

kwartalnik

Academy of Aesthetic and Anti-Aging Medicine

Official Journal of Polish Society of Aesthetic and Anti-Aging Medicine, Division of Polish Medical Society



Wyróżniona praca absolwenta PSME

Osocze bogatopłytkowe – perspektywy klinicznego zastosowania w medycynie estetycznej

Platelet-rich plasma

– perspectives for clinical usage in aesthetic medicine

Agnieszka Pietrzykowska

Streszczenie: Autorka omawia budowę i funkcje płytek krwi oraz ich udział w procesie krzepnięcia i procesie gojenia ran i kości. Przedstawia również metody przygotowania, otrzymywania oraz aktywacji osocza bogatopłytkowego. W pracy omówiono także charakterystykę czynników wzrostu występujących w żelu płytkowym oraz parametry żelu płytkowego, kwalifikację i przygotowanie pacjenta do leczenia z zastosowaniem osocza bogatopłytkowego oraz zastosowanie osocza bogatopłytkowego w medycynie estetycznej.

Słowa kluczowe: Płytki krwi, osocze bogatopłytkowe, proces krzepnięcia, gojenie ran i kości, czynniki wzrostu, medycyna estetyczna.

Summary: Author is discussing a structure and functions of blood platelets and their contribution in coagulation and wound's and bones' healing process. She is presenting also methods of platelet-rich plasma's preparation, receiving and activation. Author is also discussing a characteristics of growth factors present in platelet gel, patient's qualification and preparation for treatment using platelet-rich plasma (PRP) and it's implementation in aesthetic medicine.

Key words: Blood platelet, platelet - rich plasma (PRP), coagulation process, wound's and bones healing, growth factors, aesthetic medicine.

W Europie jedynie w nielicznych ośrodkach rutynowo stosuje się techniki z wykorzystaniem autologicznego żelu płytkowego (Platelet Gel - PG). W USA coraz większa liczba lekarzy próbuje stosować żel płytkowy w medycynie zarówno wewnątrzszpitalnej, jak i ambulatoryjnej. Należy zadać pytanie, dlaczego ta nowatorska technika dostarczania autologicznych czynników wzrostu nie jest stosowana na szerszą skalę. Głównym powodem może być brak przekonujących dowodów naukowych, które określiłyby przydatność osocza bogatopłytkowego (Platelet Rich Plasma - PRP) i żelu płytkowego w praktyce klinicznej.

Szerokie stosowanie niniejszych technik opiera się na pozytywnej ocenie klinicznej, jednak nadal brakuje silnych podstaw naukowych. Stąd konieczne jest prowadzenie badań, które odpowiedzą na pytania dotyczące skuteczności, wydajności i bezpieczeństwa żelu płytkowego stosowanego w różnych sytuacjach klinicznych.

Nie ma wątpliwości, że zrozumienie procesu przygotowywania i stosowania opisywanych preparatów jest niezbędne do właściwej oceny oraz uniknięcia niezgodnych wyników. Publikowano bowiem sprzeczne dane na temat skuteczności żelu płytkowego, zarówno w modelu ekspe-

rymentalnym, jak i w klinice. Aby zrozumieć, dlaczego tak trudno uzyskać jednorodny preparat leczniczy, należy poznać szczegóły procesu przygotowania osocza bogatopłytkowego i żelu płytkowego. Szczególnie ważne są: metoda pobierania krwi, jakość zastosowanego osocza bogatopłytkowego, liczba płytek oraz ilość czynników wzrostu, aktywacja osocza bogatopłytkowego, zastosowanie osocza bogatopłytkowego autologicznego lub od dawcy i ogólna metodologia.

BUDOWA PŁYTKI KRWI

Płytki krwi są bezjądrowymi komórkami w kształcie płaskiego dysku o średnicy 3-4 μm . Powstają w szpiku kostnym przez fragmentację cytoplazmy megakariocytów. Średnio liczba płytek krwi u osób zdrowych wynosi $1,5-3,0 \times 10^9$ w ml krwi krążącej. Około 30% płytek krwi znajduje się w śledzionie. Żyją 8-12 dni i są usuwane z krwi przez układ siateczkowo-śródbłonkowy. Płytki krwi mają trójwarstwową błonę komórkową, z licznymi otwartymi kanałkami, przez które wydostają się substancje uwalniane z ziarnistości wewnątrzpłytkowych. Warstwą zewnętrzną błony jest otoczka (glikokaliks) bogata w gli-

3/2010

3/2010
Wiosna 2010
Cena 15 zł (z VAT)



ISSN 2081-3673

< 2081-3673 >

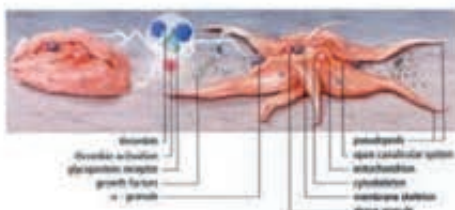
koproteiny o właściwościach receptorów dla czynników aktywujących lub hamujących czynność płytek, zawiera też białka osocza. Główny żrb błony komórkowej tworzy podwójna warstwa fosfolipidów, zawierająca białka błonowe. Podbłonowy układ mikrowłókiennki i mikrokanalików stanowi cytoszkielet płytki, warunkujący utrzymanie dyskoidalnego kształtu i jego zmiany w następstwie aktywacji. Zasadniczym składnikiem cytoszkieletu są białka kurczliwe - aktyna i miozyna. Błona płytek krwi wpukla się, tworząc skomplikowany system kanalików, mający styczność z płynem zewnątrzkomórkowym [Rysunek 1]. Cytoplazma płytkowa zawiera czynnik krzepnięcia XIII i płytkowopochodny czynnik wzrostowy komórki śródbłonka (PDGCF), jony wapniowe oraz enzymy kierujące przemianami kwasu arachidonowego, zgromadzone w układzie kanalików gęstych. Wewnątrz płytek, poza lizosomami i nielicznymi mitochondriami, znajdują się:

- 1) ziarnistości alfa - zawierające:
 - a) białka adhezyjne - fibrinogen, fibronektynę, czynnik von Willebranda (vWF), trombospondynę i vitronektynę,
 - b) czynniki wzrostu - płytkowopochodny czynnik wzrostu (PDGF), transformujący czynnik wzrostu krwi (TGF β), czynnik płytkowy 4 (PF4) i trombospondynę,
 - c) czynniki krzepnięcia i fibrynolizy - czynnik V, kinogen wielkocząsteczkowy (HMWK), inhibitor C1 fibrynogenu, czynnik XI, białko S, inhibitor aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI-1)
- 2) ziarnistości gęste - zawierające: ADP, ATP, serotoninę i jony wapnia.



Rysunek 1. Płytki krwi - morfologia.
<http://drmagrann.com/Hematology/HEMATOLOGY>
LECTURE UNIT FOUR (Platelets) Tracey Magrann

Płytki krwi normalnie znajdują się w stanie spoczynku. Płytki w stanie spoczynku nie są trombogeniczne i wymagają czynnika spustowego. Po aktywacji (np. przez trombiny) płytki zmieniają kształt i wytwarzają pseudopodia ułatwiające agregację, a następnie przez system kanalików uwalniają zawartość ziarnistości [Rysunek 2].



Rysunek 2. Płytki krwi w stanie spoczynku oraz płytka aktywowana.
Everts PAM, Knape JTA, Weibrich G, Schonberger JPAM, Hoffmann, JHL, Overdvest EP, Box HAM, van Zundert A. Platelet rich plasma and platelet gel. A review. J Extra Corpor Techn. 2006

FUNKCJA PŁYTEK KRWI

3.1. Płytki w procesie krzepnięcia krwi

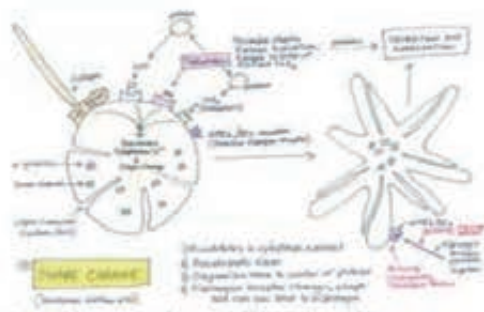
Płytki krwi pełnią dwie zasadnicze funkcje w hemostazie:

- 1) tworzą czop hemostatyczny w miejscu uszkodzenia śródbłonki naczyniowego,
- 2) uczestniczą w reakcjach krzepnięcia krwi.

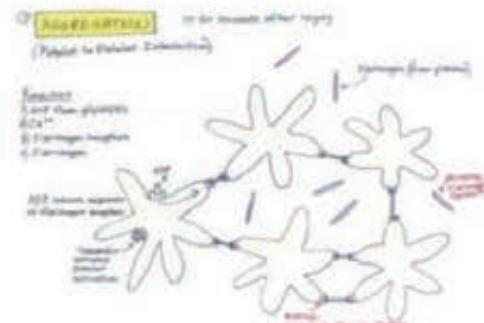
Proces krzepnięcia krwi jest zrównoważoną interakcją między płytkami, ścianą naczyń, osoczymi czynnikami krzepnięcia i związkami drobnocząsteczkowymi. Po zaistnieniu urazu (np. chirurgicznego), najważniejsze reakcje prowadzące do natychmiastowego zakrzepnięcia krwi odbywają się za pośrednictwem płytek krwi i ściany naczyń. Uszkodzone naczynia odsłaniają podbłonkowy kolagen, który, wiążąc osoczywny czynnik von Willebranda, zmienia swoją strukturę tak, aby płytki krwi mogły przylgnąć do ściany naczynia. Proces ten, zwany adhezją płytek [Rysunek 3], zachodzi dzięki receptorom glikoprotein Ib oraz IIb/IIIa, zlokalizowanym na błonie trombocytów. Aktywowane w ten sposób płytki rozpoczynają agregację. Po aktywacji cytoszkielet z dyskoidalnego przybiera kształt kulisty, uwypuklają się pseudopodia i rozpościerają nad obszarem uszkodzenia (ang. Shape change) [Rysunek 4]. Ten etap zwany jest agregacją płytek [Rysunek 5].



Rysunek 3. Adhezja płytek krwi
<http://drmagrann.com/Hematology/HEMATOLOGY>
LECTURE UNIT FOUR (Platelets) Tracey Magrann



Rysunek 4. Zmiana kształtu płytki - Shape Change.
<http://drmagrann.com/Hematology/HEMATOLOGY>
LECTURE UNIT FOUR (Platelets) Tracey Magrann



Rysunek 5. Agregacja płytek krwi.
<http://drmagrann.com/Hematology/HEMATOLOGY>
LECTURE UNIT FOUR (Platelets) Tracey Magrann

Po agregacji, przez system kanalików zostaje uwolniona zawartość ziarnistości. Wydzielona serotonina prawdopodobnie przyczynia się do skurczu naczyń. Adenozynodifosforan (ADP) powoduje degranulację sąsiednich płytek oraz sprawia, że stają się one „lepkie” i tworzą czop hemostatyczny. Wiele innych substancji jest w stanie wywołać agregację płytek oraz również aktywować fosfolipazę A2, obecną w błonie trombocytów.

Konsekwencją tego faktu jest uwolnienie przez fosfolipidy błonowe kwasu arachidonowego, który ulega przemianie w tromboksan A2, powodujący dalszą agregację płytek i uwolnienie płytkowego czynnika wzrostu (ang. platelet growth factor, PGF). Niezależnie od tromboksanu i ADP, trombina indukuje inny mechanizm powodujący agregację i degranulację trombocytów. Za sprawą tych trzech mechanizmów aktywacji płytek pierwotny czop płytkowy rozprzestrzenia się, próbując zatrzymać krwawienie z uszkodzonych naczyń. Następnie, przez wydzielane substancje aktywowany zostaje układ krzepnięcia. Najlepiej poznana funkcją płytek krwi jest tworzenie czopu płytkowego podczas pierwotnej hemostazy. Następnie inicjowana jest hemostaza wtórna, podczas której dochodzi do aktywacji czynników krzepnięcia i tworzenia sieci fibryny, stabilizującej czop płytkowy. Ostatnim krokiem jest pobudzenie leukocytów napływających w okolice skrzepu, które z kolei inicjują układ fibrynolityczny, co ostatecznie prowadzi do lizy skrzepu [Rysunek 6]. Wydzielenie zawartości ziarnistości alfa, w tym płytkowych czynników wzrostu, odbywa się prawie jednocześnie z urazem i zapoczątkowuje odbudowę tkanki i naczyń poprzez stymulację wzrostu tkanki łącznej i reawaskularyzację. Co więcej, powstanie tymczasowego czopu płytkowego i włókninowego zapobiega wniknięciu mikroorganizmów.

Opierając się na opisanym powyżej znaczeniu płytek w procesie krzepnięcia, można postawić hipotezę, że egzogeny żel płytkowy przyczyni się do wzmocnienia efektu hemostatycznego w miejscach urazu, gdzie przylega do tkanki jako czop płytkowy. Stover i wsp., ocenili perspektywnie zastosowanie żelu płytkowego jako kleju do opon mózgowych u pacjentów poddawanych kraniotomii



Rysunek 6. Etapy procesu krzepnięcia po urazie tkanki.
Everts PAM, Knape JTA, Weibrich G, Schonberger JPAM, Hoffmann, JHL, Overdvest EP, Box HAM, van Zundert A. Platelet rich plasma and platelet gel. A review. J Extra Corpor Techn. 2006

oraz zabiegom na kregostupie piersiowym i lędźwiowym, stwierdzając skuteczne zamknięcie u 39 z 40 pacjentów. Innym przykładem zastosowania jest użycie żelu płytkowego w formie aerozolu jako uszczelnacza ran oraz linii szwu u pacjentów zagrożonych przeciekaniem zespolenia lub wytworzeniem przetoki. Również u pacjentów, u których występuje ryzyko upośledzonego gojenia się rany, jak osoby z cukrzycą, można dostarczać wysokie stężenia PGF do rany za pomocą żelu płytkowego w formie aerozolu i wzmacniać naturalne procesy naprawcze.

2. Płytki w procesie gojenia się ran

Naprawa tkanek w przypadku ran i cięć chirurgicznych rozpoczyna się w momencie tworzenia czopu płytkowego, aktywacji kaskady krzepnięcia, degranulacji trombocytów i uwolnienia czynników wzrostu. W ciągu pierwszych dwóch dni procesu gojenia migracja neutrofilów, a następnie makrofagów, rozpoczyna reakcję zapalną. Pobudzone makrofagi wydzielają wiele czynników wzrostowych, w tym TGF α , TGF β (ang. transforming growth factor), PDGF (ang. platelet derived growth factor), interleukinę 1 (IL-1) oraz FGF (ang. fibroblast growth factor). Od trzeciego dnia pojawia się fibroplazja i angiogeneza, po której – między trzecim a piątym dniem – rozpoczyna się synteza kolagenu. Prowadzi to do wczesnego wzrostu wytrzymałości rany na rozzerwanie, ważnego parametru gojenia się ran chirurgicznych. Następnie dochodzi do epitelizacji i ostatecznego remodelingu. Wiele badań wykazało istotną rolę PGF na poszczególnych etapach gojenia się ran. Ilustruje to Rysunek 3.

2.1. Degranulacja płytek

Po zranieniu tkanki, uszkodzone komórki już zaczynają produkować PDGF i FGF. Gdy czop płytkowy jest już wytworzony, trombocyty ulegają degranulacji, uwalniając czynniki wzrostu, PDGF i TGF- β , które są najważniejszymi związkami na początku procesu gojenia. Częścielki PGF mają właściwości chemotaktyczne i mitogenne względnie komórek zapalnych; np. neutrofilów, monocytów i makrofagów.

2.2. Działanie pozapalne

Pierce i wsp. wykazał, że pojedyncze podanie PDGF na ranę ciętą wzmacnia odpowiedź zapalną i zwiększa napływ neutrofilów i makrofagów.

2.3. Odkładanie macierzy

PGF odgrywają również dominującą rolę w procesie syntezy i odkładania macierzy. Mustoe i wsp. wykazali na modelu doświadczalnym, że pojedyncze podanie PDGF zwiększa objętość ziarniny o 200% w ciągu 7 dni. Wykazano, że po podaniu na ranę samego TGF- β , macierz składała się głównie z nowo wytworzonego kolagenu. Ponadto, w przypadku ran leczonych steroidami lub ran napromienianych, stosowanie TGF- β przywracało sprawność gojenia i wytrzymałość rany na rozzerwanie.

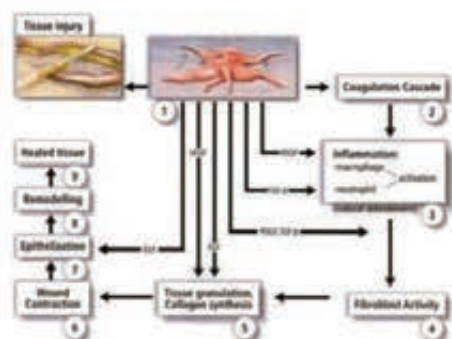
2.4. Wytwarzanie kolagenu

Barażo ważnym elementem procesu naprawy jest wytwarzanie kolagenu, które jest rozpoczynane dzięki chemotaktycznemu i mitogennemu działaniu FGF na fibroblasty.

2.5. Epitelizacja

Jak wykazały doświadczenia Nanney i wsp., miejscowe podanie czynnika wzrostu naskórka (EGF) przyspiesza epitelizację. Na początku tego procesu stwierdzono również obecność receptorów dla PDGF, co wskazuje na istotną rolę PDGF podczas epitelizacji. Podczas ostatniej fazy gojenia zarówno FGF jak i PDGF skracają czas ściągania brzegów rany i remodelingu.

Działanie poszczególnych płytkowych czynników wzrostu w procesie naprawy czyni interesującą propozycję zastosowania żelu płytkowego w leczeniu ran (Rysunek 7).



Rysunek 7. Schemat przedstawiający rolę płytkowych czynników wzrostu w procesie gojenia (liczby w kółkach oznaczają kolejne etapy gojenia rany).

EGF - czynnik wzrostu naskórka (ang. epidermal growth factor)
 FGF - czynnik wzrostu fibroblastów (ang. fibroblast growth factor)
 PDGF - płytkowy czynnik wzrostu (ang. platelet derived growth factor)
 TGF- β - transformujący czynnik wzrostu beta (ang. transforming growth factor beta)
 VEGF - czynnik wzrostu śródbłonnika naczyń (ang. vascular endothelial growth factor)

Everts PAM, Knappe JTA, Weibrich G, Schonberger JPAM, Hoffmann, JIHL, Overvest EP, Box HAM, van Zundert A. Platelet rich plasma and platelet gel. A review. J Extra Corpor Techn. 2006

3. Zastosowanie żelu płytkowego w procesie gojenia się ran

W porównaniu z pojedynczymi, rekombinowanymi czynnikami wzrostu, stosowanie żelu płytkowego ma przewagę polegającą na podaniu wielu współdziałających czynników wzrostowych, które pobudzają mitogenezę mezenchymalnych komórek macierzystych w miejscu uszkodzenia.

Obiecujące rezultaty i wskazania do stosowania żelu płytkowego obejmują leczenie przewlekłych, trudno gojących się ran oraz wspomaganie gojenia ran powstających u osób obciążonych ryzykiem upośledzonego gojenia (np. osoby z cukrzycą). Żel płytkowy był z powodzeniem stosowany u pacjentów z niegojącymi się owrzodzeniami w przebiegu cukrzycy. Margolis i inni badacze wykazali, na dużych grupach pacjentów, że stosowanie wydzielanych przez płytki krwi związków było skuteczniejsze niż standardowe metody leczenia ran. Interwencja była skuteczniejsza również u osób z głębszymi ranami. Podsumowując, istnieją mocne dowody wskazujące na użyteczność żelu płytkowego w leczeniu przewlekłych, trudno gojących się ran oraz konieczność jest prowadzenie badań klinicznych nad rehabilitacją i wczesniejszym powrotem do sprawności funkcjonalnej po zabiegach chirurgicznych.

4. Rola płytek krwi w procesie gojenia kości

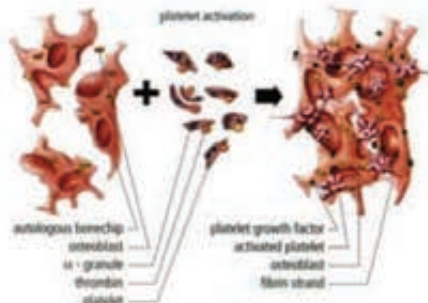
Podczas gojenia kości, osteoblasty wydzielają czynniki wzrostu podobne do tych zawartych w płytkach krwi. Przeciwnie, osteoklasty są komórkami resorbującymi tkankę i podlegają kontroli humoralnej i komórkowej. We właściwych warunkach aktywność osteoklastów i osteoblastów jest w równowadze.

Podczas naprawy i gojenia złamania kości (np. tworzenia kostnicy) płytki krwi pełnią rolę egzogennego źródła czynników wzrostowych, które we właściwy dla siebie sposób stymulują komórki tkanki kostnej. Tak jak w przypadku gojenia ran, naprawa uszkodzenia kości obejmuje trzy etapy: zapalenie, proliferację i remodeling. W miejscu złamania trombocyty uwalniają PDGF, TGF- β i EGF, które dostarczane są do punktu uszkodzenia. Najbogatszym źródłem TGF- β są płytki krwi, tkanka kostna i chrząstka. Płytki zawierają dwie izoformy TGF: β 1 i β 2. TGF- β 1 prezentuje największy potencjał naprawczy w tkance kostnej, ponieważ zarówno chondrocyty, jak i osteoblasty, posiadają bardzo liczne receptory dla tej cząsteczki. Co więcej, TGF- β przyczynia się do gojenia tkanki kostnej na wszystkich etapach. Wykazano, że połączenie płytkowych czynników TGF- β , FGF, i EGF tworzy optymalny poziom stymulacji do różnicowania i proliferacji osteoblastów do komórek osteogennych. Podobnie wzmacnieniu ulega wpływ PDGF na proliferację mezenchymalnych komórek macierzystych po dodaniu TGF- β i EGF.

5. Zastosowanie żelu płytkowego w procesie gojenia się kości

Niedawno zastosowano osocze bogatopłytkowe na modelu złamania kości udowej ze współistniejącą cukrzycą, uzyskując normalizację wczesnej proliferacji komórek i chondrogenyzy, co prowadziło do zwiększenia wytrzymałości mechanicznej.

Przeszczepy kostne są szeroko stosowane do wypełniania ubytków w kościach oraz podczas wykonywania różnych zespoleni. Stąd też ich częste użycie w leczeniu złamań. Można przypuszczać, że połączenie osocza bogatopłytkowego i trombiną (żel płytkowy) z autologiczną kością pozwoli uzyskać „bio-modyfikowany” (ang. bio-engineered) przeszczep (Rysunek 8). Wynikiem takiego połączenia jest materiał bogaty w płytki krwi uwalniające czynniki wzrostu. Dzięki lepkościom właściwościom żelu, kawałki wszczepu nie ulegają przemieszczeniu.



Rysunek 8. Graficzne przedstawienie przeszczepu kostnego „bio-modyfikowanego” przy pomocy żelu płytkowego. Kawałki kości autologicznej wymieszane zostają z osoczem bogatopłytkowym i trombiną. Wynikiem jest graf kostny, wzbogacony w płytki krwi uwalniające czynniki wzrostu. Dzięki lepkościom właściwościom żelu płytkowego kawałki wszczepu pozostają sklejone i nie ulegają przemieszczeniu.

Everts PAM, Knappe JTA, Weibrich G, Schonberger JPAM, Hoffmann, JIHL, Overvest EP, Box HAM, van Zundert A. Platelet rich plasma and platelet gel. A review. J Extra Corpor Techn. 2006

PRZYGOTOWANIE OSOCZA BOGATOPŁYTKOWEGO

Osocze bogatopłytkowe przygotowuje się w okresie okołoperacyjnym z autologicznej jednostki pełnej krwi. Produkcja preparatu może odbyć się standardowymi metodami, jakimi posługują się banki krwi lub z wykorzystaniem urządzeń „w miejscu leczenia” (ang. point-of-

Tabela 1. Zestawienie obecnie dostępnych urządzeń typu cell-saver/seperator.

Nazwa urządzenia	Producent	Specyfikacja zbiornika	Przepływ	Objętość worka (ml)
BRAV 2	Celtec Cardiovascular Inc, Nevada, CO, USA	Typu Baylora	przerywany	55, 125, 175, 225, 240
COMPACT A ELECTA	Sorin Group Mirandola, Italy	Typu Latham	przerywany	55, 125, 175, 225
Fresenius CAES	Fresenius Kabi AG Bad Homburg Germany	separacja (bezbiornikowy)	ciągły	N/A
Haemonetics CS 5 PLUS	Haemonetics Corporation Braintree, MA, USA	Typu Latham	przerywany	70, 125, 225
Sequester 1000	Medtronic Inc, Minneapolis, MN, USA	Typu Latham	przerywany	125, 225

Everts PAM, Knape JTA, Weibrich G, Schonberger JPAM, Hoffmann, JHHL, Overvest EP, Box HAM, van Zundert A. Platelet rich plasma and platelet gel. A review. *J Extra Corpor Techn.* 2006

care], takich jak cell-saver, cell-separator czy urządzenia przenośne (biurkowe). Produkcja osocza bogatopłytkowego przez banki krwi z wykorzystaniem plazmaferezy powinna być ograniczana ze względu na wyższe koszty i opóźnioną dostępność preparatu, w porównaniu z technikami „przyłóżkowymi”.

Na rynek wprowadzono dwie wirówki do stosowania „w miejscu leczenia”, które zapewniają optymalne warunki do otrzymania osocza bogatopłytkowego. W przypadku urządzeń typu cell-saver i cell-separator można wykorzystać większą ilość pobranej krwi (od 250 do ponad 500 ml krwi pełnej), co pozwala wytworzyć od 20 do ponad 50 ml osocza bogatopłytkowego.

Niewielkie wirówki biurkowe używane są do produkcji mniejszych ilości osocza bogatopłytkowego również z mniejszej ilości oddanej krwi pełnej (50-150 ml). Wybór techniki poddyktowany jest głównie rodzajem zabiegu oraz przewidywanym zapotrzebowaniem na żel płytkowy. Rozsądne wydaje się więc odzyskiwanie krwi podczas operacji z dużym krwawieniem, gdzie jednocześnie będzie stosowany żel płytkowy. Przeciwnie, w operacjach, gdzie krwawienie jest niewielkie i również niewielka jest ilość użytego żelu płytkowego, stosuje się wirówki „biurkowe” (ang. table-top devices). W Tabeli 1 umieszczono zestawienie obecnie dostępnych urządzeń typu cell-saver/seperator, natomiast

Tabela 2 zawiera informacje o urządzeniach „biurkowych”.

METODY OTRZYMYWANIA OSOCZA BOGATOPŁYTKOWEGO

Typowo, krew od pacjenta pobiera się z żyły obwodowej (np. pośredniej łokcia). Jeśli do produkcji osocza bogatopłytkowego używany jest cell-saver, krew zbierana jest grawitacyjnie do standardowych worków, nie przekraczając maksymalnej dozwolonej objętości w stosunku do zawartego w worku cytrynianu [Rysunek 10]. W przypadku urządzeń „biurkowych”, krew jest ostrożnie nabierana do strzykawki, z unikaniem dużego podciśnienia.

Rozmiar igły większy niż 17G pozwala uchronić płytki krwi przed ich zniszczeniem podczas pobierania. Pobierana krew jest mieszana z odpowiednią ilością antykoagulantu ACD-A (ang. anticoagulant citrate dextrose-A solution; kwas cytrynowy, cytrynian trisodowy, glukoza). Należy utrzymać stosunek 1 ml ACD-A do 7-8 ml pełnej krwi. Próbkę z krwią należy delikatnie wstrząsać, aby doznała do wymieszania z antykoagulantem.

Tabela 2. Zestawienie obecnie dostępnych „biurkowych” systemów do produkcji osocza bogatopłytkowego.

Nazwa urządzenia	Producent	Pozyskane preparaty	Objętość PRP	RPM
Argel™	Sorin Group Mirandola, Italy	RBC, PPP, PRP	5 - 18	max 4000
Genesis CS™	Erycye Corporation Ft. Myers, FL, USA	BMC, PPP, PRP	4 - 10	2400
GPS II™	Biomat Warsaw, IN, USA	PPP, PRP	5 - 6	3200
Magellan™	Medtronic Inc, Minneapolis, MN, USA	RBC, PPP, PRP	1 - 8	max 4000
Secure™	PPAI Medical Ft. Myers, FL, USA	RBC, PPP, PRP	7	3500
Symphony II™	dePuy Inc, Raytown, MS, USA	PPP, PRP	7	2 stół prędkości
Vivostat™	Vivalution A/S Birkerød, Denmark	PRP, FS	5 - 7	brak danych

BMC - koncentrat szpiku kostnego (ang. bone marrow concentrate); FS - kiej fibrynowy (ang. fibrin sealant); N/A - nie dotyczy; PPP - osocze ubogopłytkowe (ang. platelet poor plasma); PRP - wkładki bogatopłytkowe (ang. platelet rich fibrin); PRP - osocze bogatopłytkowe (ang. platelet rich plasma); RBC - krwinki czerwone (ang. red blood cells).

Everts PAM, Knape JTA, Weibrich G, Schonberger JPAM, Hoffmann, JHHL, Overvest EP, Box HAM, van Zundert A. Platelet rich plasma and platelet gel. A review. *J Extra Corpor Techn.* 2006

Obecnie, większość urządzeń typu cell-saver używa zbiornika Latham'a - zwięzłego o pojemności 50-225 ml (ang. Latham's bowl) zamiast prostego (ang. straight Baylor bowl). Do produkcji osocza bogatopłytkowego mogą również być użyte systemy do ciągłej autotransfuzji, bezbiornikowe. Urządzenia te oddzielają w sposób półautomatyczny osocze ubogopłytkowe (ang. platelet poor plasma - PPP) od koagulacji oraz erytrocytów poprzez wirowanie z prędkością 5600 obr./min. PPP trafia do osobnego worka. Następnie, w celu uzyskania koagulacji z osocza bogatopłytkowego i leukocytów (który trafia do kolejnego, osobnego worka lub strzykawki), wirowanie odbywa się z prędkością 2400 obr./min. Oddzielone tym razem krwinki czerwone trafiają do osobnego worka. Zebrane PPP i erytrocyty podawane są zwracanie pacjentowi w odpowiednim czasie. Otrzymane osocze bogatopłytkowe wykorzystane jest do wytworzenia żelu płytkowego, stosowanego następnie na tkankę.

W przypadku mniejszych urządzeń „biurkowych” ma miejsce podobna procedura, oparta na szybkim i wolniejszym wirowaniu. Zależnie od urządzenia, mogą one rozdzielać wszystkie składniki krwi lub jedynie zbierać osocze bogatopłytkowe. Jeśli krwinki czerwone i osocze ubogopłytkowe nie są podawane zwracanie pacjentowi, zostają wyrzucane.

Niezależnie od rodzaju metody uzyskiwania osocza bogatopłytkowego, celem procedury jest uzyskanie wyższej liczby trombocytów niż we krwi pełnej pacjenta [Rysunek 9].

AKTYWACJA OSOCZA BOGATOPŁYTKOWEGO

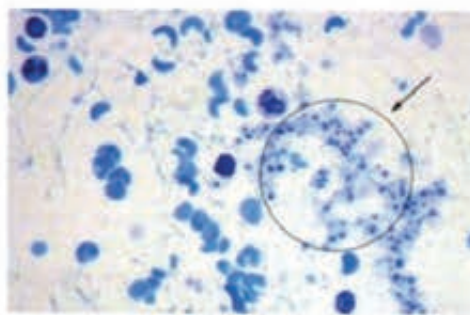
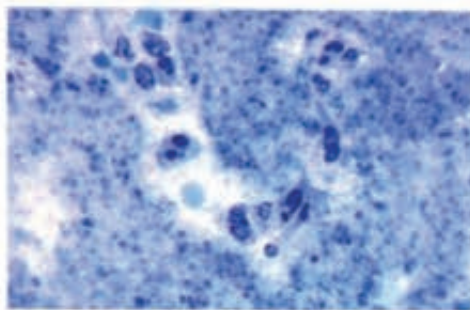
Ziarnistości alfa nieaktywowanych płytek w osoczu bogatopłytkowym zawierają PGF, które nie znajdują się w kontakcie z tkanką i dlatego są nieczynne. Aby zainicjować uwolnienie czynników wzrostu, płytki muszą zostać aktywowane. Najmniejszym aktywatorem płytek jest trombina, która indukuje natychmiastowe uwolnienie PGF w sposób zależny od dawki.

W USA „złotym standardem” jest stosowanie trombiny (dostępnej w handlu), uzyskiwanej z osocza bydźcego, pomimo, że wiązano ją z wytwarzaniem przeciwciał przeciwko czynnikom krzepnięcia V, XI i trombinie, co rzadko powodowało niebezpieczne dla życia koagulopatie. Alternatywnie, można aktywować osocze bogatopłytkowe przez dodanie autologicznej trombiny, uzyskanej przy użyciu komercyjnych zestawów wykorzystujących PPP lub PRP [Tabela 3]. Niedawno, Tsay i wsp. opisał zastosowanie syntetycznego peptydu podobnego do trombiny, nazywanego TRAP-6 (ang. Thrombin Receptor Activator Peptide 6, peptyd aktywujący receptor dla trombiny) lub SFLLRN. Aktywacja za pomocą TRAP prowadzi do dłużej utrzymującego się wydzielania PGF z mniejszą retrakcją PG oraz uzyskaniu wyższych stężeń PDGF-AB i TGF-β.

Mechanizm utrzymującego się wydzielania jest niejasny ale prawdopodobnie może przyczynić się do dojrzewania przeszczepów kostnych wzbogaconych płytkami oraz gojenia tkanek.

Zmieszanie PRP z trombiną i chlorkiem wapnia, który antagonizuje antykoagulacyjne działanie cytrynianu (obecnego w pojemniku na preparaty krwiopochodne), prowadzi do aktywacji koncentratu trombocytów i powstania lepkiego żelu płytkowego. Może on być następnie podany przy pomocy strzykawki lub jako galaretowata masa na tkankę miękkie, kość lub syntetyczną tkankę kostną.

Z chirurgicznego punktu widzenia „idealna” procedura z wykorzystaniem PG zapewnia coagulum w ciągu 10 sekund. Jednak czas jego tworzenia jest raczej funkcją stężenia aktywowanego fibrynogenu niż liczby płytek.

Rysunek 9. Rozmaz krwi obwodowej, liczba płytek wynosi 276000 w μl . Kółkiem zaznaczono płytki krwi[2].Rysunek 10. Rozmaz osocza bogatopłytkowego. Duża gęstość płytek odpowiada ich liczbie 2.750.000/ μl , objętość próbki wynosi 7 ml. Przygotowano przy pomocy systemu Argel PRP[2].