

УДК 611.018.52-54:612.118.2

В. В. Петрушенко, Д. І. Гребенюк, Г. Г. Назарчук, В. В. Мосьондз

Оцінка ефективності різних режимів подвійного центрифугування для отримання чистої збагаченої тромбоцитами плазми

Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, Україна

Paediatric Surgery(Ukraine).2022.3(76):27-35; doi 10.15574/PS.2022.76.27

For citation: Petrushenko VV, Grebeniuk DI, Nazarchuk HH, Mosondz VV. (2022). Evaluation of effectiveness of different regiments of centrifugation for a double-spin method of pure platelet-rich plasma preparation. Paediatric Surgery (Ukraine). 3 (76): 27-35. doi: 10.15574/PS.2022.76.27.

Мета – визначити оптимальні параметри подвійного центрифугування для приготування чистої збагаченої тромбоцитами плазми з максимальною редукцією інших клітинних елементів крові.

Матеріали та методи. До дослідження залучили 30 умовно здорових осіб віком від 18 до 60 років, у яких проводили забір венозної крові. Перше центрифугування всіх зразків крові проводили у режимі 160 g × 10 хв. Друге центрифугування проводили у 12 різних режимах: 190 g × 10 хв, 190 g × 15 хв, 220 g × 10 хв, 220 g × 15 хв, 250 g × 10 хв, 250 g × 15 хв, 290 g × 10 хв, 290 g × 15 хв, 320 g × 10 хв, 320 g × 15 хв, 360 g × 10 хв, 360 g × 15 хв. Визначали кількість еритроцитів, лейкоцитів, тромбоцитів (у цільній крові, а також після першого та другого центрифугування), показники ефективності збереження тромбоцитів, коефіцієнт збагачення тромбоцитами, ефективність редукції еритроцитів та лейкоцитів, концентрацію основних факторів росту в плазмі після другого центрифугування.

Результати. У цільній крові концентрація еритроцитів становила $4,455 \pm 0,301 \times 10^{12}/л$, лейкоцитів – $6,485 \pm 0,501 \times 10^9/л$, тромбоцитів – $281,5 \pm 22,7 \times 10^9/л$. Після першого центрифугування об'єм отриманої плазми, що містить тромбоцити, складав $4,51 \pm 0,25$ мл, кількість тромбоцитів – $482,1 \pm 47,4 \times 10^9 /л$, при показниках редукції тромбоцитів $14,39 \pm 1,1\%$, їх збереженні – $85,6 \pm 1,1\%$ та коефіцієнті збагачення – $1,71 \pm 0,1$; кількість еритроцитів становила $0,104 \pm 0,006 \times 10^{12} /л$, лейкоцитів – $0,205 \pm 0,025 \times 10^9 /л$, а показники їх редукції – $98,83 \pm 0,09\%$ та $98,42 \pm 0,14\%$ відповідно. Після другого центрифугування в різних режимах найефективнішим виявився режим 250 g × 15 хв, який дав змогу досягти коефіцієнта збагачення тромбоцитами близько 4,93 при концентрації в кінцевому продукті тромбоцитів $1386,7 \pm 116,5 \times 10^9/л$, ефективності їх захоплення у $82,1 \pm 1,1\%$ та редукції еритроцитів і лейкоцитів $98,86 \pm 0,08\%$ та $98,45 \pm 0,14\%$ відповідно.

Висновки. При подвійному центрифугуванні для приготування чистої збагаченої тромбоцитами плазми найефективнішим є послідовне поєднання режимів 160 g × 10 хв та 250 g × 15 хв.

Дослідження виконано відповідно до принципів Гельсінської декларації. Протокол дослідження ухвалено Локальним етичним комітетом зазначеної в роботі установи. На проведення досліджень отримано інформовану згоду пацієнтів.

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Ключові слова: плазма, збагачена тромбоцитами, плазма, що містить тромбоцити, подвійне центрифугування.

Evaluation of effectiveness of different regiments of centrifugation for a double-spin method of pure platelet-rich plasma preparation

V. V. Petrushenko, D. I. Grebeniuk, H. H. Nazarchuk, V. V. Mosondz

National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya, Ukraine

Purpose – to determine the optimal parameters of double centrifugation in the preparation of pure platelet-rich plasma with a maximum reduction of other blood cellular elements.

Materials and methods. The study included 30 apparently healthy individuals aged 18 to 60 years who underwent venous blood sampling. The first centrifugation of all blood samples was performed in the 160 g × 10 min mode. The second centrifugation was performed in 12 dif-

Оригінальні дослідження. Загальна хірургія

ferent modes: 190 g × 10 min, 190 g × 15 min, 220 g × 10 min, 220 g × 15 min, 250 g × 10 min, 250 g × 15 min, 290 g × 10 min, 290 g × 15 min, 320 g × 10 min, 320 g × 15 min, 360 g × 10 min, 360 g × 15 min. The number of erythrocytes, leukocytes, platelets (in whole blood, after the first and second centrifugation), platelet capture efficiency, platelet enrichment factor, erythrocytes and leukocytes reduction efficiency, concentration of major growth factors in plasma after the second centrifugation were determined.

Results. In whole blood, the concentration of erythrocytes was $4.455 \pm 0.301 \times 10^{12}/l$, leukocytes – $6.485 \pm 0.501 \times 10^9/l$, platelets – $281.5 \pm 22.7 \times 10^9/l$. After the first centrifugation, the volume of the obtained plasma containing platelets was 4.51 ± 0.25 ml, the number of platelets was $482.1 \pm 47.4 \times 10^9/l$, with platelet reduction rates of $14.39 \pm 1.1\%$, their preservation – $85.6 \pm 1.1\%$ and enrichment factor – 1.71 ± 0.1 ; the number of erythrocytes was $0.104 \pm 0.006 \times 10^{12}/l$, leukocytes – $0.205 \pm 0.025 \times 10^9/l$, and their reduction efficiency – $98.83 \pm 0.09\%$ and $98.42 \pm 0.14\%$, respectively. After the second centrifugation in different modes, the 250 g × 15 min mode turned out to be the most effective, which made it possible to achieve a platelet enrichment factor of about 4.93 with a concentration of platelets in the final product of $1386.7 \pm 116.5 \times 10^9/l$, their capture efficiency of $82.1 \pm 1.1\%$ and erythrocytes and leukocytes reduction efficiency of $98.86 \pm 0.08\%$ and $98.45 \pm 0.14\%$, respectively.

Conclusions. In case of double-spin centrifugation, the sequential combination of 160 g × 10 min and 250 g × 15 min regimens is most effective for the preparation of pure platelet-rich plasma.

The research was carried out in accordance with the principles of the Helsinki Declaration. The study protocol was approved by the Local Ethics Committee of all participating institutions. The informed consent of the patient was obtained for conducting the studies.

No conflict of interests was declared by the authors.

Keywords: platelet-rich plasma, plasma containing platelets, double-spin centrifugation.

Вступ

За даними Американського Червоного Хреста, плазмою, збагаченою тромбоцитами (Platelet-rich plasma, PRP), вважається фракція крові, у якій містяться тромбоцити в концентрації принаймні $5,5 \times 10^{10}$ на 50 мл [6,14]. Враховуючи, що нормальна кількість тромбоцитів, за різними даними, варіює від 150 до 450×10^9 на літр, концентрація тромбоцитів у кінцевому продукті має бути збільшена в 2–7 разів порівняно з цільною кров'ю.

На цей час у науковій літературі можна знайти величезну кількість досліджень, спрямованих на розробку та оптимізацію протоколів для обробки цільної крові з метою отримання плазми, збагаченої тромбоцитами [2,5–7,12,14,15,17,21,24]. Серед усього різноманіття досліджень можна знайти наукові роботи, у яких вивчали способи обробки крові як людини, так і тварини. Дослідження різняться також використанням обладнання – у ряді досліджень застосовували звичайні пробірки, тоді як в інших – комерціалізовані системи. Крім того, відомі протоколи приготування плазми, збагаченої тромбоцитами, характеризуються не лише різними параметрами центрифугування, але й кратністю самого центрифугування.

Основними параметрами режиму центрифугування є відносна центробіжна сила (RCF) і час центрифугування [20]. Недоліком ряду досліджень є наведення в методології центрифугування не відносної центробіжної сили, а швидкості центрифугування (Revolutions per minute, RPM), вираженої в обертах на хвилину. При цьому дослідники не вказують значення ротаційного радіусу ротора центрифуги, без яких не можна здійснити перерахунок швидкості

центрифугування у відносну центробіжну силу, а отже, й використати цю методику із застосуванням центрифуг інших моделей.

Слід зазначити, що наведені вище дослідження також різнилися й характеристиками кінцевого продукту. Так, кінцевий продукт міг позиціонуватися, як чиста або лейкоцитвмісна плазма, збагачена тромбоцитами. У деяких дослідженнях взагалі не зазначали параметри вмісту інших формених елементів крові у кінцевому продукті, хоча саме така характеристика суттєво впливає на результати клінічного застосування плазми, збагаченої тромбоцитами.

Загальний об'єм еритроцитів у цільній крові (гематокрит) становить 42–52% для чоловіків і 37–47% для жінок [4]. Саме тому від ступеня очищення кінцевого продукту від еритроцитів залежить не лише загальний його об'єм, але й коефіцієнт його збагачення тромбоцитами порівняно з цільною кров'ю.

Щодо лейкоцитів, то саме в цих клітинних елементах містяться медіатори запалення, які локально вивільняються після клінічного застосування лейкоцитвмісної плазми, збагаченої тромбоцитами. Вивільнення прозапальних цитокінів активує сигнальний NF-κB та може ініціювати або підтримувати запальний процес [10,22,23]. Такий ефект може мати позитивні наслідки в лікуванні гострих процесів на початкових стадіях, коли запалення є важливим етапом процесу загоєння, проте є небажаним на пізніх стадіях [18]. Доведено, що на пізніших термінах лейкоцити створюють негативний вплив на стовбурові клітини, пригнічуючи їх проліферацію, знижуючи рівні факторів росту, підвищуючи концентрацію катаболічних цитокінів та індуюючи апоптоз [25].

З іншого боку, хоча лейкоцити й беруть участь в імунній відповіді, проте їх наявність або відсутність у плазмі, збагаченій тромбоцитами, не впливає на її антимікробні властивості [11]. Так, сучасні дані свідчать про те, що тромбоцити беруть участь у протимікробному захисті через їх здатність вивільняти потужні протимікробні пептиди зі своїх альфа-гранул [3,9,19]. У ряді досліджень показано, що ці пептиди володіють антимікробною активністю широкого спектра проти грамнегативних, грампозитивних і грибкових патогенів.

Наявність великої кількості несистематизованих літературних даних, які інколи суперечать одні одним, спонукала нас до дослідження різних режимів центрифугування з метою приготування високоочищеної від інших клітинних елементів плазми, збагаченої тромбоцитами.

Наше попереднє дослідження [17] присвячено вивченню ефективності різних режимів одинарного центрифугування для максимального концентрування тромбоцитів в отриманій плазмі з одночасною максимальною редукцією інших клітинних елементів. Як показано, найбільшу ефективність з усіх досліджуваних мав режим 160 g × 10 хв, який дає змогу досягти коефіцієнта збагачення тромбоцитами близько 1,71 при концентрації тромбоцитів $483,6 \pm 45,4 \times 10^9/\text{л}$, ефективності захоплення тромбоцитів у $85,7 \pm 0,1\%$ та редукції еритроцитів і лейкоцитів $98,76 \pm 0,09\%$ та $98,46 \pm 0,14$ відповідно. За своїми характеристиками кінцевий продукт не можна було розцінювати, як плазму, збагачену тромбоцитами, а тому ми його позиціонували, як плазму, що містить тромбоцити (Platelet-containing plasma, PCP). Отриманий кінцевий продукт був досить добре очищений від інших клітинних елементів та потенційно міг бути концентрований до характеристик плазми, збагаченої тромбоцитами шляхом другого центрифугування.

Мета дослідження – визначити оптимальні параметри подвійного центрифугування для приготування чистої збагаченої тромбоцитами плазми з максимальною редукцією інших клітинних елементів крові.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження є фрагментом науково-дослідної роботи «Розробка та впровадження інноваційних технологій у лікування та профілактику кровотеч із варикозно розширених вен стравоходу», державний реєстраційний номер – 0120U101363.

Перспективне дослідження виконано на кафедрі ендоскопічної та серцево-судинної хірургії Вінницького національного медичного університету імені

М. І. Пирогова на базі клінічного високоспеціалізованого Центру серцево-судинної хірургії та рентгенендоваскулярної хірургії з блоком інтенсивної терапії Вінницької обласної клінічної лікарні імені М. І. Пирогова.

Дослідження затверджено Комітетом з біоетики Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова (протокол №3 від 25.03.2021) та Комісією з питань етики при Вінницькій обласній клінічній лікарні імені М. І. Пирогова (рішення №01–5–02/103 від 07.06.2021). Відповідно до їх висновку, матеріали дослідження не суперечать основним біоетичним нормам Гельсінської декларації, прийнятої Генеральною асамблеєю Всесвітньої медичної асоціації, Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину (1977 р.), відповідним положенням Всесвітньої організації охорони здоров'я, Міжнародної ради медичних наукових товариств, Міжнародного кодексу медичної етики (1983 р.), Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментах та інших наукових цілях, від 18.03.1986, Директиви ЄС №609 від 24.11.1986 і наказу Міністерства охорони здоров'я України №281 від 01.11.2000.

До дослідження залучено 30 умовно здорових осіб віком від 18 до 60 років ($36,9 \pm 11,2$ року). Жінок та чоловіків у цьому контингенті було порівну – по 15 (50%) осіб.

Усі особи, залучені до цього дослідження, попередньо взяли участь у дослідженні, присвяченому вивченню ефективності різних режимів одинарного центрифугування для максимального концентрування тромбоцитів в отриманій плазмі з одночасною максимальною редукцією інших клітинних елементів [17].

Критерії залучення до дослідження:

1. Згода потенційного учасника на участь у дослідженні.
2. Вік від 18 до 60 років.
3. Відсутність на момент залучення до дослідження ургентних станів.
4. Відсутність у потенційних учасників дослідження відомих з анамнезу хронічних захворювань, у тому числі в стані стійкої ремісії.
5. Дотримання потенційними учасниками протягом 7 діб перед початком дослідження запропонованого питного режиму із вживанням не менше 1,5 л рідини на добу.
6. У жінок дослідження повинно було проводитися в період між принаймні 8 днем після закінчення останньої менструації та початком наступного менструального циклу.

Оригінальні дослідження. Загальна хірургія

7. Відсутність застосування лікарських препаратів, що впливають на якісні та кількісні характеристики крові, протягом принаймні 21 доби перед дослідженням.

Критерій вилучення з дослідження:

1. Відмова від участі в дослідженні.
2. Недотримання потенційними учасниками протягом 7 діб перед початком дослідження запропонованого питного режиму із вживанням не менше 1,5 л рідини на добу.
3. Вилучалися з дослідження жінки, у яких менструація розпочиналася раніше терміну, а дослідження припадало на власне період менструації або наступні 8 днів.
4. Наявність патологічних змін із боку крові за результатами проведеного дослідження.

У плануванні дослідження перевагу віддавали моделі з одним донором, оскільки вона дає змогу отримати достовірніші результати.

У дослідженні використано центрифугу «СМ-3М» («MICROmed», Україна) із можливістю встановлення швидкості центрифугування в обертах на хвилину з кроком 100 об./хв та ротаційним радіусом ротора 10,0 см.

Як зазначалося раніше, основними параметрами режиму центрифугування є відносна центробіжна сила і час центрифугування.

Відповідно до результатів попереднього дослідження, перше центрифугування всіх зразків крові виконано в режимі 160 g × 10 хв [17].

Відповідно до мети дослідження, друге центрифугування мало призводити до максимального осідання тромбоцитів у нижньому шарі плазми. Так як раніше нами показано, найбільша редукція (осідання) тромбоцитів (29,44±0,09%) була за використання режиму 190 g × 15 хв, тому вирішено розпочинати дослідження з використання відносної центробіжної сили в 190 g із наступним її збільшенням до 400 g. Верхня межа відносної центробіжної сили в 400 g обрана у зв'язку з тим, що дослідження О. Bausset та співавторів [1] показало, що центрифугування із RCF, рівною або більшою за 400 g, порушує функціональність тромбоцитів – тромбоцити продовжують зберігати прокоагулянтну активність, проте час формування згортка крові є достовірно меншим, ніж при центрифугуванні із RCF, меншою за 400 g.

Час центрифугування 5 хв, 10 хв і 15 хв найчастіше описано в літературі, проте, за результатами попереднього дослідження, тривалість 5 хв є недостатньою для виконання поставлених завдань незалежно від значень відносної центробіжної сили.

Тому в цьому дослідженні центрифугування вирішено здійснювати протягом 10 хв і 15 хв.

Перерахунок швидкості центрифугування у RCF здійснено за формулою:

$$RCF = 11.18 \times r \times \left(\frac{RPM}{1000} \right)^2,$$

де r – ротаційний радіус ротора в сантиметрах;
RPM – швидкість центрифугування в об./хв.

Отже, загалом досліджено 12 режимів центрифугування: 190 g × 10 хв, 190 g × 15 хв, 220 g × 10 хв, 220 g × 15 хв, 250 g × 10 хв, 250 g × 15 хв, 290 g × 10 хв, 290 g × 15 хв, 320 g × 10 хв, 320 g × 15 хв, 360 g × 10 хв, 360 g × 15 хв.

Для вивчення характеристик отриманої в різних режимах центрифугування плазми, що містить тромбоцити, у кожного учасника дослідження проведено забір 126 мл крові у 14 вакуумних пробірок «Vacutest®» («КІМА», Італія) об'ємом 9 мл кожна, які містили гепарин натрію з розрахунку 17 МО на 1 мл крові (153 МО на одну пробірку). Забір крові виконано з кубітальної вени з використанням голок калібру 21G (Ø 0,8×25 mm) для взяття кількох проб крові за одну процедуру і тримачів для забору крові у вакуумні пробірки («КІМА», Італія).

Для уникнення технічних помилок індивідуального характеру всі процедури виконано одним спеціалістом.

Після забору крові одну пробірку з цільною кров'ю відправлено на повне гематологічне дослідження для визначення основних гематологічних показників власне для нашого дослідження (кількість еритроцитів, лейкоцитів, тромбоцитів) і можливого виявлення прихованих захворювань, що проявляються змінами з боку кількісного та якісного складу крові.

Усі гематологічні дослідження виконано на апараті «BC-6000» («Mindray», США).

Решту 13 пробірок зі зразками крові піддано першому центрифугуванню в режимі 160 g × 10 хв. Після першого центрифугування вміст пробірки розділено на три шари – верхній (плазма, що містить тромбоцити), проміжний (так званий «buffy coat», або плазма, що містить лейкоцити та тромбоцити, які не сепаруються одні від інших), та нижній (еритроцити). Верхній шар за допомогою одноканального піпеткового дозатора перемінного (від 1 мл до 10 мл) об'єму («Thermo Scientific», США) поміщено у вакуумні пробірки «Vacutest®» («КІМА», Італія) без наповнювача об'ємом 9 мл кожна. При цьому фіксовано показники дозатора для визначення об'єму отриманої плазми, що містить тромбоцити.

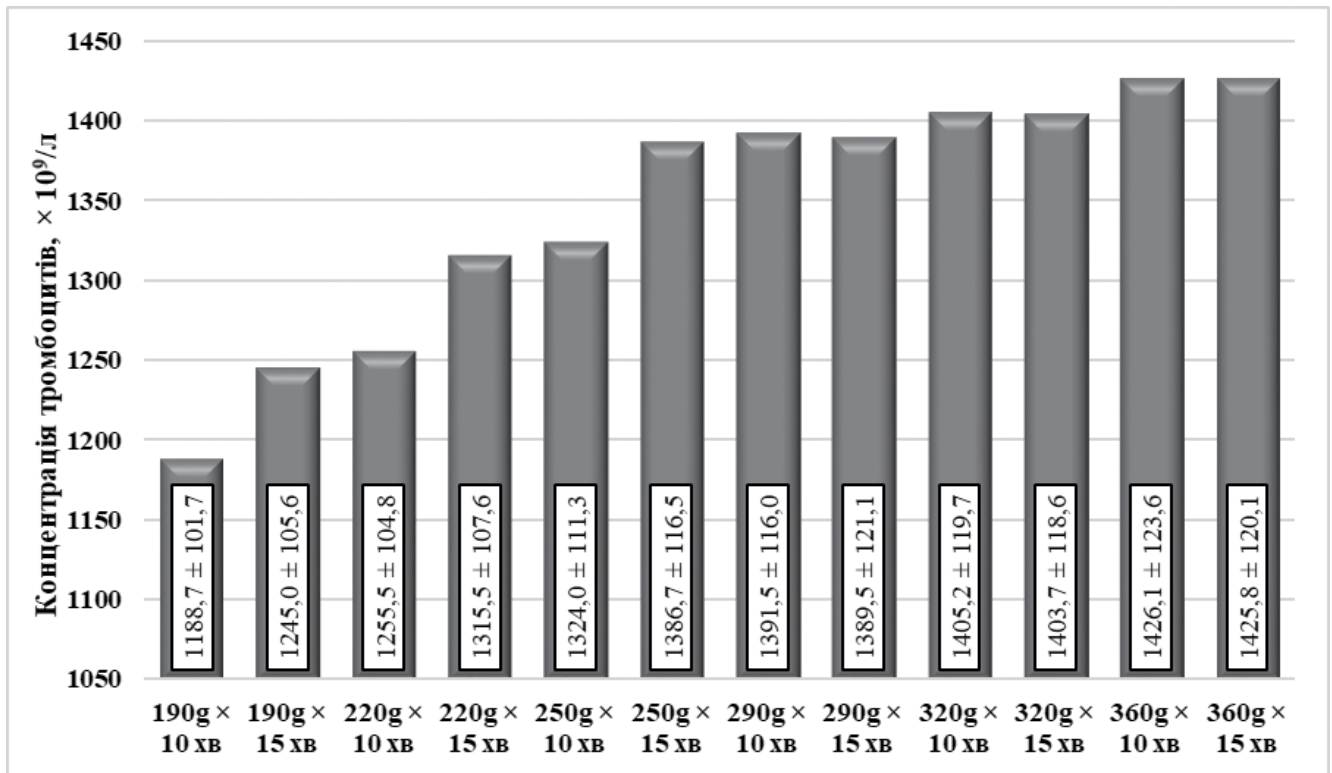


Рис. 1. Концентрація тромбоцитів у плазмі, отриманій при другому центрифугуванні в різних режимах

Одну пробірку відправлено на часткове гематологічне дослідження (кількість еритроцитів, лейкоцитів, тромбоцитів).

Решту 12 пробірок піддано другому центрифугуванню відповідно до параметрів, наведених вище. Після центрифугування за допомогою дозатора відібрано верхню частину вмісту пробірки до залишкового об'єму в 1,5 мл. Пробірку із залишковим вмістом збовтано для рівномірного розподілу осілих клітинних елементів у плазмі. Усі пробірки відправлено на часткове гематологічне дослідження (кількість еритроцитів, лейкоцитів, тромбоцитів).

Для оцінки ефективності різних режимів центрифугування, крім кількості основних клітинних елементів, вивчено такі показники, як ефективність збереження тромбоцитів (Platelet capture efficiency, PCE, %), коефіцієнт збагачення тромбоцитами (Platelet enrichment factor, PEF), ефективність редукції еритроцитів (Erythrocyte-reducing efficiencies, ERE, %) та ефективність редукції лейкоцитів (Leukocyte-reducing efficiencies, LRE, %).

Ці показники обраховано за такими формулами.

$$PCE = \frac{V_{PCP} \times C_{Platelet_in_PCP}}{V_{Whole_blood} \times C_{Platelet_in_Whole_blood}} ;$$

$$PEF = \frac{C_{Platelet_in_PCP}}{C_{Platelet_in_Whole_blood}} ;$$

$$ERE = 100 - \frac{V_{PCP} \times C_{Leucocyte_in_PCP}}{V_{Whole_blood} \times C_{Leucocyte_in_Whole_blood}} ;$$

$$LRE = 100 - \frac{V_{PCP} \times C_{Erythrocyte_in_PCP}}{V_{Whole_blood} \times C_{Erythrocyte_in_Whole_blood}} ;$$

де V – об'єм відповідного компонента, зазначеного в індексі, мл;

C – концентрація зазначеного в індексі відповідного клітинного елемента в цільній крові або плазмі, що містить тромбоцити, виражена в одиницях SI (Système international d'unités).

Крім того, у зразках отриманої після другого центрифугування плазми крові 7 випадкових донорів із досліджуваного контингенту досліджено концентрацію основних факторів росту, що містяться в альфа-гранулах тромбоцитів, – тромбоцитарний фактор росту (Platelet-derived growth factor AA, PDGF-AA), фактор росту ендотелію судин (Vascular endothelial growth factor, VEGF), трансформуючий фактор росту бета 1 (Transforming growth factor beta, TGF-β1), епідермальний фактор росту (Epidermal growth factor, EGF). Для дослідження виконано активацію тромбоцитів шляхом додавання 10% CaCl₂ (фінальна концентрація – 22,8 мМоль) із наступною інкубацією при 37°C протягом 2 год [24]. Концентрацію факторів росту досліджено шляхом імуоферментного аналізу з використанням наборів

Оригінальні дослідження. Загальна хірургія

«Human PDGF-AA ELISA kit», «Human VEGF ELISA Kit», «Human TGF- β 1 ELISA Kit» та «Human EGF ELISA Kit» («CUSABIO», Китай).

Отримані дані піддано статистичній обробці з використанням пакету програм «IBM SPSS 20.0 for Windows». Числові результати представлено у вигляді середнього значення \pm стандартне відхилення. Незалежні вибірки порівняно з використанням t-тесту Student. Для порівняння різних режимів центрифугування використано однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) з поправкою Bonferoni-Sidak.

Результати дослідження та їх обговорення

За результатами гематологічного аналізу досліджуваних зразків цільної крові, концентрація еритроцитів становила $4,455 \pm 0,301 \times 10^{12}/\text{л}$, лейкоцитів – $6,485 \pm 0,501 \times 10^9/\text{л}$, тромбоцитів – $281,5 \pm 22,7 \times 10^9/\text{л}$, що відповідало референтним значенням.

Після першого центрифугування об'єм отриманої плазми, що містить тромбоцити, складав $4,51 \pm 0,25$ мл. Кількість тромбоцитів становила $482,1 \pm 47,4 \times 10^9/\text{л}$, при показниках редукції тромбоцитів $14,39 \pm 1,1\%$, збереження – $85,6 \pm 1,1\%$, коефіцієнті збагачення – $1,71 \pm 0,1$. Кількість еритроцитів дорівнювала $0,104 \pm 0,006 \times 10^{12}/\text{л}$, лейкоцитів – $0,205 \pm 0,025 \times 10^9/\text{л}$, а показники їх редукції – $98,83 \pm 0,09\%$ і $98,42 \pm 0,14\%$ відповідно.

Концентрації тромбоцитів у плазмі, отриманій при другому центрифугуванні в різних режимах, наведено на рис. 1.

При вивченні концентрації тромбоцитів в отриманих зразках досліджуваної фракції крові відмічалось прогресивне збільшення їх концентрації зі збільшенням поєднання відносної центробіжної сили та часу центрифугування. За цим показником режими від $190 \text{ g} \times 10 \text{ хв}$ до $250 \text{ g} \times 10 \text{ хв}$ достовірно ($p < 0,05$) відрізнялися не лише один від одного при попарному порівнянні, але й від режимів від $250 \text{ g} \times 15 \text{ хв}$ до $360 \text{ g} \times 15 \text{ хв}$, тоді як останні достовірно не різнилися між собою ($p > 0,05$). При цьому в режимах від $250 \text{ g} \times 15 \text{ хв}$ до $360 \text{ g} \times 15 \text{ хв}$ зберігалася тенденція до збільшення числових значень концентрації тромбоцитів.

Крім того, слід зазначити, що за показниками концентрації тромбоцитів усі зразки досліджуваної фракції крові можна було класифікувати як плазму, збагачену тромбоцитами [6,14].

Щодо ефективності захоплення тромбоцитів, то практично всі режими центрифугування дали змогу отримати достовірно відмінні від інших значення цього показника в досліджуваній фракції кро-

ві ($p < 0,001$). Виняток становили режими з однаковою відносною центробіжною силою, але різним часом центрифугування ($p > 0,05$). Числові значення цього показника були в межах від $84,4 \pm 1,1\%$ до $70,4 \pm 1,1\%$.

Щодо коефіцієнта збагачення тромбоцитами, то, аналогічно до ефективності захоплення тромбоцитів, практично всі режими центрифугування дали змогу отримати достовірно відмінні від інших значення цього показника в досліджуваній фракції крові ($p < 0,001$). Виняток становили режими з однаковою відносною центробіжною силою, але різним часом центрифугування ($p > 0,05$). Числові значення цього показника були в межах від $4,22 \pm 0,07$ до $5,06 \pm 0,06$.

При вивченні концентрації еритроцитів в отриманих зразках досліджуваної фракції крові показники коливалися в незначних межах – від $0,303 \pm 0,009 \times 10^{12}/\text{л}$ до $0,307 \pm 0,008 \times 10^{12}/\text{л}$, при цьому жодних статистично достовірних залежностей між ними не виявлено ($p > 0,05$).

При вивченні концентрації лейкоцитів в отриманих зразках досліджуваної фракції крові показники коливалися в незначних межах – від $0,597 \pm 0,071 \times 10^9/\text{л}$ до $0,606 \pm 0,072 \times 10^9/\text{л}$, при цьому жодних статистично достовірних залежностей між ними не виявлено ($p > 0,05$).

Незважаючи на достовірне ($p < 0,001$) збільшення концентрації еритроцитів та лейкоцитів відносно показників у зразках фракції крові, отриманої після першого центрифугування, показники їх редукції практично не змінювалися та коливалися в межах від $98,86 \pm 0,09\%$ до $98,85 \pm 0,08\%$ для еритроцитів та від $98,47 \pm 0,14\%$ до $98,44 \pm 0,13\%$ для лейкоцитів. Відсутність змін показників редукції цих формених елементів крові пояснюється практично повним їх осіданням у нижній шар плазми, незалежно від параметрів другого центрифугування. Водночас збільшення їх концентрації пов'язане зі зменшенням загального об'єму плазми крові, в якій вони містяться.

Концентрації основних факторів росту в плазмі, отриманій при другому центрифугуванні в різних режимах, наведено на рис. 2.

При дослідженні концентрацій основних факторів росту в плазмі, отриманій при другому центрифугуванні в різних режимах, схожі тенденції виявлені для факторів PDGF-AA та TGF- β 1, а також VEGF та EGF.

Для факторів PDGF-AA та TGF- β 1 режими від $250 \text{ g} \times 15 \text{ хв}$ до $360 \text{ g} \times 15 \text{ хв}$ достовірно не відрізнялися ($p > 0,05$) між собою та від режиму $250 \text{ g} \times 10 \text{ хв}$, проте відрізнялися достовірно ($p < 0,05$) від режимів від $190 \text{ g} \times 10 \text{ хв}$ до $220 \text{ g} \times 15 \text{ хв}$. При цьому режими

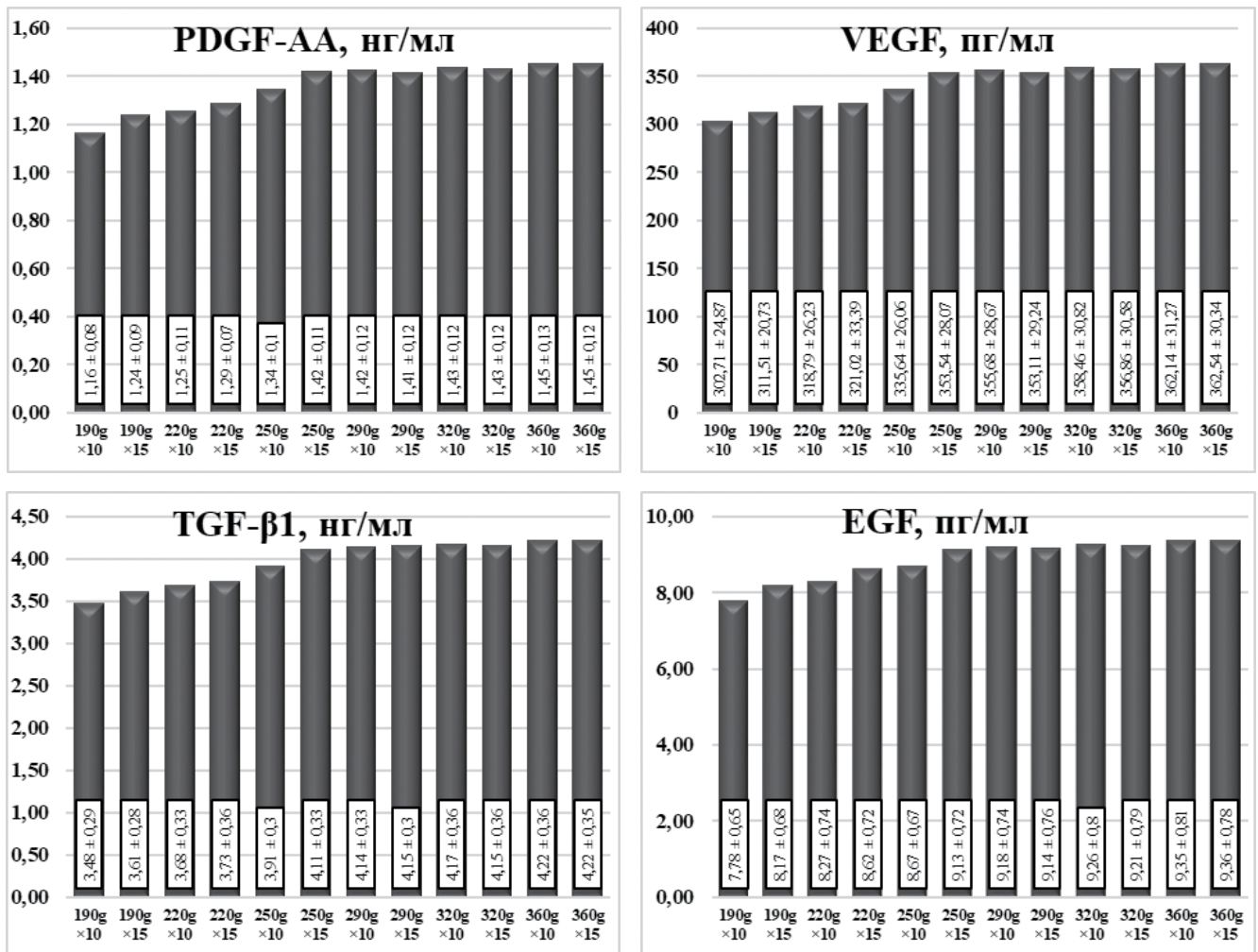


Рис. 2. Концентрація основних факторів росту в плазмі, отриманій при другому центрифугуванні в різних режимах

від 190 g × 10 хв до 220 g × 15 хв також достовірно не різнилися ($p > 0,05$) між собою. Режим 250 g × 10 хв достовірно ($p < 0,05$) відрізнявся лише від режиму 190 g × 10 хв.

Для факторів VEGF та EGF режими від 250 g × 15 хв до 360 g × 15 хв достовірно не відрізнялися ($p > 0,05$) між собою і від режимів 220 g × 15 хв та 250 g × 10 хв, проте відрізнялися достовірно ($p < 0,05$) від режимів від 190 g × 10 хв до 220 g × 10 хв. При цьому режими від 190 g × 10 хв до 220 g × 10 хв також достовірно не різнилися ($p > 0,05$) між собою. Режими 220 g × 15 хв та 250 g × 10 хв достовірно ($p < 0,05$) відрізнялися лише від режиму 190 g × 10 хв.

Як показано в нашому дослідженні, в отриманих зразках фракції крові, починаючи з режиму 250 g × 15 хв і до режиму 360 g × 15 хв, хоча й мало місце збільшення числових значень концентрації тромбоцитів та основних факторів росту, проте такий приріст був статистично недостовірним. При цьому показники концентрації та редукції еритроцитів і лейкоцитів демонстрували практично ідентичні значення у всіх досліджуваних зразках. Серед усіх

досліджуваних показників лише коефіцієнт збагачення тромбоцитами показав статистично значущий приріст при порівнянні режимів від 250 g × 15 хв до 360 g × 15 хв.

Враховуючи, що практично всі кількісні варіації досліджуваних показників втрачали достовірність, починаючи з режиму 250 g × 15 хв, вважаємо, що цей режим є оптимальним для другого етапу подвійного центрифугування з метою отримання чистої збагаченої тромбоцитами плазми.

Дослідження О. Vausset та співавт. [1] показало, що друге центрифугування в режимі 250 g × 15 хв, який не використовують на цей час у жодному протоколі приготування плазми, збагаченої тромбоцитами, дає змогу досягти достатньої концентрації тромбоцитів, зберігаючи при цьому їхню функціональність. Проте запропонований даним колективом авторів протокол не дає змоги досягти такого ж збагачення тромбоцитами, як у лейкоцитвмісній плазмі, збагаченій тромбоцитами, приготування якої є більш простим та дозволяє більшою мірою концентрувати тромбоцити, досягаючи коефіцієнта

Оригінальні дослідження. Загальна хірургія

збагачення тромбоцитами від 4 до 8 разів [8]. Найімовірнішою причиною цього може бути не достатньо добре підібраний режим першого центрифугування, який у дослідженні О. Bausset та співавт. [1] має параметри 130 g × 15 хв. Як показано в дослідженні Magalon та співавт. [13] та в нашому попередньому дослідженні [17], такий режим не дає змоги досягти максимальної концентрації тромбоцитів і коефіцієнта збагачення тромбоцитами при максимальній редукції інших формених елементів. Так, відповідно до отриманих раніше результатів, оптимальним для першого центрифугування є режим 160 g × 10 хв, який є оптимальним для приготування чистої плазми, що містить тромбоцити, готової до подальшого концентрування шляхом другого центрифугування.

Висновки

При подвійному центрифугуванні для приготування чистої збагаченої тромбоцитами плазми найефективнішим є послідовне поєднання режимів 160 g × 10 хв і 250 g × 15 хв, яке дає змогу досягти коефіцієнта збагачення тромбоцитами близько 4,93 при концентрації в кінцевому продукті тромбоцитів $1386,7 \pm 116,5 \times 10^9/\text{л}$, ефективності їх захоплення у $82,1 \pm 1,1\%$ та редукції еритроцитів і лейкоцитів $98,86 \pm 0,08\%$ та $98,45 \pm 0,14\%$ відповідно.

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

References/Література

- Bausset O, Giraud L, Veran J, Magalon J, Coudreuse JM, Magalon G et al. (2012). Formulation and storage of platelet-rich plasma homemade product. *Biores Open Access*. 1 (3): 115–123.
- Chahla J, Cinque ME, Piuzzi NS, Mannava S, Geeslin AG, Murray IR et al. (2017). A Call for Standardization in Platelet-Rich Plasma Preparation Protocols and Composition Reporting: A Systematic Review of the Clinical Orthopaedic Literature. *J Bone Joint Surg Am*. 99 (20): 1769–1779.
- Cieślak-Bielecka A, Reichert P, Skowroński R, Królikowska A, Bielecki T. (2019). A new aspect of in vitro antimicrobial leukocyte- and platelet-rich plasma activity based on flow cytometry assessment. *Platelets*. 30 (6): 728–736.
- Cohen E, Kramer M, Shochat T, Goldberg E, Krause I. (2017). Relationship between hematocrit levels and intraocular pressure in men and women: A population-based cross-sectional study. *Medicine (Baltimore)*. 96 (41): e8290.
- Croisé B, Paré A, Joly A, Louisy A, Laure B, Goga D. (2020). Optimized centrifugation preparation of the platelet rich plasma: Literature review. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg*. 121 (2): 150–154.
- Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. (2009). Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol*. 27 (3): 158–167.
- Etulain J, Mena HA, Meiss RP, Frechtel G, Gutt S, Negrotto S et al. (2018). An optimised protocol for platelet-rich plasma preparation to improve its angiogenic and regenerative properties. *Sci Rep*. 8 (1): 1513.
- Filardo G, Kon E, Pereira Ruiz MT, Vaccaro F, Guitaldi R, Di Martino A et al. (2012). Cenacchi A, Fornasari PM, Marcacci M. Platelet-rich plasma intra-articular injections for cartilage degeneration and osteoarthritis: single- versus double-spinning approach. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 20 (10): 2082–2091.
- Intravia J, Allen DA, Durant TJ, McCarthy MB, Russell R, Beitzel K et al. (2014). In vitro evaluation of the anti-bacterial effect of two preparations of platelet rich plasma compared with cefazolin and whole blood. *Muscles Ligaments Tendons J*. 4 (1): 79–84.
- Jia J, Wang SZ, Ma LY, Yu JB, Guo YD, Wang C. (2018). The Differential Effects of Leukocyte-Containing and Pure Platelet-Rich Plasma on Nucleus Pulposus-Derived Mesenchymal Stem Cells: Implications for the Clinical Treatment of Intervertebral Disc Degeneration. *Stem Cells Int*. 7162084.
- Kour P, Pudukalkatti PS, Vas AM, Das S, Padmanabhan S. (2018). Comparative Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Platelet-rich Plasma, Platelet-rich Fibrin, and Injectable Platelet-rich Fibrin on the Standard Strains of *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Contemp Clin Dent*. 9 (2): S325-S330.
- Machado ES, Leite R, Dos Santos CC, Artuso GL, Gluszczyk F, de Jesus LG et al. (2019). Turn down – turn up: a simple and low-cost protocol for preparing platelet-rich plasma. *Clinics (Sao Paulo)*. 74: e1132.
- Magalon J, Bausset O, Serratrice N, Giraud L, Aboudou H, Veran J et al. (2014). Characterization and comparison of 5 platelet-rich plasma preparations in a single-donor model. *Arthroscopy*. 30 (5): 629–638.
- Miller Y, Bachowski G, Benjamin R. (2007). Practice Guidelines for Blood Transfusion: A Compilation From Recent Peer-Reviewed Literature. Washington, DC: American Red Cross: 64.
- Nugraha HK, Muljanti M, Hernaningsih Y, Nugraha J. (2016). Platelet rich plasma preparation protocols: a preliminary study. *Indonesian Journal of Tropical and Infectious Disease*. 3 (2): 104–107.
- Pérez-Montesinos G, Medina-Bojórquez A, Hernández-Ramírez H, Morales-Sánchez MA, Peralta-Pedrero ML, Jurado-Santa CF. (2017). Platelet-rich plasma: comparative study of four protocols for its production. *Rev Cent Dermatol Pascua*. 26 (2): 41–44.
- Petrushenko V, Grebeniuk D, Nazarchuk H. (2022). Evaluation of Effectiveness of Different Regimens of Centrifugation for a Single-spin Method of Pure Platelet-containing Plasma Preparation. *International Blood Research & Reviews*. 13 (4): 73–83.
- Schepull T, Kvist J, Norrman H, Trinks M, Berlin G, Aspenberg P. (2011). Autologous platelets have no effect on the healing of human achilles tendon ruptures: a randomized single-blind study. *Am J Sports Med*. 39 (1): 38–47.
- Sethi D, Martin KE, Shrotriya S, Brown BL. (2021). Systematic literature review evaluating evidence and mechanisms of action for platelet-rich plasma as an antibacterial agent. *J Cardiothorac Surg*. 16 (1): 277.
- Sonmez C, Gümüş A, Senes M, Aykal G, Taneli F, Aksungar F et al. (2021). An important source of preanalytical error in medical laboratories: centrifugation. *Turkish Journal of Biochemistry*. 46 (4): 399–405.
- Vidal AWM, da Silva RS, Lopes Marques AP, Moreira de Souza HJ. (2020). Comparison of the protocols for obtaining platelet-rich plasma in dogs: a cellular study. *Ciência Rural [online]*. 50 (3): e20180843.
- Xu Z, Yin W, Zhang Y, Qi X, Chen Y, Xie X, Zhang C. (2017). Comparative evaluation of leukocyte- and platelet-rich plasma and pure platelet-rich plasma for cartilage regeneration. *Sci Rep*. 7: 43301.
- Yin W, Qi X, Zhang Y, Sheng J, Xu Z, Tao S et al. (2016). Advantages of pure platelet-rich plasma compared with

- leukocyte- and platelet-rich plasma in promoting repair of bone defects. *J Transl Med.* 14: 73.
24. Yin W, Xu H, Sheng J, Zhu Z, Jin D, Hsu P et al. (2017). Optimization of pure platelet-rich plasma preparation: A comparative study of pure platelet-rich plasma obtained using different centrifugal conditions in a single-donor model. *Exp Ther Med.* 14 (3): 2060–2070.
25. Zhang L, Chen S, Chang P, Bao N, Yang C, Ti Y et al. (2016). Harmful Effects of Leukocyte-Rich Platelet-Rich Plasma on Rabbit Tendon Stem Cells In Vitro. *Am J Sports Med.* 44 (8): 1941–1951.

Відомості про авторів:

Петрушенко Вікторія Вікторівна – д.мед.н., проф., зав. каф. ендоскопічної та серцево-судинної хірургії Вінницького НМУ імені М. І. Пирогова. Адреса: м. Вінниця, вул. Пирогова, 56. <https://orcid.org/0000-0002-9255-403X>.

Гребенюк Дмитро Ігорович – к.мед.н., доц. каф. ендоскопічної та серцево-судинної хірургії Вінницького НМУ імені М. І. Пирогова. Адреса: м. Вінниця, вул. Пирогова, 56. <https://orcid.org/0000-0002-6760-7494>.

Назарчук Галина Григорівна – к.мед.н., доц. каф. очних хвороб Вінницького НМУ імені М. І. Пирогова. Адреса: м. Вінниця, вул. Пирогова, 56. <https://orcid.org/0000-0003-3902-1741>.

Мосьондз Василь Володимирович – к.мед.н., доц., Універсальна Подільська Клініка. Адреса: м. Вінниця, провулок 4-й Гніванського шосе, 93-а. <https://orcid.org/0000-0002-2821-7709>.

Стаття надійшла до редакції 03.06.2022 р., прийнята до друку 20.09.2022 р.