

НМИЦ РК» Минздрава России

УТВЕРЖДАЮ:
Заместитель директора по научной
работе и образовательной
деятельности ФГБУ "Национальный
медицинский исследовательский
центр реабилитации и
курортологии" Минздрава России

О.В.Юрова
« ____ » 2023 г.

ОТЧЕТ О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

Характеристика лейкотромбоцитарной массы,
полученной при выделении PRP с использованием системы
«Пробирка стерильная для разделения крови с обогащенной
тромбоцитами плазмой YCELLBIO-KIT»
(Заключительный отчет)

Научный руководитель:

Зав. лабораторией клеточных технологий

Еремин П.С.

РЕФЕРАТ

Отчет 21с., 5 рис..1 табл.

ОБОГАЩЕННАЯ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМА, ПЛАЗМОЛИФТИНГ, ОРТОПЕДИЯ, PRP

Целью работы являлось оценить влияние получения PRP с использованием системы «Пробирка стерильная для разделения крови с обогащенной тромбоцитами плазмой YCELLBIO-KIT» на лейкотромбоцитарный состав и его жизнеспособность.

Было проанализировано 10 образцов периферической крови, полученных от условно здоровых доноров по таким параметрам как: количественное содержание тромбоцитов и лейкоцитов, распределение Т-лимфоцитов и жизнеспособность клеток в анализируемых образцах.

В результате работы было установлено, что из 14 мл цельной крови с показателем содержания тромбоцитов в крови в $319,3 \pm 31,3 \times 10^6$ ед/мл получается собрать 3 мл обогащенной тромбоцитами плазмой с показателем содержания тромбоцитов в $1343,4 \pm 151,5 \times 10^6$ ед/мл. Содержание лейкоцитов в крови доноров составило $6,72 \pm 1,13 \times 10^6$ ед/мл, а в обогащенной тромбоцитами плазмой, полученной из этой крови, этот показатель снизился до $4,27 \pm 0,74 \times 10^6$ ед/мл, но при этом, распределение Т-лимфоцитов сохранялось на уровне $76,8 \pm 8,2\%$ в обеих исследуемых группах. Жизнеспособность лейкотромбоцитарного слоя в обогащенной тромбоцитами плазмой составила $92,7 \pm 1,8\%$.

Таким образом было установлено, что система «Пробирка стерильная для разделения крови с обогащенной тромбоцитами плазмой YCELLBIO-KIT» позволяет получить обогащенную тромбоцитами плазму с высоким содержанием жизнеспособной лейкотромбоцитарной массой.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Плазма, обогащенная тромбоцитами (PRP), стала широко известна медицинскому сообществу благодаря непрерывным научным работам в области трансфузиологии в 1970 годах. [1] Изначально ее использовали для улучшения полимеризации фибрина, а не в качестве стимулятора процесса заживления тканей. [2,3]

PRP- это сложный комплекс аутологичных многоклеточных компонентов, содержащий высокие концентрации тромбоцитов и факторов роста. [2,4,5] Полученная плазма содержит как минимум в 2 раза больше тромбоцитов по сравнению с цельной кровью, которые играют решающую роль в поддержании гомеостаза тканей и регулировании воспаления, а супрафизиологические значения высвобождаемых факторов роста запускают процесс восстановления за счет инициирования гемостатического каскада, синтеза новой соединительной ткани и реваскуляризации. [2,5]

По данным литературы PRP, как клеточный аутологичный продукт, можно классифицировать на 4 группы: [6]

1. Очищенная PRP с низким содержанием лейкоцитов (LP-PRP) в виде жидкости или геля;
2. PRP с высоким содержанием лейкоцитов (LR-PRP) в виде жидкости или геля;
3. Очищенный фибрин с высоким содержанием тромбоцитов (P-PRF) в виде геля;
4. Фибрин с высоким содержанием и тромбоцитов, и лейкоцитов (L-PRF) в виде геля.

Стандартизированный протокол получения PRP отсутствует. [7] После забора крови у пациента полученный образец центрифугируется, разделяясь на различные клеточные фракции на основе различной удельной гравитационной плотности (тромбоциты имеют самую низкую плотность). [5] Существует две основные системы получения PRP, которые различаются друг от друга в этапе центрифугирования: они могут включать 1 или 2 этапа центрифугирования. Системы, использующие один цикл вращения, разделяют образец на слой плазмы, содержащий тромбоциты, и отдельный слой, содержащий красные и белые кровяные тельца. Концентрация тромбоцитов в полученной фракции превышает таковую в цельной крови в 1-3 раза, к тому же использование данных систем исключает добавление антикоагулянтов для предотвращения свертывания крови ввиду быстрого времени приготовления. Второй тип систем получения PRP включает в себя два цикла вращения и приводит к образованию трех фракций: слой, содержащий эритроциты; слой, содержащий тромбоциты и лейкоциты; а также слой без тромбоцитов. В центре внимания данных систем- второй слой, в котором концентрация тромбоцитов превышает нативный уровень более, чем в 5 раз.

По данным литературы, лейкоциты являются важными источниками цитокинов и ферментов, необходимых для процесса заживления, а также профилактики инфекционных осложнений, в то время как их оппоненты считают, что наличие лейкоцитов в PRP приведет к увеличению содержания провоспалительных цитокинов и ферментов, таких как MMP, которые могут проявлять антагонистический катаболический эффект. [5]

Кроме того, наличие Т-лимфоцитов в PRP косвенно будет способствовать заживлению тканей за счет таких цитокинов, как интерферон- γ (IFN- γ) и интерлейкин-4 (IL-4), модулируя тем самым дифференцировку моноцитов и макрофагов. [2]



МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Исследуемая система «Пробирка стерильная для разделения крови с обогащенной тромбоцитами плазмой YCELLBIO-KIT» была предоставлена компанией ООО «РУСВИСК». Образцы крови были получены от условно здоровых доноров после подписания информированного согласия на исследования.

При выполнении работы были использованы следующие реактивы и расходные материалы:

- Фосфатно-солевой буфер 1xD-PBS (StemCell, США);
- Kit_Live/Dead Test (Thermo Fisher Scientific Inc., США);
- пипетки серологические (5,10,25 мл) (Corning, США);
- пробирки стерильные 50 мл (Corning, США);
- BD Multitest IMK Kit (BD, США)

В работе использовали коммерческую культуру клеток фибробластов кожи человека HDF (Cell Applications, США, кат. № 106K-05a).

- При выполнении работы было использовано следующее оборудование:
- Ламинарный шкаф СЛШ-1,8 ЗП (Lamsystems, Россия);
- Ультрафиолетовые лампы FOTON-2 (Beauty Star, Китай);
- Центрифуга SorvallBIOS 16 (Thermo Scientific, США);

Автоматический дозатор для серологических пипеток (Gilson Macroman, США);

- ABX Pentra XL 80 (Horiba, Франция)
- Проточный цитофлуориметр BD FACSCanto II (Becton Dickinson and Company, США).

Методы

Получение PRP

В качестве объекта исследования были использованы 10 образцов крови условно здоровых доноров - мужчин в возрасте 35-50 лет. После подписания информированного согласия в стерильный шприц, содержащий 1,5 мл антикоагулянта, собирали 12,5 мл периферической крови, после чего небольшими круговыми движениями перемешивали.

Полученную кровь через отверстие вносили под углом в 45° в пробирку для разделения крови YCELLBIO-KIT до необходимой метки. Центрифугировали при 3500 об/мин в течение 4 минут. Фракция лейкоцитомбоцитарного слоя находилась в узком перешейке пробирки YCELLBIO-KIT. При нахождении эритроцитарной массы выше указанного значения, проводили повторное центрифугирование с указанными параметрами. Уровень эритроцитарной массы регулировали при помощи поворотного колпачка. После центрифугирования отбирали в стерильный шприц плазму с лейкоцитомбоцитарным слоем в объеме 3 мл.

Оценка лейкотромбоцитарного состава

Исследование лейкотромбоцитарного состава проводили на автоматическом гематологическом анализаторе ABX Pentra XL 80 (Horiba, Франция). Оценивали количественные показатели тромбоцитов и лейкоцитов в исследуемых образцах крови и PRP.

Оценка жизнеспособности клеток и распределение Т-лимфоцитов

Оценку жизнеспособности клеток проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (Becton Dickinson and Company, США) с использованием коммерческого набора Kit_Live/Dead Test (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Распределение Т-лимфоцитов также оценивали методом проточной цитометрии, с использованием коммерческого набора BD Multitest IMK Kit (BD, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В исследовании использована периферическая кровь условно здоровых доноров-добровольцев, что подтверждалось данными общего биохимического анализа крови. Для выделения плазмы обогащенной тромбоцитами (англ. platelet-rich plasma, PRP) использовали набор "YCELLBIO-KIT". Выделение PRP проводили согласно прилагающейся инструкции.

В результате проведенной работы было получено 10 образцов PRP. Для получения 4 образцов потребовалась дополнительная процедура центрифугирования, что полностью соответствует заявленной производителем методике. Содержание тромбоцитов в исходной периферической крови составило $319,3 \pm 31,3 \times 10^6$ ед/мл. При извлечении 3 мл PRP концентрация тромбоцитов увеличилась до $1343,4 \pm 151,5 \times 10^6$ ед/мл. Полученные данные свидетельствуют о минимальных потерях тромбоцитов после процедуры центрифугирования.

Таким образом, установлено, что с использованием набора "YCELLBIO-KIT" из 14 мл периферической крови удается выделить от 3 мл PRP. При этом, метод выделения позволяет повысить концентрацию тромбоцитов до 1,4 млн/мкл, что в четыре раза превышает количества тромбоцитов в периферической крови (Рис. 1).



Рисунок 1. Количество тромбоцитов в цельной крови и в лейкотромбоцитарной клеточной суспензии (PRP) после выделения набором "YCELLBIO-KIT". Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение; n=10, * – различия достоверны при $p < 0.05$.

При этом, сравнительная оценка количества лейкоцитов в крови и в выделяемом лейкотромбоцитарном слое показывает, что по содержанию лейкоцитов изменяется не значительно, что соответствует литературным данным. [5] Содержание лейкоцитов в крови доноров составило $6,72 \pm 1,13 \times 10^6$ ед/мл, а в обогащенной тромбоцитами плазме, полученной из этой крови, этот показатель снизился до $4,27 \pm 0,74 \times 10^6$ ед/мл (Рис. 2)

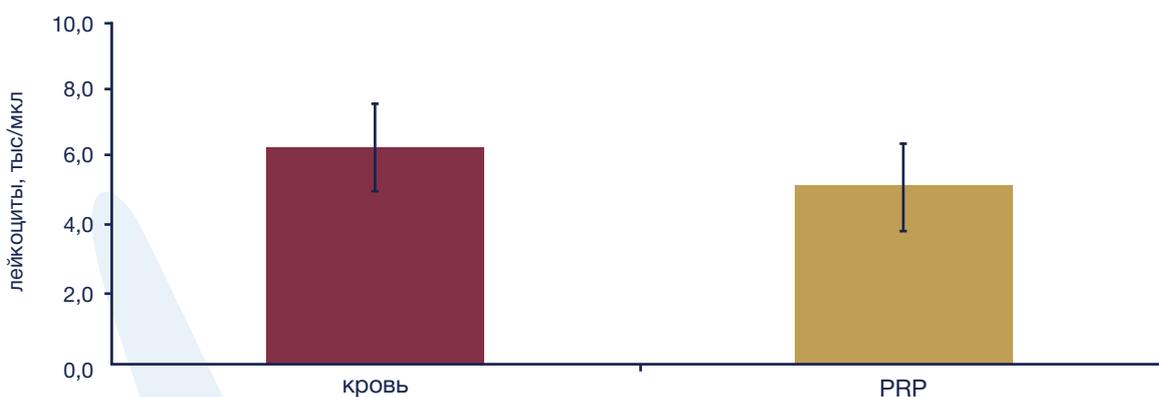


Рисунок 2. Количество лейкоцитов в цельной крови и в лейкотромбоцитарной клеточной суспензии (PRP) после выделения набором "YCELLBIO-KIT". Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение; n=10.

Данные иммунофенотипирования субпопуляционного состава лимфоцитов показывают, что метод выделения не влияет на относительное количество Т-лимфоцитов в выделяемом лейкотромбоцитарном слое и составляет $76,8 \pm 8,2\%$.

Оценка жизнеспособности клеток в лейкотромбоцитарном слое выделяемом с использованием набора "YCELLBIO-KIT", показала что метод позволяет получать клетки с жизнеспособностью более 90% (Рис. 3).

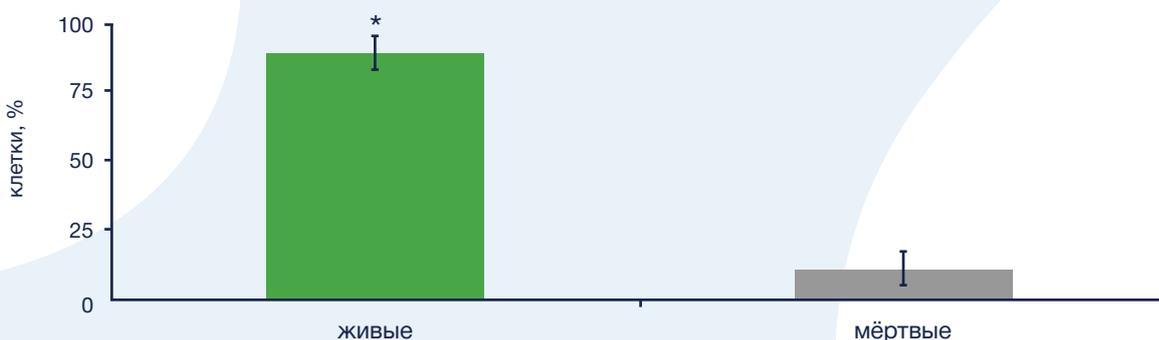


Рисунок 3. Соотношение живых и мертвых клеток в лейкотромбоцитарной клеточной суспензии (PRP) после выделения набором "YCELLBIO-KIT". Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение; n=10, * – различия достоверны при $p < 0,05$.

Таким образом, результаты проведенного исследования показывают, что использование набора "YCELLBIO-KIT" позволяет получать плазму обогащенную тромбоцитами, при этом метод выделения не влияет на клеточный состав и жизнеспособность клеток лейкотромбоцитарной массы.

ВЫВОДЫ

1. Использование набора "YCELLBIO-KIT" позволяет выделять из периферической крови лейкотромбоцитарную клеточную суспензию.
2. Концентрация тромбоцитов лейкотромбоцитарной суспензии более чем в пять раз превышает концентрацию тромбоцитов в крови, что позволяет отнести получаемый продукт к плазме обогащенной тромбоцитами.
3. Метод получения PRP продукта, с использованием набора "YCELLBIO-KIT", позволяет выделять лейкотромбоцитарную суспензию без потери клеточной жизнеспособности.



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alves R., Grimalt R. A review of platelet-rich plasma: history, biology, mechanism of action, and classification. *Skin Append Disord.* 2017; 4(1): 18–24, <https://doi.org/10.1159/000477353>.
2. Everts P., Onishi K., Jayaram P., Lana J.F., Mautner K. Platelet-Rich Plasma: New Performance Understandings and Therapeutic Considerations in 2020. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(20): 7794, <https://doi.org/10.3390/ijms21207794>.
3. Silverberg G.D., Harbury C.B., Rubenstein E. A physiological sealant for cerebrospinal fluid leaks. *J. Neurosurg.* 1977; 46: 215–219, <https://doi.org/10.3171/jns.1977.46.2.0215>.
4. Zhao J., Huang H., Liang G., Zeng L.F., Yang W., Liu J. Effects and safety of the combination of platelet-rich plasma (PRP) and hyaluronic acid (HA) in the treatment of knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Musculoskelet Disord.* 2020; 21(1): 224, <https://doi.org/10.1186/s12891-020-03262-w>.
5. Cook C.S., Smith P.A. Clinical Update: Why PRP Should Be Your First Choice for Injection Therapy in Treating Osteoarthritis of the Knee. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2018; 11(4): 583-592, <https://doi.org/10.1007/s12178-018-9524-x>.
6. Shahid M., Kundra R. Platelet-rich plasma (PRP) for knee disorders. *EFORT Open Rev.* 2017; 2(1): 28-34, <https://doi.org/10.1302/2058-5241.2.160004>.
7. Riewruja K., Phakham S., Sompolpong P, Reantragoon R, Tanavalee A, Ngarmukos S, Udomsinprasert W, Suantawee T, Dechsupa S, Honsawek S. Cytokine Profiling and Intra-Articular Injection of Autologous Platelet-Rich Plasma in Knee Osteoarthritis. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(2): 890, <https://doi.org/10.3390/ijms23020890>.