



Медицински университет
„Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна
Факултет „Фармация“
Катедра „Биология“

Николета Добромирова Иванова

**Количествени и качествени характеристики на
автоложни тромбоцитни концентрати и
биологичното значение на протеините в тях**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане
на образователна и научна степен „доктор“
Научна специалност: „Медицинска биология“

Научен ръководител:

Проф. Добри Лазаров Иванов, д.б.

Варна, 2021

Дисертационният труд е представен на 170 страници и съдържа 56 фигури, 63 таблици, 12 диаграми. Литературната справка включва 330 заглавия, от които 3 на кирилица и 327 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита от катедрен съвет на Катедра „Биология“ при Медицински университет „Проф. д-р П. Стоянов“ – Варна на 15.07.2021 г. и е насочен за публична защита пред Научно жури в следния състав:

Председател: проф. Добри Лазаров Иванов, д.б. – вътрешен член и научен ръководител

Членове:

1. Проф. Стефан Василев Пеев, д.м.н.
2. Проф. Регина Семьоновна Комса-Пенкова, д.б.н.
3. Доц. Мария Христова Казакова-Велинова, д.б.
4. Доц. Ваня Петрова Колева, д.б.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 15.10.2021г. от 10.00 часа.

Материалите по защитата са на разположение в библиотеката на Медицински университет „Проф. д-р П. Стоянов“ – Варна и в електронен вид на сайта на МУ-Варна.

Съдържание

	Дефиниции и съкращения, използвани в текста	3
I.	Въведение	5
II.	Цел, задачи, хипотеза	6
III.	Материал и методи	8
IV.	Собствени резултати	20
V.	Дискусия	55
VI.	Изводи	86
VII.	Научни приноси	88
VIII.	Заклучение	89
IX.	Научни публикации по темата	89
X.	Благодарности	91

Дефиниции и съкращения, използвани в текста

ADP	Adenosine diphosphate – аденозин дифосфат (АДФ)
ATP	Adenosine triphosphate – аденозин трифосфат (АТФ)
BC	„Buffy coat“ – „бъфи колт“
ECGF	Endothelial growth factor – ендотелен растежен фактор
ECGF	Bone morphogenetic proteins BMPs – костни морфогенни протеини
EGF	Epidermal growth factor – епидермален растежен фактор
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay – ЕЛАЙЗА изследване

GF	Growth factors – растежни фактори
IGF	Insulin like growth factor – инсулиноподобен растежен фактор
ILs	Интерлевкини
L-PRF	Leukocyte- and platelet rich fibrin – богат на левкоцити и тромбоцити фибринов съсирек
PC	Platelet concentrates – тромбоцитни концентрати
PC	Concentrated platelet rich plasma – концентрирана богата на тромбоцити плазма
PDGF	Platelet-derived growth factor – получен от тромбоцити растежен фактор
PG	Gelled platelet rich plasma – желирана богата на тромбоцити плазма
PPP	Platelet poor plasma – бедна на тромбоцити плазма
PRF	Platelet rich fibrin – богат на тромбоцити фибрин
PRP	Platelet rich plasma – обогатена с тромбоцити плазма
RCF, g	relative centrifugal force – относителна центробежна сила
TGF-β	Transforming growth factor beta – трансформиращ растежен фактор
TGFβ1	Transforming growth factor beta-1 – трансформиращ растежен фактор beta-1
M1	Метод 1
M2	Метод 2
M3	Метод 3
M4	Метод 4

I. Въведение

През последното десетилетие автоложните обогатени с тромбоцитни концентрати, в това число и т.нар. обогатена (богата) на тромбоцити плазма (PRP Platelet-Rich Plasma), придобиват широка популярност и намират разнообразно приложение в редица области на медицината – дерматология, ортопедия, спортна травматология, естетична и пластично-възстановителна хирургия, неврохирургия, лицево-челюстна хирургия, кардиохирургия и др.

Прилагането на автоложна, обогатена с тромбоцити плазма, т.нар. плазмотерапия, се определя като революционен, алтернативен метод в медицината. Процедурата представлява биологична терапия и се базира на наблюденията за ролята на тромбоцитите в естествения процес на репарация на увредените тъкани в тялото. Съществено значение за възстановителните процеси имат растежните фактори, „складирани“ в тромбоцитните клетки, тяхното биологично взаимодействие, средата и начинът, по който са активирани.

В литературата има описани множество различни протоколи за добиването на автоложни тромбоцитни продукти, но липсва стандартизация и консенсус по отношение на най-добрия подход за изготвяне. Засилената пролиферация и индуцирането на диференциация на човешките мезенхимни стволови клетки са възможните обяснения за клиничните успехи, съобщени при използване на автоложните тромбоцитни продукти.

PRP е методология, основаваща се на използването на собствените тромбоцити на пациента за подобряване на възстановяването на меките тъкани и костите след хирургични или дентални процедури. Обобщено, техниката представлява вземане на периферна кръв от пациента чрез конвенционални

флеботомични техники, която се центрофугира, като се образува отчетлив среден слой, съдържащ тромбоцити и бели кръвни клетки (WBC). Този слой се поставя в зоната на увредата, където се отделят растежни фактори и други цитокини, за да се даде възможност за по-бърза и предсказуема регенерация.

Въпреки нарастващата популярност на PRP продуктите и приложението им в различните сфери на медицината, съществуват редица противоречия по отношение на спецификата, протоколите на изготвяне, съдържанието на клетките, методите на съхранение, тайминга на приложение и активирането. В родната литература отсъстват публикации, отразяващи съвременните тенденции при изготвянето на автоложни тромбоцитни продукти. С настоящия труд си поставихме за цел да запълним тази празнина и въз основа на натрупания от нас опит да изчистим някои все още спорни моменти при изготвянето на PRP продуктите.

II. Цел, задачи, хипотеза

II.1. Цел

Целта на настоящото изследване е да се анализират количествените и качествените параметри на автоложните тромбоцитни концентрати, получени чрез различни методи.

II.2. Задачи

За изпълнението на целта са поставени следните задачи:

1. Да се извърши анализ на съществуващите и общоприети в практиката класификации на автоложните тромбоцитни концентрати и да се дискутира биологичното значение на растежните фактори в тях.

2. Да се извърши количествен анализ на кръвните компоненти в автоложната обогатена на тромбоцити плазма, получена чрез четири различни протокола.

3. Да се проследи нивото на основни категории протеини (PDGF-AB, TGF- β 1, IL-8) в изготвените проби.

4. Да се определят и дискутират факторите, които оказват влияние върху количествените и качествените характеристики на PRP продукта.

5. Да се систематизират и анализират предимствата и недостатъците на различните протоколи за получаване на PRP продукт на базата на получените резултати, като се предложи алгоритъм за изготвяне и стандартизиране.

II. 3. Хипотеза

Количественото и качественото анализиране на тромбоцитните концентрати, получени по четирите експериментални протокола, може да допринесе за изясняване състава на крайният PRP продукт и това да доведе до яснота в избора на клиницистите за прилагане на подходящият тип обогатена с тромбоцити плазма в медицинската практика.

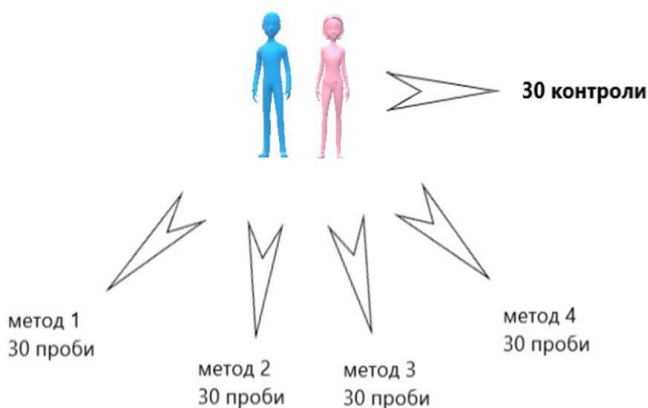
III. Материал и методи

За постигане на поставената цел да се извърши анализ за съдържанието на наличните кръвни компоненти в обогатени с тромбоцити плазмени концентрати и да се проследи количественото присъствие на протеините TGF- β 1, PDGF-AB и IL-8 чрез прилагане на четири различни методи, се използва кръв от здрави донори, хора с тяхното информирано съгласие и знание. Научното проучване е с разрешение от Комисията по етика на научните изследвания към МУ-Варна (61/30.03.2017).

Тридесетте доброволци (14 жени и 16 мъже), взели участие в научното изследване, се разпределят в пет възрастови групи: от 21–30-г. (4 броя), от 31–40-г. (12 броя), от 41–50-г. (5 броя), от 51–60-г. (6 броя) и последна – от 61–70-г. (3 броя).

От всеки един от участниците се изтегля венозна кръв, която се обработва по четирите предварително селектирани метода (протокола). Получените резултати от всеки метод, по отношение на кръвните компоненти в PRP продукта и три основни категории протеини (PDGF-AB, TGF- β 1, IL-8), се анализират помежду си и се сравняват със средните изходни стойности на участниците (контролна група). Считаме, че в настоящото изследване е редно да се говори за документиран анализ на изследвани проби, а не на общ брой изследвани

участници. Научното проучване обхваща 120 изследвани проби, които са сравнени с 30 контроли (фигура 1).



Фиг. 1. Схема на научното проучване

За практическото изпълнение на заложените задачи в дисертационния труд се използват следните лабораторни консумативи: първият – вакутейнер 8 мл със сепариращ биосъвместим инертен гел (циклоалифатен полимерен гел), съставен от смес от полимери за плазмено разделяне (елиминиращи червените кръвни клетки), вторият вид – моновета 8 мл (S-Monovette, Sarstedt) без наличие на сепариращ гел. Всеки вакутейнер и моновета съдържат антикоагулант 3,2% тринатриев цитрат.

Венозната кръв се изтегля от всеки здрав донор в удобно положение, при спазване на условията за стерилност и добрата лабораторна практика. Венепункцията се извършва с игла с размер 22G, за да се избегне преждевременното активиране на тромбоцитите. Количеството изтеглена от всеки един участник кръв е 35 мл. Тя се разпределя в два вакутейнера и две моновети с антикоагулант тринатриев цитрат и се подлага на обработка по четири експериментални метода. Три милилитра от периферната кръв се отделя в моновета, съдържаща 3,2% антикоагулант тринатриев цитрат и се използва като контролна група за анализ на изходните стойности на формените елементи. Всяка кръвна единица е обработена в рамките на 2 часа от нейното изтегляне. За нуждите на научното изследване са използвани лабораторни центрофуги OHAUS Frontier 5000 Series Multi, като ъгълът на въртене на пробите в ротора е 32° (фиг. 2). Симетрично разположение на изпитваните епруветки и калибрирането на тежестта са задължителен елемент преди центрофугирането.



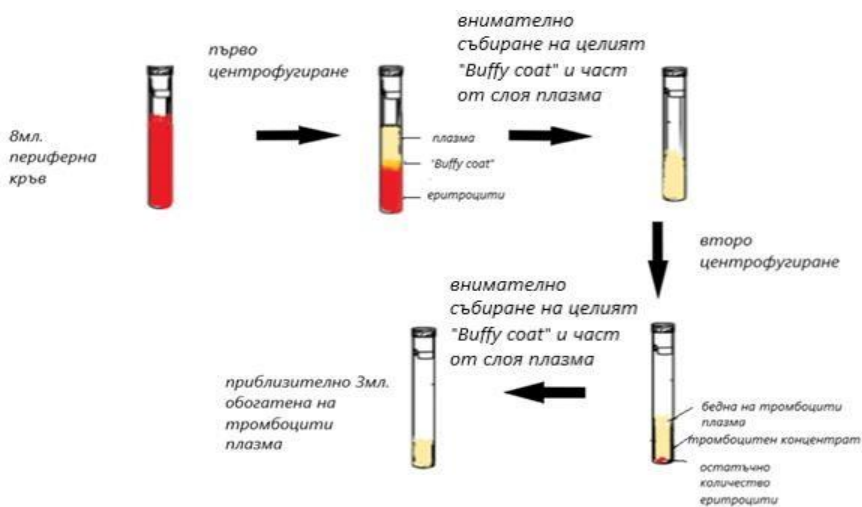
Фиг. 2. Стандартна лабораторна центрофуга

Първият протокол на обработка на кръвта включва единично центрофугиране на моновета без гел, при стайна температура с центрофужна сила 1500xg за 10 мин. Вторият метод е при същите условия на единично центрофугиране с центрофужна сила 1500xg за 10 мин, но с използване на вакутейнер със сепариращ гел. Третият протокол включва процес на двойно центрофугиране на моновета без гел. Първото въртене (разделително) е с центрофужна сила 1150xg за 10 мин, второто – концентрационно въртене с центрофужна сила 350xg за 5 мин. Четвъртият метод подлага на обработка 8 мл кръв във вакутейнер със сепариращ гел в условия, както при метод три – първо въртене с центрофужна сила 1150xg за 10 мин и второ концентрационно въртене с центрофужна сила 350xg за 5 мин (таблица 1).

Таблица 1. Протоколи за получаване на PRP по четири различни метода

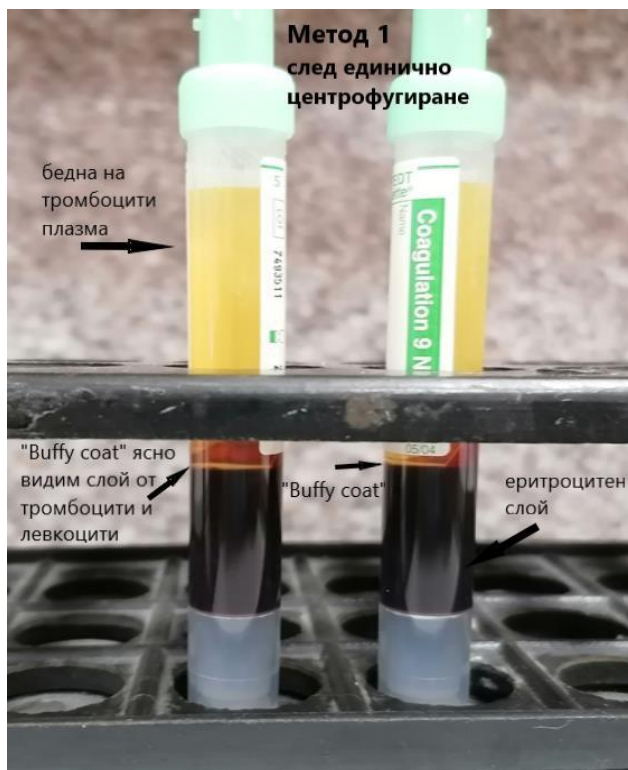
Методи		Сепариращо въртене		Концентриращо въртене	
		Центрофужна сила (g)	Време (мин)	Центрофужна сила (g)	Време (мин)
1	 без гел	1500	10		
2	 с гел	1500	10		
3	 без гел	1150	10	350	5
4	 с гел	1150	10	350	5

И при четирите метода кръвта се подлага на центрофугиране при стайна температура 20–22°C. Работните стъпки за добив на обогатена с тромбоцити плазма се причисляват към т.нар. „buffy coat“ техника, а именно първото въртене е с високи стойности на RCF (Relative centrifugal force) – относителна центробежна сила. След първото сепариращо въртене и при четирите метода се образуват три видими слоя: най-долният, богат на червени кръвни клетки; среден, богат на тромбоцити и бели кръвни клетки – т.нар. „buffy coat“; най-горен – беден на тромбоцити слой (platelet poor plasma – PPP) (фиг. 3).



Фиг. 3. Схематично представяне на етапите в производството на PRP чрез техниката „Buffy coat“

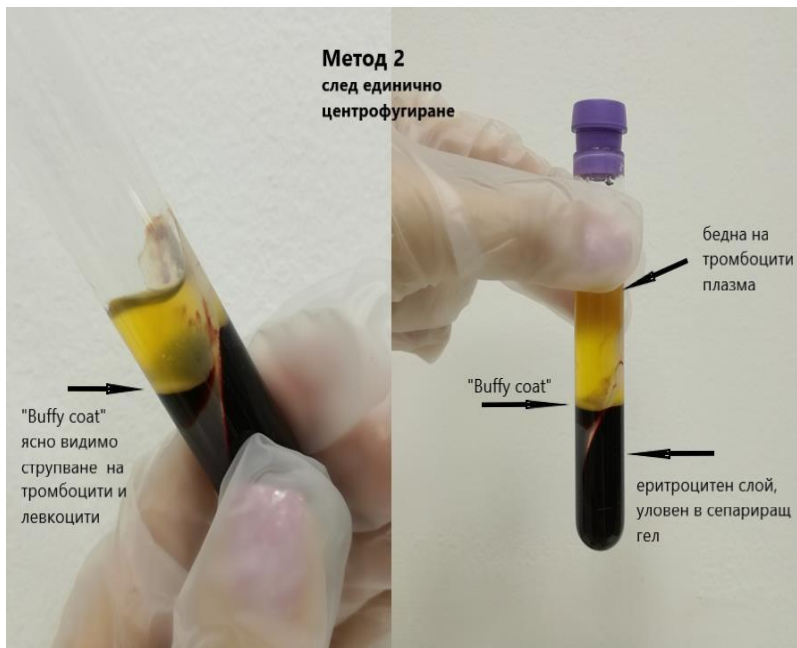
При метод I и II – единично центрофугиране, отстраняваме част от повърхностния беден на тромбоцити слой (PPP). При протокол I внимателно отпипетирваме 3 мл от останалия над еритроцитите продукт за изследване (фиг. 4).



Фиг. 4. Протокол I – обогатена на тромбоцити плазма в епруветки без сепариращ гел

При метод II – част от останалата плазма (PPP) в епруветката се аспирира и връща с цел да се „отлепи“ полепналият слой клетки върху сепарация гел. След

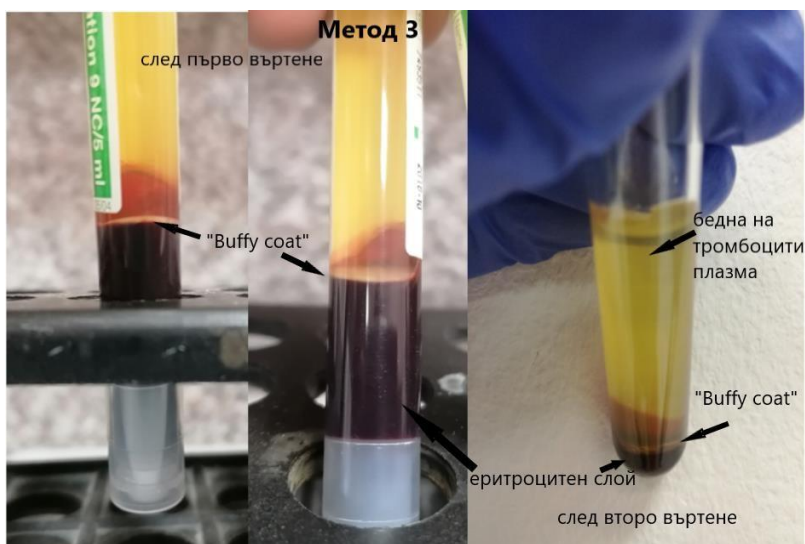
„отмиването“ на полепналите клетки от гела аспирираме продукта (също с обем 3 мл) за извършване на анализ по отношение на състава на клетките и нивото на растежните фактори (фиг. 5).



Фиг. 5. Протокол 2 – обогатена на тромбоцити плазма в епруветки със сепариращ гел

При протокол III и IV средният слой и по-голямата част от бедната на тромбоцити плазма (PPP) внимателно се

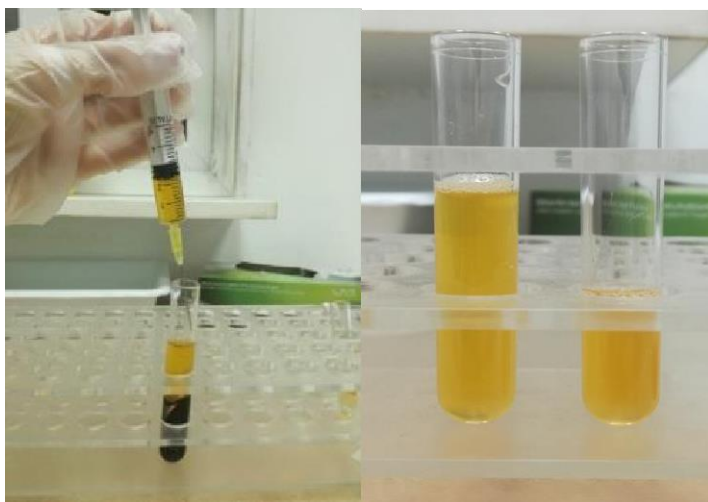
отпипетирват и се пренасят в нова епруветка вече без наличие на антикоагулант за последващо второ концентрационно центрофугиране. След второто центрофугиране се отчита малък брой еритроцити, утаени в долната част на епруветката, тромбоцитен концентрат над него и отново слой бедна на тромбоцити плазма най-отгоре (фиг. 6, фиг.7). Внимателно аспирираме част от повърхностния слой – бедната на тромбоцити плазма, който се елиминира. Останалото количество плазма (с обем 3 мл) се евакуира с пипета, за да може да се улови максимално тромбоцитният концентрат, като полученият продукт се подлага на последващо изследване (фиг. 8).



Фиг. 6. Протокол 3 – ясно видими тромбоцитно-левкоцитни слоеве след първо и второ центрофугиране

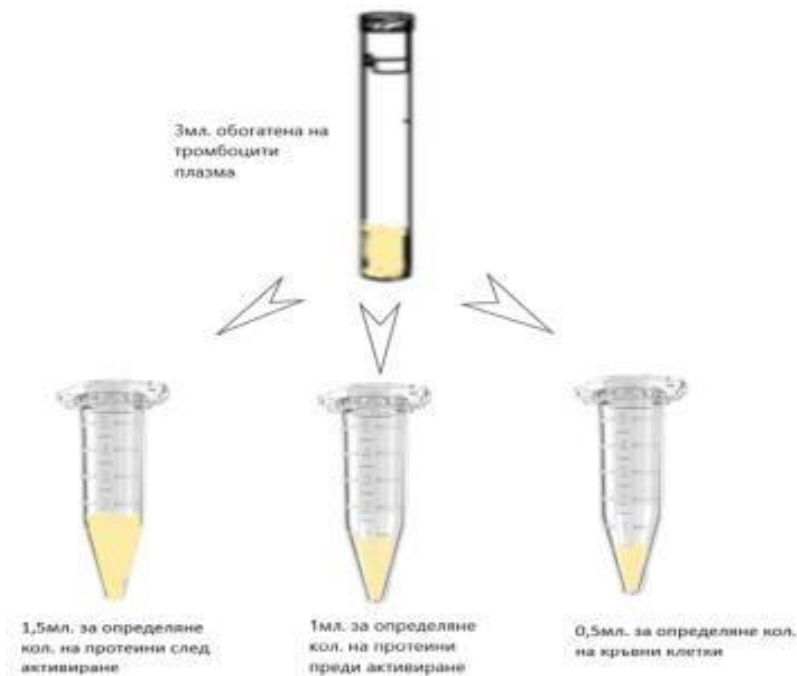


Фиг. 7. Протокол 4, етап I – обогатена на тромбоцити плазма в епруветки със сепариращ гел



Фиг. 8. (ляво) Премахване на горния слой бедна на тромбоцити плазма; (дясно) Получено количество PPP и PRP от всяка изследвана проба

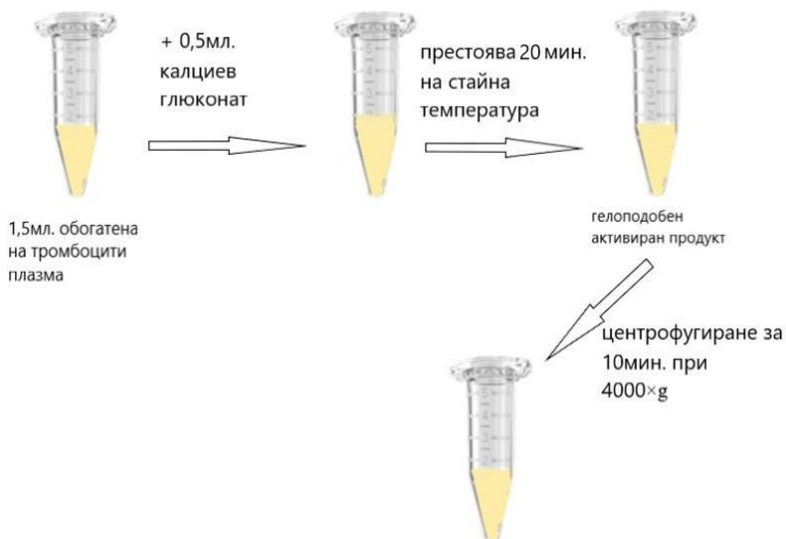
Като краен продукт след всеки един от четирите протокола е налице 3 мл PRP обем. От всяка една от тези проби (3 мл) се отделя 1,5 мл в стерилни микропруветки без наличие на антикоагулант за извършване на активиране на продукта с последващо определяне количеството на (PDGF-AB, TGF- β 1 и IL-8). От всяка една проба отделяме и 1 мл от PRP продукта за определяне на количеството протеини (PDGF-AB, TGF- β 1 и IL-8) преди активиране. Останалото количество от добитата обогатена на тромбоцити плазма (0,5 мл) се отделя в микропруветки тип Епендорф за анализ на наличните кръвни клетки в нея (фиг. 9).



Фиг. 9. Схематично представяне на разделяне обем обогатена на тромбоцити плазма в три микропруветки

Автоложният продукт, получен от всеки от четирите метода (0,5 мл), се подлага на анализ за количествено определяне на еритроцити, тромбоцити, левкоцити, както и неутрофили, моноцити и лимфоцити чрез използването на автоматичен хемоанализатор Swelab Alfa Basic (Boule Medical AB, Швеция). Извършва се сравнение с контролните стойности на кръвните клетки от периферната кръв, взета в началото (контролна група), анализира се насищането с тромбоцити в брой пъти и количественото съдържание на левкоцитите, като се определя и факторът на концентрация (%) спрямо изходните стойности.

От получения PRP продукт отделяме плазма с обем 1,5 мл, която подлагаме на активиране с последващо измерване на съдържащите се протеини PDGF-AB, TGF- β 1 и IL-8. За екзогенен активатор избираме калциев глюконат (Calcium gluconicum amp. 10%) (фиг. 10). В епруветка без антикоагулант поставяме добитата плазма, която смесваме с 0,5 мл калциев глюконат. Хомогенизираме сместа и оставяме в покой при стайна температура за 20 мин. Полученият гелоподобен продукт (фиг. 11) се подлага на последващо центрофугиране с центрофужна сила 4000xg за 10 мин с цел отстраняване на вече активираните тромбоцити, а отделените от тях растежните фактори в плазмата се подлагат на количествено определяне чрез ELISA изследване.



Фиг. 10. Схематично представяне на отделните стъпки в процеса на активиране



Фиг. 11. PRP в гелообразна форма след процес на активиране

За постигането на зададената цел на настоящия дисертационен труд се осъществи количественото определяне на PDGF-AB, TGF- β 1 и IL-8 в получените продукти, базирано на enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA изследване). Използваните търговски продукти (китове) за определяне на съдържанието са: Human PDGF-AB ELISA Kit Thermo Fisher за PDGF-AB, за TGF- β 1 – Human TGF-beta1 ELISA Kit Invitrogen и за IL-8, съответно Human IL-8 ELISA Kit Invitrogen. Изработването на ELISA изследванията е осъществено при стриктно придържане към ръководствата за употреба на производителя. За определяне на абсорбционната стойност при дължина на вълната 450 nm е използван ELISA четец Diatek DR-200Bs.

IV. Собствени резултати

В настоящото проучването са включени 30 участници, определени на случаен принцип. Средната възраст на изследваните лица е 42.77 години ($SD \pm 11.840$), минимална възраст 26 години и максимална възраст 64 години. Разпределението по пол показва, че по-висок относителен дял (53.33%, $n=16$) имат мъжете в сравнение с жените, чийто относителен дял е 46.67% ($n=14$). С цел да се провери хипотезата, че честотното разпределение на мъжете и жените е статистически незначимо, е проведен хи-квадрат тест (Chi-square test), което показва, че разликата в относителните дялове в разпределението по пол е статистически незначима: $\chi^2 (1.30) = 0.133$, ($p > 0.05$). Данни са представени в таблица 2.

Средната възраст в групата на изследваните мъже е 41.44 (станд. откл. ± 12.842), а в групата на изследваните жени средната възраст е 44.29 (станд. откл. ± 10.852).

Таблица 2. Разпределение на изследваните лица по пол и възраст

Пол	Брой	Относителен дял	χ^2	р-стойност	Възраст	
	N	%			средна	Станд. откл.
Мъже	16	53.33%	0.133	0.715	41.44	± 12.842
Жени	14	46.67%			44.29	± 10.852

Количествено определяне на кръвни клетки в контрола и четири експериментални метода

В таблица 3 са представени минимална, максимална, средна стойности и стандартно отклонение за червени кръвни клетки, тромбоцити, левкоцити, неутрофили, моноцити и лимфоцити в контролната група.

Таблица 3. Дескриптивна статистика на изследваните клинични лабораторни показатели в контролната група

Клиничен лабораторен показател	Контролна група (n=30)			
	Мин. стойност	Макс. стойност	Средна стойност	Станд. откл.
еритроцити ($\times 10^{12}/L$)	4.0	6.1	5.01	± 0.642
тромбоцити ($\times 10^9/L$)	170	420	287.03	± 63.214
Левкоцити ($\times 10^9/L$)	3.7	9.0	6.24	± 1.283
неутрофили ($\times 10^9/L$)	2.2	5.4	3.60	± 0.801
моноцити ($\times 10^9/L$)	0.5	1.1	0.78	± 0.185
лимфоцити ($\times 10^9/L$)	1.2	3.4	2.01	± 0.458

Параметрите на кръвни клетки от автоложните тромбоцитни продукти, получени по четири експериментални протокола, са представени в таблица 4 със средна стойност и стандартно отклонение.

Таблица 4. Стойности на изследваните кръвни клетки според четирите експериментални протокола

Клиничен Лабораторен показател	Протокол 1		Протокол 2		Протокол 3		Протокол 4	
	Средна стой- ност	Станд. откл.	Средна стой- ност	Станд. откл.	Средна стой- ност	Станд. откл.	Средна стойност	Станд. откл.
еритроцити $\times 10^{12}/L$	2.41	± 0.547	0.43	± 0.195	0.193	± 0.041	0.008	± 0.006
тромбоцити $\times 10^9/L$	549.80	± 118.85 6	1254.50	± 274.141	1297.60	± 283.272	1406.00	± 313.0 91
левкоцити $\times 10^9/L$	12.93	± 1.978	11.38	± 2.199	3.71	± 0.992	1.60	± 0.313
неутрофили $\times 10^9/L$	6.43	± 1.389	5.82	± 1.361	0.01	± 0.009	0.005	± 0.005
моноцити $\times 10^9/L$	2.98	± 0.855	2.97	± 0.775	0.48	± 0.163	0.007	± 0.007
лимфоцити $\times 10^9/L$	8.88	± 2.055	8.80	± 2.022	2.23	± 0.451	1.05	± 0.138

При пробите от метод 1 се установява понижение с 51.9% на средната стойност на еритроцитите в сравнение със стойностите на контролната група, повишение на тромбоцитите с 91.55% и повишение на левкоцитите с 107.21%. Процентното изменение на средната стойност на изследваните клинични лабораторни показатели е показана на таблица 5.

Таблица 5. Стойности на формените елементи (контролна група/метод 1) и процентно изменение на средната стойност за изследваните лица следтестово

Клиничен лабораторен показател	Контролна група		Метод 1		Процент промяна в средната стойност	Тенденция
	Средна стойност	Станд. откл.	Средна стойност	Станд. откл.		
еритроцити $\times 10^{12}/L$	5.01	± 0.642	2.41	± 0.547	-51.9%	Понижение
тромбоцити $\times 10^9/L$	287.03	± 63.214	549.80	± 118.856	+91.55%	Повишение
левкоцити $\times 10^9/L$	6.24	± 1.283	12.93	± 1.978	+107.21%	Повишение

При метод 2 се установява понижение с 91.42% на средната стойност на еритроцитите в сравнение със стойностите от контролната група, повишение на тромбоцитите с 337.06% и повишение на левкоцитите с 82.37%. Процентното изменение на средната стойност на изследваните клинични лабораторни показатели е показана на таблица 6.

Таблица 6. Стойности на формените елементи (контролна група/метод 2) и процентно изменение на средната стойност за изследваните лица следтестово

Клиничен лабораторен показател	Контролна група (n=30)		Метод 2		Процент промяна в средната стойност	Тенденция
	Средна стойност	Станд. откл.	Средна стойност	Станд. откл.		
еритроцити $\times 10^{12}/L$	5.01	± 0.642	0.430	± 0.195	-91.42%	Понижение
тромбоцити $\times 10^9/L$	287.03	± 63.214	1254.50	± 274.14 1	+337.06%	Повишение
левкоцити $\times 10^9/L$	6.24	± 1.283	11.38	± 2.199	+82.37%	Повишение

При метод 3 се установява понижение с 96.18% на средната стойност на еритроцитите в сравнение със стойностите на контролната група, повишение на тромбоцитите с 352.08% и понижение на левкоцитите с 40.54%. Процентното изменение на средната стойност на изследваните клинични лабораторни показатели са показана на таблица 7.

Таблица 7. Стойности на формените елементи (контролна група/метод 3) и процентно изменение на средната стойност за изследваните лица следтестово

Клиничен лабораторен показател	Контролна група (n=30)		Метод 3		Процент промяна в средната стойност	Тенденция
	Средна стойност	Станд. откл.	Средна стойност	Станд. откл.		
еритроцити $\times 10^{12}/L$	5.01	± 0.642	0.193	± 0.041	-96.18%	Понижение
тромбоцити $\times 10^9/L$	287.03	± 63.214	1297.60	± 283.272	+352.08%	Повишение
левкоцити $\times 10^9/L$	6.24	± 1.283	3.71	± 0.992	-40.54%	Понижение

При метод 4 се установява понижение с 99.84% на средната стойност на еритроцитите в сравнение със стойностите на контролната група, повишение на тромбоцитите с 389.84% и понижение на левкоцитите с 74.36%. Процентното изменение на средната стойност на изследваните клинични лабораторни показатели е показано в таблица 8.

Таблица 8. Стойности на формените елементи (контролна група/метод 4) и процентно изменение на средната стойност за изследваните лица следтестово

Клиничен лабораторен показател	Контролна група		Метод 4		Процент промяна в средната стойност	Тенденция
	Средна стойност	Станд. откл.	Средна стойност	Станд. откл.		
еритроцити $\times 10^{12}/L$	5.01	± 0.642	0.008	± 0.006	-99.84%	Понижение
Тромбоцити $\times 10^9/L$	287.03	± 63.214	1406.00	± 313.091	+389.84%	Повишение
Левкоцити $\times 10^9/L$	6.24	± 1.283	1.60	± 0.313	-74.36%	Понижение

В експерименталната група от протокол 1 се установи статистическо значимо различие между средните контролни (предтестови) и следтестови стойности на еритроцити, $t = 19.018$, $p < 0.05$, тромбоцити, $t = -24.922$, $p < 0.05$ и левкоцити, $t = -27.465$, $p < 0.05$. Тези данни са представени в таблица 9.

Таблица 9. Сравнение на средна стойност на еритроцити, тромбоцити и левкоцити от контролна група със стойности от метод 1

Клиничен лабораторен показател	Контролна група		Метод 1		Т-тест	Т-тест (p-стойност)
	Средна стойност	Станд. откл.	Средна стойност	Станд. откл.		
еритроцити $\times 10^{12}/L$	5.01	± 0.642	2.41	± 0.547	19.018	$p < 0.05$
тромбоцити $\times 10^9/L$	287.03	± 63.214	549.80	± 118.856	-24.922	$p < 0.05$
левкоцити $\times 10^9/L$	6.24	± 1.283	12.93	± 1.978	-27.465	$p < 0.05$

В експерименталната група от метод 2 се установи статистическо значимо различие между средните контролни и средните следтестови стойности на еритроцити, $t = 40.791$, $p < 0.05$, тромбоцити, $t = -24.989$, $p < 0.05$ и левкоцити, $t = -24.882$, $p < 0.05$. Данните са представени в таблица 10.

Таблица 10. Сравнение на средна стойност на еритроцити, тромбоцити и левкоцити от контролна група със стойности от метод 2

Клиничен лабораторен показател	Контролна група		Метод 2		Т-тест	t-тест (p-стойност)
	Средна стойност	Станд. откл.	Средна стойност	Станд. откл.		
еритроцити $\times 10^{12}/L$	5.01	± 0.642	0.430	± 0.195	40.791	$p < 0.05$
тромбоцити $\times 10^9/L$	287.03	± 63.214	1254.50	± 274.141	-24.989	$p < 0.05$
левкоцити $\times 10^9/L$	6.24	± 1.283	11.38	± 2.199	-24.882	$p < 0.05$

В експерименталната група от метод 3 се установи статистическо значимо различие между средните контролни (предтестови) и следтестови стойности на еритроцити, $t=41.369$, $p < 0.05$, тромбоцити, $t=-25.018$, $p < 0.05$ и левкоцити, $t=30.525$, $p < 0.05$. Тези данни са представени в таблица 11.

Таблица 11. Сравнение на средна стойност на еритроцити, тромбоцити и левкоцити от контролна група със стойности от метод 3

Клиничен лабораторен показател	Контролна група (n=30)		Метод 3		Т-тест	Т-тест (р-стойност)
	Средна стойност	Станд. откл.	Средна стойност	Станд. откл.		
еритроцити $\times 10^{12}/L$	5.01	± 0.642	0.193	± 0.041	41.369	$p < 0.05$
тромбоцити $\times 10^9/L$	287.03	± 63.214	1297.60	± 283.272	-25.018	$p < 0.05$
левкоцити $\times 10^9/L$	6.24	± 1.283	3.71	± 0.992	30.525	$p < 0.05$

В експерименталната група от метод 4 се установи статистически значима разлика между средните контролни и средните следтестови стойности на еритроцити, $t=42.710$, $p < 0.05$, тромбоцити, $t=-24.409$, $p < 0.05$ и левкоцити, $t=-21.969$, $p < 0.05$. Данните са представени в таблица 12.

Таблица 12. Сравнение на средна стойност на еритроцити, тромбоцити и левкоцити от контролна група със стойности от метод 4

Клиничен лабораторен показател	Контролна група (n=30)		Метод 4		t-тест	t-тест (р-стойност)
	Средна стойност	Станд. откл.	Средна стойност	Станд. откл.		
еритроцити $\times 10^{12}/L$	5.01	± 0.642	0.008	$\pm 0,006$	42.710	$p < 0.05$
тромбоцити $\times 10^9/L$	287.03	± 63.214	1406.00	$\pm 313,091$	-24.409	$p < 0,05$
левкоцити $\times 10^9/L$	6.24	± 1.283	1.60	$\pm 0,313$	21.969	$p < 0.05$

Анализ на връзката между стойностите на еритроцити в контролната група и получените стойности следтестово за метод 1, метод 2, метод 3 и метод 4

За анализ на връзката между стойностите на еритроцитите от контролната група и получените стойности следтестово за метод 1, метод 2, метод 3 и метод 4 е приложен корелационен анализ при спазване на добрата практика за определяне на точен статистически инструмент. Не се установи статистически значима корелация между анализираните променливи ($p < 0.05$). Стойностите на корелационните коефициенти и нивата на значимост са показани на таблица 13.

Таблица 13. Корелационен анализ между стойностите на еритроцити от контролната група и получените стойности по експериментални методи

Еритроцити				
Контролна група спрямо	метод 1	метод 2	метод 3	метод 4
Корелационен коефициент (r)	0.278	0.247	0.194	0.028
Значимост	p=0.137	p=0.188	p=0.305	p=0.884

Анализ на връзката между стойностите на тромбоцити в контролната група и получените стойности следтестово за метод 1, метод 2, метод 3 и метод 4

Най-висока асоциация се наблюдава между стойността на тромбоцитите от контролната група и следтестовата стойност от метод 4 ($r=0.948$, $p < 0.01$), а най-ниска при стойностите на тромбоцитите от метод 3 ($r = 0.896$, $p < 0.01$). Стойностите на

корелационните коефициенти и нивата на значимост за показани на таблица 14.

Таблица 14. Корелационен анализ между стойностите на тромбоцити от контролната група и получените стойности по експериментални методи

Тромбоцити				
Контролна група спрямо	метод 1	метод 2	метод 3	метод 4
Корелационен коефициент (r)	0.945	0.902	0.896	0.948
Значимост	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01

Анализ на връзката между стойностите на левкоцитите в контролната група и получените стойности следтестово за метод 1, метод 2, метод 3 и метод 4

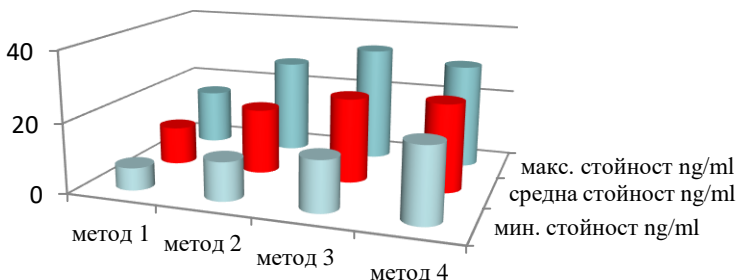
Най-висока асоциация се наблюдава между стойността на левкоцитите от контролната група и следтестовата стойност от метод 2 ($r=0.945$, $p<0.01$), а най-ниска – при стойностите на левкоцитите от метод 4 ($r =0.557$, $p<0.01$). Стойностите на корелационните коефициенти и нивата на значимост за показани на таблица 15.

Таблица 15. Корелационен анализ между стойностите на левкоцити от контролната група и получените стойности по експериментални методи

Левкоцити				
Контролна група спрямо	метод 1	метод 2	метод 3	метод 4
Корелационен коефициент (r)	0.772	0.945	0.788	0.1557
Значимост	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01

Анализ на данни относно растежен фактор TGF beta 1

Средната стойност на TGF beta 1 **преди** активирание е най-висока при метод 4 (25.17 ± 2.369 ng/ml) с минимална стойност 21.22 ng/ml и максимална 30.12 ng/ml, следвана от метод 3 (24.31 ± 5.106 ng/ml) с минимална стойност 14.55 ng/ml и максимална стойност 33.26 ng/ml. След това място заема метод 2 (18.80 ± 4.109 ng/ml) с минимална стойност 11.09 ng/ml и максимална 27.41 ng/ml и най-ниска средна стойност наблюдаваме при метод 1 (11.00 ± 2.399 ng/ml) с минимална стойност 6.44 ng/ml и максимална 16.02 ng/ml (диаграма 1).

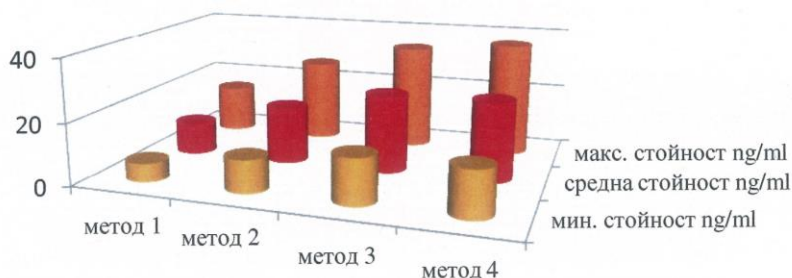


Диаграма 1. Стойности на TGF beta 1 преди активирание за четирите експериментални метода

Средната стойност на TGF beta 1 **след** активирание е най-висока при метод 4 (25.37 ± 5.297 ng/ml) с минимална стойност 14.96 ng/ml и максимална 36.77 ng/ml. След това е метод 3 със средна стойност 24.79 ± 5.171 ng/ml с минимална стойност 14.85 ng/ml и максимална 33.93 ng/ml. Пробите от метод 2 имат средна стойност 18.24 ± 3.982 ng/ml с минимална стойност 10.76 ng/ml и

максимална 26.59 ng/ml. Най-ниска средна стойност наблюдаваме при метод 1 ($10,37 \pm 2,165$ ng/ml), с минимална стойност 6.18 ng/ml и максимална 15.38 ng/ml (диаграма 2).

Минималните, максималните и средните стойности на TGF beta 1 след активирание за четирите използвани протокола са представени на диаграма 8. Наблюдава се тенденция за плавно увеличаване от метод 1 към метод 4.



Диаграма 2. Минимални, максимални и средни стойности на TGF beta 1 след активирание за четирите експериментални метода

За анализ на връзката между стойностите на TGF beta 1 в пробите преди активирание за метод 1, 2, 3 и 4 със стойностите на тромбоцитите от контролната група е приложен корелационен анализ, в резултат на което се установи статистически значима положителна корелация в изследваните променливи ($p < 0.05$). Стойностите на корелационните коефициенти и нивата на значимост са показани на таблица 16.

Таблица 16. Корелационен анализ между стойностите на тромбоцити от контролната група и стойностите на TGF- β 1 преди активация

Корелация на тромбоцити от контролна група	TGF β 1 преди активация			
	Метод 1	метод 2	метод 3	метод 4
Корелационен коефициент (r)	0.900	0.901	0.929	0.905
Значимост	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01

За анализ на връзката между стойностите на TGF beta 1 след активация за метод 1, метод 2, метод 3 и метод 4 и стойността на тромбоцитите от контролната група е приложен корелационен анализ, в резултат на което се установи статистически значима положителна корелация в изследваните променливи ($p<0.05$). Линейната корелация между анализирания променливи е много голяма и за четирите метода. Стойностите на корелационните коефициенти и нивата на значимост са показани в таблица 17.

Таблица 17. Корелационен анализ между стойностите на тромбоцити от контролната група и стойностите на TGF β 1 след активация

Корелация на тромбоцити контролна група	TGF beta 1 след активация			
	Метод 1	Метод 2	Метод 3	Метод 4
Корелационен коефициент (r)	0.899	0.900	0.936	0.913
Значимост	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01

Запазва се тенденцията за положителна корелация между количеството на тромбоцити от контролните проби към количеството на TGF beta 1 в пробите от четири експериментални протокола след активирането им.

За да се проследи връзката между средната стойност на тромбоцитите, получени при условията на метод 1, и стойностите на TGF beta 1 преди и след активация от метод 1, е проведен корелационен анализ, като се установи статистически значима положителна корелация в изследваните променливи ($p < 0.05$). Стойностите на корелационните коефициенти и нивата на значимост са представени в таблица 18.

Таблица 18. Корелационен анализ между средната стойност на тромбоцити от метод 1 и стойностите на TGF b1 от метод 1 преди и след активация

Корелация на тромбоцити от метод 1	TGF b1 преди активация Метод 1	TGF b1 след активация Метод 1
Корелационен коефициент (r)	0.955	0.903
Значимост	$p < 0.01$	$p < 0.01$

Проведен е корелационен анализ за връзката между средната стойност на тромбоцитите, получени при условията на метод 2 и стойностите на TGF beta 1 преди и след активация от метод 2, който също установи статистически значима положителна корелация в изследваните променливи ($p < 0.05$) (табл. 19).

Таблица 19. Корелационен анализ между стойностите на тромбоцити от метод 2 и стойностите на TGF b1 от метод 2 преди и след активация

Корелация на тромбоцити от метод 2	TGF b1 преди активация Метод 2	TGF b1 след активация Метод 2
Корелационен коефициент (r)	0.945	0.903
Значимост	p<0.01	p<0.01

Корелационният анализ за проследяване на връзката между средната стойност на тромбоцитите от метод 3 спрямо TGF beta 1 в пробите преди и след активиране от метод 3 също установи положителна корелация в изследваните променливи (табл. 20).

Таблица 20. Корелационен анализ между стойностите на тромбоцити от метод 3 и стойностите на TGF b1 от метод 3 преди и след активация

Корелация на тромбоцити от метод 3	TGF b1 преди активация метод 3	TGF b1 след активация метод 3
Коефициент	0.954	0.952
Значимост	p<0.01	p<0.01

Същата корелационна зависимост е направена и между стойността на тромбоцитите от метод 4 със стойностите на TGF beta 1 преди и след процеса на активиране на пробите (табл. 21).

Таблица 21. Корелационен анализ между стойностите на тромбоцити от метод 4 и стойностите на TGF b1 от метод 4 преди и след активация

Корелация на тромбоцити от метод 4	TGF b1 преди активация метод 4	TGF b1 след активация метод 4
Корелационен коефициент (r)	0.949	0.948
Значимост	p<0.01	p<0.01

На таблица 22 са представени корелационните коефициенти и нивата на значимост при изследваната зависимост между стойностите на левкоцитите по методи и нивата на TGF beta 1 по методи. Статистически значима корелационна връзка не се наблюдава между количеството левкоцити от метод 1 спрямо съдържанието на TGF beta 1 в пробите преди и след активирането им.

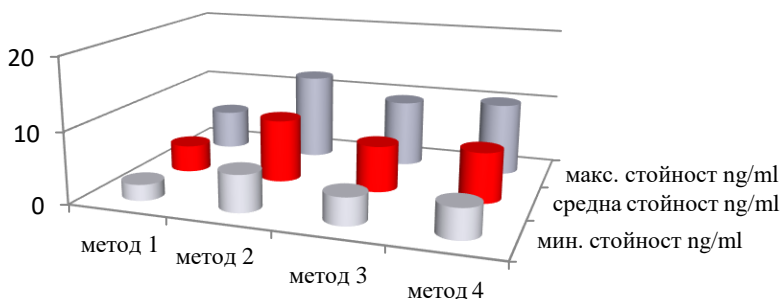
Таблица 22. Корелационни коефициенти и нива на значимост при изследваната зависимост между стойностите на левкоцитите по методи и нивата на TGF beta 1 по методи

Корелационен анализ ЛЕВКОЦИТИ МЕТОДИ	TGF beta 1							
	метод 1		метод 2		метод 3		метод 4	
	преди активация	след активация	преди активация	след активация	преди активация	след активация	преди активация	след активация
Корелационен коефициент	0.359	0.354	0.517	0.519	0.631	0.623	0.540	0.564
Значимост	p>0.05	p>0.05	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01

Анализиране на данните относно растежен фактор PDGF-AB

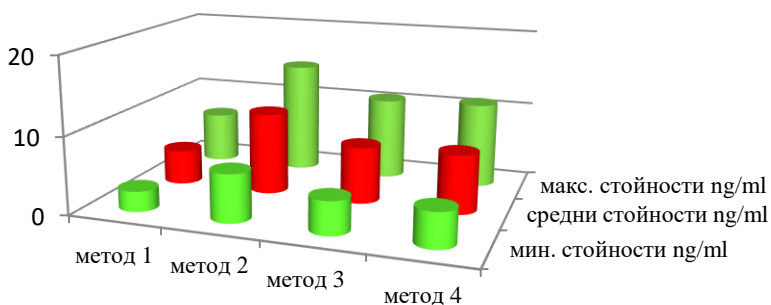
Анализът на данните относно количеството PDGF-AB в изследваните проби от обогатена с тромбоцити плазма включва определяне на минимална, максимална, средна стойност и стандартно отклонение преди и след активация; корелационен анализ на потенциалната връзка между PDGF-AB преди активиране и PDGF-AB след активиране; орелационна връзка между тромбоцитната стойност на контролната група и PDGF-AB преди и след активация за всеки един от четирите експериментални модела; корелационна връзка между PDGF-AB преди и след активация за всеки един от четирите експериментални метода поотделно и тромбоцитната стойност от всеки един от четирите експериментално модела.

Средната стойност на количеството PDGF-AB в пробите преди активиране е най-висока при метод 2 (средна стойност= 8.85 ± 1.785 ng/ml) с минимална стойност 5.19 ng/ml и максимална 12.21 ng/ml. След това място заема средната стойност на количеството на PDGF AB от метод 4 (средна стойност= 7.03 ± 1.467 ng/ml) с минимална стойност 4,16 ng/ml и максимална стойност 10,22 ng/ml. На трето място по средна стойност на PDGF AB заема метод 3 (средна стойност= 6.49 ± 1.417 ng/ml) с минимална стойност 3.81 ng/ml и максимална стойност 9.46 ng/ml. Най-ниска средна стойност се наблюдава при метод 1 (средна стойност= 3.82 ± 0.844 ng/ml) с минимална стойност 2.25 ng/ml и максимална 5.61 ng/ml. Разпределение на средните стойности на PDGF-AB в пробите преди активиране, изготвени и по четирите експериментални метода, са представени на диаграма 3.



Диаграма 3. Стойности на количеството PDGF-AB преди активиране за четирите протокола

След прилагане на активатор към пробите от четирите метода най-висока средната стойност на PDGF AB се наблюдава при метод 2 (средна стойност=10.59±2.129 ng/ml) с минимална стойност 6.22 ng/ml и максимална 14.51 ng/ml и най-ниска при метод 1 (средна стойност=4.51±0.999 ng/ml) с минимална стойност 2.64 ng/ml и максимална 6.62 ng/ml. Разпределение на средните стойности на PDGF AB в пробите след активиране, изготвени по четирите експериментални метода, са представени на диаграма 4.



Диаграма 4. Стойности на количеството PDGF-AB след активиране за четирите експериментални метода

За проследяване на връзката между стойностите на PDGF-AB преди процес на активиране за метод 1, метод 2, метод 3 и метод 4 спрямо тромбоцитите от контролна група е проведен корелационен анализ, който установи положителна корелация в изследваните променливи ($p < 0.05$). Данните са представени в табл. 23.

Таблица 23. Корелационен анализ между стойностите на тромбоцити от контролната група и стойностите на PDGF AB преди активация

Корелация на тромбоцити от контролна група	PDGF AB преди активация			
	метод 1	метод 2	метод 3	метод 4
Корелационен коефициент (r)	0.978	0.904	0.904	0.864
Значимост	$p < 0.05$	$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p < 0.01$

За анализ на връзката между стойностите на PDGF AB след активация за метод 1, метод 2, метод 3 и метод 4 и стойността на тромбоцитите от контролната група е приложен корелационен анализ, в резултат на което се установи статистически значима положителна корелация в изследваните променливи ($p < 0.05$). Стойностите на корелационните коефициенти и нивата на значимост за показани на таблица 24.

Макар и много високата корелационна връзка между наблюдаваните променливи преди и след прилагането на активатор в пробите, впечатление прави, че най-висока е в пробите, получени с най-ниско насищане на тромбоцити.

Таблица 24. Корелационен анализ между стойностите на тромбоцити от контролната група и стойностите на PDGF-AB след активация

Корелация на тромбоцити контролна група	PDGF-AB след активация			
	Метод 1	Метод 2	Метод 3	Метод 4
Корелационен коефициент (r)	0.978	0.907	0.908	0.866
Значимост	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05

За проследяване на връзката между стойностите на PDGF-AB преди и след активация за метод 1 и стойността на тромбоцитите от метод 1 беше проведен корелационен анализ, като се установи статистически значима положителна корелация в изследваните променливи ($p < 0.05$). Съгласно Cohen линейната корелация между анализиранияте променливи е висока преди активация ($r = 0.569$, $p < 0.01$) и много висока след активация ($r = 0.786$, $p < 0.01$). Стойностите на корелационните коефициенти и нивата на значимост са показани на таблица 25.

Таблица 25. Корелационен анализ между стойностите на тромбоцити от метод 1 и стойностите на PDGF-AB от метод 1 преди и след активация

Корелация на тромбоцити от метод 1	PDGF-AB предиактивация метод 1	PDGF-AB след активация метод 1
Корелационен коефициент (r)	0.569	0.786
Значимост	p<0.01	p<0.01

За установяване на връзката между стойностите на PDGF-AB преди и след активация за метод 2 и стойността на тромбоцитите от метод 2 е проведен корелационен анализ, като се установи статистически значима положителна корелация в изследваните променливи ($p < 0.05$). И в пробите от метод 2 линейната корелация между анализирания променливи е много висока. Наблюдава се много малка разлика в двете групи. Преди прилагане на активатор ($r = 0.907$, $p < 0.01$) и след активация ($r = 0.904$, $p < 0.01$). Стойностите на корелационните коефициенти и нивата на значимост са показани на таблица 26.

Таблица 26. Корелационен анализ между стойностите на тромбоцитите от метод 2 и стойностите на PDGF-AB от метод 2 преди и след активация

Корелация на тромбоцитите от метод 2	PDGF-AB преди активация метод 2	PDGF-AB след активация метод 2
Корелационен коефициент (r)	0.907	0.904
Значимост	$p < 0.01$	$p < 0.01$

Статистически значима положителна корелация се наблюдава и между стойностите на PDGF-AB преди и след активация за метод 3 и стойността на тромбоцитите от метод 3 (табл. 27).

Таблица 27. Корелационен анализ между стойностите на тромбоцитите от метод 3 и стойностите на PDGF-AB от метод 3 преди и след активация

Корелация на тромбоцитите от метод 3	PDGF-AB преди активация метод 3	PDGF-AB след активация метод 3
Корелационен коефициент (r)	0.904	0.908
Значимост	$p < 0.01$	$p < 0.01$

За стойностите от метод 4 също се проведе корелационен анализ, като се установи статистически значима положителна корелация в изследваните променливи ($p < 0.05$) (табл. 28).

Таблица 28. Корелационен анализ между стойностите на тромбоцити от метод 4 и стойностите на PDGF-AB от метод 4 преди и след активация

Корелация на тромбоцити от метод 4	PDGF-AB преди активация Метод 4	PDGF-AB след активация Метод 4
Корелационен коефициент (r)	0.864	0.866
Значимост	$p < 0.01$	$p < 0.01$

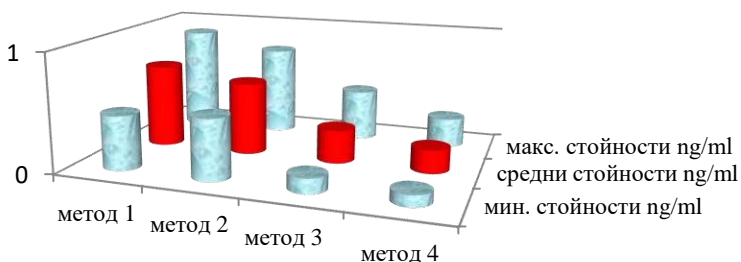
На таблица 29 са представени данните след проведен корелационен анализ между стойностите на левкоцити в пробите, получени чрез четирите различни протокола и количеството на PDGF-AB в тях преди и след прилагане на екзогенен активатор. Статистически значима корелационна връзка между наблюдаваните променливи се установи и за пробите от четирите метода.

Таблица 29. Корелационни коефициенти и нива на значимост при изследваната зависимост между стойностите на левкоцитите по методи и нивата на PDGF-AB по методи

Корелационен анализ ЛЕВКОЦИТ ИМЕТОДИ	PDGF-AB							
	метод 1		метод 2		метод 3		метод 4	
	преди активация	след активация	преди активация	след активация	преди активация	След активация	преди активация	след активация
Корелационен коефициент r	0.440	0.449	0.470	0.471	0.594	0.579	0.503	0.501
Значимост	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p < 0.01$	$p < 0.01$

Анализиране на данните относно IL-8

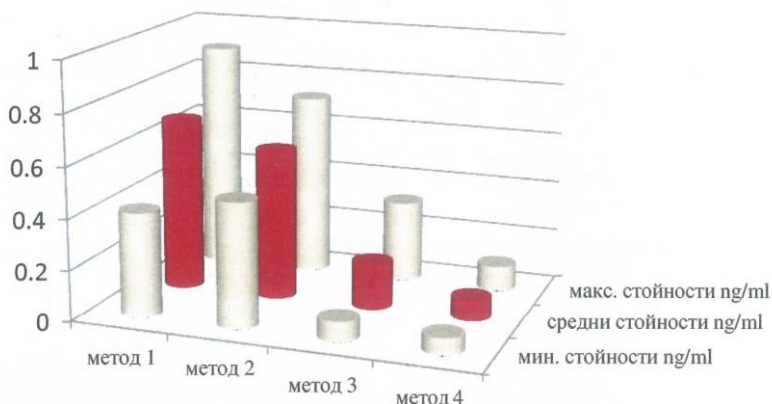
Средната стойност на IL-8 **преди** активиране е най-висока при метод 1 (средна стойност $=0.707 \pm 0.107$ ng/ml) с минимална стойност 0.462 ng/ml и максимална 0.889 ng/ml и най-ниска при метод 4 (средна стойност $=0.196 \pm 0.025$ ng/ml) с минимална стойност 0.097 ng/ml и максимална 0.251 ng/ml. Наблюдаваните най-високи стойности на количеството на IL-8 са в пробите от метод 1 и метод 2, в които присъства най-високо съдържание на левкоцити (диаграма 5).



Диаграма 5. Стойностите на количеството IL-8 преди активиране за четирите експериментални метода

Средната стойност на IL-8 **след** активиране е най-висока при метод 4 (средна стойност $=0.681 \pm 0.115$ ng/ml) с минимална стойност 0.413 ng/ml и максимална 0.901 ng/ml и най-ниска при метод 4 (средна стойност $=0.08 \pm 0.011$ ng/ml) с минимална стойност 0.066 ng/ml и максимална 0.099 ng/ml. Тук наблюдаваната тенденция е както при стойностите на IL-8 преди активиране на пробите. Плавно намаляване на средните

стойности на IL-8 от метод 1 към метод 4. На диаграма 6 са представени минимални, максимални и средни стойности на IL-8 след активиране на пробите от четирите метода.



Диаграма 6. Минимални, максимални и средни стойности на количеството IL-8 след активиране

За проследяване на връзката между стойностите на IL-8 преди активиране за метод 1, метод 2, метод 3, метод 4 и стойността на левкоцити от контрола беше проведен корелационен анализ, като се установи статистически значима положителна корелация в изследваните променливи при метод 1 линейната корелация между анализираниите променливи е много висока ($r=0.714$, $p<0.01$), висока при метод 4 ($r=0.645$, $p<0.01$) и умерена при метод 3 ($r=0.432$, $p<0,01$). Статистически значима разлика **не** се наблюдава при метод 2 ($r=0.285$, $p>0.05$) (табл. 30).

Таблица 30. Корелационен анализ между стойностите на левкоцити от контрола и стойностите на IL-8 от метод 1 преди активация

Корелация на левкоцити от контролна група	IL-8 преди активация			
	метод 1	метод 2	метод 3	метод 4
Корелационен коефициент (r)	0.714	0.285	0.432	0.645
Значимост	p<0.01	p>0.05	p<0.01	p<0.01

За проследяване на връзката между стойностите на IL-8 след активиране за метод 1, метод 2, метод 3, метод 4 и стойността на левкоцити от контрола беше проведен корелационен анализ, като се установи статистически значима положителна корелация в изследваните променливи (табл. 31). При метод 1 линейната корелация между анализираните променливи е висока ($r=0.536$; $p<0.01$), при метод 3 е умерена ($r=0.464$; $p<0.01$). При останалите два метода (2 и 4) не се установи статистически значима корелация между IL-8 след активация и стойността на левкоцитите от контролна група ($p>0,5$).

Таблица 31. Корелационен анализ между стойностите на левкоцити от контрола и стойностите на IL-8 от метод 1 след активация

Корелация на левкоцити от контролна група	IL-8 след активация			
	Метод 1	Метод 2	Метод 3	Метод 4
Корелационен коефициент (r)	0.536	0.253	0.464	-0.052
Значимост	p<0.01	0.178 p>0.05	p<0.01	0.784 p>0.05

За да проследим връзката между стойността на левкоцитите от метод 1 и стойностите на IL-8 преди и след активация за метод 1, беше проведен корелационен анализ, като се установи статистически значима положителна корелация в изследваните променливи ($p < 0.05$). Съгласно Cohen линейната корелация между анализираниите променливи е много висока преди ($r = 0.854$; $p < 0.01$) и след активация ($r = 0.738$; $p < 0.01$). Данните са представени в таблица 32.

Таблица 32. Корелационен анализ между стойностите на левкоцити от метод 1 и стойностите на IL-8 от метод 1 преди и след активация

Корелация на левкоцити от метод 1	IL-8 преди активация метод 1	IL-8 след активация метод 1
Корелационен коефициент (r)	0.854	0.738
Значимост	$p < 0.01$	$p < 0.01$

За проследяване на връзката между стойностите на IL-8 преди и след активация за метод 2 и стойността на левкоцитите от метод 2 беше проведен корелационен анализ, като не се установи статистически значима корелация в изследваните променливи ($p > 0.05$) (табл. 33).

Таблица 33. Корелационен анализ между стойностите на левкоцити от метод 2 и стойностите на IL-8 от метод 2 преди и след активация

Корелация на левкоцити от метод 2	IL-8 преди активация метод 2	IL-8 след активация метод 2
Корелационен коефициент (r)	0.115	0.096
Значимост	0.544 $p > 0.05$	0.614 $p > 0.05$

За проследяване на връзката между средните стойности на левкоцитите от пробите в метод 3 спрямо средната стойност на ПЛ-8 преди и след активация за метод 3 беше проведен корелационен анализ, като се установи статистически значима корелация между изследваните променливи ($p < 0.05$) (табл. 34).

Таблица 34. Корелационен анализ между стойностите на левкоцити и стойностите на ПЛ-8 преди и след активация (метод 3)

Корелация на левкоцити от метод 3	ПЛ-8 преди активация метод 3	ПЛ-8 след активация метод 3
Корелационен коефициент (r)	0.409	0.471
Значимост	0.025 $p < 0.05$	0.009 $p < 0.05$

За проследяване на връзката между средните стойности на левкоцитите от метод 4, спрямо количеството на ПЛ-8 в пробите преди и след активация за метод 4, беше проведен корелационен анализ, като се установи статистически значима положителна корелация между изследваните променливи (таблица 35).

Таблица 35. Корелационен анализ между стойностите на левкоцити и стойностите на ПЛ-8 преди и след активация (метод 4)

Корелация на левкоцити от метод 4	ПЛ-8 преди активация метод 4	ПЛ-8 след активация метод 4
Корелационен коефициент (r)	0.667	-0.363
Значимост	0.000 $p < 0.01$	0.049 $p < 0.05$

За проследяване на връзката между стойностите на IL-8 преди и след активация за метод 1 и стойността на неутрофили, моноцити и лимфоцити от контролната група беше проведен корелационен анализ. Статистически значима корелация се установи между стойностите на IL-8 преди и след активация за метод 1 и стойностите на неутрофили и моноцити от контролна група. Стойностите са представени в таблица 36.

Таблица 36. Корелационен анализ между неутрофили, моноцити и лимфоцити от контрола спрямо IL-8 преди и след активирание за метод 1

Корелационен анализ	IL-8 преди активация метод 1	IL-8 след активация метод 1
Неутрофили контрола	$r=0.622 / p=0.000$	$r=0.493 / p=0.006$
Моноцити контрола	$r=0.443 / p=0.014$	$r=0.417 / p=0.022$
Лимфоцити контрола	$r=0.203 / p=0.281$	$r=-0.036 / p=0.849$

След проведен корелационен анализ между стойностите на неутрофили, моноцити и лимфоцити от контролната група спрямо стойностите на IL-8 в групите за метод 2 преди и след активирание се вижда, че липсва корелационна връзка между изследваните променливи със стойности $p > 0.05$ (табл. 37).

Таблица 37. Корелационен анализ между неутрофили, моноцити и лимфоцити от контрола спрямо IL-8 преди и след активиране за протокол 2

Корелационен анализ	IL-8 преди активация метод 2	IL-8 след активация метод 2
неутрофили контрола	$r=0.065 / p=0.733$	$r=0.051 / p=0.790$
моноцити контрола	$r=0.368 / p=0.054$	$r=0.271 / p=0.148$
лимфоцити контрола	$r=0.059 / p=0.758$	$r=0.103 / p=0.589$

Корелационен анализ за връзката между неутрофили, моноцити и лимфоцити от контрола, спрямо IL-8 преди и след активиране за метод 3, показва значима зависимост между неутрофили от контролна група с IL-8 след активиране ($p<0.05$), както и лимфоцитите от контролна група с IL-8 след активиране ($p<0.05$). Между останалите изследвани променливи не се наблюдава статистически значима връзка. Получените резултати са представени в таблица 38.

Таблица 38. Корелационен анализ между неутрофили, моноцити и лимфоцити от контрола спрямо IL-8 преди и след активиране за метод 3

Корелационен анализ	IL-8 преди активация метод 3	IL-8 след активация метод 3
неутрофили контрола	$r=0.361 / p=0.050$	$r=0.377 / p=0.040$
моноцити контрола	$r=0.327 / p=0.078$	$r=0.300 / p=0.107$
лимфоцити контрола	$r=0.359 / p=0.051$	$r=0.479 / p=0.007$

Данните от корелационния анализ за връзката между неутрофили, моноцити, лимфоцити от контролна група спрямо IL-8 преди и след активиране за метод 4 са представени на табл. 39. Статистически значима връзка се установи в групата на неутрофили ($r=0.559 / p=0.001$) и моноцити ($r=0.584 / p=0.001$) от контрола с IL-8 преди подлагане на активиране.

Таблица 39. Корелационен анализ между неутрофили, моноцити и лимфоцити от контрола спрямо IL-8 преди и след активиране за метод 4

Корелационен анализ	IL-8 преди активация метод 4	IL-8 след активация метод 4
неутрофили контрола	$r=0.559 / p=0.001$	$r= -0.181 / p=0.338$
моноцити контрола	$r=0.584 / p=0.001$	$r=0.004 / p=0.982$
лимфоцити контрола	$r=-0.004 / p=0.984$	$r= -0.011 / p=0.956$

За проследяване на връзката между стойностите на IL-8 преди и след активация и стойността на неутрофили, моноцити и лимфоцити при условията на метод 1 беше проведен корелационен анализ, стойностите на който са представени в табл. 40. Статистически значима зависимост се установи между стойностите на IL-8 преди и след активация за метод 1 и стойностите на неутрофили от тестовата група.

Таблица 40. Корелационен анализ между неутрофили, моноцити и лимфоцити от тестова група на метод 1 спрямо IL-8 преди и след активирание за метод 1

Корелационен анализ	IL-8 преди активирание метод 1	IL-8 след активирание метод 1
неутрофили метод 1	$r=0.513 / p=0,004$	$r=0.380 / p=0,038$
моноцити метод 1	$r=0.253 / p=0.178$	$r=0.270 / p=0.149$
лимфоцити метод 1	$r=0.169 / p=0.372$	$r= -0.072 / p=0.705$

При метод 2 след проведен корелационен анализ за установяване на зависимост между неутрофили, моноцити и лимфоцити от тестова група на метод 2 спрямо IL-8 преди и след активирание за метод 2 се установи връзка само в групата на лимфоцити ($r=0.373/p=0.042$) и IL-8 преди активирание. При всички останали променливи не се наблюдава статистически значими зависимости. Резултатите са представени в табл. 41.

Таблица 41. Корелационен анализ между неутрофили, моноцити и лимфоцити от тестова група на метод 2 спрямо IL-8 преди и след активирание за метод 2

Корелационен анализ	IL-8 преди активирание метод 2	IL-8 след активирание метод 2
неутрофили метод 2	$r=0.070 / p=0.712$	$r=0.043 / p=0.821$
моноцити метод 2	$r=0.047 / p=0.805$	$r=0.032 / p=0.866$
лимфоцити метод 2	$r=0.373 / p=0.042$	$r=0.274 / p=0.142$

След проведен корелационен анализ между съдържанието на неутрофили, моноцити и лимфоцити от метод 3 спрямо присъствието на IL-8 в пробите преди и след активиране се установи статистически значима зависимост между неутрофили и IL-8 след активиране ($r=0.471 / p=0.009$) и моноцити и IL-8 отново в пробите след активирането им ($r=0.364 / p=0.048$). При останалите наблюдавани променливи не се наблюдава статистически значима връзка (табл. 42).

Таблица 42. Корелационен анализ между неутрофили, моноцити и лимфоцити от тестова група на метод 3 спрямо IL-8 преди и след активиране за метод 3

Корелационен анализ	IL-8 преди активация метод 3	IL-8 след активация метод 3
неутрофили метод 3	$r=0.409 / p=0.025$	$r=0.471 / p=0.009$
моноцити метод 3	$r=0.316 / p=0.088$	$r=0.364 / p=0.048$
лимфоцити метод 3	$r=0.299 / p=0.108$	$r=0.308 / p=0.098$

Идентичен на предходните корелационен анализ е проведен и за присъствието на неутрофили, моноцити, лимфоцити в пробите от метод 4 и съдържанието на IL-8 в пробите от метод 4 преди и след подлагането им на активиране. Единствена статистически значима зависимост се наблюдава между съдържанието на моноцити и присъствието на IL-8 в пробите преди активиране. Получените резултати са представени в таблица 43.

Таблица 43. Корелационен анализ между неутрофили, моноцити и лимфоцити от тестова група на метод 4 спрямо IL-8 преди и след активиране за метод 4

Корелационен анализ	IL-8 преди активация метод 4	IL-8 след активация метод 4
неутрофили метод 4	$r=-0.105 / p=0.580$	$r=0.025 / p=0.895$
моноцити метод 4	$r=-0.569 / p=0.001$	$r=-0.008 / p=0.965$
лимфоцити метод 4	$r=-0.225 / p=0.231$	$r=-0.098 / p=0.607$

Интерес за научното изследване представлява и установяване на съществуващи или не зависимости между възраст на участниците в изследването и насищането с тромбоцити по методи. След проведен анализ се установи негативна корелационна връзката между количеството тромбоцити по използваните методи и възрастта на участниците, ясно личат високите стойности на корелационния коефициент, което обяснява много силната връзка между наблюдаваните променливи. В таблица 44 са представени стойностите на корелационния коефициент и степента на значимост между средната възраст на участниците в изследването и средния брой тромбоцитите от всеки един тестов продукт.

Таблица 44. Корелационен анализ между средна стойност на възраст на участниците в изследването и брой на тромбоцити в плазмата от всеки метод

Корелационен анализ – възраст	Тромбоцити			
	метод 1	метод 2	метод 3	метод 4
Корелационен коефициент	-0.966	-0.966	-0.967	-0.957
Значимост	$p<0.01$	$p<0.01$	$p<0.01$	$p<0.01$

След проведен статистически анализ за връзката между възрастта на участниците в научното изследване и количествата отделени изследвани протеини от метод 1 се установява статистически висока значимост при TGF beta 1, PDGF AB и IL-8 преди активиране на пробите, както и при TGF beta 1 и PDGF AB след активиране на пробите от метод 1. Липсва сигнификантна значимост между изследваната корелационна връзка с IL-8 в пробите от метод 1 след тяхното активиране. Данните са посочени в табл. 45.

Таблица 45. Корелационен анализ между средна възраст на участниците в изследването и количеството изследвани протеини преди и след активация за метод 1

Корелационен анализ	Метод 1					
	Преди активиране			След активиране		
	Възраст	TGF beta 1	PDGF AB	IL-8	TGF beta 1	PDGF AB
Корелационен коефициент	-0.963	-0.947	-0.476	-0.931	-0.946	-0.352
Значимост	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p>0.05

Относно корелационната зависимост между възрастта и изследваните протеини от обогатената с тромбоцити плазма, получена по метод 2, сигнификантна зависимост се наблюдава при TGF beta 1 ($p<0.01$) и PDGF AB ($p<0.01$) преди и след активиране. Статистически незначима връзка се установява между възрастта на участниците и количеството IL-8 в пробите преди и след активиране ($p>0.05$). Получените резултати са представени в табл. 46.

Таблица 46. Корелационен анализ между средна възраст на участниците в изследването и количеството изследвани протеини преди и след активация за метод 2

Корелационен анализ Възраст	Метод 2					
	Преди активирание			След активирание		
	TGF beta 1	PDGF AB	IL-8	TGF beta 1	PDGF AB	IL-8
Корелационен коефициент	-0.963	-0.967	-0.194	-0.963	-0.966	-0.120
Значимост	p<0.01	p<0.01	p>0.05	p<0.01	p<0.01	p>0.05

За пробите от метод 3 корелационният анализ за установяване на зависимост между възрастта и изследваните променливи преди и след активирание показва много висока значимост на връзката с TGF beta 1 и PDGF AB преди и след активирание ($p<0.01$). Слаба статистическа значимост се наблюдава между възрастта и количеството на IL-8 в пробите преди активирание ($p<0.05$), липса на статистически значима зависимост е установена между възрастта и IL-8 в пробите след активирание ($p>0.05$). Получените резултати са представени в табл. 47.

Таблица 47. Корелационен анализ между средна възраст на участниците в изследването и количеството изследвани протеини преди и след активация за метод 3

Корелационен анализ Възраст	Метод 3					
	Преди активирание			След активирание		
	TGF beta 1	PDGF AB	IL-8	TGF beta 1	PDGF AB	IL 8
Корелационен коефициент	-0.959	-0.967	-0.366	-0.962	-0.970	-0.287
Значимост	p<0.01	p<0.01	p<0.05	p<0.01	p<0.01	p>0.05

След направен корелационен анализ за връзка между възрастта на участниците и изследваните протеини в получената плазма по метод 4 се установява висока стойност на значимост при TGF beta 1, PDGF AB и IL 8 ($p < 0.01$) в пробите преди активиране; висока стойност на статистическа значимост при TGF beta 1, PDGF AB ($p < 0.01$) в пробите след активиране и липса на статистическа значимост при IL-8 ($p > 0.05$) в пробите след активиране. Получените резултати са представени в табл. 48.

Таблица 48. Корелационен анализ между средна възраст на участниците в изследването и количеството изследвани протеини преди и след активация за метод 4

Корелационен анализ Възраст	Метод 4					
	Преди активиране			След активиране		
	TGF beta 1	PDGF AB	IL 8	TGF beta 1	PDGF AB	IL 8
Корелационен коефициент	-0.981	-0.934	-0.505	-0.940	-0.940	-0.226
Значимост	0.000 $p < 0.01$	0.000 $p < 0.01$	0.004 $p < 0.01$	0.000 $p < 0.01$	0.000 $p < 0.01$	0.229 $p > 0.05$

V. Дискусия

Налице са множество проучвания (предимно доклади и поредици от случаи) относно добиването и приложението на обогатени с тромбоцити плазмени продукти и потенциалните клинични ползи в различни сфери на медицината. Независимо от това все още липсват достоверни доказателства по отношение на клиничната ефективност на PRP продуктите в рандомизирани мултицентрични контролни проучвания. Считаме, че до голяма

степен това се дължи на липсата на ясни методологични стандарти за получаване на PRP и нейното характеризиране. Концентрацията на формените елементи, растежните фактори и цитокините в пробите варира според използвания метод на центрофугиране (de Vos et al.). Липсват стандартизирани критерии при получаването на автоложния продукт, обвързани с конкретното му приложение.

Вариациите в процеса на добиване на PRP продукт, т.нар. променливите условия – центрофужната сила (RCF), време на центрофугиране, вид използван антикоагулант, необходимост от активиране или не, водят до получаване на автоложни тромбоцитни концентрати с разлики в биологичните им характеристики. Липсата на характеризиране на тези различни PRP продукти, получени чрез различни техники, включващи затворени автоматични системи, готови търговски китове или стандартни лабораторни консумативи и центрофуги, затруднява задълбочения анализ на литературата и прави стандартизирането трудоемко (Dohan Ehrenfest et al.). Без консенсус клиничното приложение, респективно терапевтичният ефект, остава непрозрачен и валидирането на PRP продуктите остава противоречиво.

В изследването, представено в настоящия дисертационен труд, кръвните проби, подложени на анализ по четирите експериментални протокола, както и контролните проби, са от едни и същи донори. Резултатите от проучването показват широки вариации. Избрахме такъв тип работен алгоритъм, с който можем да осигурим максимална точност в съпоставянето на получените резултати. Сравнителните оценки между отделните протоколи са направена при условия на: различна центробежна сила и време на центрофугиране, използването или не на сепариращ гел, прилагане на активатор или не.

Центробежна сила (RCF) и време

Земното притегляне като гравитационно сила е достатъчно да сепарира различните кръвни клетки с течение на времето. Епруветка с антикоагулант, изпълнена с периферна кръв, оставена да стои в право положение, в крайна сметка ще се фракционира до плазма червени кръвни клетки и бели кръвни клетки. Необходимият период от време за осъществяването на този процес изключва този начин на сепариране на компонентите с оглед клиничното им приложение. Освен това потенциалното разграждане на биологичните съставки при продължително съхранение означава, че са необходими по-бързи техники за разделяне. Следователно за ускоряване на седиментацията ефектът на гравитацията се усилва с помощта на т.нар.

„центрофужна сила“, осигурена от лабораторна центрофуга, даваща възможност да бъде увеличен многократно ефектът на гравитацията (Dhurat R, Sukesh M).

Разделянето на клетъчните съставки в кръвта може да се постигне чрез процес, известен като диференциално центрофугиране. При диференциалното центрофугиране силата на ускорение се регулира за утаяване на някои клетъчни съставки и установяване на други в суспензия. При центрофугиране RCF е силата, необходима за разделяне на две фази, като тази сила се нарича още относително центробежно поле. Тя се изразява като стойности, кратни на земната гравитация (g), чрез ускоряване на g може да бъде постигнато бързо утаяване на елементите. g е действителната сила, която въздейства на въртящия се ротор на центрофугата, разделяйки водните разтвори. Центробежната сила може да бъде изчислена по следното уравнение: $RCF (g) = (1.118 \times 10^{-5}) \times R \times S^2$. R е радиусът на ротора (разстоянието от центъра на ротора до центъра на гнездото на пробата) в сантиметри и S е скоростта на центрофугата в обороти за минута.

Важно е да се отбележи, че калкулирането на RCF зависи от радиуса на центрофугата, която се използва (Dhurat R, Sukesh M). За да могат да се прилагат еднакви протоколи за добив на PRP продукти от различни клиницисти, трябва да се работи с посочена центробежна сила. По този начин условията могат да бъдат повторени, вземайки предвид различни параметри на лабораторни центрофуги.

В настоящото проучване всички проби са изработени на един вид лабораторни центрофуги, следователно разстоянието от оста на ротора и ъгловата скорост (32° по технически параметри) са постоянни. Прилагаме единично центрофугиране с 1500 g за 10 мин (метод 1 и 2) и двойно центрофугиране с обхват 1150 g за 10 мин първо и 350 g за 5 мин второ въртене (метод 3 и 4). Трябва да отбележим, че когато авторите използват в своите изследвания центрофужно ускорение – обороти в минута (RPM), вместо $\times g$, това усложнява задачата за анализ на резултатите по отношение на протоколите за добив на PRP (Fernández-Barbero JE et al., Su CY et al.).

Активиране и състояние на PRP продуктите

Друг дискутабилен параметър, изискващ специално внимание, е активирането на PRP преди инжектиране. Тромбоцитите в PRP могат да бъдат активирани екзогенно чрез добавяне на тромбин, калциеви съединения (CaCl_2 или калциев глюконат), комбинация от тромбин и Ca-съединения или метод на замразяване и размразяване. Ендогенното активиране основно се осъществява с присъствието на колагена в организма, така че когато се използва PRP продукт в меките тъкани, не е необходимо да бъде екзогенно активиран. Тромбоцитите може да се активират и по време на центрофугирането като основен процес

в добива на PRP. При тези условия α -гранулите на тромбоцитите освобождават протеини с ниско молекулно тегло като растежни фактори и цитокини. В проведеното от нас научно изследване за избор на екзогенен активатор приемаме **калциев глюконат**, лесен за набавяне като фармацевтичен продукт и надежден източник на Ca йони.

В проучването на Lee et al. (2013) е установено, че няма влияние върху активирането на PRP с използване на тромбин и калциев хлорид върху секрецията на растежни фактори и върху количеството тромбоцити, концентрирани в плазмата. На базата на тези резултати те обръщат внимание на възможността тромбоцитите да са се активирали предварително в резултат на приложената високата центрофужна сила. Leitner et al. (2006) установява, че силата, необходима за разкъсване на тромбоцитите, е 30 000 g. Взимайки тази стойност като отправна точка, Marx препоръчва двустепенен процес на центрофугиране. Lee също използва тази концепция, като достига диапазон на центрофугиране 31 000 g като прилага сепариращо въртене при 2000 g за 3 мин и концентриращо въртене 5000 g за 5 мин. Увреждането на тромбоцитната мембрана при високо скоростно центрофугиране води до активирането на тромбоцитите дори в отсъствието на екзогенни активатори, като по този начин отново се задейства каскадата на отделяне на растежни фактори.

Straum (2020) в своя обобщен литературен обзор относно PRP продуктите, получени по различни методи и условия, достига до извода, че не се виждат ясни тенденции или модел по отношение на различните методи за активиране и оптималната концентрация на PRP. Eker (2020) изследва IGF-1, PDGF и bFGF (basic fibroblast growth factor) в проби от PRP преди и след процес на активиране. Той сравнява два типа активатори, калциев глюконат 10% и метода на замразяване и размразяване на

пробите. Авторът посочва, че няма сигнификантна разлика между съдържанието на растежните фактори в пробите след активиране по двата различни метода. Екег посочва цикъла на замразяване (при -80°C) / размразяване като подходящ избор на процедура за активиране на PRP, без индуциране на фибринов матрикс като прост, евтин и лесен за стандартизация метод на активиране. Ние смятаме, че процедурата по замразяване и последващо размразяване на пробите не е удачен метод да се препоръчва поради невъзможност всеки клиницист да разполага с охладителна система, осигуряваща такава работна температура.

Важен аспект за клиничното приложение на тромбоцитните концентрати е тяхната физическа форма, която може да варира от течен или твърд гел, позволяващ да се използва като хирургично влагане в кухини или течен инжекционен разтвор за минимално инвазивно инжектиране. Различните техниките на активиране водят до получаване на автоложен тромбоцитен концентрат с различна структура. DeLong (2012) описва различни варианти за доставяне на PRP продукта до желаното място на аплициране, обвързано с различните активатори. Формирането на съсирек (фибринов матрикс) може да се използва за запълване на кухини и се образува чрез добавяне на CaCl_2 + центрофугиране, комбинация от активиране с CaCl_2 + тромбин или само тромбин. Гелоподобен PRP продукт може да се получи чрез прилагане на CaCl_2 + тромбин или само с тромбин. PRP продукт под формата на спрей се получава чрез ендогенно активиране или с помощта на CaCl_2 + тромбин или само тромбин. За приложението на течен инжекционен концентрат на PRP се разчита основно на ендогенно активиране.

Fufa (2008) установява, че използването на CaCl_2 индуцира образуване на съсирек в рамките на 30 минути след добавянето му, докато тромбинът и CaCl_2 плюс тромбин

причиняват по-бързо образуване на съсиреци, което се открива на петнадесетата минута. Авторът наблюдава образуване на макар и по-малки съсиреци след активиране с колаген, сравнено с тромбин.

Полученият тромбоцитен концентрат се активира екзогенно и се инжектира под форма на разтвор преди да е достигнат моментът на гелоподобно състояние, концентратът може да остане в инжектираната зона и секрецията на растежните фактори и молекули да активират лечебния процес. Ако тромбоцитният концентрат е приложен в течна форма, без възможност да се задържи на желаното място, неговото изтичане ще намали или влоши потенциално положителния ефект от прилагането му. Ето защо платформата за доставка на PRP (течност, спрей, гел или съсирек) трябва да се избира въз основа на типа процедура (отворена или артроскопска) и дали бавното или бързото активиране на тромбоцитите е желателно (DeLong J M et al.).

След анализиране на получените от нас резултати относно средните стойности на трите изследвани протеина в пробите, получени по четирите протокола преди и след активирането им, можем да предложим течно и гелоподобно състояние на PRP. Пробите преди подлагане на активиране използваме като контролни за сравнение с пробите след активиране. Количеството на TGF-beta 1 в пробите от метод 1 и 2 е по-голямо преди активиране спрямо след активиране със статистически значима разлика ($p < 0.05$). В пробите, получени по метод 3 и 4, се наблюдава повишаване на количеството TGF-beta 1 в активирано състояние, спрямо неактивирано със статистически значима разлика в пробите, получени от метод 3 ($p < 0.05$), и липса на сигнификантна разлика за пробите от метод 4 ($p > 0.05$). На базата на получените резултати считаме, че

тромбоцитни концентрати от методи 1, 2 и 4 преди да бъдат активирани екзогенно, а от метод 3 след активиране може да се използват в клиничната практиката.

За другия анализиран от нас растежен фактор PDGF-AB се установи, че количеството му се повишава след приложен екзогенен активатор спрямо неактивирани проби и при четирите изследвани метода със статистически значима разлика ($p < 0.05$). Следователно гелоподобното състояние след активиране би довело до по-голямо освобождаване на PDGF-AB на мястото му на аплициране.

Що се отнася до изследвания IL-8, установяваме намаляване на средната стойност в пробите, получени след прилагане на екзогенен активатор спрямо неактивирани и при четирите метода ($p < 0.05$). В зависимост от конкретното приложение и желаното присъствие на IL-8 предлагаме неговото използване в течна неактивирана форма.

Връзка между възрастта и пола с PRP продукта

Други фактори, от които хипотетично може да зависи качеството на PRP деривата, са възрастта и полът. Според Weibrich et al. (2004) няма сигнификантна разлика в концентрацията на тромбоцитите или количеството растежни фактори по отношение на възрастта и пола. В настоящото проучване се наблюдава негативна корелация между възрастта на участниците и броя на тромбоцитите в пробите от PRP, получени чрез отделните методи. Корелационните коефициенти са много високи (M1 $r = -0.966$, M2 $r = -0.966$; M3 $r = -0.967$; M4 $r = -0.957$) при нива на значимост $p < 0.01$. Обратнопорпорционална корелация с високи нива на значимост ($p < 0.01$) се установи също и при

анализиране на възрастта спрямо отделянето на TGF beta 1 и PDGF-AB при всички проби от M1, M2, M3 и M4 преди и след прилагане на активатор. Що се отнася до корелационна връзка между възраст на участниците в изследването и съдържанието на IL-8, резултатите са разнопосочни. Установената негативна корелация между възрастта и количеството на IL-8 във всички проби след активиране е без статистическа значимост ($p>0.05$).

Насищане с тромбоцити в пробите от PRP

Както беше отбелязано, Maгх (2004) предлага да се зададе прагова концентрация от 1×10^6 тромбоцит/ μL или от 3-5 пъти насищане с тромбоцити, която да осигури терапевтично ефективно количество растежни фактори в PRP продуктите. В настоящото научно изследване обогатената плазма, получена по условията на **метод 1** (единично центрофугиране на кръв в моновети без сепариращ гел), има най-ниско количество насищане с тромбоцити – 1.92 пъти спрямо контролната стойност ($549.80 \pm 118.856 \times 10^9/\text{L}$). В плазмата, получена по **протокол 2** (единично центрофугиране във вакутейнери със сепариращ гел), тромбоцитното насищане е 4.37 пъти спрямо съдържанието на тромбоцити в контролата от цяла кръв ($1254.50 \pm 274.141 \times 10^9/\text{L}$). В плазмата, получена по експериментален **метод 3** (двойно центрофугиране в моновета без сепариращ гел) – 4.52 пъти ($1297.60 \pm 283.272 \times 10^9/\text{L}$), в продукта, получен по **метод 4** (двойно центрофугиране във вакутейнери със сепариращ гел), насищането с тромбоцити е 4.9 пъти ($1406.00 \pm 313.091 \times 10^9/\text{L}$). Придържайки се към дефиницията, предложена от Maгх, продуктът, получен от нас по метод 1, не може да се определи като същински вид PRP, посочваните PRP продукти в литературата са с насищане на тромбоцити над 2 пъти над контролните сравними стойности.

Съдържание на левкоцити в PRP продуктите

Нивата на левкоцитите в PRP продуктите са от особено важно значение, имайки предвид техните биологични характеристики. Тяхното съдържание винаги трябва да бъде определяно в пробите от тромбоцитни концентрати. За намаляване нивото им в сравнение с цяла кръв често се използва левкоцитен филтър или се прилага двойно центрофугиране на пробите, като се манипулира внимателно с т.нар. „Buffy coat“. В проведеното от нас проучване автоложните тромбоцитни концентрати, изготвени по условията на методи 1 и 2, доказват обогатяване на получените продукти и с левкоцити. В пробите от метод 1 средната стойност на левкоцитите е $12.93 \pm 1.978 \times 10^9/L$, а при метод 2 стойността им е $11.38 \pm 2.199 \times 10^9/L$. Сравнявайки ги със средната стойност в пробите от контрола на периферна кръв $6.24 \pm 1.283 \times 10^9/L$, наблюдаваме увеличаване на количеството им с 2.07 пъти за плазмата от метод 1 и 1.82 пъти за плазмата от метод 2. Според MARSPILL класификационна система на Lana и съавтори спрямо количеството на левкоцити, получените от нас и двата типа продукти можем да отнесем в групата на LR-PRP (leukocyte rich platelet-rich plasma), обогатена с левкоцити и тромбоцити плазма. В пробите от метод 3 средната стойност на левкоцитното съдържание е $3.71 \pm 0.992 \times 10^9/L$, това е намаляване на количеството с 1,68 пъти спрямо контролната стойност, а при обогатената с тромбоцити плазма по метод 4 наблюдаваме стойности на левкоцитите $1.60 \pm 0.313 \times 10^9/L$, което е намаляване с 3.9 пъти спрямо контролните стойности. Според цитираната по-горе класификационна система на Lana et al. продуктите от метод 3 и 4 могат да бъдат характеризирани като LP-PRP (leukocyte-poor platelet-rich plasma), бедна на левкоцити и обогатена с тромбоцити плазма.

Kobayashi et al. (2016) съобщават за средни стойности на левкоцити в получените от тях LR-PRP продукти $14.9 \pm 4.5 \times 10^3 / \mu\text{L}$, малко по-високи спрямо стойностите на левкоцити от протокол 1 и 2, получени от нас. В LP-PRP средните стойности на левкоцитите са $2.4 \pm 1.3 \times 10^3 / \mu\text{L}$, сходни със средните стойности, получени от нас за пробите от метод 3 и 4. Винаги трябва да бъде документирано присъствието на левкоцити в обогатените с тромбоцити плазмени концентрати по подходящи класификационни системи. Само по този начин може да се избере подходящ PRP продукт за необходимото му приложение.

LR-PRP или LP-PRP

Употребата на LR-PRP или LP-PRP не е добре описана в статиите и няма консенсус относно това кой тип е най-добрият за клиничното използване. Zhou et al. (2015) съобщава, че при *in vitro* проучване и двата вида PRP, култивирани със TSCs (tendon stem/progenitor cells) сухожилни стволони/прогениторни клетки, изолирани от здравите пателарни сухожилия на зайци, предизвикват подобна диференциация на TSC в активни теноцити. Въпреки това, докато LR-PRP индуцира предимно катаболни и възпалителни промени в диференцирани теноцити като повишена матрична металопротеиназа MMP 1, MMP-13 и проинфламаторни цитокини IL-1 β , IL-6 и TNF- α , то LP-PRP индуцира предимно анаболни ефекти като повишена генна експресия на анаболни гени, колаген тип I и III. Авторите предполагат, че LR-PRP може да има вредни ефекти поради катаболната си активност, докато използването на LP-PRP при остри наранявания може да доведе до прекомерно образуване на белези поради силния потенциал за предизвикване на необичайни анаболни ефекти.

В *in vitro* проучването на Assirelli et al. (2015) както LP-PRP, така и LR-PRP са култивирани със синовиални фибробласти, изолирани от пациенти с остеоартрит, подложени на операция на ставите. LR-PRP предизвиква по-голямо увеличение на проинфламаторните фактори IL-1 β , IL-8 и фибробластен растежен фактор – 2, а също и по-голямо намаляване на антикатаболните медиатори в хрущяла като хепатоцитен растежен фактор и тъканен инхибитор на металопроотеиназа – 4. Тъй като тези проучвания са били *in vitro*, дали по-големият възпалителен отговор, предизвикан от LR-PRP, влияе върху лечебния процес не може да бъде определено.

Идеята, че LR-PRP предизвиква по-голям възпалителен отговор от LP-PRP, се подкрепя и от *in-vivo* проучвания. Dragoo et al. (2012) съобщава, че LR-PRP предизвиква по-остър възпалителен отговор от LP-PRP на пети ден, но не и четиринадесет дни след инжектирането в здрави заешки сухожилия. Въпреки това дали този по-голям остър възпалителен отговор, индуциран от LR-PRP, засяга лечебния процес, не може да бъде определено, тъй като изследването използва здраво сухожилие. В проучване, докладвано от Yan и Ran (2017), използващо модел на хронична тендинопатия, индуцирана от локално инжектиране на колагеназа в ахилесовото сухожилие на зайци, ефектът на двата вида PRP върху резултатите от лечебния процес е оценен 4 седмици след интравенозно инжектиране на LP-PRP или LR-PRP. Авторът доказва, че LP-PRP индуцира по-добри хистологични резултати с големи диаметри на колагеновите фибрили, отколкото LR-PRP. Въпреки това ефективността от приложение на един от двата вида PRP продукт за лечение може да зависи от етапа на заздравяване и вида на нараняването. LR-PRP може да бъде полезен за лечение на остри наранявания на сухожилията, а LP-PRP за лечение на хронични наранявания на сухожилията. Ефектът на LR- и LP-PRP върху

застрававането на други видове наранявания и патологии не е добре проучен. Освен това няма клинични проучвания, сравняващи употребата на LR и LP-PRP. Всъщност много клинични проучвания, които са налични в литературата, не цитират вида на използвания PRP продукт.

Съдържание на неутрофили в PRP

Boswell et al. (2012) предлага използването на PRP без неутрофили или с контролиран приток на неутрофили, за да се елиминира генерирането на видове свободни радикали – reactive oxygen species (ROS), и производството на металопротеиназа, което може да има вредно за лечебния процес значение. Използвайки стандартни лабораторни консумативи и центрофуги, по-трудно се осигурява пълното елиминиране на неутрофили, присъстващи за „buffy coat“ техниката. В изследването, проведено от нас, наблюдаваме различно съдържание на неутрофили в плазмата, получена чрез четирите експериментални метода. Средните стойности на съдържанието на неутрофили в автоложните обогатени с тромбоцити концентрати по методи е: протокол 1 ($6.43 \pm 1.389 \times 10^9/L$), протокол 2 ($5.82 \pm 1.361 \times 10^9/L$), протокол 3 ($0.01 \pm 0.009 \times 10^9/L$) и протокол 4 ($0.005 \pm 0.005 \times 10^9/L$), сравнени със средните стойности от контролната проба ($3.60 \pm 0.801 \times 10^9/L$). Наблюдаваме повишаване на средната стойност на неутрофилите спрямо средната стойност в контролната група в тромбоцитните концентрати, получени по метод 1 и 2. Изводът, който можем да посочим, е, че при еднократно центрофугиране е невъзможно отделянето на неутрофили дори и при използването на вакутейнери със сепариращ гел. В продуктите, получени чрез метод 3 и 4, средните стойности на броя на неутрофилите е много

ниска, това според нас се дължи на факта – двукратен процес на центрофугиране. Получените от нас стойности за количествата на неутрофилите са сходни с докладваните от Kobayashi (2016). Авторите показват стойности на неутрофили в проби от обогатена с левкоцити и тромбоцити плазма LR-PRP от $5.4 \pm 3.0 \times 10^3 / \mu\text{L}$, а в пробите от обогатена с тромбоцити плазма без присъствие на левкоцити LP-PRP средните стойности на неутрофилите е $0.0 \pm 0.0 \times 10^3 / \mu\text{L}$.

Взаимодействието между неутрофилите и активираните тромбоцити може да освободи противовъзпалителни молекули. Parrish и Roides (2017) публикува статия относно взаимодействието на тромбоцитите и други клетъчни типове в процеса на лечение, показващо противовъзпалителния потенциал от взаимодействието на тромбоцитите и неутрофилите. Първоначално активираните тромбоцити освобождават арахидонова киселина, която се улавя от неутрофилите и се превръща в левкотриени и простагландини, които действат като възпалителни медиатори Meirer K et al. От друга страна, тромбоцитите в асоциация с неутрофили, които произвеждат левкотриени, могат да вземат тези възпалителни протеини и да ги превърнат в липоксини. Те са мощни противовъзпалителни протеини, които могат да ограничат активацията на неутрофилите, да предотвратят диapedезата и да задвижат провеждането на лечебната каскада. Производството на липоксини чрез тромбоцитите е възможно само поради наличието на левкотриени, произведени от неутрофили. Способността да променя производството от про- до антивъзпалителни молекули предотвратява набирането на неутрофили и последващо възпалително активиране, докато допринася за процеса на разрешаване на лечебната каскада.

Левкоцитите допринасят както за процеса на възпалението, така и за сигнализиране с други видове клетки, поради това те са от решаващо значение за регенерацията. Неутрофилите секретират цитокини за хемотаксиса на макрофагите. Макрофагите имат пластични свойства, които са важни за насърчаването на възпалението, необходимо за започване на лечебния процес. Авторите наричат този процес „регенеративно възпаление“, т.е. възпаление, необходимо за регенерация. В допълнение, макрофагите също са незаменими за фазите на ремоделиране и възстановяване. Освобождаването на тромбоцитни гранули също сигнализира до левкоцитите. По този начин PRP продуктите могат да се възползват от включването на левкоцити от „buffy coat“, тъй като те изглеждат по-скоро полезни, отколкото вреден компонент. Предполага се, че макрофагите действат като инструктори на лечебния процес.

Съдържание на лимфоцити и моноцити в PRP

Възпалителната фаза е от решаващо значение за лечебния процес, за да се насърчат останалите фази на заздравяване като ремоделиране и свиване на тъканите. Дискутабилен въпрос е и присъствието на друга клетъчна популация в обогатената с тромбоцити плазма, която играе важна роля във възпалителната фаза: мононуклеарни клетки, особено моноцити. Мононуклеарните клетки на периферната кръв – peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), включват лимфоцити (Т и В), клетките, естествени убийци, и моноцитите (Gratchev A et al). Всички тези клетки имат важна роля, но поради диференциацията на моноцитите в макрофаги, както и поради тяхната пластичност, се обсъждат като уникална клетъчна популация. Способността за превключване на фенотипната експресия и показването на

различни функции поради дразнители от околната среда са критични свойства на моноцитите. Тъканите или периферните макрофаги играят важна роля във фагоцитозата на клетките, подложени на апоптоза, и защитават гостоприемника чрез вроден имунитет.

В проведеното от нас изследване установихме различно съдържание на моноцити и лимфоцити в тромбоцитните концентрати, получени чрез отделните протоколи за добив. Средните стойности на моноцити в пробите, получени чрез M1, са $2.98 \pm 0.855 \times 10^9/L$, за M2 са $2.97 \pm 0.775 \times 10^9/L$, за M3 са $0.48 \pm 0.163 \times 10^9/L$ и M4 $0.007 \pm 0.007 \times 10^9/L$, сравнени със средни стойности на моноцити в контролните проби $0.78 \pm 0.185 \times 10^9/L$. Впечатление прави насищането с моноцити в пробите от M1 и M2, сравнени със стойности от контролите. Респективно, пробите от M3 и M4 са с по-ниско съдържание на моноцити, сравнени с контролите. Относно съдържанието на лимфоцити, средните стойности в пробите от M1 са $8.88 \pm 2.055 \times 10^9/L$, в пробите от M2 са $8.80 \pm 2.022 \times 10^9/L$, в пробите от M3 са $2.23 \pm 0.451 \times 10^9/L$ и за M4 са $1.05 \pm 0.138 \times 10^9/L$, сравнени със средна стойност на лимфоцити от контролна група 2.01 ± 0.458 . Повишено съдържание на лимфоцити спрямо базовата контролна стойност наблюдаваме в пробите от M1, M2 и M3. Извод – единственият PRP продукт с намалено съдържание на лимфоцити е получен при условия на двойно центрофугиране и във вакутейнери със сепариращ гел. Получените от нас стойности за присъствието на лимфоцити и моноцити в получените тромбоцитни концентрати като стойности отчасти кореспондира с резултатите, докладвани от Kobayashi et al. (2016). Авторите показват съдържание на лимфоцити $2.3 \pm 0.3 \times 10^3/\mu L$ и моноцити $0.1 \pm 0.0 \times 10^3/\mu L$ за LP-PRP. В LR-PRP получените стойности от автора за лимфоцити са $8.1 \pm 1.9 \times 10^3/\mu L$, а за моноцити $1.4 \pm 0.6 \times 10^3/\mu L$.

Съдържание на PDGF-AB и TGF beta 1 в PRP продуктите

Zimmermann et al. изследват дали наличието на левкоцити има ефект върху нивата на PDGF-AB, PDGF-BB и TGF- β 1. Средните абсолютни нива на PDGF-AB и PDGF-BB показват разлики между богатите на левкоцити и бедни на левкоцити препарати. Богатата на левкоцити PRP има значително по-високи нива на PDGF-AB, PDGF-BB и TGF- β 1, сравнена с PRP бедна на левкоцити ($p < 0.05$). Постепенният регресионен анализ показва, че концентрацията на тромбоцитите е най-значимата променлива и наличието на моноцити е съществена копроменлива за прогнозиране промяната в измерванията на PDGF-BB и TGF- β 1.

Автоложната обогатена плазма, съдържаща високи стойности концентрирани тромбоцити, притежава изобилие от растежни фактори, позволяващи заздравяване и регенерация на тъканите.

Lee et al. (2013) доказва, че растежните фактори се съдържат в най-висока концентрация в тромбоцитите и имат съществена роля в процеса на зарастване на раната. При настъпване на травма, водеща до рана или възпаление в тъканите, тромбоцитите се активират и растежните фактори, съдържащи се в α -гранулите, се секретират. В частност от множеството растежни фактори PDGF и TGF-beta имат съществена роля в процесите на регенерация и възстановяване на увредените тъкани. Водени от тази причина, ние сме се насочили конкретно към анализиране количеството на PDGF-AB и TGF beta 1 в получените от нас тромбоцитни концентрати.

PDGF-AB се отделя от тромбоцитите и оказва влияние върху множество клетки. В проведеното от нас изследване, след направен T-тест за корелирани извадки, се установи

статистическо значимо различие между средните стойности на PDGF-AB преди и след активиране по методи ($p < 0.05$). За **метод 1** средните стойности на PDGF-AB в активираната плазма нарастват с 1,18 пъти, спрямо неактивираната плазма, получена при същите условия ($p < 0.05$). За **метод 2** средните стойности на PDGF-AB в активираната плазма нарастват с 1.20 пъти спрямо неактивираната плазма, получена при същите условия ($p < 0.05$). При **метод 3** стойностите на PDGF-AB в активираната плазма се увеличават с 1.13 пъти спрямо неактивираната плазма, получена при същите условия ($p < 0.05$), а при **метод 4** увеличаването на PDGF-AB в активираната плазма е 1.08 пъти спрямо неактивираната плазма. Получените от нас резултати са сходни с резултатите от Lee et al. (2013), които докладват увеличаване на стойностите на PDGF-AB с 1.06 пъти в активирана плазма спрямо неактивирана, но те посочват, че няма статистически значима разлика в получените стойности ($p > 0.05$). Въпреки това Weibrich et al. (2003) съобщават за стойности на PDGF поне 5 пъти по-високи при активирания PRP, отколкото при инактивирания. От получените при нас резултати ясно се вижда, че PDGF-AB позитивно корелира с броя на тромбоцитите от контролната група ($p < 0.05$). Позитивна корелация се наблюдава и между броя на тромбоцитите, получени след добиване на обогатената плазма по методи, спрямо PDGF-AB преди и след активиране на пробите ($p < 0.05$). Установена е обаче и положителната корелация между броя на левкоцитите, получени след добиване на обогатената плазма по методи, спрямо PDGF-AB преди и след активиране на пробите ($p < 0.05$). Впечатление прави най-високата стойност на PDGF-AB в пробите от метод 2, както преди, така и след прилагане на активатор. Това е автоложният обогатен с тромбоцити продукт, в които с високи стойности са представени както съдържанието на тромбоцити, така и съдържанието на левкоцити на едно място. Като извод трябва да отбележим, че

количеството на PDGF-AB зависи и от съдържанието на левкоцити в крайния продукт. Wasterlain и колектив (2012) също съобщават за връзката между клетъчния тип и растежния фактор в PRP. PDGF и VEGF са получени както от тромбоцити, така и от левкоцити, докато TGF- β са предимно получени от тромбоцити.

Редица автори разглеждат задълбочено зависимостта на броя на тромбоцитите в PRP и нивото на растежните фактори Anitua et al. (2009), Eppley et al. (2004), Magalon et al. (2014), McCarrel & Fortier (2009), Sanchez et al. (2007). Въпреки че ранните данни в литературата демонстрират, че нивото на тромбоцитите в PRP корелира позитивно с концентрацията на растежните фактори, напоследък е установено, че нарастването на растежните фактори не е правопрпорционално на увеличаването на тромбоцитите и е налице разлика в концентрационния градиент за различните растежни фактори. Растежните фактори се съхраняват не само в тромбоцитите, а също и в левкоцитите и тяхната концентрация зависи от броя кръвни клетки в PRP.

Друг от основните растежни фактори в автоложните тромбоцитни продукти е TGF β 1. Това е мултифункционален цитокин, участващ в контрола на растежа на клетките, стимулацията на матриксна продукция и потискането на имунната система. В нашето изследване анализирахме получените резултати и съпоставихме нивото на този растежен фактор в пробите с обогатена на тромбоцити плазма преди и след активирането ѝ. С цел да се провери хипотезата за равенство на средноаритметичните стойности на TGF β 1 преди и след активиране за четирите протокола отделно е проведен Т-тест за корелирани извадки, като се установи статистическо значимо различие за пробите от метод 1, 2 и 3 ($p < 0.05$). В пробите, изготвени по метод 1 и 2, се наблюдава минимално понижаване

на стойностите на TGF beta 1 след добавяне на активатор спрямо пробите преди активиране (метод 1 преди активиране 11.00 ± 2.399 ng/ml, след активиране 10.37 ± 2.165 ng/ml; метод 2 преди активиране 18.80 ± 4.109 ng/ml, след активиране 18.24 ± 3.982 ng/ml). В пробите от PRP, изготвени по метод 3 и метод 4, се наблюдава повишаване на средната стойност на TGF beta 1 в активираните проби. За автоложния тромбоцитен концентрат, изготвен в условията на метод 3, средните стойности преди активиране са 24.31 ± 5.106 ng/ml, а след активиране 24.79 ± 5.171 ng/ml, като се установи статистически значима разлика ($p < 0.05$) и можем да предложим използването на калциев глюконат като активиращ агент съобразно необходимото приложение в практиката. Най-високите средни стойности на TGF beta 1 са в пробите от метод 4 преди активиране (25.17 ± 2.369 ng/ml) и след активиране (25.37 ± 5.297 ng/ml), но тук не се установява статистически значима разлика в стойностите ($p > 0.05$). Можем да предложим протокола за добив на обогатена с тромбоцити плазма при условията на метод 4 за директно използване, без добавяне на използвания от нас активатор, съобразно нуждите за конкретното приложение. Най-ниска средна стойност на TGF beta 1 се установява в пробите от метод 1 преди активиране (11.00 ± 2.399 ng/ml) и след активиране (10.37 ± 2.165 ng/ml). За анализ на връзката между стойностите на TGF beta 1 преди и след активация за метод 1, метод 2, метод 3 и метод 4 и стойността на тромбоцитите от контролната група и броя на тромбоцитите, измерени в получената плазма по методи, е приложен корелационен анализ, в резултат на което се установи статистически значима положителна корелация в изследваните променливи ($p < 0.05$). Това обяснява и повишаването на средните стойности на количеството изследван растежен фактор в пробите с по-високо насищане с тромбоцити. Lee et al. (2013), анализирайки нивата на TGF-beta в активиран и инактивиран PRP

продукт, достига до извода, че концентрацията на TGF-beta по-скоро намалява в групата, подложена на активиране. Авторите посочват стойности от 120.28 ± 1.74 ng/ml за инактивирана PRP група и съответно 118.7 ± 1.84 ng/ml за активираната PRP група. Обратно на нашите резултати, проучванията на Roussy et al. (2007) и Weibrich et al. (2003) демонстрират различни стойности относно количественото определяне на растежните фактори в автоложните продукти. В проучването на Taniguchi et al. (2019) растежните фактори, които корелират с нивото на тромбоцитните клетки в LP-PRP, са PDGF, TGF beta 1, EGF и HGF. Като с най-висока позитивна корелация е TGF beta 1. Трябва да отбележим, че TGF beta 1 се разглежда като анаболен фактор и има възможност да активира хондрогенния потенциал на репаративните мезенхимни стволови клетки. Също така TGF beta 1 е необходим за нормалното развитие на артикулиращите повърхности на ставите, като липсата му на сигнализация може да предизвика развитието на нормална става в остеоартроза.

Доскоро концентрацията на растежните фактори се считаше, че е пропорционална на концентрацията на тромбоцитите. В горесцитираното проучване на Taniguchi et al. авторите доказват, че концентрацията на растежните фактори не е задължително пропорционална на броя на тромбоцитите, затова препоръчват при използването на PRP концентрацията на растежните фактори да бъде оценявана различно от тромбоцитната концентрация. По този начин теорията „повече е по-добро“ изглежда да не е валидна по отношение на концентрацията на тромбоцитите в PRP, а по-скоро подходящ тип на PRP продукт е необходимо да бъде селектиран в зависимост от желаното приложение в тъканите. Авторът на настоящия дисертационен труд също изповядва концепцията, че методологията на изготвяне на определен PRP продукт зависи

преди всичко от търсеното клинично приложение. Тази теза е подкрепена и от задълбочените проучвания на Giusti et al. (2014).

Различията в количествения анализ на растежните фактори се обуславя от множество фактори и включва вариабилност на количеството протеини, съдържащи се в тромбоцитите при всеки индивид, различна степен на концентрация на тромбоцитите, получена в процеса на добиване, активацията или инактивацията на крайния продукт, а също и различната степен на увреда на мембраната на тромбоцитите и тайминга при определянето на растежните фактори.

Съдържание на IL 8 в пробите от PRP

Белите кръвни клетки в PRP продуктите са източник на разнообразни проинфламаторни цитокини. IL-8 и TNF-а са основни провъзпалителни цитокини, участващи във фебрилни реакции и индуциращи секрецията на цитокини от други клетки. Поради тази причина ние си поставихме за цел да проверим съдържанието на IL-8 в получените тромбоцитни концентрати, за да се прогнозира поведението на тромбоцитните препарати след приложението им. След анализ на получените резултати се установи статистически значимо различие между средните стойности на IL-8 в пробите преди и след активиране за четирите метода $p < 0.05$. Най-високо съдържание на IL-8 получихме в пробите от метод 1 (0.707 ± 0.107 ng/ml) преди прилагане на активатор, обяснимо с факта за най-високо съдържание на моноцити и неутрофили. Най-ниските стойности на IL-8 се наблюдават в пробите от метод 4 след прилагане на активатор (0.083 ± 0.011 ng/ml, респективно най-ниско присъствие на остатъчни моноцити и неутрофили в тромбоцитния концентрат, получен по методиката на протокол 4). Като цяло установените

от нас стойности за IL-8 са по-ниски в сравнение с докладваните от Pochini et al. (2016). Авторите показват стойности на IL-8 в PRP, получени от отворени системи и търговски китове над 2 ng/ml. Amable et al. (2013) установяват, че когато тромбоцитите са активирани с калциев активатор, се секретират само 12 растежни фактори и цитокини, сред които и изследваният от нас IL-8: PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, TGF- β 1, TGF- β 2, EGF, IL-4, IL-8, IL-13, IL-17, IFN α и TNF α . Авторите получават стойности на IL-8 в активираната плазма значително по-високи спрямо неактивираната. Наблюдаваме намаляване на количеството на IL-8 в изследваните от нас групи след прилагане на активатор, с което получените от нас резултати се различават от тези на Amable. Положителна корелационна връзка се установи между количеството на левкоцитите от контролната група и съдържанието на IL-8 в тромбоцитните концентрати преди и след активиране в пробите от метод 1 и 3, както и между количеството на IL-8 и съдържанието на левкоцитите в пробите от метод 1, 3 и 4 ($p < 0.05$). Установяваме липса на сигнификантна разлика между стойностите на левкоцитите от контрола и левкоцити от метод 2 спрямо количеството на IL-8 в активирани и неактивирани проби. За метод 2 не се наблюдава и статистически значима корелационна връзка между стойностите на IL-8 в пробите преди и след активиране спрямо количеството на неутрофили, моноцити и лимфоцити в контролните проби ($p > 0.05$). Очаквана положителна корелационна връзка наблюдаваме между съдържанието на неутрофили и моноцити от контролна проба и съдържанието на неутрофилите от пробите от метод 1, спрямо съдържанието на IL-8, преди и след активирането им ($p < 0.05$). За пробите от протокол 3 се установи положителна корелационна връзка между неутрофили и лимфоцити от контролна група спрямо съдържанието на IL-8 в пробите след активиране, както и между съдържанието на неутрофили и моноцити от пробите,

получени чрез метод 3 спрямо IL-8 активираната група ($p < 0.05$). Повечето наблюдавани статистически значими корелационни връзки в пробите от тромбоцитни концентрати са между IL-8 и групите на неутрофилите. За метод 4 наблюдаваната сигнификантна значимост е между IL-8 в групата преди активиране и стойностите на моноцити от контрола и PRP пробите от метод 4 ($p < 0.05$). В литературата липсват отчетливи данни за зависимости между количеството IL-8 в изследвани PRP продукти и съдържанието на неутрофили, моноцити и лимфоцити в тромбоцитния концентрат. Разнопосочни и трудни за тълкуване са и получените от нас резултати. За внасяне на по-голяма яснота относно стойностите на изследвания цитокин считаме, че трябва да се направят допълнителни проучвания.

Сепариращ гел или не?

Използването на сепариращ биосъвместим гел в проведеното от нас проучване води до получаване на два вида тромбоцитни концентрати с присъствие на левкоцити (метод 2) и без присъствие на левкоцити (метод 4). Неминуемо двойното центрофугиране при метод 4 подпомага за елиминиране на съдържанието на левкоцити в тромбоцитните продукти и за това свидетелства продуктът, получен в условията на метод 3, който е бедна на левкоцити и обогатена с тромбоцити плазма, получена в моновети без сепариращ гел и в условията на двойно центрофугиране също. Изводът, който можем да посочим относно използването на вакутейнери с гел, е, че се получава доста по-лесно и сигурно тромбоцитен концентрат без присъствие на левкоцити (както посочихме, някои автори изключват тяхното присъствие, а за други присъствието на левкоцити в тромбоцитния концентрат е желателно).

Класифициране на получените от настоящото изследване PRP продукти

След подробно разглежданите в литературния обзор съществуващи класификационни системи на продуктите, произлизащи от богатата на тромбоцити плазма и съпоставяйки с клетъчните компоненти, присъстващи в продуктите, добити по четирите експериментални метода в нашето научно изследване, можем да ги отнесем според PAW класификационната система на DeLong (2012) и класификационна система MARSPILL на Lana (2017). По PAW класификационна система четирите експериментално добити тромбоцитни концентрати могат пълно да се съпоставят спрямо увеличението в пъти брой тромбоцити, наличието на общо количество левкоцити под или над базовите контролни стойности на цяла кръв, както и наличието на неутрофили под или над базовите контролни стойности като присъствие в цяла кръв. PAW класификационната система също разглежда и присъствието или не на екзогенен активатор.

Базирайки се на PAW класификационната система, PRP продуктите, получени чрез метод 1 и 2 (при едни и същи условия: единично центрофугиране при 1500 g за 10 мин), но в моновети без сепариращ гел за метод 1 и с използван сепариращ гел в метод 2, се различават основно по насищането с тромбоцити. За пробите от метод 1 тромбоцитното насищане е над базовата контролна стойност, но не по-високо от 750 000 тромбоцити/ μ l, общото количество бели кръвни клетки е над базовата стойност и съдържанието на неутрофили също е над базовата стойност, сравнена с контролата. За пробите от метод 2 тромбоцитното насищане попада в групата със стойност по-голяма от 1 250 000 тромбоцити/ μ l, общото количество бели кръвни клетки е над базовата стойност и съдържанието на неутрофили също е над базовата стойност, сравнена с контролата. Пробите от протокол 3

и 4 също са класифицирани спрямо PAW системата. Условието на добив на PRP и при двата метода са еднакви (двойно центрофугирани, 1150 g за 10 мин и 350 g, 5 мин). Разликата отново е във вида на използваните лабораторни консумативи, а именно пробите от метод 3 са изработени в моновети без сепариращ гел, при метод 4 със сепариращ гел. Продуктите от метод 3 и 4 са с обогатяване на тромбоцити по-високо от 1 250 000 тромбоцити/ μl , общо количество левкоцити и неутрофили под базовите контролни стойности спрямо посочената класификационна система, те са сходни по наблюдаваните параметри. Абревиатурното означение е представено веднъж без активиране на продукта и веднъж след добавяне на екзоген активатор.

Според MARSPIII класификационната система, тромбоцитните концентрати, получени от четирите протокола, могат да се определят спрямо съдържанието на левкоцити със специално внимание към моноклеарната клетъчна популация. Внимание се обръща на използвания метод – всички наши разновидности на PRP продукти са получени чрез ръчни методи. Според съдържанието на еритроцити пробите от метод 1 и 2 са богати на еритроцити, а пробите от метод 3 и 4 са бедни на остатъчно количество еритроцити (съдържание 15 пъти по-ниско спрямо контролни стойности). Спрямо насищането с тромбоцити продуктът, получен по метод 1, не може да се класифицира спрямо посочените минимални насищания в граница от 2-3 пъти над базовите контролни стойности (средна стойност 1.92 пъти над средната стойност от контролна група). Следователно според посочената класификационна система на Lana (2017) не можем да го отнесем като класически PRP продукт. Тромбоцитните концентрати, получени чрез метод 2, 3 и 4, са в границите на насищане между 4-6 пъти спрямо средната стойност от контролната група. Продуктите, получени по метод 1 и 2, са

богати на левкоцитно съдържание (средна стойност на пробите над средната стойност от контролната група), а продуктите, получени чрез метод 3 и 4, са бедни на левкоцити (средна стойност на пробите, по-ниска от средната стойност на контролната група). Продуктите, получени от нас, не са подлагани на светлинно активиране L(L-) и също така не са използвани образни средства за правилното място на приложение I (G-). Представени са и броят на центрофугиранията за пробите от четирите метода (Sp1 за метод 1 и 2 и Sp2 за метод 3 и 4). Двукратното абривиатурно представяне за всеки един метод е свързано с активирането и неактивирането на получените проби. В таблица 49 са представени абривиатурните означения на получените от нас автоложни тромбоцитни концентрати, класифицирани спрямо PAW и MARSPILL системите.

Таблица 49. Класифициране на получените от нас четири продукта спрямо системите на PAW и MARSPILL

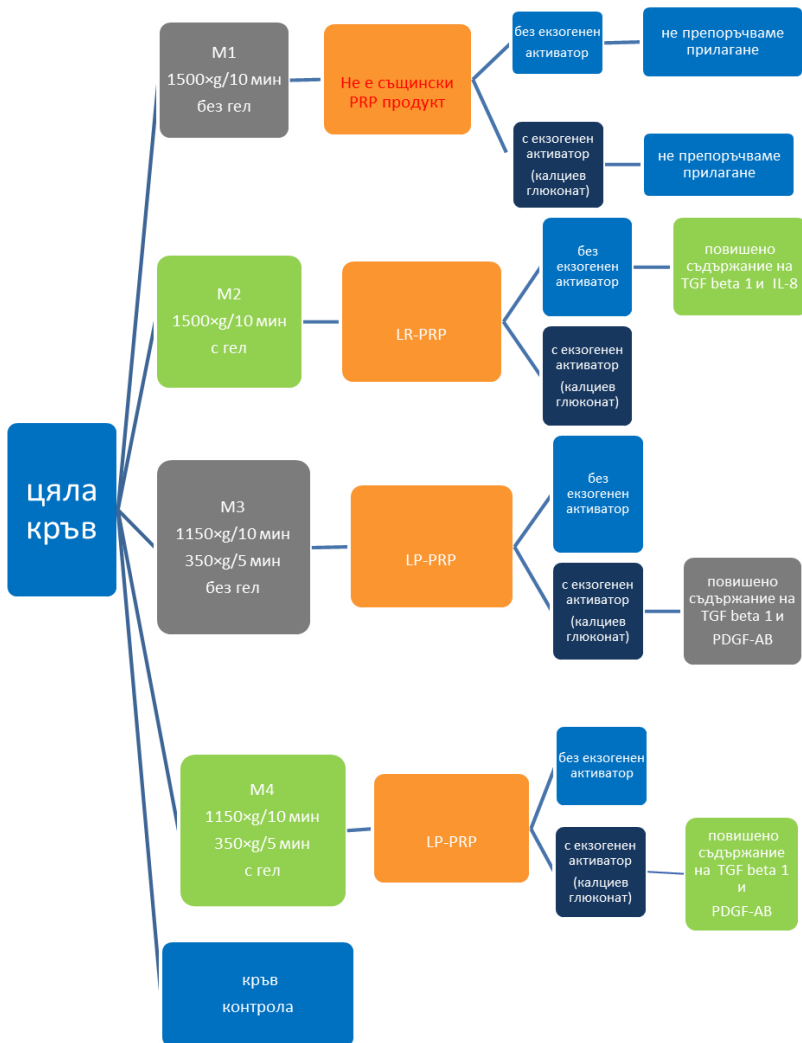
Класификационна система	Автоложен обогатен с тромбоцити продукт			
	Метод 1	Метод 2	Метод 3	Метод 4
PAW	P2-Aα P2-x-Aα	P4-Aα P4-x-Aα	P4-Bβ P4-x-Bβ	P4-Bβ P4-x-Bβ
MARSPILL	M(H) A(A-) R(RBC-R) S(Sp1) P(PL-) I(G-) L(LR) L(L-)	M(H) A(A-) R(RBC-R) S(Sp1) P(PL 4-6) I(G-) L (LR) L(L-)	M(H) A(A-) R(RBC-P) S(Sp2) P(PL 4-6) I(G-) L (P) L(L-)	M(H) A(A-) R(RBC-P) S(Sp2) P(PL 4-6) I(G-) L (P) L(L-)
	M(H) A(A+) R(RBC-R) S(Sp1) P(PL-) I(G-) L(LR) L(L-)	M(H) A(A+) R(RBC-R) S(Sp1) P(PL 2-3) I(G-) L (LR) L(L-)	M(H) A(A+) R(RBC-P) S(Sp2) P(PL 4-6) I(G-) L(P) L(L-)	M(H) A(A+) R(RBC-P) S(Sp2) P(PL 4-6) I(G-) L (P) L(L-)

Алгоритъм при получаването на автоложни тромбоцитни концентрати

На базата на обширния литературен обзор и натрупания от нас практически опит предлагаме следния алгоритъм при изготвяне и прилагане на обогатена с тромбоцити плазма (фиг. 12).

След изтегляне на периферна кръв, същата се разпределя за анализ по четири избрани от нас протокола. Според проучената литература и натрупани данни относно видовете PRP и тяхното насищане с тромбоцити продуктът, получен от нас в условията на метод 1, не може да се нарече същинска обогатена с тромбоцити плазма поради насищане с тромбоцити в нея по-ниско от два пъти над контролните стойности. Следователно не препоръчваме прилагането ѝ в медицинската практика. Обогатената с тромбоцити плазма, добита в условията на метод 2, според разгледаните класификации по-горе се означава като LR-PRP. Освен с обогатяване на тромбоцити и левкоцити в нея, наблюдаваме и повишено количество на моноцити, неутрофили и лимфоцити, сравнени с контролните стойности от цяла кръв. За този вид тромбоцитен концентрат получихме повишаване на количеството на два от изследваните три протеина в неактивирана (течна) форма на продукта. Продукт с такива характеристики може да намира приложение при трудно зарастващи рани поради антибактериалната си активност, както

и насърчаване на заздравяването при наранявания на меките тъкани. Обогатената с тромбоцити плазма, получена чрез методи 3 и 4, е сходна по своите характеристики за количествено присъствие на изследваните клетъчни компоненти. Това са „пречистени“ по своята същност продукти – предимно богати на тромбоцити, означени като LP-PRP, с предложение за прилагане в клиничната практика, като продукти с установена липса на левкоцити. Тромбоцитните концентрати, добити чрез методи 2, 3 и 4, могат да намират своето приложение след прилагане на активатор или не в зависимост от състоянието, в което трябва да бъдат приложени. Трябва да обърнем внимание обаче на установените повишени стойности на TGF beta 1 и PDGF-AB в пробите от LP-PRP и от двата метода след прилагане на активатор. С установеното от нас предлагаме предварително активиране на посочените тромбоцитни концентрати при необходимост от запълване на кухини или костни дефекти.



Фиг. 12. Алгоритъм при получаването на автоложни тромбоцитни концентрати

Предложение за стандартизиране на PRP процедурата

Както отбелязахме, налице са много фактори, които оказват влияние на процеса на изготвяне на PRP. Считаме, че следните стъпки в протокола на изготвяне на PRP биха помогнали за достигане на оптимална яснота в количествените характеристики на крайния продукт. В зависимост от клиничното приложение, клиницистът трябва да определи необходимия обем PRP за всяка една процедура, както и интервала за прилагането им. Предложените от нас протоколи са разработени и количествено определени за краен обем PRP от 3 мл.

1. Венепункцията трябва да се извършва с игла с размер минимум 22G във лабораторни съдове (вакутейнери със сепариращ гел или моновети без сепариращ гел) в присъствието на антикоагулант на цитратна основа, в условия на стайна температура 21–24°C до 5 мин.

2. Кръвната проба, изтеглена в лабораторни съдове, трябва да се обръща 5–10 пъти за правилно смесване на антикоагуланта и кръвта. Ако кръвта не се разклати, могат да се образуват малки фибринови налепи, водещи до фалшиво намален брой тромбоцити.

3. Ако се работи с параметри, различни от посочените от нас (центробежна сила и време), предлагаме контролно измерване на броя на тромбоцитите в еритроцитния слой и супернатанта за осигуряване на оптимално разделяне на тромбоцитите от цяла кръв. Ако това не се е случило, е необходимо да се променят параметрите обороти за минута и време.

4. Ако след първото центрофугиране е налице голям обем плазма, тогава е препоръчително при второ центрофугиране използването на по-висока центрофужна сила за концентриране на тромбоцитите в дъното на епруветката (закон за скоростта).

5. Слой с концентрираните тромбоцити трябва да бъде отделен от PRP максимално бързо след центрофугирането, тъй като концентрираните тромбоцити с течение на времето бавно ще преминат в PRP слоя чрез процес на дифузия и така ще намалее броят тромбоцити в желаня PRP продукт.

6. За преброяване на тромбоцитите в крайния PRP концентрат той трябва да се ресуспендира за минута, за да позволи равно разпределяне на тромбоцитите преди преброяване.

7. С цел улесняване процедурата по отделянето на отделните слоеве в амбулаторни условия, предлагаме използването на вакутейнери със сепариращ гел.

VI. Изводи

Техническият напредък на медицината и съвременният ритъм на живот изискват от клиницистите да въвеждат в своята практика методи, осигуряващи максимално бързо и пълноценно възстановяване на пациентите към ежедневните им дейности.

1. Свидетелство за комплексността на проблематиката, разгледана в настоящия дисертационен труд, е наличието на множество различни класификационни системи, вариабилност на протоколите за изготвяне на автоложните тромбоцитни продукти и липсата на единомислие по отношение на тези параметри.

2. Подчертани са факторите, които оказват влияние на процеса на изготвяне на PRP, като са предложени идеи за стандартизиране на процедурата.

3. Извършен е анализ на кръвните компоненти в автоложната обогатена на тромбоцити плазма, получена чрез четири различни протокола. Установено е повишаване на тромбоцитното съдържание с над +337,06% в три от продуктите, сравнени с базовата контролна стойност, с ясно определени налични клетъчни фракции в тях.

4. Клиничното приложение на дадения PRP продукт е основният фактор, който трябва да се съобрази при избора на протокол на изготвяне – с оглед използването на богат или беден на левкоцити продукт, течна или гелообразна форма на PRP.

5. В настоящото проучване са предложени протоколи и анализирани PRP продукти, които могат да бъдат прилагани успешно в амбулаторни условия. Използването на сепариращ гел прави процедурата по добив на PRP технически по-лесна и сигурна.

6. Детайлно са анализирани количеството на три основни протеина (PDGF-AB, TGF-b1, IL-8), като е дискутирана тяхната корелация с формените елементи в PRP продуктите и зависимостта им от активиране или не.

VII. Научни приноси

Приноси с оригинален характер:

1. За първи път в България е направен задълбочен анализ върху различни класификационните системи с оглед дефинирането на крайния продукт.

2. За първи път в България е направено проучване относно съдържанието на PDGF-AB, TGF beta 1 и IL-8 в различни експериментални протоколи за добив на PRP.

3. За първи път в България е изготвено предложение за стандартизиране на процедурата по получаване на обогатена с тромбоцити плазма.

Приноси с приложен характер:

1. Изготвен е собствен алгоритъм за получаване на автоложни тромбоцитни концентрати.

2. Направено е предложение за прилагане на конкретни PRP продукти, съобразно техните характеристики.

Приноси с потвърдителен характер:

1 Извършено е усъвършенстване и популяризиране на техниката за получаване на обогатена с тромбоцити плазма в родната литература.

2. Потвърдено е, че добивът на обогатена с тромбоцити плазма е надежден при използване на ръчни методи със

стандартна лабораторна центрофуга, без помощта на затворени търговски комплекти и китове.

3. Потвърдени са зависимости между количество кръвни клетки и изследвани протеини в крайния PRP продукт.

4. Потвърдени са резултатите за получаване на LP-PRP в условия на двойно центрофугиране.

VIII. Заключение

Настоящото проучване представя три надеждни протокола за получаването на PRP продукти с повишаване на тромбоцитното съдържание с над +337,06%, сравнени с базовата контролна стойност, с ясно определени налични клетъчни фракции в тях. Определяме три основни протеина, присъстващи преди и след прилагане на екзогенен активатор в PRP продуктите и на базата на съдържанието на различните клетъчни и молекулни компоненти предлагаме медицинско приложение на два типа обогатена с тромбоцити плазма (LR-PRP, LP-PRP) според конкретния диагностициран проблем.

**Забележка: Номерацията на фигури, таблици и диаграми в настоящия автореферат не следва номерацията на същите в дисертационния труд.*

IX. Научни публикации по темата

1. Н. Иванова, С. Иванов, Г. Янева, Ц. Димитрова, Д. Иванов. Анализирани са съществуващи класификации на обогатени с тромбоцити плазмени концентрати (PRP). Съюз на учените

Пловдив. Серия Г. Медицина, фармация и дентална медицина, том XXI, 2017, 254-257.

2. Н. Иванова, С. Иванов, Г. Янева, Ц. Димитрова, Д. Иванов. Сравнителна оценка на използването на обогатена с тромбоцити плазма (PRP) в ортопедичната амбулаторна практика за лечение на заболявания на сухожилията чрез иновативен метод на получаване Научни трудове на Съюза на учените в България – Пловдив. Серия Г. Медицина, фармация и дентална медицина, т. XXII, 2018, 189-193.

3. Н. Иванова, Г. Янева, Д. Иванов. Основни концепции в изготвянето на автоложните тромбоцитни концентрати. Варненски медицински форум, т. 10, 2021, Online First.

4. **Ivanova N**, Yaneva G, Ivanov D. Characteristics of autologous platelet- rich plasma concentrates obtained by the buffy coat technique using different protocols. Scr. Sci. Pharm., 2021; online first, Medical University of Varna.

Участие в научни форуми

Н. Иванова, С. Иванов, Д. Иванов. Сравнителен анализ на клетъчни компоненти в PRP концентрационно насищане на тромбоцитна маса в PRP при различни условия. XIII Национална конференция по медицинска биология. 13–15 септември 2019 г., Варна.

Х. Благодарности

В заключение изказвам благодарности на:

- *Научния ми ръководител проф. Добри Лазаров Иванов, д.б. – за подкрепата и помощта при разработването, анализа и подготовката на дисертационния труд*
- *Проф. Стефан Василев Пеев, д.м.н – за споделения професионален опит относно PRP добиване и приложение*
- *Всички мои колеги от Катедра „Биология“ – за давания кураж, споделения опит и умения, професионалната и техническа помощ при извършване на експерименталната част от научното изследване*
- *Моя съпруг д-р Стоян Иванов – за първоначалната идея за този дисертационен труд, за безрезервната помощ и за това, че винаги е до мен*
- *Моите двама сина Иван и Борис – за проявеното търпение към мама*
- *Моето голямо семейството – за подкрепата, вярата и любовта*
- *Всички доброволци, взели участие в научното изследване, послужило за изработването на настоящия дисертационен труд*

Научното изследване е проведено с помощта на финансиран малък проект по Фонд „Наука“ към МУ-Варна.