

# Wybrane zagadnienia dotyczące nowatorskich zastosowań preparatów płytkopochodnych w świetle informacji przedstawionych w czasie wirtualnego kongresu Międzynarodowego Towarzystwa Przetaczania Krwi

Paulina Goczyńska , Joanna Lasocka , Elżbieta Lachert 

Zakład Transfuzjologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

**Artykuł jest tłumaczeniem pracy:**

Goczyńska P, Lasocka J, Lachert E. Innovative applications of platelet derivatives in light of information presented during the 2022 virtual congress of the International Society of Blood Transfusion (ISBT); selected issues. *J Transf Med* 2023; 16 (1): 31–34. DOI: 10.5603/JTM.2023.0003. Należy cytować wersję pierwotną.

Koncentraty krwinek płytkowych (KKP) od lat są stosowane w krwiolecznictwie u pacjentów z małopłytkowością i z towarzyszącymi jej objawami skazy krwotocznej. Już w latach 80. XX wieku zaobserwowano stymulujący wpływ płytkopochodnych czynników wzrostu na metabolizm komórek u zwierząt. Do czynników tych należą: płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF-aa, PDGF-ab i PDGF-bb, *platelet-derived growth factor*), transformujący czynnik wzrostu beta (TGF-B1 i TGF-B2, *transforming growth factor*), naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) oraz czynnik wzrostu fibroblastów (FGF, *fibroblast growth factor*). Potwierdzono także, że biologiczne mediatory regulujące wczesną proliferację biorą udział w różnicowaniu wszystkich typów komórek odgrywających ważną rolę w regeneracji tkanek miękkich i twardych. Od tego czasu znacznie zwiększyło się zainteresowanie preparatami na bazie płytek krwi, coraz więcej ukazujących się prac przedstawiało zastosowanie osocza bogato-płytkowego lub KKP, które stosowano nie tylko w medycynie regeneracyjnej (np. owrzodzenia kończyn, choroby zwyrodnieniowe stawów czy umocowania przeszczepów kości), ale również w chirurgii plastycznej czy też kosmetologii. Coraz częściej zaczęły pojawiać się także doniesienia

o możliwościach zastosowania klinicznego preparatów płytkopochodnych stosowanych w formie lizatów. Od lat 90. XX wieku zainteresowanie budzą także preparaty zawierające autologiczną surowicę, stosowane m.in. u pacjentów z zespołem suchego oka.

W trakcie wirtualnego kongresu Międzynarodowego Towarzystwa Przetaczania Krwi (ISBT, *International Society of Blood Transfusion*), który odbył się w dniach 4–8 czerwca 2022 roku, zaprezentowano kilka prac odnoszących się do niekonwencjonalnego zastosowania preparatów płytkopochodnych. Zagadnienia dotyczące ww. preparatów prezentowano podczas sesji plakatowych: „Blood products — The versatility of platelets and their products” oraz „Cellular therapies — New avenues of cellular therapy” [1–3].

W pracy Burnoufa (*Although expired, platelets are now starting a new life in medicine*) z Medycznego Uniwersytetu w Taipei przedstawiono możliwość alternatywnego wykorzystania przeterminowanych KKP. Na podstawie wyników badań stwierdzono, że allogeniczne krwinki płytkowe w przeterminowanych KKP mogą być cennym materiałem do przygotowania ludzkich lizatów płytkowych (HPL, *human platelet lysates*) lub biomateriałów płytkowych w celu ich medycznego

**Adres do korespondencji:** mgr Paulina Goczyńska, Zakład Transfuzjologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie, ul. Indiry Gandhi 14, 02-776 Warszawa, tel. 22 349 6386, e-mail: pgoczynska@ihit.waw.pl

Artykuł jest dostępny bezpłatnie na podstawie licencji Creative Commons Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) umożliwiającej jego pobranie oraz udostępnianie pod warunkiem wskazania autorstwa i wydawcy. Niedopuszczalne jest wprowadzanie jakichkolwiek zmian lub wykorzystanie komercyjne bez zgody wydawcy.

zastosowania w terapiach komórkowych i w medycynie regeneracyjnej. Naukowe uzasadnienie dla tych klinicznych zastosowań leży w fakcie, że krwinki płytkowe zawierają dużą ilość czynników troficznych (czynniki wzrostu, cytokiny, chemokiny, przeciwutleniacze, czynniki zapalne i przeciwzapalne itp.), które są niezbędne do koordynowania i promowania wzrostu komórek i regeneracji tkanek. Lizaty, otrzymane z przeterminowanych KKP, są zamrażane i przechowywane w centrach krwiodawstwa, a następnie dostarczane do producenta HPL, zgodnie z wcześniej ustalonymi warunkami. Proces otrzymywania lizatów obejmuje zamrażanie i rozmrażanie KKP w celu lizy krwinek płytkowych skutkującej uwolnieniem z ich ziarnistości aktywnych biologicznie substancji. Następnie otrzymany rozwór białka jest poddawany wirowaniu (lub filtracji) w celu usunięcia resztkowych elementów morfotycznych. Ostatni etap obejmuje sterylną filtrację, rozlewanie do butelek i przechowywanie w stanie zamrożonym. Lizaty są wykorzystywane między innymi w charakterze suplementu w podłożach hodowlanych dla mezenchymalnych komórek zrębu (MSC, *mesenchymal stromal cells*) (szpiku, tkanki tłuszczowej, galarety Whartona czy miazgi zęba), zamiennie dla najczęściej stosowanej płodowej surowicy bydlęcej lub końskiej. Stosując surowicę odzwierzęcą, zawsze zwiększa się ryzyko zarówno kontaminacji hodowli, jak i możliwość przeniesienia do podłoża ksenoprotein, toksyn, inhibitorów wzrostu oraz odzwierzęcych czynników zakaźnych, takich jak na przykład herpeswirus bydła typu-1 (BHV-1, *bovine herpesvirus type-1*), który może wywołać zapalenie nosa i tchawicy bydła (IBR/IPV, *infectious bovine rhinotracheitis*), wirus biegunki bydła (BVDV, *bovine viral diarrhoea virus*) [1].

Stosowanie ludzkiego lizatu eliminuje to ryzyko. W badaniach eksperymentalnych potwierdzono również skuteczność zastosowania podłoża z dodatkiem lizatu krwinek płytkowych w hodowli komórek nabłonka rogówki, chondrocytów, fibroblastów czy komórek śródbłonna.

Możliwość stosowania lizatów krwinek płytkowych w medycynie regeneracyjnej oparto na bogatym doświadczeniu klinicznym wynikającym z zastosowania allogenicznego lub autologicznego osocza bogatopłytkowego (PRP, *platelet rich plasma*) między innymi w chirurgii ortopedycznej (np. choroba zwyrodnieniowa stawów), gojeniu ran tkanek miękkich (np. opornych owrzodzeń), chirurgii szczękowo-twarzowej, stomatologii i implantologii, medycynie sportowej czy okulistyce. Allogeniczne KKP są używane także do otrzymywania kropli do oczu pochodzenia ludzkiego (EDHO,

*eye drops of human origin*) w postaci surowicy lub lizatów krwinek płytkowych stosowanych w leczeniu zespołu suchego oka. Obecnie (faza badań przedklinicznych) oceniane jest również działanie neuroprotektoryjne i neuroregeneracyjne lizatów, co może mieć zastosowanie w leczeniu zaburzeń neurodegeneracyjnych i urazów tkanki mózgowej [4–6].

Jak podkreślono w kolejnej pracy, zaprezentowanej w Sesji: *Cellular therapies — New avenues of cellular therapy (Preparation and neuroprotective activity of nanofiltered human platelet lysate in Parkinson's disease and traumatic brain injury models)* w przyszłości stosowanie lizatów krwinek płytkowych może stanowić nową bioterapię neurodegradacyjnych chorób i uszkodzeń centralnego układu nerwowego. Otrzymanie jednorodnej serii lizatu jest związane z koniecznością pulowania KKP oraz wprowadzenia metod redukcji czynników zakaźnych w celu zwiększenia bezpieczeństwa stosowanych preparatów. Burnouf i wsp. przedstawili badania oceniające wpływ wprowadzenia nanofiltracji w procesie otrzymywania lizatów z pul KKP na ich ewentualną skuteczność w leczeniu Parkinsona i uszkodzeń tkanki mózgowej. Pulę otrzymano w wyniku połączenia 50 preparatów KKP, którą poddano wstępnej filtracji (0,2 i 0,1  $\mu\text{m}$ ), a następnie nanofiltracji (0,001  $\text{m}^2$  Planova 20 N (19 nm)) przy stałym natężeniu przepływu 0,1 ml/min i pod kontrolowanym ciśnieniem. W celu oceny stopnia redukcji wirusa zastosowano model parwowirusa mysiego (MVM, *minute virus of mice*) i metodę immuno-qPCR. Zawartość białka całkowitego oznaczano metodą Bradforda, a ilościowe oznaczenie czynników neurotroficznych określono za pomocą testów ELISA. Płytkowe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (PEVs, *platelet-derived extracellular vesicles*) badano metodą dynamicznego rozpraszania światła (DLS, *dynamic light scattering*) i metodą śledzenia nanocząsteczek (NTA). Analizę proteomiczną przeprowadzono za pomocą chromatografii cieczowej i spektrometrii masowej. W celu oceny neuroprotektoryjnych i przeciwzapalnych funkcji poddanych nanofiltracji lizatów krwinek płytkowych zastosowano komórkowe modele *in vivo*. Zróznicowane ludzkie neurony dopaminergiczne śródmózgowia zastosowano jako model choroby Parkinsona (PD). Jednocześnie, stosując model mysy *in vivo*, przeprowadzono łagodne urazowe uszkodzenie mózgu w celu oceny, czy donosowe podanie ludzkich lizatów krwinek płytkowych (poddanych nanofiltracji) powoduje zmniejszenie ekspresji prozapalnych markerów mRNA (RT-PCR). Na podstawie wyników badań

stwierdzono, że nanofiltrację można wdrożyć do procesu otrzymywania lizatów krwinek płytkowych w celu zwiększenia bezpieczeństwa wirusologicznego bez wpływu na działanie neuroprotektoryjne i przeciwzapalne tych preparatów [2].

W tej samej Sesji: *Cellular therapies — New avenues of cellular therapy*. Le i wsp. przedstawili wyniki badań (*Proteomics studies of human platelet lysates for optimized applications in cell therapies and regenerative biotherapies*) otrzymane podczas wielośrodkowych badań wykonanych w Chinach i we Francji. W pracy podkreślono, że nie opracowano jeszcze jednej standardowo stosowanej metody otrzymywania lizatów krwinek płytkowych, natomiast różnice w sposobie ich przygotowywania mogą wpływać na ich skład białkowy i funkcję biologiczną, a w konsekwencji na ich bezpieczeństwo i skuteczność kliniczną. Celem tej pracy była próba porównania 7 metod otrzymywania lizatów krwinek płytkowych (HPL):

1. Zamrażanie–rozmarzanie lizatu krwinek płytkowych (FTPL): KKP zamrażano i rozmrażano w celu uwolnienia zawartości krwinek płytkowych do osocza.
2. Konwertowany lizat krwinek płytkowych w surowicy (SCPL): do KKP dodawano chlorku wapnia w celu przekształcenia fibrynogenu w fibrynę.
3. Konwertowany lizat krwinek płytkowych w surowicy (HSCPL) poddany procesowi ogrzewania (56°C, 30 min).
4. Lizat osadu krwinek płytkowych (PPL): wyizolowane krwinki płytkowe, pozbawione osocza poddawane lizie przez zamrażanie/rozmarzanie.
5. Lizat osadu krwinek płytkowych poddany procesowi ogrzewania (56°C, 30 min) (HPPL).
6. Lizat osadu krwinek płytkowych z mikrofiltracją (HPPL0201): filtracja 0,2–0,1 µm.
7. Lizat osadu krwinek płytkowych z mikrofiltracją (HPPL0201) poddany dodatkowo nanofiltracji (Planova 20 N, filtr usuwający wirusy 19 nm).

W wyniku badań proteomicznych zidentyfikowano 1441 białek w różnych rodzajach lizatów. Stwierdzono, że niektóre białka, występujące w wysokich stężeniach w osoczu, maskowały białka pochodzenia płytkowego. Usunięcie „przeszkadzających białek” umożliwiło ocenę proteomu krwinek płytkowych. Stwierdzono także, że skład białek lizatów krwinek płytkowych zależy od metody ich otrzymywania, a szczególnie od dodatkowych etapów, takich jak usuwanie osocza, ogrzewanie i filtracja. Różnice w składzie proteomu lizatów

krwinek płytkowych, mogą zatem wpływać na ich funkcjonalność, a w konsekwencji na różną skuteczność w terapii komórkowej i w medycynie regeneracyjnej [3].

### Zastosowanie lizatów krwinek płytkowych — najnowsze doniesienia

Prace dotyczące lizatów krwinek płytkowych, przedstawione podczas kongresu ISBT, potwierdzają coraz większe zainteresowanie tymi preparatami. W piśmiennictwie coraz częściej pojawiają się doniesienia dotyczące zarówno metod ich otrzymywania, jak i ich zastosowania. W jednej z prac udowodniono na przykład, że stosowanie podłoży hodowlanych zawierających lizaty krwinek płytkowych nasila właściwości klonogenne komórek MSC ze szpiku i tkanki tłuszczowej. W wyżej wymienionym badaniu wykazano niewielki wpływ metody otrzymywania lizatów na namnażane komórki (np. na ich potencjał różnicowania). Obecnie ze względu na brak jednoznacznych metod otrzymywania lizaty krwinek płytkowych nie są preparatem często stosowanym do produkcji podłoży wzrostowych. Jednak należy oczekiwać, że zachęcające wyniki badań oraz bezpieczne metody otrzymywania materiału wyjściowego, jakim są KKP (m.in. detekcja wirusów, metody inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych) spowodują, że lizaty będą coraz częściej otrzymywane i dodawane do podłoży wzrostowych) [4, 7, 8].

Krwinki płytkowe oprócz udziału w procesie krzepnięcia odgrywają istotną rolę w innych fizjologicznych mechanizmach. Potwierdzono na przykład, że krwinki płytkowe, wydzielając czynniki proneurogenne, komunikują się z tkanką mózgową, wpływając na funkcje kognitywne mózgu (zdolność przetwarzania bodźców z otoczenia). Jest to ściśle związane z obecnością w ziarnistościach krwinek płytkowych czynników neurotroficznych — neurotropowego czynnika pochodzenia mózgowego (BDNF, *brain-derived neurotrophic factor*), czynnika płytkowego 4 (PF4, *platelet factor 4*), pełniącego funkcję stymulatora neurogenezy oraz innych, wspomnianych wcześniej białek, biorących udział w mechanizmach wzrostu i regeneracji, między innymi czynnikiem wzrostu naskórki (EGF, *epidermal growth factor*), VEGF lub PDGF. W związku z powyższymi doniesieniami zainteresowano się zastosowaniem lizatów w procesach neuroregeneracyjnych. Wyniki badań (zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*) otrzymane w modelach chorób: stwardnienia zanikowego bocznego (ALS, *amyotrophic lateral sclerosis*), urazowego uszkodzenia mózgu (TBI,

*traumatic brain injury*), Parkinsona czy Alzheimera potwierdziły, że lizaty podtrzymują optymalną strukturę i funkcję neuronów (wykazują działanie neuroprotektoryjne), a w modelu udaru niedokrwionego mózgu potwierdzono także działanie pobudzające tworzenie komórek nerwowych i naczyń krwionośnych. W przypadku ww. jednostek chorobowych ważna jest możliwość indukcji podziałów komórek nerwowych, co daje szansę na poprawę stanu zdrowia pacjentów. W przypadku urazowego uszkodzenia mózgu (TBI) mogącego doprowadzić w zaawansowanej formie do zaburzeń fizycznych, poznawczych, społeczno-emocjonalnych lub nawet śmierci stosuje się wyłącznie leczenie paliatywne (tzn. objawowe). Leczenie lizatami, ze względu na ich szerokie spektrum białek proteomu (zestaw białek występujących w komórce, w danym momencie), może stanowić w tym przypadku jedną z nielicznych opcji terapeutycznych. W celu zapewnienia maksimum bezpieczeństwa do badań stosuje się HPLs poddane nanofiltracji oraz inaktywacji poprzez ogrzewanie (ok. 55°C przez 0,5 h) (IHPPL, *heat-treated Inactivated Platelet Pellet Ly-sate*). Filtracja membranowa zapewnia usunięcie wirusów, natomiast wysoka temperatura zapobiega aktywacji trombiny, aktywacji czynnika XI oraz chroni pacjenta przed ewentualnym ryzykiem zakrzepicy. Pięć-procentowy roztwór IHPPL po tygodniu inkubacji z komórkami mikrogleju i neuronami nie wykazywał w stosunku do nich toksyczności i nie indukował stanu zapalnego, wyrażanego w komórkach przez ekspresję czynników zapalnych (m.in. czynnika martwicy nowotworów [TNF, *tumor necrosis factor*] oraz cyklooksygenazy [COX-2, *cyclooxygenase-2*]), co w połączeniu z badaniami nad podziałami neuronów daje nadzieję na możliwość implementacji lizatów do leczenia układu nerwowego [6, 9, 10].

Aktywne biologicznie substancje zawarte w płytkach krwi sprawiają, że obecnie preparaty płytkopochodne już znalazły swoje zastosowanie w terapii wielu jednostek chorobowych, między

innymi takich jak niegojące się rany i choroby zwyrodnieniowe stawów, a prowadzone obecnie badania mogą umożliwić wykorzystanie tych preparatów w przyszłości, na przykład w chorobach neurodegeneracyjnych oraz regeneracji kości, ścięgien, neuronów i innych.

**Konflikt interesów:** nie zgłoszono

## Piśmiennictwo

1. Burnouf T. Although expired, platelets are now starting a new life in medicine. *Vox Sanguinis* 2022.
2. Delila L, Nebie O, Le N. Preparation and neuroprotective activity of nanofiltered human platelet lysate in Parkinson's disease and traumatic brain injury models. *Vox Sanguinis* 2022.
3. Le N, Han C, Delila L. Proteomics studies of human platelet lysates for optimized applications in el therapies and regenerative biotherapies. *Vox Sanguinis* 2022.
4. Barro L, Burnouf PA, Chou ML, et al. Human platelet lysates for human cell propagation. *Platelets*. 2020; 32(2): 152–162, doi: [10.1080/09537104.2020.1849602](https://doi.org/10.1080/09537104.2020.1849602), indexed in Pubmed: 33251940.
5. Antoniewicz-Papis J. Artificial tears to treat dry eye syndrome. *Acta Haematol Pol* 2021; 4 (52): 412–415.
6. Nebie O, Carvalho K, Barro L, et al. Human platelet lysate biotherapy for traumatic brain injury: preclinical assessment. *Brain*. 2021; 144(10): 3142–3158, doi: [10.1093/brain/awab205](https://doi.org/10.1093/brain/awab205), indexed in Pubmed: 34086871.
7. Gao Y, Ku NJ, Sung TC, et al. The effect of human platelet lysate on the differentiation ability of human adipose-derived stem cells cultured on ECM-coated surfaces. *J Mater Chem B*. 2019; 7(45): 7110–7119, doi: [10.1039/c9tb01764j](https://doi.org/10.1039/c9tb01764j), indexed in Pubmed: 31513217.
8. Mareschi K, Marini E, Niclot AG, et al. A new human platelet lysate for mesenchymal stem cell production compliant with good manufacturing practice conditions. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(6), doi: [10.3390/ijms23063234](https://doi.org/10.3390/ijms23063234), indexed in Pubmed: 35328655.
9. Nebie O, Barro L, Wu YW, et al. Heat-treated human platelet pellet lysate modulates microglia activation, favors wound healing and promotes neuronal differentiation *in vitro*. *Platelets*. 2020; 32(2): 226–237, doi: [10.1080/09537104.2020.1732324](https://doi.org/10.1080/09537104.2020.1732324), indexed in Pubmed: 32106742.
10. Delila L, Nebie O, Le N, et al. Neuroprotective activity of a virus-safe nanofiltered human platelet lysate depleted of extracellular vesicles in Parkinson's disease and traumatic brain injury models. *Bioengineering & Translational Medicine*. 2022; 8(1), doi: [10.1002/btm2.10360](https://doi.org/10.1002/btm2.10360), indexed in Pubmed: 36684076.