

## ВПЛИВ ШВИДКОСТІ ПРИСКОРЕННЯ ТА ЧАСУ НА ЗБАГАЧЕННЯ ПЛАЗМИ ТРОМБОЦИТАМИ

Фіщенко В.О.<sup>1,3</sup>, Рибінський М.В.<sup>1</sup>, Фіщенко О.В.<sup>1,2</sup>, Німчик Н.Ю.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова

<sup>2</sup>Вінницький обласний клінічний госпіталь ветеранів війни

<sup>3</sup>Вінницька міська клінічна лікарня швидкої медичної допомоги

**Резюме.** Використання збагаченої тромбоцитами плазми в клінічних умовах вимагає чіткого алгоритму її отримання згідно з індивідуальними лабораторними протоколами. Найпростіша оцінка готової PRP (platelet-rich plasma) здійснюється за допомогою визначення її можливих кількісних характеристик. **Мета.** У дослідженні проводиться оцінка впливу різних параметрів центрифугування на кількісні показники плазми. **Матеріали і методи.** Для дослідження використано 36 зразків крові по 4 мл, які підлягали центрифугуванню за різних умов. Для оцінки плазми проводилось визначення та порівняння кількості тромбоцитів, лейкоцитів, еритроцитів та об'єму плазми. **Результати.** Кількість тромбоцитів у всіх зразках збільшується у 1,5-2,5 рази після першого циклу центрифугування, та в 3-5 разів після другого циклу. Кількість лейкоцитів у всіх зразках менша базового значення після першого циклу і найменша після першого циклу тривалістю 15 хв. Вихід рідкої частини плазми зростає за умови тривалішого та агресивнішого первинного центрифугування, починаючи з  $\approx 48\%$  при 5 хв. і закінчуючи  $\approx 76\%$  при 15 хв. на швидкості 1000 об/хв. Кількість еритроцитів у всіх зразках мінімальна. Другий цикл центрифугування продемонстрував збільшення кількості лейкоцитів у деяких зразках до меж базових значень. **Висновки.** Центрифугування із використанням невеликих обертів та часу дозволяє отримати якісну плазму вже після першого циклу. Другий цикл дозволяє збільшити вміст тромбоцитів до бажаного рівня за рахунок більшого прискорення.

**Ключові слова:** збагачена тромбоцитами плазма, центрифугування, тромбоцити, лейкоцити, фактори росту.

### Вступ

Останнє десятиліття увагу вчених та лікарів усього світу дедалі більше привертає прямий вплив на регенерацію тканин шляхом застосування тих чи інших біологічно активних речовин. Збагачена тромбоцитами плазма (PRP – platelet-rich plasma) вже знайшла своє застосування у багатьох галузях медицини та з успіхом використовується і як самостійний метод, і в комплексі з іншими методами лікування. Світове наукове товариство не має чіткої позиції щодо дефініції поняття “PRP”: у багатьох оглядах збагаченою називають плазму, яка містить кількість тромбоцитів, більшу за середні базові значення; у той же час робочим визначенням вважають значення тромбоцитів у межах  $1000 \times 10^9/\text{л}$  [10]. Незважаючи на це, дуже велика кількість клітин чи тканин, на регенерацію яких ми б хотіли вплинути, вимагає різних кількісних характеристик PRP. На нашу думку, саме це і зумовлює різнобічний погляд дослідників на поняття. Маючи велику кількість повідомлень про склад PRP та методи її приготування, відповідно, знаходимо дуже широкий спектр

біологічної дії – від практично відсутніх результатів до абсолютно прекрасних. Зрозуміло, що такий різноманітний вплив, насамперед, зумовлений не так складом PRP, як субстратом, тобто клінічною точкою прикладання дії факторів росту. З іншого боку, саме впливом на параметри центрифугування ми модифікуємо кількість факторів росту та кінцевий регенераторний потенціал PRP. Як відомо, пік виділення факторів росту припадає на першу годину після її виготовлення та активації, більшість їх виділяється протягом першої доби, а інша частина виділяється в середньому протягом 7-10 днів із моменту активації [6, 7, 8]. Активація тромбоцитів фактично починається одразу при контакті крові зі стінками шприца та голки. Цю первинну активацію ми призупиняємо шляхом уведення у зразки антикоагулянту. Реактивація тромбоцитів із дегрануляцією їх  $\alpha$ -гранул здійснюється або додаванням іонів Са та тромбіну, або уведенням плазми одразу у пошкоджену тканину, що містить велику кількість власне тканинного тромбопластину. Тому для нас надважливо зберегти якнайдовше тромбоцити життєздатними та мати достатню їх кількість

в одиниці об'єму для гарного пролонгованого клінічного ефекту.

**Мета дослідження** – встановити взаємозалежність між параметрами центрифугування та кінцевою кількістю тромбоцитів та інших формених елементів у плазмі.

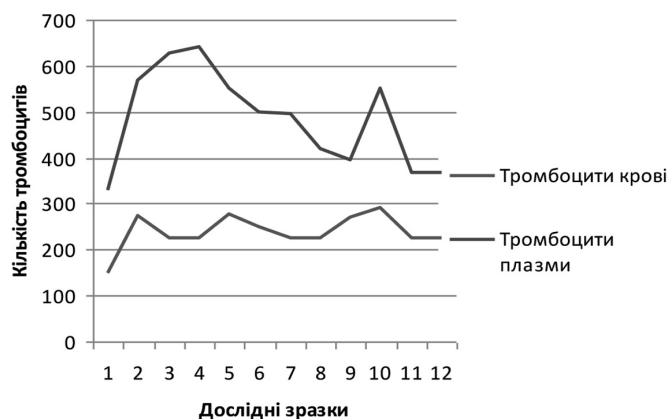
## Матеріали і методи

Для дослідження було використано кров пацієнтів хірургічного відділення, які підлягали оперативному артроскопічному лікуванню, віком від 27 до 73 років. Приготування збагаченої тромбоцитами плазми проводилось в умовах лабораторії Вінницького обласного клінічного госпіталю ветеранів війни за допомогою центрифуг "ОПн-3" та "Дніпро-МПВ". Оцінка кількісних характеристик показників крові та плазми здійснювалась на автоматичному гематологічному аналізаторі "Mythic 18" (Швейцарія). Забір крові здійснювався в одnorазові стерильні пробірки "Vacuheck" об'ємом 4 мл з антикоагулянтном K<sub>3</sub>EDTA. Першим кроком було визначення кількості тромбоцитів, лейкоцитів, еритроцитів, їх співвідношення у цільній крові та плазмі після першого циклу центрифугування, а також кількості первинної плазми в порівнянні з вихідним гематокритом крові за різної тривалості центрифугування – 5 хв., 10 хв. та 15 хв. на швидкості 1000 об/хв. Наступним кроком був підрахунок формених елементів після другого циклу центрифугування при швидкості прискорення 1500, 2400 та 3000 об/хв. Потрібно зауважити, що у всіх зразках відбір верхньої частини плазми бідної тромбоцитами здійснювався у розмірі 50% від усієї кількості. Статистичні показники підраховувались за допомогою однофакторного параметричного дисперсійного аналізу та попарного порівняння t-критерію у Microsoft Excel.

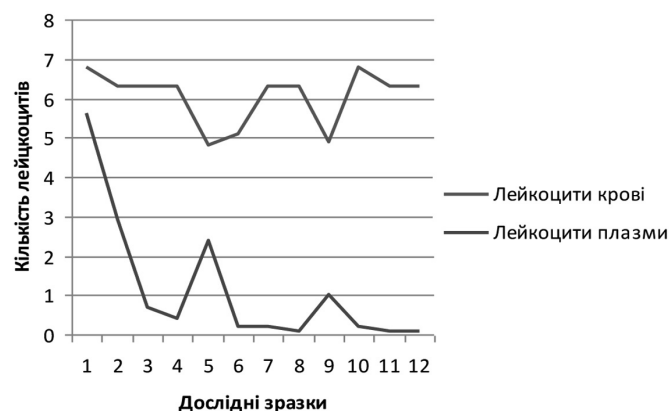
## Результати та їх обговорення

Отже, на першому етапі дослідження ми отримали наступні показники крові та первинної плазми. Середній вміст тромбоцитів у вихідній цільній крові склав  $239,33 \pm 37,84 \times 10^9$ /л, середня кількість лейкоцитів –  $6,04 \pm 0,70 \times 10^9$ /л, еритроцитів –  $4,80 \pm 0,26 \times 10^{12}$ /л (n=12). Відповідні середні показники в плазмі після першого циклу центрифугування склали: для тромбоцитів –  $484,17 \pm 106,45 \times 10^9$ /л, для лейкоцитів –  $1,16 \pm 1,68 \times 10^9$ /л, для еритроцитів –  $0,053 \pm 0,037 \times 10^{12}$ /л (n=12). Теоретична кількість первинної плазми –  $2,28 \pm 0,11$  мл, фактична кількість отриманої плазми склала  $1,38 \pm 0,32$  мл (n=12). Збагачення первинної плазми тром-

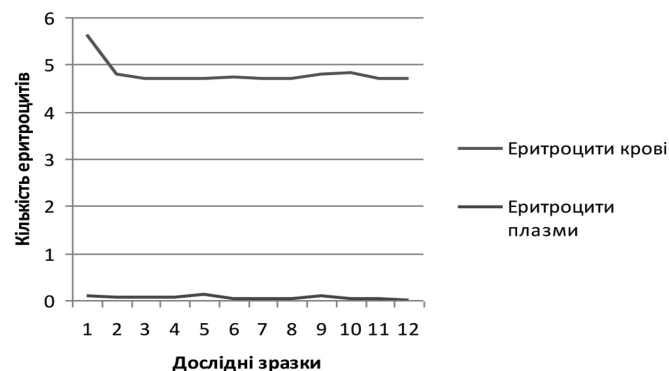
боцитами склало: після 5 хв. центрифугування –  $146,81 \pm 39,07\%$  (n=4), після 10 хв. центрифугування –  $100,45 \pm 13,85\%$  (n=4), після 15 хв. центрифугування –  $65,0 \pm 18,18\%$  (n=4). Вихід плазми щодо теоретично можливої склав: після 5 хв. центрифугування –  $47,82 \pm 2,84\%$  (n=4), після 10 хв. центрифугування –  $56,71 \pm 3,40\%$  (n=4), після 15 хв. центрифугування –  $76,41 \pm 2,89\%$  (n=4). Розподіл значень демонструють відповідні графіки (рис. 1, 2, 3 та 4).



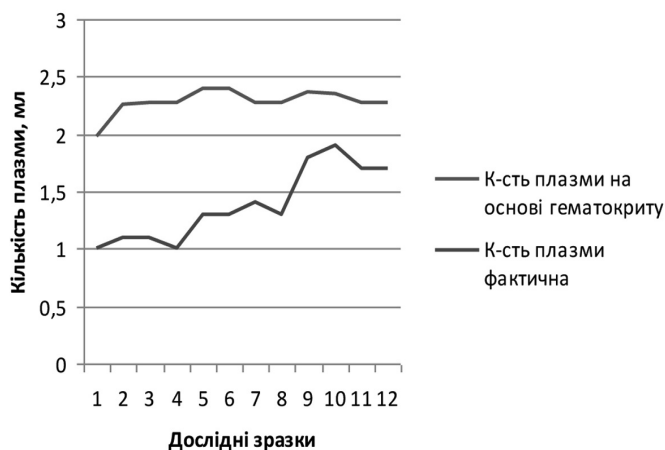
**Рис. 1.** Співвідношення тромбоцитів крові та плазми після першого циклу центрифугування



**Рис. 2.** Співвідношення лейкоцитів крові та плазми після першого циклу центрифугування

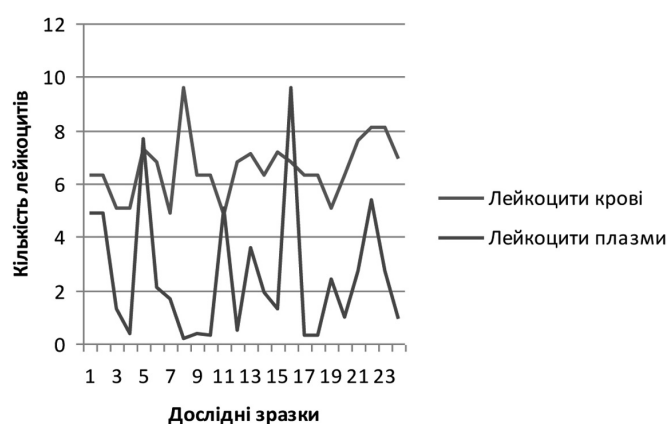


**Рис. 3.** Співвідношення еритроцитів крові та плазми після першого циклу центрифугування



**Рис. 4.** Співвідношення фактично отриманої плазми та можливої, що розрахована на основі гематокриту

Наступне дослідження продемонструвало утворення збагаченої тромбоцитами плазми з середнім вмістом тромбоцитів  $839,54 \pm 286,76 \times 10^9/\text{л}$ , вихідний вміст тромбоцитів складав  $260,71 \pm 76,40 \times 10^9/\text{л}$ , після першого циклу центрифугування –  $518,87 \pm 119,03 \times 10^9/\text{л}$ . Середня кількість лейкоцитів вихідної крові –  $6,57 \pm 1,13 \times 10^9/\text{л}$ , плазми –  $2,57 \pm 2,53 \times 10^9/\text{л}$ . Вміст еритроцитів залишається незмінним відносно первинної плазми і складає “сліди” –  $0,125 \pm 0,093 \times 10^{12}/\text{л}$  ( $n=24$ ). Збагачення плазми після другого циклу прискорення склало: відносно крові – при швидкості 1500 об/хв –  $161,73 \pm 32,18\%$  ( $n=8$ ), при швидкості 2400 об/хв –  $209,14 \pm 37,32\%$  ( $n=8$ ), при швидкості 3000 об/хв –  $290,03 \pm 86,65\%$  ( $n=8$ ); відносно первинної плазми – при швидкості 1500 об/хв –  $29,65 \pm 17,52\%$  ( $n=8$ ), при швидкості 2400 об/хв –  $59,09 \pm 9,25\%$  ( $n=8$ ), при швидкості 3000 об/хв –  $92,33 \pm 22,82\%$  ( $n=8$ ). Графіки наочно демонструють отримані залежності (рис. 5, 6).

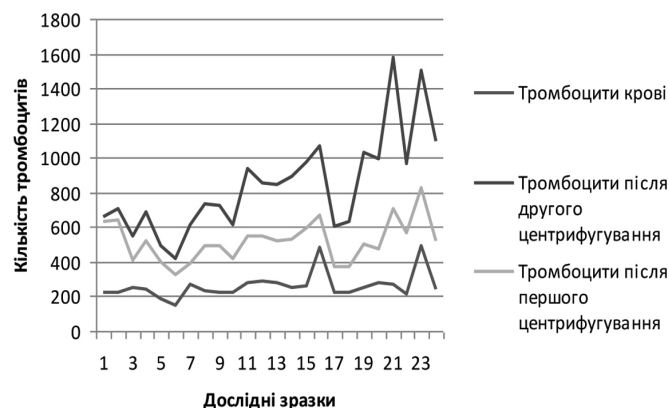


**Рис. 5.** Співвідношення тромбоцитів крові та плазми після двох циклів центрифугування

Згідно з проведеним нами аналізом, усі показники демонструють статистичну достовірність

впливу як часових характеристик, так і прискорення на збагачення плазми тромбоцитами ( $p < 0,05$ ).

Дуже важко оцінити та порівняти якість приготованої плазми, якщо для цього застосовуються абсолютно різні підходи та складові. Перешкоди починаються вже з моменту визначення продукту. Згідно з існуючими системами класифікації, мова йде про рідку форму плазми, а саме її підвиди лейкоцитарну (leucocyte-PRP) та чисту (pure-PRP) [2, 4]. Щодо доцільності застосування обох форм єдиної думки не існує, але більшість авторів віддає перевагу “чистій” плазмі. Які переваги останньої і які проблеми виникають при створенні в звичайних лабораторних умовах та застосуванні в клінічній практиці цих видів PRP? Перш за все, лейкоцити також є джерелом деяких біологічно активних речовин, серед яких найбільше уваги заслуговують інтерлейкіни. IL-1, IL-6, ФНП – це прозапальні цитокіни, які модифікують кінцевий клінічний ефект PRP. Можливо, саме з цим пов'язане виникнення болювого синдрому, наприклад, при локальному внутрішньосуглобовому введенні плазми та його поступове регресування протягом 1-2-3 діб. Найкращим способом зменшення кількості лейкоцитів у кінцевій PRP є використання лейкоцитарних фільтрів, але це значно ускладнює процедуру приготування та є економічно не вигідним.



**Рис. 6.** Співвідношення лейкоцитів крові та плазми після другого циклу центрифугування

При центрифугуванні розподіл часток у пробірці залежить від їх розміру та маси. Саме тому еритроцити концентруються найнижче – біля дна пробірки, займаючи при цьому фактично половину її об'єму. Вище цього шару утворюється тонкий лейкоцитарний прошарок, який ще має назву “buffy coat”. Верхній прошарок – це плазма крові. Залежно від первинного доцентрового прискорення розподіл “потрібних” нам тромбоцитів різний. При невеликій швидкості центрифуги (в межах 100 g) останні, в силу їх малого розміру і маси,

розподіляються практично рівномірно по всьому прошарку плазми. При зростанні прискорення тромбоцити концентруються ближче до лейкоцитарного шару і відповідно до їх малих розмірів та фізіологічних адгезивних властивостей складають разом із лейкоцитами основну масу “buffy coat” [3]. Виходячи лише з цього, для зменшення кількості лейкоцитів у первинній плазмі достатньо застосовувати більш “м’яке” центрифугування з подальшим відбором плазми без лейкоцитарного прошарку. Такий підхід дозволяє також зберегти життєздатність тромбоцитів, попереджуючи їх передчасну дегрануляцію [9]. Зрозуміло, що подібний прийом неможливо застосувати при виготовленні PRP одним циклом швидкісного центрифугування, так як забір плазми тоді здійснюється саме з “buffy coat”. У це дослідження ми не включали підрахунок кількості тих чи інших факторів росту, а також якісної оцінки тромбоцитів, тобто їх життєздатності, при різних швидкостях та тривалості прискорення. Але подібні дослідження, що були проведені раніше, дозволяють вважати одержані нами механізми отримання PRP цілком прийнятними і в плані її якості [9].

Підрахунок тромбоцитів одразу після високошвидкісного другого циклу центрифугування проводити важко в силу тотальної агрегації тромбоцитів на дні пробірки. Щоб уникнути помилок, при цьому необхідно або зачекати певний час ( $\approx$  від 30 хв.), доки тромбоцити ресуспендують у плазму (при цьому плавно обертаючи пробірку декілька разів), або використовувати речовини, які знижують фізіологічну агрегацію тромбоцитів, наприклад PGE1 [5].

Важливим фактором, що впливає практично на усі досліджувані показники, є людський фактор. Намагаючись при первинному та вторинному відборі плазми з пробірок відібрати якомога менше формених елементів, ми інколи відбираємо практично весь лейкоцитарний прошарок і, як видно з останнього графіку, виготовляємо саме лейкоцитарну PRP.

Чи відрізняється будь-яка із запропонованих нами схем приготування збагаченої тромбоцитами плазми від готових комерційних засобів? Дослідження, проведене Tiffany N. Castillo [1] та співавторами для порівняння трьох відомих комерційних систем “Cascade” (MTF), “GPS III” (Biomet) та “Magellan” (Arteriocyte), продемонструвало від 1,06- до 4,1-кратного збільшення кількості тромбоцитів у порівнянні з базовими значеннями. Дві системи також зумовили значне збільшення кількості лейкоцитів у PRP. Як видно, кратність збільшення кількості формених елементів порівняна з нашими показниками навіть від першого циклу центрифугування. Загалом приготування плазми на звичайних центрифугах дає можли-

вість у доволі широкій мірі керувати процесом, у той час як на готових системах цей процес закритий та заздалегідь визначений, а тому і значно простіший для практикуючого лікаря.

## Висновки

Приготування збагаченої тромбоцитами плазми можливе не лише на високошвидкісних спеціальних центрифугах, а й на звичайних лабораторних. Бажана концентрація тромбоцитів досягається за рахунок двостадійної схеми центрифугування. Режим центрифугування повинен підбиратись індивідуально для центрифуг. “М’яке” центрифугування дозволяє виготовляти збагачену тромбоцитами лише за один цикл, хоча з меншим фактичним виходом рідкої частини плазми. Доцентрова швидкість та час центрифугування переважно впливають на кількість плазми в порівнянні з вихідним гематокритом. “М’яке” центрифугування дає можливість зменшити кількість лейкоцитів у кінцевій плазмі, а подовжена тривалість – збільшити вихід рідкої частини плазми. Кількість еритроцитів, зважаючи на їх величину та масу, за будь-яких умов у плазмі є мінімальною.

## Література

1. Castillo T.N. Comparison of Growth Factor and Platelet Concentration From Commercial Platelet-Rich Plasma Separation Systems / T.N. Castillo, M.A. Pouliot, H.J. Kim [et al.]. // The American Journal of Sports Medicine. – 2011. – Vol. 39, № 2. – P. 266–271.
2. DeLong J.M. Platelet-Rich Plasma: The PAW Classification System / J.M. DeLong, R.P. Russell, A.D. Mazzocca // Arthroscopy. – 2012. – Vol. 28, № 7. – P. 998–1009.
3. Dburat R. Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author's Perspective / R. Dburat, M.S. Sukesb // J. Cutan Aesthet Surg. – 2014. – Vol. 7, № 4. – P. 189–197.
4. Doban Ebrenfest D.M. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) / D.M. Doban Ebrenfest, L. Rasmusson, T. Albrektsson // Trends Biotechnol. – 2009. – Vol. 27, № 3. – P. 158–167.
5. Fukaya M. New Economic Method for Preparing Platelet-rich Plasma / M. Fukaya, A. Ito // Reconstr Surg Glob Open. – 2014. – Vol. 2, № 6. – P. 162.
6. Marx R.E. Platelet-rich plasma (PRP): What Is PRP and What Is Not PRP? / R.E. Marx // Implant Dent. – 2001. – № 10. – P. 225–228.
7. Marx R. E. Platelet-rich plasma: Evidence to support its use / R.E. Marx // J. Oral Maxillofac. Surg. – 2004. – № 62. – P. 489–496.
8. Mei-Dan O. Novel Applications of Platelet-Rich Plasma Technology in Musculoskeletal Medicine and Surgery / O. Mei-Dan, M.R. Carmont // Oper. Tech. Orthop. – 2012. – № 22. – P. 56–63.
9. Perez A. Relevant Aspects of Centrifugation Step in the Preparation of Platelet-Rich Plasma / A. Perez, J.F. Lana, A.A. Rodrigues [et al.] // ISRN Hematology. – Vol. 2014. – № 2014.
10. Steimert A.F. Platelet-Rich Plasma in Orthopaedic Surgery and Sports Medicine: Pearls, Pitfalls, and New Trends in Research / A.F. Steimert, K.K. Middleton, P.H. Araujo, F.H. Fu // Oper. Tech. Orthop. – 2012. – № 22. – P. 91–103.

### **THE INFLUENCE OF SPEED AND TIME ACCELERATION FOR THE ENRICHMENT OF PLASMA BY PLATELETS**

*Fishchenko V.O., Rybinskyi M.V., Fishchenko O.V., Nimchyk N.Iu.*

**Summary.** The use of platelet rich plasma in clinical settings require precise algorithm of its receipt by the individual laboratory protocols. The simplest assessments of prepared platelet rich plasma is determined by its possible quantitative characteristics. **Objective:** to study the impact of various centrifugation parameters on quantitative characteristics of plasma. **Materials and methods.** For the study 36 blood samples of 4 ml were centrifuged under different conditions. The determination and comparison of number of platelets, white blood cells, red blood cells and plasma volume were performed to assess the plasma. **Results.** The platelet count in all samples increased by 1.5 – 2.5 times after the first cycle of centrifugation and by 3 - 5 times after the second cycle. The number of leukocytes in all samples was lower from basic value after the first cycle and the lowest after the first cycle lasting 15 minutes. The output of liquid plasma increases with longer and more aggressive initial centrifugation, starting from approximately 48% at 5 minutes and ending by approximately 76% at 15 min at a speed of 1000 rev/min. The number of red blood cells in all samples is minimal. The second centrifugation cycle showed an increase in number of leukocytes in some samples to the limits of basic values. **Conclusions.** The centrifugation by using small revolutions and a short period of time provides a high-quality plasma after the first cycle. The second cycle can increase the platelet count to a desired level due to the greater acceleration.

**Key words:** platelet rich plasma, centrifugation, platelets, leucocytes, growth factors.

### **ВЛИЯНИЕ СКОРОСТИ УСКОРЕНИЯ И ВРЕМЕНИ НА ОБОГАЩЕНИЕ ПЛАЗМЫ ТРОМБОЦИТАМИ**

*Фищенко В.А., Рыбинский М.В., Фищенко А.В., Нимчик Н.Ю.*

**Резюме.** Использование обогащенной тромбоцитами плазмы в клинических условиях требует четкого алгоритма ее получения по индивидуальным лабораторным протоколам. Самая простая оценка готовой PRP (platelet-rich plasma) осуществляется с помощью определения ее возможных количественных характеристик. **Цель.** В исследовании проводится оценка влияния различных параметров центрифугирования на количественные показатели плазмы. **Материалы и методы.** Для исследования использованы 36 образцов крови по 4 мл, которые подлежали центрифугированию при различных условиях. Для оценки плазмы проводилось определение и сравнение количества тромбоцитов, лейкоцитов, эритроцитов и объема плазмы. **Результаты.** Количество тромбоцитов во всех образцах увеличивается в 1,5-2,5 раза после первого цикла центрифугирования, и в 3-5 раз после второго цикла. Количество лейкоцитов во всех образцах меньше базового значения после первого цикла и наименьшее после первого цикла продолжительностью 15 мин. Выход жидкой части плазмы возрастает при более длительном и агрессивном первичном центрифугировании, начиная с ≈48% при 5 мин. и заканчивая ≈76% при 15 мин. на скорости 1000 об/мин. Количество эритроцитов во всех образцах минимальное. Вторым циклом центрифугирования продемонстрировал увеличение количества лейкоцитов в некоторых образцах до границ базовых значений. **Выводы.** Центрифугирование с использованием небольших оборотов и времени позволяет получить качественную плазму уже после первого цикла. Второй цикл позволяет увеличить содержание тромбоцитов до желаемого уровня за счет большего ускорения.

**Ключевые слова:** обогащенная тромбоцитами плазма, центрифугирование, тромбоциты, лейкоциты, факторы роста.