

Применение препаратов PRP В КОСМЕТОЛОГИИ

Зорина А.И.

кандидат медицинских наук,
главный специалист по применению
клеточных технологий, Институт
стволовых клеток человека (Москва)

Зорин В.Л.

кандидат биологических
наук, руководитель отдела
регенеративной медицины,
Институт стволовых клеток
человека (Москва)

PRP (Platelet-Rich Plasma, плазма крови, обогащенная тромбоцитами) содержит множество факторов роста и цитокинов, которые оказывают существенное нормализующее влияние на биологические процессы, лежащие в основе регенерации и репарации тканей, — пролиферацию клеток и их миграцию, воспаление, ангиогенез, адекватный синтез компонентов межклеточного матрикса. В этой связи PRP-терапия представляет большой практический интерес в плане ее применения в терапевтической косметологии.

Тромбоциты как источник ростовых факторов

Согласно R. Marx с соавт. (2001), PRP (множество тромбоцитов, сконцентрированных в небольшом объеме плазмы крови) — это плазма крови, концентрация тромбоцитов в которой превышает норму [1]. В норме концентрация тромбоцитов колеблется в пределах 150–350 тыс. кл/мкл и в среднем составляет 200 тыс. кл/мкл. Терапевтически эффективной концентрацией препарата PRP считается (хотя количество и подсчет тромбоцитов еще не оптимизированы) концентрация тромбоцитов более 1 млн кл/мкл, т.е. примерно от 4 до 7 раз превышающая средний уровень тромбоцитов в крови [1, 2].

Тромбоциты служат богатым источником факторов роста (ФР), цито-хемокинов, а также плазматических белков крови (фибрина, фибронектина, витронектина и др.), которые депонируются в органеллах этих клеток — α-гранулах, электронно-плотных тельцах и лизосомах [1, 2]. Такой коктейль из факторов роста (**табл. 1**) играет ключевую роль в регуляции процесса восстановления и регенерации тканей, в то время как плазматические белки крови служат в качестве каркаса при регенерации соединительной ткани и миграции эпителиальных клеток [2, 3].

Основные ФР накапливаются в α-гранулах, откуда посредством экзоцитоза высвобождаются после активации тромбоцитов во внеклеточную среду. За первые 10 мин тромбоциты секретируют около 70% ФР, и далее, в течение 1 ч, происходит практически полное их высвобождение. Синтез дополнительного количества ФР тромбоцитами продолжается еще на протяжении не менее 7 дн, после чего они завершают свой жизненный цикл [4].

В настоящее время описано более 30 ФР, содержащихся в α-гранулах тромбоцитов, среди которых особый интерес, в частности для эстетической медицины, представляют фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), эпидермальный фактор роста (EGF), основной фактор роста фибробластов (β-FGF), трансформирующий фактор роста-β1 (TGF-β1), инсулиноподобный фактор роста (IGF; **табл. 1**).

Так, в клеточных культурах в присутствии PRP выявлена индукция пролиферации фибробластов, кератиноцитов, эндотелиальных клеток, образования капилляров [5–9]. При совместном культивировании мультипотентных мезенхимных стволовых клеток (ММСК), выделенных из жировой ткани (СКЖТ)

Таблица 1

Основные факторы роста, входящие в состав PRP, и их функции [3]	
Факторы роста*	Функции
PDGF	Активация миграции и пролиферации ММСК, фибробластов, гладкомышечных клеток, остеобластов; активация миграции моноцитов, макрофагов, нейтрофилов; активация макрофагов
TGF-β1	Индукция синтеза МКМ, регуляция пролиферации кератиноцитов и стимуляция продукции коллагена
VEGF	Стимуляция пролиферации эндотелиальных клеток и ангиогенеза, стимуляция лимфоангиогенеза, повышение проницаемости сосудистой стенки
EGF	Стимуляция миграции кератиноцитов, стимуляция пролиферации эпителиальных, мезенхимных клеток и фибробластов; стимуляция миграции и пролиферации эндотелиальных клеток и ангиогенеза, регуляция продукции коллагеназ
FGF	Индукция пролиферации фибробластов; стимуляция роста эндотелиальных клеток; стимуляция ангиогенеза, стимуляция роста сосудов
IGF	Стимуляция пролиферации фибробластов, синтез коллагена и других компонентов МКМ

* PDGF (platelet-derived growth factor) — тромбоцитарный фактор роста; TGF-β1 (transforming growth factor-beta1) — трансформирующий фактор роста; VEGF (vascular endothelial growth factor) — фактор роста эндотелия сосудов; EGF (epidermal growth factor) — эпидермальный фактор роста; FGF (fibroblast growth factor) — фактор роста фибробластов; IGF (insulin-like growth factor) — инсулиноподобный фактор роста.

и PRP, был обнаружен стимулирующий эффект последней на пролиферацию СКЖТ [10, 11]. N. Kakudo с соавт. (2008) также показали, что «активированная» PRP содержит большое количество PDGF-AB и TGF-β, которые усиливают пролиферацию фибробластов кожи человека и СКЖТ [10]. В общей сложности в 13 исследованиях *in vitro* с 2001 по 2014 г. было показано, что PRP и PRFM оказывают значительный эффект на клеточную активность [12].

В ряде исследований была выявлена антибактериальная активность PRP, в частности, против метициллин-чувствительного (MSSA) и метициллин-резистентного (MRSA) золотистого стафилококка (*St. Aureus*) и кишечной палочки (*E. coli*) [13, 14].

Следует отметить, что механизм антибактериального действия PRP до конца не изучен. Предполагают, что он связан с содержащимися в тромбоцитах антимикробными пептидами и лейкоцитами (которые также входят в состав некоторых препаратов PRP).

К настоящему времени выделено 7 антимикробных пептидов:

- fibrinopeptide A;
- fibrinopeptide B;
- thymosin b-4;
- platelet basic protein;
- connective tissue activating peptide 3;
- RANTES;
- platelet factor 4 [14].

И те и другие способны оказывать как прямой, так и опосредованный антибактериальный эффект за счет участия в антиген-специфических иммунных реакциях. В экспериментах на животных также было продемонстрировано усиление основополагающих процессов репарации поврежденных тканей под действием препаратов PRP: отмечены стимуляция пролиферации фибробластов и эндотелиальных клеток, индукция неоваскуляризации и ангиогенеза, увеличение синтеза коллагена I типа [5, 12, 15–17].

На сегодняшний день механизм действия PRP на ткани, особенно на здоровую кожу (например, при коррекции ее возрастных изменений), не вполне ясен. Однако известно, что ФР и цитокины, содержащиеся в PRP, оказывают существенное нормализующее влияние на биологические процессы, лежащие в основе регенерации и репарации тканей, — пролиферацию клеток и их миграцию, воспаление, ангиогенез, а также адекватный синтез компонентов межклеточного матрикса (МКМ) [2, 12, 18–20].

Технология получения и классификация препаратов PRP

В техническом руководстве, изданном Американской ассоциацией банков крови (American Association of Blood Banks), указывается, что «обогащенную тромбоцитами плазму крови получают из цельной крови при помощи низкоскоростного центрифугирования, а затем тромбоциты концентрируют при помощи высокоскоростного центрифугирования с последующим удалением супернатанта, состоящего из плазмы крови» [2].

Сегодня препараты PRP получают посредством разных методик и оборудования. Называются они также по-разному, в зависимости от биохимической структуры получаемого препарата: PRP (Platelet-Rich Plasma — обогащенная тромбоцитами плазма крови, суспензия), PRG (Platelet-Rich Gel — обогащенный тромбоцитами гель), PRF (Platelet-Rich Fibrin — обогащенный тромбоцитами фибрин), PRFM (Platelet-Rich Fibrin Matrix — обогащенный тромбоцитами фибриновый матрикс). В России получило распространение название «плазмолифтинг» [21].

Согласно последней международной классификации, предложенной объединенным коллективом специалистов из Швейцарии, США, Италии, Польши, Швеции, Голландии, Южной Кореи [22], все препараты PRP (табл. 2) подразделяют на 4 категории в зависимости от содержания в них лейкоцитов и фибрина:

- **чистая обогащенная тромбоцитами плазма крови (P-PRP — Pure Platelet-Rich Plasma)**, которую получают с помощью сепаратора крови (separator PRP) методами Vivostat PRF или Anitua's PRGF;
- **обогащенная лейкоцитами и тромбоцитами плазма крови (L-PRP — Leucocyte and Platelet-Rich Plasma)**, методы получения — Curasan, Regen, Plateltex, SmartPReP, PCCS, Magellan и GPS PRP;
- **чистый обогащенный тромбоцитами фибрин (P-PRF — Pure Platelet-Rich Fibrin)**, метод получения — Fibrinet;
- **обогащенный лейкоцитами и тромбоцитами фибрин (L-PRF — Leucocyte and Platelet-Rich Fibrin)**, метод получения — Choukroun's PRF [23].

В настоящей статье мы также будем придерживаться данной классификации.

Следует отметить, что P-PRP- и L-PRP-суспензии относятся к неактивированным жидким формам PRP-продуктов, тогда как P-PRP и L-PRP фибриновые гели — к активированным (хлоридом кальция и другими агентами) формам. При этом неактивированные препараты PRP не могут рассматриваться как неактивные препараты, поскольку предполагается, что их полная активация только отложена и происходит после контакта с тканями организма [22].

На отечественном рынке предлагается ряд коммерческих технологий получения PRP и проведения процедуры PRP-терапии (в виде набора необходимых инструментов, емкостей и реактивов), но только некоторые из них сертифицированы. К таковым относятся:

- 1) REGEN LAB (Швейцария) — РУ № ФСЗ 2011/11417 от 30.12.2011; РУ № ФСЗ 2011/10571 от 30.12.2011;
- 2) ENDORET-PRGF (Испания) — РУ № РЗН 2014/1995 от 7.11.2014;
- 3) YCELLBIO-KIT (Южная Корея) — РУ № РЗН 2014/2149 от 08.12.2014.

Известны 3 типа параметров, которыми определяются все существующие методы получения PRP-препаратов [25]:

- характеристики центрифуги и набора для процессинга препарата (размер центрифуги, режим/время центрифугирования, стоимость центрифуги/расходников);
- показатели эффективности выделения тромбоцитов и лейкоцитов (их жизнеспособность и конечное содержание / концентрация в продукте);
- качество/плотность фибриновой сетки (низкая/высокая).

Такая классификация, по мнению ее разработчиков, должна способствовать стандартизации получения препаратов PRP, а также помочь разобраться в случаях неуспешного применения PRP-терапии.

Все существующие способы получения препаратов PRP содержат как общие ключевые технологические моменты (забор крови, использование антикоагулянта, двукратное центрифугирование крови, активация тромбоцитов), так и специфические для каждого типа препарата PRP особенности. На последних остановимся более подробно.

1. Получение P-PRP и L-PRP — чистой обогащенной тромбоцитами плазмы крови и обогащенной лейкоцитами и тромбоцитами плазмы крови

Данные препараты можно получить методом плазмофоре́за с использованием специальных аппаратов, осуществляющих дифференциальное ультрацентрифугирование (как правило, при 3000 g). Однако этот метод является трудоемким и дорогим, поэтому на практике, как правило, применяют т.н. классический — «ручной» протокол с использованием двухэтапного процесса центрифугирования (**рис. 1, шаг 1, шаг 2А, шаг 2В**) [24].

Шаг 1. Разделение крови путем центрифугирования на 3 слоя

Цельную кровь собирают в пробирки с антикоагулянтом и центрифугируют в течение 10 мин при низких (230 – 270 g) оборотах. В результате получают три основных слоя:

- нижний (RBC, red blood cells) — эритроциты;
- промежуточный (buffy coat, BC) — слой беловатого цвета, содержащий тромбоциты и лейкоциты;
- верхний (PPP, platelet-poor plasma) — обедненная тромбоцитами плазма крови.

При использовании данного протокола используют антикоагулянты на основе солей цитрата натрия и раствора глюкозы с аденином и без аденина — acid citrate dextrose (ACD, ACD-A), citrate phosphate dextrose (CPD, CPD-A), а также сукцинат натрия. Эти антикоагулянты в отличие от солей гепарина препятствуют спонтанной активации тромбоцитов, что важно для правильного процессинга препаратов PRP.

Следует помнить, что при однократном центрифугировании невозможно получить истинную PRP, содержание тромбоцитов в которой не меньше 1 млн/мкл. Однократное центрифугирование позволяет получить лишь обычную плазму с физиологическим содержанием тромбоцитов и соответственно с физиологической концентрацией ФП (**рис. 1, шаг 1**). В качестве примера может служить технология «Плазмолифтинг» (Россия) [21]. (Технология «ENDORET-PRGF» (Испания) [61] основана также на однократном центрифугировании, но коэффициент увеличения тромбоцитов у данной технологии — 2,5 раза).

Для получения истинных PRP-препаратов необходимо провести еще один — второй — этап центрифугирования. Причем в зависимости от того, какие именно слои отбираются для повторного центрифугирования, на выходе получают или P-PRP, или L-PRP (**рис. 1, шаг 2А**).

Шаг 2А. Получение P-PRP — чистой обогащенной тромбоцитами плазмы

После первого («мягкого») центрифугирования (**рис. 1, шаг 1**) осторожно отбирают весь слой PPP (бедную тромбоцитами плазму) и верхнюю часть слоя BC (именно в этом слое содержится основное количество тромбоцитов) и переносят их в новую пробирку (**рис. 1, шаг 2А**). При этом большая часть лейкоцитов, которые содержатся в нижней части слоя BC на границе с эритроцитами, так же, как и небольшое количество присутствующих там же эритроцитов, в новую пробирку не попадают.