

Влияние богатой тромбоцитами плазмы крови в составе средства для наружного применения на репаративный остеогенез (экспериментальное исследование)

О.Л. Гребнева, Т.А. Силантьева, М.А. Ковинька

The effect of blood platelet-rich plasma comprising an agent for external use on reparative osteogenesis (An experimental study)

O.L. Grebneva, T.A. Silant'eva, M.A. Kovin'ka

Федеральное государственное бюджетное учреждение

«Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А.Илизарова» Минздрава России, г. Курган (директор – д.м.н. А.В. Губин)

Цель. Изучение возможности воздействия лиофилизата богатой тромбоцитами плазмы крови (БОТП) на репаративную регенерацию кости при аппликациях БОТП в составе средства для наружного применения. **Материалы и методы.** Изучали воздействие на процесс регенерации после остеотомии ребра реципиентов (лабораторных мышей) суспензии геля тизоль и лиофилизата богатой тромбоцитами плазмы крови (БОТП) интактных доноров в составе средства для наружного применения. Контрольной группе животных наносили аналогичное разведение тизоля без БОТП. Изучали клеточный состав области регенерации и биохимические показатели сыворотки крови реципиентов через 10 суток после операции. **Результаты.** В тканях регенерата животных опытной группы обнаружили большее количество клеток остеобластической линии дифференцировки и меньшее – хондробластической линии дифференцировки (441 % и 45 % от контрольных значений соответственно). В сыворотке крови животных опытной группы обнаружили меньшую концентрацию кальция (79 % от контрольных величин). **Заключение.** Сделано заключение об ускорении регенераторных процессов в данном режиме использования БОТП и предложен подход к рассмотрению механизмов этого феномена. **Ключевые слова:** регенерация, адаптация, кость, клеточный состав, кровь, тромбоциты, кальций, тизоль, мыши, эксперимент.

Purpose. To study the possibility of influencing the blood platelet-rich plasma (BPRP) lyophilizate on bone reparative regeneration for applying BPRP as a part of an agent for external use. **Materials and Methods.** The influence of Tizol gel suspension, as well as that of blood platelet-rich plasma (BPRP) lyophilizate of intact donors as a part of an agent for external use on regeneration process after rib osteotomy in recipients (laboratory mice) studied. The similarly diluted BPRP-free Tizol applied to the animals of control group. The cell composition of regeneration zone, and the biochemical values of blood serum in recipients studied ten days after surgery. **Results.** A lot of cells of osteoblastic differentiation line found in the regenerated bone tissues of the animals in experimental group, as well as fewer cells of chondroblastic differentiation line (441 % and 45 % of control values, respectively). The lower calcium concentration found in blood serum of the animals in experimental group (79 % of control values). **Conclusion.** The acceleration of regeneration processes concluded for this mode of BPRP using, and the approach proposed to consider this phenomenon mechanisms. **Keywords:** regeneration, adaptation, bone, cell composition, blood, platelets, calcium, Tizol, mice, experiment.

До сих пор остается актуальной задача оптимизации хода восстановительных процессов при лечении пациентов травматологического и ортопедического профиля. Одним из методов решения этой задачи является использование концентрированных тромбоцитов в виде различных производных крови. Ряд экспериментальных и клинических исследований свидетельствуют о результативности применения этих компонентов крови, одна-

ко перед исследователями по-прежнему стоят комплексные вопросы по механизмам действия и стандартизации использования плазмы крови [7, 19, 20, 23].

Целью нашей работы явилось изучение возможности воздействия лиофилизата богатой тромбоцитами плазмы крови (БОТП) на репаративную регенерацию кости при аппликациях БОТП в составе средства для наружного применения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах был использован материал от 22 белых лабораторных мышей-самцов массой 20-25 г. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с этическими нормами, отраженными в «Европейской конвенции по защите прав позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Донорами БОТП были интактные мыши (n=10). Выделение БОТП проводили по общепринятой методике [2]. У животных – реципиентов моделировали перелом ребра [10]. В качестве основы мази был выбран препарат тизоль («ОЛИМП», г. Екатеринбург), не влияющий на показатели репаративного остеогенеза в данном режиме применения [1]. В экспериментальной группе животных (n=7) наносили водную суспензию лиофилизата БОТП на тизоле, в контрольной группе (n=5) – аналогичное разведение тизоля без БОТП. Через 10 суток после операции

выделяли материал для морфологических исследований области перелома и биохимических исследований крови. Производили подсчет количества дифференцированных клеток хондробластического и остеобластического ряда в периосте на единицу площади периостальной костнохрящевой мозоли (0,0025 мм²). В сыворотке крови определяли содержание молочной кислоты (МК), кальция (Ca), магния (Mg), фосфора (P) и хлоридов (Cl), активности щелочной (ЩФ, КФ 3.1.3.1.) и тартратрезистентной кислот (ТРКФ, КФ 3.1.3.2.) фосфатаз – с помощью наборов фирмы Vital Diagnostics (СПб), концентрации пировиноградной кислоты (ПВК) – модифицированным методом Умбрайта [5]. Результаты обрабатывали с помощью непараметрических методов статистики: данные приводили в виде медиан и квартилей, при проверке гипотез использовали критерий Вилкоксона для независимых выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В области регенерации у животных опытной группы по сравнению с контролем обнаружено более высокое количество клеток остеобластической линии дифференцировки и меньшее количество клеток хондробластической линии дифференцировки (табл. 1). Это свидетельствует об ускорении репаративных процессов в направлении морфогенеза костной ткани под воздействием БОТП. В сыворотке крови животных опытной группы была обнаружена меньшая концентрация кальция (78,8 % от контрольных значений). Значения остальных биохимических показателей не имели достоверных различий между группами.

Большое количество публикаций результатов экспериментальных [14, 16, 18] и клинических [7, 11, 12, 23] исследований свидетельствует об эффективности применения БОТП при костных травмах. Однако есть сведения и об отсутствии положительных эффектов при использовании БОТП как в клинических условиях [13, 22, 24], так и в эксперименте [17, 21]. Авторы аналитических обзоров [15, 19, 20] приходят к выводу о недостаточном количестве публикаций с результатами доказательных исследований этого метода.

Мы полагаем, что механизмы феномена оптимизации регенераторных процессов обладают общебиологическими закономерностями, и их необходимо рассматривать с позиций теории адаптации. Все этапы как регенерационного, так и адаптационного процесса являются сторонами общей программы развития целостного организма. Очевидно, что оба процесса функционируют непрерывно, а их промежуточным результатом

на конкретный момент времени является одна и та же функционирующая структура.

Известно, что исходом адаптационного процесса может быть либо стадия резистентности, либо стадия истощения. В наших опытах было обнаружено ускорение процессов репаративного остеогенеза. Мы полагаем, что в данной модели адаптационный ответ на серийное воздействие БОТП состоял в повышении резистентности, что отразилось в более эффективном метаболизме и ускорило темпы репаративной регенерации.

В пользу этого предположения свидетельствует более низкое содержание кальция в крови животных опытной группы. Это может быть следствием более интенсивного депонирования иона в образованные структуры регенерата, то есть отражать начало более поздней стадии регенерации под действием БОТП – стадии минерализации. Кроме того, клинические и экспериментальные исследования регенерации в различных тканях опорно-двигательной системы показали, что успешность регенерации тесно связана с организацией энергообеспечения в рамках целостного организма [3, 4, 6, 8, 9]. Обнаруженное в данном исследовании семикратное превышение концентрации молочной кислоты в крови животных контрольной группы (табл. 1, $p=0,051$) также подчеркивает важность перехода энергообеспечения метаболизма биосистемы от гликолитического к аэробному, которое характерно для более зрелых структур при репаративной регенерации. Таким образом, адаптационный процесс регенерации проявляется в совокупности метаболических реакций, зависящих от их энергообеспечения.

Таблица 1

Морфометрические показатели клеточного состава периостального костного регенерата ребра и биохимические показатели сыворотки крови реципиентов

	Контрольная группа				Опытная группа				P
	n	M	K1	K3	n	M	K1	K3	
ОБ	5	0,733	0,533	0,983	7	3,233	1,979	3,383	0,0058
ХБ	5	7,32	6,58	7,38	7	3,33	2,98	3,74	0,0058
ЩФ	5	171	162	182	7	231	178	339	0,3299
ТРКФ	5	2,5	0,9	3,5	7	0	0	2,15	0,2225
МК	5	4,34	3,69	4,42	7	0,623	0,398	0,968	0,0513
ПВК	5	0,305	0,284	0,307	7	0,541	0,298	0,774	0,3299
Ca	5	2,26	2,16	2,39	7	1,78	1,61	1,91	0,0149
P	5	2,44	2,26	2,65	7	1,92	1,61	5,54	0,2556
Mg	5	1,02	0,95	1,02	7	0,92	0,87	1,07	0,3298
Cl	5	113,7	113,1	116	7	118,6	115,8	122,7	0,2556

Примечания: ОБ, ХБ – количество клеток остеобластической и хондробластической линий дифференцировки на единицу площади периостальной костно-хрящевой мозоли соответственно; М, К1 и К3 – медиана, 1-й и 3-й квартили значений показателя в группе животных соответственно. Единицы измерения биохимических показателей: ЩФ и ТРКФ – Е/л, МК, ПВК, Ca, P, Mg, Cl – ммоль/л.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют об ускорении процессов репаративного остеогенеза при использовании богатой тромбоцитами плазмы крови в составе средства для наружного применения. На пути к разработке показаний к применению БОТП в клини-

ческих условиях необходимо проведение дальнейших экспериментальных исследований как в отношении состояния различных подсистем целостного организма в динамике ответа на воздействие, так и ориентиров в стандартизации воздействующего агента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Влияние компонентов сыворотки крови в составе средства для наружного применения на репаративные остео-, керато- и дермогенез в эксперименте / О.Л. Гребнева, М.А. Ковинька, Т.А. Силантьева, Е.Н. Горбач // Гений ортопедии. 2010. № 3. С. 135-140.
Grebneva O.L., Kovin'ka M.A., Silant'eva T.A., Gorbach E.N. Vliianie komponentov syvorotki krovi v sostave sredstva dlia naruzhnogo primeneniia na reparativnyye osteo-, kerato- i dermogenez v eksperimente [The influence of blood serum components being part of an agent for outer use on

- reparative osteo-, kerato- and dermogenesis experimentally]. *Genij Ortop.* 2010;(3):135-140.
- Лабораторные методы исследования в клинике: справочник / под ред. В.В. Меньшикова. М.: Медицина, 1987. 386 с. *Laboratornyye metody issledovaniia v klinike: spravochnik. Pod red. V.V. Men'shi-kova [Laboratory research methods in clinic]. [Ed. Men'shikov V.V.]. M.: Meditsina, 1987. 386 s.*
 - Межорганный взаимосвязь субстратов энергообмена у мышей при скелетной травме / М.В. Стогов, С.Н. Лунева, Е.А. Ткачук, Р.Ю. Очеретина // Гений ортопедии. 2010. № 3. С. 40-42. *Stogov M.V., Luneva S.N., Tkachuk E.A., Ocheretina R.Iu. Mezhorgannaia vzaimosviaz' substratov energoobmena u myshei pri skeletnoi travme [Interorganic relationship of energy metabolism substrates in mice for skeletal trauma]. Genij Ortop. 2010;(3):40-42.*
 - О перспективах использования наноматериалов в лечении повреждений и заболеваний тканей опорно-двигательной системы / В.И. Шевцов, Е.А. Волокитина, С.Н. Лунева, О.Л. Гребнева, М. А. Ковинька, И. А. Талашова, М. В. Стогов, А. Н. Накоскин, Т. А. Силантьева, Н. А. Кононович, Н. В. Петровская, Е. А. Ткачук, А. Г. Гасанова, А. А. Еманов, А. И. Гайдьшев // Гений ортопедии. 2008. № 4. С. 26-31. *Shevtsov V.I., Volokitina E.A., Luneva S.N., Grebneva O.L., Kovin'ka M.A., Talashova I.A., Stogov M.V., Nakoskin A.N., Silant'eva T.A., Kononovich N.A., Petrovskaiia N.V., Tkachuk E.A., Gasanova A.G., Emanov A.A., Gaidyshev A.I. O perspektivakh ispol'zovaniia nanomaterialov v lechenii povrezhdenii i zaboлева-nii tkanei oporno-dvigatel'noi sistemy [Scopes for nanomaterial use in treatment of the injuries and diseases of the locomotor apparatus tissues]. Genij Ortop. 2008;(4):26-31.*
 - Бабаскин Б.С. Определение пировиноградной кислоты модифицированным методом Умбрайта // Лабораторное дело. 1976. № 3. С. 76-79. *Babaskin B.S. Opredelenie pirovinogradnoi kisloty modifitsirovannym metodom Umbraita [Determination of pyruvic acid by the Umbright method]. Laboratornoe Delo. 1976;(3):76-79.*
 - Особенности энергетического метаболизма скелетных мышц собак в условиях удлинения голени по Илизарову / М.В. Стогов, Л.С. Кузнецова, С.Н. Лунева, С.А. Ерофеев // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2002. № 6. С. 176-179. *Stogov M.V., Kuznetsova L.S., Luneva S.N., Erofeev S.A. Osobennosti energeticheskogo metabolizma skeletnykh myshts sobak v usloviakh udlineniia goleni po Ilizarovu [The features of energy metabolism of canine skeletal muscles under leg lengthening according to Ilizarov]. Biulleten' VSNTs SO RAMN. 2002;(6):176-179.*
 - Сочетанное использование остеопластики и обогащенной тромбоцитами плазмы в травматологии и ортопедии (обзор) / И.А. Кирилова, Н.Г. Фомичев, В.Т. Подорожная, Ю.В. Эттейн // Травматология и ортопедия России. 2008. № 3 (49). С. 63-67. *Kirilova I.A., Fomichev N.G., Podorozhnaia V.T., Etitein Iu.V. Sochetannoe ispol'zovanie osteoplastiki i obogashchennoi trombocitami plazmy v travmatologii i ortopedii (obzor) [The combined use of osteoplasty and platelet-enriched plasma in traumatology and orthopaedics (a review)]. Travmatol. Ortop. Rossii. 2008;3(49):63-67.*
 - Стогов М.В., Самусенко Д.В., Бойчук С.П. Анализ метаболических процессов при заживлении множественных закрытых переломов верхних конечностей // Вестник травматологии и ортопедии. 2007. № 3. С. 59-62. *Stogov M.V., Samusenko D.V., Boichuk S.P. Analiz metabolicheskikh protsessov pri zzhivlenii mnozhestvennykh zakrytykh perelomov verkhnikh konechnostei [The analysis of metabolic processes for healing multiple closed fractures of the upper limbs]. Vestnik Travmatol. Ortop. 2007;(3):59-62.*
 - Стогов М.В., Смирнов А.В. Энергообмен в скелетных мышцах собак в ходе лечения перелома костей голени по Илизарову // Травматология и ортопедия России. 2012. № 3. С. 73-76. *Stogov M.V., Smirnov A.V. Energoobmen v skeletnykh myshtsakh sobak v khode lecheniia pereloma kostei goleni po Ilizarovu [Energy metabolism in canine skeletal muscles during treatment of leg bone fracture according to Ilizarov]. Travmatol. Ortop. Rossii. 2012;(3):73-76.*
 - Экспериментальная модель для изучения процессов репаративного остеогенеза / О.Л.Гребнева, М.А. Ковинька, Т.А. Силантьева, О.В. Дюрягина, Л.И. Сбродова, Е.И. Кузнецова, Л.В. Розова, М.В. Стогов, Е.А. Ткачук // Сибирский медицинский журнал. 2011. Т. 26, № 1. Вып. 1. С. 135-139. *Grebneva O.L., Kovin'ka M.A., Silant'eva T.A., Diuriagina O.V., Sbrodova L.I., Kuznetsova E.I., Rozova L.V., Stogov M.V., Tkachuk E.A. Eksperimental'naia model' dlia izucheniiia protsessov reparativnogo osteogeneza [An experimental model to study the processes of reparative osteogenesis]. Sibirskii Med. Zhurnal. Vyp. 1. 2011;26(1):135-139.*
 - Tayapongsak P., O'Brien D.A., Monteiro C.B., Arceo-Diaz L.Y. Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 1994;52(2):161-165.
 - Plachokova A.S., Nikolidakis D., Mulder J., Jansen J.A., Creugers N.H. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in dentistry: a systematic review. *Clin. Oral Implants Research.* 2008;19(6):539-545.
 - Torres J., Tamimi F., Martinez P.P., Alkhraisat M.H., Linares R., Hernández G., Torres-Macho J., López-Cabarcos E. Effect of platelet-rich plasma on sinus lifting: a randomized-controlled clinical trial. *J. Clin. Periodontol.* 2009;36(8):677-687.
 - Fennis J.P., Stoeltinga P.J., Jansen J.A. Mandibular reconstruction: a histological and histomorphometric study on the use of autogenous scaffolds, particulate cortico-cancellous bone grafts and platelet rich plasma in goats. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2004;33(1):48-55.
 - Guidelines for the Use of Platelet Rich Plasma: Presented by the International Cellular Medical Society. URL: [www. http://cellmedicinesociety.org](http://cellmedicinesociety.org).
 - Park E.J., Kim E.S., Weber H.P., Wright R.F., Mooney D.J. Improved bone healing by angiogenic factor-enriched platelet-rich plasma and its synergistic enhancement by bone morphogenetic protein-2. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 2008;23(5):818-826.
 - Chaput C.D., Patel K.V., Brindley G.W., Roux M.A., Hu N., Dmitriev A., Cunningham B. Influence of a platelet concentrate on prosthetic bone ingrowth in a rabbit model. *J. Surg. Orthop. Adv.* 2007;16(4):159-63.
 - Kim E.S., Park E.J., Choung P.H. Platelet concentration and its effect on bone formation in calvarial defects: an experimental study in rabbits. *J. Prosthet. Dent.* 2001;86(4):428-433.
 - Mehta V. Platelet-rich plasma: a review of the science and possible clinical applications. *Orthopedics.* 2010;33(2):111.
 - Lee K.S., Wilson J.J., Rabago D.P., Baer G.S., Jacobson J.A., Borrero C.G. Musculoskeletal applications of platelet-rich plasma: fad or future? *AJR. Am. J. Roentgenol.* 2011;196(3):628-36.
 - Por Y.C., Yeow V.K., Louris N., Lim T.K., Kee I., Song I.C. Platelet-rich plasma has no effect on increasing free fat graft survival in the nude mouse. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* 2009;62(8):1030-1034.
 - Thor A., Wannfors K., Sennerby L., Rasmusson L. Reconstruction of the severely resorbed maxilla with autogenous bone, platelet-rich plasma, and implants: 1-year results of a controlled prospective 5-year study. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* 2005;7(4):209-220.
 - Alsousou J., Thompson M., Hulley P., Noble A., Willett K. The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery: a review of the literature. *J. Bone Joint Surg. Br.* 2009;91(8):987-996.
 - Schaaf H., Streckbein P., Lendeckel S., Heidinger K., Görtz B., Bein G., Boedeker R.H., Schlegel K.A., Howaldt H.P. Topical use of platelet-rich plasma to influence bone volume in maxillary augmentation: a prospective randomized trial. *Vox Sang.* 2008;94(1):64-69.

Рукопись поступила 03.10.2013.

Сведения об авторах:

- Гребнева Ольга Леонидовна – ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава РФ, старший научный сотрудник лаборатории биохимии, к. м. н.
- Силантьева Тамара Алексеевна – ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава РФ, ведущий научный сотрудник лаборатории морфологии, к. б. н.
- Ковинька Михаил Александрович – ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава РФ, старший научный сотрудник лаборатории биохимии, к. б. н.