснику VAS уменьшаются по окончании шести и двенадцати месяцев после лечения с последующим улучшением состояния пациента (Таблица 4, Рисунки 3 и 4).



**Рисунок 3**

Диаграммы показывают улучшения, полученные в период клинического наблюдения за 6 и 12 месяцев:

а) подгруппы вопросника KOOS;

б) после лечения с использованием PRP, остаются постоянными в течение 12 месяцев клинического наблюдения.

### Выводы

Биологический подход к повреждениям хряща представляет собой новый и прекрасный вызов. Инфильтративный метод лечения с применением PRP является обещающим терапевтическим выбором для лечения и предупреждения дегенеративных повреждений коленного хряща; предварительные результаты воодушевляют. Необходима стандартизация в приготовлении и применении тромбоцитных концентратов, необходима подготовка специальных терапевтических протоколов, действие которых должно будет проверяться посредством рандомизированных перспективных исследований.

В настоящее время проводятся исследования с целью найти оптимальный терапевтический протокол, развеять сомнения относительно безопасности процедуры и внести возможные изменения для улучшения клинических результатов.

Cecilia Conz (Цецилия Конц)

Georgios Karnatzikos (Георгиос Карнацикос)

Alberto Gobbi (Альберто Гоби)

Специалисты в области ортопедии и травматологии

OASI Bioresearch Fondation Gobbi ONLUS

г. Милан

Сара Бевилакка

Специалист

Библиография и дополнительные сведения приведены в Интернете по адресу:

[www.sportemedicina.it](http://www.sportemedicina.it)