

ЗАСТОСУВАННЯ ЗБАГАЧЕНОЇ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМИ (ЗТП) ПРИ ТРАВМАТИЧНИХ УШКОДЖЕННЯХ СУХОЖИЛКІВ

(огляд літератури)

Гайович І.В.

APPLICATION OF PLATELET-RICH PLASMA (PRP) IN TRAUMATIC DAMAGES of LIGAMENTS

(review of the literature).

Gajovich I.V.

Репаративними процесами при пошкодженні сухожилків фахівці цікавилися ще з давніх часів, вивчаючи стадійність цього процесу і намагаючись пришвидшити ці процеси. Пирогов М.І. у своїх працях вказував на важливу роль низькодиференційованих клітин кров'яного згортка та паратенона для регенерації сухожилків. Як показали дослідження, ще в середині ХХ століття основним джерелом регенерації сухожилля є навколишні м'які тканини (екзогенний шлях) і проліферація власне клітин ушкодженого сухожилля та фібробластів (ендогенний шлях) [6,35,39].

На даний момент учені виділяють 4 основні фази репаративного процесу, які відбуваються в ушкоджених сухожиллях. Перша фаза – запалення відбувається протягом перших трьох - п'яти днів після травми. Вона характеризується міграцією і проліферацією клітин з навколишніх м'яких тканин (паратенон, підшкірна жирова клітковина і фасції), та проліферацією власне клітин сухожилля (епітенону та паратенону). Таким чином дефект тканин спочатку заповнюється грануляційною тканиною екзогенного походження. Фібробласти, що мігрують у зону травми, володіють фагоцитарними властивостями і знаходяться в межах ушкодженого сухожилля. У цю фазу запалення зона дефекту заповнена ушкодженою тканиною, що включає в себе залишки розірваних сухожилів, гематоми і біомеханічна міцність

Experts were interested in regeneration processes in damaged ligaments since ancient times, studied the stages of this process and trying to fasten it. Pirogov in his works pointed to the important role of cells in blood convulsion and paratenon for ligaments regeneration. Studies have shown that even in the middle of the XXth century the main sources of tendon regeneration were the surrounding soft tissues (exogenous path) and proliferation of own cells of damaged tendons and fibroblasts (endogenous path). [6,35,39]

Nowadays scientists distinguish 4 basic phases of reparative process that occurred in damaged tendons. The first phase is the inflammation that occurs during the first three to five days after the injury. It is characterized by migration and proliferation of cells from the surrounding soft tissues (paratenon, adipose and fascia), and proliferation the tendon's own cells (epitenon and paratenon). So the defect of tissue originally is filled with granulation tissue of exogenous origin. Fibroblasts, migrating into the zone of injury have phagocyte properties and are within the damaged tendon. In this phase the inflammation area defect is filled with damaged tissue that includes the remains of torn tendons, hematoma and biomechanical strength of this area depends on the fibrin fibers that are charging the edges



цієї ділянки залежить від фібринових волокон, що стягують краї ушкодженого сухожилля. На п'ятий день після травми фібробласти, які мігрували в зону ушкодження, починають синтезувати колаген. Спочатку відсутня певна орієнтація новостворених колагенових волокон, а фібробласти є домінуючим типом клітин у зоні ушкодження, кількість колагену безперервно протягом 4 тижнів після травми збільшується. У кінці четвертого тижня збільшується проліферація фібробластів ендогенного походження. Ці фібробласти в основному походять з ендотенону, вони активно ремоделюють колаген. Відбувається дозрівання колагенових волокон, їх переорієнтація вздовж осі функціонального напруження сухожилля. Ця фаза регенерації відбувається приблизно протягом двох місяців після травми. Остаточне ремоделювання проходить під дією навантаження. При цьому відбувається процес зшивання колагенових волокон, що веде до зростання міцності відновленого сухожилля. Крім того, колаген третього типу поступово замінюється на більш міцний колаген першого типу, що морфологічно та функціонально наближає ушкоджену зону до здорового сухожилля, хоча дослідження показують, що навіть через 14 місяців після травми у відновленій зоні може зберігатись підвищений вміст колагену третього типу, що веде до зниження еластичних та міцносних характеристик сухожилля, його перевантаження та дегенерації, що може призвести до його розриву в подальшому [18,21,22,28,35,39].

Результати сучасних досліджень показують, що різні фактори росту відіграють ключову роль у перебігу процесів репарації, стимулюючи процеси неоваскуляризації, проліферації і диференціації клітин та синтезу міжклітинного матриксу в зоні ушкодження (таб 1.1) [37].

of the damaged tendon. On the fifth day after the injuries of dermal fibroblasts, which migrated into the area of damage begin to synthesize collagen. First, missing a certain orientation of newly formed collagen fibres, and dermal fibroblasts are the dominant type of cells in the area of the damage amount of collagen continuously for 4 weeks after the injury. At the end of the fourth week increases proliferation of fibroblasts of endogenous origin. These dermal fibroblasts are mainly derived from the endotenon, they actively remodel collagen. Maturation of collagen fibres shifts along the axis of the functional stress of the tendon. This phase of regeneration takes place for about two months after the injury. The final remodelling takes place under the influence of the load. At that occurs the process of Collagen fibres cross-linking, leading to an increase in the strength of reconstructed tendon. In addition, the collagen of third type is gradually replaced by a more durable collagen of first type, which morphologically and functionally brings the damaged area to the condition of healthy tendon, although studies show that even 14 months after injury in the restored area could be high content of collagen of the third kind, which leads to a reduction of elastic and strength characteristics of the tendon, its overload and degeneration, which can cause it to break in the future. [18, 21, 22, 28, 35 and 39]

The results of modern studies show that various growth factors play a key role in the course of repair processes by stimulating processes of angiogenesis, proliferation and differentiation of cells and the synthesis of intercellular matrix in the zone of damage (Table 1.1). [37]

Таблиця 1.1

Вплив факторів росту на різних стадіях репаративно-відновних процесів в сухожиллях

Table 1.1

Effect of growth factors at different stages of reparative-regenerative processes in the tendons

Фаза регенерації Phase of regeneration	Процеси, що проходять в зоні ушкодження <i>Processes that take place in the zone of damage</i>	Фактори росту, що впливають на процес <i>Growth factors that affect the process of</i>
Запалення Inflammation	Стимулює міграцію фібробластів і запальних клітин у місці ушкодження <i>Stimulates the migration of fibroblasts and inflammatory cells at the site of injury</i> Регулює експресію та атракцію інших факторів росту <i>Regulates the expression and attraction of other growth factors</i> Стимулює неангіогенез <i>Stimulates neoangiogenesis</i>	IGF-1 [1,13,31] TGF- β [32,33,48] PDGF [30,45,47] VEGF, bFGF [9,40,42,46,53]
Проліферації Proliferation	Проліферація клітин, синтез ДНК <i>Proliferation of the cells, DNA synthesis</i> Стимуляція синтезу колагену та міжклітинного матриксу <i>Stimulation of the synthesis of collagen and intercellular matrix</i> Синтез колагену 3-ого типу <i>Synthesis of 3rd type collagen</i>	IGF-1, PDGF, TGF- β , bFGF, GDF-5,-6,-7[1,11,41] IGF-1, PDGF, bFGF [1, 9,10,41] TGF- β , GDF-5,-6,-7[11]
Диференціації Differentiation	Ремодельовання міжклітинного матриксу <i>Remodeling the intercellular matrix</i> Припинення процесів проліферації клітин <i>Termination of cell proliferation processes</i> Синтез колагену 1-ого типу <i>Synthesis of 1st type collagen</i>	IGF-1[1,13,31] TGF- β [11] PDGF ,TGF- β , GDF-5,-6,-7 [11,41]



І майже з моменту відкриття факторів росту вчені намагались пришвидшити та покращити процес регенерації за рахунок привнесення в зону ушкодження додаткової кількості факторів росту як аутологічного, так і біосинтетичного походження.

Історія дослідження факторів росту почалася ще в 50-х роках минулого сторіччя. У 1952 році доктор Levi-Montalcini досліджуючи культуру клітин пухлини помітила, що наявність пухлинних клітин стимулює ріст нервових волокон ембріона курей у безпосередній близькості від вогнища пухлини. Помітивши наявність специфічних речовин, автор продовжила дослідження в цьому напрямку і в 1957 році спільно з Stanley Cohen виділила цю речовину, що отримала назву Nerve Growth Factor (фактор росту нервів). Подальша співпраця цих учених дозволила виділити Epidermal Growth Factor- фактор росту епідермісу, який ефективно стимулює проліферацію епітеліальних клітин [12].

У 60 -70-х роках ХХ століття виділили групу факторів росту при дослідженні процесів росту пухлин. Було встановлено, що збагачена тромбоцитами плазма, на відміну від бідної тромбоцитами плазми, позитивно впливає на ріст та проліферацію епідермальних клітин. Тоді ж було визначено, що в альфа-гранулах тромбоцитів містяться протеїни, які локально впливають на проліферацію та диференціацію клітин. Наявні на той час технології не дозволяли виділити окремі фактори та визначити їх механізм дії.

Лише в 1979 році з альфа-гранул тромбоцитів був виділений Platelet derived growth factor (PDGF), встановлено структуру його форм та вивчено специфічний вплив на проліферацію клітин сполучної тканини [25].

У 1982 році Gary Knighton дослід-

And almost from the moment of growth factors discovery, scientists have tried to speed up and improve the process of regeneration by infusing the area of damage with additional quantities of growth factors.

History of the research of the factors of growth began in the 50's of the last century. In 1952, Dr. Levi-Montalcini was exploring the culture of the cells of the tumour and has noticed that the presence of tumour cells stimulate the growth of nerve fibres of chickens embryo in close proximity to the hearth of tumours. Having notified the presence of specific substances, the author continued the research in this direction and in 1957, jointly with Stanley Cohen distinguished this substance called Nerve Growth Factor (nerve growth factor). Further cooperation of scientists allowed selecting Epidermal Growth Factor that effectively stimulates proliferation of epithelial cells. [12]

In the 60 -70's years of the XXth century a group of growth factors have been distinguished in the study of the processes of tumours growth. It was established that enriched Platelet-Rich Plasma unlike poor platelet-rich plasma, positively influences on epidermal cells growth and proliferation. Then it was defined that the alpha granules of platelets contain proteins that are locally affect by proliferation and differentiation of cells. Available technology at that time did not allow selecting individual factor and determining mechanism of action thereof. Only in 1979, with alpha-granules of platelets Platelet derived growth factor (PDGF) was established, structure of forms thereof was defined and the specific impact on cell proliferation of connective tissue was studied. [25]

жуючи неоангіогенез та синтез колагену при загоєнні ран у дослідних кролів вказав, що продукти, виділені з тромбоцитів, зокрема PDGF, здатні стимулювати неоангіогенез, фіброплазію та синтез колагену при загоєнні ран. Автор пояснив порушення процесів загоєння ран у пацієнтів із тромбоцитопенією, лейкопенією та порушенням коагуляції, а також запропонував у таких випадках трансфузію тромбоцитарної маси [5]. На цей момент із тромбоцитів та плазми виділено більш ніж 30 видів факторів росту, що в тій чи іншій мірі впливають на проліферацію, диференціацію клітин, синтез колагену та інших речовин при ушкодженні тканин. В основному на репертативно-відновні процеси в сполучній тканині впливають: PDGF, TGF- α, β , FGF, IGF, PDEGF, PDAF – (Таб. 1.2). Одні з них містяться в альфа-гранулах тромбоцитів, інші – розчинені в плазмі. На цей момент існують рекомбінантні аналоги майже всіх відомих факторів росту і доведена ефективність дії кожного з них на якусь певну ланку репаративного процесу. Розглянемо це питання докладніше.

На даний момент проведено багато досліджень, під час яких вивчали ізольований вплив та механізм дії того чи іншого фактору росту на загоєння сухожильків.

PDGF (Platelet derived growth factor) або тромбоцитарний фактор росту індукує дію інших факторів росту (IGF-1) у першій фазі загоєння. Крім того, дослідження на тваринних моделях показали, що він стимулює процеси проліферації та диференціації клітин, дозозалежно стимулює синтез колагену в фазі ремоделювання. Застосування цього фактору росту, особливо в комбінації з IGF-1 та bFGF, на пізніх стадіях репарації веде до утворення функціонально більш повноцінного сухо-

In 1982 Gary Knighton, researching angiogenesis and collagen synthesis in wound healing in experimental rabbits, pointed out that the products separated from the platelets, namely PDGF are able to stimulate neoangiogenesis and collagen synthesis in wound healing. The author explained deviations of wound healing processes in patients with thrombocytopenia by leukopenia, and coagulation disorders, and suggested transfusion of thrombocytes in such cases. [5] Nowadays over 30 types of growth factors are separated from platelets and plasma and all of them at some extent affect proliferation, differentiation of cells, synthesis of collagen and other substances at the damaged tissue. Mostly the following influence on reparative processes in connective tissues: PDGF, TGF- α, β , FGF, IGF, PDEGF, PDAF (table 1.2). Some of them are contained in the alpha-granules of platelets, others are dissolved in plasma. Nowadays there are recombinant analogues of almost all known growth factors and efficiency of each of them on any element of reparative process is proved. Consider this issue more precisely.

At the moment, many researches are conducted to study insulated influence on mechanism of each certain growth factor's influence on healing ligaments wounds.

PDGF (Platelet derived growth factor) induces the action of other growth factors (IGF-1) at the first stage of healing. Moreover, research on animal models has shown that it stimulates the processes of cells proliferation and differentiation, stimulated synthesis of collagen at the stage of remodelling depending on dose.

Application of this growth factor,



Таблиця 1.2

Фактори росту тромбоцитів та плазми крові, що впливають на репаративні процеси в сполучній тканині

ФАКТОРИ РОСТУ	ДЖЕРЕЛО	КЛІТИНИ МІШЕНІ ТА ДІЯ
PDGF (Platelet derived growth factor) – тромбоцитарний фактор росту	Тромбоцити, ендотеліальні клітини, клітини плаценти	Має мітотичну активність. Зумовлює проліферацію та структурну організацію тканин мезенхімального походження (сполучної, м'язевої тканини, неоангіогенез), є необхідним чинником поділу фібробластів[30,41,45,47]
TGF- β (Transforming growth factor beta) Трансформуючий фактор росту- β	Велика кількість типів клітин, у тому числі α -гранули тромбоцитів	Контролює процеси проліферації, диференціації й інші функції в більшості типів клітин, може зумовлювати апоптоз клітин. Є необхідним для активації CTGR (Connective tissue growth factor) фактор росту сполучної тканини. Стимулює синтез колагену 1-го типу [11, 32,33,48]
EGF (Epidermal growth factor) епідермальний фактор росту	Макрофаги та тромбоцити	Стимулює синтез ДНК. Відіграє важливу роль у регуляції клітинного циклу, проліферації і диференціюванні клітин [16]
VEGF (Vascular endothelial growth factor) група факторів росту судинного ендотелію	Тромбоцити та мезенхімальні стромальні клітини	Стимулює міграцію, мітоз та проліферацію ендотелію, зумовлюючи неоангіогенез, фенестрацію новостворених судин та вазодилатацію. Також має хемотаксичні властивості на гранулоцити та макрофаги [7]
FGF (Fibroblast growth factor) Група факторів росту фібробластів	Тромбоцити, макрофаги, мезенхімальні клітини, хондроцити, остеобласти	Проліферація та міграція різних типів клітин мезенхімального походження, у першу чергу, фібробластів, синтез міжклітинного матриксу [9,10]
IGF-1 (Insulin growth factor) інсуліноподібний фактор росту першого типу	Плазма	Анаболічний ефект майже на всі типи клітин. Спричиняє гіпертрофію скелетних м'язів, індукуючи синтез протеїнів та блокуючи їх атрофію[1,13,31]
PDEGF (platelet derived epidermal growth factor) тромбоцитарний епідермальний фактор росту та PDAF (platelet derived angiogenesis factor) тромбоцитарний фактор ангіогенезу	α -гранули тромбоцитів	Впливають на проліферацію та диференціацію, в основному - ендотелію судин, але також стимулюють макрофаги, стромальні та гліальні клітини та деякі види епітелію [43]

Table 1.2
Platelet growth factors and blood plasma, that affect the reparative processes in the connective tissue

GROWTH FACTORS	SOURCE	TARGET CELLS AND ACTION
PDGF (Platelet derived growth factor)	Platelets, endothelial cells, the cells of the placenta	Has mitotic activity. Activates proliferation and structural organization of mesenchyme tissues (connective tissue, angiogenesis), is an essential factor in the division of fibroblasts [30,41,45,47]
TGF- β (Transforming growth factor beta)	A large number of cell types including α -granules of platelets	Controls the processes of proliferation and differentiation, as well as other functions in most types of cells; could provoke cells apoptosis. It is necessary to activate CTGR (Connective tissue growth factor). Stimulates the synthesis of 1 st type collagen. [11,32,33,48]
EGF (Epidermal growth factor)	macrophages and platelets	Stimulates the synthesis of DNA. Plays an important role in regulation of the cell cycle, proliferation and differentiation of cells. [16]
VEGF (Vascular endothelial growth factor)	Platelets and mesenchyme stromal cells	Stimulates the migration, proliferation and mitosis of endothelium, activates neo-angiogenesis, fenestration of the newly formed blood vessels and vasodilatation [7]. Also has hemotoxic influence on granulocytes and macrophages.
FGF (Fibroblast growth factor)	platelets, macrophages, mesenchyme cells, chondrocytes, osteoblasts	Proliferation and migration of various types of cells of mesenchyme origin, first of all of fibroblasts, the synthesis of intercellular matrix [9,10]
IGF-1 (Insulin growth factor)	Plasma	Anabolic effect on almost any cell types. [1,13,31] Causes hypertrophy of skeletal muscles by inducing synthesis of proteins and blocking atrophy thereof [1, 13, 31]
PDEGF (platelet derived epidermal growth factor) and PDAF (platelet derived angiogenesis factor)	α -granules of platelets	Influence on proliferation and differentiation of mainly endothelium of vessels, but also stimulate macrophages, stromal and glial cells and some types of epithelium [43]



жилля в піддослідних тварин. Разом з тим, деякі вчені вказують, що надмірна доза PDGF може пригнічувати процеси проліферації клітин [30,41,45,47].

TGF- β (Transforming growth factor beta) - трансформуючий фактор росту бета відіграє важливу роль у процесі загоєння ушкодженого сухожилля, регулюючи напрямок міграції фібробластів, процес неоваскуляризації та секреції позаклітинного матриксу, проколагену типу I і III. За його присутності відбувається індукція експресії колагену I і III типів, покращуються механічні властивості сухожилля та прискорюється процес його загоєння. Крім того доведено, що одноразове додавання TGF- β достатнє для індукції міграції мезенхімальних стовбурових клітин у зону ушкодження. Дія TGF- β виражається на початку процесу репарації сухожилля у фазі запалення (на 4-7 дні), після чого на 2-4 тижні, при початку навантаження, веде до зниження експресії TGF. На заключних етапах регенерації сухожилля TGF- β може також сприяти апоптозу фіброцитів, що спостерігалось в досліджах на щурах, коли при ушкодженні ротаторної манжети на 8 тижні спостерігалось підвищення експресії цього фактору. З цим може бути пов'язана активізація процесів запалення в цей період після ушкодження. Ізольоване одноразове застосування TGF- β підвищує механічну міцність Ахіллового сухожилля щурів після його травматичного ушкодження, у той час, як додавання антитіл до TGF- β достовірно знижує синтез колагену в зоні ушкодження до 30%. Дослідження показали, що застосування TGF- β характеризується дозозалежним ефектом відносно до синтезу колагену, але надмірна доза його призводить до порушення співвідношення колагену першого та третього типу в бік збільшення кількості останнього, що веде до формування

especially in combination with IGF-1 and bFGF on the later stages of repair leads to the formation of functionally more full-fledged tendon in experimental animals. However, some scientists point out that excessive dose of PDGF can inhibit cell proliferation processes. [30,41,45,47]

TGF- β (Transforming growth factor beta) plays an important role in the process of damaged tendons healing by regulating the direction of migration of fibroblasts, new vascularization processes and secretion of extracellular matrix, procollagen type I and III. In presence thereof induction of expression of collagen I and III occurs and the mechanical properties of the tendons and speed of the healing process is improved. It is also proved that single addition of TGF- β induces migration of stem cells into the area of damage. Effect of TGF- β is expressed at the beginning of the tendon repair process in phase of inflammation (4-7 days), and later on 2nd-4th weeks, at the beginning loading; and leads to decrease in TGF expression. At final stages of tendon regeneration, TGF- β may also promote apoptosis of fibrocytes, observed in experiments of rats, when in the damaged rotator cuffs improvement of this factor was observed at 8th week. This could be connected with intensification of inflammation processes in this period after injury. Isolated single use of TGF- β increases the mechanical strength of rats' Achilles tendon after traumatic injury thereof, while adding the antibodies to TGF- β reliably reduces the synthesis of collagen in the zone of damage in up to 30%. Studies have shown that effect of TGF- β application depends on dose thereof, although outstanding dose thereof leads to disorders in inter-

функціонально неповноцінного сухожилля [11,32,33,48]. VEGF (Vascular endothelial growth factor) - група факторів росту судинного ендотелію необхідна для неоваскуляризації на початковій стадії загоєння сухожилля. У нормі на пізніх стадіях загоєння судини зникає, в інакшому випадку погіршуються механічні властивості сухожилля внаслідок руйнування колагену. Дослідженн Y. Hou та колеґ показали, що дія VEGF характеризується дозозалежним ефектом, при цьому збільшується неоваскуляризація зони уш-кодження з 1 до 8 тижнів після розриву. Локальне введення в зону ушкодження VEGF покращує механічні властивості сухожилля на перший тиждень після розриву, проте на другий (різниця порівняно з контрольною групою) майже зникає, а надлишок фактору (особливо на пізніх стадіях репаративно-відновного процесу) веде до формування функціонально неповноцінного сухожилля та посилення дегенеративно-дистрофічних процесів через руйнування колагенових волокон, що пов'язане із збільшенням вмісту металопротеза в зоні ремодельовання. У зв'язку з цим, VEGF жорстко контролюється протягом усього процесу загоєння сухожилля під дією TGF- β . T. Pufe та W. Petersen у своїх дослідженнях довели, що на тлі пригнічення VEGF едостатином у фазі ремодельовання, можна досягнути кращих показників механічної міцності сухожилля [7].

FGF (Fibroblast growth factor) - фактори росту фібробластів. K. M. Chan та C. Fu довели, що FGF стимулює проліферацію фібробластів та синтез міжклітинного матриксу, особливо колагену III типу, що важливо саме на ранніх етапах загоєння. У перший тиждень після ушкодження FGF

relation between the 1st and the 3rd type to decrease of the 3rd type and leads to formation of functionally disabled tendon [11, 32, 33, 48] excessive dose it leads to disruption ratio of VEGF (Vascular endothelial growth factor) is necessary for the angiogenesis at the initial stages of healing tendon. Normally on the later stages of blood vessels healing, mechanical properties of tendon worsen or even most valuable characteristics thereof disappear due to destruction of collagen. Studies by Y. Hou et al. showed that influence of VEGF is characterized by a dose-dependent effect, thus increasing the damaged zone angiogenesis during from 1 to 8 weeks after the rupture. Local input of VEGF into the zone of damage improves the mechanical properties of the tendon on the first week after the rupture, but at the second week the difference (compared to the control group) almost disappears and the excessive factor (especially on the later stages of the reparative process) leads to the formation of functionally disabled tendon and strengthening of degenerative-dystrophic processes due to collagen fibres destruction associated with the increase of metal device in the area of remodelling. In this regard, VEGF should be strictly controlled throughout the complete process of healing the tendon under the influence of TGF- β . T. Pufe and W. Petersen in their research have proved that upon oppression of VEGF by endostatine in remodelling phase, one can achieve the best indexes of mechanical strength of the tendon. [7]

FGF (Fibroblast growth factor).

K. M. Chan and C. Fu have proved that FGF stimulates proliferation of fibroblasts and synthesis of intercellular matrix, especially of



стимулює утворення металопротеза, що опосередковано веде до формування додаткового простору для нових тенобластів та теноцитів. Саме з цим пов'язане збільшення кількості клітинних елементів у зоні ушкодження на початкових фазах загоєння. Ці клітини утворюють міжклітинний матрикс. Пізніше у фазі ремоделювання активність фактора спадає, а під впливом TGF- β , який зумовлює апоптоз клітин, співвідношення клітин та матриксу починає нормалізуватися. Дія FGF, як і інших факторів росту, характеризується дозозалежним ефектом, а його передозування веде до порушення співвідношення колагену I та III типів і клітинних елементів у бік зменшення колагену I типу та формування функціонально неповноцінного сухожилля. Kobayashi D при дослідженні ізольованої дії FGF на ушкоджену передню хрестоподібну зв'язку відмітив негативний ефект фактора в разі продовження дії цього фактора після 3-го тижня після ушкодження [9,10].

IGF-1 (Insulin growth factor) або інсуліноподібний фактор росту першого типу впливає на репаративно-відновні процеси, як безпосередньо стимулюючи міграцію та проліферацію фібробластів на ранніх стадіях відновлення, так і регулюючи дію інших факторів росту. R. James відзначив, що IGF-1 може бути присутній у вигляді неактивного білка-попередника в нормальних сухожиллях, але після травми, під впливом ферментів відбувається його активація. Пізніше, у фазі ремоделювання, IGF-1 дозозалежно стимулює синтез колагену й інших компонентів позаклітинного матриксу. Kurtz CA вивчаючи ізольовану дію рекомбінантного IGF-1 при травматичному ушкодженні Ахіллового сухожилля щурів показав, що через 24 години

collagen type III that is important on the early stages of healing. During the first week after injury, FGF is stimulated by metal prosthesis, and this leads indirectly to creating additional space for new tenoblasts and tenocytes. Increase of cellular elements in the area of damage during the initial phases of healing is connected with this fact. These cells form its exterior matrix. Later, during remodelling stage activity of this factor decreases and under the influence of TGF- β , which defines apoptosis of the cells, the ratio of cells and matrix begins to normalize. Effect of FGF as well as of other growth factors is dose-dependent, and overdose leads to violation of parity between collagen of I and III types and cellular elements, mainly to decrease of I type collagen, thus forming functionally disabled tendon. Kobayashi D., studying insulated influence of the FGF on the damaged anterior cruciate ligament noted the negative effect of this factor in case of its continued influence after the 3rd week after damage. [9,10]

IGF-1 (Insulin growth factor) or insulin-like growth factor of the first type of effect on the reparative-regenerative processes, directly stimulating the migration and proliferation of fibroblasts on the early stages of recovery and regulating the action of other growth factors. R. James noted that IGF-1 can be presented in form of an inactive predecessor of protein in normal tendons, but after an injury, under the influence of enzymes it is activated. Later in remodelling phase dose-dependent IGF-1 stimulates the synthesis of collagen and other components of the extracellular matrix. Kurtz CA, studying activity of IGF-1 in traumatic damage of the Achilles tendon of rats showed



після введення фактору в зону шва функціональний індекс Ахіллового сухожилля основної групи був вищим, ніж у контрольній, і ця перевага зберігалася протягом усього періоду дослідження на протязі 15 днів. Letson AK також проводив дослідження на щурах із ушкодження медіально-колатеральної зв'язки та застосовував введення в зону розриву (без відновлення зв'язки) суміші IGF-1 та FGF. Після виведення тварин з експерименту на 12 день в основній групі міцність медіальної колатеральної зв'язки була вищою на 58%, ніж у дослідних щурів, що не отримували відповідних факторів росту [1,13,31].

Таким чином, фактори росту можна умовно поділити на ті, що мають переважно стимулюючий ефект на процеси міграції, проліферації та диференціації клітин та синтезу міжклітинного матриксу (VEGF, TGF- β , FGF) та ті, що володіють переважно регулюючою дією на інші фактори росту (IGF-1 та PDGF). Дія перших яскраво проявляється посиленням та пришвидшенням процесів регенерації при дослідженнях, проведених *in vivo* та *in vitro*. При цьому, при дослідженнях *in vitro* в разі передозування або застосування на пізніх стадіях, відмічається порушення балансу процесів проліферації та синтезу міжклітинного матриксу, що призводить до формування функціонально неповноцінного сухожилля. Дія факторів росту другої групи менш виражена, особливо *in vivo*. Вони несуттєво пришвидшують активність проліферативно-відновних процесів, але експерименти *in vitro* доводять їх здатність оптимізувати та нормалізувати процеси репарації, шляхом пригнічення проліферації клітин на стадії ремоделювання та нормалізуючи співвідношення колагену I та III типів [1, 11,13,31,41].

that 24 hours after the introduction of the suture zone, functional index of Achilles tendon in the first group was higher compared to control one, and this advantage remained throughout the complete period of study, during 15 days. Letson A. K. also conducted studies on rats with damaged medial collateral ligament and applied into the area of the rupture (without restoring ties) the mixture of IGF-1 and FGF. After the animal removal from experiment, on the 12th day in the main group strength of medial collateral ligament was 58% higher compared to experimental rats that did not receive appropriate growth factors. [1,13,31]

Thus growth factors can be divided into those that have mostly stimulating effect on migration processes, proliferation and differentiation of cells and the synthesis of intercellular matrix (VEGF, TGF- β , FGF) and those that have a predominantly regulative effect on other growth factors (IGF-1 and PDGF). Activity of the first ones is vividly reflected by increased and fastened regeneration processes in studies conducted *in vivo* and *in vitro*. At that in case of *in vitro* studies in case of overdose at the latest stages one could observe disorders in proliferation and intercellular matrix synthesis, which leads to the formation of functionally disabled tendon. Influence of growth factors from the second group is less evident, particularly *in vivo*. They inessentially fasten the activity of proliferative-reducing processes, but experiments *in vitro* prove their ability to optimize and normalize the processes of healing by inhibition of proliferation of cells at the stage of remodeling and normalize the ratio of collagen of I and III types. [1, 11,13,31,41]



Отже, оптимальним і обґрунтованим можна вважати застосування комбінації факторів росту в певному співвідношенні - так званий «суповий набір», а найкращим вважається застосування аутологічних факторів росту, джерелом яких в організмі є аутологічні тромбоцити та плазма крові пацієнта. При центрифугуванні крові відбувається розділення крові на фракції та осідання тромбоцитів у плазмі. Таким чином, у плазмі зростає концентрація тромбоцитів, що відповідно збільшує концентрацію факторів росту, які містяться в α -гранулах тромбоцитів. При цьому не порушується баланс і співвідношення факторів росту, а дозування може регулюватися використанням різної концентрації тромбоцитів [14]. Таким чином, збагачена тромбоцитами плазма (ЗТП) містить збільшену концентрацію тромбоцитів порівняно з концентрацією їх у крові [14].

Клінічне використання ЗТП починається з другої половини 90-х років ХХ століття, коли в стоматології, хірургії та офтальмології широко розпочалися дослідження впливу ЗТП на загоєння «проблемно» заживаючих ран та виразок. Ці дослідження показали, що гель, приготовлений при згортанні плазми, в якій концентрація тромбоцитів вище 1 млн. на 1 мл плазми, достовірно дозволяє покращити загоєння ран та виразок у післяопераційному періоді [14].

Використання ЗТП в травматології та ортопедії розпочалося з досліджень Е. Anitua, який вперше застосував її в групі пацієнтів із хронічним епіконділітом, що тривало і безрезультатно лікувалися традиційними методами консервативного лікування. Автор вперше показав ефективність даного методу при дегенеративно-дистрофічних ушкодженнях сухожилків

So, a combination of growth factors in a certain ratio-the so-called "soup set" could be considered the best and most effective, and the best is use of autologous growth factors, the source thereof in the body are authologous platelets and blood plasma of the patient. Thus, concentration of platelets increases in blood plasma, and consequently increases growth factors concentration contained in α -granules of platelets. At that the balance and ratio of growth factors is not violated, and the dosage can be adjusted using different concentrations of platelets. [14] Thus, platelet-rich plasma (PRP) contains a larger concentration of platelets compared to their concentration in the blood. [14]

Clinical use of PRP starts from the second half of the 90-th of the XX century, when experts in dentistry, surgery and ophthalmology began to study widely the influence of PRP on healing "problem" wounds and ulcers. These studies have shown that the gelm, prepared with the closing of the plasma, in which the platelet concentration is above 1 million per 1 ml of plasma, allows to improve healing of wounds and ulcers in the postoperative period. [14]

Use PRP in orthopedics and traumatology began with the research E. Anitua, who was the first to apply it in the group of patients with chronic epicondylitis, whose treatment by traditional methods of conservative treatment was continuous and ineffective. The author for the first to show the efficiency of this method in degenerative-dystrophic ligaments damages [3]. According to Peter A.M. Everts, over 1000 articles have been published as of the year 2013, and the number of notification about positive

[3]. Згідно даних Peter A.M. Everts на 2013 рік опубліковано понад 1000 статей та повідомлень на цю тему, але кількість повідомлень, що вказують на позитивний ефект від застосування ЗТП наближається до кількості повідомлень, що свідчать про отриманні негативні результати. Це може бути пов'язано не лише з порушенням технологій виготовлення ЗТП, але і з різним складом ЗТП, що застосовувався в різних клінічних дослідженнях [34].

E. Anitua на форумі AAOS, присвяченому питанню застосування ЗТП в травматології та ортопедії відзначив, що «не всі ЗТП однаково корисні» і те, що є оптимальним для однієї патології може бути навіть шкідливим в іншому випадку [3].

Спочатку для отримання ЗТП використовувалися методики однофазного центрифугування та механічного забору необхідного шару плазми після її розділення на шари. Такі методи дозволяли отримати невисоку – максимум в 3,5 рази вищу концентрацію порівняно з вихідною. Використання антикоагулянтів, що змінюють буферність крові та, таким чином, попереджують активацію тромбоцитів та утворення згортків, дозволило перейти до двохфазного і більш тривалого центрифугування та більш ефективно концентрувати тромбоцити, а використання спеціалізованих комплектів дозволило досягнути концентрації тромбоцитів, що більше, ніж у 8 разів, переважає базову. Сучасні ж комп'ютеризовані системи з варіабельністю програм дозволяють отримати змінну концентрацію тромбоцитів та варіювати вміст лейкоцитарної фракції в ЗТП [14, 8].

Дія ЗТП напряму залежить від її складу та способу введення. Зміна концентрації тромбоцитів, наявність чи відсутність фракції лейкоцитів, наявність чи

results is approaching the number of notification about negative ones. It could be connected not only with the cases of violating technologies of PRP production, but also with different composition of the PRP applied in different clinical studies. [34].

E. Anitua on AAOS Forum, devoted to PRP application in traumatology and orthopaedics noted that "not all PRP are equally useful" and what optimal for one pathology may even be harmful otherwise. [3]

Originally to obtain single-phase PRP centrifuge techniques and mechanical sampling of necessary layer of plasma after the separation of the layers were applied. These methods allowed receiving quite low concentration - maximum in 3.5 higher compared to the original one. Use of anticoagulants, changing PH of blood and thus preventing the activation of platelets and formation of thrombs allowed to go to the two phases and longer centrifuging and more effectively concentration of platelets; and use of specialized kits allowed achieving concentration of platelets, which is in more than 8 times higher than the original one. Modern computerized system with variability of programs allows getting variable concentration of platelets, and varies the contents of the leucocytes fraction in the PRP. [14, 8].

Activity of PRP depends on its composition and method of inputting. Changing the concentration of platelets, the presence or absence of a fraction of leukocytes, the presence or absence of an activator essentially reverses the effect of PRP application. Nowadays over 50 different methods of PRP production are developed and applied, different in PRP content, and this in turn allows comparing the results of treatment of the



відсутність активатора суттєво змінює ефект від застосування ЗТП.

На цей час розроблено та застосовується більше 50 різних методик отримання ЗТП, які характеризуються значним різноманіттям складу ЗТП, що, у свою чергу, не дає змогу порівняти результати лікування хворих і однією патологією при використанні різних за складом ЗТП, оскільки це все рівно, що порівнювати і яблука, і апельсини, і банани [3].

Перша спроба класифікації протоколів отримання ЗТП була зроблена David M. Dohan Ehrenfest у 2009 році. Згідно його класифікації було виділена чиста (без лейкоцитів) ЗТП (P-PRP) та лейкоцитарна ЗТП (L-PRP), а також збагачений тромбоцитами фібрин, який, в свою чергу, поділявся на чистий та лейкоцитарний pure platelet-rich fibrin (P-PRF) та leucocyte and platelet-rich fibrin (L-PRF). Ця класифікація дозволяє класифікувати, перш за все, особливості технології та протоколів отримання, але не кількісний та якісний склад ЗТП (таб. 1.3) [15].

Починаючи з 2011 значну увагу фахівців привернули роботи, що стосувалися питань класифікації ЗТП. Найпростіша з них запропонована A.Mishra в 2011 році. Вона включає в себе показники концентрації тромбоцитів, фракції лейкоцитів та застосування активаторів – (таб. 1.4) [36]. Розширена класифікація ЗТП була запропонована Jeffrey M. DeLong в 2012 році (рис. 1). Остання включає ступінь концентрації тромбоцитів, диференціює наявність нейтрофілів у фракції лейкоцитів. Це пов'язано з тим, що протеолітичні ферменти нейтрофілів можуть мати ушкоджуючу дію на клітини та міжклітинний матрикс у зоні ушкодження, що може погіршувати ефективність терапевтичного застосування ЗТП [14].

patients with similar pathology by application of different combinations of PRP, because it will be the same as comparison of apples, oranges and bananas. [3].

The first attempt to classify protocols of PRP production was made by David M. Dohan Ehrenfest in 2009. This classification distinguished pure (without blood) PRP and leucocytes-and-PRP, as well as platelets rich fibrin, also subdivided into pure and platelet-and-leucocytes rich fibrin. This classification allows classifying, first of all, peculiarities of technologies and protocols of production thereof, but not qualitative and quantitative characteristics. (table 1.3) [15] Table 1.3

Beginning from the year 2011, considerable attention has been attracted to the researches devoted to the matters of PRP classification. The simplest of them was offered by A.Mishra in 2011. It includes indicators of platelets concentration, the fraction of white blood cells and application of activators (table 1.4). [36]

Extended classification of PRP was proposed by Jeffrey M. DeLong in 2012. The last mentioned include the extent of concentration of platelets, differentiates the presence of neutrophils in white blood cells' fraction. It is due to the fact that proteolysis ferments of neutrophils could damage cells and intercell matrix that could impair the effectiveness of the therapeutic application of PRP. [14]

According to the provided classification, concentration of platelets may be low, moderate, high and very high:

Low concentration of platelets (P1): less than 1 x of the basic level of platelets cannot provide sufficient cell response.

Таблиця 1.3

Класифікація протоколів отримання ЗТП за Dohan Ehrenfest D. M. 2009 [0]

Ключовий параметр	Субпараметр	Визначення
А Витратні комплекти та центрифуги	А1 Вага та розмір центрифуги необхідний для методики	Важка та громіздка
		Легка компактна
		Важка , але можливе використання альтернативних легших систем
	А2 Тривалість процедури (від забору крові до введення)	Швидка (менше 20 хв)
		Тривала (20-60 хв)
		Дуже тривала (більше 1 години)
	А3 Вартість (загальна вартість приладу та одноразових комплектів)	Наддешева (менше 5 євро)
		Дешева (5-50 євро)
		Вартісна (вартість одноразового комплекту дорожче 50 євро)
	А4 Ергономічність виконання процедури	Дуже проста (++)
		Проста (+)
		Складна (*)
		Надскладна (*)
	В тромбоцити та лейкоцити	В1 кінцевий об'єм крові у відношенні до забраного матеріалу
Малий – менше 25%		
Може змінюватися		
В2 ефективність концентрації тромбоцитів		Відмінна – вище 80%
		Добра 40-80%
		Низька – менше 40%
В3 ефективність концентрації лейкоцитів		Варіабельна – інколи невідома
		Без лейкоцитів – якщо метод дозволяє виключити лейкоцити з кінцевого продукту
В4 Збереження тромбоцитів і лейкоцитів	Неушкоджені	
	Ушкоджені	
	Невідомо	
	Активовані – у разі, якщо коагуляція настає під час центрифугування	
С Фібрин	С1 Концентрація фібриногену і щільність фібрину	Висока щільність
		Низька щільність
	С2 Тип полімеризації фібрину	Сильний, в основному з тримолекулярними або рівносторонніми переходами
		Слабкий, в основному з тетрамолекулярними або двосторонніми переходами



Table 1.3

Classification protocols of PRP production by Dohan Ehrenfest D. M. 2009 [15]

The key parameter	Sub-parameters	The definition of	
A. Consumable kits and centrifuges	A1 the weight and size of the centrifuges required for the method	Heavy and cumbersome	
		Lightweight compact	
		Heavy, but it is possible to use alternative lighter container systems	
	A2 duration of procedure (from blood sampling to insertion)	Fast (less than 20 min.)	
		Long-term (20-60 min.)	
		Very long (over 1 hour)	
	A3 cost (the total cost of the device and disposable kits)	Very cheap (less than 5 euro)	
		Cheap (5-50 EUR)	
		Cost (the cost of a single set of expensive 50 euros)	
	A4 Ergonomics of procedure	Very simple (+ +)	
		Simple (+)	
		Complex(*)	
		Very complex(*)	
B platelets and white blood cells	B1 final volume of blood in relation to the enclosed material	Big – more than 25% of the amount of blood	
		Small – less than 25%	
		May vary	
	B2 efficiency of platelets concentration	Excellent – above 80%	
		A good 40-80%	
		B3 efficiency of leukocyte concentration	Low – less than 40%
			sometimes unknown
	B4 preservation of platelets and leukocytes	No white blood cells – if the method allows to exclude the assessment "of the final product	
		Undamaged	
		Damaged	
Unknown			
C Fibrin	C1 the concentration of fibrinogen and fibrin density	Enabled – if coagulation occurs during centrifuging	
		High density	
	C2 type of fibrin polymerization	Low density	
		Strong	
		Weak, mostly from bilateral transitions	

Таблиця 1.4

Класифікація ЗТП за А. Mishra 2011 [36]

	Кількість лейкоцитів	Застосування активаторів
Тип 1	Підвищена порівняно з кров'ю	Ні
Тип 2	Підвищена порівняно з кров'ю	Так
Тип 3	Мінімальна або відсутня	Ні
Тип 4	Мінімальна або відсутня	Так
А: концентрація тромбоцитів у 5 разів вища порівняно з кров'ю		
В: концентрація тромбоцитів вища, менш ніж у 5 разів порівняно з кров'ю		

Table 1.4

PRP classification by A. Mishra 2011 [36]

	The number of white blood cells	Application of activators
Type 1	Increased compared with the blood	No
Type 2	Increased compared with the blood	Yes
Type 3	Minimal or no	No
Type 4	Minimal or no	Yes
And: the concentration of platelets in 5 times higher compared with blood		
In: the concentration of platelets is higher for less than 5 times in comparison with the blood		

Згідно наведеної класифікації, концентрація тромбоцитів може бути низькою, помірною, високою і надзвичайно високою (суперконцентрація): *Низька концентрація тромбоцитів (P1)*: менше 1-х базового рівня тромбоцитів не може забезпечити достатню клітинну відповідь. Часто цей тип використовується в якості контролю бідної тромбоцитами плазми і показав незначну ефективність [14].

Помірна концентрація тромбоцитів (P2): (більш 1-х, але менш ніж 4-х), (більше базового до 750000 тромбоцитів). Більшість методик центрифугування дозволяють отримати концентрацію тромбоцитів, що дорівнює або менше, ніж 750 000 тромбоцитів. Найбільша кількість клінічних досліджень проведена саме з таким рівнем тромбоцитів. М. Sanches та колеги в 2007 році вводили екзогенноактивованний PRP з 3-кратною концентрації тромбоцитів у зону шва Ахіллового сухожилля людини. Вони виявили значне поліпшення

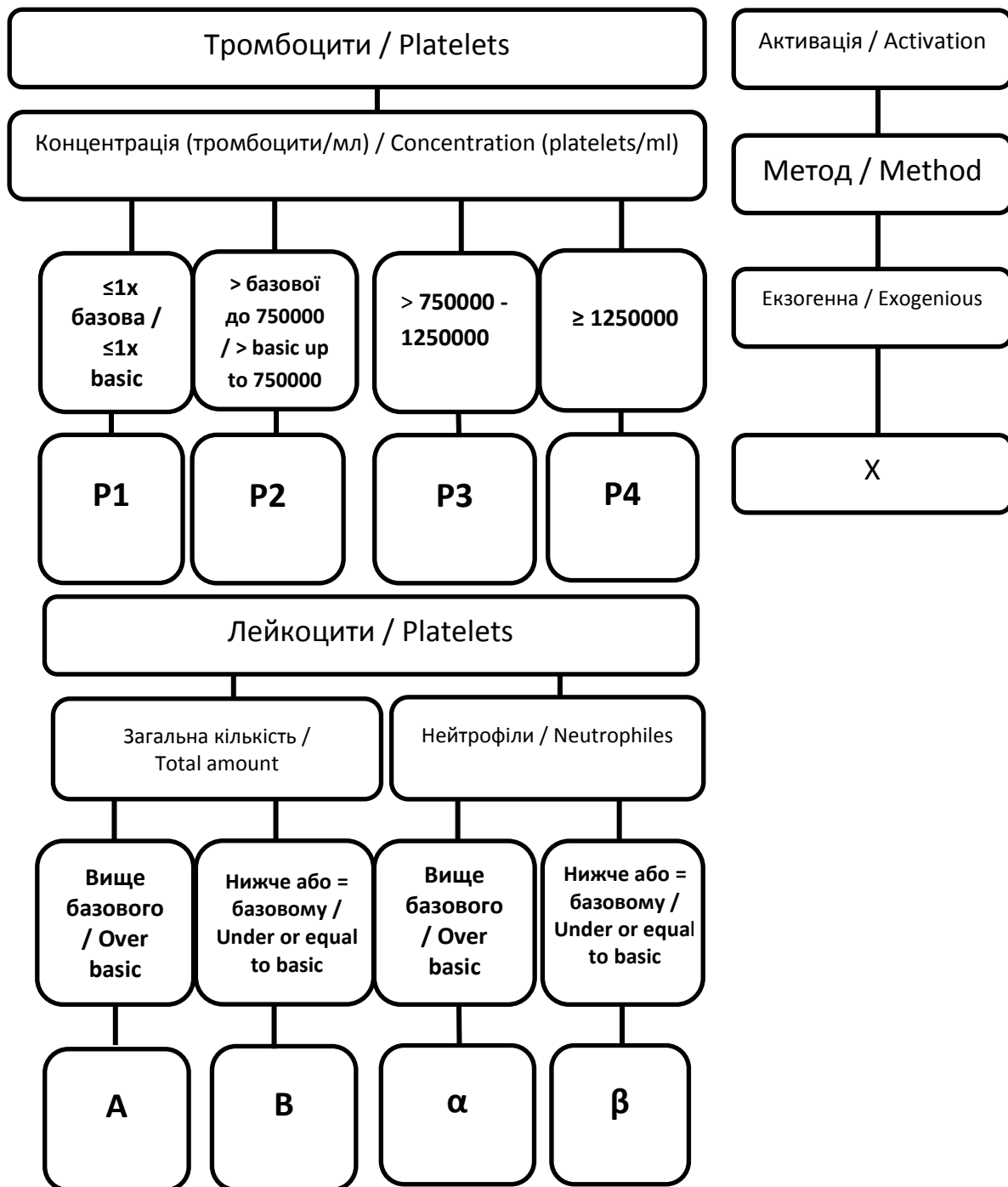
This type is very often used as a control of plasma poor in platelets and demonstrates low efficiency [14].

Moderate concentration of platelets (P2) (over 1x, but less than 4x), (exceeding the basic base to 750,000 platelets). Most centrifuging methods allow reaching concentration of platelets equal to less than 750 000 units. The majority of cell studies have been conducted using this level of platelets. Sanches et al. in 2007 applied PRP 3-multiple platelet concentration in human Achilles tendon suture zone. They observed significant improvement and earlier return to sport activities compared to the control group patients. Another study showed that similar composition of PRP improves the processes of ligamentisation of tendon graft during anterior cruciate ligament plastics, and histologic research through 6 and 24 months showed improvement in connective tissue



Рис 1.
ЗТП "PAW" класифікаційна система
Jeffrey M. DeLong в 2012 [14]

Рис.1
PRP "PAW" classification by Jeffrey M. DeLong in 2012



і раніше повернення до спортивних навантажень, у порівнянні з пацієнтами контрольної групи. Інше дослідження показало, аналогічна за складом ЗТП покращує процеси лігаментизації трансплантата сухожилля під час пластики передньої хрестоподібної зв'язки, а гістологічні дослідження через 6 та 24 місяці показали покращення ремоделювання сполучної тканини в порівнянні з необробленими трансплантатами Sanchez M, Anitua E, 2010 [14]. Graziani F. та його група в 2007 році досліджуючи вплив ЗТП різної концентрації (в 2,5, 3,5 та 4,5 рази вище порівняно з базовою) довели, що концентрація 550 000 тромбоцитів/мл найефективніше впливає на проліферацію фібробластів та остеобластів [23]. Але отримані результати *in vivo* досліджень не дозволяють оцінити вплив усього комплексу факторів росту, так як виключають вплив ангіогенезу та повноцінність синтезу міжклітинного матриксу, тому повноцінно не можуть переноситися на клінічні дослідження.

Висока концентрація тромбоцитів (P3): (від 4-х до 6-х), (> 750 000 до 1800000 тромбоцитів / мл). Кількість проведених з таким ЗТП досліджень, значно менша, оскільки для отримання відповідної концентрації, як правило, потрібне спеціалізоване обладнання. Weibrich G (2004) досліджуючи вплив різної концентрації ЗТП на загоєння дефекту кісток у кролів довів, що оптимальною для перебудови трансплантата є концентрація в 5-6 разів ніж базова, у той час як низька концентрація майже не впливала на процеси ремоделювання, а надто висока (понад 9 разів вище вихідного рівня) може здійснювати парадоксальний, тобто інгібуючий вплив [51]. Giusti I (2009) порівнюючи дію різних концентрацій ЗТП на ендотеліальні клітини довів, що більш висока концентрація тромбоцитів (максимальною була 1500000/мл) зумовлює кращу проліферацію ендотеліальних клітин *in vivo* [24].

У досліджах Per Aspenberg (2012) на 296 щурах, із механічним ушкодженням

remodeling compared to raw transplants Sanchez M, Anitua E, 2010. [14]

Graziani Fand and his group in 2007, exploring the influence of different concentrations of PRP (2.5, 3.5, and 4.5 times higher compared to basic) proved that the concentration of 550 000 platelets/ml affects the most efficiently on proliferation of fibroblasts and osteoblasts. [23] But the results obtained *in vivo* do not allow us to assess the influence of the entire set of growth factors as well as to eliminate the effect of angiogenesis and the adequacy of the synthesis of intercellular matrix, so completely may not be carried on clinical research.

The high concentration of platelets (P3): (from 4x to 6x), (> 750 000 to 1,800,000 platelets/ml) number of the following PRP research, much less, as more appropriate concentration usually requires specialized equipment. Weibrich G (2004) exploring the effects of different concentrations of PRP on the healing of bone defect in rabbits proved that the optimal adjustment for graft is the concentration in 5-6 times than the base, while the low concentration of almost no influence on the processes of remodeling, and too high (more than 9 times the original level) can make a paradoxical meaning. [51] Giusti I.(2009), comparing the effect of different concentrations of PRP on endothelial cells has proved that the high concentration of platelets (the maximum was 1,500,000/ml) makes a better proliferation of endothelial cells *in vivo*. [24]

In experiments Per Aspenberg (2012) 296 rats with mechanical injury to Achilles tendon using PRP with concentration 1,500,000/ml, activated with the help of autotrombine as a control was used



Ахіллового сухожилля, застосували ЗТП з концентрацією 1500000/мл, активованого при допомозі аутотромбіну. У якості контролю використовувалася дослідна група, що лікувалася бідною на тромбоцити плазму. 3 мм дефект заповнювався збагаченим тромбоцитами гелем в основній групі та бідним тромбоцитами гелем у контрольній. Встановлено, що з 14-ого і до 28 дня механічна міцність на розрив в основній групі переважала - максимальна перевага на 31% відмічалася на 21 день. Жорсткість сухожилля основної групи також переважала відповідні параметри контрольної групи і досягала максимуму вже на 11 день. А енергія поглинання досягала максимуму на 21 день дослідження і навіть переважала відповідний параметр не оперованих щурів. Таким чином, застосування ЗТП з високою концентрацією тромбоцитів призводить до прискорення репаративних процесів при заповненні дефекту Ахіллового сухожилля щурів, але не дозволяє в повній мірі оцінити залежність цих процесів від концентрації тромбоцитів та наявності фракції лейкоцитів у ЗТП через відсутність гістологічних та біохімічних досліджень [4].

Супер концентрат тромбоцитів (P4): (вище ніж у 6-х порівняно з вихідним), (вище ніж 1800000/мл). Кількість досліджень з такою концентрацією вкрай низька через обмежену можливість для фахівців до останнього часу отримувати надвисоку концентрацію тромбоцитів. Дослідження, проведені при заповненні дефектів кісток у кролів, свідчать, що надвисока концентрація тромбоцитів може індукувати апоптоз клітин та здійснювати парадоксальний інгібуючий ефект на перебіг репаративних процесів у тканинах [51].

Chris Hyunchul J в 2012 році опублікував дослідження впливу різної концен-

research group that was treated poor in platelets plasma. 3 mm defect filled platelet-rich gel in the main group and platelet-rich gel in the control installed with 14th and 28th day mechanical strength at the gap in the main group prevailed-maximum advantage of 31% was on the 21st day. The tightening of the tendon of the test group also prevailed indications of the control group and reached a maximum on 11th day. Energy acquisitions reached a maximum on 21st day and even exceeded this indication of not operated rats. Thus the application of PRP with the high concentration of platelets leads to an acceleration of the reparatory process when filling defect of Achilles tendon of rats, but not allow you to fully appreciate the dependence of these processes of concentration and platelet fraction of leukocytes in PRP due to lack of histological and biochemical research. [4]

Chris Hyunchul J in 2012 published a study of the influence of different concentrations of PRP on the proliferation tenocytes tendon rotator cuff person. Tenocytes rotator human cuffs were cultured for 15 days under the influence of PRP varying concentrations of 100, 200, 400, 800, 1000, 2000, 4000, 8000, and 16,000 x 10³, and two control groups with poor platelet plasma or group where the tenocytes were cultured in fetal serum. Researches have shown that proliferative activity tenocytes increases with increasing concentration of platelets, reaching a maximum at a concentration of platelets to 4,000,000/ml. With further growth of the concentration, proliferative activity remained at this level, without effect of inhibition. In this case study in vivo also does not allow you to

трації ЗТП на проліферацію теноритів сухожилля ротаторної манжети плеча людини. Теноцити ротаторної манжети людини культивувалися протягом 15 діб під впливом ЗТП різної концентрації 100, 200, 400, 800, 1000, 2000, 4000, 8000, та $16,000 \times 10^3$, та дві контрольні групи - з бідною тромбоцитами плазмою та група, де теноцити культивувалися в фетальній бичачій сироватці. Результати досліджень показали, що проліферативна активність теноцитів зростає із підвищенням концентрації тромбоцитів, досягаючи максимуму при концентрації тромбоцитів 4000000/мл. При подальшому зростанні концентрації проліферативна активність залишається на цьому рівні, тобто інгібуючого ефекту не відмічалось. При цьому дослідження *in vivo* також не дозволяє в повній мірі оцінити весь комплекс впливів факторів росту, що міститься в ЗТП, та не показує вплив фракції лейкоцитів на репаративні процеси в сухожиллях [27].

Таким чином, на даний час остаточна відповідь щодо використання оптимальної концентрації тромбоцитів у ЗТП для найкращого відновлення ушкоджених сухожилків відсутня. *Лейкоцитарна фракція*: питання про включення або виключення фракції лейкоцитів із ЗТП широко дискутує. Dohan Ehrenfest DM (2009) доводить, що лейкоцитарна фракція, і особливо, нейтрофіли, виділяючи протеолітичні ферменти, можуть призводити до більш значного ушкодження тканин, у той час, як інші вказують на нульовий або навіть позитивний ефект, пов'язаний з антимікробною дією лейкоцитів при загоєнні післяопераційної рани. Досліджень щодо впливу фракції лейкоцитів на тканину сухожилля не проводилося [15]. *Питання активації тромбоцитів є надзвичайно важливим*. Отримання ЗТП середньої та низької концентрації не вимагає тривалого центрифую-

fully evaluate all the complex effects of growth factors contained in PRP and does not show the influence of fraction of leukocytes on the reparative processes in tendons. [27]

So now the final answers on the use of the optimal concentration of platelets in PRP to restore the damaged ligaments injuries.

Leukocyte fraction: The issue of inclusion or exclusion of the fraction of leukocytes with the PRP widely discussing. Dohan Ehrenfest D. M. (2009) shows that the leukocyte fraction, and especially neutrophils, exuding a proteolytic enzymes, can lead to more significant tissue damage, while others point to zero or even positive effects associated with antimicrobial action of white blood cells during healing of Postoperative wound. No studies of the influence of leukocytes fraction on the tendon's tissue have been conducted. [15]

Platelet Activation Issues is extremely important. Getting middle and low concentration of the PRP does not require longer centrifuging, i.e. activation of the platelets and the release of growth factors happens later. As to obtain a high concentration of platelets need to prevent premature activation of the platelets with long-term centrifuge for this used Heparin anticoagulants are ineffective, it only blocks the formation of clot, but does not block the activation of platelets, and release of growth factors. Therefore, to prevent the activation of platelets used sodium citrate and sodium citrate dextrose. Increasing the PH of blood they prevent premature activation of platelets, but this kind of plasma in the future requires reactivation and recovery of PH ions



гування, то активація тромбоцитів та вивільнення факторів росту відбувається пізніше. Оскільки для отримання високої концентрації тромбоцитів потрібно попередити передчасну активацію тромбоцитів при тривалому центрифугуванні для цього застосовують антикоагулянти. Гепарин є неефективним, оскільки він лише блокує формування згортка, але не блокує активацію тромбоцитів та вивільнення факторів росту. Тому з метою попередження активації тромбоцитів застосовується цитрат натрію та цитрат декстрози. Підвищуючи буферність крові, вони попереджують передчасну активацію тромбоцитів, але така плазма в подальшому потребує реактивації та відновлення буферності іонами кальцію.

При ін'єкційному застосуванні ЗТП для активації тромбоцитів та вивільнення альфа-гранул достатньо міжклітинного кальцію. У разі ж застосування відкритих методик введення -необхідне утворення згортка. Для цього застосовують інші активатори – тромбін, кальцію хлорид, колаген [14].

Тромбін викликає швидку агрегацію тромбоцитів. Швидка активація може призвести до надмірної конденсації матриці фібрину і значне втягування згортка, тобто блокування частини тромбоцитів у середині згортка, у порівнянні з менш швидкою фізіологічною активацією. Це може також привести до зниження загальної кількості факторів росту, доступних для впливу на зону ушкодження, оскільки деякі фактори росту мають короткий період напіврозпаду [2]. Окрім того, у разі використання бичачого тромбіну можливо викликати імунну реакцію [26].

Хлорид кальцію як екзогенний активатор був запропонований замість бичачого тромбіну. Він відновлює буферність

of calcium. When injection PRP to Platelet Activation and the release of Alpha granules enough intercellular calcium. In the case of application of the open input methods necessary to the formation of convolution. For this purpose apply other activators-thrombin, calcium chloride, collagen. [14]

Thrombin: Thrombin causes rapid aggregation of platelets; faster activation can lead to excessive condensation of fibrin matrix and significant involvement of clot, blocking part of the platelets in the middle of convolution, compared to less rapid physiological activation. It can also lead to a decrease in the total number of growth factors, available to influence the area of damage, because some of the growth factors have a short half-life. [2] In addition in the case of the use of bovine Thrombin may trigger the immune reaction. [26]

Calcium chloride as exogenous activator was proposed instead of bovine thrombin. It restores blood PH after the addition of citrate, which leads to a slow and physiological activation of platelets, and the gradual release of growth factors however because of the low pH of the introduction of calcium chloride causes pain in the patient. [19].

Combined application of calcium chloride and Thrombin enables significantly compromising the negative factors of both methodologies in these conditions, growth factors in the generated clot stand out more slowly and not coming to their breakup. [38]

To activate the platelets, collagen type 1 can be used and it is as effective activator of platelets as thrombin.

In research in vivo release of growth

крові після додавання цитрату, що веде до повільної та фізіологічної активації тромбоцитів та поступового вивільнення факторів росту. Проте через низький Рн введення хлориду кальцію викликає больовий синдром у пацієнта [19].

Поєднане застосування тромбіну та хлориду кальцію дозволяє суттєво знівелювати негативні чинники обох методик. У цих умовах фактори росту в сформованому згортку виділяються повільніше і не настає їх розпад [38].

Для активації тромбоцитів може бути використаний колаген I типу, що є ефективним активатором тромбоцитів як і тромбін. У дослідженнях *in vivo* порівнювалося вивільнення тромбоцитами факторів росту під дією колагену та бичачого тромбіну. Колаген I типу викликає аналогічне вивільнення PDGF і VEGF, але тривале та розтягнене в часі вивільнення TGF порівняно з дією тромбіну [20]. Аутологічний тромбін не викликає імунної реакції, а використання його в невисокій концентрації дозволяє активувати фізіологічний процес формування згортка та вивільнення факторів росту [14].

За методикою використання та активації ЗТП поділяється на:

- рідку ін'єкційну - використовується для ін'єкцій - активація при цьому відбувається переважно за рахунок кальцію міжклітинного простору, хоча можливе додавання хлориду кальцію безпосередньо перед ін'єкцією;

- спрей – використовується при оперативному лікуванні - наноситься на ранову поверхню – активація відбувається за рахунок ендогенних факторів - міжклітинного кальцію та колагену або при додаванні тромбіну та хлориду кальцію;

- гель – подібно до спрею, але для швидкої активації використовуються екзогенні чинники - тромбін та хлорид кальцію;

factors by collagen and bovine thrombin was compared. Collagen of 1st type causes a similar release of VEGF and PDGF, but longer release of TGF compared to the influence of thrombin. [20]

Autotrombine does not cause immune reactions, and use it in low concentration allows you to activate the physiological process of forming clot and release of growth factors. [14]

On how to use and activate the PRP is divided to:

- Liquid injection-is used for injection-activation when this happens mainly due to calcium intercellular space, although it is possible to add the calcium chloride immediately before injection.

- The spray is used in operational treatment-is applied to the wound surface-activation occurs due to endogenous factors-intercellular calcium and collagen or when adding Thrombin and calcium chloride.

- The gel-like spray but for quick activation used exogenous factors of thrombin and calcium chloride

- Fibrin clot is formed usually during centrifuging by adding calcium chloride before centrifuging. [14]

Recently studies indicate that the PRP provides not only local, but also the system effect. Amy S. Wasterlain (2013) conducted research on 25 volunteers to define the content of human hormones, IGF-1, IGFBP-3, bFGF, VEGF, and PDGF-BB and proved that in 15 minutes after injection of 3-6 ml of PRP, content of these hormones and growth factors in blood starts increasing and varies during 7 days. It can serve as an indicator of PRP use as doping in athletes. [50]

Thus, the individual results of PRP



- фібриновий згусток – формується, як правило, на етапі центрифугування шляхом додавання хлориду кальцію перед центрифугуванням [14].

Останнім часом проводяться дослідження, що вказують на те, що ЗТП здійснює не лише локальний, але й системний ефект. Amy S. Wasterlain (2013) проводячи дослідження на 25 добровольцях досліджував вміст гормону росту людини IGF-1, IGFBP-3, bFGF, VEGF та PDGF-BB довів, що через 15 хвилин після ін'єкції 3-6 мл ЗТП вміст цих гормонів та факторів росту в крові починає зростати, змінюючись протягом 7 діб. Це може служити індикатором використання ЗТП як допінгу в спортсменів [50].

Таким чином, окремі результати досліджень з застосування ЗТП при ушкодженні сухожилків та велика варіабельність перемінних параметрів не дозволяють на даному етапі визначитись з оптимальним складом ЗТП для максимального покращення та пришвидшення перебігу регенераторних процесів при лікуванні даної патології. Слід враховувати недостатню вивченість процесів регенерації в місці шва у випадку відновлення після застарілих ушкоджень сухожилків та особливостей застосування ЗТП при застарілих випадках.

application in damaged ligaments and wide range of variable parameters do not allow defining optimal composition of PRP at present stage required for maximum improvement and fastening of regenerative processes while treatment of this pathology. Lack of information about processes of regeneration in the area of suture in case of recovery after extend traumas of ligaments and peculiarities of PRP application in extended cases should be also taken into consideration.

Список літератури

1. Abrahamsson SO, Lundborg G, Lohmander LS. Recombinant human insulin-like growth factor-I stimulates in vitro matrix synthesis and cell proliferation in rabbit flexor tendon. *J Orthop Res* 1991;9:495–502.
2. 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;91:9S7-996
3. Anitua E, Prado, Sánchez M, Orive G. Platelet-Rich Plasma: Preparation and Formulation. *Operative Techniques in Orthopaedics* 03/2012; 22(1):25–32.
4. Aspenberg P., Virchenko O. Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats *Acta Orthop Scand* 2004; 75 (1): 93–99
5. Banda M J, Knighton D R, Hunt T K. Isolation of a nonmitogenic *angiogenesis* factor from wound fluid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 December; 79(24): 7773–7777
6. Beredjikian PK. Biologic aspects of flexor tendon laceration and repair. *J Bone*

Joint Surg 2003;85A:539–550.

7. Boyer MI, Watson J, Lou J, et al. Quantitative variation in vascular endothelial growth factor mRNA expression during early flexor tendon healing: an investigation in a canine model. *J Orthop Res* 2001; 19 (5): 869-72

8. Castillo TN, Pouliot MA, Kim HJ, Dragoo JL. Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet rich plasma separation systems. *Am J Sports Med* 2010;39: 266–271.

9. Chan BP, Fu S, Qin L, Lee K, Rolf CG, Chan K. Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on early stages of tendon healing: a rat patellar tendon model. *Acta Orthop Scand* 2000;71:513–518.

10. Chang J, Most D, Thunder R, et al. Molecular studies in flexor tendon wound healing: the role of basic fibroblast growth factor gene expression. *J Hand Surg [Am]* 1998; 23A (6): 1052-9

11. Chang J, Thunder R, Most D, et al. Studies in flexor tendon wound healing: neutralizing antibody to TGF-B1 increases postoperative range of motion. *Plast Reconstr Surg* 2000; 105 (1): 148-55

12. Cohen S. "Origins of growth factors: NGF and EGF." *J Biol Chem.* 283(49) (2008) 33793-33797

13. Dahlgren LA, Mohammed HO, Nixon AJ. Expression of insulin-like growth factor binding proteins in healing tendon lesions. *J Orthop Res* 2006;24:183–192.

14. DeLong JM, Russell RP, Mazzocca AD. Platelet-rich plasma: the PAW classification system. *Arthroscopy.* 2012 Jul;28(7):998-1009. doi: 10.1016/j.arthro.2012.04.148

15. Dohan Ehrenfest D M, Rasmusson L., Albrektsson Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in Biotechnology (Impact Factor: 9.66).* 02/2009; 27(3):158-67

16. Dreux AC, Lamb DJ, Modjtahedi H, Ferns GA (May 2006). "The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: their putative role in atherogenesis". *Atherosclerosis* 186(1): 38–53. doi:10.1016

17. Embil JM, Papp K, Sibbald G, Tousignant J, Smiell JM, Wong B, Lau CY. Recombinant human platelet-derived growth factor-BB (becaplermin) for healing chronic lower extremity diabetic ulcers: an open-label clinical evaluation of efficacy. *Wound Repair Regen.* 2000 May-Jun;8(3):162-8.

18. Flynn JE, Graham JH. Healing of tendon wounds. *Am J Surg* 1965;109:315–324.

19. Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-rich plasma: From basic science to clinical applications *Am J Spans Med* 2009;37:2259-2272

20. Fufa D, Shealy B, Jacobson M, Kevy S, Murray MM. Activation of platelet-rich plasma using soluble type I collagen. *J Oral Maxllhfac Surg* 200S;66:684-690.

21. Furlow LT Jr. The role of tendon tissues in tendon healing. *Plast Reconstr Surg* 1976;57:39–49.

22. Goodship AE, Birch HL, Wilson AM. The pathobiology and repair of tendon and ligament injury. *The Veterinary Clinics of North America. Vet Clin North Am Equine Pract* 1994;10:323–349.

23. Graziani F, Ivanovski C, Cei S, Ducci F, Tonetti M, Gabriele M. The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clin Oral Implants Res* 2006;17: 212-219

24. Giusti I, Rughetti A, D'Ascenzo S, et al. Identification of an optimal concentration of platelet gel for promoting angiogenesis in human endothelial cells. *Transfusion* 2009;49:771-778.



25. Hannink M, Donoghue DJ (1989). "Structure and function of platelet-derived growth factor (PDGF) and related proteins". *Biochim. Biophys. Acta* 989 (1): 1–10. PMID 2546599.
26. Harrison S, Vavken P, Kevy S, Jacobson M, Zurakowski D, Murray MM. Platelet activation by collagen provides sustained release of anabolic cytokines. *Am J Sports Med* 2011;39:729-734
27. Hyunchul C., Eun Kim J., Sup Yoon K., Shin S. Platelet-Rich Plasma Stimulates Cell Proliferation and Enhances Matrix Gene Expression and Synthesis in Tenocytes From Human Rotator Cuff Tendons With Degenerative Tears *Am J Sports Med* 2012 40: 1035 originally published online February 23, 2012
28. Ingraham JM, Hauck RM, Ehrlich HP. Is the tendon embryogenesis process resurrected during tendon healing? *Plast Reconstr Surg* 2003;112:844–854.
29. Rickert M, Wang H, Wieloch P, Lorenz H, Steck E, Sabo D, Richter W. Adenovirus-mediated gene transfer of growth and differentiation factor-5 into tenocytes and the healing rat Achilles tendon. *Connect Tissue Res* 2005;46: 175–183.
30. Rolf CG, Fu BS, Pau A, Wang W, Chan B. Increased cell proliferation and associated expression of PDGFRbeta causing hypercellularity in patellar tendinosis. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40:256 –261.
31. Kang HJ, Kang ES. Ideal concentration of growth factors in rabbit's flexor tendon culture. *Yonsei Med J* 1999;40: 26 –29.
32. Kashiwagi K, Mochizuki Y, Yasunaga Y, Ishida O, Deie M, Ochi M. Effects of transforming growth factor-beta 1 on the early stages of healing of the Achilles tendon in a rat model. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 2004;38: 193–197.
33. Katsura T, Tohyama H, Kondo E, Kitamura N, Yasuda K. Effects of administration of transforming growth factor (TGF)-beta1 and anti-TGF-beta1 antibody on the mechanical properties of the stress-shielded patellar tendon. *J Biomech* 2006;39:2566 – 2572.
34. Kon E, Filardo G, Di Martino A, Marcacci M. Platelet-rich plasma (PRP) to treat sports injuries: Evidence to support its use. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2011;19:516-527.
35. Manske PR, Gelberman RH, Lesker PA. Flexor tendon healing. *Hand Clin* 1985;1:25–34.
36. Mishra A, Harmon K, Woodall J, Vieira A. Sports medicine applications of platelet rich plasma. *Curr Pharm Biotechnol* 2011 July 8.
37. Molloy T, Wang Y., Murrell G The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med*, ., 2003 33 381- 394
38. Nikolidakis D, Jansen JA. The biology of platelet-rich plasma and its application in oral surgery: Literature review. *Tissue Eng Part B Rev* 2008; 14:249-258.
39. Peacock E. Physiology of tendon repair.// *Am J Surg* 1965;109:283–286.
40. Petersen W, Pufe T, Unterhauser F, Zantop T, Mentlein R, Weiler A. The splice variants 120 and 164 of the angiogenic peptide vascular endothelial cell growth factor (VEGF) are expressed during Achilles tendon healing. *Arch Orthop Trauma Surg* 2003;123:475– 480.
41. Pierce GF, Mustoe T, Lingelbach J, et al. Platelet-derived growth factor and

transforming growth factor-beta enhance tissue repair activities by unique mechanisms. *J Cell Biol* 1989; 109 (1): 429-40

42. Pufe T, Petersen W, Tillmann B, Mentlein R. The angiogenic peptide vascular endothelial growth factor is expressed in foetal and ruptured tendons. *Virchows Arch* 2001;439:579–585.

43. Relf M, LeJeune S, Scott PA, Fox S, Smith K, Leek R, Moghaddam A, Whitehouse R, Bicknell R, Harris AL. Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res.* 1997 Mar 1;57(5):963-9.

44. Sharma P, Maffulli N. Basic biology of tendon injury and healing. *Surgeon* 2005;3:309–316.

45. Spindler KP, Nanney LB, Davidson JM. Proliferative responses to platelet-derived growth factor in young and old rat patellar tendon. *Connect Tissue Res* 1995;31:171–177.

46. Takahasih S, Nakajima M, Kobayashi M, Wakabayashi I, Miyakoshi N, Minagawa H, Itoi E. Effect of recombinant basic fibroblast growth factor (bFGF) on fibroblast-like cells from human rotator cuff tendon. *Tohoku J Exp Med* 2002; 198:207–214.

47. Thomopoulos S, Harwood FL, Silva MJ, Amiel D, Gelberman RH. Effect of several growth factors on canine flexor tendon fibroblast proliferation and collagen synthesis in vitro. *J Hand Surg* 2005;30A:441–447.

48. Tsubone T, Moran SL, Subramaniam M, Amadio PC, Spelsberg TC, An KN. Effect of TGF-beta inducible early gene deficiency on flexor tendon healing. *J Orthop Res* 2006;24:569–575.

49. Virchenko O, Fahlgren A, Skoglund B, Aspenberg P. CDMP-2 injection improves early tendon healing in a rabbit model for surgical repair. *Scand J Med Sci Sports* 2005;15:260–264.

50. Wasterlain Amy S, Braun Hillary J., Alex H.S. Harris, Hyeon-Joo Kim and Jason L. Dragoo.. The Systemic Effects of Platelet-Rich Plasma Injection// *Am J Sports Med* 2013 41: 186,

51. Weibrich G, Hansen K, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* 2004;34:665-671. 52. Wolfman NM, Hattersley G, Cox K, Celeste AJ, Nelson R, Yamaji N, et al. Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6, and 7, members of the TGF-beta gene family. *J Clin Invest* 1997;100:321–330.

53. Yoshikawa T, Tohyama H, Enomoto H, Matsumoto H, Toyama Y, Yasuda K. Expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in patellar tendon grafts in the early phase after anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2006;14:804–810.