

О. Н. Сулаєва

Український науково-практичний центр ендокринної хірургії, г. Київ

## ПОЛУЧЕНИЕ БОГАТОЙ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЫ: МИФЫ И РЕАЛЬНОСТЬ

e-mail: oksana.sulaieva@gmail.com

В работе проведен сравнительный анализ характеристик плазмы, полученной с помощью разных пробирок для PRP-терапии (RegenLab, Plasmolifting, ВТИ, MM Medic, Ycellbio). Плазму выделяли согласно протоколам производителей из крови 12 добровольцев (6 мужчин и 6 женщин, средний возраст  $40 \pm 0,8$  лет). Оценку количества тромбоцитов проводили с помощью гематологического анализатора Micro-CC 20 (HTI США), а также методом проточной цитометрии с использованием флуоресцентно меченных антител к CD61 (Beckman Coulter, США). Максимальное количество тромбоцитов было получено при использовании пробирок Ycellbio, однако недостатком данного вида пробирок является необходимость выполнения дополнительных манипуляций и открытость системы. Использование пробирок, содержащих разделительный гель (RegenLab, Plasmolifting), не позволяет получить PRP. Низкое количество тромбоцитов в получаемой плазме может быть связано с адсорбирующими свойствами геля и/или использованием более жесткого режима центрифугирования. Оптимальным инструментом для получения плазмы, соответствующей по своим характеристикам PRP, является использование простых пробирок (ВТИ и MM Medic).

**Ключевые слова:** богатая тромбоцитами плазма, PRP-терапия, тромбоциты.

На сегодняшний день PRP терапия прочно вошла в клиническую практику разных сфер медицины [2, 4, 5, 7]. Этот метод занял лидирующие позиции в сфере косметологии и эстетической медицины, позволяя нивелировать возраст-ассоциированные изменения кожи, обеспечивая мощное прорегенераторное влияние [9]. Одним из ярких примеров доказанного клинического эффекта PRP-терапии является стимуляция заживления хронических ран [6]. Дерматологи, стоматологи, гинекологи, урологи, кардиохирурги и многие другие специалисты успешно применяют PRP терапию в ежедневной практике [3, 4, 6]. Однако использование клеточных технологий в клинической практике требует соблюдения определенных требований и условий, которые гарантируют безопасность и эффективность лечения [8]. На сегодня однозначно доказано, что PRP терапия является абсолютно безопасным методом лечения. Это обусловлено аутологичностью биологического материала, который не содержит аллергенов и мутагенов. Однако в отношении эффективности PRP терапии ситуация не так однозначна [5]. Ключевым фактором, определяющим эффективность PRP терапии, являются характеристики конечного биопродукта, а точнее – количество тромбоцитов в плазме после разделения фракций крови. На сегодня о количестве тромбоцитов в плазме, получаемой с помощью пробирок разных производителей известно преимущественно из маркетинговых материалов самих производителей. Однако, каково реальное количество тромбоцитов и насколько получаемая плазма соответствует стандартным характеристикам PRP, известно мало.

**Целью** работы был анализ характеристик плазмы, получаемой с помощью разных медицинских изделий, предназначенных для получения PRP.

**Материал и методы исследования.** В работе проведен анализ количества тромбоцитов в богатой тромбоцитами плазме, выделенной с использованием пробирок для PRP-терапии. При этом в исследование были включены только пробирки сертифицированных производителей (соответствие ISO 13485, Директиве 93/42 или Техническому регламенту в отношении медицинских изделий). На основании конструкции пробирок и принципов выделения PRP, пробирки были разделены на 3 группы. Первую группу составили простые пробирки PRGF EndoRet (Plasma Rich in Growth Factors) от Biotechnology Institute, Испания (далее ВТИ) и MM Medic (Украина), содержащие только антикоагулянт АСD-А, рекомендуемый к использованию в сфере PRP-терапии. В основу фракционирования крови в этих пробирках положен принцип центрифугирования, а выделение PRP требует базовых навыков работы с данным классом пробирок. Вторая группа включала в себя пробирки с разделительным гелем – RegenLab (Швейцария) и Plasmolifting (РФ). Наличие тиксотропного геля в таких пробирках гарантирует полное разделение фракций крови и простоту выделения PRP. Третий вариант тестируемых медицинских изделий включал пробирки Ycellbio (Южная Корея), которые имеют специфическую форму, облегчающую отбор PRP после центрифугирования.

После выделения PRP согласно протоколов производителей оценивали финальное количество тромбоцитов в выделяемой плазме и объем полученной PRP. Для оценки этих параметров использовали кровь 12 добровольцев (6 мужчин и 6 женщин, средний возраст  $40 \pm 0,8$

лет). Забор крови осуществляли утром натощак из локтевой вены. PRP получали согласно инструкции к пробиркам от производителя с использованием центрифуги Labofuge 200 (Германия). Для тестирования каждого вида пробирок использовали кровь как минимум 5 волонтеров. В то же время проводили перекрестную оценку, предусматривающую использование крови одного добровольца для тестирования нескольких разных видов пробирок. Концентрацию тромбоцитов оценивали в цельной крови и в полученной плазме. Плазму, полученную с помощью пробирок Endoret от ВТИ, оценивали без введения активатора. Оценку количества тромбоцитов проводили с помощью гематологического анализатора Micro-CC 20 (HTI США), а также методом проточной цитометрии с использованием флюоресцентно меченных антител к CD61 (Beckman Coulter, США). CD61 антиген (тромбоцитарный гликопротеин GPIIb/IIIa) представляет собой  $\beta 3$  субъединицу интегрин молекулярной массой 110 кДа. Данный маркер экспрессируется преимущественно в плазмолемме тромбоцитов и эндотелиоцитов. Он нековалентно связан с  $\alpha$ IIb цепью интегрин (CD41, или тромбоцитарный гликопротеин GPIIb). При активации CD61 связываясь с CD41, формирует комплекс GPIIb-IIIa ( $\alpha$ IIb- $\beta 3$  интегрин), являющийся высокоаффинным рецептором к фибриногену. Независимо от CD41, CD61 также может формировать связь с интегрином  $\alpha V$  (CD51), формируя рецептор к витронектину. Цитометрическое исследование проводили в цельной венозной крови и выделенной согласно инструкции плазме, разведенной в 10 раз фосфатным буфером (PBS). Окрашивание тромбоцитов проводили путем инкубации 40 мкл разведенной крови/плазмы с 5 мкл CD61-FITC в течение 15 минут при комнатной температуре. В качестве отрицательного контроля использовали антитела к мышиному иммуноглобулину, меченые FITC. Реакцию останавливали добавлением 455 мкл 1xPBS. Образцы анализировали на проточном цитометре Coulter Epics XL-MCL. Статистическую обработку данных проводили в пакете MedCalc.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Имеющиеся на сегодня в сфере PRP терапии опыт и практика демонстрируют роль ряда технических параметров, которые могут влиять на характеристики получаемой плазмы. К ним относят: способ забора крови, используемый антикоагулянт, ускорение при центрифугировании, время центрифугирования, температурный режим, принцип фракционирования крови и пр. [2, 9]. Более того, согласно современной концепции, плазму богатую тромбоцитами классифицируют на несколько типов, в зависимости от количества в ней тромбоцитов и лейкоцитов – чистая r-PRP и содержащая лейкоциты PRP (L-PRP) и используемого способа активации [1]. Проведенный анализ количества тромбоцитов в плазме, выделенной из крови добровольцев с использованием разных пробирок позволил выявить ряд интересных фактов. Во-первых, плазма, выделенная с помощью всех вариантов пробирок согласно рекомендациям производителя, соответствовала плазме с низким содержанием лейкоцитов. Во-вторых, стоит отметить, что оценка количества тромбоцитов в цельной крови и плазме разными методами дает сопоставимые результаты, однако в большинстве случаев метод проточной цитометрии оказался более чувствительным (таблица). И наконец, сравнение характеристик плазмы, полученной с помощью разных пробирок, позволило выявить существенные различия, которые могут влиять на эффективность PRP-терапии.

Результаты определения количеств тромбоцитов в плазме, выделенной с помощью пробирок 1-й группы показали, что несмотря на простую конструкцию пробирок от ВТИ и MM Medic, количества тромбоцитов в выделенной плазме было в 4-5 раз выше показателя в цельной крови, достигая оптимального порога – 106 тромбоцитов в 1 мкл, рекомендуемого ведущими специалистами в сфере PRP терапии (таблица). Стоит отметить, что процедура получения PRP с помощью данных пробирок достаточно проста и включает три шага: забор крови в пробирку, центрифугирование, отбор плазмы, богатой тромбоцитами. При этом обеспечивается закрытость системы, с минимальным риском контаминации биоматериала. При центрифугировании происходит разделение фракций крови, в результате эритроциты оседают вниз пробирки, над ними формируется узкое лейкоцитарное кольцо, а выше расположена плазма. Причем нижняя ее фракция (1,5-2 мл) содержит высокую концентрацию тромбоцитов – в соответствии с требованиями к PRP, а верхний слой (2 мл) по количеству тромбоцитов соответствует PPP. Однако использование таких пробирок требует профессиональных навыков врача при отборе PRP.

Тестирование образцов плазмы, полученных с помощью пробирок 2-й группы, содержащих разделительный гель (RegenLab и Plasmolifting), показало, что независимо от производителя и используемого в пробирках антикоагулянта, получаемая плазма содержала очень низкое количество тромбоцитов – ниже показателя в цельной крови, соответствующее PPP (таблица). Учитывая выявленное противоречие с данными, представленными в маркетинговых

материалах производителей, помимо оценки количества тромбоцитов в общем объеме выделенной плазмы, было проведено измерение количества тромбоцитов в нижней фракции плазмы (над гелем) и в верхнем слое плазмы до перемешивания. При этом количество тромбоцитов в нижней фракции плазмы было в 2 раза выше, чем в общем объеме плазмы после перемешивания, но мало отличалось от показателя в цельной крови. Одной из причин низкого содержания тромбоцитов в плазме, полученной с помощью пробирок RegenLab и Plasmolifting, может быть связывание тромбоцитов с тиксотропным гелем, являющимся полимером и обладающим высокой вязкостью. Эти данные во многом созвучны с мнением ведущих практикующих специалистов в области PRP терапии, не рекомендующих использовать пробирки с разделительным гелем, поскольку гель адсорбирует значимое количество тромбоцитов. И хотя активированная PRP также обладает стимулирующим влиянием на процесс регенерации, ее действие не сопоставимо с эффектами PRP. Вторым не менее существенным недостатком данных пробирок является необходимость использования более высокого ускорения при центрифугировании вследствие присутствия геля. Как известно, механическое воздействие (центрифугирование, или так называемая скорость сдвига в условиях *in vivo*) является активатором тромбоцитов. При активации происходит не только агрегация тромбоцитов, но и процесс дегрануляции, сопровождающийся освобождением содержимого гранул тромбоцитов. При ускорении 400 G спонтанная активация тромбоцитов составляет 5% [9]. Избыточное ускорение повышает процент активированных тромбоцитов, что сопровождается их преждевременной активацией. Использование режима центрифугирования с 1000-1500 G существенно увеличивает вероятность спонтанной активации и дегрануляции тромбоцитов, что ограничивает количество полноценных тромбоцитов в получаемой плазме и предопределяет раннюю дегрануляцию факторов роста, накапливаемых в гранулах тромбоцитов [1]. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что присутствие разделительного геля, обеспечивая простоту отбора плазмы, значительно снижает количество тромбоцитов в ней, и не позволяет получить PRP.

Таблица

**Количество тромбоцитов в образцах плазмы, выделенных с помощью разных пробирок**

№ пробирки	Цельная кровь	Плазма (гематологический анализатор)	Плазма (проточный цитометр)
Endoret ВТІ	274,2±14,6 (95% ДИ 233,6-314,8)	1011,0±26,9* (95% ДИ 941,6-1080,4)	1039,4±17,9* (95% ДИ 989,7-1089,1)
MM Medic	264,8±21,7 (95% ДИ 204,4-325,2)	1039,6±37,1* (95% ДИ 936,6-1142,6)	1067,6±17,7* (95% ДИ 1018,3-1116,9)
RegenLab	291,8±14,4 (95% ДИ 251,7-331,9)	205,8±23,6 (95% ДИ 140,0-271,6)	217,2±18,9 (95% ДИ 164,6-269,8)
Plasmolifting	311,6±19,9 (95% ДИ 254,1-369,1)	172,0±15,7* (95% ДИ 128,4-215,6)	205,200±31,9 (95% ДИ 116,6-293,7)
Ycellbio	251,6±22,9 (95% ДИ 187,9-315,3)	1554,0±24,9* (95% ДИ 1484,8-1623,1)	1583,2±28,5* (95% ДИ 1504,2-1662,2)

Примечание: \* – достоверности различий на уровне  $p < 0,05$ .

Максимальное количество тромбоцитов было получено в 3-й группе – при использовании пробирок Ycellbio. Данные пробирки, благодаря особой форме, облегчают отбор плазмы. Кроме того, данный вид пробирок не содержит вакуум, что ограничивает вероятность механического повреждения/активации тромбоцитов на этапе забора крови. Однако этот момент имеет и отрицательную сторону, требуя введения дополнительного шага – забор крови в отдельный шприц с последующим введением крови в пробирку через специальное отверстие в крышке. Это не только усложняет процедуру, но и ведет к «открытости» системы выделения PRP, повышая риск контаминации биоматериала и нивелируя стерильность процесса. В выделяемом 1-1,5 мл PRP количество тромбоцитов было в 7-8 раз выше показателя в цельной крови. Но при этом нельзя не отметить, что получаемая концентрация тромбоцитов при этом в 1,5 раза превышала оптимальный для PRP порог, обозначенный как 106 тромбоцитов на 1 мкл. Показано, что увеличение количества Тр в 4-6 раз (до 106) обеспечивает мощное прорегенераторное действие в сочетании с противовоспалительным эффектом. В PRP с количеством тромбоцитов в 7-10 раз превышающем базальный показатель в крови, зарегистрировано появление провоспалительных эффектов. Отчасти это связывают с наличием в составе гранул тромбоцитов многочисленных хемокинов, а также со способностью тромбоцитов продуцировать ряд цитокинов [1, 2]. Кроме того, ряд авторов указывает, что при очень высокой концентрации тромбоцитов возможен также процесс аутоактивации и парадоксальный ингибирующий эффект PRP на процессы регенерации [9].

**Закличення**

Проведенное исследование показало, что оптимальным инструментом для получения плазмы, соответствующей по своим характеристикам PRP, является использование простых пробирок (сертифицированные примеры в Украине – ВТИ и MM Medic). При выборе пробирок для PRP терапии важно учитывать параметры забора крови, режим центрифугирования и систему отбора плазмы, отдавая предпочтение закрытым системам, снижающим риски контаминации биоматериала и минимизирующим количество манипуляций.

**Список литературы**

1. Dhurat R. Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma / R. Dhurat, M. S. Sukesh // - A Review and Author's Perspective J Cutan Aesthet Surg. – 2014, Vol. 7(4), P. 189–197.
2. Ehrenfest D. M. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives / D. M. Ehrenfest, I. Andia, M. A. Zumstein // - Muscles Ligaments Tendons J. – 2014, Vol. 4(1), P. 3–9.
3. Fernandes G. Application of platelet-rich plasma with stem cells in bone and periodontal tissue engineering / G. Fernandes, S. Yang // Bone Res. – 2016, Vol.4 P. 160-136.
4. Jubert J. N. Platelet-Rich Plasma Injections for Advanced Knee Osteoarthritis: A Prospective, Randomized, Double-Blinded Clinical Trial / J. N. Jubert, L. Rodríguez, M. M. Reverté-Vinaixa [et al.] // Orthop J Sports Med. – 2017, Vol.5(2) P.232-596.
5. Kushida S. Platelet and growth factor concentrations in activated platelet-rich plasma: a comparison of seven commercial separation systems / S. Kushida, N. Kakudo, N. Morimoto [et al.] // J Artif Organs. – 2014, Vol.17(2), P. 186-192.
6. Martinez-Zapata M. J. Autologous platelet-rich plasma for treating chronic wounds / M. J. Martinez-Zapata, A. J. Martí-Carvajal // Cochrane Database Syst Rev. - 2016 May Vol. 25 (5).
7. Perez A. G. M. Aspects of Centrifugation Step in the Preparation of Platelet / A. G. M. Perez, S. D. Lana // - Rich Plasma ISRN Hematol. - 2014.
8. Platelet Rich Plasma (PRP) Guidelines, © International Cellular Medicine Society - 2011. Available from: <http://www.cellmedicinesociety.org>
9. Sister D. PRP: the new frontier in regenerative medicine and aesthetic medicine / D. Sister // - Firenze, - 2016 – 158 p.

**Реферати****ОТРИМАННЯ БАГАТОЇ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМИ:  
МІФИ та РЕАЛЬНІСТЬ**

Сулаєва О. М.

В роботі проведено порівняльний аналіз характеристик плазми, отриманої за допомогою різних пробірок для PRP-терапії (RegenLab, Plasmolifting, ВТИ, MM Medic, Ycellbio). Плазму виділяли відповідно до протоколів виробників з крові 12 добровольців (6 чоловіків і 6 жінок, середній вік  $40 \pm 0,8$  років). Оцінку кількості тромбоцитів проводили за допомогою гематологічного аналізатору Micro-CC 20 (HTI США), а також методом проточної цитометрії з використанням флуоресцентно мічених антитіл до CD61 (Beckman Coulter, США). Плазму з максимальною кількістю тромбоцитів було отримано при використанні пробірок Ycellbio. Проте недоліком даного виду пробірок є необхідність виконання додаткових маніпуляцій і відкритість системи. Використання пробірок, що містять розділовий гель (RegenLab, Plasmolifting), не дозволяє отримати PRP. Низька кількість тромбоцитів в одержуваній плазмі може бути пов'язана з адсорбуючими властивостями гелю та/або використанням більш жорсткого режиму центрифугування. Оптимальним інструментом для отримання плазми, яка відповідає за своїми характеристиками PRP, є використання простих пробірок (ВТИ і MM Medic).

**Ключові слова:** багата тромбоцитами плазма, PRP-терапія, тромбоцити.

Стаття надійшла 28.07.2017 р.

**OBTAINING OF PLATELET RICH PLASMA:  
MYTHS AND REALITY**

Sulaieva O. N.

A comparative analysis of plasma obtained by using different medical devices for PRP-therapy (RegenLab, Plasmolifting, ВТИ, MM Medic, Ycellbio tubes) was performed. Plasma was obtained according to the protocols of manufacturers from the blood of 12 volunteers (6 men and 6 women, the average age was  $40 \pm 0.8$  years). Evaluation of the platelet count was performed using a haematological analyser Micro-CC 20 (HTI USA), as well as by flow cytometry using fluorescently labelled antibodies to CD61 (Beckman Coulter, USA). The maximum number of platelets was obtained using Ycellbio tubes, but the drawback of this type of tubes is the need for additional manipulations and openness of the system. The use of tubes containing separating gel (RegenLab, Plasmolifting) does not allow obtaining PRP. The low count of platelets in the obtained plasma may be due to adsorption by separating gel and/or because of use of a more stringent centrifugation regime. The best device for obtaining plasma, that corresponds to requirements to PRP, was a kind of simple tubes (ВТИ and MM Medic).

**Key words:** platelet rich plasma, PRP-therapy, platelets.

Рецензент Запорожець Т.М.