

Міністерство охорони здоров'я України
Національний медичний університет імені О.О. Богомольця
Науково-дослідний інститут експериментальної та клінічної медицини
Київський обласний центр щелепно-лицевої хірургії та стоматології

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

для впровадження в закладах щелепно-лицевої хірургії та стоматології з
приводу посттравматичних й післяопераційних дефектів і реконструктивно-
відновного лікування

(НОВОВВЕДЕННЯ В СФЕРІ ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я)

СПОСІБ ВИКОРИСТАННЯ ПЛАЗМИ, ЗБАГАЧЕНОЇ
ФАКТОРАМИ РОСТУ ЗА МЕТОДИКОЮ PRGF EndoRet,
З УРАХУВАННЯМ ОЦІНКИ СТАНУ ТРОМБОЦИТАРНОЇ
ЛАНКИ ГЕМОСТАЗУ

**Натрус Л.В., Копчак А.В., Черновол П.А.,
Рибак В.А., Павличук Т.О., Панова Т.І.**

Київ - 2018

УДК 615.382: 612.111.7

Методичні рекомендації складено за матеріалами
НДР «Вивчити механізми розвитку тканинних реакцій, ланки міжклітинної
взаємодії, особливості регенеративних процесів за локального термічного
ушкодження при порушенні вуглеводного обміну»
(№ держреєстрації 0116U004902 строки виконання 01.01.2016-31.12.2018)

*Рекомендовано для впровадження в профільних закладах охорони здоров'я
(обласних, міських, районних), закладах щелепно-лицевої хірургії та стоматології
з приводу посттравматичних й післяопераційних дефектів і реконструктивно-
відновного лікування.*

*Спосіб використання плазми, збагаченої факторами росту за
методикою PRGF EndoRet, з урахуванням оцінки стану тромбоцитарної
ланки гемостазу. Л.В. Натрус, А.В. Копчак, П.А. Черновол, В.А. Рибак,
Т.О. Павличук, Т.І. Панова // Методичні рекомендації (нововведення в сфері
охорони здоров'я) для впровадження в закладах щелепно-лицевої хірургії та стоматології з
приводу посттравматичних й післяопераційних дефектів і реконструктивно-відновного
лікування / Київ, НМУ імені О.О. Богомольця, 2018. 21 с.*

Рецензенти:

Яковенко Л. М., завідувач кафедри хірургічної стоматології та щелепно-лицевої хірургії дитячого віку НМУ імені О.О. Богомольця, д.м.н., професор.

Борисенко А. В., завідувач кафедри терапевтичної стоматології НМУ імені О.О. Богомольця, д.м.н., професор.

Для використання матеріал рекомендований Вченою Радою НМУ імені О.О. Богомольця, протокол № _____ від _____ 2018 р.

ЗМІСТ

Вступ	4
Мета впровадження	6
Завдання	6
Матеріали та методи проведення дослідження	6
Розділ 1. Спосіб кількісної оцінки стану тромбоцитарної ланки гемостазу пацієнта	8
Розділ 2. Чинники, що впливають на вміст та функціональні властивості тромбоцитів у фракціях плазми PRGF, отриманої за стандартним протоколом EndoRet	13
Розділ 3. Принципи використання аутоплазми PRGF для найбільш успішного проведення реконструктивно-відновного лікування	16
Висновки	19
Використана література	20

ВСТУП

Збагачена тромбоцитами плазма (platelet rich plasma, PRP) – це отриманий із аутологічної крові продукт, що містить тромбоцити в концентрації, більшій ніж у цільній крові [20, 25]. PRP отримують шляхом центрифугування венозної крові, в результаті якого відбувається розділення компонентів крові відповідно до їх специфічної ваги. Еритроцити та лейкоцити відокремлюють, а елементи, що можуть виявляти лікувальний ефект: фібрин/фібриноген, тромбоцити, фактори росту, розчинені в рідкій плазмі тощо, збирають та концентрують [28]. Завдяки низькій вартості, доступності та безпечності, PRP розглядається, як перспективний метод отримання аутологічних факторів росту для подальшого впливу на перебіг репаративних процесів в різних галузях медицини: таких, як хірургічна стоматологія, пародонтологія, щелепно-лицева хірургія, ортопедія та травматологія, косметична медицина, загальна хірургія тощо [2, 7].

Лікувальний потенціал плазми, збагаченої тромбоцитами, базується на факторах росту, що містяться головним чином в альфа-гранулах тромбоцитів: трансформуючий фактор росту бета (TGF- β) [10, 24], фактор росту ендотелію судин (VEGF) [14, 12], тромбоцитарний фактор росту (PDGF) [13] та інші (IGF-1, FGF, EGF). Фактори росту вивільняються при дегрануляції тромбоцитів в місці ушкодження, підсилюють регенерацію тканин, стимулюють клітинну проліферацію, синтез екстрацелюлярного матриксу, проростання судин тощо. Гранули тромбоцитів є джерелом цитокінів, хемокінів та багатьох інших протеїнів, що стимулюють проліферацію та дозрівання клітин, модулюють запальну реакцію [7, 9, 16, 30].

Після концентрування та активації тромбоцитів, концентрація факторів росту, що виділяються, зростає в 3-5 разів порівняно з їх вмістом в плазмі крові [10]. Дослідники вказують на наявність позитивних кореляцій між вмістом факторів росту і загальною кількістю тромбоцитів. Це зокрема доведено для TGF- β 1 та PDGF [11], хоча і не підтверджується для інсуліноподібного фактору росту.

Водночас, оптимальна концентрація клітинних елементів в «тромбоцитарних концентратах» є предметом наукової дискусії та численних досліджень, результати яких неоднозначні [21, 22, 17]. За визначенням Marx (2001), плазма, збагачена тромбоцитами, має містити не менше, ніж в 4-5 разів більшу їх кількість, ніж нативна плазма (в якій концентрація тромбоцитів становить $(150-350) \cdot 10^9/\text{л}$ [20]. Водночас клінічні та експериментальні дослідження останніх років засвідчили, що оптимальний вплив на регенерацію кісткової тканини досягається в певному діапазоні концентрації тромбоцитів: $(500-1000) \cdot 10^9/\text{л}$ [29, 32]. Зменшення концентрації тромбоцитів призводить до зменшення ефективності застосування PRP, а надмірне збільшення якісно змінює її дію, пригнічує клітинну проліферацію та інгібує репаративні процеси в кістковій та сполучній тканині [31, 29]. В дослідженні Hsu et al. (2009) було показано, що і проліферація клітин слизової оболонки порожнини рота пригнічується при застосуванні високих концентрацій тромбоцитів, що, на думку

автора, пов'язано із підвищеною секрецією тромбоспондіну-1 з концентрованої PRP [15].

Таким чином, визначення концентрації тромбоцитів в PRP, отриманої при застосуванні різних методологічних підходів, є важливим для правильної інтерпретації результатів досліджень, їх об'єктивного порівняння, а також прогнозування клінічної ефективності та доцільності застосування PRP в різних клінічних ситуаціях.

Концентрація тромбоцитів в PRP значною мірою визначається методикою та особливостями її отримання і може сильно відрізнятися залежно від кількості центрифугувань, режиму центрифугування, типу антикоагулянту та активатора тромбоцитів, що використовується. Єдиного уявлення про оптимальний режим отримання PRP наразі не існує, і це питання залишається предметом наукової дискусії [19]. Крім того, за даними літератури, навіть при застосуванні однієї методики, концентрація тромбоцитів в PRP може сильно відрізнятися у різних пацієнтів, або у одного й того ж пацієнта за різних умов [11, 12, 25, 32, 33].

Однією із найбільш поширених методів отримання «тромбоцитарних концентратів» є методика PRGF (Plasma Rich in Growth Factors) EndoRet, запропонована Інститутом біотехнології ВТІ (Vitoria, Іспанія). Ця плазма збагачена тромбоцитами та циркулюючими протеїнами і факторами росту, для активації коагуляції в якій не потрібно застосовувати людський чи тваринний тромбін. Протокол її отримання передбачає використання спеціальних пробірок з наступним однократним центрифугуванням і активацією хлоридом кальцію [4].

PRGF вивчалась багатьма дослідниками, і отримані результати переконливо свідчать, що вона здатна стимулювати остеогенез, ангиогенез, сприяти клітинній міграції у рану. Із її фракції, яка бідна на тромбоцити, рекомендовано створити фібринову матрицю. Тривимірна фібринова матриця може виступати носієм для низько-диференційованих клітин попередників та створює контрольовану систему доставки протеїнів [3, 17]. PRGF підвищує проліферацію, міграцію, та хемотаксис остеобластів. Крім того, вона підвищує аутокринну експресію двох проангіогенних факторів: судинного ендотеліального фактору росту та фактору росту гепатоцитів, а також трьох маркерів остеобластичної активності проколагену I, остеокальцину та лужної фосфатази [3]. За даними дослідників, дотримання протоколу PRGF EndoRet дозволяє в більшості випадків отримати оптимальну концентрацію тромбоцитів (до 500 тис/мл і більше).

Слід зазначити, що вплив індивідуальних параметрів пацієнта на властивості «тромбоцитарних концентратів» є практично не вивченим, існують лише поодинокі дослідження, результати яких є неоднозначними. Більшість з них підтверджують залежність між вихідною кількістю тромбоцитів в плазмі та її вмістом в PRP при застосуванні переважної більшості методів їх концентрування [33]. De Andrade (2008) на тваринній моделі визначив, що кількість тромбоцитів в PRP серед інших гематологічних показників найбільшою мірою залежить від гематокриту і вихідного рівня тромбоцитів у плазмі та практично не залежить від коагуляційних властивостей крові [1, 8].

Водночас вплив індивідуальної варіації та чинників, від яких залежать клінічні, гематологічні та біохімічні параметри пацієнта, на концентрацію тромбоцитів в PRGF залишаються недостатньо вивченими.

Мета впровадження :

розробка алгоритму дослідження пацієнта та принципів використання аутоплазми PRGF, отриманої за стандартним протоколом EndoRet, для найбільш успішного проведення реконструктивно-відновного лікування.

Завдання:

1. розробити та впровадити спосіб кількісної оцінки стану тромбоцитарної ланки гемостазу пацієнта,
2. визначити чинники, що впливають на вміст та функціональні властивості тромбоцитів у фракціях плазми PRGF, отриманої за стандартним протоколом EndoRet,
3. визначити принципи використання аутоплазми PRGF для найбільш успішного проведення реконструктивно-відновного лікування.

Матеріали і методи проведення дослідження

В дослідження було включено 30 пацієнтів, що лікувалися на базі Київського обласного центру щелепно-лицевої хірургії та стоматології з приводу посттравматичних та післяопераційних дефектів верхньої та нижньої щелепи, віком від 17 до 70. Середній вік хворих склав $36,2 \pm 13,4$ років. Чоловіки становили 43,3 % від загальної кількості обстежених. До індивідуальної карти кожного хворого вносили відомості про вік, стать, наявність супутніх соматичних захворювань та шкідливих звичок, розміри існуючого дефекту та його етіологію, прийом антикоагулянтів та нестероїдних протизапальних засобів тощо.

Всім хворим **перед проведенням хірургічного втручання** було проведено комплексне клініко-лабораторне дослідження, що включало клінічний аналіз крові, коагулограму та агрегатограму.

Усі лабораторно-діагностичні дослідження були виконані в лабораторії клінічної лабораторної діагностики (зав. лабораторії Рижко І.М.) Науково-дослідного інституту експериментальної та клінічної медицини НМУ імені О.О. Богомольця за стандартними методиками [18].

Гемограму отримували за допомогою гематологічного аналізатора (MicroCC, Китай). Аналіз коагулограми виконували на напівавтоматичному коагулометрі (Coag 3003, Польща) із реагентами для визначення протромбінового часу, АЧТЧ (активованого частково тромбoplastинового часу) та фібриногену за Клаусом (виробництва Helena Biosciences Europe, Великобританія). Під час визначення протромбінового часу розраховували протромбіновий індекс, під час визначення часу АЧТЧ – індекс АЧТЧ.

Вивчення агрегаційних властивостей тромбоцитів проводили шляхом виконання агрегатограми (індукованої агрегації тромбоцитів плазми) на аналізаторі агрегації тромбоцитів РМ-2110 («СОЛАР», Білорусь). В якості

індукторів агрегації використовували розчини АДФ (аденозін-5'-дифосфорна кислота дінатрієва сіль, м.м. 471,2) виробництва «Технологія-Стандарт» (Росія) в кінцевій концентрації 0,5 мкМ, та розчин адреналіну гідрохлориду в концентрації 5,0 мкМ.

Кров для дослідження набирали у пацієнтів вакуумним методом у пластикові пробірки VACUETTE виробництва «Grenier-bio-one» (Австрія), що містять антикоагулянт (3,8 % водний розчин цитрату натрію), у співвідношенні «кров : антикоагулянт» – 9:1.

Для кожного пацієнта одержували плазму з різною концентрацією тромбоцитів. Для багаті тромбоцитами плазми (БТП) пробірки центрифугували 5 хвилин при 200 G, відбирали БТП і ще раз центрифугували пробірки у режимі 10 хвилин 2000 G для отримання плазми, бідної тромбоцитами (ПБТ). ПБТ використовується для калібрування приладу, та розведення БТП до необхідної для вимірювання концентрації тромбоцитів у діапазоні $(200-270) \cdot 10^9/\text{л}$. Також ПБТ використовувалась для дослідження коагулограми.

Запис індукованої агрегації тромбоцитів здійснювали згідно з інструкцією до агрегометра. Так, в пластикову кювету із 270,0 мкл БТП (із належною концентрацією тромбоцитів) додавали магнітну мішалку і прогрівали 5 хвилин при $37,0\text{ }^\circ\text{C}$ в блоці підготовки проб. Після перенесення кювети з плазмою у вимірювальне вічко відкаліброваного агрегометра, додавали індуктор, наприклад АДФ (30,0 мкл), і натиском кнопки «START» починали запис. Спостерігали зміни кривої агрегації. Після закінчення запису, агрегатограми обробляли за допомогою програмного забезпечення СОЛАР.

В клініці під час проведення хірургічного втручання по заміщенню дефектів всім хворим були виготовлені дві фракції плазми за методикою PRGF (Endoret Dentistry, BTE Biotechnology Institute, S.L., Miñano, Álava, Spain) (Vitoria, Іспанія) [4]. Протокол їх отримання передбачав використання спеціальних пробірок з 0,9 мл 3,8 % цитрату натрію на 8,1 мл крові з наступним центрифугуванням (580 g) протягом 8 хвилин при кімнатній температурі, використовуючи центрифугу для PRGF System IV (BTE, Іспанія). Потім отриману плазму розділяли на дві фракції: F1 та F2 (відповідно до рекомендацій компанії BTE), потім їх відділяли з кожної пробірки за допомогою пристрою для переміщення плазми PTD2. Фракція F2 являла собою плазму збагачену факторами росту – «тромбоцитарний концентрат» із найбільшим вмістом тромбоцитів. Натомість фракцію F1, бідну тромбоцитами, використовували для виготовлення фібринової мембрани. Для активації коагуляції і формування згустку або фібринової мембрани в пробірки додавали хлорид кальцію (0,5 мл на 1 мл плазми) і досягали необхідного ефекту протягом 10 хв. Перед активацією відбирали проби з фракцій F1 та F2 для проведення аналізу на вміст тромбоцитів, крім того, визначали вміст інших формених елементів крові та досліджували морфологію фібринової мембрани.

Для визначення кореляційного зв'язку використовували статистичний пакет MedCalc, версія 16.8. (2016 р) [5]. Розраховували: коефіцієнт кореляції Пірсона (r), з P-значенням: 95% довірчий інтервал для коефіцієнта кореляції.

РОЗДІЛ 1

СПОСІБ КІЛЬКІСНОЇ ОЦІНКИ СТАНУ ТРОМБОЦИТАРНОЇ ЛАНКИ ГЕМОСТАЗУ ПАЦІЄНТА

За допомогою програми СОЛАР проводили автоматичне обчислення наступних параметрів агрегаційної кривої: ступінь агрегації (СТА, %) – максимальний рівень відносного світлопропускання плазми після внесення індуктора агрегації; час агрегації, (хв., сек.) – час, відповідний максимальному ступеню агрегації після натискання кнопки «START» на агрегометрі; швидкість агрегації (ШВА, %/хв) – зміна відносного світлопропускання плазми після внесення індуктора агрегації, який вимірюється на відрізку довжиною 30 секунд (по осі абсцис) від обраної точки відліку.

Ми вважаємо, що для оцінки стану тромбоцитарної ланки гемостазу доцільно аналізувати особливості їх агрегації, механізми і типи активації рецепторів, завдяки яким настає агрегація тромбоцитів, параметри міцності створеного згустку і його дезагрегації у порівнянні із їх кількісним вмістом в периферичній крові. Для цього параметрів, обчислених програмою СОЛАР, недостатньо. Тому ми розробили оригінальний спосіб оцінки функціональних властивостей тромбоцитів через вивчення їх агрегаційних та дезагрегаційних властивостей.

Спосіб реалізують наступним чином: додатково вимірюють ступінь дезагрегації (СТД, %) як різницю між максимумом агрегаційної кривої і найбільш низькою точкою на кривій після цього максимуму. Якщо крива має кілька максимумів – СТД рахується після кожного максимуму і підсумовується.

Вимірюють час агрегації (ЧасА, хв) – час, за який агрегація досягла максимуму, час дезагрегації (ЧасД, хв) – час, за який відбувалася дезагрегація, вимірюють середнє значення СТА і ШВА у пулі здорових донорів (не менше 20) і визначають відносне значення СТА і ШВА до контролю (донорів) СТА/СТА_д, ШВА/ШВА_д, визначають ефективність агрегації (ЕА) як СТА/ЧасА, ефективність дезагрегації (ЕД) як СТД/ЧасД, за якими розраховують індекс функціональної активності тромбоцитів (ІФАТ) за формулою

$$\text{ІФАТ} = [\text{СТА}/\text{СТА}_{\text{д}} + \text{ШВА}/\text{ШВА}_{\text{д}} + (\text{СТА}-\text{СТД})/\text{СТА} + (\text{ЕА}-\text{ЕД})/\text{ЕА}]/4.$$

Стан тромбоцитарної ланки гемостазу визначають через порівняння отриманого значення ІФАТ із PLT .

Переваги способу в тому, що аналіз враховує кількість тромбоцитів поєднано із їх функціональною активністю, яка оцінюється кількісним показником. Використання відносних величин нівелює суб'єктивні впливи оператора, приладу і умови виконання аналізу тощо, та робить дослідження більш об'єктивним. Відношення ступеню агрегації до дезагрегації (СТА-СТД)/СТА надає можливість оцінити активність створення агрегатів та їх міцність. Відношення ефективності агрегації до дезагрегації (ЕА-ЕД)/ЕА надає можливість

оцінити функціональні властивості тромбоцитів за ефективністю агрегації та дезагрегації.

Відомо, що використання кожного із індукторів надає можливість визначити чутливість окремої групи рецепторів тромбоцитів до проагрегантів, та оцінити функціональність ланцюга «рецептор → активація тромбоциту → агрегація тромбоцитів» [9]. Найчастіше в якості індукторів агрегації використовують АДФ та адреналін. Використання більшої кількості індукторів дозволяє більш поширено дослідити чутливість рецепторів тромбоцитів та їх агрегаційну відповідь на додавання проагреганту. Але за рахунок того, що частина рецепторів може бути заблокована інгібіторами (як природними, так і ятрогенного характеру), ІФАТ, обчислений при використанні різних індукторів, може значно відрізнятись при дослідженні одного і того ж пацієнта в один і той же час. Різниця між індексами, обчисленими за використання різних індукторів, несе цінну діагностичну та прогностичну інформацію, з допомогою якої можна оцінити стан рецепторів тромбоцитів та ефективність антиагрегантної терапії. У зв'язку з цим ми не рекомендуємо порівнювати між собою індекси, одержані за використання різних індукторів агрегації, і навіть за різної концентрації одного й того ж індуктора агрегації.

Індукована агрегація тромбоцитів – це рецептор-опосередкований процес. Ефект адреналіну на тромбоцити виражений значно слабкіше у порівнянні із АДФ [23]. Адреналін викликає агрегацію тромбоцитів без зміни їх форми, взаємодіючи з альфа-адренорецепторами плазматичної мембрани. При активації альфа-2-адренорецепторів відбувається інгібування аденілатциклази. При цьому передбачається, що механізм дії адреналіну пов'язаний з модуляцією мембран і зміною їх проникності до іонів Ca^{2+} .

Найважливішу функцію, завдяки чому настає агрегація тромбоцитів, здійснюють специфічні рецептори, що відносяться до класу P2Y і реагують на дію АДФ. За механізмом передачі сигналу P2-рецептори діляться на два сімейства: P2X-рецептори, які є ліганд-залежними іонними каналами; P2Y – які відносяться до групи G-протеїн-опосередкованих рецепторів. У тромбоцитах виявлено наявність трьох підтипів P2-рецепторів – P2Y₁, P2Y₁₂, і P2X₁, кожен з яких відіграє специфічну роль в активації та агрегації кров'яних пластинок.

Так, стимуляція P2Y₁-рецепторів аденозиндіфосфатом мобілізує іони Ca^{2+} з депо, що призводить до зміни форми тромбоцитів і запуску оборотну агрегацію кров'яних пластинок. Активація P2Y₁₂-рецепторів при впливі АДФ веде до посилення агрегації як самим аденозиндіфосфатом, так і іншими агоністами – колагеном, тромбіном і адреналіном. Активація тромбоцитів АДФ призводить до експресії рецепторів до фібриногену на плазматичній мембрані тромбоцитів. Іони Ca^{2+} беруть участь у формуванні центру зв'язування рецептора з фібриногеном. Оптимальною для зв'язування є концентрація кальцію 0,1-1,0 мМ. Ту ж роль іони Ca^{2+} виконують і при спонтанній агрегації тромбоцитів [23, 27].

Таким чином, за допомогою індукції агрегації адреналіном та АДФ можна оцінювати активність тромбоцитарних P2-рецепторів (G-протеїн-опосередкованих) і модуляції Ca^{2+} каналів мембрани. Вважаємо, що такий підхід у сукупності із врахуванням особливостей дезагрегації надає можливість максимально об'єктивізувати погляд дослідника на механізми досліджуваної ланки гемостазу.

Тому для кожного пацієнта ми виконували агрегатограми із двома індукторами АДФ та адреналіном і розраховували ІФАТ як середнє значення ІФАТ з кожним індуктором.

Ми виявили, що значення ІФАТ у пацієнтів визначалося у діапазоні 1,13-0,41, із модою $Mo=0,79$. Вірогідно, це значення, при якому система збалансована, із незначним переважанням часу та швидкості агрегації над дезагрегацією. Відсутність у пацієнтів порушення гемостазу або скарги з боку системи згортання крові надає нам підставу вважати коливання ІФАТ в діапазоні 1,13-0,41 припустимим у фізіологічних межах.

Ми прийняли, що значення $ІФАТ \geq 0,8$ відображає високу агрегаційну активність тромбоцитів, а значення $ІФАТ < 0,8$ відображає низьку агрегаційну активність тромбоцитів.

Кількість тромбоцитів плазми (PLT) у всіх хворих була у межах рекомендованих референтних значень, з коливанням $(174-356) \cdot 10^9/\text{л}$ ($M=(260,76 \pm 44) \cdot 10^9/\text{л}$). Тобто у пацієнтів були відсутні ознаки тромбопенії, або тромбоцитозу.

Тому, за оцінкою кількості тромбоцитів периферичної крові PLT, ми прийняли, що $PLT < 260 \cdot 10^9/\text{л}$ є умовно низьким вмістом їх в периферичній крові, а $PLT \geq 260 \cdot 10^9/\text{л}$ є умовно високим їх вмістом.

Стан **тромбоцитарної ланки гемостазу** визначали через порівняння отриманого значення ІФАТ із PLT і вважали:

- *нормальним* при наявності низької агрегаційної активності тромбоцитів за ІФАТ у комплексі із високим PLT, або високої агрегаційної активності за ІФАТ у комплексі із низьким PLT.
- *гіпоактивним* при наявності низької агрегаційної активності за ІФАТ із низьким PLT,
- *гіперактивним* при наявності високої агрегаційної активності за ІФАТ із високим PLT.

Конкретні приклади розрахування ІФАТ та оцінки стану тромбоцитарної ланки гемостазу

Приклад 1. У пацієнта №1 із гемограми визначили $PLT - 306 \cdot 10^9/l$; за даними агрегатограми: СТА – 40 %, ШВА – 54 %/хв,

Додатково вимірювали (рис. 1): СТД – 14%, ЧасА – 4 хв, ЧасД – 5,6 хв.

Середнє значення СТА в групі донорів (20 донорів) СТА_д – 65 %, середнє значення ШВА в групі донорів (20 донорів) ШВА_д – 60 %/хв.

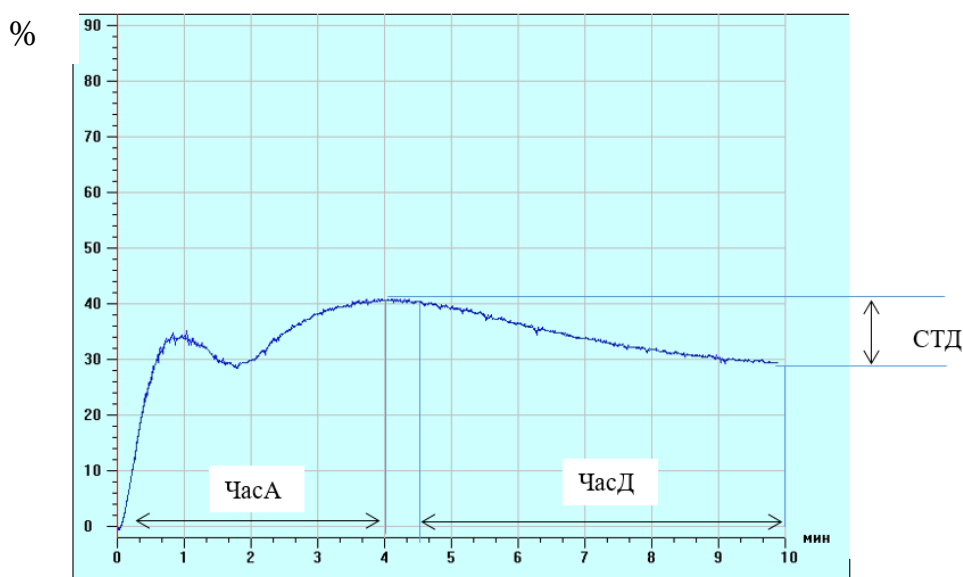


Рис. 1. Вимірювання додаткових показників агрегації тромбоцитів у пацієнта № 1: СТД, ЧасА, ЧасД

Розрахунок показників:

$40/4=10$ значення ЕА,

$14/5,6 = 2,5$; значення ЕД.

Індекс функціональної активності тромбоцитів пацієнта №1

$$ІФАТ = [СТА/СТА_{д} + ШВА/ШВА_{д} + (СТА-СТД)/СТА + (ЕА-ЕД)/ЕА]/4 = [(40/65 + 54/60 + (40-14)/40 + (10-2,5)/10)]/4 = 0,73$$

Таким чином, кількість тромбоцитів PLT оцінюють як високу, а агрегацію за ІФАТ визначають як низьку, тому стан тромбоцитарної ланки оцінюють як *нормальний*.

Приклад 2. У пацієнта №2 із гемограми визначили $PLT - 253 \cdot 10^9/l$, за даними агрегатограми: СТА – 38 %, ШВА – 34 %/хв

Додатково вимірювали (рис. 2): СТД – 24 %, ЧасА – 1,5 хв, ЧасД – 8,5 хв.

Середнє значення СТА в групі донорів (20 донорів) СТА_д – 65 %, середнє значення ШВА в групі донорів (20 донорів) ШВА_д – 60 %/хв.

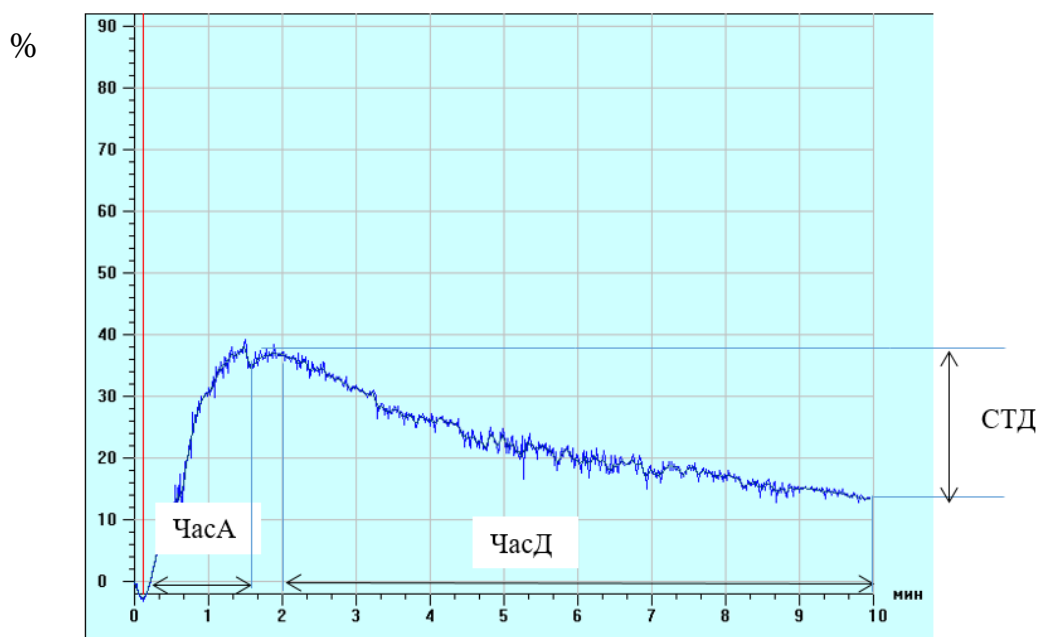


Рис. 2. Вимірювання додаткових показників агрегації тромбоцитів у пацієнта № 2: СТД, ЧасА, ЧасД

Розрахунок показників:

$$38/1,5 = 25,33 \text{ значення ЕА}$$

$$24/8 = 3 \text{ значення ЕД}$$

Індекс функціональної активності тромбоцитів пацієнта № 2

$$ІФАТ = [СТА/СТА_{д} + ШВА/ШВА_{д} + (СТА-СТД)/СТА + (ЕА-ЕД)/ЕА]/4 = [(38/65 + 34/60 + (38-24)/38 + (25,33-3)/25,33)]/4 = 0,6$$

У пацієнта № 2 кількість тромбоцитів PLT оцінюють як низьку, агрегацію за ІФАТ визначають як низьку, тому стан тромбоцитарної ланки оцінюють як *гіпоактивний*.

РОЗДІЛ 2

ЧИННИКИ, ЩО ВПЛИВАЮТЬ НА ВМІСТ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ТРОМБОЦИТІВ У ФРАКЦІЯХ ПЛАЗМИ PRGF, ОТРИМАНОЇ ЗА СТАНДАРТНИМ ПРОТОКОЛОМ ENDORET

Морфологічне (мікроскопічне) дослідження матриксу фібринової мембрани, яку отримували методикою PRGF EndoRet та використовували для компенсації дефекту, показало значну схожість структури і не дозволило виявити достовірну різницю у будові сітки, розташуванні волокон нерозчинного фібрину та їх послідовності. Різниці між структурою, наповненням, волокнами чи гранулами у фракціях, а також між мембранами різних пацієнтів – не виявлено. Всі фібринові мембрани, одержані від різних пацієнтів, мали однакову консистенцію (макроскопічно) і однакову мікроскопічну структуру [26].

При аналізі даних протромбінового часу, протромбінового індексу та ІФАТ кореляційного зв'язку не знайдено: відповідно $r=0,015$ та $r=0,0084$. Співставлення ІФАТ із тромбоцитарними параметрами: PTC, MPV, PDW, P-LCR – також не виявило достовірної статистичної залежності між показниками.

Серед показників коагулограми виявлено вірогідний зворотній зв'язок між вмістом фібриногену та концентрацією тромбоцитів у фракції F2 ($r=-0,683$, $p<0,05$), а також вмістом фібриногену та коефіцієнтом концентрування F2/PLT ($r=-0,748$, $p<0,05$).

Середній об'єм тромбоцитів, їх морфологічні характеристики та тромбокрит вірогідно не впливали на концентруючу здатність методики. Вихідний рівень тромбоцитів вірогідно позначався на їх концентрації у фракції F2 ($r=0,44$, $p<0,05$) та F1 ($r=0,532$, $p<0,05$), але не мав вірогідного впливу на коефіцієнт концентрування та співвідношення тромбоцитів у фракціях PRGF.

В ході дослідження було виявлено вірогідні зв'язки між гематокритом (і, відповідно, вмістом еритроцитів та лейкоцитів в крові) та концентрацією тромбоцитів в PRGF, співвідношенням вмісту тромбоцитів в F1 та F2, а також концентруючою здатністю методики. Збільшення гематокриту супроводжувалось збільшенням концентрації тромбоцитів у фракції F2 та зменшенням співвідношення F2/F1.

Таким чином, основними чинниками, що визначали вміст тромбоцитів у плазмі, збагаченій факторами росту, були вихідний вміст тромбоцитів в крові, гематокрит та концентрація фібриногену

Вивчення клітинного вмісту плазми пацієнтів, яка була отримана за методикою PRGF EndoRet, виявило, що середня кількість тромбоцитів F1 складала $(200\pm 84,4)\cdot 10^9/\text{л}$, а в F2 = $(387,6\pm 180)\cdot 10^9/\text{л}$, тобто вміст тромбоцитів у F2 в усіх випадках перевищував кількість клітин у F1, і це природно, але ми не виявили значної концентрації (в межах $500\cdot 10^9/\text{л}$ та вище) тромбоцитів в отриманій фракції F2.

Такий факт, на наш погляд, підкреслює більш коректне визначення PRGF – як «плазма, яка збагачена факторами росту», а не «багата тромбоцитами плазма».

Тому немає необхідності при використанні методики PRGF EndoRet домагатися високого вмісту клітин у F2. Доцільно вважати високий клінічний ефект F2 як результат дії «коктейлю» факторів [1, 13, 30], оскільки саме вони забезпечують ефект грануляцій та епітелізації рани.

Для аналізу концентрації клітин у F2, відносно нативної плазми крові, ми розрахували коефіцієнт концентрування тромбоцитів $kt=(F2-PLT)/PLT$. Його середнє значення складало 1,48. Визначення кореляції між kt та PLT не виявило значного зв'язку. Тобто *прямої лінійної залежності між початковою кількістю тромбоцитів плазми та вмістом тромбоцитів у F2 немає.*

При цьому у 16 % досліджених вміст тромбоцитів у F2 був нижчим, ніж у первинній плазмі. І цей факт ще більше впевнює нас не визначати ведучим фактором клінічної ефективності PRGF EndoRet саме велику (більш $500 \cdot 10^9/\text{л}$) кількість клітин (тромбоцитів) у біологічному середовищу.

Але при співставленні вмісту тромбоцитів у складі F2 ми виявили кореляцію із агрегаційною активністю тромбоцитів плазми за ІФАТ. Коефіцієнт кореляції складав $k = -0,42$ ($p=0,02$ ДІ 95 %).

Таким чином, ми виявили, що існує зворотній зв'язок між вмістом тромбоцитів в складі F2 та їх функціональними властивостями. Спираючись на факт існування такої залежності, можна зробити висновок про закономірності, які забезпечують підтримку гомеостазу крові у межах фізіологічних коливань.

Якщо тромбоцити мають високу активність до агрегації, то їх кількість у фракції F2 зменшена. І навпаки, тромбоцитів з низькою агрегаційною активністю у F2 більше.

Саме тому, в усіх випадках наших спостережень, де пацієнти розрізнялися за результатами агрегатограми, ефективність клінічного перебігу була практично однаковою з добрими клінічними результатами.

При співставленні PLT цільної крові пацієнта та функціональної активності тромбоцитів, визначеної за агрегатограмою із розрахунком ІФАТ, кореляційного зв'язку між цими величинами нами виявлено не було ($r = -0,23$).

Але розуміння існування природної підтримки балансу гомеостазу крові наштовхнуло нас вилучити із вибірки ті випадки, коли гіперагрегаційні властивості тромбоцитів за ІФАТ супроводжувалися високим значенням PLT, а гіпоагрегаційні властивості супроводжувалися низьким значенням PLT. Із вибірки випадали 5 значень (16 %).

Таке виключення (рис. 3) дозволило виявити значний зворотній кореляційний зв'язок. Коефіцієнт кореляції складав $r = -0,55$ ($p < 0,01$).

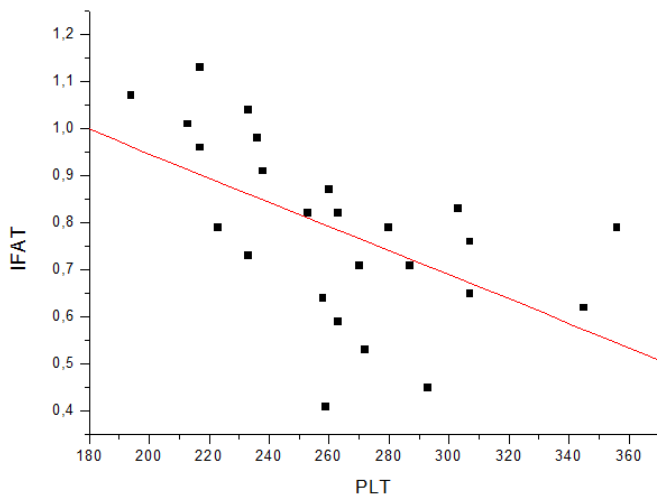


Рис. 3. Регресійна залежність між вмістом тромбоцитів в крові (PLT) та ІФАТ після виключення «випадаючих» значень ($r = -0,55$; $p < 0,01$).

Таким чином, ми виявили, що розбіжність в параметрах агрегатограми пацієнтів і, відповідно, різниця функціональних властивостей тромбоцитів компенсується кількістю тромбоцитів у плазмі крові та, ще більше, у PRGF.

У фізіологічних межах існує зворотній зв'язок між функціональними, в першу чергу агрегаційними, властивостями тромбоцитів та їх концентрацією у PRGF – фракції плазми, яка призначена реалізовувати найвищі протекторні властивості, забезпечує високій ефект регенерації і використовується для хірургічного лікування кісткового дефекту.

Оптимальну концентрацію тромбоцитів відносно їх функціональних властивостей забезпечує динамічна система підтримки гомеостазу організму пацієнта. Для використання практичним лікарем методики PRGF EndoRet важливим є оцінка кількості тромбоцитів в крові пацієнта та співставленні із їх фізіологічними властивостями за даними агрегатограми. Виявлення зворотного зв'язку цього аналізу є запорукою успішності лікування в різних клінічних ситуаціях.

РОЗДІЛ 3

ПРИНЦИПИ ВИКОРИСТАННЯ АУТОПЛАЗМИ PRGF ДЛЯ НАЙБІЛЬШ УСПІШНОГО ПРОВЕДЕННЯ РЕКОНСТРУКТИВНО-ВІДНОВНОГО ЛІКУВАННЯ

Серед усіх пролікованих пацієнтів PRGF використовували, як самостійний метод заміщення дефекту в 83 % випадків, поєднували із застосуванням кісткових аутоотрансплантатів – в 3 % та ксеногенних кістково-заміщуючих матеріалів – в 14 % випадків.

АЛГОРИТМ

використання аутоплазми, збагаченої за методикою PRGF EndoRet

- При визначенні у пацієнта нормального стану тромбоцитарної ланки гемостазу використовують F2 плазми.
- При визначенні у пацієнта гіперактивного стану тромбоцитарної ланки гемостазу використовують плазму без поділення на фракції. Оскільки її властивості достатньо ефективні для стимулювання остеогенезу та ангиогенезу, і створення фібринової матриці.
- При визначенні у пацієнта гіпоактивного стану тромбоцитарної ланки гемостазу використовують подвійну кількість F2 для підвищення протекторних властивостей і забезпечення необхідного лікувального ефекту.

В післяопераційному періоді враховували наявність чи відсутність ускладнень, пов'язаних із відторгненням або експозицією трансплантатів, приєднанням гнійно-запальних процесів в післяопераційному періоді та уповільненням репаративних процесів. Визначали строки появи грануляцій та повної епітелізації ран, крім того, використовуючи метод експертних оцінок, визначали інтегральний результат загоєння операційної рани, як добрий (3 бали), задовільний (2 бали), уповільнений (1 бал), незадовільний (0 балів).

Важливо підкреслити, що розбіжність агрегаційної активності тромбоцитів пацієнтів суттєво не відобразилась на результаті загоєння операційної рани. За нашими даними, 88 % мали задовільний (2 бали) результат лікування. В одному випадку можна визначити успішність хірургічного лікування на 1-2 бали, а у 11 % ми виявили добру епітелізацію рани (3 бали).

Так, у 93,3 % хворих в ході лікування було досягнуто хороших або задовільних результатів. Ускладнення у вигляді розходження країв рани та часткового руйнування тромбоцитарного згустку були відзначені в одного хворого (3,3 %), причому їх негативні наслідки не потребували проведення повторних хірургічних втручань і були ліквідовані консервативними методами, крім того, у одного хворого (3,3 %) відзначали уповільнення загоєння рани, що

відбувалось на тлі наявної супутньої соматичної патології (вроджена нейтропенія). При проведенні кореляційного аналізу вірогідних зв'язків між вмістом тромбоцитів у фракції F2 та клінічною ефективністю застосування PRGF виявлено не було. У всіх хворих виразність больового синдрому та набряку в післяопераційному періоді була низькою або помірною, строки епітелізації ран не залежали від вмісту тромбоцитів в PRGF, а визначалися, головним чином, особливостями клінічної картини та характером проведеного хірургічного втручання. Вірогідного впливу функціональної активності тромбоцитів (ІФАТ) на клінічні показники також не було виявлено.

За нашим спостереженням, застосування плазми, збагаченої факторами росту, за пропонованим алгоритмом дозволило досягти добрих або задовільних результатів у абсолютної більшості прооперованих пацієнтів.

В проведеній нами серії клініко-лабораторних досліджень не було виявлено статистично вірогідних зв'язків між PLT в F2 та клінічною ефективністю препарату. Цей факт може бути поясненим уявленням про механізми підтримки гомеостазу системи крові.

Відомо, що між загальною кількістю тромбоцитів та їх середнім об'ємом існує нелінійний зворотній зв'язок, що, з біологічної точки зору, забезпечує перебіг процесів агрегації тромбоцитів, згортання крові та наступної стимуляції регенераторних процесів в межах фізіологічного діапазону, незалежно від індивідуальних коливань показника PLT [6].

При виготовленні плазми, збагаченої факторами росту, зворотній зв'язок між кількістю тромбоцитів у фракції F2 та функціональною активністю тромбоцитів зберігався, що вірогідно забезпечує найбільш ефективний вплив на перебіг репаративних процесів. Отже, менша кількість тромбоцитів в нативній крові та плазмі, збагаченій факторами росту, в нормі компенсується їх підвищеною функціональною, зокрема агрегаційною активністю. Саме тому в наших спостереженнях, де пацієнти суттєво розрізнялися за результатами агрегатограми та вмісту тромбоцитів, клінічна ефективність методики була практично однаковою.

Ми вважаємо, що досягнення значної концентрації тромбоцитів (більше $500 \cdot 10^9/\text{л}$) при виготовленні PRGF EndoRet не можна розглядати, як провідний фактор її ефективності. Клінічний ефект PRGF є результатом дії «коктейлю» факторів – тромбоцитарних факторів росту та розчинних в плазмі білків і цитокінів, які забезпечують формування та дозрівання сполучної, кісткової та епітеліальної тканини та фібрину. Останній в ході активації та формування згустку утворює зв'язки, що забезпечує утворення складної тривимірної сітчастої структури, здатної затримувати цитокіни, фактори росту та інші біологічно активні речовини та забезпечувати міграцію клітин. Вміст фібрину в плазмі вірогідно позначається на концентруючій здатності метода, однак морфологічні

характеристики фібринової матриці при застосуванні методики PRGF EndoRet практично не залежали від індивідуальних параметрів крові пацієнта, вмісту та функціональної активності тромбоцитів у фракціях F2 та F1.

Таким чином, для практичного використання методики PRGF EndoRet важливою є попередня оцінка кількості тромбоцитів в крові пацієнта та її співставлення із функціональною активністю за даними агрегатограми, що дозволяє обрати правильну лікувальну стратегію та визначити прогноз клінічної ефективності її застосування.

ВИСНОВКИ

1. Динамічна система підтримки гомеостазу забезпечує оптимальну концентрацію тромбоцитів в організмі, враховуючи їх функціональні властивості.
2. Вміст тромбоцитів у фракціях F1 та F2 плазми, збагаченої факторами росту (PRGF EndoRet), зазнає значних індивідуальних коливань в межах $155 \cdot 10^9/\text{л}$ до $919 \cdot 10^9/\text{л}$, коефіцієнт концентрування при цьому в середньому становить 1,48.
3. Основними чинниками, що впливають на вміст тромбоцитів у плазмі, збагаченій факторами росту, та концентраційну здатність методики є вихідний вміст тромбоцитів в крові, гематокрит та концентрація фібриногену.
4. При застосуванні методики PRGF EndoRet доцільним є попереднє визначення вихідного рівня тромбоцитів крові та її співставлення із функціональною активністю за даними агрегатограми, що дозволяє обрати правильну лікувальну стратегію та визначити прогноз її клінічної ефективності.
5. Для більшості пацієнтів існує зворотній кореляційний зв'язок між кількістю тромбоцитів в нативній крові, плазмі, збагаченій факторами росту, та їх функціональною (агрегаційною) активністю, що визначає високу клінічну ефективність PRGF EndoRet навіть у випадках, де концентрація тромбоцитів після центрифугування зростає незначною мірою.

Для забезпечення необхідного лікувального ефекту РЕКОМЕНДУЄМО:

АЛГОРИТМ

використання аутоплазми, обробленої за методикою PRGF EndoRet

- При визначенні у пацієнта *нормального* стану тромбоцитарної ланки гемостазу використовують F2 плазми.
- При визначенні у пацієнта *гіперактивного* стану тромбоцитарної ланки гемостазу використовують плазму без поділення на фракції. При визначенні у пацієнта *гіпоактивного* стану тромбоцитарної ланки гемостазу використовували подвійну кількість F2.

Використана література

1. Aghaloo, T.L., Moy, P.K., Freymiller, E.G. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: a pilot study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002. 60. P. 1176-1181.
2. Anitua E. The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in oral surgery // *J Pract Proced Aesthet Dent.* 2001. Vol. 5, No. 6. P. 487-493.
3. Anitua E., Prado R., Orive G. Endogenous morphogens and fibrin bioscaffolds for stem cell therapeutics // *Trends in Biotechnology.* 2013. Vol. 31, No. 6. P. 364-374.
4. Anitua E., Prado R., Troya M. et al. Implementation of more physiological plasma rich in growth factor (PRGF) protocol: Anticoagulant removal and reduction in activator concentration // *J Platelets.* 2016. Vol. 27, No. 5. P. 459-466.
5. Armitage P., Berry G., Matthews J.N.S. *Statistical methods in medical research.* Blackwell Science Ltd., 2002. 816 p.
6. Bessman J.D., Williams L.J., Gilmer P.R. Mean platelet volume. The inverse relation of platelet size and count in normal subjects, and an artifact of other particles // *J Clin Pathol.* 1981. Vol. 76, No. 3. P. 289-293.
7. Biloklytska G.F., Kopchak O.V. The use of platelet-rich plasma (PRP) for treatment of generalized periodontitis // *Stomatologia wspolczesna.* 2014. Vol. 21, No. 3. P. 8-17.
8. De Andrade M.G., Freitas Brandão C.J., Sá C.N., et al. Evaluation of factors that can modify platelet-rich plasma properties // *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008. No. 105. P. 5-12.
9. Do Amaral R.J.F.C., da Silva N.P., Haddad N.F., et al. Platelet-rich plasma obtained with different anticoagulants and their effect on platelet numbers and mesenchymal stromal cells behavior in vitro // *Stem Cells Int.* 2016.
10. Foster T.E., Puskas B.L., Mandelbaum B.R., et al. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications // *American Journal of Sports Medicine.* 2009. Vol. 37, No. 11. P. 2259-2272.
11. Giraldo C.E. Effects of sodium citrate and acid citrate dextrose solutions on cell counts and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel // *BMC Vet Res.* 2015. No. 11. P. 60.
12. Giusti I., D'Ascenzo S., Mancò A., et al. Platelet concentration in platelet-rich plasma affects tenocyte behavior in vitro // *Biomed Res Int.* 2014.
13. Graves D.T., Cochran D.L. Biologically active mediators: platelet-derived growth factor, monocyte chemoattractant protein-1 and transforming growth factor-beta // *Curr Opin Dent.* 1991. No. 1. P.809-815.
14. Holmes D.I.R., Zachary I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease // *Genome Biology.* 2005. No. 2. Art. 209.
15. Hsu C.W., Yuan K., Tseng C.C. The negative effect of platelet-rich plasma on the growth of human cells is associated with secreted thrombospondin-1 // *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009. No. 107. P. 185-92.
16. Inchingolo F., Tatullo M., Marrelli M., et al. Regenerative surgery performed with platelet-rich plasma used in sinus lift elevation before dental implant surgery: an useful aid in healing and regeneration of bone tissue // *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2012. Vol. 16, No. 9. P. 1222-1226.

17. Kawasumi M., Kitoh H., Siwicka K.A., et al. The effect of the platelet concentration in platelet-rich plasma gel on the regeneration of bone // *Bone Joint Surg Br.* 2008. No. 90. P. 966-972.
18. Kozlov A.A., Natrus L.V., Chernovol P.A., et al. *Laboratornaya diahnozyka systemy hemostazu. Uchebnoe posobyie / Moskva: Lyterra. 2011. 136 s. (ros).*
19. Lopez-Vidriero E., Goulding K.A., Simon D.A., et al. Poor standardization in platelet-rich therapies hampers advancement // *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery.* 2010. Vol. 26, No. 6. P. 724-725.
20. Marx R.E. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? // *Implant Dent.* 2001. No. 10. P. 225-228.
21. Marx R.E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use // *J Oral Maxillofac Surg.* 2004. No. 62. P. 489-496.
22. McCarrel T.M. Minas T, Fortier L.A. Optimization of leukocyte concentration in platelet-rich plasma for the treatment of tendinopathy // *J Bone Joint Surg Am.* 2012. No. 94. P. 143.
23. Miloradov M.Ju., Emanuilova N.V., Masina I.V. Effect of platelet and platelet aggregation on RBC interaction // *Yaroslavs'kyi pedahohichnyy vistnyk.* 2013. No. 4. Tom III (Estestvennye nauky). S 209-214.
24. Pakyari M., Farrokhi A., Maharlooei M.K., et al. Critical role of transforming growth factor beta in different phases of wound healing // *Advances in Wound Care.* 2013. Vol. 2, No. 5. P. 215-224.
25. Rinnovati R., Romagnoli N. Gentilini F., et al. The influence of environmental variables on platelet concentration in horse platelet-rich plasma // *Acta Veterinaria Scandinavica.* 2016. P. 58-45.
26. Rybak V., Natrus L., Kopchak A., et al. Factors that can influence on the content and functional properties of platelet in Plasma-Rich in Growth Factors (PRGF EndoRet) // *Emergency medicine.* 2017. No. 1 (80). P. 159-167.
27. Siess W. Molecular mechanisms of platelet activation // *Physiol Rev.* 1989. Vol. 69, No. 1. P. 58-178.
28. Sommeling C.E., Heyneman A., Hoeksema H, et al. The use of platelet-rich plasma in plastic surgery: a systematic review // *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery.* 2013. Vol. 66, No. 3. P. 301-311.
29. Suchetha A., Lakshmi P., Bhat D., et al. Platelet concentration in platelet concentrates and periodontal regeneration-unsrambling the ambiguity // *Bharwani Contemp Clin Dent.* 2015. Vol. 6, No. 4. P. 510-516.
30. Sundman E.A., Cole B.J., Fortier L.A. Growth factor and catabolic cytokine concentrations are influenced by the cellular composition of platelet-rich plasma // *J Sports Med.* 2011. Vol. 39, No. 10. P. 2135-2140.
31. Weibrich G., Hansen T., Kleis W., et al. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration // *J Bone.* 2004. No. 34. P. 665-671.
32. Weibrich G., Kleis W.K., Hitzler W.E., et al. Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-in-growth-factors kit to produce platelet-rich plasma: a technical report // *J Oral Maxillofac Implants.* 2005. Vol. 20, No. 1. P. 118-123.
33. Weibrich G., Kleis W.K., Kunz-Kostomanolakis M., et al. Correlation of platelet concentration in platelet-rich plasma to the extraction method, age, sex, and platelet count of the donor // *J Oral Maxillofac Implants.* 2001. Vol. 16, No. 5. P.693-699.