

ПАТОЛОГИЯ СЕТЧАТКИ, СОСУДИСТОЙ ОБОЛОЧКИ И ЗРИТЕЛЬНОГО НЕРВА PATHOLOGY OF RETINA, CHOROID AND OPTIC NERVE OLOGY

Научная статья
УДК 617.736-089
doi: 10.25276/0235-4160-2023-2-54-61

Исследование клеточного состава богатой тромбоцитами плазмы для оптимизации ее использования в хирургии макулярных разрывов. Часть 1

А.Ю. Клейменов, В.Н. Казайкин, Н.С. Демченко, А.В. Шалагин, А.С. Козлова

Екатеринбургский центр МНТК «Микрохирургия глаза», Екатеринбург

РЕФЕРАТ

Актуальность. В настоящее время использование богатой тромбоцитами плазмы крови (БоТП) является одним из успешных направлений тканевой инженерии и клеточной терапии в медицине. БоТП активно применяется в офтальмохирургии, в частности, для закрытия макулярного разрыва (МР). **Цель.** Исследовать клеточный состав БоТП для оптимизации ее использования в хирургии макулярного разрыва. **Материал и методы.** В настоящем исследовании представлены результаты анализа БоТП 20 пациентов (6 мужчин и 14 женщин), прооперированных в АО «Екатеринбургский центр МНТК «Микрохирургия глаза» в период с апреля по июль 2021 г. по поводу сквозного макулярного разрыва. Возраст пациентов составил от 57 до 82 лет ($69,0 \pm 1,2$ года). Для получения БоТП использовалась Ycellbio-Kit. При центрифугировании получались 2 основные фракции крови: плазма и эритроцитарный слой (эритроцитарная масса). Исследование содержимого пробирки проводилось на 4 уровнях. Основное внимание было уделено количественному составу тромбоцитов и лейкоцитов, которые являются наиболее важ-

ными и значимыми при хирургии МР. **Результаты.** В результате проведенного исследования были получены следующие показатели тромбоцитов и лейкоцитов в общем анализе крови (ОАК) и БоТП. Концентрация тромбоцитов в ОАК составила от 140 до $285 \cdot 10^3/\text{мкл}$ ($215,85 \pm 9,23$), P-PRP (чистая БоТП) – от 699 до $5681 \cdot 10^3/\text{мкл}$ ($2600,4 \pm 329,9$), L-PRP (ЛТС-плазма, содержащая тромбоциты и лейкоциты) – от 1995 до $9989 \cdot 10^3/\text{мкл}$ ($6555,8 \pm 506,7$) ($p < 0,001$). Концентрация лейкоцитов в ОАК составила от 3,83 до $7,73 \cdot 10^3/\text{мкл}$ ($5,58 \pm 0,29$), P-PRP – от 0,02 до $7,08 \cdot 10^3/\text{мкл}$ ($1,49 \pm 0,58$), L-PRP – $6,12 - 494,69 \cdot 10^3/\text{мкл}$ ($99,3 \pm 38,1$) ($p < 0,01$). **Заключение.** БоТП обладает регенераторной активностью и контрактильными свойствами в обеих фракциях – в P-PRP и L-PRP (ЛТС), что упрощает процесс забора БоТП из пробирки и расширяет возможности для ее применения в хирургии МР и другой патологии сетчатки, связанной с ретинальными дефектами. С учетом наименьшей концентрации лейкоцитов фракция P-PRP, возможно, является оптимальной для хирургии МР.

Ключевые слова: макулярный разрыв, обогащенная тромбоцитами плазма, тромбоциты, лейкоциты ■

Для цитирования: Клейменов А.Ю., Казайкин В.Н., Демченко Н.С., Шалагин А.В., Козлова А.С. Исследование клеточного состава богатой тромбоцитами плазмы для оптимизации ее использования в хирургии макулярных разрывов. Часть 1. Офтальмохирургия. 2023;2: 54–61. doi: 10.25276/0235-4160-2023-2-54-61

Автор, ответственный за переписку: Андрей Юрьевич Клейменов, kley_82@mail.ru

ABSTRACT

Original article

Cellular composition of platelet-rich plasma evaluation in order to optimize its use in macular hole surgery. Part 1

A.Yu. Kleymenov, V.N. Kazaykin, N.S. Demchenko, A.V. Shalagin, A.S. Kozlova

Eye Microsurgery Center, Ekaterinburg, Russian Federation

Currently, the use of platelet-rich plasma (PRP) is one of the successful areas of tissue engineering and cell therapy. In medicine PRP is widely used in ophthalmosurgery, in particular for macular hole (MH) closure.

Purpose. To evaluate cellular composition of PRP in order to optimize its use in macular hole surgery. **Material and methods.** This study included platelet-rich plasma analysis of 20 patients (6 male and 14 female) who underwent surgical treatment of macular hole in Eye Microsurgery Center in the period from April till July 2021. Patients' age ranged from 57 to

82 ($69,0 \pm 1,2$) years. Ycellbio-Kit was used to obtain PRP. As a result of centrifugation 2 main blood fractions were obtained: plasma and erythrocyte layer. The study of the contents of the test tube was performed on 4 levels. The main attention was paid to the quantitative composition of platelets and leukocytes, which are the most important and significant in MH surgery.

Results. The following platelet and leukocyte count in the general blood test and PRP were obtained as a result of the study. General blood test – platelet concentration was 140 to $285 \cdot 10^3/\mu\text{L}$ (215.85 ± 9.23), P-PRP (pure

platelet-rich plasma) – 699 to $5681 \cdot 10^3/\mu\text{L}$ (2600.4 ± 329.9), L-PRP (plasma containing platelets and leukocytes) – 1995 to $9989 \cdot 10^3/\mu\text{L}$ (6555.8 ± 506.7) ($p < 0.001$). General blood test – white blood cell concentration was 3.83 to $7.73 \cdot 10^3/\mu\text{L}$ (5.58 ± 0.29), P-PRP was 0.02 to $7.08 \cdot 10^3/\mu\text{L}$ (1.49 ± 0.58), L-PRP was 6.12 – $494.69 \cdot 10^3/\mu\text{L}$ (99.3 ± 38.1) ($p < 0.01$). **Conclusion.** Platelet-rich plasma has regenerative activity and contractile properties in both fractions –

in P-PRP and L-PRP, which simplifies the process of PRP extraction from the test tube and expands the possibilities for its use in MH surgery and other retinal pathologies associated with retinal tears. Given the lowest leukocyte concentration, the P-PRP fraction may be optimal for MH surgery.

Key words: macular rupture, platelet-enriched plasma, platelets, leukocytes ■

For citation: A.Yu. Kleymenov, V.N. Kazaykin, Demchenko N. S., Shalagin A.V., Kozlova A.S. Cellular composition of platelet-rich plasma evaluation in order to optimize its use in macular hole surgery. Part I. Fyodorov Journal of Ophthalmic Surgery. 2023;2: 54–61.
doi: 10.25276/0235-4160-2023-2-54-61

Corresponding author: Andrei Yu. Kleymenov, kley_82@mail.ru

АКТУАЛЬНОСТЬ

Внастоящий момент использование богатой тромбоцитами плазмы крови (БоТП; англ. Platelet rich plasma, PRP) является одним из успешных направлений тканевой инженерии и клеточной терапии в медицине [1]. В офтальмологии БоТП активно применяется в хирургии заболеваний сетчатки и переднего отрезка глаза [2–8].

В современной литературе представлено множество публикаций по использованию в клинической офтальмологии аутоплазмы с повышенным содержанием тромбоцитов, но нет единого представления и понимания о свойствах получаемых препаратов аутоплазмы, зависящих от их клеточного состава. Также описано большое количество классификаций и видов аутоплазмы в зависимости от способа получения и механизма действия [9, 10]. D.M. Dohan Ehrenfest и соавт. в 2008 г. представили достаточно простую в понимании классификацию, согласно которой выделили 4 группы препаратов плазмы с повышенным содержанием тромбоцитов, отличающихся клеточным составом и степенью активации фибриногена [11]. Регенераторное действие БоТП зависит от количества и качества содержащихся в ней тромбоцитов [12].

В тромбоцитах различают гиаломер и грануломер. Гиаломер – это зона под мембраной тромбоцита, содержащая сократительные миофиламенты (актин, миозин и тропомиозин). Грануломер – зона с органеллами, гранулами и гликогеновыми везикулами. Различают секреторные гранулы трех типов.

Альфа-гранулы содержат митогенные и хемотаксические факторы роста. Бета-гранулы содержат аденозинтрифосфат, аденозиндифосфат, гуанозинтрифосфат, гуанозиндифосфат, серотонин, кальций и неорганический фосфат. Гамма-гранулы (лизосомы) содержат кислотную фосфатазу, р-глюкуронидазу, катепсин, кислые гидролазы. В тромбоцитах содержится большое количество тромбоксан-синтазы, которая превращает арахидоновую кислоту клеточных мембран в тромбоксаны [13].

Согласно современным представлениям, по морфофункциональной характеристике выделено 4 типа тромбоцитов [14, 15].

Platelet-large cell ratio (P-LCR; большие тромбоциты), относятся к 3-му и 4-му типам отростчатых дегранули-

рованных тромбоцитов. Большие тромбоциты не содержат гранул, поэтому являются функционально неполноценными и не способны к выраженной адгезии и агрегации, не способны выполнять коагулологическую, ангиотрофическую, эндотелиальноподдерживающую, транспортную, ростстимулирующую функции и не обладают провоспалительной активностью, так как утратили биологически активные молекулы. Их доля от общего числа тромбоцитов составляет от 13–43%.

Функционально полноценными являются только дискоциты и большие округлые тромбоциты с гранулами, т.е. тромбоциты 1-го и 2-го типов [15].

Таким образом механизм действия БоТП заключается в том, что тромбоциты участвуют в регенерации тканей за счет факторов роста и других активных молекул (хемокинов, арахидоновой кислоты, фибриногена и фибрина [16]). В основе этих эффектов лежит синергичное взаимодействие с местными клетками, обуславливающее специфические реакции пролиферации, клеточной миграции и синтез экстрацеллюлярного матрикса [17].

Для офтальмологического использования чаще применяются системы Xcellbio Kit и Arthrex ACP (autologous conditioned plasma). Обе методики отличаются способом заготовки и, следовательно, клеточным составом получаемого субстрата, в котором офтальмологов в первую очередь интересует концентрация тромбоцитов и в меньшей степени лейкоцитов [18].

ЦЕЛЬ

Исследовать клеточный состав БоТП для оптимизации ее использования в хирургии макулярного разрыва (МР).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В настоящем исследовании представлены результаты анализа БоТП 20 пациентов (6 мужчин и 14 женщин), прооперированных в АО «Екатеринбургский центр МНТК «Микрохирургия глаза» в период с апреля по июль 2021 г. по поводу сквозного МР. Возраст пациентов со-

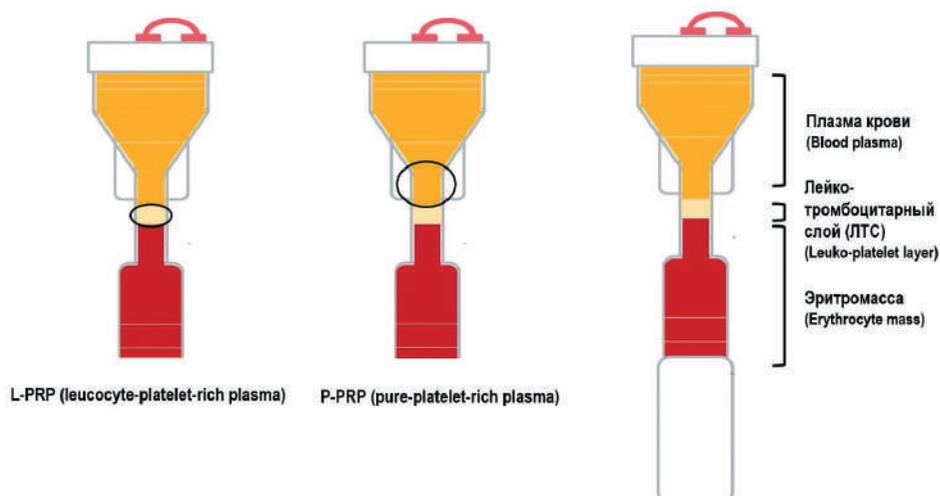


Рис. 1. Фракции крови в пробирке Yceelbio-Kit после центрифугирования. P-PRP – чистая обогащенная тромбоцитарная плазма и L-PRP – обогащенная тромбоцитами и лейкоцитами плазма

Fig. 1. Blood fractions in Yceelbio-Kit tube after centrifugation. P-PRP is pure platelet-enriched plasma and L-PRP is platelet- and leukocyte-rich plasma

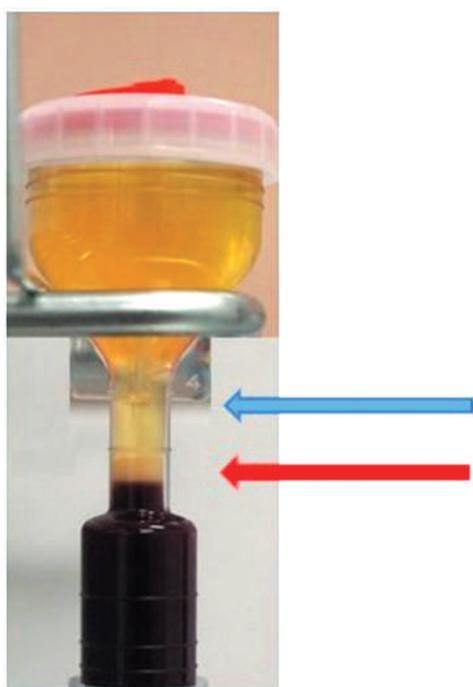


Рис. 2. Фракции крови в пробирке Yceelbio-Kit после центрифугирования: P-PRP – чистая обогащенная тромбоцитарная плазма (синяя стрелка) и L-PRP – обогащенная тромбоцитами и лейкоцитами плазма (красная стрелка)

Fig. 2. Blood fractions in the Yceelbio-Kit tube after centrifugation: P-PRP – pure platelet-enriched plasma (blue arrow) and L-PRP – platelet- and leukocyte-rich plasma (red arrow)

ставил от 57 до 82 лет ($69,0 \pm 1,2$ года), все – без приема антикоагулянтов и антиагрегантов, без тромбоцитопатии и тромбоцитопении.

Для получения БоТП использовался контейнер (пробирка) из силиконизированной пластмассы Ycellbio-Kit (Ycellbio Medical Co., Ltd, Южная Корея) и центрифуга

СМ-6М (ELMI, Латвия). Условия центрифугирования: 3200–3400/мин в течение 4 мин, двукратное при повышенном гематокрите.

Забор крови у пациента в шприц производился иглой 21G или иглой «бабочкой», не форсированно – для избежания повреждения клеток крови. Перед забором крови внутренняя поверхность цилиндра шприца обрабатывалась антикоагулянтом цитрат натрия, который обеспечивал жидкую консистенцию плазмы до момента ее аппликации в зону разрыва и не ограничивал хирурга по времени для выполнения этой манипуляции. Кроме того, цитрат натрия обеспечивал сохранность свойств тромбоцитов.

Для анализа состава полученных в результате центрифугирования фракций крови использовался аппарат Sysmex XS-500i – гематологический 5-DIFF-анализатор, который позволял определять концентрацию тромбоцитов и эритроцитов, качественный состав тромбоцитов, дифференцировать лейкоциты на 5 популяций. Объем образцов крови составлял 20 мкл. Анализ плазмы проводился автоматически в зависимости от уровня исследуемой фракции, на котором устанавливался пробоотборник анализатора.

При центрифугировании получались 2 основные (видимые) фракции крови: плазма и эритроцитарный слой (эритромаасса). Плазма состояла из следующих слоев: в самой верхней части пробирки располагалась бедная тромбоцитами плазма (PPP, Platelet Poor Plasma), в верхнем сегменте узкой части пробирки – чистая БоТП (P-PRP, Pure Platelet Rich Plasma), в нижнем сегменте узкой части пробирки – также слой БоТП, но с большим содержанием лейкоцитов, который поэтому называется лейко-тромбоцитарным слоем (Leucocyte Platelet Rich Plasma, L-PRP). Под L-PRP, т.е. в нижней части пробирки, располагался эритроцитарный слой (рис. 1, 2).

Исследование содержимого пробирки проводилось на 4 уровнях, представленных на рисунке 3. Основное

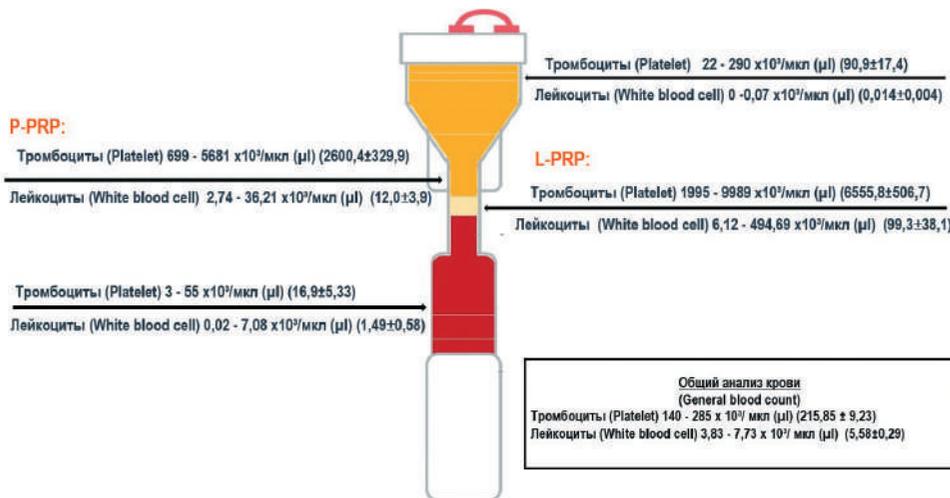


Рис. 3. Показатели концентрации тромбоцитов и лейкоцитов в пробирке Yceelbio-Kit после центрифугирования

Fig. 3. The values of platelet and leukocyte concentrations in the Yceelbio-Kit tube after centrifugation

внимание было уделено количественному составу тромбоцитов и лейкоцитов. Кроме того, с целью определения возможной корреляционной зависимости состава крови и состава БотП было проведено исследование общего анализа крови (ОАК).

Статистический анализ результатов исследования проводился при помощи пакета прикладных программ Microsoft Office Excel 2019 для операционной системы Windows.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведенного исследования были получены следующие показатели тромбоцитов и лейкоцитов в ОАК и БотП.

Концентрация тромбоцитов в ОАК составила от 140 до $285 \cdot 10^3/\mu\text{кл}$ ($215,85 \pm 9,23$), P-PRP – от 699 до $5681 \cdot 10^3/\mu\text{кл}$ ($2600,4 \pm 329,9$), L-PRP – от 1995 до $9989 \cdot 10^3/\mu\text{кл}$ ($6555,8 \pm 506,7$).

Концентрация лейкоцитов в ОАК составила от $3,83$ до $7,73 \cdot 10^3/\mu\text{кл}$ ($5,58 \pm 0,29$), P-PRP – от $0,02$ до $7,08 \cdot 10^3/\mu\text{кл}$ ($1,49 \pm 0,58$), L-PRP – $6,12 - 494,69 \cdot 10^3/\mu\text{кл}$ ($99,3 \pm 38,1$).

Полученные результаты представлены в *таблице 1*.

Показатели тромбоцитов и лейкоцитов в ОАК и БотП представлены в *таблице 2*.

Концентрация тромбоцитов меньше 1 млн/мкл в P-PRP была выявлена только в 2 случаях (10%), при этом у обоих пациентов отмечалась весьма низкая концентрация лейкоцитов: $699 \cdot 10^3/\mu\text{кл}$ (лейкоциты – $0,09 \cdot 10^3/\mu\text{кл}$) и $707 \cdot 10^3/\mu\text{кл}$ (лейкоциты – $0,06 \cdot 10^3/\mu\text{кл}$).

Концентрация тромбоцитов в БотП по сравнению с исходным уровнем в ОАК увеличилась в P-PRP в $2,6 - 27,0$ раза ($11,6 \pm 1,5$), в L-PRP – в $7,6 - 47,5$ раза ($29,2 \pm 2,3$). Концентрация лейкоцитов по сравнению с исходным уровнем в ОАК в P-PRP уменьшилась в $0,9 - 671,9$ раза ($200,3 \pm 60,2$), в L-PRP увеличилась в $1,6 - 93,3$ раза ($28,1 \pm 9,8$).

Показатели концентрации тромбоцитов и лейкоцитов во всех фракциях плазмы, эритроцитарном слое исследованной группы представлены на *рисунке 3*.

В результате проведенного исследования были получены следующие показатели больших (дегранулированных) тромбоцитов (P-LCR) в ОАК и БотП: в ОАК – от $17,9$ до $65,7 \cdot 10^3/\mu\text{кл}$ ($43,1 \pm 3,36$), в P-PRP – от $17,10$ до $1795,78 \cdot 10^3/\mu\text{кл}$ ($675,65 \pm 117,78$), в L-PRP – от $695,54$ до $3425,04 \cdot 10^3/\mu\text{кл}$ ($1830,52 \pm 202,27$).

Показатели P-LCR в ОАК и БотП в группе представлены в *таблице 3*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Методика хирургии МР с применением БотП, наряду с технологией перевернутого лоскута внутренней порочной мембраны (ВМП), позволила поднять анатомический успех лечения этого заболевания на качественно новый уровень и облегчила выполнение самой операции. В настоящее время трудности продолжают вызывать пациенты с МР более 400 мкм и глаза с передне-задней осью более 26 мм [19, 20].

Обогащенная плазма в своем составе, как следует из ее названия, содержит тромбоциты и растворенные в плазме белки (фибриноген и др.). Тромбоциты – плоские безъядерные клетки, образующиеся в костном мозге, содержат в своем составе: α -, β - и γ -гранулы, в которых депонируются более 30 факторов роста (ФР), цитокины, хемокины, адгезивные белки, Ca^{2+} и другие активные вещества, миофиламенты, которые построены из сократительных белков (актина, миозина и тропомиозина) и обеспечивают около 80% сократительной активности будущего сгустка. Активация всех этих веществ происходит в результате дегрануляции тромбоцитов при механическом контакте последних с любыми клетками, отличными от эндотелия сосудов, особен-

Таблица 1

Концентрация тромбоцитов и лейкоцитов в ОАК и фракциях БоТП

Table 1

Concentration of platelets and leukocytes in the general blood count and PRP fractions

Концентрация тромбоцитов Platelet concentration		
ОАК General blood count, μl (n=20)	P-PRP, μl (n=20)	L-PRP, μl (n=20)
140–285·10 ³ /мкл (215,85±9,23)	699–5681·10 ³ /мкл (2600,4±329,9)	1995–9989·10 ³ /мкл (6555,8±506,7)
Концентрация лейкоцитов White blood cell concentration		
ОАК General blood count, μl (n=20)	P-PRP, μl (n=20)	L-PRP, μl (n=20)
3,83–7,73·10 ³ /мкл (5,58±0,29)	0,02–7,08·10 ³ /мкл (1,49±0,58)	6,12–494,69·10 ³ /мкл (99,3±38,1)

Таблица 2

Показатели тромбоцитов и лейкоцитов в ОАК и полученных фракциях БоТП после центрифугирования

Table 2

Platelet and leukocyte count in the general blood count and obtained PRP fractions after centrifugation

Параметр	ОАК General blood count (n=20)	PPP (n=20)	P-PRP (n=20)	L-PRP (n=20)	Слой эритроцитов Layer of red blood cells (n=20)
Тромбоциты Platelet (μl)	140–285·10 ³ /мкл (215,85±9,23)	22–290·10 ³ /мкл (90,9±17,4)	699–5681·10 ³ /мкл (2600,4±329,9)	1995–9989·10 ³ /мкл (6555,8±506,7)	3–55·10 ³ /мкл (16,9±5,33)
Лейкоциты White blood cell (μl)	3,83–7,73·10 ³ /мкл (5,58±0,29)	0–0,07·10 ³ /мкл (0,014±0,004)	0,02–7,08·10 ³ /мкл (1,49±0,58)	2,11–494,69·10 ³ /мкл (99,3±38,1)	2,74–36,21·10 ³ /мкл (12,0±3,9)

Примечание. Из данных таблицы 2 установлено, что между концентрацией тромбоцитов и лейкоцитов в ОАК и БоТП корреляционной зависимости не выявлено ($R < 0,25$), что указывает на статистическую независимость этих показателей.

Note. From the data in Table No. 2, it was found that there was no correlation between the concentration of platelets and leukocytes in the UAC and BoTP ($R < 0,25$), which indicates the statistical independence of these indicators.

но это выражено при взаимодействии с коллагеновыми волокнами, обнажающимися в результате травмы (микротравмы) [21, 22]. Вариантом микротравмы может служить удаление ВПМ во время макулярной хирургии – процедуры, существенно ослабляющей центробежное тракционное воздействие на края разрыва, но неизбежно приводящей к микроповреждениям нейрорепителителя сетчатки.

Одновременно с вышеперечисленными процессами через молекулы белка-посредника (фактор фон

Виллебранда) происходит адгезия тромбоцитов к краям разрыва и окружающей ее сетчатке и запускается процесс свертывания – образование сгустка. Растворенный в плазме белок фибриноген под действием тромбина и Ca^{2+} последовательно переходит в фибрин-мономер, затем при участии фибриназы приобретает ковалентные связи и превращается в фибрин-полимер. Адгезия всего образующегося сгустка к поврежденной ткани осуществляется благодаря тромбоцитам и молекулам адгезии плазмы (фибронектин, тромбоспондин) [23, 24].

Таблица 3

**Концентрация больших тромбоцитов в ОАК и разных фракциях плазмы
(норма составляет 13–43%)**

Table 3

**Concentration of platelet-large cell ratio (P-LCR) in the general blood count and different plasma fractions
(normal is 13–43%)**

Абсолютное количество P-LCR Absolute number of P-LCR		
ОАК General blood count, μl	P-PRP, μl	L-PRP, μl
17,9–65,7·10 ³ /мкл (43,1±3,36)	17,10–1795,78·10 ³ /мкл (675,65±117,78)	695,54–3425,04·10 ³ /мкл (1830,52±202,27)

Во время хирургического процесса эти внутри- и межклеточные взаимодействия выглядят следующим образом.

После аппликации плазмы в зоне МР тромбоциты активируются, прикрепляются к поверхности сетчатки, высвобождают ФР, происходит формирование фибриновой матрицы. Факторы роста способствуют регенерации ткани. Сокращение миофиламентов тромбоцитов и фибрин-полимера способствует центростремительному стягиванию краев разрыва. Фибриновая матрица при смыкании разрыва, кроме того, обеспечивает поддержку высокой концентрации ФР в зоне разрыва и способствует пролиферации клеток. Далее наступает фаза регресса сгустка, которая длится 3 суток при активном участии белка-фермента плазмина [8].

Ключевым фактором эффективности БоТП является концентрация тромбоцитов, которая запускает регенеративные способности организма, количество введенной плазмы менее значимо. При увеличении концентрации тромбоцитов увеличивается концентрация факторов роста и миофиламентов. Наибольший стимулирующий эффект БоТП проявляется при концентрации тромбоцитов 1 000 000/мкл. При меньшей концентрации стимулирующий эффект снижается или отсутствует, при большей – не изменяется [12]. Хотя, по данным некоторых клинических исследований, БоТП эффективна и при концентрации тромбоцитов 300 000–700 000/мкл [7].

На эффективность БоТП может влиять не только количественный, но и качественный состав тромбоцитов и способность их к запуску регенераторных процессов. Поэтому в настоящей работе было проанализирована доля больших тромбоцитов (P-LCR) в исследуемых фракциях крови, которые относятся к 3-му и 4-му типам отростчатых, дегранулированных тромбоцитов. Обладая двигательной активностью и многочисленными отростками цитоплазматической мембраны, большие тромбоциты способны формировать тромбоцитарные агрегаты и участвовать в формировании тромбоцитарного каркаса для фибринового сгустка в месте смыкания и вос-

становления целостности поврежденной ткани. Но они уже не содержат гранул, поэтому являются функционально неполноценными и не способны к выраженной адгезии и агрегации, не способны выполнять коагулогическую, ангиотрофическую, эндотелиальноподдерживающую, транспортную, ростстимулирующую функции и не обладают провоспалительной активностью, так как утратили биологически активные молекулы.

Спорным эффектом для заживления МР является концентрация в БоТП лейкоцитов. По данным литературных источников, лейкоциты могут как усилить механизм восстановления тканей, снизить вероятность инфекции, так и усилить воспаление и способствовать образованию рубцов и фиброзу, что в значительной степени обусловлено нейтрофилами, влияющими на высвобождение свободных радикалов кислорода, катаболических цитокинов, матриксных металлопротеиназ (ММП) и интерлейкина В, разрушающих ткани [25–27].

Для объективности этих оценок нужно сказать, что эти данные в основном исходят не из офтальмологии, а общесоматических разделов медицины – травматологии, стоматологии, урологии и др., в которых концентрация лейкоцитов, безусловно, играет большое значение в процессах ранозаживления [28].

В офтальмологии предложено несколько методик получения БоТП, наиболее известными являются: система Ycellbio-Kit (Южная Корея), система Arthrex ACP (Германия), стерильная пробирка АРМ (Россия). Во всех случаях кровь пациента забирается в определенную емкость (вакуумная пробирка, двойной шприц, шприц-пробирка, сепаратор) и центрифугируется в заданных режимах. В результате происходит отделение аутологичной плазмы. Основное их отличие – различный качественный и количественный состав конечного продукта (содержание клеток в плазме). Качественный состав БоТП при центрифугировании крови в одних и тех же моделях пробирок у разных пациентов неоднороден. Хирургам в первую очередь интересен состав P-PRP – чистой обога-

щенной тромбоцитами плазмы и L-PRP (лейкотромбоцитарного слоя) – обогащенной тромбоцитами плазмы с большим содержанием лейкоцитов. Вопрос – какова реальная концентрация тромбоцитов и лейкоцитов в этих слоях, какой из них возможен для применения в хирургии МР и какой из них является наиболее оптимальным?

Ответ на этот вопрос явился целью настоящего исследования. В результате проведенного исследования были выявлены следующие данные. Во-первых, концентрация тромбоцитов в БоТП по сравнению с исходным уровнем в ОАК после центрифугирования увеличивается с большим разбросом – в P-PRP в 2,6–27,0 раза, в L-PRP – в 7,6–47,5 раза. При этом концентрация лейкоцитов по сравнению с исходным уровнем в ОАК в P-PRP уменьшается в 0,9–671,0 раза, а в L-PRP увеличивается в 1,6–93,3 раза. То есть были получены абсолютно непредсказуемые показатели и не было выявлено никакой корреляционной зависимости между концентрацией тромбоцитов и лейкоцитов в ОАК и в БоТП ($R < 0,25$). Важно, что концентрация тромбоцитов и в P-PRP, и в L-PRP после центрифугирования оказалась достаточной для эффективного применения в хирургии МР. В чистой плазме – P-PRP – только в 10% случаев (2 пациента) она не достигла 1 млн/мкл и составила 699 и $707 \cdot 10^3$ /мкл. Но даже эти показатели, согласно данным литературы, являются достаточными для стягивающей края разрыва и регенеративной активности БоТП. Это расширяет возможности хирурга во время операции по поводу МР – при недостаточном объеме слоя L-PRP или его отсутствии достаточно набрать P-PRP около слоя эритроцитной массы. Кроме того, объем фракции P-PRP значительно больше, чем L-PRP, поэтому его можно использовать и для хирургии разрывов сетчатки больших размеров и другой локализации. Низкая концентрация лейкоцитов в слое P-PRP ($0,02-7,08 \cdot 10^3$ /мкл ($1,49 \pm 0,58$) против $2,11-494,69 \cdot 10^3$ /мкл ($99,3 \pm 38,1$) в L-PRP ($p < 0,01$), возможно, делает его более оптимальным для применения в офтальмохирургии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При использовании пробирки Ycellbio-Kit концентрация тромбоцитов в P-PRP составила от 699 до 5681 ($2600,4 \pm 329,9$) $\cdot 10^3$ /мкл, в L-PRP (ЛТС) – от 1995 до 9989 ($6555,8 \pm 506,7$) $\cdot 10^3$ /мкл ($p < 0,001$), что значительно превышает либо приближено к наиболее оптимальной концентрации для активации регенераторных процессов в зоне макулярного разрыва ($1000 \cdot 10^3$ /мкл).

Концентрация лейкоцитов при использовании пробирки Ycellbio-Kit в P-PRP составила от 0,02 до $7,08 \cdot 10^3$ /мкл ($1,49 \pm 0,58$), в L-PRP – от 6,12 до $494,69 \cdot 10^3$ /мкл ($99,3 \pm 38,1$) ($p < 0,01$), что позволяет утверждать, что P-PRP является менее реактогенной для развития возможных воспалительных процессов.

Концентрация тромбоцитов и лейкоцитов на разных уровнях БоТП не зависит от показателей ОАК ($R < 0,25$).

БоТП в обеих фракциях – в P-PRP и L-PRP – обладает достаточной концентрацией тромбоцитов для послеоперационного смыкания краев МР, что упрощает процесс забора БоТП из пробирки и расширяет возможности для ее применения в хирургии сетчатки.

Доля больших (дегранулированных) тромбоцитов в P-PRP имеет меньший показатель по сравнению с L-PRP (22 и 27% соответственно) ($p < 0,01$), следовательно доля функционально активных тромбоцитов составила 78% в P-PRP и 73% в L-PRP, что позволяет предположить более высокую регенеративную активность P-PRP.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Болдырева О.В., Вахрушев С.Г., Торопова Л.А. Применение плазмы, обогащенной тромбоцитами, в медицинской практике. Современные проблемы науки и образования. 2016;5. [Boldyreva OV, Vakhrushev SG, Toropova LA. The use of plasma enriched with platelets in medical practice. Modern problems of science and education. 2016;5. (In Russ.)]
2. Rosenthal AR, Harbury C, Egbert PR, Rubenstein E. Use of a platelet-fibrinogen-thrombin mixture as a corneal adhesive: experiments with sutureless lamellar keratoplasty in the rabbit. Invest Ophthalmol. 1975;14(11): 872–875.
3. Лошкарева А.О., Майчук Д.Ю. Применение богатой тромбоцитами плазмы у пациентов с хроническими эрозиями роговицы. Современные технологии в офтальмологии. 2016;4: 131–132. [Loshkareva AO, Maychuk D.Yu. Use of Platelet-rich Plasma in Patients with Chronic Corneal Erosions. Modern technologies in ophthalmology. 2016;4: 131–132. (In Russ.)]
4. Арбенцева Н.С., Братко В.И., Трунов А.Н., Повешенко О.В., Черных В.В. Результаты применения аутологичной плазмы, обогащенной тромбоцитами, в составе комплексной схемы лечения увеита, ассоциированного с системными заболеваниями, сопровождающегося макулярным отеком. Офтальмохирургия. 2020;2: 20–25. [Arbenyeva NS, Bratko VI, Trunov AN, Poveshchenko OV, Chernykh VV. The results of the use of autologous platelet-rich plasma as part of a comprehensive treatment regimen for uveitis associated with systemic diseases and accompanied by macular edema. Fyodorov Journal of Ophthalmic Surgery. 2020;2: 20–25. (In Russ.). doi: 10.25276/0235-4160-2020-2-20-25]
5. Станишевская О.М., Черных В.В., Братко В.И. Сочетанная методика и ее клиничко-патогенетическая оценка в лечении центрального серозной хориоретинопатии с использованием субпорогового микроимпульсного лазерного воздействия длиной волны 577 нм в сочетании инъекциями тромбоцитарной аутоплазмы. Acta Biomedica Scientifica. 2019;4(4):134-138. [Stanishevskaya OM, Chernykh VV, Bratko VI. Combined technique and its clinical and pathogenetic evaluation in treatment of central serous chorioretinopathy using subthreshold microimpulse laser irradiation with a wavelength of 577 nm in combination with injections of platelet autoplasm. Acta Biomedica Scientifica. 2019;4(4): 134–138. (In Russ.). doi: 10.29413/ABS.2019-4.4.21]
6. Paques M, Chastang C, Mathis A, et al. Effect of autologous platelet concentrate in surgery for idiopathic macular hole: results of a multicenter, double-masked, randomized trial. Platelets in macular hole surgery group. Ophthalmology. 1999;106(5): 932–938.
7. Арсютов Д.Г. Использование аутологичной кондиционированной плазмы, обогащенной тромбоцитами, в хирургии регматогенной отслойки сетчатки с центральным и периферическими разрывами. Acta Biomedica Scientifica. 2019;4(4): 61–65. [Arsyutov DG. Use of autologous conditioned platelet rich plasma in the surgery of rhegmatogenous retinal detachment with central and peripheral tears. Acta Biomedica Scientifica. 2019;4(4): 61–65. (In Russ.). doi: 10.29413/ABS.2019-4.4.8]
8. Шкворченко Д.О., Захаров В.Д., Шпак А.А. и др. Наш первый опыт применения богатой тромбоцитами плазмы крови в хирургии макулярных разрывов. Современные технологии в офтальмологии. 2016;1(9): 245–246. [Shkvorchenko DO, Zakharov VD, Shpak AA, et al. Our first experience in the use of platelet-rich blood plasma in the surgery of macular ruptures. Modern technologies in ophthalmology. 2016;1(9): 245–246. (In Russ.)]
9. Everts P, Onishi K, Jayaram P, Lana JF, Mautner K. Platelet-Rich Plasma: New performance understandings and therapeutic considerations in 2020. Int J Mol Sci. 2020;21(20): 7794. doi: 10.3390/ijms21207794

10. Попов Е.М., Куликов А.Н., Чурашов С.В., Гаврилюк И.О., Егорова Е.Н., Аббасова А.И. Сравнение показателей получаемой разными способами аутоплазмы, используемой для лечения пациентов с макулярным разрывом. Офтальмологические ведомости. 2021; 14(4): 27–34. [Popov EM, Kulikov AN, Churashov SV, Gavrilyuk IO, Egorova EN, Abbasova AI. Comparison of indicators of autologous serum obtained by different methods and used for the treatment of macular hole. Ophthalmology Reports. 2021;14(4): 27–34. (In Russ)]. doi: 10.17816/OV89413
11. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: From pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). Trends 12. Biotechnol. 2009;27(3): 158–167. doi: 10.1016/j.tibtech.2008.11.009
12. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? Implant Dent. 2001;10(4):225–8. doi: 10.1097/00008505-200110000-00002
13. Медведев В.Л., Коган М.И., Михайлов И.В., Лепетунцов С.Н. Аутологичная плазма, обогащенная тромбоцитами: что это и для чего? Вестник урологии. 2020;8(2): 67–77. [Medvedev VL, Kogan MI, Mihailov IV, Lepetunov S.N. Platelet-rich autologous plasma: what is it and for what? Urology Herald. 2020;8(2): 67–77. (In Russ.)]. doi: 10.21886/2308-6424-2020-8-2-67-77
14. Колосова Е.Н., Василенко И.А., Ковалева Л.Г. Оценка морфофункционального состояния тромбоцитов у больных идиопатической тромбоцитопенической пурпурой методом витальной компьютерной морфометрии. Сибирский научный медицинский журнал. 2011;31(2): 58–63. [Kolossova EN, Vasilenko IA, Kovaleva LG. Assessment of morphofunctional condition of platelets of patients with idiopathic thrombotocytopenic purpura by method of vital computer morphometry. The Siberian Scientific Medical Journal. 2011;31(2): 58–63. (In Russ.)]
15. Макаров М.С. Особенности морфофункционального статуса тромбоцитов человека в норме и патологии. Дисс. ...канд. биол. наук. М.; 2014. [Makarov MS. Features of the morphofunctional status of human platelets in norm and pathology [Dissertation]. Moscow; 2014.
16. Guder WG, Narayanan S, Wissner H, Zawta B. Special aspects of haematological analysis: diagnostic samples: from the patient to the laboratory. The impact of preanalytical variables on the quality of laboratory results. 4th ed. Berlin: Wiley-Blackwell, Publications; 2009.
17. Weiser L, Bhargava M, Attia E, Torzilli PA. Effect of serum and platelet-derived growth factor on chondrocytes grown in collagen gels. Tissue Eng. 1999;5(6): 533–544. doi: 10.1089/ten.1999.5.533
18. Куликов А.Н., Чурашов С.В., Попов Е.М. Методы лечения макулярного разрыва – история и перспективы. Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова. 2021;1: 135–138. [Kulikov AN, Churashov SV, Popov EM. Methods of treatment of macular hole: history and prospects. Bulletin of Pirogov National Medical & Surgical Center. 2021;1: 135–138 (In Russ.)] doi: 10.25881/BPNMSC.2021.14.53.026
19. Rizzo S, Tartaro R, Barca F, Caporossi T, Bacherini D, Giansanti F. Internal limiting membrane peeling versus inverted flap technique for treatment of full-thickness macular holes: a comparative study in a large series of patients. Retina. 2018;38 Suppl 1: S73–S78. doi: 10.1097/IAE.0000000000001985
20. Schaub F, Gözlügöl N, von Goscinski C, Enders P, Heindl LM, Dahlke C. Outcome of autologous platelet concentrate and gas tamponade compared to heavy silicone oil tamponade in persistent macular hole surgery. Eur J Ophthalmol. 2021;31(2): 664–672. doi: 10.1177/1120672120993704
21. Базлов С.Б., Мелконян К.И., Русинова Т.В., Попандопуло К.И., Марченко Н.В., Шевчук Д.Д. К вопросу о получении плазмы, обогащенной тромбоцитами. Инновационная медицина Кубани. 2022;(1): 38–43. [Bazlov SB, Melkonian KI, Rusinova TV, Popandopulo KI, Marchenko NV, Shevchuk DD. On the issue of obtaining platelet-rich plasma. Innovative Medicine of Kuban. 2022;(1): 38–43. (In Russ.)] doi: 10.35401/2500-0268-2022-25-1-38-43
22. Sánchez M, Andia I, Anitua E, et al. Platelet rich plasma (PRP) biotechnology: concepts and therapeutic applications in orthopedics and sports medicine. Innovations in Biotechnology. 2012;113–138. doi: 10.5772/28908
23. Sun S, Urbanus RT, Ten Cate H, de Groot PG, de Laat B, Heemskerk JWM, Roest M. Platelet activation mechanisms and consequences of immune thrombocytopenia. Cells. 2021;10(12): 3386. doi: 10.3390/cells10123386
24. Fernández DI, Kuijpers MJ, Heemskerk JW. Platelet calcium signaling by G-protein coupled and ITAM-linked receptors regulating anoctamin-6 and procoagulant activity. Platelets. 2021;32: 863–871. doi: 10.1080/09537104.2020.1859103
25. Saad Setta H, Elshahat A, Elsherbiny K, Massoud K, Safe I. Platelet-rich plasma versus platelet-poor plasma in the management of chronic diabetic foot ulcers: a comparative study. Int Wound J. 2011;8(3): 307–312. doi: 10.1111/j.1742-481X.2011.00797
26. McCarrel TM, Minas T, Fortier LA. Optimization of leukocyte concentration in platelet-rich plasma for the treatment of tendinopathy. J Bone Joint Surg Am. 2012;94(19): e143(1–8). doi: 10.2106/JBJS.L.00019
27. DeLong J, Beitzel K, Mazzocca A, Shepard D, Roller B, Hanypsiak B. Update on platelet-rich plasma. Current Orthopaedic Practice: November/December. 2011;22 (6): 514–523. doi: 10.1097/BCO.0b013e318236bd55
28. Tohidnezhad M, Varoga D, Wruck CJ, Podschun R, Sachweh BH, Bornemann J, Bovi M, Sönmez TT, Slowik A, Houben A, Seekamp A, Brandenburg LO, Pufe T, Lippross S. Platelets display potent antimicrobial activity and release human beta-defensin 2. Platelets. 2012;23(3): 217–223. doi: 10.3109/09537104.2011.610908

Информация об авторах

Андрей Юрьевич Клейменов, врач-офтальмохирург, kley_82@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1848-1207>

Виктор Николаевич Казайкин, д.м.н., victor-ru66@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9569-5906>

Надежда Сергеевна Демченко, к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики и лабораторной генетики, medichkan@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0580-6188>

Андрей Витальевич Шалагин, врач клинической лаборатории, andrey_shalagin_2021@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2559-6261>

Алина Сергеевна Козлова, врач-стажер, alina.kozlova1804@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2559-6261>

Information about the authors

Andrei Yu. Kleimenov, Ophthalmologist, kley_82@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1848-1207>

Victor N. Kazaykin, Doctor of Sciences in Medicine, victor-ru66@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9569-5906>

Nadejda S. Demchenko, PhD in Medicine, Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics and Laboratory Genetics, medichkan@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0580-6188>

Andrei V. Shalagin, Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, andrey_shalagin_2021@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2559-6261>

Alina S. Kozlova, Resident doctor, alina.kozlova1804@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2559-6261>

Вклад авторов в работу:

А.Ю. Клейменов: существенный вклад в концепцию и дизайн работы, редактирование, написание текста, окончательное утверждение версии, подлежащей публикации.

В.Н. Казайкин: существенный вклад в концепцию и дизайн работы, редактирование, написание текста, окончательное утверждение версии, подлежащей публикации.

Н.С. Демченко: существенный вклад в концепцию и дизайн работы, редактирование, написание текста.

А.В. Шалагин: вклад в концепцию и дизайн работы, редактирование текста.

А.С. Козлова: сбор, анализ и обработка материала, написание текста.

Authors' contribution:

A.Yu. Kleimenov: significant contribution to the concept and design of the work, editing, writing, final approval of the version to be published.

V.N. Kazaykin: significant contribution to the concept and design of the work, editing, writing, final approval of the version to be published.

N.S. Demchenko: significant contribution to the concept and design of the work, editing, writing.

A.V. Shalagin: contribution to the concept and design of the work, editing.

A.S. Kozlova: collection, analysis and processing of material, writing.

Финансирование: Авторы не получили конкретный грант на это исследование от какого-либо финансирующего агентства в государственном, коммерческом и некоммерческом секторах.

Согласие пациента на публикацию: Письменного согласия на публикацию этого материала получено не было. Он не содержит никакой личной идентифицирующей информации.

Конфликт интересов: Отсутствует.

Funding: The authors have not declared a specific grant for this research from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sectors.

Patient consent for publication: No written consent was obtained for the publication of this material. It does not contain any personally identifying information.

Conflict of interest: There is no conflict of interest.

Поступила: 01.02.2023
Переработана: 09.03.2023
Принята к печати: 15.05.2023

Originally received: 01.02.2023
Final revision: 09.03.2023
Accepted: 15.05.2023