

Оптимизация способа получения богатой тромбоцитами плазмы для использования в клинической практике

К.И. Бурыкин¹✉, Н.В. Боровкова², М.С. Макаров², И.Н. Пономарев², М.В. Паршиков¹,
Н.В. Ярыгин¹, А.М. Файн^{1,2}

Кафедра травматологии, ортопедии и медицины катастроф

¹ ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» МЗ РФ
Российская Федерация, 127473, Москва, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1

² ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»
Российская Федерация, 129090, Москва, Б. Сухаревская пл., д. 3

✉ Контактная информация: Бурыкин Кирилл Игоревич, аспирант кафедры травматологии, ортопедии и медицины катастроф ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» МЗ РФ. Email: bi.kirik@mail.ru

АКТУАЛЬНОСТЬ

В настоящее время идет активный поиск и разработка эффективных биопрепаратов на основе тромбоцитов человека, предназначенных для использования в регенеративной медицине. Исходным материалом для получения биопрепаратов является богатая тромбоцитами плазма (БоТП), при этом методика выделения БоТП до сих пор не стандартизирована.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить качество тромбоцитов в БоТП, выделенной при разных режимах центрифугирования.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве источника тромбоцитов использовали кровь доноров-добровольцев. Для выделения БоТП использовали три методики, каждая из методик включала 2-этапное центрифугирование: в течение 5 мин с ускорением 300 g и 17 мин с ускорением 700 g (1-я группа); в течение 10 мин с ускорением 300 g и 10 мин с ускорением 700 g (2-я группа); в течение 15 мин с ускорением 300 g и 5 мин с ускорением 700 g (3-я группа). Тромбоциты исследовали с помощью способа оценки морфофункционального статуса тромбоцитов, основанного на витальном окрашивании клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Было показано, что в образцах БоТП 1-й и 2-й групп общая сохранность биологически полноценных тромбоцитов была сходной и составляла 55–60% от их общего содержания в крови. В 3-й группе сохранность биологически полноценных тромбоцитов составила лишь 30% ($p < 0,05$, статистически значимо).

ВЫВОДЫ

Режимы центрифугирования в течение 5 мин с ускорением 300 g / 17 мин с ускорением 700 g и 10 мин с ускорением 300 g / 10 мин с ускорением 700 g позволяют получить БоТП равного качества; вместе с тем режим центрифугирования в течение 10 мин 300 g / 10 мин 700 g имеет ряд инструментальных преимуществ.

Ключевые слова:

тромбоциты, богатая тромбоцитами плазма, центрифугирование, морфофункциональный статус тромбоцитов

Для цитирования

Бурыкин К.И., Боровкова Н.В., Макаров М.С., Пономарев И.Н., Паршиков М.В., Ярыгин Н.В. и др. Оптимизация способа получения богатой тромбоцитами плазмы для использования в клинической практике. *Журнал им. Н.В. Склифосовского неотложной медицинской помощи*. 2023;12(2):268–273. <https://doi.org/10.23934/2223-9022-2023-12-2-268-273>

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Благодарность, финансирование

Исследование не имеет спонсорской поддержки

БоТП — богатая тромбоцитами плазма

ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день методики лечения с использованием препаратов на основе тромбоцитов человека получают все большее распространение во многих областях клинической медицины. Тромбоциты человека содержат большое количество факторов роста, факторы ангиогенеза и цитокины, действие которых направлено на стимуляцию процессов репаративной регенерации [1–5]. Эффективность тромбоцитных препаратов показана в большом числе исследований; вместе с тем ни один из таких препаратов не является

полностью стандартизированным. Исходным материалом для получения биопрепаратов является богатая тромбоцитами плазма (БоТП). Методы получения БоТП инструментально и технически простые, а использование аутологичной БоТП в клиническом процессе имеет незначительное число относительных и абсолютных противопоказаний и является юридически разрешенным. По мнению исследователей, для достижения клинического эффекта концентрация тромбоцитов в БоТП должна составлять не меньше 1000 тыс/мкл.

Существуют различные протоколы извлечения БоТП, которые позволяют получить необходимую концентрацию тромбоцитов [6–9], разработаны специальные центрифуги и системы для выделения БоТП, максимально упрощающие трудозатраты на использование данной методики в клинической практике [8, 9]. Однако при этом не учитывается собственно качество получаемых тромбоцитов, их структурные и функциональные характеристики. Центрифугирование может нарушать нативную структуру тромбоцитов, вызывать их спонтанную агрегацию, что в конечном итоге может приводить к потере биологического потенциала тромбоцитов.

Цель настоящей работы — оценить морфофункциональный статус тромбоцитов БоТП, выделенной при разных способах центрифугирования.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа проведена с одобрения Межвузовского Комитета по этике (протокол № 02-21 от 18.02.2021 г.). Для исследования использовали образцы венозной крови 15 доноров-добровольцев. Венозную кровь забирали из кубитальной вены в вакуумные пробирки с антикоагулянтом ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота). От каждого донора заготавливали по 3 пробирки крови объемом 4 мл. Из пробирок отбирали небольшие аликвоты (10–50 мкл) для оценки исходного качества тромбоцитов доноров, затем пробирки распределяли по трем опытным группам с тем, чтобы в каждой группе была одна пробирка от каждого донора. В опытных группах проводили двукратное центрифугирование с целью выделения БоТП. Первоначально цельную кровь центрифугировали с ускорением 300 g для ее разделения на компоненты и получения первичной плазмы с тромбоцитами. Затем первичную плазму центрифугировали с ускорением 700 g для концентрирования тромбоцитов и получения конечной БоТП. В 1-й группе длительность центрифугирования с ускорением 300 g составляла 5 мин, а при ускорении 700 g она была 17 мин, во 2-й группе — 10 мин и 10 мин, в 3-й группе — 15 мин и 5 мин соответственно.

Во всех случаях после первого центрифугирования весь объем супернатантной плазмы с тромбоцитами перенесли в новую пробирку. После центрифугирования с ускорением 700 g первичная плазма разделялась на осадок тромбоцитов и плазму, бедную тромбоцитами (содержание тромбоцитов — менее 100 тыс/мкл). Бедную тромбоцитами плазму отбирали таким образом, чтобы в пробирке ее оставалось 0,5 мл. Этот объем плазмы использовали для ресуспендирования осадка тромбоцитов. Отбор плазмы и ее перемешивание во всех случаях проводили одноразовыми стерильными медицинскими шприцами объемом до 10 мл через одноразовые стерильные иглы для спинальной анестезии размером 20 G (рис. 1). В результате из 4 мл крови получали 0,5 мл БоТП.

Объем полученной плазмы измеряли градуированной пипеткой. Концентрацию тромбоцитов и лейкоцитов в крови и плазме определяли на гематологическом анализаторе, также рассчитывали общее количество тромбоцитов в образце. Оценка морфофункционального статуса тромбоцитов человека включала окрашивание клеток витальным флуорохромным красителем с последующим их анализом с помощью флуоресцентного микроскопа [10, 11]. В исходной крови, первичной плазме и БоТП оценивали уровень биологически полноценных тромбоцитов с гранулами, *D* тр.гр. (в %, норма 35–75%), рассчитывали общее число тромбоцитов с гранулами в пробе, Стр.гр. (10⁶). Помимо этого, в каждой группе рассчитывали общую сохранность тромбоцитов и сохранность тромбоцитов с гранулами. Для этого определяли отношение количества тромбоцитов во всем объеме готовой БоТП к их числу в объеме исходной крови и выражали в процентах. Аналогичным образом проводили подсчет для тромбоцитов с гранулами.

При статистической обработке данных определяли медиану, 1-й и 3-й квартили, для оценки различий использовали критерий Вилкоксона (кр. *W*) для связанных выборок. Статистически значимыми считали результаты при *p* менее 0,05.

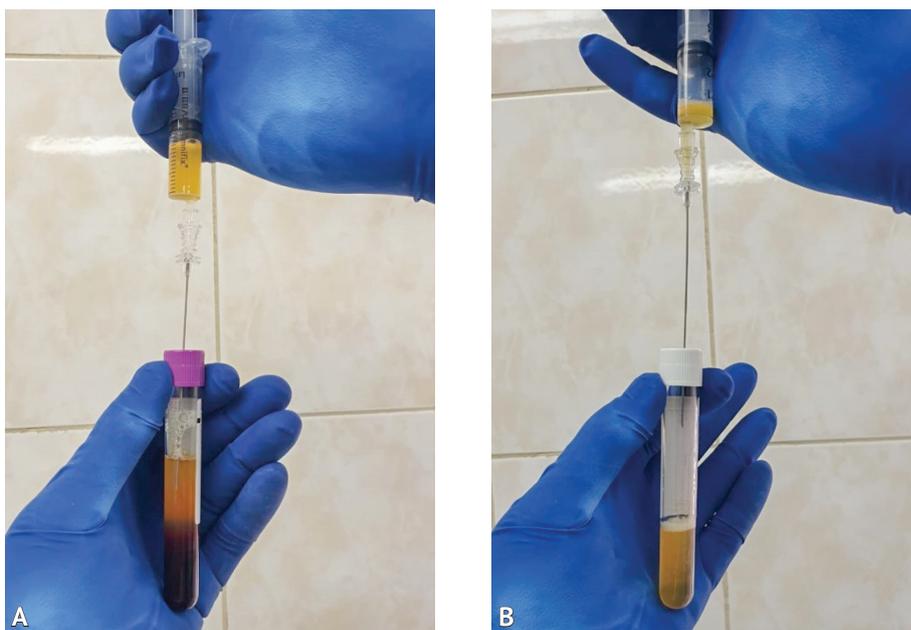


Рис. 1. А — отбор плазмы с тромбоцитами из пробирки; В — перемещение первичной плазмы в стерильную пробирку перед повторным центрифугированием

Fig. 1. A — selection of plasma with platelets from a test tube; B — transfer of primary plasma into a sterile tube before re-centrifugation

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В исходной крови концентрация тромбоцитов составила 249 (223; 284) тыс/мкл, их общее количество — 964 (888; 1136), доля D тр.гр. — 50 (45; 60) %, а концентрация лейкоцитов — 7 (6; 10) тыс/мкл. Показатели плазмы после первого центрифугирования представлены в табл. 1. По сравнению с показателями исходной крови концентрация тромбоцитов в плазме увеличилась, при этом в 3-й группе концентрация тромбоцитов была статистически значимо ниже по сравнению с 1-й и 2-й группами. Концентрация лейкоцитов, напротив, статистически значимо снизилась во всех группах, но в 1-й группе была в 3–5 раз выше, чем во 2-й и 3-й ($p < 0,05$). Объем полученной плазмы после первого центрифугирования в 1-й группе составил 1,30 (1,00; 1,50), во 2-й группе — 1,40 (1,40; 1,60), а в 3-й группе — 1,60 (1,40; 1,80). В результате общее количество тромбоцитов, полученное после первого центрифугирования, во всех образцах было статистически значимо меньше, чем в исходной крови. Потери составляли в 1-й группе 43%, во 2-й — 38%, а в 3-й — 47% от исходного общего числа тромбоцитов. Таким образом, первое центрифугирование нецелесообразно проводить более 10 минут. Более длительное центрифугирование приводит к излишнему осаждению тромбоцитов и увеличивает их потерю.

После второго центрифугирования с ускорением 700 g и последующего ресуспендирования в меньшем объеме плазмы общая концентрация тромбоцитов в 1-й и 2-й группе в среднем составляла 1000 тыс/мкл и выше, что соответствовало рекомендуемой концентрации тромбоцитов в БоТП. В 3-й группе целевой концентрации тромбоцитов достичь не удавалось. В этих образцах содержание тромбоцитов было ниже, чем в 1-й и 2-й группе в среднем в 1,8 раза. Тромбоциты 1-й и 2-й групп сохраняли свой морфофункциональный статус, при этом относительное содержание тромбоцитов с гранулами после двукратного центрифугирования по сравнению с таковым в исходной крови статистически

значимо не менялось. Напротив, в образцах БоТП 3-й группы отмечено статистически значимое снижение D тр.гр. и других морфофункциональных параметров тромбоцитов ($p < 0,05$). Во многих образцах данной группы наблюдались многочисленные тромбоцитарные конгломераты, в составе которых тромбоциты сохраняли гранулы. Также можно было видеть мелкие агрегаты, образованные клетками без гранул. Яркость цитоплазмы в таких тромбоцитах была заметно снижена. Все это говорит о спонтанной активации тромбоцитов. Общее количество полученных тромбоцитов с гранулами в БоТП представлено на рис. 2.

В 1-й и 2-й группах общее количество функционально полноценных тромбоцитов составляло в среднем 55–60%, тогда как в 3-й группе — только 30%. Сравнительный анализ образцов БоТП, полученных разными способами, представлен в табл. 2. Можно заключить, что режим выделения БоТП «15 мин при ускорении 300 g/5 мин при ускорении 700 g» является неэффективным.

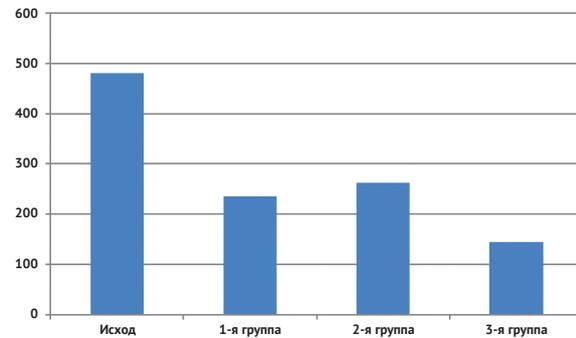


Рис. 2. Общее количество тромбоцитов с гранулами в исходном образце крови и в богатой тромбоцитами плазме исследуемых групп
Fig. 2. The total number of platelets with granules in the initial blood sample and in the platelet-rich plasma of the studied groups

Таблица 1

Характеристика образцов плазмы, выделенной из крови пациентов при центрифугировании с ускорением 300 g
Table 1
Characteristics of plasma samples isolated from the blood of patients during centrifugation at 300 g

Морфофункциональные параметры: медиана (1-й кв; 3-й кв)	Тип образца			
	Цельная кровь	Первичная плазма, после первого центрифугирования с ускорением 300 g		
		1-я группа (5 минут)	2-я группа (10 минут)	3-я группа (15 минут)
Концентрация тромбоцитов, $\times 10^5$ /мкл	241 (223; 284)	447 (336; 511)*	462 (341; 574)*	332 (254; 438)* **
Концентрация лейкоцитов, $\times 10^3$ /мкл	7 (6; 10)	0,8 (0,5; 2,5)*	0,3 (0,1; 0,5)* **	0,2 (0,1; 0,8)* **
Общее число тромбоцитов в пробе, $\times 10^6$	952 (848; 1156)	548 (429; 682)*	591 (429; 742)*	506 (342; 615)*
Общее число тромбоцитов с гранулами, $\times 10^6$	501 (400; 674)	282 (216; 353)*	375 (280; 445)*	306 (263; 380)*

Примечания: * — статистически значимо относительно контроля ($p < 0,05$); ** — статистически значимо относительно 1-й группы ($p < 0,05$)
Notes:

Таблица 2

Сравнение образцов богатой тромбоцитами плазмы (БоТП), полученных разными способами
Table 2
Comparison of platelet rich plasma samples obtained by different methods

Морфофункциональные параметры: медиана (1-й кв; 3-й кв)	Способ получения БоТП		
	5 мин при ускорении 300 g/ 17 мин при ускорении 700 g (1-я группа)	10 мин при ускорении 300 g/10 мин при ускорении 700 g (2-я группа)	15 мин при ускорении 300 g/5 мин при ускорении 700 g (3-я группа)
Уровень тромбоцитов с гранулами, %	45 (40; 51)	47 (43; 59)	40 (37; 45)*
Общее число тромбоцитов в БоТП, $\times 10^6$	545 (479; 665)	657 (582; 782)	315 (274; 405)*
Общее число тромбоцитов с гранулами в БоТП, $\times 10^6$	305 (223; 352)	275 (199; 341)	142 (118; 172)*

Примечание: * — статистически значимо относительно 1-й группы ($p < 0,05$)
Note: * — statistically significant as compared to Group 1 ($p < 0,05$)

Режимы центрифугирования 5/17 и 10/10 позволяют получить БоТП, оптимальную по своим качественным и количественным характеристикам, способным проявить регенераторный потенциал.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что известный режим «5 мин при ускорении 300 g / 17 мин при ускорении 700 g» [7] позволяет получить БоТП с тромбоцитами удовлетворительного качества. Режим центрифугирования «10 мин при ускорении 300 g / 10 мин при ускорении 700 g» сопоставим с указанным режимом по числу и качеству тромбоцитов (табл. 2), однако имеет ряд инструментальных преимуществ. Во-первых, при режиме «10 мин при ускорении 300 g / 10 мин при ускорении 700 g» первичная плазма содержит гораздо меньше лейкоцитов, что может быть критически важным при изготовлении тромбоцитных препаратов. Следует учесть, что лейкоциты содержат большое число провоспалительных цитокинов, которые в комбинации с тромбоцитарными компонентами могут усиливать многие патофизиологические реакции, в связи с чем большинство исследователей рекомендует получать БоТП без лейкоцитов [2, 3, 6]. Во-вторых, в ряде случаев 5 мин центрифугирования при ускорении 300 g может быть недостаточным для получения нужного объема первичной плазмы, так как этому препятствует повышенная вязкость крови

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Kushida S, Kakudo N, Morimoto N, Hara T, Ogawa T, Mitsui T, et al. Platelet and growth factor concentrations in activated platelet-rich plasma: a comparison of seven commercial separation systems. *J Artif Organs*. 2014;17(2):186–192. PMID: 24748436 <https://doi.org/10.1007/s10047-014-0761-5>
- Patel S, Dhillon MS, Aggarwal S, Marwaha N, Jain A. Treatment with platelet-rich plasma is more effective than placebo for knee osteoarthritis: a prospective, double-blind, randomized trial. *Am J Sports Med*. 2013;41(2):356–364. PMID: 23299850 <https://doi.org/10.1177/0363546512471299>
- Lacci KM, Dardik A. Platelet-rich plasma: support for its use in wound healing. *Yale J Biol Med*. 2010;83(1):1–9. PMID: 20351977
- Yassibag-Berkman Z, Tuncer O, Subasioglu T, Kantarci A. Combined use of platelet-rich plasma and bone grafting with or without guided tissue regeneration in the treatment of anterior interproximal defects. *J Periodontol*. 2007;78(5):801–809. PMID: 17470012 <https://doi.org/10.1902/jop.2007.060318>
- Макаров М.С., Сторожева М.В., Коношко О.И., Боровкова Н.В., Хватов В.В. Влияние концентрации тромбоцитарного фактора роста на пролиферативную активность фибробластов человека. *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2013;(2):111–115.
- Etulain J, Mena HA, Meiss RP, Frechtel G, Gutt S, Negrotto S, et al. An optimised protocol for platelet-rich plasma preparation to improve its angiogenic and regenerative properties. *Sci Rep*. 2018;8(1):1513. PMID: 29367608 <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19419-6>
- Amable PR, Carias RB, Teixeira MV, da Cruz Pacheco I, Corrêa do Amaral RJ, Granjeiro JM, et al. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(3):67. PMID: 23759113 <https://doi.org/10.1186/scrt218>
- Degen RM, Bernard JA, Oliver KS, Dines JS. Commercial Separation Systems Designed for Preparation of Platelet-Rich Plasma Yield

REFERENCES

- Kushida S, Kakudo N, Morimoto N, Hara T, Ogawa T, Mitsui T, et al. Platelet and growth factor concentrations in activated platelet-rich plasma: a comparison of seven commercial separation systems. *J Artif Organs*. 2014;17(2):186–192. PMID: 24748436 <https://doi.org/10.1007/s10047-014-0761-5>
- Patel S, Dhillon MS, Aggarwal S, Marwaha N, Jain A. Treatment with platelet-rich plasma is more effective than placebo for knee osteoarthritis: a prospective, double-blind, randomized trial. *Am J Sports Med*. 2013;41(2):356–364. PMID: 23299850 <https://doi.org/10.1177/0363546512471299>

и плазмы, которая отмечается при с артериальной гипертензии, массивной кровопотере, обширных ожогах, отравлениях и многих патологиях, сопровождающихся диспротеинемией [12–14]. Кроме того, даже у здоровых людей длительность выделения плазмы может быть увеличена из-за низких значений скорости оседания эритроцитов [15]. Таким образом, центрифугирование крови при ускорении 300 g в течение 10 мин повышает надежность получения БоТП со стандартной концентрацией клеток при сохранении их морфофункциональных характеристик. Образцы БоТП, полученной таким способом, также содержали достаточное число тромбоцитов с гранулами, которое требуется для достижения терапевтического эффекта, продемонстрированного ранее как в исследованиях *in vitro*, так и в рамках клинического исследования [5, 16].

ВЫВОД

Предложенный режим получения богатой тромбоцитами плазмы «10 мин при ускорении 300 g / 10 мин при ускорении 700 g» представляется эффективным для получения тромбоцитарного концентрата с необходимым качественным 47% (43; 59) ($p < 0,05$) и количественным составом 657 (582; 782) тыс/мкл 10^6 ($p < 0,05$) и рекомендуется для использования в клинической практике, в том числе в травматологии и ортопедии.

- Differences in Cellular Composition. *HSS J*. 2017;13(1):75–80. PMID: 28167878 <https://doi.org/10.1007/s11420-016-9519-3>
- Croisé B, Paré A, Joly A, Louisy A, Laure B, Goga D. Optimized centrifugation preparation of the platelet rich plasma: Literature review. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg*. 2020;121(2):150–154. PMID: 31299341 <https://doi.org/10.1016/j.jormas.2019.07.001>
- Хубуття М. Ш., Макаров М.С., Хватов В.В., Высочин И.В., Кобзева Е.Н., Боровкова Н.В. и др. *Способ оценки морфофункционального статуса тромбоцитов человека*: Патент № 2485502С1; заявл. 17.02.2012; опубл. 20.06.2013. Бюллетень №17. URL: <https://patentimages.storage.googleapis.com/db/51/6f/194ae2d17f6f8b/RU2485502C1.pdf> [Дата обращения: 21.04.2023]
- Макаров М.С., Кобзева Е.Н., Высочин И.В., Боровкова Н.В., Хватов В.В. Применение витального окрашивания для морфофункционального анализа тромбоцитов человека короткого хранения. *Альманах клинической медицины*. 2014;(30):83–87.
- Козинец Г.И. (ред.) *Практическая трансфузиология*. Москва: Практическая медицина; 2005.
- Рагимов А.А. (ред.) *Трансфузиология. Национальное руководство*. Москва: ГЭОТАР-Медиа; 2012.
- Муравьев А.В., Михайлов П.В., Тихомирова И.А. Микроциркуляция и гемореология: точки взаимодействия. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2017;16(2):90–100. <https://doi.org/10.24884/1682-6655-2017-16-2-90-100>
- Максимович Н.Е., Ходосовский М.Н., Троян Э.И., Левевич А.В., Рузан Т.А., Максимович Е.Н. *Патологическая физиология: пособие для студентов*. 2-е изд., доп. и перераб. Гродно: ГрГМУ; 2014.
- Боровкова Н.В., Малыгина М.А., Макаров М.С. Сахарова О.М., Пономарев И.Н. *Способ лечения пациентов с переломом шейки плеча*: Патент № 2681753 С1; заявл. 21.05.2018; опубл. 12.03.2019. Бюллетень № 8. URL: https://www.elibrary.ru/download/elibrary_37357934_81969735.PDF [Дата обращения 21.04.2023]

- Lacci KM, Dardik A. Platelet-rich plasma: support for its use in wound healing. *Yale J Biol Med*. 2010;83(1):1–9. PMID: 20351977
- Yassibag-Berkman Z, Tuncer O, Subasioglu T, Kantarci A. Combined use of platelet-rich plasma and bone grafting with or without guided tissue regeneration in the treatment of anterior interproximal defects. *J Periodontol*. 2007;78(5):801–809. PMID: 17470012 <https://doi.org/10.1902/jop.2007.060318>
- Makarov MS, Storozheva MV, Konyushko OI, Borovkova NV, Khvatov VB. Vliyanie kontsentratsii trombocitarnogo faktora rosta na proliferativnyuyu aktivnost' fibroblastov cheloveka. *Cell Technologies in Biology and Medicine*. 2013;(2):111–115. (In Russ.)

6. Etulain J, Mena HA, Meiss RP, Frechtel G, Gutt S, Negrotto S, et al. An optimised protocol for platelet-rich plasma preparation to improve its angiogenic and regenerative properties. *Sci Rep.* 2018;8(1):1513. PMID: 29367608 <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19419-6>
7. Amable PR, Carias RB, Teixeira MV, da Cruz Pacheco I, Corrêa do Amaral RJ, Granjeiro JM, et al. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4(3):67. PMID: 23759113 <https://doi.org/10.1186/scrt218>
8. Degen RM, Bernard JA, Oliver KS, Dines JS. Commercial Separation Systems Designed for Preparation of Platelet-Rich Plasma Yield Differences in Cellular Composition. *HSS J.* 2017;13(1):75–80. PMID: 28167878 <https://doi.org/10.1007/s11420-016-9519-3>
9. Croisé B, Paré A, Joly A, Louisy A, Laure B, Goga D. Optimized centrifugation preparation of the platelet rich plasma: Literature review. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg.* 2020;121(2):150–154. PMID:31299341 <https://doi.org/10.1016/j.jormas.2019.07.001>
10. Khubutiya MSh, Makarov MS, Khvatov VB, Vysochin IV, Kobzeva EN, Borovkova NV, et al. *Sposob otsenki morfofunktsional'nogo statusa trombotsitov cheloveka.* Patent No 2485502C1; decl. 17.02.2012; publ. 20.06.2013. Bull. No 17. (In Russ.). Available at: <https://patentimages.storage.googleapis.com/db/51/6f/194ae2d17f6f8b/RU2485502C1.pdf> [Accessed Apr 21, 2023]
11. Makarov MS, Kobzeva EN, Vysochin IV, Borovkova NV, Khvatov VB. Use of Vital Staining in Stored Human Platelets Morphofunctional Analysis. *Almanac of Clinical Medicine.* 2014;(30):83–87. (In Russ.)
12. Kozinets GI (ed.) *Prakticheskaya transfuziologiya.* Moscow: Prakticheskaya meditsina Publ.; 2005. (In Russ.)
13. Ragimov AA. (ed.) *Transfuziologiya.* Moscow: GEOTAR-Media Publ.; 2012. (In Russ.)
14. Muravyov AV, Mikhailov PV, Tikhomirova IA. Microcirculation and Hemorheology: points of interaction. *Regional blood circulation and microcirculation.* 2017;16(2):90–100. (In Russ.) <https://doi.org/10.24884/1682-6655-2017-16-2-90-100>
15. Maksimovich NE, Khodosovskiy MN, Troyan EI, Lelevich AV, Rukan TA, Maksimovich EN. *Patologicheskaya fiziologiya.* 2nd ed., exp. and rev. Grodno: GrGMU Publ.; 2014. (In Russ.)
16. Borovkova NV, Malygina MA, Makarov MS, Sakharova OM, Ponomarev IN. *Sposob lecheniya patsientov s perelomom sheyki plecha.* Patent No 2681753 S1; decl. 21.05.2018; publ. 12.03.2019. Bull. No 8. (In Russ.)

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Бурькин Кирилл Игоревич

аспирант кафедры травматологии, ортопедии и медицины катастроф ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова»;

<https://orcid.org/0000-0003-0792-2027>, bi.kirik@mail.ru;

21%: выполнение исследования, анализ и интерпретация данных, составление черновика рукописи

Боровкова Наталья Валерьевна

доктор медицинских наук, заведующая научным отделением биотехнологий и трансфузиологии ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»;

<https://orcid.org/0000-0002-8897-7523>, borovkovanv@yandex.ru;

20%: разработка концепции и дизайна исследования, анализ и интерпретация данных, окончательное утверждение рукописи

Макаров Максим Сергеевич

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отделения биотехнологий и трансфузиологии ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»;

<https://orcid.org/0000-0002-2184-2982>, mcsimmc@yandex.ru;

15%: анализ и интерпретация данных исследования, составление черновика рукописи

Пonomарев Иван Николаевич

кандидат медицинских наук, научный сотрудник отделения биотехнологий и трансфузиологии ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»;

<https://orcid.org/0000-0002-2523-6939>, rzam@yandex.ru;

15%: анализ и интерпретация данных исследования

Паршиков Михаил Викторович

заслуженный изобретатель РФ, доктор медицинских наук, профессор кафедры травматологии, ортопедии и медицины катастроф ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова»;

<https://orcid.org/0000-0003-4201-4577>, parshikovmikhail@gmail.com;

10%: проверка принципиально важного интеллектуального содержания

Ярыгин Николай Владимирович

доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН, профессор, заведующий кафедрой травматологии, ортопедии и медицины катастроф ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова»;

<https://orcid.org/0000-0003-4322-6985>, dom1971@yandex.ru;

10%: проверка принципиально важного интеллектуального содержания

Файн Алексей Максимович

доктор медицинских наук, заведующий научным отделением неотложной травматологии опорно-двигательного аппарата ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»; профессор кафедры травматологии, ортопедии и медицины катастроф ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова»;

<https://orcid.org/0000-0001-8616-920X>, finn.loko@mail.ru;

9%: проверка принципиально важного интеллектуального содержания

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Optimization of Platelet-Rich Plasma Preparation for Use in Clinical Practice

K.I. Burykin¹ ✉, N.V. Borovkova², M.S. Makarov², I.N. Ponomarev², M.V. Parshikov², N.V. Yarygin¹, A.M. Fain^{1, 2}

Department of Traumatology, Orthopedics and Disaster Medicine
¹ A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry
 20, bldg. 1, Delegatskaya Str., Moscow, 127473, Russian Federation
² N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine
 3, Bolshaya Sukharevskaya Sq., Moscow, 129090, Russian Federation

✉ **Contacts:** Kirill I. Burykin, post-graduate student, Department of Traumatology, Orthopedics and Disaster Medicine, A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry. Email: bi.kirik@mail.ru

INTRODUCTION Development of effective biological products, based on human platelets, is very actual in regenerative medicine. The initial material for biological products' obtaining is platelet-rich plasma (PRP), but the method of PRP isolation has not yet been standardized.

AIM To assess the quality of platelets in PRP, harvested by different centrifugation modes.

MATERIAL AND METHODS For platelet study, venous blood was harvested from volunteer donors. We used 3 methods for PRP-preparation, each methods included 2-stage centrifugation: 5 min 300g and 17 min 700g (Group 1); 10 min 300g and 10 min 700g (Group 2); 15 min 300g and 5 min 700g (Group 3). Platelets were examined using morphofunctional method based on vital cell staining.

RESULTS In Group 1 and Group 2, the overall safety of biologically high-grade platelets in PRP was similar and estimated 55-60% of their total content in the blood. In Group 3 the safety of biologically high-grade platelets was only 30% ($p < 0,05$).

CONCLUSION The centrifugation modes «5 min 300 g / 700 g 17 min» and «10 min 300 g / 10 min 700 g» allowed researchers to obtain equal quality PRP, while «10 min 300 g / 10 min 700 g» mode has a number of instrumental benefits.

Keywords: platelets, platelet-rich plasma, centrifugation, morphofunctional properties of platelets

For citation Burykin KI, Borovkova NV, Makarov MS, Ponomarev IN, Parshikov MV, Yarygin NV, et al. Fain Optimization of Platelet-Rich Plasma Preparation for Use in Clinical Practice. *Russian Sklifosovsky Journal of Emergency Medical Care.* 2022;12(2):268–273. <https://doi.org/10.23934/2223-9022-2022-12-2-268-273> (In Russ.)

Conflict of interest Authors declare lack of the conflicts of interests

Acknowledgments, sponsorship The study has no sponsorship

Affiliations

Kirill I. Burykin	Post-graduate student, Department of Traumatology, Orthopedics and Disaster Medicine, A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry; https://orcid.org/0000-0003-0792-2027 , bi.kirik@mail.ru; 21%, research, data analysis and interpretation, manuscript drafting
Natalia V. Borovkova	Doctor of Medical Sciences, Head, Scientific Department of Biotechnology and Transfusiology, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine; https://orcid.org/0000-0002-8897-7523 , borovkovanv@yandex.ru; 20%, study concept and design, data analysis and interpretation, final approval of the manuscript
Maxim S. Makarov	Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Scientific Department of Biotechnology and Transfusiology, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine; https://orcid.org/0000-0002-2184-2982 , mcsimmc@yandex.ru; 15%, data analysis and interpretation, drafting of the manuscript
Ivan N. Ponomarev	Candidate of Medical Sciences, Researcher, Scientific Department of Biotechnology and Transfusiology, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine; https://orcid.org/0000-0002-2523-6939 , rzam@yandex.ru; 15%, data analysis and interpretation
Mikhail V. Parshikov	Honored Inventor of the Russian Federation, Doctor of Medical Sciences, Professor, Department of Traumatology, Orthopedics and Disaster Medicine, A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry; https://orcid.org/0000-0003-4201-4577 , parshikovmikhail@gmail.com; 10%, validation of critical intellectual content
Nikolay V. Yarygin	Doctor of Medical Sciences, Corresponding Member of RAS, Professor, Head, Department of Traumatology, Orthopedics and Disaster Medicine, A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry; https://orcid.org/0000-0003-4322-6985 , dom1971@yandex.ru; 10%, validation of critical intellectual content
Alexey M. Fain	Doctor of Medical Sciences, Head, Scientific Department of Emergency Traumatology of the Musculoskeletal System, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine; Professor, Department of Traumatology, Orthopedics and Disaster Medicine, A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry; https://orcid.org/0000-0001-8616-920X , finn.loko@mail.ru; 9%, validation of critical intellectual content

Received on 23.02.2022

Review completed on 06.06.2022

Accepted on 28.03.2023

Поступила в редакцию 23.02.2022

Рецензирование завершено 06.06.2022

Принята к печати 28.03.2023