

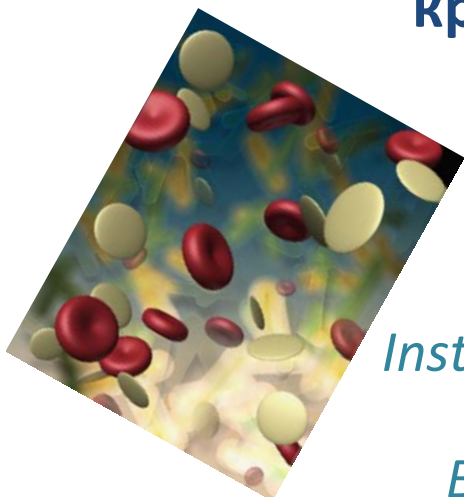


**ЕВРОПЕЙСКИ СОЦИАЛЕН ФОНД, МОМН,
ОП „РАЗВИТИЕ НА ЧОВЕШКИТЕ РЕСУРСИ”
2007 – 2013**

**Тема на проекта: Разработванена методика за
криоконсервация на кръвна плазма обогатена с
тромбоцити**

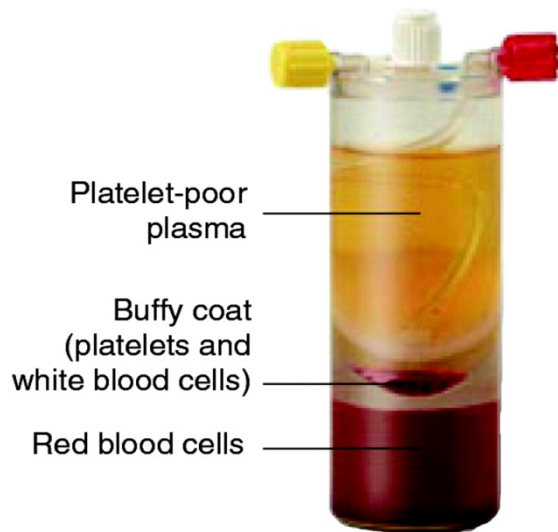
Кирил Лазов

*Institute of biology and immunology of reproduction “Acad.
Kiril Bratanov”, Bulgarian Academy of Science
Boulevard Tsarigradsko shose 73, 1113 Sofia, Bulgaria*

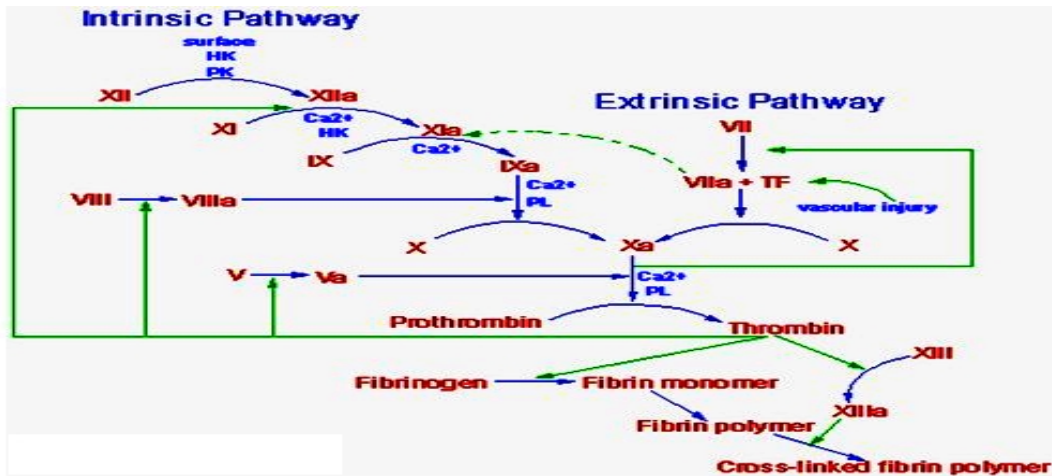


Защо е необходимо това изследване?

- **Тромбоцитите** са най-малките оформени елементи в кръвта. Броят им е 150000-400000 в 1 микролитър кръв. Формата им е овална, нямат ядра, безцветни са и размерите им са от порядъка на 2-3 микрометра.
- Основната функция на тромбоцитите е свързана с процеса на кръвосъсирване.



При кръвосъсирването участват 13 фактора, които при нормални условия циркулират в кръвната плазма в неактивна форма.



Platelet Rich Plasma

Platelets - 1500000 cml
Growth Factor – 3-5 times

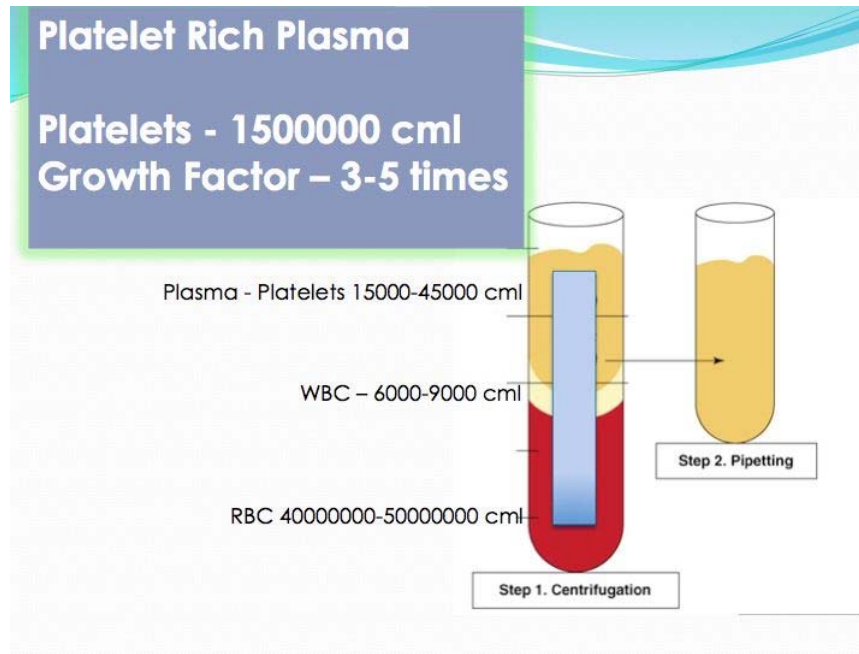
Plasma - Platelets 15000-45000 cml

WBC – 6000-9000 cml

RBC 40000000-50000000 cml

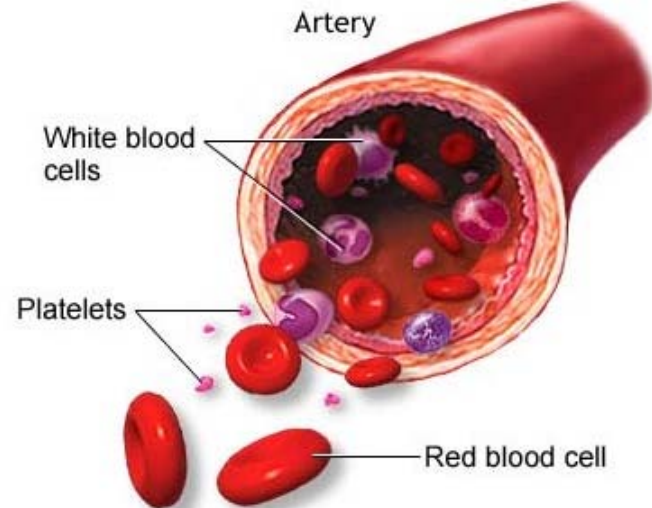
Step 1. Centrifugation

Step 2. Pipetting





Инфузна терапия



Инфузна терапия с тромбоцити се изисква при широк кръг патологични състояния свързани с намаляването на броя на тромбоцитите-тромбоцитопении или с нарушена тяхна функция-тромбоцитопатии. Инфузията на тромбоцити е и показана при остри кръвозагуби. Ето защо наличието на този кръвен продукт в клиничната дейност е от изключителна важност. Опитите са насочени към съхраняване на плазма богата на тромбоцити, която да бъде готова да инфузия. Освен прякото, животоспасяващо действие на плазмата богата на тромбоцити, приложение се намира и в регенеративната медицина. Тромбоцитите съдържат алфа гранули. В алфа-гранулите се съдържат растежни фактори-инсулиноподобен растежен фактор1, тромбоцитарен растежен фактор, тромбоцитарен фактор 4 и други. Използването на PRP плазма в регенеративната медицина е главно чрез т.нар плазмолифтинг.

Установено е, че при стайна температура- 22 С, тромбоцитите могат да се съхраняват за кратко време-3 до 5 дни. А в специални разтвори до 15 дни. До този момент усилия в световен мащаб са насочени към тяхното дълготрайно съхранение в течен азот, или в хладилник при минус 80 градуса. При съхранение в течен азот и хладилна температура при минус 80 градуса като водещ криопротектор, се наложи ДМСО. Същевременно са изпитани и други криопротектори като диметилацетамид, глицерин, 1,2 пропандиол, декстран, хидроксиетил старч, а също така и комбинация от тях. В резултат на извършените проучвания се установи, че ДМСО е най-подходящият криопротектор. Но всички изпитани криопротектори до този момент притежават токсични ефекти и е необходимо тяхното отминаване и последващо ресуспендиране на размразените тромбоцити.

Тези две технологични стъпки са абсолютно наложителни, за да се получи безвреден и готов продукт за инфзия. Също така са изпитвани и различни технологични режими за дълготрайно съхраняване. До скоро се считаше, че замразяването използващо технологията основана на ултраниски температури чрез използване на течен азот е водещото решение. Но последните години се наблюдава тенденция за все по-широко използване на фризери т.е. за преминаване от ултраниски температури към ниски-80С. Също така стана ясно, че и други кръвни клетки като левкоцитите съхраняват своите морфофункционални свойства при минус 80 градуса.

В.В. Захаров (1996) доказва, че замразени тромбоцити при минус 80 градуса с 2.5 процента разтвором ДМАЦ в крайни концентрации по всички показатели на функционална активност са превъзхождали своите контролни групи, които са били замразени в течен азот с препарата „Тромбокриодмац“.

Разработен е способ на криоконсервиране на тромбоцити при минус 80 С и използване на защитна среда : 2,5% диметилацетамида. Този метод обезпечава съхраняването на 75% от клетките, което превъзхожда методиката за криоконсервиране при минус 196 градуса.

Нашата цел и задачи:

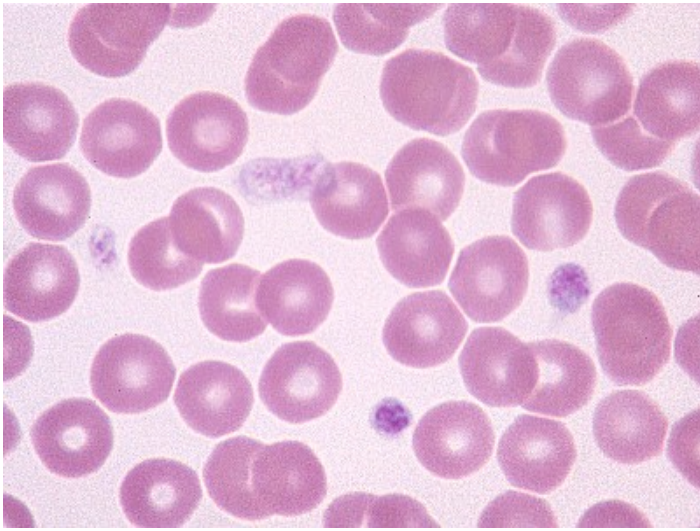
Нашата цел е да разработим методология, която да съответства на следните условия.

Разработка на лек и достъпен от практична гледна точка метод за криоконсервация на тромбоцити във фризер при минус 80 градуса. Ползите от замразяването в хладилна камера са очевидни. Методът е много удачен, тъй като не се изисква спъпо оборудване, не се използва течен азот и криотехника, което е задължително при поддържането на криобанки. Не се налага наличието на специализиран персонал и регулярно ангажиране на специализиран превоз за запълване на дюаровите съдове. Използването като новост на фризерната технология ще оптимизира метода за криосъхранение и използване на PRP плазма. До този момент малко на брой здравни заведения и могат да си позволят поддържането на криобанка с течен азот.

Създаване на технологична програма за понижаване на температурата, която да е максимално щадяща за морфо-функционалните параметри на тромбоцитите. За целта ще се изпитат различни подходи при еквилибрирането на пробите преди замразяването.

Използване на криопротектори, които не изискват отмиване и последващо ресуспендиране на тромбоцитите след размразяване. С тази цел ще бъде тестван усъвършенстван криопротектираща среда на основата на ГМБТОЕМ. Ползите са свързани с опростяването на методиката за преливането на кръвния продукт. Отпадането на двете технологични стъпки-отмиване на тромбоцитите от криопротектора и тяхното последващо ресуспендиране ще облекчи в значителна степен персонала на клиничните заведения и ще направи PRP плазмата доста по-гъвкав кръвен продукт. Освен това ще се избегнат и допълнителните механични увреди над тромбоцитите, които са неизбежни в процеса на отмиване и ресуспендиране.

Използване на кучешки тромбоцити като опитен модел. Инфузия на размразените тромбоцити на опитно животно /куче/ с цел наблюдение за възникване на евентуални нежелани реакции, което ще позволи този способ на криоконсервация да бъде препоръчан за клинична проба.



Normal Canine Platelets

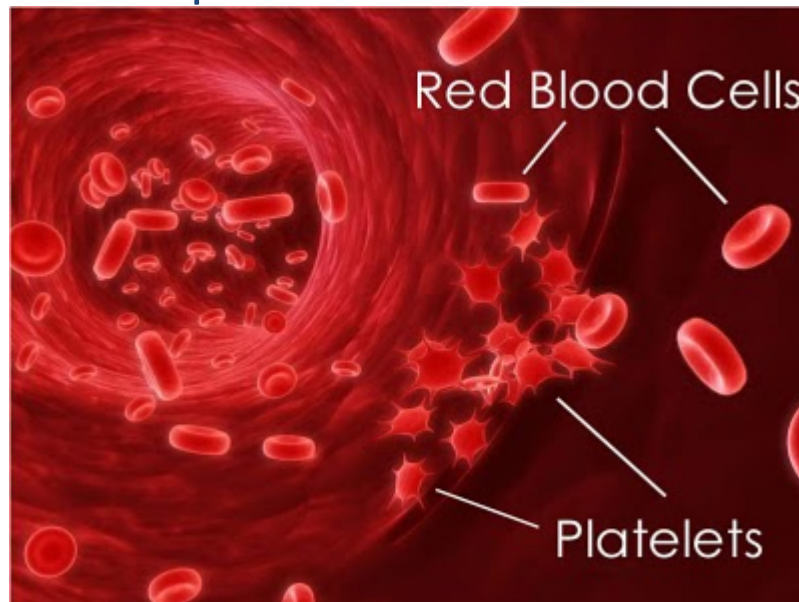
Отпадането на двете технологични стъпки-отмиване на тромбоцитите от криопротектора и тяхното последващо ресуспендиране, ще облекчи в значителна степен персонала на клиничните заведения и ще направи получаването на PRP плазмата доста по-лесно за приложение. Освен това, ще се избегнат и допълнителните механични увреди над тромбоцитите, които са неизбежни в процеса на отмиване и ресуспендиране.

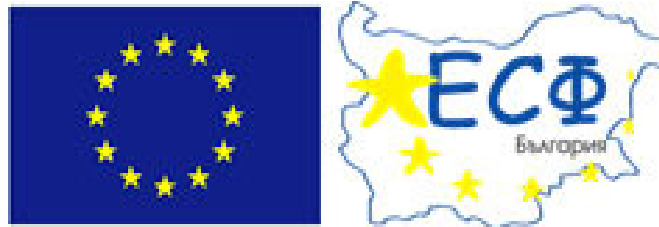
Ще се използват кучешки тромбоцити като опитен модел.

Ще се проведе инфузия на размразените тромбоцити на опитно животно /куче/ с цел наблюдение за възникване на евентуални нежелани реакции, което ще позволи този способ на криоконсервация да бъде препоръчан за клинична проба.

За постигането на посочените от нас цели ще бъде създадена модификация на криопротективна среда, разработена от Кузнецов, Константин Васильевич в неговата дисертация, Консервирование тромбоцитов замораживанием по экспоненциальной программе при - 80[O]C през 2006 година. Същият автор през 2006 година съобщава като научна новина, че за първи път са замразени тромбоцити със задоволителен резултат и инфузирани на куче без да са извършвани технологичните стъпки свързани с измиване и ресуспендиране.

Ние предлагаме да се разработи иновативен подход за замразяване на тромбоцити, чрез създаване на нова протекторна среда и нов подход за замразяване, с оглед бъдещо прилагане в практиката.





**ЕВРОПЕЙСКИ СОЦИАЛЕН ФОНД, МОМН,
ОП „РАЗВИТИЕ НА ЧОВЕШКИТЕ РЕСУРСИ”
2007 – 2013**

Благодаря за вниманието