

**АНАЛИЗ БОГАТОЙ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЫ, ПОЛУЧЕННОЙ
РАЗЛИЧНЫМИ СПОСОБАМИ.**

Файзрахманов Р.Р., Крупина Е.А., Павловский О.А., Ларина Е.А.,
Суханова А.В., Карпов Г.О.

ФГБУ «НМХЦ им. Н. И. Пирогова» Минздрава России
105203 г. Москва, ул. Нижняя Первомайская, д. 70 центр офтальмологии.

Резюме. Биологические методы терапии в последние десятилетия привлекают к себе все больше внимания. На сегодняшний день в медицине широкое распространение получили методы терапии на основе использования аутологичной плазмы крови (*АПК*). В данном исследовании проведен биологический анализ богатой тромбоцитами плазмы, полученной с использованием пробирок для *АПК*-терапии двух типов. В первой группе использовались пробирки для получения *PRP*, во второй для получения *АСР*.

Проведенное исследование показало, что при выборе пробирок для *PRP* терапии важно учитывать режим центрифугирования и систему отбора плазмы, отдавая предпочтение закрытым системам, позволяющим получать чистую *АПК*, сохраняющим стерильность и снижающим риски контаминации биоматериала при минимальном количестве манипуляций. В частности при терапии воспалительных нозологий необходимо использование *PRP*, что может определиться возможность коррекции локального иммунного статуса. При полостных операциях в офтальмологии целесообразно использование *АСР*, обладающей низкой реакцией со стороны иммунной системы. Основная роль *АПК* в данном случае тампонада тканевого дефекта за счет свойств используемого материала.

Ключевые слова: *PRP*-терапия, *АСР*-терапия, макулярный разрыв.

ANALYSIS OF PLATELET-RICH PLASMA OBTAINED IN VARIOUS WAYS.

R.R. Fayzrahmanov , E.A Krupina., O.A. Pavlovskiy , E.A. Larina ,
A.V. Suchanova., Karpov G.O.

Federal state budgetary institution «National Medical and Surgical Center named after
N.I. Pirogov» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation.

105203 Moscow, Nizhnyaya Pervomayskaya str., 70, center of ophthalmology.

телефон: +79206227210 e-mail: olegpavlovskiy@yandex.ru

Resume. Biological therapies have attracted more and more attention in recent decades. To date, in medicine, widespread therapies based on the use of autologous blood plasma (ABP). In this study, a biological analysis of platelet-rich plasma was performed. obtained using tubes for ABP-therapy of two types. In the first group, test tubes were used to obtain PRP, in the second to obtain ACP.

The study showed that when choosing tubes for PRP therapy, it is important to take into account the centrifugation mode and the plasma selection system, preferring closed systems that allow to obtain pure ABP, preserve sterility and reduce the risks of contamination of biomaterial with a minimum number of manipulations. In particular, the therapy of inflammatory nosologies requires the use of PRP, which may determine the possibility of correcting the local immune status. In cavity operations in ophthalmology, it is advisable to use ACP, which has a low response from the immune system. The main role of APC in this case tamponade tissue defect due to the properties of the material used.

Keyword: PRP therapy, ACP therapy, macular hole.

Актуальность.

Биологические методы терапии в последние десятилетия привлекают к себе все больше внимания. На сегодняшний день в медицине широкое распространение получили методы терапии на основе использования аутологичной плазмы крови (**АПК**). Данная технология прочно вошла в клиническую практику разных сфер медицины [3]. Использование **АПК** для ускорения роста кости и мягких тканей стало прорывом в хирургии, стоматологии, травматологии и ортопедии, спортивной медицине, косметологии и дерматологии, комбустиологии [11,12,14]. **АПК**-терапия занимает ведущие позиции в сфере косметологии и эстетической медицины, позволяя нивелировать возрастные изменения кожи, обеспечивая мощное регенераторное действие [2].

На сегодняшний день в клинической практике широко используется богатая тромбоцитами плазма (**Platelet-Rich Plasma / PRP**), аутологичная кондиционированная плазма (**Autologous Conditioned Plasma / ACP**). За последние 20 лет **АПК**-терапия перешла на новый уровень от продуктов первого поколения, т.е. богатой **PRP** и **ACP**, к продуктам второго поколения, обладающим повышенной фибринозной активностью, к которым относятся обогащённый лейкоцитами-тромбоцитами фибрин (**Leukocyte-Platelet-Rich Fibrin / L-PRF**) и усовершенствованный обогащённый тромбоцитами фибрин (**Advanced Platelet-Rich Fibrin / A-PRF**) [12].

Продукты второго поколения, предназначенные для **АПК**-терапии, имеют две отличительные черты от своих предшественников: повышенное содержание лейкоцитов и устойчивая фибринная матрица, обеспечивающая клеточную миграцию в зону репарации. Фибриновая пленка в **PRF** обладает повышенной эластичностью, что в свое время определяет возможность полного закрытия раневой поверхности [3, 14].

На сегодняшний день важным моментом являются возможности **АПК**-терапии, который основывается на дополнительных включениях в белковую структуру. Так, потенциал **PRF** основывается на включении высокой концентрации факторов роста, таких как, фактор роста эндотелия сосудов (**Vascular endothelial growth factor / VEGF**), фактор роста тромбоцитов (**Platelet-derived growth factor / PDGF**), противовоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин 4, 10 (**Interleukin-10, Interleukin-4**), трансформирующий фактор роста (**Transforming Growth Factor beta / TGF-beta**). Благодаря подобным включениям **АПК**-терапия обеспечивает стимулирование рубцевания ткани, формирование сосудов, пролиферацию клеток и дифференцирование, что является важным аспектом репарации. Кроме того, **PRF** содержит определенное количество нейтрофилов и моноцитов, обеспечивающих экспрессию эотаксина (**eotaxin**), хемокина-5 (**chemokine type 5**). Основная функция хемокинов состоит в контроле клеточной миграции. Клетки, мигрирующие под влиянием хемокинов, следуют градиенту концентрации сигнала по направлению к его источнику [15].

Тромбоциты известны своей ролью в гемостазе, но они также играют ключевую роль как промежуточное звено в процессе заживления поврежденной ткани за счёт способности выделять из своих α -гранул факторы роста [2,3]. Таким образом, **L-PRF** и **A-PRF** наибольший интерес представляют в имплантологии, периодонтологии и хирургической стоматологии.

На сегодня однозначно доказано, что **АПК**-терапия является абсолютно безопасным методом лечения. Ключевым фактором, определяющим эффективность терапии, являются характеристики полученной плазмы — количество тромбоцитов,

лейкоцитов, наличие антикоагулянта. При рассмотрении данного вопроса в рамках офтальмологии, использование продуктов **АПК**-терапии имеет широкий вектор направленности. Так, данные технологии могут быть использованы при патологии роговицы, изменении структуры глазной поверхности [10]. На сегодняшний день доказана эффективность использования **АПК** в ходе хирургии макулярных разрывов с хорошим анатомическим и функциональным результатом [8,9].

Тем не менее, эффективность **АПК**-терапии основывается на поставленной задаче: заживление раневой поверхности, коррекция локального иммунного ответа или устранение дефекта ткани. Несомненно, выбор задачи определяет возможность использования того или иного продукта **АПК**-терапии. Так, при наличии необходимости нивелирования иммунного ответа локальной зоны целесообразно использование **АПК**-продукта с повышенной концентрацией противовоспалительных цитокинов, хемокинов. При терапии дистрофических патологических состояний сетчатки, таких как макулярные разрывы, периферические разрывы сетчатки с наличием отслойки наиболее эффективным методом является использование фибриновой структуры, не обладающей иммунной активностью. На сегодняшний день среди многих офтальмологов активно обсуждается проблема терапии патологии центрального отдела сетчатки, а также критерии назначения антиангиогенной терапии и глюкокортикоидов [5,6,7]. Данный аспект основывается на механизмах воздействия на локальный иммунный статус сетчатки, что подчеркивает актуальность данной проблемы.

В связи с этим **целью** данной работы является биологический анализ богатой тромбоцитами плазмы, полученной различными способами.

Материал и методы исследования.

В данном исследовании проведен биологический анализ богатой тромбоцитами плазмы 24 человек. У каждого пациента получали два вида плазмы с использованием систем для **АПК**-терапии двух типов: пробирки **Ycellbio** (Южная Корея) для получения **PRP** и шприцы **Arthrex ACP** (Германия) для получения **ACP**.

Забор крови проводили у пациентов (12 мужчин, 12 женщин), средний возраст которых составил 54 ± 12 лет. Факторы исключения из исследования –тяжелые или нестабильные соматические заболевания (сахарный диабет, рефрактерная сердечно-сосудистая и почечная недостаточность и т.д.), применение пациентом тромболитиков.

Для получения **PRP** в пробирках **Ycellbio** проводили забор 12,5-13,5 мл крови, учитывая пол пациента, в шприц с антикоагулянтом (Цитрат натрия + Декстроза) – 1,5 мл, перенесение крови в пробирку и центрифугирование в течение 5 минут на скорости 4000

оборотов в минуту (*табл. 1*). Перед центрифугированием шприц закрывали и перемешивали содержимое путем 6-8-кратного вращения.

АСР получали с помощью двойных шприцов путем центрифугирования. Оба вида плазмы готовили в соответствии с инструкцией, описанной производителями.

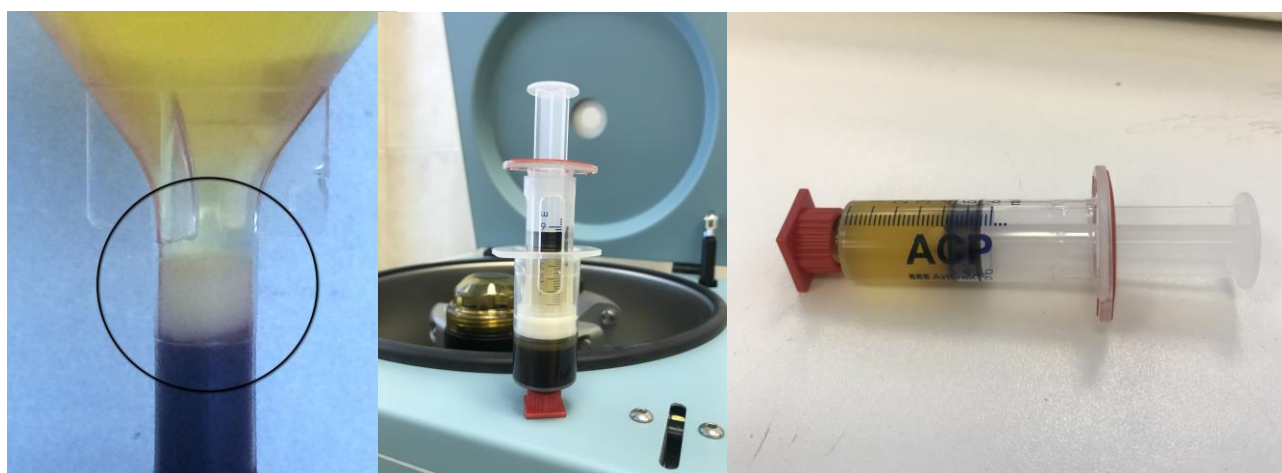
Таблица 1

Распределение объемов крови и антикоагулянта в пробирке для анализа **PRP**

Объём материала (мл)	Мужчина	Женщина
Кровь	12,5	13,5
Антикоагулянт	1,5	1,5
Всего	14	15

Для получения **PRP** использовались специальные пробирки с расширенной и узкой частью. После введения в пробирку определенного объема крови и ее центрифугирования происходило разделение на эритроцитарную массу и плазму таким образом, что тромбоцитарно-лейкоцитарный слой собирался в узкой части пробирки (стандартная ситуация) (*рис. 1а*). В нестандартной ситуации происходило завышение или понижение гематокрита, что приводило к необходимости проведения повторного центрифугирования. Объем получаемой таким способом плазмы составлял в среднем $0,1 \pm 0,05$ мл

АСР получали путем забора 15 мл крови в двойной шприц Arthrex без применения антикоагулянта. Центрифугирование проводили один раз во всех случаях в течение 5 минут на скорости 1500 оборотов в минуту. Затем **АСР** извлекали, вытягивая поршень маленького внутреннего шприца. Объем получаемой таким способом плазмы составил в среднем $4,2 \pm 0,7$ мл (*рис. 1 б, в*).



а**б****в**

Рис. Получение аутологичной плазмы крови для по методикам **PRP** и **ACP**.

Примечание: **а** - в узкой части пробирки указана фракция PRP, **б** - двойной шприц Arthrex ACP, **в** - внутренний шприц с полученной после центрифугирования плазмой.

Анализ состава плазмы (количество тромбоцитов и лейкоцитов) в нижнем слое определялось на полуавтоматическом гематологическом анализаторе (Drew 3-PAC (DREW Scientific (Великобритания – США))).

Результаты исследования.

Наиболее важными показателями, определяющим направленность использования **PRP** или **ACP** является наличие и процентное содержание тромбоцитов и лейкоцитов. Проведенный анализ с использованием двух типов медицинских изделий позволил выявить, что количество тромбоцитов соответствовало числу клеток, согласно заявленным рекомендациям производителя (*табл. 2*). Максимальное количество тромбоцитов было зафиксировано при использовании пробирок для получения **PRP**, тем не менее при повышении концентрации в 1,26 раза статистической достоверности выявлено не было.

Таблица 2.

Среднее количество тромбоцитов и лейкоцитов при различных методах исследования

(n=24, M±m)

Методика	Количество тромбоцитов, 10 ⁹ /л	Количество лейкоцитов, 10 ⁹ /л
PRP	820±112	4,2 ±1,4
ACP	653±85	0,026±0,06

Примечание: В таблице приведены данные содержания тромбоцитов и лейкоцитов в плазме, подсчитанные на гематологическом анализаторе.

Наиболее показательным являлось содержание лейкоцитов, в частности в **ACP** концентрация данного пула клеток была меньше в 161,54 раза меньше. По мнению ряда авторов, в некоторых случаях, после применения **PRP**, наблюдается воспалительная реакция, связанная с повышенным содержанием лейкоцитов в получаемой плазме [1].

Дополнительным, немало важным моментом является содержание антикоагулянта. На сегодняшний день имеющиеся в области **АПК** терапии протоколы демонстрируют

различия в ряде технических параметров, которые могут влиять на характеристики получаемой плазмы. К ним относят: применяемый антикоагулянт, скорость вращения центрифуги, время центрифугирования, принцип фракционирования крови и пр. [13]. При получении **PRP** средний объем антикоагулянта составил $0,01 \pm 0,04$ мл. Плазма **АСР** антикоагулянт не содержала.

При анализе коагулограммы АПК, полученной двумя разными методами, были выявлены нормальные значения базовых показателей (табл. 3).

Таблица 3.

Показатели коагулограммы при различных методах исследования (n=24, M $\pm$ m)

Наименование	PRP	АСР	Единицы измерения
АЧТВ	28 $\pm$ 3,2	26,8 $\pm$ 4,1	сек
МНО	1,02 $\pm$ 0,15	0,95 $\pm$ 0,2	
Фибриноген	3,45 $\pm$ 1,53	3,53 $\pm$ 1,37	г/л
Протромбиновое время	13,5 $\pm$ 4,25	14,8 $\pm$ 3,89	сек
Протромбиновый индекс (по Квику)	96 $\pm$ 23	108 $\pm$ 17	%
Тромбиновое время	16,3 $\pm$ 2,1	15,7 $\pm$ 2,7	сек

Обсуждение.

При центрифугировании с применением протокола индукции **PRP** определенное значение имеет уровень лейкоцитарного пула, таким образом данную фракцию можно отнести к **L-PRF**. При применении технологии **АСР**, мы получили чистую **АПК**, практически лишенную лейкоцитов, а отсутствие антикоагулянта нивелирует все возможные осложнения, связанные с развитием аллергических реакций.

Стоит отметить, что процедура получения **PRP** с помощью пробирок требует проведение дополнительных этапов – забор крови в отдельный шприц с последующим введением крови в пробирку через боковое отверстие в крышке. Затем, через центральное отверстие необходимо провести забор полученной плазмы. Это не только усложняет протокол, но и ведет к «открытости» системы в ходе получения **АПК**, повышая риск контаминации биоматериала, тем самым нарушая стерильность процесса. Забор крови с помощью системы **Arthrex** с двойным шприцем представляет собой простую процедуру, для которой необходима только стандартная канюля с разъемом **Luer Lock**. Поэтому процесс получения **АПК** занимает несколько минут, а закрытая система – может использоваться в клинике или в стерильных условиях в операционной, сохраняя стерильность полученной плазмы.

Несмотря на повышенную концентрацию тромбоцитов в **PRP**, активность данного клеточного пула ограничена методологией. Основопологающим моментом в протоколах получения **PRP** является необходимость использования более высокого ускорения. Как известно, механическое воздействие является активатором тромбоцитов. При активации происходит не только агрегация, но и разрушение тромбоцитов, что ограничивает количество полноценных тромбоцитов в получаемой плазме [13]. Дополнительным отягощающим моментом получения **PRP** является изменение митохондриальной активности клеток. При формировании митохондриальной недостаточности можно ожидать снижения пластической активности любых клеток, в т.ч. и тромбоцитов. По своему происхождению тромбоцит является безъядерным фрагментом более крупной клетки — мегакариоцита и свою основную внутриклеточную структуру в виде гранул трех типов получает именно от него. Однако, уже начав свое самостоятельное существование, он не прекращает метаболическую активность как в рамках пластического, так и в рамках энергетического обмена. Поскольку формирование митохондриальной недостаточности тромбоцитов может значимо повлиять на интенсивность их пластического обмена и снизить концентрацию факторов роста в α -гранулах, то в конечном итоге это отразится на качестве аутобиоматериала и, соответственно, снизит эффективность PRP-терапии. Следовательно, предварительная оценка состояния митохондриального аппарата тромбоцитов и фармацевтическая коррекция митохондриальной недостаточности может значительно улучшить их качество [4].

Заключение.

Проведенное исследование показало, что при выборе пробирок для PRP терапии важно учитывать режим центрифугирования и систему отбора плазмы, отдавая предпочтение закрытым системам, позволяющим получать чистую **АПК**, сохраняющим стерильность и снижающим риски контаминации биоматериала при минимальном количестве манипуляций. Кроме того, основным аспектом терапии является задача использования **АПК**. В частности при терапии воспалительных нозологий необходимо использование **PRP**, что может определиться возможностью коррекции локального иммунного статуса. В офтальмологии к данным заболеваниям может быть отнесена группа патологий глазной поверхности. При полостных операциях в офтальмологии целесообразно использование **АСР**, обладающей низкой реакцией со стороны иммунной системы. Основная роль **АПК** в данном случае тампонада тканевого дефекта за счет свойств используемого материала.

Литература.

1. Арсютов Д.Г. Использование аутологичной кондиционированной плазмы, обогащённой тромбоцитами, в хирургии регматогенной отслойки сетчатки с центральным и периферическими разрывами // Acta Biomedica Scientifica. – 2019. – Том 4. – № 4.
2. Ахмеров Р., Зарудий Р., Рычкова И. с соавт. Плазмолифтинг (Plasmolifting).— Лечение возрастной атрофии кожи богатой тромбоцитами аутоплазмой // Эстетическая медицина. – 2011. – № 2. – С. 181-187.
3. Ачкасов Е.Е., Безуглов Э.Н., Ульянов А.А. с соавт. Применение аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, в клинической практике // Биомедицина. – 2013. –№ 4. – С. 46-59.
4. Измайлова Т.А. Персонализированная PRP-терапия: алгоритм подготовки пациента // Инъекционные методы в косметологии. - 2016. - №2. -С. 76-81.
5. Файзрахманов Р. Р. Режимы назначения анти-VEGF-препаратов при терапии неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации // Вестник офтальмологии. – 2018. - № 6. - С. 105- 113.
DOI: <https://doi.org/10.17116/oftalma2018134061105>.
6. Файзрахманов Р.Р. Анти-VEGF терапия неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации: от рандомизированных исследований к реальной клинической практике // Российский офтальмологический журнал.- 2019.- №12 (2).- С. 97-105.
DOI: 10.21516/2072-0076-2019-12-2-97-105.
7. Файзрахманов Р.Р. Озурдекс в терапии диабетического макулярного отека. Когда назначать? // Вестник офтальмологии. – 2019. - № 4. - С. 121- 125.
<https://doi.org/10.17116/oftalma2019135041121>.
8. Файзрахманов Р.Р. Павловский О.А., Ларина Е.А. Хирургическое лечение пациентов с неустраненным макулярным разрывом // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова.- 2019. № 14 (2).- С. 98-104.
DOI: 10.25881/BPNMSC.2018.64.37.021.
9. Шпак А.А., Шкворченко Д.О., Крупина Е.А. Структурные изменения макулярной области после хирургического лечения макулярных разрывов с применением богатой тромбоцитами плазмы крови // Офтальмохирургия. – 2018. – № 4. – С. 52-57.
10. Anitua E. et al. Preservation of biological activity of plasma and platelet-derived eye-drops after their different time and temperature conditions of storage // Cornea. – 2015. – Vol. 34. - № 9. – P. 1144 – 1148].

- 11.Arshdeep K., Kumaran M. Platelet-rich plasma in dermatology: Boon or a bane? // Ind J Dermatol Venereol Leprol. – 2014. – Vol. 80. – P. 5–14.
- 12.Dragonas P., Katsaros T., Avila-Ortiz G. et. al. Effects of leukocyte-platelet-rich fibrin (L-PRF) in different intraoral bone grafting procedures: a systematic review // Int J Oral Maxillofac Surgery.- 2019 Vol. 48. - № 2. – P. 250 -262.
- 13.Ehrenfest D.M., Bielecki T., Mishra A., et. al. In search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: plateletrich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes // Current pharmaceutical biotechnology. – 2012. – Vol. 13. - № 7 – P.1131–1137
- 14.Soldatova L., Campbell R.G., Elkhatab A.H. et. al. Role of Leukocyte-Platelet-Rich Fibrin in Endoscopic Endonasal Skull Base Surgery Defect Reconstruction // J Neurol Surgery Skull Base. – 2017. Vol. 78. - № 1 – P.59–62 DOI: 10.1055/s-0036-1584894.
- 15.Yang B., Houlberg K., Millward A. et. al. Polymorphisms of chemokine and chemokine receptor genes in Type 1 diabetes mellitus and its complications // Cytokine. - 2004 Vol. 7. - № 26 – P.114–121.