

DOI: 10.26693/jmbs02.03.135

УДК 615.382:612.118

Сулаєва О. Н.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОБИРОК ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БОГАТОЙ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЫ

Украинский научно-практический центр эндокринной хирургии,
трансплантации эндокринных органов и тканей, Киев, Украина

oksana.sulaieva@gmail.com

Целью работы стал анализ соответствия разных вариантов пробирок для получения богатой тромбоцитами плазмы (PRP) критериям безопасности и эффективности. Показано соответствие международным рекомендациям относительно PRP терапии пробирок Endoret BTI, MM Medic и Ycellbio. Плазма, получаемая в гель-содержащих пробирках (RegenLab, Plasmolifting), по количеству тромбоцитов не отличается достоверно от показателя в цельной крови.

Ключевые слова: PRP-терапия, тромбоциты, плазма, пробирки.

Введение. Во всем мире богатая тромбоцитами плазма (PRP) и PRP-терапия прочно вошла в клиническую практику разных сфер медицины [1, 2, 3]. Этот метод занял лидирующие позиции в сфере косметологии и эстетической медицины, позволяя нивелировать возраст-ассоциированные изменения кожи, корректировать изменение геометрии лица, обеспечивая мощное прорегенераторное влияние на разные ткани [1, 3, 4]. В то же время, доказана эффективность применения PRP в сфере стоматологии - для лечения воспалительных и деструктивных заболеваний пародонта, в ортопедии и травматологии – для восстановления структуры и метаболизма суставов, в хирургии – для стимуляции заживления ран разного генеза [5]. Дерматологи, гинекологи, урологи, кардиохирурги и многие другие специалисты успешно применяют PRP терапию в ежедневной практике.

Использование клеточных технологий в клинической практике требует соблюдения определенных требований, принципов и условий, которые гарантируют как минимум два ключевых параметра: безопасность и эффективность лечения [6]. Это выдвигает жесткие требо-

вания к медицинским изделиям, используемым для получения PRP. На сегодняшний день на рынке Украины представлен достаточно широкий спектр пробирок от производителей разных стран. Пробирки отличаются между собой по ряду параметров, включая форму, размер/объем, материал, из которого изготовлена пробирка; антикоагулянт; принцип разделения фракций крови при получении PRP [5]. Между тем, есть ряд совершенно объективных критериев, позволяющих ответить на вопрос о качестве пробирок для получения PRP, безопасности их применения и эффективности.

Целью данной работы стал анализ соответствия разных вариантов пробирок, предназначенных для получения PRP, критериям безопасности и эффективности.

Материалы и методы исследования. В работе проведен анализ 6 видов медицинских изделий (табл. 1), предназначенных для получения PRP, представленных на рынке Украины. Поскольку получаемая в пробирках плазма вводится обратно в организм пациента, в работе не проводили анализ лабораторных пробирок, предназначенных для лабораторных *in vitro* исследования и не предусмотренных для применения в медицинских целях.

На первом этапе в работе был проведен анализ безопасности пробирок, зависящей от ряда

Таблица 1 – Характеристика производителей пробирок для получения PRP

Номер пробирки	Торговая марка	Страна ТМ	Соответствие производства пробирок ISO13485	Цена
Пробирка 1	RegenLab	Швейцария	ДА	Высокая
Пробирка 2	Plasmolifting	РФ	ДА	Низкая
Пробирка 3	PlasmoMed	Италия	?	Низкая
Пробирка 4	MM Медик	Украина	ДА	Низкая
Пробирка 5	Endoret BTI	Испания	ДА	Высокая
Пробирка 6	Ycellbio	Южная Корея	ДА	Высокая

параметров, включаючи якість матеріала, з якого виготовлені компоненти пробірки і доповнювальні речовини, що входять до складу вмісту пробірок, стерильність, герметичність, відсутність токсичних компонентів і пр. Оскільки всі ці параметри визначаються умовами виробництва, критерієм безпеки пробірок вважали відповідність виробництва пробірок ISO13485 і Директиві 93/42, що відображає релевантність пробірок європейським вимогам стосовно медичних виробів, а також відповідність пробірок технічному регламенту в стосунку медичних виробів (з оновленнями від 2016 р.).

Для аналізу ефективності пробірок оцінювали фінальну концентрацію тромбоцитів в виділяемій плазмі та об'єм PRP. Для оцінки цих параметрів використовували кров'яні 12 добровольців (6 чоловіків і 6 жінок, середній вік $40 \pm 0,8$ років). Збір крові здійснювали вранці натощак з локтевої вени. PRP отримували згідно інструкції до пробірок від виробника з використанням центрифуги Labofuge 200 (Німеччина). Для тестування кожного типу пробірок використовували кров'яні мінімум 5 волонтерів. В той же час проводили перехрестну оцінку, передбачаючи використання крові одного добровольця для тестування декількох 3 різних типів пробірок. Концентрацію тромбоцитів оцінювали в цільній крові та в отриманій плазмі. Оцінку кількості тромбоцитів проводили з допомогою гематологічного аналізатора MicroCC 20 (HTI США). Статистичну обробку даних проводили в пакеті MedCalc.

Результати дослідження та їх обговорення.

Як видно з наведених в табл. 1 даних, виробництво більшості пробірок, включених до аналізу, гарантує якість медичних виробів, та безпеку застосування пробірок в регенеративній медицині. Винятком були пробірки № 3, в стосунку яких не були най-

дені достовірні дані, що підтверджують сертифікацію за ISO 13485 та відповідність Директиві 93/42/ЄЕС. При цьому пробірки №1 та №5, що виробляються в країнах Євросоюзу, а також корейські пробірки (№6) мали високу ціну, що перевищує вартість пробірок № 2, 3, 4 в декілька разів.

Аналіз матеріалів та компонентів пробірок (табл. 2) показав, що частину пробірок (№ 1, 2, 3) виготовлено зі скла, матеріал решти пробірок – варіанти медичного пластику, якість якого відповідає вимогам безпеки. Варто зазначити, що оптимальним для роботи з тромбоцитами вважається використання пластику [7]. Це пов'язано з високою адгезивною активністю тромбоцитів, та їх здатністю прилипати до скла. Другим недоліком використання скла як матеріалу для виготовлення пробірок є ризик зміни кольору в процесі стерилізації з використанням γ -випромінювання. Таким чином, з огляду на характеристики матеріалу, з якого виготовлено пробірки, оптимальною відповідністю міжнародним рекомендаціям виявлено для пробірок від BTI, MM Medic та Ycellbio.

До складу більшості пробірок входить антикоагулянт. Винятком була пробірка №6, що не містить доповнювальних компонентів. В разі її використання передбачено додатковий етап – збір крові в окремий шприць, в якому попередньо набирають антикоагулянт. Як антикоагулянти для отримання PRP переважно використовують ACD-A (пробірки RegenLab, Endoret BTI, MM Medic), що відповідає рекомендаціям міжнародного товариства клітинної медицини за застосування PRP. В одній з пробірок (№3) як антикоагулянт використовується цитрат натрію. А в пробірці № 2 – гепарин натрію.

Конструкція пробірок, що забезпечує розділення фракцій крові, дозволила розділити пробірки на 3 групи: 1) прості пробірки (№ 4, 5); 2) пробірки з розділювальним гелем (№ 1, 2, 3); 3) пробірки з фізичним принципом розділення фракцій крові (№ 6) завдяки особливій формі, що полегшує збір плазми. Проведений аналіз кількості тромбоцитів в плазмі, отриманій від добровольців, дозволив виявити ряд цікавих фактів: 1) оцінка кількості тромбоцитів в

Таблиця 2 – Характеристики матеріалів та компонентів пробірок

Види пробірок	Матеріал, з якого виготовлена пробірка	Наявність гелю	Антикоагулянт	Об'єм плазми, що отримується після фракціонування
Пробірка 1	Скло	ТА	ACD-A	4 мл
Пробірка 2	Скло	ТА	Гепарин	4 мл
Пробірка 3	Скло	ТА	Цитрат натрію	4-5 мл
Пробірка 4	Пластик	НІТ	ACD-A	2 мл – PRP, 2 мл- PPP
Пробірка 5	Пластик	НІТ	ACD-A	2 мл – PRP, 2 мл- PPP
Пробірка 6	Пластик	НІТ	НІТ	1 мл – PRP, 3 мл- PPP

цельной крови и плазме разными методами дает сопоставимые результаты, однако в большинстве случаев метод проточной цитометрии оказался более чувствительным; 2) результаты использования пробирок разных групп существенно отличались. При получении PRP в простых пробирках (№4, 5) концентрация тромбоцитов увеличивалась в 4-5 раз, статистически значимо отличаясь от показателя в цельной крови ($p < 0,001$) и достигала оптимального порога – 10^6 тромбоцитов в 1 мкл. В то же время во всех пробирках, содержащих разделительный гель (№1, 2, 3), независимо от производителя и гарантий качества, получаемая плазма содержала низкое количество тромбоцитов, не имевшее достоверных отличий от показателя в цельной крови или даже ниже, соответствуя характеристикам бедной тромбоцитами плазмы PPP (рис.). Максимальной оказалась численность тромбоцитов в плазме, полученной с помощью пробирки № 6 – здесь количество тромбоцитов было в 7-8 раз выше показателя в цельной крови ($p < 0,001$) и превышало показатель, получаемый в простых пробирках ($p < 0,01$). Но при этом объем получаемой PRP составлял всего 1-1,5 мл.

Обсуждение результатов исследования. Как показали результаты исследования, количество тромбоцитов в плазме, выделяемой с помощью разных пробирок, существенно различается. Отчасти это связано с принципами выделения плазмы в разных типах пробирок. Так, в основу фракционирования крови в простых пробирках положен принцип центрифугирования (пробирки № 4 и 5). 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 более высокую концентрацию тромбоцитов, а верхний слой по количеству тромбоцитов соответствует PPP. Использование таких пробирок позволяет использовать более низкое ускорение при центрифугировании, что снижает вероятность спонтанной агрегации тромбоцитов. Однако использо-

вание таких пробирок требует профессиональных навыков врача.

Пробирки с сепарационным гелем (№ 1, 2, 3), обеспечивающим полное разделение крови на фракции и простоту отбора плазмы. Однако существенными недостатками данных пробирок является ограниченное количество тромбоцитов в получаемой плазме. По сути, полученные данные свидетельствуют о связывании 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 как минимум 20% тромбоцитов [5, 7]. И хотя активированная PRP также обладает стимулирующим влиянием на процесс регенерации, ее действие несопоставимо с эффектами PRP [6, 8]. В интерпретации полученных данных важно также помнить о том, что технология получения PRP в пробирках с гелем предусматривает использование более высокого ускорения. Так, если при использовании простых пробирок (BTI и MM Medic) достаточно ускорения 600 G, то при центрифугировании крови в пробирках Plasmolifting и RegenLab ускорение достигает 900 и 1500 G соответственно. Как известно, механическое воздействие (центрифугирование, или так называемая скорость сдвига в условиях *in vivo*) является активатором тромбоцитов [9]. При активации происходит не только агрегация тромбоцитов, но и процесс дегрануляции, сопровождающийся

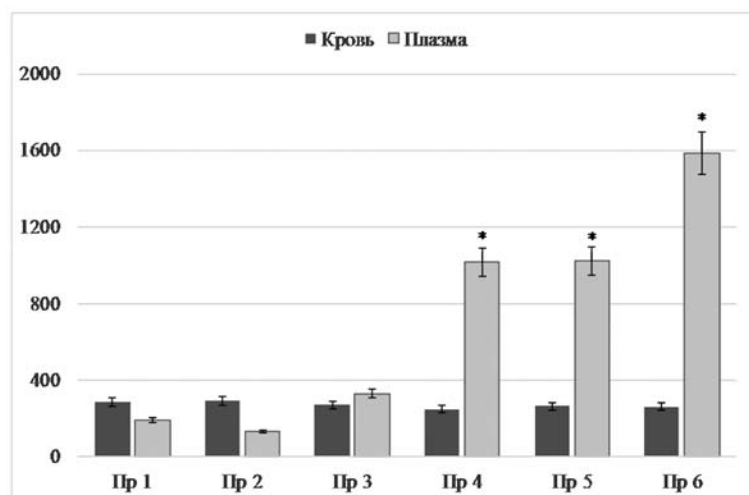


Рис. Количество тромбоцитов в цельной крови и плазме, выделенной с помощью разных видов пробирок

Примечания: По оси абсцисс – виды пробирок (Пр 1 – RegenLab, Пр 2 – Plasmolifting, Пр 3 – Plasmomed, Пр 4 – MM Medic, Пр 5 – Endoret BTI (без введения активатора), Пр 6 – Ycellbio). По оси ординат – абсолютное количество тромбоцитов ($\times 10^6$ в мкл)

освобождением содержимого гранул тромбоцитов. При ускорении 400 G спонтанная активация тромбоцитов составляет 5% [7]. Избыточное ускорение повышает процент активированных тромбоцитов, что сопровождается их преждевременной активацией. Учитывая короткий период полужизни факторов роста, ранняя дегрануляция может быть причиной ограничения эффективности лечения [6]. То есть по факту, пробирки с разделительным гелем, облегчая процедуру отбора плазмы, лишают ее достаточного количества тромбоцитов и их преждевременной активацией.

Пробирки с физическим принципом разделения фракций крови (№ 6) благодаря особой форме, облегчают отбор плазмы. Кроме того, данная пробирка не содержит вакуум, что также 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. Не менее важным фактором для регенеративной медицины является объем получаемой PRP. В пробирках № 6 он составлял всего 1-1,5 мл. Кроме того, нельзя не отметить, что получаемая концентрация тромбоцитов в данных пробирках в 1,5 раза превышала оптимальный для PRP порог, обозначенный как 10^6 тромбоцитов на 1 мкл [8]. Показано, что увеличение количества тромбоцитов в 4-6 раз (до 10^6 в 1 мкл) обеспечивает мощное прорегенераторное действие в сочетании с противовоспалительным эффектом [2, 4]. В PRP с коли-

чеством тромбоцитов в 7-10 раз превышающем базальный показатель в крови, зарегистрировано появление провоспалительных эффектов. Кроме того, ряд авторов указывает, что при очень высокой концентрации тромбоцитов возможен также процесс аутоактивации и парадоксальный ингибирующий эффект PRP [9].

Выводы. 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.

1. По техническим характеристикам (сертификация, материал, компоненты, протокол выделения) максимальное соответствие Европейским рекомендациям относительно PRP терапии выявлено для пробирок от BTI, MM Medic, Ycellbio. Стоимость пробирок не отражалась на характеристиках получаемой плазмы.
2. PRP с адекватным количеством тромбоцитов можно получить с использованием простых пробирок (MM Medic, BTI).
3. Использование пробирок с особой конфигурацией (Ycellbio) облегчало отбор плазмы, но количество тромбоцитов в ней было избыточным. Недостатком этого вида пробирок является также открытость системы и риск контаминации биоматериала.
4. Применение гель-содержащих пробирок (RegenLab, Plasmolifting) не позволяет получить PRP - количество тромбоцитов в плазме, фракционированной с помощью гель-содержащих пробирок, не отличается статистически значимо от показателя в цельной крови.

Перспективы дальнейших исследований. Стандартизация требований и технологии выделения PRP позволит гарантировать эффективность проводимой PRP-терапии.

References

1. Agrawal A. A. Evolution, current status and advances in application of platelet concentrate in periodontics and implantology. *World J Clin Cases*. 2017; 5 (5): 159–71. DOI: 10.12998/wjcc.v5.i5.159.
2. Dhurat R, Sukesh MS. Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author's Perspective. *J Cutan Aesthet Surg*. 2014; 7 (4): 189–97. DOI: 10.4103/0974-2077.150734.
3. Kushida S, Kakudo N, Morimoto N, Hara T, Ogawa T, Mitsui T, Kusumoto K. Platelet and growth factor concentrations in activated platelet-rich plasma: a comparison of seven commercial separation systems. *J Artif Organs*. 2014; 17 (2): 186-92. DOI: 10.1007/s10047-014-0761-5.
4. Martinez-Zapata MJ, Martí-Carvajal AJ, Solà I, Expósito JA, Bolívar I, Rodríguez L, Garcia J, Zaror C. Autologous platelet-rich plasma for treating chronic wounds. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016; 25 (5): CD006899. DOI: 10.1002/14651858.CD006899.pub3.
5. Perez AGM, Lana SD, Rodrigues AA, Luzo ACM, Belangero WD, Santana MHA. Relevant Aspects of Centrifugation Step in the Preparation of Platelet-Rich Plasma. *ISRN Hematol*. 2014; 2014: 176060. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/176060>.
6. Platelet Rich Plasma (PRP) Guidelines, © International Cellular Medicine Society - 2011. Available from: <http://www.cellmedsociety.org>.
7. Sister D. *PRP: the new frontier in regenerative medicine and aesthetic medicine*. Firenze; 2016. 158 p.

8. Ehrenfest DM, Andia I, Zumstein MA, Zhang CQ, Pinto NR, Bielecki T. 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. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2014; 4 (1): 3–9.
9. Jubert JN, Rodríguez L, Reverté-Vinaixa MM, Navarro A. Platelet-Rich Plasma Injections for Advanced Knee Osteoarthritis: A Prospective, Randomized, Double-Blinded Clinical Trial. *Orthop J Sports Med.* 2017; 5 (2): 2325967116689386. DOI: 10.1177/2325967116689386.

УДК 615.382:612.118

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОБІРОК ДЛЯ ОТРИМАННЯ БАГАТОЮ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМИ

Сулаєва О. М.

Резюме. Метою роботи став аналіз відповідності різних варіантів пробірок для отримання багатої тромбоцитами плазми (PRP) критеріям безпеки та ефективності. Показано відповідність міжнародним рекомендаціям щодо PRP терапії пробірок Endoret BTI, MM Medic і Ycellbio. Плазма, що отримується в пробірках що містять гель (RegenLab, Plasmolifting), за кількістю тромбоцитів не відрізняється вірогідно від показника в цільній крові.

Ключові слова: PRP-терапія, тромбоцити, плазма, пробірки.

UDC 615.382:612.118

Comparative Analysis of the Tubes for Obtaining Platelet Enriched Plasma

Sulaieva O. N.

Abstract. Platelet enriched plasma is considered as one of the best ways to stimulate tissue repair and age associated changes correction. The widespread use of PRP therapy in various fields of medicine requires compliance with the requirements for medical devices which are used to obtain PRP. The purpose of the article is to examine the compliance of different types of PRP-tubes in terms of safety and efficacy criteria. Six types of tubes that are available in Ukrainian market were analyzed: Endoret (BTI), Plasmolifting, RegenLab, MM Medic, Plasmomed and Ycellbio. According to the construction and protocol of PRP obtaining these tubes were subdivided into 3 groups: 1) simple tubes (BTI and MM Medic) that include only anticoagulant, 2) tubes with separating gel (Plasmolifting and RegenLab) and 3) tubes with a special construction facilitating PRP isolation. The following characteristics were taken into account during the study: the material from which the tubes were made, tube's components, type of anticoagulant, centrifugation protocol, and platelets count in plasma. The highest compliance with the international recommendations for PRP-therapy was shown for Endoret (BTI), MM Medic and Ycellbio tubes. PRP with an optimal count of platelets (1 million per mkl) can be obtained with simple tubes (MM Medic, Endoret BTI). Using tubes with a special configuration (Ycellbio) facilitated the selection of plasma, but number of platelets in PRP was excessive. One more disadvantage of this type of tubes is the systems openness and the risk of contamination of the biomaterial. The plasma obtained with gel-containing tubes (RegenLab, Plasmolifting) does not differ significantly from the whole blood in terms of platelets count blood. In addition, the presence of gel requires the increase of centrifugation acceleration that could lead to spontaneous activation of platelets. Standardization of PRP obtaining characteristics will be useful for further development of regenerative medicine technologies.

Keywords: PRP-therapy, platelets, plasma, test tubes.

Стаття надійшла 16.08.2017 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування