

Terapia autologicznym osoczem bogatopłytkowym (PRP) — obiecująca metoda leczenia regeneracyjnego uszkodzonych tkanek stosowana w wielu dziedzinach medycyny

Łukasz Piszczorowicz^{ORCID}, Dorota Król^{ORCID}, Stanisław Dyląg

Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Katowicach

Artykuł jest tłumaczeniem pracy:

Piszczorowicz Ł, Król D, Dyląg S. Autologous platelet-rich plasma therapy — a promising method for tissue repair/regeneration in many medical fields. *J Transf Med* 2020; 13(2): 135–148. DOI: 10.5603/JTM.2020.0004.

Należy cytować wersję pierwotną.

Streszczenie

Terapia osoczem bogatopłytkowym (PRP) jest powszechnie stosowana w wielu dziedzinach medycyny i zyskuje coraz większą popularność w leczeniu licznych schorzeń. Płytki krwi zawierają fizjologicznie aktywne białka, zwane czynnikami wzrostu (GFs), które przyspieszają regenerację uszkodzonej tkanki. Stymulowanie regeneracji uszkodzonej tkanki jest możliwe dzięki zastosowaniu własnej krwi pacjenta, która musi przed podaniem zostać poddana odpowiedniej preparatyce. Preparatyka PRP polega na kilkukrotnym zagęszczeniu krwinek płytkowych w porównaniu z ich stężeniem w krwi obwodowej pacjenta. Ze względu na to, że leczenie opiera się na wykonywaniu zabiegów autologicznych, ryzyko zakażenia pacjenta jest znikome, jakkolwiek w pewnych sytuacjach niektóre czynniki ryzyka ograniczają stosowanie PRP i mogą się przyczynić do wystąpienia objawów niepożądanych. Preparatyka jest stosunkowo tania i szybka, i może być przeprowadzana w obecności pacjenta.

W literaturze przedmiotu można spotkać zarówno różne definicje PRP, uwzględniające zróżnicowane sposoby preparatyki, zagęszczania i aktywacji krwinek płytkowych, jak i różne sposoby ich aplikacji do uszkodzonej tkanki i wreszcie różne efekty leczenia tym preparatem. Jednocześnie potwierdzenie skuteczności terapii PRP jest trudne, jeśli porównuje się ze sobą leczenie różnych chorób. Autorzy jednoznacznie podkreślają potrzebę standaryzacji preparatyki i określenia sposobu aplikacji w zależności od jednostki chorobowej. Brak ujednoczenia procedur preparatyki i sposobu podawania PRP rodzi wiele pytań i kontrowersji, jednak terapia PRP uważana jest za obiecującą metodę leczenia.

Celem tej pracy jest analiza piśmiennictwa dotyczącego zastosowania osocza bogatopłytkowego, z uwzględnieniem mechanizmu jego działania.

Słowa kluczowe: osocze bogatopłytkowe (PRP), preparatyka PRP, płytki krwi (PLT), czynniki wzrostu (GFs), regeneracja tkanek

J. Transf. Med. 2020; 13: 120–134

Wstęp

Termin osocze bogatopłytkowe (PRP, *platelet-rich plasma*) został stworzony przez hematologów w latach 70. XX wieku w celu opisanego osocza o zwiększonym stężeniu krwinek płytkowych w porównaniu ze stężeniem krwinek płytkowych w krwi obwodowej, którym początkowo leczono chorych z trombocytopenią. Dziesięć lat później PRP zaczęto stosować w chirurgii szczękowo-twarzowej, a następnie wykorzystywać w medycynie sportowej w leczeniu urazów [1]. W 1974 roku Kohler i Lipton w badaniach nad fibroblastami odkryli, że płytki krwi (PLT, *platelets*) mogą być traktowane jako stymulator wzrostu [2]. W kolejnych latach odkryto, że PLT są źródłem wielu czynników wzrostu (GFs, *growth factors*). Najistotniejsze z nich to: płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF, *platelet derived growth factor*), transformujący czynnik wzrostu $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$, *transforming growth factor $\beta 1$*), transformujący czynnik wzrostu $\beta 2$ (TGF- $\beta 2$, *transforming growth factor $\beta 2$*), insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF, *insulin-like growth factor*), epidermalny czynnik wzrostu (EGF, *epidermal growth factor*), naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF, *vascular endothelial growth factor*), czynnik wzrostu fibroblastów (FGF, *fibroblast growth factor*) czy czynnik wzrostu hepatocytów (HGF, *hepatocyte growth factor*) [3–5]. Pierwsze kliniczne zastosowanie autologicznego PRP podczas zabiegów chirurgicznych na otwartym sercu opisali Ferrari i wsp. w 1987 roku we Włoszech. Użycie autologicznych koncentratów krwinek płytkowych i koncentratów krwinek czerwonych nie wymagało wykonywania transfuzji homologicznych krwi podczas zabiegu i przez to zmniejszyło koszty procedur [6]. Od tego czasu zwiększyło się zainteresowanie tego typu preparatami i poszerzyło się ich zastosowanie w innych dziedzinach medycyny. W 1994 roku Tayapongsak i wsp. jako pierwsi zastosowali PRP w zabiegach rekonstrukcji żuchwy [7], a od roku 1997 PRP zaczęto stosować w chirurgii jamy ustnej i przy zabiegach dentystrycznych [8, 9]. Równocześnie rozwijała się wiedza na temat zastosowania kleju fibrynowego. Koncentraty fibrynogeny, zawierające stabilizujący fibrynę czynnik XIII, wraz z roztworem trombiny i w niektórych przypadkach aprotyniny (właściwości antyfibrynolityczne) były w 1972 roku wykorzystywane w odnowie uszkodzonych nerwów obwodowych, najpierw u zwierząt, a później (w 1974 roku) u ludzi. Chociaż komercyjnie dostępne kleje fibrynowe były powszechnie stosowane w Europie od lat 70. XX wieku, w Stanach Zjednoczonych pierwszy klej fibrynowy został do-

puszczony do obrotu przez Agencję Żywności i Leków (FDA, *Food and Drug Administration*) dopiero w 1998 roku, z powodu obaw dotyczących możliwej transmisji wirusów [10]. W 1997 roku Whitman i wsp. jako pierwsi opisali metodę otrzymywania osocza bogatopłytkowego. Pod wpływem aktywacji osocza bogatopłytkowego, np. trombiną, uzyskuje się żel płytkowy, który stanowi alternatywę dla kleju fibrynowego [8]. Pierwsza i druga dekada XXI wieku przyniosły większe zainteresowanie PRP w medycynie sportowej, zwłaszcza w leczeniu tendinopatii [11–14] oraz w dermatologii, głównie w leczeniu blizn, w zabiegach odmładzania skóry i w leczeniu łysienia plackowatego [1].

Różne rodzaje preparatów płytkowych stosowanych w medycynie regeneracyjnej

W literaturze naukowej spotyka się wiele zamiennych terminów stosowanych w odniesieniu do preparatów płytkowych wykorzystywanych w medycynie regeneracyjnej, co wprowadza zamieszanie w terminologii medycznej. W przypadku opisu zabiegów chirurgicznych autorzy najczęściej posługują się terminem osocze bogatopłytkowe (PRP). Jest to preparat, w którym nie doszło jeszcze do aktywacji krwinek płytkowych. W celu uzyskania efektu klinicznego krwinki płytkowe muszą zostać aktywowane na skutek podania aktywatorów (np. trombiny bydłczej, chlorku wapnia) lub w sposób naturalny przez kolagen uszkodzonej tkanki, bez stymulacji czynnikami zewnętrznymi. Skutkami aktywacji są rozpoczęcie procesu krzepnięcia oraz sekrecja czynników wzrostu z ziarnistości płytkowych. Preparat o konsystencji żelu z aktywowanymi płytkami nazywany jest żelem bogatopłytkowym (PRG, *platelet-rich gel*). W zależności od rodzaju stosowanej preparatyki oraz sposobu aktywacji płytek krwi wyróżnia się preparaty osocza bogatopłytkowego oraz preparaty fibryny bogatopłytkowej (PRF, *platelet-rich fibrin*). Podczas aplikacji PRP używa się substancji aktywujących, natomiast podczas aplikacji PRF nie używa się zewnętrznych aktywatorów i proces krzepnięcia zachodzi naturalnie. Sposób aktywacji płytek krwi ma wpływ na strukturę fibryny i szybkość wydzielania czynników wzrostu (stopniowe lub gwałtowne), przez co kliniczny mechanizm działania tych preparatów jest nieco odmienny. W literaturze naukowej można spotkać wiele propozycji podziału tych preparatów. Według jednej z nich można je podzielić na 4 kategorie uwzględniające stężenie leukocytów i strukturę fibryny: czyste osocze

bogatopłytkowe (P-PRP, *pure platelet-rich plasma*), osocze bogatopłytkowe o wysokiej zawartości leukocytów (L-PRP, *leukocyte- and platelet-rich plasma*), czystą fibrynę bogatopłytkową (P-PRF, *pure platelet-rich fibrin*) i bogatoleukocytarną fibrynę bogatopłytkową (L-PRF, *leukocyte- and platelet-rich fibrin*) [15]. W wielu pracach można się również spotkać z innymi terminami, np.: autologiczne PRP (aPRP, *autologous platelet-rich plasma*) [16], osocze bogate w czynniki wzrostu (PRGFs, *plasma-rich in growth factors*) [17], koncentrat bogatopłytkowy (PRC, *platelet-rich concentrate*) [18], zaawansowana fibryna bogatopłytkowa (A-PRF, *advanced platelet-rich fibrin*) czy fibryna bogatopłytkowa w postaci płynnej do wstrzykiwania (i-PRF, *injectable platelet-rich fibrin*) [19].

Nie ma jednoznacznej definicji PRP, ale w literaturze naukowej najczęściej mówi się o osoczu o stężeniu krwinek płytkowych kilkakrotnie wyższym od wartości fizjologicznej w krwi obwodowej. W 2001 roku Marx wskazał liczbę 1 mln PLT w 1 μ l preparatu, czyli stężenie 4–5 \times wyższe niż w krwi pełnej [20]. Jungbluth i wsp. proponują użycie PRP o 3–5-krotnie wyższym stężeniu PLT [21], Cho i wsp. sugerują stosowanie PRP o 3–7-krotnie wyższym stężeniu PLT [22], natomiast Franchini i wsp. stosowali preparaty o stężeniu nawet 14-krotnie wyższym od wartości bazowej [23], choć Anitua i wsp. uzyskali korzystne wyniki kliniczne, stosując preparaty o stężeniu już powyżej 300 tys. płytek [24].

Graziani i wsp. (2006) badali wpływ PRP o różnych stężeniach krwinek płytkowych na proliferację ludzkich osteoblastów i fibroblastów *in vitro*. Maksymalny efekt został osiągnięty przy stężeniu PLT 2,5 \times wyższym od wartości bazowej, podczas gdy PRP o wyższych stężeniach krwinek płytkowych redukowało proliferację komórek [25].

Weibrich i wsp. (2004) porównali wpływ PRP o trzech różnych stężeniach płytek na procesy regeneracji tkanki kostnej królików. W 3. i 4. tygodniu doświadczenia, przy stosowaniu PRP o stężeniu PLT 2–6-krotnie większym od wartości bazowej, przyrost masy kostnej był o blisko 90% większy niż w grupie kontrolnej. Przy stężeniach PLT mniejszych od 2-krotności wartości bazowej nie wykazano efektu stymulującego, natomiast przy stężeniach 6–11-krotnych PRP hamowało procesy kościotworzenia [26].

W zależności od sposobu preparatyki skład otrzymanego PRP może się istotnie różnić pod względem liczby krwinek płytkowych, zawartości czynników wzrostu i leukocytów [27]. W 2014 roku Dohan Ehrenfest i wsp. zaproponowali podział PRP

pod względem zawartości leukocytów na: PRP z dużą zawartością leukocytów (LR-PRP, *leukocyte-rich platelet-rich plasma*) i PRP z minimalną zawartością leukocytów (LP-PRP, *leukocyte-poor platelet-rich plasma*). LR-PRP otrzymuje się z kożuszka leukocytarno-płytkowego, wykorzystując większe prędkości wirowania lub 2-krotne wirowanie krwi pełnej, natomiast LP-PRP uzyskuje się w wyniku mniejszych prędkości i 1-krotnego wirowania [28]. Niektórzy autorzy zwracają uwagę, że leukocyty są źródłem cytokin prozapalnych, przez co mogą negatywnie wpływać na gojenie się tkanek; inni wskazują, że LR-PRP przyspiesza gojenie zakażonych tkanek miękkich. Oprócz funkcji immunologicznych leukocyty wydzielają dodatkowe ilości GFs oraz mają właściwości antynocyceptywne dzięki wydzielanym cytokinom przeciwzapalnym (interleukiny: IL-4, IL-10 i IL-13) oraz peptydom opioidowym (β -endorfina, metenkefalina i dynorfina-A) [29].

Zastosowanie

Osocze bogatopłytkowe ma zastosowanie w leczeniu wielu schorzeń i urazów w takich dziedzinach medycyny, jak: ortopedia, dermatologia (w tym kosmetologia), stomatologia, urologia, okulistyka, otolaryngologia, medycyna sportowa, a także weterynaria. PRP wykorzystuje się w chirurgii ogólnej, szczękowo-twarzowej, naczyniowej, ginekologicznej (przy zabiegach histerektomii czy cesarskiego cięcia), chirurgii serca i klatki piersiowej, chirurgii głowy i szyi, chirurgii plastycznej czy neurochirurgii. PRP jest stosowane w wielu zabiegach, np. w rekonstrukcji ubytków kości (m.in. żuchwy) czy ekstrakcji zębów. W medycynie sportowej osoczem bogatopłytkowym leczy się urazy ścięgien w przypadku tendinopatii mięśni, więzadeł i łąkotek, a dermatologii — przewlekłe owrzodzenia, rany oparzeniowe; PRP stosuje się także przy przeszczepianiu skóry [7, 9, 11, 24, 30–37].

W klinikach medycyny estetycznej wykonuje się zabiegi mezoterapii igłowej skóry, polegające na licznych punktowych wkłuciach za pomocą specjalnych urządzeń, np. Derma Pen[®] czy Derma Roller[®]. Mikrowkłucia powodują powstawanie mikroran, w których krwinki płytkowe oraz neutrofile wydzielają dodatkowe ilości GFs, wywołując proces zapalny. Efektem tego jest powstawanie nowych włókien kolagenowych. Mezoterapię stosuje się również wraz z podawaniem osocza bogatopłytkowego. Taki zabieg wykorzystywany jest w leczeniu blizn potrądzikowych, leczeniu łysienia czy w tzw. wampirzym liftingu. Pod wpływem działania czyn-

ników wzrostu następują wzrost i przebudowa włókien kolagenowych i elastynowych poprzez zwiększenie aktywności fibroblastów, a w efekcie likwidacja zmarszczek, zmniejszenie rumienia czy też obrzęków [38, 39].

Źródło czynników wzrostu stymulujących regenerację uszkodzonych tkanek

Gojenie to złożony proces, którego początek ma najczęściej miejsce w skrzepie, stąd zainteresowanie krwią jako źródłem substancji potencjalnie przyspieszających gojenie [40]. Powszechnie uważa się, że aby uszkodzona tkanka mogła się zregenerować, powinno się stosować systemy biologiczne zawierające tzw. triadę Lyncha, której składowe to: 1) syntetyczna lub naturalna macierz tkankowa; 2) mediatory oddziałujące na komórki docelowe uszkodzonej tkanki, do których należą: czynniki wzrostu, czynniki przylegania komórek (adhezyny), hormony, witaminy; 3) komórki, na które oddziałują mediatory: nieróżnicowane komórki macierzyste, komórki częściowo zróżnicowane (preosteoblasty, fibroblasty, chondroblasty) lub komórki zróżnicowane (fibrocyty, osteocyty). PRP spełnia dwa wymagania triady Lyncha — jest nośnikiem i zawiera PLT uwalniające mediatory, lecz nie zawiera komórek, na które oddziałują mediatory [41].

Aktywowane krwinki płytkowe zmieniają kształt i wykształcają cytoplazmatyczne pseudopodia, dzięki którym mogą się przemieszczać wewnątrz macierzy skrzepu w uszkodzonej tkance i efektywniej ją regenerować. Krwinki płytkowe, podobnie jak inne komórki, zawierają różne struktury wewnątrzkomórkowe, w tym ziarnistości α uwalniające czynniki wzrostu, które odgrywają kluczową rolę w regeneracji tkanki i utrzymaniu jej hemostazy. Czynniki wzrostu to ligandy oddziałujące na swoiste receptory, działają w taki sam sposób jak hormony: autokrynnie, parakrynnie i endokrynnie. Poszczególne czynniki wzrostu regulują ekspresję innych czynników wzrostu i są regulowane mechanizmem sprzężeń zwrotnych [4, 30, 40, 42, 43]. Podział czynników wzrostu i ich funkcji biologicznych przedstawiono w tabeli 1.

Do innych czynników wzrostu w osoczu bogatopłytkowym należą: neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (BDNF, *brain-derived neurotrophic factor*), czynnik wzrostu nerwów β (β -NGF, *β -nerve growth factor*), rzęskowy czynnik neurotroficzny (CNTF, *ciliary neurotrophic factor*) należący do rodziny IL-6, czynnik wzrostu tkanki łącznej (CTGF, *connective tissue growth factor*), czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocy-

tów (G-CSF, *granulocyte colony-stimulating factor*), czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów (M-CSF, *macrophage colony-stimulating factor*), czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) oraz różnicujące czynniki wzrostu (GDFs, *growth differentiation factors*), będące podrodziną TGF- β [49].

Krwinki płytkowe zaczynają intensywnie wydzielać czynniki wzrostu już w ciągu pierwszych 10 minut od rozpoczęcia procesu krzepnięcia, a zdecydowana większość czynników wzrostu (> 95%) ulega wydzielaniu już w czasie pierwszej godziny po aktywacji płytek. Przez kilka kolejnych dni krwinki płytkowe syntetyzują i wydzielają dodatkowe ilości czynników wzrostu [18, 31].

Osocze bogatopłytkowe jest źródłem nie tylko czynników wzrostu, ale także adhezyn — białek odpowiedzialnych m.in. za osteokondukcję i migrację komórek nabłonkowych [50].

Mechanizm działania PRP można opisać na przykładzie modelu regeneracji tkanki kostnej żuchwy, opracowanego przez Marxa i wsp. pod koniec lat 90. minionego wieku po dokonaniu przeszczepienia kości gąbczastej. Wrotniak, Bielecki i Gaździk (2007) w swoim artykule przeglądowym przedstawiają go następująco. Zaobserwowano, że istotnym czynnikiem regeneracji jest różnica w utlenowaniu między miejscem ubytku kości a zdrową tkanką. Ubytek cechuje się ok. 5–9-krotnie niższym utlenowaniem oraz kwasicią (pH = 4–6) w porównaniu z prawidłowo ustrukturyzowaną tkanką, co przyciąga chemotaktycznie makrofagi, które czyszczą ranę oraz są dodatkowym źródłem czynników wzrostu. Zapoczątkowanie regeneracji kości po podaniu PRP rozpoczyna się w chwili uwolnienia PDGF, TGF- β 1 i IGF z ziarnistości płytek. PDGF pobudza mitogenezę komórek kościotwórczych oraz komórek macierzystych szpiku, co powoduje zwiększenie ich liczby o kilka rzędów. Czynnik ten rozpoczyna również angiogenezę poprzez podział komórek śródbłonna i pączkowanie naczyń kapilarnych w obrębie przeszczepu. TGF- β wstępnie pobudza fibroblasty oraz preosteoblasty do mitozy, zwiększając ich liczbę i różnicując je w dojrzałe osteoblasty. Pobudza osteoblasty do tworzenia macierzy kostnej, a fibroblasty do syntezy kolagenu, wspierając tym samym wrastanie kapilar. IGF z kolei działa na osteoblasty i wzmacnia beleczki kostne w obrębie przeszczepionej kości gąbczastej. Około 3. dnia obserwuje się kapilary penetrujące przeszczep, a całkowite unaczynienie przeszczepu następuje w dniach 14.–17. Początkowa wzmoczona aktywność komórkowa

Tabela 1. Czynniki wzrostu w osoczu bogatopłytkowym — podział i funkcje [3–5, 18, 32, 41, 44–48]

Czynnik wzrostu	Podział i funkcje
Płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF, <i>platelet derived growth factor</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Wyróżnia się 5 form homo- lub heterodimerskich: PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC, PDGF-DD • Działa przez α-receptory błony komórkowej komórek docelowych, przez co wpływa na ekspresję ich genów. Uszkodzenie α-receptorów dla PDGF powoduje zaburzenia embriogenezy kości twarzoczaszki i kręgosłupa • Wydzielany przez krwinki płytkowe, fibroblasty i keratynocyty. W późniejszej fazie regeneracji produkowany także przez komórki mięśni gładkich, aktywowane makrofagi czy komórki śródbłonka naczyń krwionośnych • Jest czynnikiem mitogennym i chemotaktycznym dla komórek pochodzenia mezenchymalnego: fibroblastów, komórek mięśni gładkich, komórek glejowych, neutrofilii i makrofagów • Promuje angiogenezę • Promuje powstawanie nabłonków • Promuje proliferację osteocytów i chondrocytów • Przyspiesza oddziaływanie innych czynników wzrostu na komórki docelowe, np. na makrofagi • Kontroluje resorpcję kości i jej przebudowę poprzez zwiększenie liczby osteoklastów
Transformujące czynniki wzrostu (β (TGFs- β , <i>transforming growth factors-β</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Do tej rodziny czynników wzrostu należą: TGF-β1, TGF-β2 i TGF-β3, białka morfogenetyczne kości (BMPs, <i>bone morphogenetic proteins</i>) i aktywiny • Oddziałują mitogenicznie na fibroblasty, osteoblasty, komórki mięśni gładkich i regulują ich metabolizm • Przyczyniają się do powstawania macierzy zewnątrzkomórkowej i promują angiogenezę, aktywując komórki śródbłonka naczyń • TGF-β1 indukuje apoptozę osteoklastów, co przyczynia się do przewagi tworzenia kości nad jej resorpcją • TGF-β1 odgrywa główną rolę w gojeniu ran skórnych
Naczyniowo-śródbłonkowe czynniki wzrostu (VEGFs, <i>vascular endothelial growth factors</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Do tej rodziny czynników wzrostu należą: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E i łożyskowy czynnik wzrostu (PlGF, <i>placental growth factor</i>) • Promują angiogenezę, wzmagając mitogenezę i przepuszczalność naczyń, szczególnie śródbłonka • Mają właściwości antyapoptotyczne, indukując białka IAP (<i>inhibitors of apoptosis</i>) • Podczas embriogenezy są jednymi z głównych czynników wzrostu i proliferacji komórek śródbłonka naczyniowego • Poprzez indukcję ekspresji aktywatorów plazminogenu i ich inhibitorów oraz metaloproteinaz są odpowiedzialne za reorganizację macierzy zewnątrzkomórkowej • Odgrywają rolę w neurogeniezie i neuroprotekcji ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego poprzez stymulację wzrostu komórek Schwanna, stymulację proliferacji i migracji astrocytów, a także przez stymulację śródbłonka do produkcji substancji neurotroficznych
Nabłonkowe czynniki wzrostu (EGFs, <i>epidermal growth factors</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Do tej rodziny czynników wzrostu należą: nabłonkowy czynnik wzrostu (EGF, <i>epidermal growth factor</i>), EGF wiążący heparynę (HB-EGF, <i>heparin binding EGF</i>), transformujący czynnik wzrostu α (TGF-α, <i>transforming growth factor-α</i>), epiregulina, amferegulina, betacellulina, epigen, neuregulina-1 (NRG-1, <i>neuregulin-1</i>), NRG-2, NRG-3, NRG-4, NRG-5 i NRG-6 • Są wydzielane przez krwinki płytkowe, makrofagi i fibroblasty • Są mitogenne dla fibroblastów, keratynocytów i komórek śródbłonka • Promują różnicowanie się komórek nabłonka, migrację keratynocytów i zwiększają angiogenezę nabłonka, wpływając na jego odnowę • Zwiększają aktywność kolagenazy i są czynnikami chemotaktycznymi dla komórek śródbłonka
Czynniki wzrostu fibroblastów (FGFs, <i>fibroblast growth factors</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Najistotniejsze w procesie gojenia ran skóry są: FGF-2, FGF-7 i FGF-10 • FGF-2, nazywany również zasadowym czynnikiem wzrostu fibroblastów (bFGF, <i>basic fibroblast growth factor</i>), wpływa na tworzenie ziarniny i przebudowę tkanek. Reguluje syntezę i odkładanie różnych składników macierzy zewnątrzkomórkowej, wpływa na zwiększenie ruchliwości keratynocytów i promuje migrację fibroblastów, stymulując je do produkcji kolagenazy • FGF-7, zwany także czynnikiem wzrostu keratynocytów 1 (KGF-1, <i>keratinocyte growth factor-1</i>), odgrywa istotną rolę w neowaskularyzacji tkanek • FGF-7 wraz z FGF-10 oddziałują promitogenicznie na keratynocyty, stymulując ich różnicowanie i migrację, co jest istotną częścią procesu reepitelializacji tkanek. Chronią keratynocyty przed apoptozą, zwiększając transkrypcję czynników, które usuwają reaktywne formy tlenu

Tabela 1 cd. Czynniki wzrostu w osoczu bogatopłytkowym — podział i funkcje [3–5, 18, 32, 41, 44–48]

Czynnik wzrostu	Podział i funkcje
Insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (IGF-1, <i>insulin-like growth factor-1</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Jest modulatorem apoptozy • Wraz z PDGF promuje regenerację kości poprzez proliferację i różnicowanie osteoblastów • Jest czynnikiem chemotaktycznym dla fibroblastów • Wpływa na migrację keratynocytów
Czynnik wzrostu hepatocytów (HGF, <i>hepatocyte growth factor</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Promuje angiogenezę • Jest czynnikiem mitogennym dla hepatocytów i komórek śródbłonka • W badaniach na zwierzętach stwierdzono, że jest kluczowym czynnikiem w procesie samonaprawy tkanek i dzięki swoim antyapoptotycznym i antyzapalnym właściwościom pełni funkcje ochronne dotyczące wielu organów, np. wątroby, nerek, płuc, serca, mózgu czy śluzówki przewodu pokarmowego, a neutralizacja HGF na etapie rozwoju zarodka skutkuje hipoplazją tych organów • Działa cytotoksycznie na niektóre nowotwory • Jest jednym z czynników kontrolujących stężenie glukozy we krwi – przeciwdziała hiperglikemii, pobudzając komórki β trzustki do wydzielania insuliny • Pełni istotną funkcję w prawidłowym rozwoju mieszków włosowych
Czynnik płytkowy 4 (PF-4, <i>platelet factor-4</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Ma działanie antyheparynowe, przez co sprzyja powstawaniu skrzepu • Jest czynnikiem chemotaktycznym dla fibroblastów • Stymuluje początkowy napływ neutrofilów do zranionej tkanki
Ludzki płytkopochodny czynnik wzrostu śródbłonka (PDEGF, <i>human platelet-derived endothelial growth factor</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Przyspiesza gojenie rany, stymulując proliferację keratynocytów i skórnych fibroblastów
Płytkopochodny czynnik angiogenezy (PDAF, <i>platelet-derived angiogenesis factor</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Indukuje powstawanie nowych naczyń krwionośnych

jest bezpośrednim skutkiem działania przede wszystkim PDGF, TGF- β i IGF, w mniejszym zaś stopniu innych czynników wzrostu. Czas życia krwinek płytkowych w uszkodzonej tkance i wpływu wydzielanych przez nie czynników wzrostu trwa około 5 dni. Wydłużenie regeneracji tkanki kostnej może następować w dwojaki sposób. Pierwszy z nich polega na wzroście liczby komórek macierzystych szpiku i ich różnicowaniu w osteoblasty, które następnie wydzielają TGF- β i IGF do macierzy kostnej. Drugi — bardziej dominujący — mechanizm opiera się na chemotaksji i aktywacji makrofagów, które po 3 dniach zaczynają zastępować krwinki płytkowe w ich funkcji wydzielania czynników wzrostu, gdy słabnie wpływ płytkowego PDGF. Świeżo powstająca kość jest niezorganizowana, splotowata, pozbawiona kanałów Haversa i spójności strukturalnej. Jest to tzw. kość I fazy i powstaje w pierwszych 4 tygodniach od dokonania przeszczepienia kości. Po mniej więcej 4 tygodniach zanika gradient

tenowy i niedojrzała kość podlega stopniowej resorpcji i przekształceniu w kość dojrzałą o budowie drobnowłóknistej blaszkowatej. Jest to tzw. kość II fazy, w której pojawiają się kanały Haversa, rozwinięta śródkostna i okostna. Za ten proces odpowiadają IGF i BMPs, które wiążą się z macierzą kostną i są uwalniane przez osteoklasty podczas przebudowy kości [35].

Podejrzewa się, że ewolucyjny cel procesów regeneracyjnych wywoływanych przez czynniki wzrostu to oszczędność i wydajność energii. Wysoce niewydajne energetycznie jest utrzymywanie dużej populacji komórek gojących pozbawionych innych funkcji. Wraz z wiekiem liczba komórek naprawczych maleje. System oparty na działaniu czynników wzrostu w razie potrzeby potrafi w krótkim czasie powiększyć pulę tych komórek i pobudzić je do działania w okresie gojenia [35].

Poziom wydzielanych czynników wzrostu skorelowany jest nie tylko z liczbą aktywowanych krwinek płytkowych, ale również ze sposobem

pobierania krwi, szybkością, czasem i temperaturą wirowania, ogólnym czasem preparatyki, rodzajem stosowanego antykoagulantu, a także środkami aktywującymi dodawanymi do PRP. Bardzo istotne jest takie dobranie warunków preparatyki osocza bogatopłytkowego, aby zapobiec przedwczesnej aktywacji krwinek płytkowych, a tym samym przedwczesnemu wydzielaniu czynników wzrostu [31].

Zalety stosowania autologicznego osocza bogatopłytkowego

Istotną zaletą stosowania autologicznego PRP jest większe bezpieczeństwo niż w przypadku stosowania preparatów allogenicznych. Ze względu na to, że PRP jest otrzymywane z krwi autologicznej, nie ma ryzyka reakcji immunologicznych ani przeniesienia drobnoustrojów od innych dawców [18, 40, 51].

Kolejną zaletą PRP są jego właściwości antibakteryjne [52, 53] i przeciwgrzybicze [54]. Krwinki płytkowe oprócz czynników wzrostu zawierają również szereg aktywnych biologicznie substancji, m.in. proakcelerynę, serotoninę, katecholaminy oraz białka antibakteryjne. Ludzkie krwinki płytkowe pod wpływem działania trombiny wydzielają 7 białek należących do grupy antibakteryjnych peptydów (HPAPs, *human platelets antimicrobial peptides*):

- fibrynopeptyd A (FP-A, *fibrinopeptide A*);
- fibrynopeptyd B (FP-B, *fibrinopeptide B*);
- tymozyna β -4 (T β -4, *thymosin β -4*);
- PBP (*platelet basic protein*);
- białko 3 pobudzane przez tkanki (CTAP-3, *connective tissue activating peptide 3*);
- białko RANTES;
- płytkowy czynnik 4 (PF-4, *platelet factor 4*) [24, 54].

Badania mikrobiologiczne *in vitro*, które prowadzili Tang i wsp. (2002), wykazały aktywność antibakteryjną i przeciwgrzybiczą tych białek w odniesieniu do: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* czy *Cryptococcus neoformans*. Wraz ze wzrostem stężenia peptydów zwiększała się strefa zahamowania bakterii lub grzybów. Optymalne działanie antibakteryjne i przeciwgrzybicze każdego z białek HPAPs zachodzi w nieco odmiennym pH, przeważnie w środowisku kwaśnym [54].

Interesującym, chociaż nie do końca jeszcze zbadanym zjawiskiem jest zależność pomiędzy wrażliwością niektórych szczepów bakterii a rodzajem trombiny (bydłęca lub ludzka) stosowanej jako aktywator krwinek płytkowych [55].

Osocze bogatopłytkowe wpływa także łagodząco na odczuwanie bólu po zabiegach, przez co

pozwała ograniczyć podawanie leków przeciwbólowych, jak również zmniejsza utratę krwi po operacji [34, 56, 57]. Fanning i wsp. badali przeciwbólowe właściwości PRP poprzez ocenę subiektywnego odczuwania bólu przez 55 pacjentek poddanych dużym zabiegom ginekologicznym. Wyniki wykazały, że grupa badana, która otrzymywała PRP, odczuwała mniejszy, krócej trwający ból i z tego względu zmniejszono ilość stosowanych leków przeciwbólowych [34]. Johal i wsp. (2019) opracowali metaanalizę 78 randomizowanych badań kontrolowanych placebo (RCT, *randomized controlled trials*), obejmującą opis przypadków 5308 pacjentów poddanych zabiegom ortopedycznym, w których stosowano PRP. Jest to największy do tej pory przegląd RCT w tej dziedzinie. Stwierdzono statystycznie istotne zmniejszenie odczuwania bólu w leczeniu zapalenia nadkłykcia kości ramiennej i choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego, natomiast w przypadku leczenia urazów mięśni, stożka rotatorów czy rekonstrukcji więzadła krzyżowego przedniego efekt przeciwbólowy był znikomy lub nieistotny statystycznie. Co ciekawe, zawartość leukocytów, krwinek płytkowych czy użycie substancji aktywujących krwinki płytkowe nie miały wpływu na wyniki. Autorzy przeanalizowali dodatkowo 3 próby leczenia zapalenia nadkłykcia kości ramiennej, w których podawanie pełnej krwi bądź tzw. suche igłowanie dało podobny efekt co zastosowanie PRP, co autorzy tłumaczą dwojako. Wprowadzenie pełnej krwi lub samo pobudzenie procesów zapalnych i miejscowego krwawienia uszkodzonej tkanki mogło wpłynąć na wydzielenie wystarczającej ilości czynników leczniczych (choć mniejszej niż w przypadku podania PRP), aby uzyskać kliniczny efekt przeciwbólowy, albo też mógł zadziałać efekt placebo. Autorzy podkreślają potrzebę dalszych badań w celu określenia różnic między tymi sposobami leczenia [58].

Innymi — również ważnymi — zaletami PRP są jego stosunkowo prosty i szybki sposób pozyskania i preparatyki (niecałe 30 minut od pobrania krwi do aplikacji) oraz niski koszt wytwarzania [59].

Ryzyko stosowania osocza bogatopłytkowego

Pomimo zalet terapii PRP należy jednak mieć na uwadze występowanie czynników ryzyka. Czynnikiem ryzyka może być zakażenie preparatu drobnoustrojami przeniesionymi z zewnątrz, jest on bowiem przygotowywany z krwi pobieranej metodą wkłucia. Preparat może być przechowywany w temperaturze pokojowej, co

sprzyja namnażaniu się bakterii [60]. Należy pamiętać, że podczas zabiegów, w których stosuje się iniekcję PRP, tak jak w przypadku każdego innego zabiegu związanego z zastosowaniem igieł, powłoki skórne zostają przebite i istnieje ryzyko infekcji oraz mechanicznego uszkodzenia tkanek. Jeśli jednak personel medyczny przestrzega odpowiednich procedur, a sterylność narzędzi zostaje zachowana, ryzyko to udaje się minimalizować [30, 61].

PRP jest preparatem inicjującym proces krzepnięcia, więc przy nieprawidłowym wprowadzeniu go do naczynia krwionośnego istnieje ryzyko zapoczątkowania niepożądanego procesu wykrzepiania wewnątrznaczyniowego.

W niektórych przypadkach stosowanie PRP może wywoływać niepożądane reakcje, gdyż PRP stymuluje procesy obronne organizmu. W przeszłości dodawanie trombiny bydlęcej do PRP w celu aktywacji płytek wywoływało u niektórych pacjentów reakcje immunologiczne. Trombina bydlęca podawana wraz z bydlęcym czynnikiem Va była przyczyną zagrażających życiu koagulopatii, w wyniku których powstawały przeciwciała przeciw ludzkim czynnikom krzepnięcia: trombinie, czynnikowi XI, a w szczególności przeciw czynnikowi V. Z tego powodu, począwszy od 1997 roku, zaczęto usuwać czynnik Va pochodzenia bydlęcego podczas produkcji trombiny bydlęcej [8, 18, 62, 63].

W trakcie leczenia preparatami bogatymi w czynniki wzrostu należy unikać ekspozycji skóry na światło słoneczne. Nie jest do końca jasne, jaki wpływ może mieć promieniowanie ultrafioletowe (UV, *ultraviolet*) na ekspresję i funkcje TGF- β w skórze. Promieniowanie UV zaburza transdukcję sygnału mediowanego przez TGF- β do jądra komórki, co może się przyczyniać do rozwoju raka skóry [64].

Nie zaleca się podawania PRP pacjentom z zaburzeniami krzepnięcia krwi i współistniejącą trombocytopenią lub hipofibrinogenem [18], kobietom karmiącym lub w ciąży, chorym na nowotwory lub pacjentom leczącym infekcje. Ponadto przed iniekcją PRP podaje się środki miejscowego znieczulenia, jak lidokaina czy bupiwakaina, co może być dodatkowym czynnikiem ryzyka u pacjentów z alergią na te leki. Ze względu na możliwość wystąpienia niepożądanych reakcji pacjenci powinni zostać o nich poinformowani przed zabiegiem [61].

Tematem dyskusyjnym jest również zawartość leukocytów w PRP. Leukocyty uwalniają enzymy kataboliczne, takie jak metaloproteiny macierzy, które mogą opóźnić proces gojenia [65].

Dodatkowo, neutrofile mogą się przyczyniać do uszkodzenia tkanki przez uwalnianie reaktywnych form tlenu [66].

Ograniczenia i skuteczność stosowania osocza bogatopłytkowego

Znaczna część badań dotyczących stosowania PRP była prowadzona w małych grupach pacjentów. Niewiele z nich było randomizowanych, cechują się więc niską wartością względem medycyny opartej na faktach (EBM, *evidence-based medicine*). Gołos i Treliński (2014) podają, że w przeprowadzonych randomizowanych badaniach klinicznych (również obejmujących niewielką liczbę pacjentów), w których wszczepiano implanty kości, w porównaniu z grupą kontrolną nie wykazano przewagi użycia PRP w procesie gojenia. Raghoebar i wsp. (2005) również nie wykazali statystycznych różnic między grupą kontrolną a grupą pacjentów, u których stosowano PRP, poddanych autologicznemu przeszczepieniu kości podczas zabiegów chirurgicznych ściany zatoki szczękowej. Wyniki randomizowanych badań dotyczących leczenia urazów więzadła krzyżowego przedniego także nie wykazały przewagi leczenia osoczem bogatopłytkowym [30]. Šumanovac (2018), dokonując przeglądu literatury przedmiotu, odnotował różną skuteczność kliniczną PRP w różnych zabiegach ortopedycznych. Według tego autora z przeglądu większości literatury wynika, że PRP dawało poprawę w leczeniu choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego przez okres do 12 miesięcy. Obecne badania nie są jednoznaczne w odniesieniu do skuteczności PRP, ale niektóre badania wykazały, że podawanie PRP miało większą skuteczność leczniczą w porównaniu z kwasem hialuronowym czy placebo. Należy też wspomnieć o obawach dotyczących jakości publikacji oraz wysokiego ryzyka stronniczości prac, a także podkreślić trudności w oszacowaniu skuteczności klinicznej PRP i porównywaniu wyników różnych badań ze względu na brak standaryzacji protokołów preparatyki PRP [67].

Skuteczność stosowania PRP wykazali natomiast Alissa i wsp. (2010) w badaniu stomatologicznym, którego wyniki potwierdziły szybsze gojenie ran po zabiegach ekstrakcji zębów, Simonpieri i wsp. (2012) w leczeniu ubytków kostnych czy Patela i wsp. (2013) w randomizowanym badaniu dotyczącym leczenia 150 pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawu kolanowego [30, 36]. Miron i wsp. (2017) w swojej pracy przeglądowej dotyczącej wpływu PRF na gojenie tkanek miękkich stwierdzają, że w 27 na 31 (87%) badań klinicznych

aplikacja PRP przyniosła statystycznie istotny, pozytywny efekt w różnych zabiegach medycznych, w tym dentystrycznych [68]. Chen i wsp. (2018) dokonali przeglądu literatury dotyczącej leczenia androgenicznego łysienia plackowatego (AGA, *androgenic alopecia*) za pomocą PRP. Spośród 24 badań (8 randomizowanych, 16 kohortowych), które spełniały założone kryteria, w 21 (88%) otrzymano pozytywne wyniki kliniczne, a w 3 nie stwierdzono poprawy po zabiegu [69]. Korzystne efekty leczenia preparatami PRP wykazano także po zabiegach wszczepiania implantów kostnych oraz po operacyjnym leczeniu defektów przyzębia, w chirurgii plastycznej, w leczeniu przewlekłych ran (m.in. stopy cukrzycowej), w chirurgii rekonstrukcyjnej twarzy czy po zabiegach ginekologicznych. Niektóre wyniki randomizowanych badań klinicznych dotyczących przewlekłego leczenia tendinopatii również wskazują na korzystny, lecz opóźniony efekt działania PRP. Metaanaliza wyników badań dotyczących PRP jest więc utrudniona ze względu na różnice dotyczące badanych struktur anatomicznych, różnice populacyjne (zawodowi sportowcy, amatorzy), różnice w sposobie otrzymywania PRP, w technice podawania, rehabilitacji po zabiegu i w samym sposobie oceny skuteczności leczenia [30].

Dzięki rozbudowanej wiedzy na temat PRP z roku na rok terapia za pomocą PRP znajduje coraz szersze zastosowanie w różnych dziedzinach medycyny zarówno u ludzi, jak i u zwierząt. Od 2015 roku PRP stosuje się w leczeniu zaburzeń wzrostu śluzówki macicy (tzw. cienkie endometrium) [70], a w ostatnich latach próbowano leczyć nim niektóre choroby, np. zespół cieśni kanału nadgarstka [71], zespół pustego nosa [72], zespół Sjögrena [73] czy zespół suchego oka, podając osocze bogatopłytkowe w postaci kropli do oczu [74]. W 2019 roku prowadzono badania na myszach z chorobą Alzheimera, którym aplikowano osocze bogate w czynniki wzrostu. Cele badań obejmowały wpływ czynników wzrostu na integralność i funkcjonalność bariery krew–mózg oraz na odkładanie się złogów amyloidu β . Podczas gdy wyniki wstępnych badań *in vitro* były obiecujące, badania *in vivo* wykazały nasilenie patologii związanej z chorobą [17].

Ostatnio osocze bogatopłytkowe próbuje się stosować w leczeniu zaburzeń erekcji [75] oraz w ginekologii kosmetycznej, np. w celu odmłodzenia pochwy [76] czy w tzw. zabiegach *O-shot* [77], mających przywrócić kobietom przyjemność z życia seksualnego poprzez rewitalizację miejsc intymnych.

Preparatyka, aplikacja i klasyfikacja osocza bogatopłytkowego

Osocze bogatopłytkowe uzyskuje się za pomocą wirowania krwi pełnej w odpowiednich probówkach lub gotowych sterylnych zestawach pojemników pochodzących od różnych producentów. Krew pobiera się na antykoagulant, np. ACD-A (*anticoagulant citrate dextrose solution, solution A*), i wiruje z różną prędkością w zależności od zaleceń producenta, następnie oddziela się od siebie powstałe frakcje krwinek czerwonych (RBC, *red blood cells*), PRP i osocza ubogopłytkowego (PPP, *platelet-poor plasma*) [40]. Należy zaznaczyć, że wirowanie może spowodować lizę i fragmentację części krwinek płytkowych i być przyczyną przedwczesnego uwolnienia bioaktywnych czynników wzrostu, stąd istotny jest dobór odpowiednich parametrów wirowania [18]. Otrzymywanie PRP poprzez wirowanie jest na tyle łatwe, że można je wytwarzać w gabinecie lekarskim, a także na sali operacyjnej. Wirowanie krwi musi się odbywać w warunkach sterylnych, a jego warunki powinny być opracowane tak, aby oddzielić krwinki płytkowe od krwinek czerwonych oraz aby nie doprowadzić do lizy krwinek płytkowych. Po odwirowaniu oddziela się warstwę krwinek płytkowych wraz z niewielką ilością osocza [50].

W zależności od stosowanego systemu objętość krwi pobieranej od pacjenta wynosi od 9 do 120 ml [30]. Krew pobiera się do specjalnych pojemników lub strzykawek z antykoagulantem zawierającym cytrynian sodu w stosunku objętościowym 10:1. Jako antykoagulant stosuje się najczęściej roztwór ACD (*acid citrate dextrose* — kwas cytrynowy, cytrynian trójsodowy, D-glukoza), ponieważ najlepiej utrzymuje żywotność krwinek płytkowych [48]. Roztwór CPD (*citrate phosphate dextrose* — kwas cytrynowy, cytrynian trójsodowy, dwuwodorofosforan sodowy, D-glukoza) ma podobne właściwości, ale jest o 10% mniej skuteczny w utrzymaniu żywotności krwinek płytkowych [20]. Z kolei roztwór EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid* — kwas etylenodiaminotetraoctowy) jest antykoagulantem, który może uszkodzić krwinki płytkowe [48]. Krew odwirowywana jest 1- lub 2-krotnie. Po pierwszym wirowaniu krew rozdziela się na 3 fazy: krwinki czerwone, osocze bogatopłytkowe i osocze ubogopłytkowe. Warstwę osocza bogatopłytkowego oddziela się od pozostałych warstw (np. za pomocą strzykawki) i ponownie odwirowuje w celu zagęszczenia krwinek płytkowych w preparacie. Objętość końcowa preparatu

również zależy od stosowanego systemu i waha się między 3 a 32 ml [30].

Bezpośrednio przed aplikacją preparatu PRP dodawane są czynniki aktywujące krwinki płytkowe — trombina bydlęca (rzadziej rekombinowana) oraz 10-procentowy roztwór CaCl_2 w stosunku objętościowym 6:1 lub 10:1. W przypadku aplikacji w formie iniekcji w użyciu są, oprócz standardowych strzykawek, specjalne aplikatory złożone z dwóch komór o wspólnym ujściu w igle. Budowa aplikatora pozwala składnikom na zmieszanie się ze sobą dopiero w chwili iniekcji do tkanki [18, 48, 78–80]. Podczas iniekcji preparatu, a także w czasie badań kontrolnych w trakcie leczenia urazów stosuje się obrazowanie [ultrasonografia — USG, badanie rentgenograficzne — RTG lub rezonans magnetyczny (MRI, *magnetic resonance imaging*)] [40, 81].

Aktywacji krwinek płytkowych można również dokonać bez użycia substancji aktywujących. Fibryna bogatopłytkowa (PRF, *platelet-rich fibrin*) to koncentrat krwinek płytkowych nowej generacji, stosowany głównie w stomatologii, chirurgii jamy ustnej i chirurgii szczękowo-twarzowej. Proces podawania PRF jest prostszy, ponieważ nie wymaga dodatku substancji w postaci antykoagulantów czy aktywatorów. Skrzep powstaje w sposób naturalny i w porównaniu z aktywowanym PRP posiada bardziej elastyczną sieć fibrynową, w której komórki są zdolne do migracji, a czas wydzielania czynników wzrostu jest wydłużony [78]. Du i wsp. w 2018 roku opisali nowatorską, zależną od temperatury, metodę preparatyki i aktywacji PRP, którą nazwali t-PRP (*temperature controlled PRP*). Badacze otrzymali t-PRP przez podwójne wirowanie krwi pełnej w temperaturze 4°C, a jego aktywację przeprowadzili przez podgrzewanie preparatu do 37°C. Wyniki badań wykazały, że osocze bogatopłytkowe otrzymane tą metodą ma bardziej fizjologiczną charakterystykę w porównaniu z konwencjonalnym PRP aktywowanym dodatkowymi substancjami, a czynniki wzrostu wydzielane są wolniej i przez dłuższy czas [82]. Harrison i wsp. wykazali, że sposób aktywacji krwinek płytkowych wpływa na dynamikę wydzielania czynników wzrostu. Podczas aktywacji krwinek płytkowych trombiną czynniki wzrostu wydzielane są natychmiast, natomiast podczas naturalnej aktywacji pod wpływem kontaktu docelowej tkanki z kolagenem czynniki wzrostu uwalniane są stopniowo i działają dłużej [83]. Interesującą — wciąż jeszcze badaną — metodą aktywacji krwinek płytkowych jest fotoaktywacja światłem polichromatycznym o długości fali 600–1200 nm (pasmo bliskie podczerwieni) [84]. Inną — również alternatywną — metodą aktywacji

krwinek płytkowych stanowi metoda stymulacji krwinek impulsami elektrycznymi, którą opatentowali w 2019 roku Neculaes i wsp. Dzięki odpowiednim modyfikacjom tych metod można uzyskać efekt wydłużonego i kontrolowanego wydzielania czynników wzrostu z płytek. Optymalizując te metody, można uzyskać odpowiednie stężenia czynników wzrostu w preparacie bez formowania się skrzepu, który utrudniałby aplikację PRP. Jest to zaleta odróżniająca te metody od metod konwencjonalnych, w których stosuje się substancje aktywujące [85].

Na rynku dostępne są różne systemy wykorzystywane do pozyskiwania PRP (tab. 2) [86]. Różnią się one objętością pobieranej krwi (9–120 ml), liczbą wirowań (1–2), prędkością i temperaturą wirowania, a w konsekwencji stężeniem PLT w preparacie [30].

Na świecie stosuje się różnego rodzaju preparatykę wykorzystywaną komercyjnie, dzięki której możemy wyodrębnić PRP z krwi pełnej. Fadadu i wsp. w swojej pracy przeglądowej z 2019 roku spośród 876 opracowań wyodrębnili aż 33 systemy i protokoły do wytwarzania PRP, które różniły się zarówno warunkami preparatyki, jak i stężeniem płytek w preparacie końcowym. Autorzy podkreślają potrzebę standaryzacji systemów separacji PRP w celu lepszego poznania metod leczenia wykorzystujących osocze bogatopłytkowe [87]. Warto również odnotować, że Chahla i wsp. w swoim przeglądzie literatury naukowej obejmującej lata 2006–2016, analizując 105 badań, stwierdzili, że jedynie 11 prac (10%) zawierało szczegółowy opis preparatyki, na podstawie którego można by było odtworzyć warunki otrzymywania PRP, a tylko 17 opracowań (16%) uwzględniało pomiar ilościowy składu chemicznego końcowego preparatu PRP [88]. W odpowiedzi na potrzebę standaryzacji otrzymywania i aplikacji osocza bogatopłytkowego w 2012 roku DeLong i wsp. zaproponowali klasyfikację PAW. Skrót ten uwzględnia czynniki takie, jak: 1) stężenie płytek w preparacie (*platelets*), 2) sposób aktywacji (*activation*), 3) stężenie krwinek białych (*white cells*). Autorzy uwzględniają podział PRP ze względu na stężenie krwinek płytkowych: P1 (mniejsze lub równe wartości bazowej płytek w krwi obwodowej), P2 (większe od wartości bazowej do 750 000 PLT/ μl), P3 (powyżej 750 000 do 1 250 000 PLT/ μl) oraz P4 (powyżej 1 250 000 PLT/ μl) [89]. W tym samym roku Mishra i wsp. opracowali klasyfikację wprowadzającą podział PRP na 4 typy: I. LR-PRP, II. żel LR-PRP, III. LP-PRP, IV. żel LP-PRP, w której uwzględnili czynniki takie, jak:

Tabela 2. Charakterystyka komercyjnych systemów używanych do pozyskiwania PRP [86]

System	Objętość krwi [ml]	Wirowanie	Czas [min]	Końcowa objętość PRP [ml]	Wielokrotność stężenia wyjściowego PLT z pobranej krwi	Leukocyty	Aktywator
ACP-DS (Arthrex, Naples, FL)	9	Pojedyncze	5	3	× 2–3	Brak	Brak
Fibrinet (Cascade; Musculoskeletal Tissue Foundation)	9–18	Pojedyncze dla PRP Podwójne dla PRFM	6 dla PRP dla PRFM	4–9	× 1–1,5	Brak	CaCl ₂
GPS (Biomet)	27–110	Pojedyncze	15	3–12	× 3–8	Obecne	TA/CaCl ₂
Magellan (Medtronic, Minneapolis, MN)	30–60	Podwójne	4–6	6	× 3–7	Obecne	CaCl ₂
PRGF (BTI Biotechnology Institute)	9–72	Pojedyncze	8	4–32	× 2–3	Brak	CaCl ₂
SmartPrep (Harvest Technologies, Plymouth, MA)	20–120	Podwójne	14	3–20	× 4–6	Obecne	TB/CaCl ₂

CaCl₂ — chlorek wapnia; PRFM (*platelet rich fibrin matrix*) — matryca fibryny bogatopłytkowej; TA — trombina autologiczna; TB — trombina bydłęca

obecność leukocytów (typy I i II) lub ich brak (typy III i IV) oraz użycie substancji aktywujących płytki (typy II i IV) lub ich brak (typy I i III). Klasyfikacja uwzględnia również stężenie płytek: niższe (typ A) lub wyższe (typ B) od 5-krotnej wartości stężenia płytek w krwi obwodowej [81]. W 2015 roku Mautner i wsp. stworzyli dokładniejszą klasyfikację uwzględniającą: stężenie płytek w PRP (PLT/ μ l), obecność lub brak leukocytów (a także udział procentowy neutrofilii) i RBC oraz zużycie lub brak aktywatorów. Klasyfikacja ta przyjęła nazwę PLRA od pierwszych liter angielskich słów *platelet*, *leukocyte*, *red blood cells* i *activation* [90]. W roku 2016 Magallon i wsp. stworzyli podobną klasyfikację — DEPA, uwzględniającą czynniki takie, jak: 1) dawka płytek podanych w zastrzyku (*dose of injected platelets*), 2) wydajność produkcji (*efficiency of production*) wyrażona jako procentowy odzysk płytek, 3) czystość PRP (*purity of PRP*) — udział procentowy krwinek płytkowych w stosunku do krwinek czerwonych i krwinek białych, 4) sposób jego aktywacji (*activation process*) — użyty czynnik lub mieszanina czynników aktywujących krwinki płytkowe. Dzięki tym klasyfikacjom porównanie różnych systemów preparatyki PRP stało się łatwiejsze [91]. Lana i wsp. (2017) podkreślili szczególną rolę komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMCs, *peripheral blood mononuclear cells*), które mogą występować w PRP. Do puli komórek jednojądrzastych należą monocyty i limfocyty, które uczestniczą nie tylko w odpowiedzi odpornościowej, ale również

w procesie regeneracji poprzez wydzielanie cytokin o różnych funkcjach, np. chemotaktycznych, pro- i przeciwzapalnych, promujących proliferację czy też modulujących funkcje wydzielnicze innych komórek. W związku z tym autorzy zwracają uwagę na potrzebę oznaczenia ilościowego PBMCs w PRP i proponują kolejną klasyfikację — MARSPILL. Klasyfikacja ta uwzględnia również parametry preparatyki i aplikacji PRP, takie jak: 1) sposób otrzymywania PRP — zautomatyzowany (M, *machine*) lub manualny (H, *handmade*), 2) liczba wirowań (*spin number*: Sp1 lub Sp2), 3) obecność krwinek czerwonych (RBC-R, RBC-P), 4) stężenie krwinek płytkowych (wielokrotność wartości bazowej PLT: PL: 2–3, PL: 4–6, PL: 6–8 i PL: 8–10), 5) obecność leukocytów (Lc-R, Lc-P) i ich liczba, 6) aktywacja krwinek płytkowych (A+, A–), 7) fotoaktywacja (L+, L–) oraz 8) obrazowanie podczas aplikacji PRP (*imaging guidance*: G+, G–). Autorzy definiują ubogoerytrocytarne PRP jako takie, które cechuje się 15 × mniejszą zawartością RBC w porównaniu z krwią obwodową pacjenta, natomiast LR-PRP i LP-PRP — jako mające odpowiednio wyższą lub niższą zawartość leukocytów w porównaniu z wartością bazową. Ponadto, klasyfikacja MARSPILL wymaga stosowania analizatora hematologicznego w celu dokładnego rozróżnienia i oznaczenia ilościowego komórek w PRP. Skrót MARSPILL pochodzi od angielskich słów: *method* (M), *activation* (A), *red blood cells* (R), *spin* (S), *platelets* (P), *image guidance* (I), *leukocytes* (L), *light activation* (L). Wobec

nowych, obiecujących doniesień dotyczących pozytywnych efektów leczenia choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego za pomocą PRP aktywowanego światłem autorzy uwzględnili fotoaktywację PRP jako jeden z parametrów nowo utworzonej klasyfikacji. Podkreślili zarazem potrzebę prowadzenia dalszych badań w celu potwierdzenia skuteczności tej terapii [92].

Podsumowanie

Na podstawie dotychczasowych publikacji można stwierdzić, że terapia PRP jest względnie bezpieczna klinicznie, ponieważ stosuje się w niej preparaty autologiczne [18, 40, 51]. Preparatyka PRP jest prosta, tania i szybka, często prowadzona w obecności pacjenta [59]. PRP ma działanie antybakteryjne, przeciwgrzybicze [52–54] i przeciwbólowe, co umożliwia podawanie mniejszej ilości narkotycznych leków przeciwbólowych [34, 58].

Mimo wielu badań i obiecujących efektów leczenia w celu potwierdzenia terapeutycznych właściwości PRP potrzebne jest przeprowadzenie randomizowanych badań na szeroką skalę [26].

Duże nadzieje wiąże się też z leczeniem skojarzonym, w którym efekt działania PRP można połączyć ze stosowaniem mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC, *mesenchymal stem cells*) i terapią genową [79, 93].

Dohan Ehrenfest, Rasmusson i Albrektsson (2009), analizując literaturę dotyczącą preparatyki PRP, nazywają świat rynku koncentratów krwinek płytkowych „gąszczem” ofert handlowych i produktów o wątpliwej standaryzacji [94]. Ze względu na występowanie wielu współlistniejących metod preparatyki i aplikacji PRP istotnym wyzwaniem dla środowiska naukowego na najbliższe lata jest opracowanie międzynarodowych wytycznych dotyczących standaryzacji metod otrzymywania PRP i sposobów jego aplikacji w poszczególnych schorzeniach. Większość autorów podkreśla ten problem, jednocześnie oceniając stosowanie osocza bogatopłytkowego jako obiecującą metodę leczenia regeneracyjnego uszkodzonych tkanek [30, 42].

Konflikt interesów

Autorzy deklarują brak konfliktu interesów i zgłaszają, że w Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Katowicach wykonuje się preparaty osocza bogatopłytkowego, które są dostarczane do podmiotów leczniczych w celu wykonywania komercyjnych zabiegów medycznych. Żadne osoby lub organizacje nie finansowały tej publikacji i nie wpłynęły na jej treść.

Piśmiennictwo

- Alves R, Grimalt R. A review of platelet-rich plasma: history, biology, mechanism of action, and classification. *Skin Appendage Disord.* 2018; 4(1): 18–24, doi: [10.1159/000477353](https://doi.org/10.1159/000477353), indexed in Pubmed: [29457008](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29457008/).
- Kohler N, Lipton A. Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity. *Exp Cell Res.* 1974; 87(2): 297–301, doi: [10.1016/0014-4827\(74\)90484-4](https://doi.org/10.1016/0014-4827(74)90484-4).
- Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2004; 114(6): 1502–1508, doi: [10.1097/01.prs.0000138251.07040.51](https://doi.org/10.1097/01.prs.0000138251.07040.51), indexed in Pubmed: [15509939](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15509939/).
- Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, et al. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008; 16(5): 585–601, doi: [10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x](https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x), indexed in Pubmed: [19128254](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19128254/).
- Nakamura T, Mizuno S. The discovery of hepatocyte growth factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2010; 86(6): 588–610, doi: [10.2183/pjab.86.588](https://doi.org/10.2183/pjab.86.588), indexed in Pubmed: [20551596](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20551596/).
- Ferrari M, Zia S, Valbonesi M, et al. A new technique for hemodilution, preparation of autologous platelet-rich plasma and intraoperative blood salvage in cardiac surgery. *Int J Artif Organs.* 2018; 10(1): 47–50, doi: [10.1177/03913988701000111](https://doi.org/10.1177/03913988701000111).
- Tayapongsak P, O'Brien D, Monteiro C, et al. Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. *J Oral Maxillofac Surg.* 1994; 52(2): 161–165, doi: [10.1016/0278-2391\(94\)90401-4](https://doi.org/10.1016/0278-2391(94)90401-4).
- Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997; 55(11): 1294–1299, doi: [10.1016/s0278-2391\(97\)90187-7](https://doi.org/10.1016/s0278-2391(97)90187-7), indexed in Pubmed: [9371122](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9371122/).
- Taniguchi Yu, Yoshioka T, Sugaya H, et al. Growth factor levels in leukocyte-poor platelet-rich plasma and correlations with donor age, gender, and platelets in the Japanese population. *J Exp Orthop.* 2019; 6(1): 4, doi: [10.1186/s40634-019-0175-7](https://doi.org/10.1186/s40634-019-0175-7), indexed in Pubmed: [30712144](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30712144/).
- Evans LA, Morey AF. Current applications of fibrin sealant in urologic surgery. *Int Braz J Urol.* 2006; 32(2): 131–141, doi: [10.1590/s1677-55382006000200002](https://doi.org/10.1590/s1677-55382006000200002), indexed in Pubmed: [16650289](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16650289/).
- de Vos RJ, Weir A, van Schie HTM, et al. Platelet-rich plasma injection for chronic Achilles tendinopathy: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2010; 303(2): 144–149, doi: [10.1001/jama.2009.1986](https://doi.org/10.1001/jama.2009.1986), indexed in Pubmed: [20068208](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20068208/).
- Sánchez M, Anitua E, Azofra J, et al. Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *Am J Sports Med.* 2007; 35(2): 245–251, doi: [10.1177/0363546506294078](https://doi.org/10.1177/0363546506294078), indexed in Pubmed: [17099241](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17099241/).
- Młynarek RA, Kuhn AW, Bedi A. Platelet-rich plasma (PRP) in orthopedic sports medicine. *Am J Orthop* 2016; 45(5): 290–326. PMID: [27552452](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27552452/).
- Gholami M, Ravaghi H, Salehi M, et al. A systematic review and meta-analysis of the application of platelet rich plasma in sports medicine. *Electron Physician.* 2016; 8(5): 2325–2332, doi: [10.19082/2325](https://doi.org/10.19082/2325), indexed in Pubmed: [27382440](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27382440/).
- Dohan Ehrenfest DM, Bielecki T, Mishra A, et al. In search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012; 13(7): 1131–1137, doi: [10.2174/138920112800624328](https://doi.org/10.2174/138920112800624328), indexed in Pubmed: [21740379](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21740379/).

16. Cohn CS, Lockhart E. Autologous platelet-rich plasma: evidence for clinical use. *Curr Opin Hematol*. 2015; 22(6): 527–532, doi: [10.1097/MOH.000000000000183](https://doi.org/10.1097/MOH.000000000000183), indexed in Pubmed: [26390166](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26390166/).
17. Duong QV, Kintzing ML, Kintzing WE, et al. Plasma rich in growth factors (PRGF) disrupt the blood-brain barrier integrity and elevate amyloid pathology in the brains of 5XFAD mice. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(6): 1489, doi: [10.3390/ijms20061489](https://doi.org/10.3390/ijms20061489), indexed in Pubmed: [30934587](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30934587/).
18. Mehta S, Watson JT. Platelet rich concentrate: basic science and current clinical applications. *J Orthop Trauma*. 2008; 22(6): 432–438, doi: [10.1097/BOT.0b013e31817e793f](https://doi.org/10.1097/BOT.0b013e31817e793f), indexed in Pubmed: [18594311](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18594311/).
19. Kawase T, Tanaka T. An updated proposal for terminology and classification of platelet-rich fibrin. *Regen Ther*. 2017; 7: 80–81, doi: [10.1016/j.reth.2017.10.002](https://doi.org/10.1016/j.reth.2017.10.002), indexed in Pubmed: [30271855](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30271855/).
20. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent*. 2001; 10(4): 225–228, doi: [10.1097/00008505-200110000-00002](https://doi.org/10.1097/00008505-200110000-00002), indexed in Pubmed: [11813662](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11813662/).
21. Jungbluth P, Wild M, Grassmann JP, et al. Platelet-rich plasma on calcium phosphate granules promotes metaphyseal bone healing in mini-pigs. *J Orthop Res*. 2010; 28(11): 1448–1455, doi: [10.1002/jor.21152](https://doi.org/10.1002/jor.21152), indexed in Pubmed: [20872580](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20872580/).
22. Cho JM, Lee YHo, Baek RM, et al. Effect of platelet-rich plasma on ultraviolet b-induced skin wrinkles in nude mice. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2011; 64(2): e31–e39, doi: [10.1016/j.bjps.2010.08.014](https://doi.org/10.1016/j.bjps.2010.08.014), indexed in Pubmed: [20884308](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20884308/).
23. Franchini M, Duplicato P, Ferro I, et al. Efficacy of Platelet Gel in Reconstructive Bone Surgery. *Orthopedics*. 2005; 28(2): 161–163, doi: [10.3928/0147-7447-20050201-19](https://doi.org/10.3928/0147-7447-20050201-19).
24. Anitua E, Andia I, Ardanza B, et al. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost*. 2004; 91(1): 4–15, doi: [10.1160/TH03-07-0440](https://doi.org/10.1160/TH03-07-0440), indexed in Pubmed: [14691563](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14691563/).
25. Graziani F, Ivanovski S, Cei S, et al. The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clin Oral Implants Res*. 2006; 17(2): 212–219, doi: [10.1111/j.1600-0501.2005.01203.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2005.01203.x), indexed in Pubmed: [16584418](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16584418/).
26. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, et al. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone*. 2004; 34(4): 665–671, doi: [10.1016/j.bone.2003.12.010](https://doi.org/10.1016/j.bone.2003.12.010), indexed in Pubmed: [15050897](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15050897/).
27. Oudelaar BW, Peerbooms JC, Huis In 't Veld R, et al. Concentrations of blood components in commercial platelet-rich plasma separation systems: a review of the literature. *Am J Sports Med*. 2019; 47(2): 479–487, doi: [10.1177/0363546517746112](https://doi.org/10.1177/0363546517746112), indexed in Pubmed: [29337592](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29337592/).
28. Castillo TN, Pouliot MA, Kim HJ, et al. Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet-rich plasma separation systems. *Am J Sports Med*. 2011; 39(2): 266–271, doi: [10.1177/0363546510387517](https://doi.org/10.1177/0363546510387517), indexed in Pubmed: [21051428](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21051428/).
29. Ehrenfest DMD, Andia I, Zumstein MA, et al. Classification of platelet concentrates (platelet-rich plasma-PRP, platelet-rich fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles Ligaments Tendons J*. 2019; 04(01): 03, doi: [10.32098/mltj.01.2014.02](https://doi.org/10.32098/mltj.01.2014.02).
30. Golas A, Trelński J. Kliniczne zastosowanie osocza bogatopłytkowego. *Hematologia* 2014; 5(3): 252–259; <https://journals.viamedica.pl/hematologia/article/view/40225/34375>.
31. Jameson C. Autologous Platelet Concentrate for the Production of Platelet Gel. *Laboratory Medicine*. 2007; 38(1): 39–42, doi: [10.1309/3ua5hwyvknce01ar](https://doi.org/10.1309/3ua5hwyvknce01ar).
32. Floryan KM, Berghoff WJ. Intraoperative use of autologous platelet-rich and platelet-poor plasma for orthopedic surgery patients. *AORN J*. 2004; 80(4): 668–674, doi: [10.1016/s0001-2092\(06\)61320-3](https://doi.org/10.1016/s0001-2092(06)61320-3), indexed in Pubmed: [15526700](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15526700/).
33. Moradi O, Seyyed MG, Mohammad MD, Sedaghat R, Akbarein H. Effects of platelet rich plasma (PRP) and platelet rich growth factor (PRGF®) on the wound healing of distal part of limbs in horses. *IJVS* 2013; 8(1): 41–47. [http://www.ivsajournals.com/article_3633_1e5d5a813e0dc3a01a2502483a99fe89.pdf].
34. Fanning J, Murrain L, Flora R, et al. Phase I/II prospective trial of autologous platelet tissue graft in gynecologic surgery. *J Minim Invasive Gynecol*. 2007; 14(5): 633–637, doi: [10.1016/j.jmig.2007.05.014](https://doi.org/10.1016/j.jmig.2007.05.014), indexed in Pubmed: [17848327](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17848327/).
35. Wrotniak M, Bielecki T, Gaździk TS. Current opinion about using the platelet-rich gel in orthopaedics and trauma surgery. *Ortop Traumatol Rehabil*. 2007; 3(6): 227–238.
36. Alissa R, Esposito M, Horner K, et al. The influence of platelet-rich plasma on the healing of extraction sockets: an explorative randomised clinical trial. *Eur J Oral Implantol*. 2010; 3(2): 121–34. PMID: [20623037](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20623037/).
37. Moraes VY, Lenza M, Tamaoki MJ, et al. Platelet-rich therapies for musculoskeletal soft tissue injuries. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013(12): CD010071, doi: [10.1002/14651858.CD010071.pub2](https://doi.org/10.1002/14651858.CD010071.pub2), indexed in Pubmed: [24363098](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24363098/).
38. Elghblawi E. Medical micro-needling. *Trichol Cosmetol Open J*. 2017; 1(1): 21–24. doi: [10.17140/TCOJ-1-105](https://doi.org/10.17140/TCOJ-1-105).
39. Sand JP, Nabili V, Kochhar A, et al. Platelet-rich plasma for the aesthetic surgeon. *Facial Plast Surg*. 2017; 33(4): 437–443, doi: [10.1055/s-0037-1604240](https://doi.org/10.1055/s-0037-1604240), indexed in Pubmed: [28753720](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28753720/).
40. Chomiccki-Bindas P, Zakrzewski P, Pomianowski S. Platelet concentrates, as new and promising agent in the orthopedic surgery – an introduction. *Borgis — Post Nauk Med* 2010; 23(2): 153–157.
41. Bielecki T, Gaździk TS, Cieślík-Bielecka A, Cieślík T. Application of the platelet rich plasma as biomaterial stimulating tissue regeneration and reparation processes. *Inż Biomater* 2004; 7(34): 22–25.
42. Roffi A, Filardo G, Assirelli E, et al. Does platelet-rich plasma freeze-thawing influence growth factor release and their effects on chondrocytes and synoviocytes? *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 692913, doi: [10.1155/2014/692913](https://doi.org/10.1155/2014/692913), indexed in Pubmed: [25136613](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25136613/).
43. Lubkowska A, Dołęgowska B, Banfi G. Growth factor content in PRP and their applicability in medicine. *J Biol Regul Homeost Agents* 2012; 26(2): 3–22. PMID: [23648195](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23648195/).
44. ten Dijke P, Hansen P, Iwata KK, et al. Identification of another member of the transforming growth factor type beta gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988; 85(13): 4715–4719, doi: [10.1073/pnas.85.13.4715](https://doi.org/10.1073/pnas.85.13.4715), indexed in Pubmed: [3164476](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3164476/).
45. Houde N, Chamoux E, Bisson M, et al. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) induces human osteoclast apoptosis by up-regulating Bim. *J Biol Chem*. 2009; 284(35): 23397–23404, doi: [10.1074/jbc.M109.019372](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.019372), indexed in Pubmed: [19574221](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19574221/).
46. Tran J, Rak J, Sheehan C, et al. Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 264(3): 781–788, doi: [10.1006/bbrc.1999.1589](https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1589), indexed in Pubmed: [10544009](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10544009/).
47. Bielawska L, Kopczyński P, Szubińska P, Baszczuk A, Kopczyński Z. Evaluation of release rate of vascular endothelial growth factor

- (VEGF) by activated in vitro platelets in platelet-rich plasma. *Post Nauk Med.* 2014; 27(12B): 5-10.
48. Alsousou J, Thompson M, Hulley P, et al. The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery: a review of the literature. *J Bone Joint Surg Br.* 2009; 91(8): 987–996, doi: [10.1302/0301-620X.91B8.22546](https://doi.org/10.1302/0301-620X.91B8.22546), indexed in Pubmed: [19651823](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19651823/).
 49. Krüger JP, Freymann U, Vetterlein S, et al. Bioactive factors in platelet-rich plasma obtained by apheresis. *Transfus Med Hemother.* 2013; 40(6): 432–440, doi: [10.1159/000356329](https://doi.org/10.1159/000356329), indexed in Pubmed: [24474894](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24474894/).
 50. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 62(4): 489–496, doi: [10.1016/j.joms.2003.12.003](https://doi.org/10.1016/j.joms.2003.12.003), indexed in Pubmed: [15085519](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15085519/).
 51. Wang C, Xu M, Guo W, et al. Clinical efficacy and safety of platelet-rich plasma in arthroscopic full-thickness rotator cuff repair: A meta-analysis. *PLoS One.* 2019; 14(7): e0220392, doi: [10.1371/journal.pone.0220392](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220392), indexed in Pubmed: [31356630](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31356630/).
 52. Kour P, Pudukalkatti PS, Vas AM, et al. 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.* 2018; 9(Suppl 2): S325–S330, doi: [10.4103/ccd.ccd_367_18](https://doi.org/10.4103/ccd.ccd_367_18), indexed in Pubmed: [30294166](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30294166/).
 53. Drago L, Bortolin M, Vassena C, et al. Plasma components and platelet activation are essential for the antimicrobial properties of autologous platelet-rich plasma: an in vitro study. *PLoS One.* 2014; 9(9): e107813, doi: [10.1371/journal.pone.0107813](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107813), indexed in Pubmed: [25232963](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25232963/).
 54. Tang YQ, Yeaman MR, Selsted ME. Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun.* 2002; 70(12): 6524–6533, doi: [10.1128/iai.70.12.6524-6533.2002](https://doi.org/10.1128/iai.70.12.6524-6533.2002), indexed in Pubmed: [12438321](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12438321/).
 55. Cieślak-Bielecka A, Bold T, Ziółkowski G, et al. Antibacterial Activity of Leukocyte- and Platelet-Rich Plasma: An Study. *Biomed Res Int.* 2018; 2018: 9471723, doi: [10.1155/2018/9471723](https://doi.org/10.1155/2018/9471723), indexed in Pubmed: [30050949](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30050949/).
 56. Mochizuki T, Yano K, Ikari K, et al. Platelet-rich plasma for the reduction of blood loss after total knee arthroplasty: a clinical trial. *Eur J Orthop Surg Traumatol.* 2016; 26(8): 901–905, doi: [10.1007/s00590-016-1821-8](https://doi.org/10.1007/s00590-016-1821-8), indexed in Pubmed: [27448283](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27448283/).
 57. Tian WZ, Er JX, Liu L, et al. Effects of autologous platelet rich plasma on intraoperative transfusion and short-term outcomes in total arch replacement (sun's procedure): a prospective, randomized trial. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2019; 33(8): 2163–2169, doi: [10.1053/j.jvca.2019.02.033](https://doi.org/10.1053/j.jvca.2019.02.033), indexed in Pubmed: [31060939](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31060939/).
 58. Johal H, Khan M, Yung SHP, et al. Impact of platelet-rich plasma use on pain in orthopaedic surgery: a systematic review and meta-analysis. *Sports Health.* 2019; 11(4): 355–366, doi: [10.1177/1941738119834972](https://doi.org/10.1177/1941738119834972), indexed in Pubmed: [31136726](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31136726/).
 59. Rutkowski J, Thomas J, Bering C, et al. An analysis of a rapid, simple, and inexpensive technique used to obtain platelet-rich plasma for use in clinical practice. *J Oral Implantol.* 2008; 34(1): 25–33, doi: [10.1563/1548-1336\(2008\)34\[25:aaors\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1563/1548-1336(2008)34[25:aaors]2.0.co;2).
 60. Buchholz DH, Young VM, Friedman NR, et al. Bacterial proliferation in platelet products stored at room temperature. *Transfusion-induced Enterobacter sepsis.* *N Engl J Med.* 1971; 285(8): 429–433, doi: [10.1056/NEJM197108192850803](https://doi.org/10.1056/NEJM197108192850803), indexed in Pubmed: [5283524](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5283524/).
 61. Sampson S, Gerhardt M, Mandelbaum B. Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2008; 1(3-4): 165–174, doi: [10.1007/s12178-008-9032-5](https://doi.org/10.1007/s12178-008-9032-5), indexed in Pubmed: [19468902](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19468902/).
 62. Everts PAM, Knape JTA, Weibrich G, et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J Extra Corpor Technol.* 2006; 38(2): 174–187, indexed in Pubmed: [16921694](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16921694/).
 63. Zehnder JL, Leung LL. Development of antibodies to thrombin and factor V with recurrent bleeding in a patient exposed to topical bovine thrombin. *Blood.* 1990; 76(10): 2011–2016, doi: [10.1182/blood.v76.10.2011.bloodjournal76102011](https://doi.org/10.1182/blood.v76.10.2011.bloodjournal76102011).
 64. Ciężyńska M, Bednarski I, Lesiak A. The role of TGF- β in photodegradation and carcinogenesis. *Forum Dermatologicum* 2016;2(2):60-3.
 65. Sundman EA, Cole BJ, Fortier LA. Growth factor and catabolic cytokine concentrations are influenced by the cellular composition of platelet-rich plasma. *Am J Sports Med.* 2011; 39(10): 2135–2140, doi: [10.1177/0363546511417792](https://doi.org/10.1177/0363546511417792), indexed in Pubmed: [21846925](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21846925/).
 66. Tidball JG. Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Med Sci Sports Exerc.* 1995; 27(7): 1022–1032, doi: [10.1249/00005768-199507000-00011](https://doi.org/10.1249/00005768-199507000-00011), indexed in Pubmed: [7564969](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7564969/).
 67. Šumanovac A. Platelet-rich plasma in orthopaedics – to use or not to use? *Orthopedics, Traumatology Spor Med Int J.* 2018; 1(1): 5–6, doi: [10.30881/otsmij.00002](https://doi.org/10.30881/otsmij.00002).
 68. Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Bishara M, et al. Platelet-Rich Fibrin and Soft Tissue Wound Healing: A Systematic Review. *Tissue Eng Part B Rev.* 2017; 23(1): 83–99, doi: [10.1089/ten.TEB.2016.0233](https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2016.0233), indexed in Pubmed: [27672729](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27672729/).
 69. Chen JX, Justicz N, Lee LN. Platelet-Rich Plasma for the Treatment of Androgenic Alopecia: A Systematic Review. *Facial Plast Surg.* 2018; 34(6): 631–640, doi: [10.1055/s-0038-1660845](https://doi.org/10.1055/s-0038-1660845), indexed in Pubmed: [29954021](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29954021/).
 70. Chang Y, Li J, Chen Y, et al. Autologous platelet-rich plasma promotes endometrial growth and improves pregnancy outcome during in vitro fertilization. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8(1): 1286–1290. PMID: [24358582](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24358582/).
 71. Malahias MA, Chytas D, Mavrogenis AF, et al. Platelet-rich plasma injections for carpal tunnel syndrome: a systematic and comprehensive review. *Eur J Orthop Surg Traumatol.* 2019; 29(1): 1–8, doi: [10.1007/s00590-018-2278-8](https://doi.org/10.1007/s00590-018-2278-8), indexed in Pubmed: [30022241](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30022241/).
 72. Di Mario A, Crescenzi D, Di Rienzo Businco L. Functional reconstruction of turbinates with growth factors and adipose tissue in the treatment of empty nose syndrome. *J J Bone Stem Res* 2015; 1(2): 1-9.
 73. Jarka E. Review of Sjögren Syndrome: A Comparison of Two Topical Biologic Treatment Options. *J Ophthalmol Clin Res.* 2016; 3(3): 1–7, doi: [10.24966/ocr-8887/100024](https://doi.org/10.24966/ocr-8887/100024).
 74. Avila MY, Igua AM, Mora AM. Randomised, prospective clinical trial of platelet-rich plasma injection in the management of severe dry eye. *Br J Ophthalmol.* 2018 [Epub ahead of print], doi: [10.1136/bjophthalmol-2018-312072](https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2018-312072), indexed in Pubmed: [29970389](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29970389/).
 75. Scott S, Roberts M, Chung E. Platelet-Rich Plasma and Treatment of Erectile Dysfunction: Critical Review of Literature and Global Trends in Platelet-Rich Plasma Clinics. *Sex Med Rev.* 2019; 7(2): 306–312, doi: [10.1016/j.sxmr.2018.12.006](https://doi.org/10.1016/j.sxmr.2018.12.006), indexed in Pubmed: [30833169](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30833169/).
 76. Desai SA, Kroumpouzou G, Sadick N. Vaginal rejuvenation: From scalpel to wands. *Int J Womens Dermatol.* 2019; 5(2): 79–84, doi: [10.1016/j.ijwd.2019.02.003](https://doi.org/10.1016/j.ijwd.2019.02.003), indexed in Pubmed: [30997377](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30997377/).
 77. Neto JB. O-Shot: Platelets Rich Plasma in Intimate Female Treatment. *Journal of Women's Health Care.* 2017; 06(05), doi: [10.4172/2167-0420.1000395](https://doi.org/10.4172/2167-0420.1000395).

78. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 101(3): e37–e44, doi: [10.1016/j.tripleo.2005.07.008](https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.008), indexed in Pubmed: [16504849](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16504849/).
79. Cieřlik-Bielecka A, Bielecki T, Gaździk TS, Cieřlik T. Growth factors in the platelet-rich plasma as autogenic material which stimulates bone healing processes. *Czas Stomatol* 2006; 59(7): 510-517.
80. Ogundipe OK, Ugboko VI, Owotade FJ, et al. Preparation of platelet-rich plasma from small volume of whole blood - a simplified approach. *Niger Postgrad Med J* 2012; 19(3): 133–136. PMID: 23064167.
81. Mishra A, Harmon K, Woodall J, et al. Sports medicine applications of platelet rich plasma. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012; 13(7): 1185–1195, doi: [10.2174/138920112800624283](https://doi.org/10.2174/138920112800624283), indexed in Pubmed: [21740373](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21740373/).
82. Du L, Miao Y, Li X, et al. A novel and convenient method for the preparation and activation of PRP without any additives: temperature controlled PRP. *Biomed Res Int.* 2018; 2018: 1761865, doi: [10.1155/2018/1761865](https://doi.org/10.1155/2018/1761865), indexed in Pubmed: [29862255](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29862255/).
83. Harrison S, Vavken P, Kevy S, et al. Platelet activation by collagen provides sustained release of anabolic cytokines. *Am J Sports Med.* 2011; 39(4): 729–734, doi: [10.1177/0363546511401576](https://doi.org/10.1177/0363546511401576), indexed in Pubmed: [21398575](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21398575/).
84. Irmak G, Demirtař TT, Gümüřderelioęlu M. Sustained release of growth factors from photoactivated platelet rich plasma (PRP). *Eur J Pharm Biopharm.* 2020; 148: 67–76, doi: [10.1016/j.ejpb.2019.11.011](https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.11.011), indexed in Pubmed: [31811895](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31811895/).
85. Neculaes VB, Torres AS, Caiafa A, Dun-Lan Lee B, Garner AL. Platelet activation and growth factor release using electric pulses. United States Patent No. US010369200B2. 2019.
86. Lopez-Vidriero E, Goulding KA, Simon DA, et al. The use of platelet-rich plasma in arthroscopy and sports medicine: optimizing the healing environment. *Arthroscopy.* 2010; 26(2): 269–278, doi: [10.1016/j.arthro.2009.11.015](https://doi.org/10.1016/j.arthro.2009.11.015), indexed in Pubmed: [20141991](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20141991/).
87. Fadadu PP, Mazzola AJ, Hunter CW, et al. Review of concentration yields in commercially available platelet-rich plasma (PRP) systems: a call for PRP standardization. *Reg Anesth Pain Med.* 2019 [Epub ahead of print], doi: [10.1136/rapm-2018-100356](https://doi.org/10.1136/rapm-2018-100356), indexed in Pubmed: [30992411](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30992411/).
88. Chahla J, Cinque ME, PiuZZi NS, et al. 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.* 2017; 99(20): 1769–1779, doi: [10.2106/JBJS.16.01374](https://doi.org/10.2106/JBJS.16.01374), indexed in Pubmed: [29040132](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29040132/).
89. DeLong JM, Russell RP, Mazzocca AD. Platelet-rich plasma: the PAW classification system. *Arthroscopy.* 2012; 28(7): 998–1009, doi: [10.1016/j.arthro.2012.04.148](https://doi.org/10.1016/j.arthro.2012.04.148), indexed in Pubmed: [22738751](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22738751/).
90. Mautner K, Malanga GA, Smith J, et al. A call for a standard classification system for future biologic research: the rationale for new PRP nomenclature. *PM R.* 2015; 7(4 Suppl): S53–S59, doi: [10.1016/j.pmrj.2015.02.005](https://doi.org/10.1016/j.pmrj.2015.02.005), indexed in Pubmed: [25864661](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25864661/).
91. Magalon J, Chateau AL, Bertrand B, et al. DEPA classification: a proposal for standardising PRP use and a retrospective application of available devices. *BMJ Open Sport Exerc Med.* 2016; 2(1): e000060, doi: [10.1136/bmjsem-2015-000060](https://doi.org/10.1136/bmjsem-2015-000060), indexed in Pubmed: [27900152](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27900152/).
92. Lana JF, Purita J, Paulus C, et al. Contributions for classification of platelet rich plasma - proposal of a new classification: MARS-PILL. *Regen Med.* 2017; 12(5): 565–574, doi: [10.2217/rme-2017-0042](https://doi.org/10.2217/rme-2017-0042), indexed in Pubmed: [28758836](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28758836/).
93. Amable PR, Carias RB, Teixeira MV, 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, doi: [10.1186/scrt218](https://doi.org/10.1186/scrt218), indexed in Pubmed: [23759113](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23759113/).
94. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* 2009; 27(3): 158–167, doi: [10.1016/j.tibtech.2008.11.009](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.11.009), indexed in Pubmed: [19187989](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19187989/).