

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
БІЛОЦЕРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ
КАФЕДРА ХІРУРГІЇ ТА ХВОРОБ ДРІБНИХ ДОМАШНІХ ТВАРИН

ЗАСТОСУВАННЯ PRP-ТЕХНОЛОГІЙ У ВЕТЕРИНАРНІЙ МЕДИЦИНІ

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Біла Церква – 2022 р.

УДК: 636.09:615.36(07)

Розглянуто та рекомендовано до
друку й практичного використання
методичною комісією БНАУ
(протокол № 10 від 26 червня 2022 р.)

Укладачі: **Шевченко С.М.**, аспірантка; **Рубленко М.В.**, академік
НААН.

Застосування PRP-технологій у ветеринарній медицині.
Методичні рекомендації. С.М. Шевченко, М.В. Рубленко. Біла
Церква: БНАУ, 2022. 19 с.

Описано класифікацію різних типів тромбоцитарних концентратів,
методику їх одержання та використання у ветеринарній медицині.

Рекомендовано практичним та науковим фахівцям, слухачам
післядипломної освіти, студентам та аспірантам вищих навчальних закладів
III—IV рівнів акредитації зі спеціальності 211 — ветеринарна медицина.

Рецензенти: **Ільніцький М.Г.**, д-р вет. наук, професор, зав. кафедри
анатомії та гістології домашніх тварин ім. П.О.
Ковальського (Білоцерківський національний аграрний
університет)

Чемеровський В.О., д-р філософії, асистент кафедри
хірургії та хвороб дрібних домашніх тварин
(Білоцерківський національний аграрний університет)

©БНАУ, 2022

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
Тромбоцити і тромбоцитарні маси.....	4
Плазма, збагачена тромбоцитами.....	8
Методика приготування аутологічної плазми, збагаченої тромбоцитами, шляхом одноступеневого центрифугування.....	8
Методика приготування аутологічної плазми, збагаченої тромбоцитами, шляхом двоступеневого центрифугування.....	9
Фібрин, збагачений тромбоцитами.....	11
Методика приготування фібрину, збагаченого тромбоцитами.....	11
Використання тромбоцитарних мас у ветеринарній медицині.....	13
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ	
ДЖЕРЕЛ.....	14

ВСТУП

В останні роки істотного теоретичного і практичного розвитку набула регенеративна біомедицина, яка представляє собою науково-обґрунтовані концепції, методи і технології одержання та зберігання клітинних і тканинно-інженерних продуктів, відновлення і керованої регенерації тканин та органів, їх структур і функцій. Проблематика регенеративної біомедицини надзвичайно широка і, з одного боку, вона зумовлена суттєвими відмінностями у регенеративних властивостях тканин і органів, а з іншого – втратою їх репаративного потенціалу [1, 2].

Причинами цього можуть бути різноманітні фактори, зокрема дистрофія тканин, окислювальні ушкодження і дисбаланс регенеративних механізмів на підставі втрати кровозабезпечення чи великих за об'ємом травм, їх ускладнення інфекційно–запальними процесами, метаболічний синдром чи імунопатологічні процеси, що призводять до деструкції чи метapлазії тканин [3].

Особливо поширеними технології регенеративної медицини виявилися в травматології та ортопедії за ушкоджень зв'язок і сухожилків, хрящів та кісток [1, 4]. Хоча кісткова тканина, завдяки виключно клітинному типу регенерації, володіє унікальною властивістю формувати ідентичний кістковий регенерат, однак нерідко репаративний остеогенез ускладнюється різними патологічними станами. Проте, безліч інноваційних підходів поки що не покращили клінічні результати лікування значних за об'ємом кісткових дефектів [5, 6]. Вони, в першу чергу, спрямовані на використання аутоотрансплантатів, аллотрансплантатів і тканинно-інженерних конструкцій, пов'язаних з клітинами чи іншими біологічними факторами [1]. Кожен з варіантів має певні недоліки, такі як знижена біоактивність імплантів, імунологічні запальні реакції, необхідність додаткового хірургічного втручання, обмежена доступність, неадекватний розмір та форма, а також передача захворювань від донора [7, 8, 9]. Це зумовлює необхідність вдосконалення та пошук нових доступних, безпечних і оптимальних у використанні матеріалів, які мають відповідати певним вимогам [10]: біологічна сумісність, стимуляція ангіогенезу [5], остеокондуктивність і остеоіндуктивність [11], а також відсутність запальних, алергічних і токсичних реакцій [10].

При цьому істотна увага надається різноманітним факторам росту і кістковим морфогенетичним білкам [12, 13]. Проте їх альтернативою можуть бути тромбоцитарні маси, здатні підсилювати і оптимізувати процеси регенерації завдяки вмісту в тромбоцитах всіх відомих факторів росту [4, 9, 14].

Тромбоцити і тромбоцитарні маси

Тромбоцити – це без'ядерні сферичні клітини діаметром 2-4 мкм [15]. У кровоносному руслі вони циркулюють близько 9-11 діб, здатні до миттєвої адгезії, агрегації та секреції вмісту своїх гранул [16], першими накопичуються у великій кількості у ділянках пошкоджених стінок судини і оточуючих тканин [17]. Ці клітини містять практично всі можливі джерела активних форм кисню, такі як ксантиноксадаза, цитоплазматична НАД(Ф)Н-оксидаза, мітохондрії і ферменти, що каталізують перетворення арахідонової кислоти. Активні форми кисню виконують безліч функцій в організмі: участь у реакціях окисного фосфорилування, біосинтезу простагландинів і нуклеїнових кислот, у процесах мітозу та розпаду фагоцитованих клітин бактерій [18].

У тромбоцитах є близько 35 α -гранул і 5 щільних тіл, які виконують функцію основних резервуарів зберігання різноманітних біологічно активних речовин [17].

Активація тромбоцитів відбувається низкою стимуляторів (тромбін, хлорид кальцію, колаген тощо) [19] за рахунок контакту із специфічними рецепторами, розташованими на їх поверхні, або ж внаслідок взаємодії з колагеном, фактором Віллебранда та іншими адгезивними білками. При цьому підвищується внутрішньоклітинна концентрація іонів кальцію, внаслідок чого білки клітинної мембрани тромбоцитів опосередковують адгезію і агрегацію [15, 20, 21].

Загалом, завдяки своїй складній організації, тромбоцити здійснюють і контролюють адгезію, агрегацію і первинний судинно-тромбоцитарний гемостаз, ангіотрофічну та репаративну функції, що стало підставою до використання їх концентратів чи комбінації із фібрином і лейкоцитами за різноманітної патології.

Поняття «тромбоцитарні маси» — це термін, що узагальнює назву продуктів, виготовлених шляхом центрифугування крові відразу після відбору її зразка. Вони можуть бути активовані, неактивовані, з лейкоцитами або без, але всі характеризуються підвищеною до певного рівня концентрацією тромбоцитів [22].

Аутогенні тромбоцитарні маси стимулюють синтез колагену, індукцію росту судин, зменшують біль, забезпечують гемостаз, прискорюють регенерацію, знижують ризик післяопераційних інфекційно-запальних ускладнень, що зумовило їх використання для лікування ран м'яких тканин та індукції репаративного остеогенезу за кісткових дефектів [23-27].

Все більше широкого застосування тромбоцитарні концентрати набувають у різних областях гуманної медицини таких як ортопедія, оториноларингологія, гінекологія, косметична хірургія, офтальмологія,

загальна хірургія і стоматологія [22, 28], а також останнім часом і у ветеринарії. Плазма, збагачена тромбоцитами, володіє потужними остеоіндуктивними властивостями, у зв'язку з чим її поєднують із різними остеокондуктивними матеріалами [29].

Різні форми тромбоцитарних мас виготовляються шляхом модифікації протоколів центрифугування крові. В основу їх класифікації закладено два основні параметри, такі як архітектура фібрину та вміст клітин. В залежності від цього, тромбоцитарні концентрати можна розділити на 5 основних категорій [22, 33]:

- чиста плазма, збагачена тромбоцитами (Pure Platelet-Rich Plasma (P-PRP)) або плазма збагачена факторами росту (Plasma Rich in Growth Factors (PRGF));
- плазма, збагачена лейкоцитами та тромбоцитами (Leukocyte- and Platelet-Rich Plasma (L-PRP));
- ін'єкційний фібрин, збагачений тромбоцитами (injectable-Platelet-Rich Fibrin (i-PRF));
- чистий фібрин, збагачений тромбоцитами (Pure Platelet-Rich Fibrin (P-PRF)), комерційна назва Fibrinet (технологія його виготовлення передбачає використання антикоагулянту);
- фібрин, збагачений лейкоцитами та тромбоцитами (Platelet-Rich Fibrin (L-PRF)) [37, 38, 30].

Лікувальна ефективність P-PRP та PRF ґрунтується на дії значної кількості факторів росту (рис. 1) та інших сигнальних молекул, зосереджених у гранулах тромбоцитів [39]: фактор росту тромбоцитів (PDGF) [7, 40], трансформуючий фактор росту бета (TGF- β) [41], фактор росту фібробластів (FGF) [37], інсуліноподібний фактор росту-1 (IGF-1) [22], інсуліноподібний фактор росту-2 (IGF-2), судинний фактор ендотеліального росту (VEGF) [28], епідермальний фактор росту (EGF), Інтерлейкін 8 (IL-8), keratino-cyte фактор роста (KGF) та фактор росту сполучної тканини (CTGF) [39, 42].

Їх молекули індукують та регулюють ангіогенез, позаклітинне матричне ремоделювання і клітинні ефекти: задіяння стовбурових клітин, хемотаксис, проліферацію і диференціювання [43]. Тобто вони здатні впливати на будь-яку стадію регенеративного процесу — запальну, проліферативну та ремоделювання. Проте ефективність їх впливу на ці біологічні механізми значною мірою залежать від ступеню вивільнення і активності факторів росту та інших субстанцій тромбоцитів, що зумовлено технологією і протоколом їх концентрування [28].

Приготування тромбоцитарних мас

Технологія отримання плазми та фібрину, збагачених тромбоцитами, складається з наступних етапів: відбір зразка крові пацієнта та безпосереднє її центрифугування (рис. 2.). У результаті відбувається концентрування найактивніших компонентів, а саме – тромбоцитів, фібрину та інколи лейкоцитів.



Рис. 1. Фактори росту, зосереджені в гранулах тромбоцитів

Використовують такі форми тромбоцитарних мас: рідина, гель [35], згустки або плівки (мембрани) фібрину [44, 30], місцево, у вигляді ін'єкції [45,

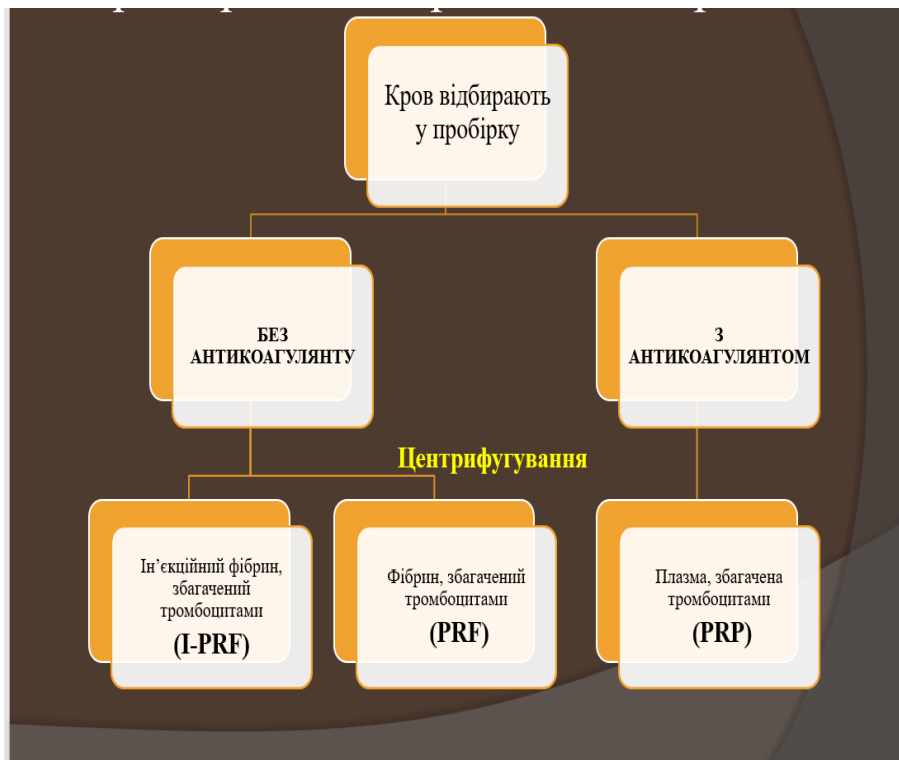


Рис. 2. Приготування тромбоцитарних мас

46, 32], чи у поєднанні з іншими матеріалами [47, 29].

Різноманітність форм та способів застосування PRP дає змогу їх використання для регенерації різних типів тканин. При цьому суттєву роль відіграє тип центрифуги, швидкість її обертання [46, 48, 49] і діаметри роторів, оскільки за різних їх параметрів отримують різні за складом і властивостями тромбоцитарні матеріали, що на сьогодні є найбільш дискусійним [50]. Розрахунок відносної відцентрової сили (g) дозволяє визначити бажану швидкість центрифугування для кожної центрифуги [51].

Плазма, збагачена тромбоцитами

Плазма, збагачена тромбоцитами – це фракція об'єму плазми крові після центрифугування з кількістю тромбоцитів у межах 1млн/мкл клітин. Оптимальним вважають збільшення концентрації тромбоцитів у п'ять разів, але за її рівня більше 5 млн/мкл спостерігається гальмування ангіогенезу [52].

Використовують наступні форми плазми, збагаченої тромбоцитами: рідку — неактивовану та гель — активовану [42, 53, 41, 49, 54]. Для концентрування тромбоцитів використовують одно— або двоступеневе центрифугування [55, 56]. При цьому склад PRP, залежно від методики, може бути суттєво різним за вмістом клітин, факторів росту і цитокінів. На нього також впливає спосіб активації тромбоцитів, що позначається на клінічній ефективності [40, 57]. Це, нерідко, зумовлює суперечливу інтерпретацію її результатів [42].

На властивості аутологічної плазми, збагаченої тромбоцитами, також впливають швидкість взяття і об'єм цільної крові (від якого залежить кількість тромбоцитів в кінцевому об'ємі плазми), вибір антикоагулянту [46, 42] (цитрат натрію, гепарин, натрій *EDTA* та калій *EDTA* (Натрій- та Калій-етилендіамінтетраоцтова кислота, які не рекомендують для приготування – знижує втрату зернистості)) та рН-фактор (7.2 – 8.0) [58].