

ВЛИЯНИЕ КРИООБРАБОТКИ НА ПРЕПАРАТЫ АУТОПЛАЗМЫ, ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ

DOI: 10.17691/stm2020.12.6.07

УДК 615.382.664.8:611-013.11

Поступила 17.05.2020 г.

**Д.В. Мельников**, к.м.н., доцент кафедры онкологии, радиотерапии и пластической хирургии;**К.А. Кириллова**, к.м.н., младший научный сотрудник кафедры онкологии,

радиотерапии и пластической хирургии;

А.С. Захаренко, к.м.н., младший научный сотрудник кафедры онкологии,

радиотерапии и пластической хирургии;

М.Е. Синельников, младший научный сотрудник Института регенеративной медицины;**А.А. Рагимов**, д.м.н., профессор кафедры клинической трансфузиологии;**А.Л. Истранов**, д.м.н., профессор кафедры онкологии, радиотерапии и пластической хирургии;**О.И. Старцева**, д.м.н., профессор кафедры онкологии, радиотерапии и пластической хирургии

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова

(Сеченовский университет), ул. Трубецкая, 8/2, Москва, 119991

Тромбоцитарный фактор роста (platelet-derived growth factor, PDGF) играет важную роль в ангиогенезе, влияет на активацию миграции и пролиферации мезенхимальных стволовых клеток, фибробластов, гладкомышечных клеток, остеобластов; активацию миграции моноцитов, макрофагов и нейтрофилов.

Цель исследования — изучить влияние криообработки на качественные свойства аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами (АОТ), в различные временные отрезки.

Материалы и методы. Препараты аутологичной плазмы получали из крови 31 донора. Биологический материал подвергали двукратному центрифугированию по протоколу получения P-PRP и L-PRP. В свежих препаратах АОТ изучали количество тромбоцитов и концентрацию факторов роста (PDGF-AA и PDGF-BB). В замороженных образцах АОТ определяли концентрацию PDGF-AA и PDGF-BB через 2 нед и через 2 мес после криообработки при температуре -35°C . Исследовали образцы P-PRP и L-PRP, активированные 10% раствором CaCl_2 и неактивированные.

Результаты. Препараты L-PRP значительно превосходят препараты P-PRP, поскольку в них отмечено увеличение количества тромбоцитов в 1,7 раза. Уровень PDGF-AA в неактивированной L-PRP в 1,8 раза выше по сравнению с неактивированной P-PRP ($p < 0,05$). В активированной L-PRP уровень PDGF-AA в 1,5 раза выше, чем в активированной P-PRP ($p < 0,05$). Уровень PDGF-BB в неактивированной L-PRP в 2,9 раза выше по сравнению с неактивированной P-PRP и в 1,8 раза выше в активированной L-PRP, чем в активированной P-PRP ($p < 0,05$). Концентрация PDGF-BB в неактивированной P-PRP резко увеличивается на 2-й неделе после заморозки и через 2 мес остается на том же уровне ($p < 0,05$). Концентрация PDGF-BB в активированной плазме не изменяется ($p > 0,05$).

Заключение. Процесс криообработки неактивированной аутоплазмы L-PRP позволяет сохранять и в последующем усиливать свойства плазмоконтрата, что дает возможность применять его в клинической практике.

Ключевые слова: клеточные технологии; тромбоцитарный фактор роста; PDGF; альфа-гранулы тромбоцитов; пролиферация; активированные P-PRP, L-PRP; неактивированные P-PRP, L-PRP.

Как цитировать: Melnikov D.V., Kirillova K.A., Zakharenko A.S., Sinelnikov M.Y., Ragimov A.A., Istranov A.L., Startseva O.I. Effect of cryo-processing on platelet-rich autoplasm preparations. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2020; 12(6): 54–61, <https://doi.org/10.17691/stm2020.12.6.07>

English

Effect of Cryo-Processing on Platelet-Rich Autoplasm Preparations

D.V. Melnikov, MD, PhD, Associate Professor, Department of Oncology, Radiotherapy and Plastic Surgery;**K.A. Kirillova**, MD, PhD, Junior Researcher, Department of Oncology, Radiotherapy and Plastic Surgery;**A.S. Zakharenko**, MD, PhD, Junior Researcher, Department of Oncology, Radiotherapy and Plastic Surgery;

Для контактов: Синельников Михаил Егорович, e-mail: Mikhail.y.sinelnikov@gmail.com

M.Y. Sinelnikov, Junior Researcher, Institute of Regenerative Medicine;
A.A. Ragimov, MD, DSc, Professor, Department of Clinical Transfusion Medicine;
A.L. Istranov, MD, DSc, Professor, Department of Oncology, Radiotherapy and Plastic Surgery;
O.I. Startseva, MD, DSc, Professor, Department of Oncology, Radiotherapy and Plastic Surgery

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8/2 Trubetskaya St.,
 Moscow, 119991, Russia

Platelet-derived growth factor (PDGF) plays an important role in angiogenesis, affects activation of migration and proliferation of mesenchymal stem cells, fibroblasts, smooth muscle cells, osteoblasts; activation of migration of monocytes, macrophages, and neutrophils.

The aim of the investigation was to study the effect of cryo-processing on the qualitative properties of platelet-rich autoplasm (PRP) at different time intervals.

Materials and Methods. Autologous plasma preparations were obtained from the blood of 31 donors. The biological material was prepared by double centrifugation according to the protocol for obtaining P-PRP and L-PRP. Platelet count and the concentration of growth factors (PDGF-AA and PDGF-BB) were studied in fresh PRP preparations. In frozen PRP samples, the concentration of PDGF-AA and PDGF-BB was determined 2 weeks after cryo-processing and 2 months after cryo-processing at -35°C . P-PRP and L-PRP samples activated with 10% CaCl_2 solution and those non-activated were studied.

Results. L-PRP preparations are significantly superior to P-PRP preparations: the concentration of platelets is 1.7 times higher in them. The level of PDGF-AA in non-activated L-PRP is 1.8 times higher than in non-activated P-PRP ($p < 0.05$). The level of PDGF-AA is 1.5 times higher in activated L-PRP than in activated P-PRP ($p < 0.05$). The level of PDGF-BB is 2.9 times higher in non-activated L-PRP than in non-activated P-PRP and 1.8 times higher in activated L-PRP than in activated P-PRP ($p < 0.05$). The concentration of PDGF-BB in non-activated P-PRP sharply increases in the 2nd week after freezing and remains at the same level after 2 months ($p < 0.05$). The concentration of PDGF-BB in activated plasma does not change ($p > 0.05$).

Conclusion. Cryo-processing of non-activated autologous L-PRP allows preserving and subsequently enhancing the properties of plasma concentrate, which makes it possible to apply it in clinical practice.

Key words: cell technologies; platelet growth factor; PDGF; platelet alpha granules; proliferation; activated P-PRP, L-PRP; non-activated P-PRP, L-PRP.

Введение

Одним из наиболее перспективных направлений в пластической хирургии является пересадка аутологичной жировой ткани для восполнения утраченных объемов тканей, эстетической коррекции, а также с целью репарации и регенерации тканей организма [1–3]. Несмотря на легкость и безопасность, данный метод имеет существенный недостаток — непрогнозируемое и неэффективное приживление пересаженного жира [4].

Достижения в области клеточных технологий позволяют по-другому посмотреть на проблему пересадки собственной жировой ткани. Особое внимание уделяется факторам, оказывающим влияние на приживаемость жирового аутоотрансплантата. Для улучшения приживаемости свободно пересаженного жира применяют препараты аутологичной плазмы, обогащенной тромбоцитами (АОТ) [5–7].

Компоненты крови для нетрансфузиологических целей начали использовать после сообщения R. Marx и соавт. [5, 8] об успешном применении тромбоконцентрата в стоматологии. Согласно R. Marx, АОТ — это плазма крови, концентрация тромбоцитов в которой заметно превышает нормальную [9]. В норме она находится в пределах 150–350 тыс. кл./мкл и в среднем составляет 200 тыс. кл./мкл. Доказано, что стимулирующий эффект аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, проявляется, если концентрация тромбоцитов в

ней равна 1 млн. и более кл./мкл [10]. В ряде исследований концентрацию тромбоцитов в АОТ увеличивали в 2–8,5 раза от нормы [5, 7, 11–15].

Будучи аутологичным продуктом, богатая тромбоцитами плазма является привлекательной для терапевтического применения ввиду отсутствия риска побочных эффектов, а также риска передачи инфекционных заболеваний [5, 6, 16, 17].

Уникальность и специфичность АОТ обуславливается многофакторным местным влиянием высококонцентрированного комплекса биологических медиаторов [10]. Факторы роста АОТ высвобождаются из альфа-гранул тромбоцитов в ответ на их активацию [15, 18, 19]. Основными факторами роста являются тромбоцитарный фактор роста (PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB), трансформирующий фактор роста (TGF- β 1 и TGF- β 2), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста фибробластов (FGF), инсулиноподобный фактор роста (IGF-1 и IGF-2) и фактор роста эпителия (EGF) [10, 11].

Тромбоцитарный фактор роста играет важную роль в ангиогенезе. Рецепторы к нему расположены в сосудистой стенке на фибробластах и гладкомышечных клетках. PDGF стимулирует пролиферацию данных клеток. Этот фактор участвует в активации миграции и пролиферации мезенхимальных стволовых клеток, фибробластов, гладкомышечных клеток, остеобластов; в активации миграции моноцитов, макрофагов, нейтрофилов [10, 14].

Эффективность применения данной субстанции (в частности, ее благоприятное воздействие на ткани-мишени) обусловлена тромбоцитами. Как известно, в альфа-гранулах тромбоцитов содержатся факторы роста, влияющие на ткани-мишени; следовательно, количество факторов роста непосредственно зависит от количества тромбоцитов. Значимое влияние на концентрацию тромбоцитов, а соответственно, и факторов роста, оказывает клеточный состав плазмы, обогащенной тромбоцитами [20].

Препараты аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами (platelet rich plasma, PRP), делят на четыре категории в зависимости от содержания лейкоцитов и фибрина: чистая аутоплазма, обогащенная тромбоцитами крови (P-PRP); аутоплазма, обогащенная тромбоцитами и лейкоцитами крови (L-PRP); чистый обогащенный тромбоцитами фибрин (P-PRF); обогащенный лейкоцитами и тромбоцитами фибрин (L-PRF) [21–23].

Популярной темой для споров и многочисленных публикаций является возможность хранения (замораживания) аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами. Замораживание и размораживание не требует забора крови для каждой инъекции в случае нескольких сеансов лечения, но ухудшает функцию тромбоцитов, тем самым изменяя картину высвобождения фактора роста [6]. По этим причинам свежее введение PRP считается более эффективным [24].

Цель исследования — изучить влияние криообработки на качественные свойства аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, в различные временные отрезки.

Материалы и методы

Работа была выполнена на базе Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова. Препараты аутологичной плазмы (P-PRP и L-PRP) получали из крови 31 донора-добровольца (средний возраст — 38,0±13,2 года).

У доноров набирали по две вакуумные пробирки крови объемом 9 мл с концентрацией $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 3,8%. Пробирки маркировали индивидуальным штрих-кодом, присвоенным донору при регистрации. Для определения исходных показателей клеточного состава крови проводили клинический анализ. Далее пробирки с указанным биологическим материалом подвергали двукратному центрифугированию по протоколу получения P-PRP и L-PRP (500 g — 5 мин и 1538 g — 3 мин, где g — величина центробежного ускорения), отработанному нами ранее [25] и позволяющему достичь концентрации тромбоцитов от 1 900 000 до 2 436 000 в 1 мкл, лейкоцитов (в составе L-PRP) — от 10 000 до 15 000 в 1 мкл, что является важным моментом эффективного применения данных препаратов.

В свежих препаратах AOT (P-PRP и L-PRP) изучали количество тромбоцитов и концентрацию факторов роста (PDGF-AA и PDGF-BB). В замороженных образцах AOT (P-PRP и L-PRP) определяли концентрацию

PDGF-AA и PDGF-BB через 2 нед и через 2 мес после криообработки. Температурный режим выбирали с учетом правил криообработки белковых фракций (от –20 до –80 °С). Значение –35 °С было выбрано в качестве среднего с учетом особенностей лабораторного оборудования. Отбор был осуществлен в лабораторные эпидорфы. Все полученные образцы исследовали в двух состояниях: активированном 10% раствором CaCl_2 в соотношении 1:10 и неактивированном.

Состав аутоплазмы (наличие и количество лейкоцитов и тромбоцитов) определяли на гематологическом анализаторе Sysmex XT2000i (Sysmex, Япония). Концентрацию факторов роста (FGF basic, PDGF-AA, PDGF-BB, VEGF) изучали с помощью технологии xMAP Luminex (Gen-Probe, США) на основе проточной цитометрии (флуориметрии). Это метод мультиплексного анализа, в котором носителем являются полистироловые микросферы, интегрированные двумя флуорофорами в различной концентрации. Определенное соотношение их концентраций создает сочетания возможных типов частиц со своей уникальной спектральной характеристикой, позволяющей одновременно выявлять несколько аналитов в одном образце. Исследование проводили с помощью тест-систем Human Angiogenesis Base Kit A (R&D Systems, США), микросфер Luminex Performance assay FGF basic, PDGF-AA, PDGF-BB, VEGF (R&D Systems) в соответствии с протоколом производителя с учетом его адаптации под использование цитратной плазмы (единицы измерения концентрации факторов роста — граммы на миллилитры).

Статистическая обработка данных. Данные по концентрации тромбоцитов и факторов роста (PDGF-AA и PDGF-BB) в крови, P-PRP и L-PRP были статистически проанализированы с использованием программ Statistica 8.0 (StatSoft) и SigmaStat 3.5 (Systat Software). Распределение проверяли на нормальность с помощью метода Колмогорова–Смирнова. Для межгрупповых сравнений при критическом уровне значимости $p < 0,05$ применяли параметрические критерии (t-критерий Стьюдента для попарных сравнений, однофакторный дисперсионный анализ и тест Холма–Сидака для множественных сравнений) в случае нормального распределения; данные представляли как среднее ± стандартное отклонение среднего. В случае распределения данных, отличного от нормального, использовали непараметрические критерии (U-критерий Манна–Уитни для попарных сравнений, H-критерий Краскела–Уоллиса и тест Данна для множественных сравнений); данные представляли как Me (min–max), где Me — медиана, min, max — минимальное и максимальное значения переменной.

Результаты

Концентрация тромбоцитов в цельной крови составила $238 (183–254) \cdot 10^3$ кл./мкл; в бедной тромбоцитами плазме (platelet poor plasma, PPP) после 1-го эта-

па центрифугирования — $500 (400-584) \cdot 10^3$ кл./мкл; в P-PRP — $1138 (690-1422) \cdot 10^3$ кл./мкл; в L-PRP — $1900 (1418-2875) \cdot 10^3$ кл./мкл. В L-PRP отмечено увеличение количества тромбоцитов в 1,7 раза в сравнении с P-PRP ($p < 0,05$) (рис. 1).

Концентрация факторов роста. Концентрация PDGF-AA в неактивированной L-PRP ($1089,9 (973,1-1444,1)$ г/мл) в 1,8 раза выше, чем в неактивированной P-PRP ($614,7 (453,6-885,8)$ г/мл) ($p < 0,05$). Концентрация PDGF-AA в активированной L-PRP

($1134,3 (914,9-1305,6)$ г/мл) в 1,5 раза выше, чем в активированной P-PRP ($742,5 (575,6-1008,8)$ г/мл) ($p < 0,05$) (рис. 2).

Концентрация PDGF-BB в неактивированной L-PRP ($3493,2 (2594,3-5086,9)$ г/мл) в 2,9 раза выше, чем в неактивированной P-PRP ($1651,7 (1168,2-2785,2)$ г/мл) ($p < 0,05$). Концентрация PDGF-BB в активированной L-PRP ($4029,1 (2814,1-4393,1)$ г/мл) в 1,8 раза выше, чем в активированной P-PRP ($2262,1 (1250,0-3539,6)$ г/мл) ($p < 0,05$) (рис. 3).

Рис. 1. Концентрация тромбоцитов в периферической крови, PPP, неактивированных P-PRP и L-PRP

* — межгрупповые различия значений статистически значимы, $p < 0,05$

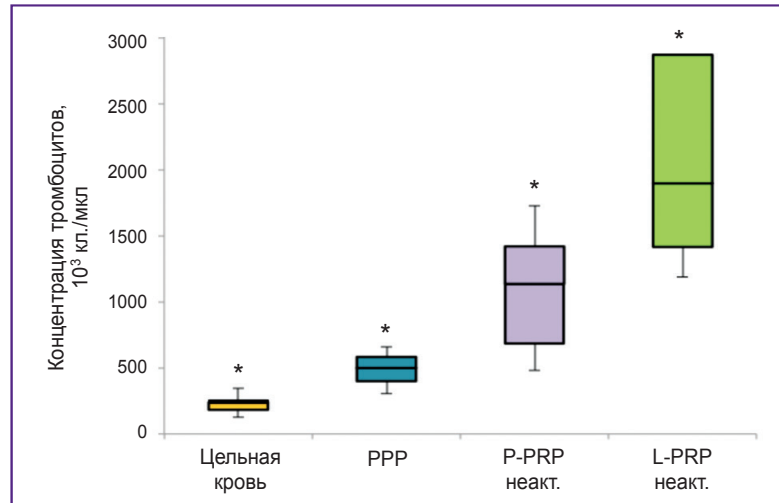


Рис. 2. Концентрация фактора роста PDGF-AA в неактивированных (а) и активированных (б) P-PRP и L-PRP; * — $p < 0,05$

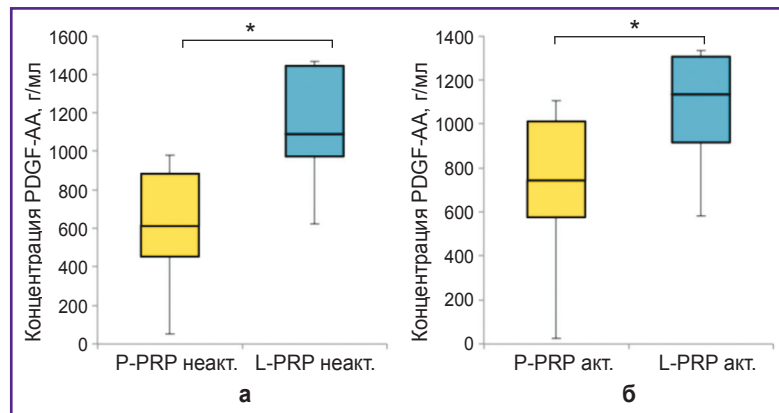
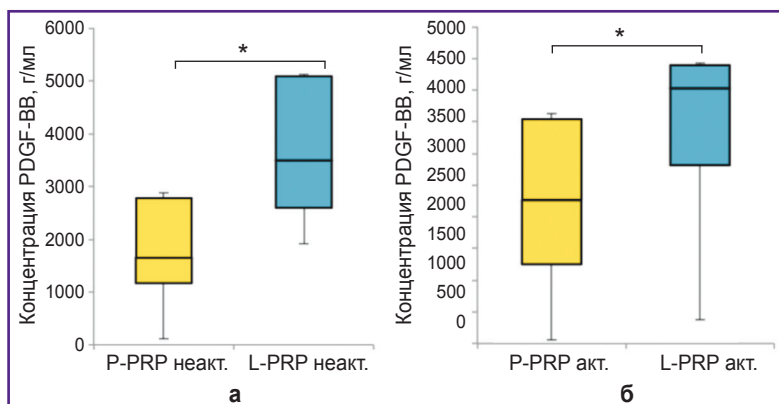


Рис. 3. Концентрация фактора роста PDGF-BB в неактивированных (а) и активированных (б) P-PRP и L-PRP; * — $p < 0,05$



Динамика факторов роста после заморозки.

Концентрация PDGF-AA в неактивированной P-PRP увеличивается через 2 нед после заморозки и спустя 2 мес остается на том же уровне ($p < 0,05$). Концентрация PDGF-AA в активированной P-PRP значительно не меняется ($p > 0,05$) (рис. 4).

Концентрация PDGF-BB в неактивированной P-PRP резко увеличивается на 2-й неделе после заморозки и через 2 мес остается гораздо выше исходных зна-

чений ($p < 0,05$). Концентрация PDGF-BB в активированной плазме статистически значимо не изменяется ($p > 0,05$) (рис. 5).

Концентрация PDGF-AA в неактивированной L-PRP возрастает через 2 нед и через 2 мес остается выше исходных значений ($p < 0,05$). Концентрация PDGF-AA в активированной плазме статистически значимо возрастает через 2 нед, через 2 мес она остается выше исходного уровня ($p < 0,05$) (рис. 6).

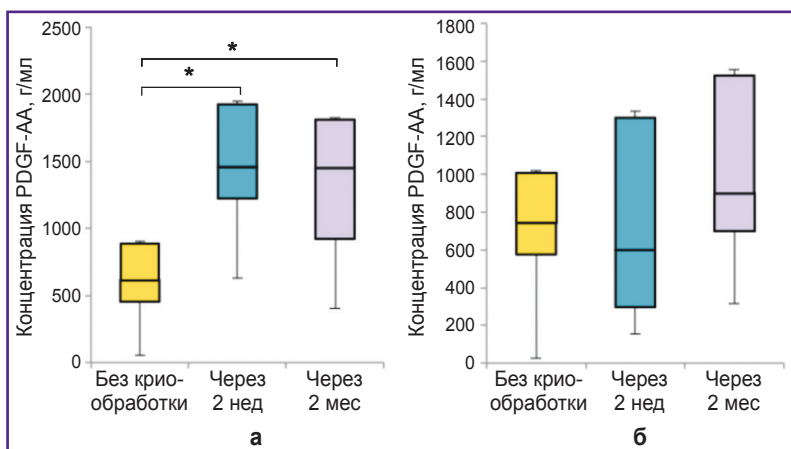


Рис. 4. Зависимость концентрации фактора роста PDGF-AA от срока заморозки: а — неактивированная P-PRP, * — $p < 0,05$; б — активированная P-PRP

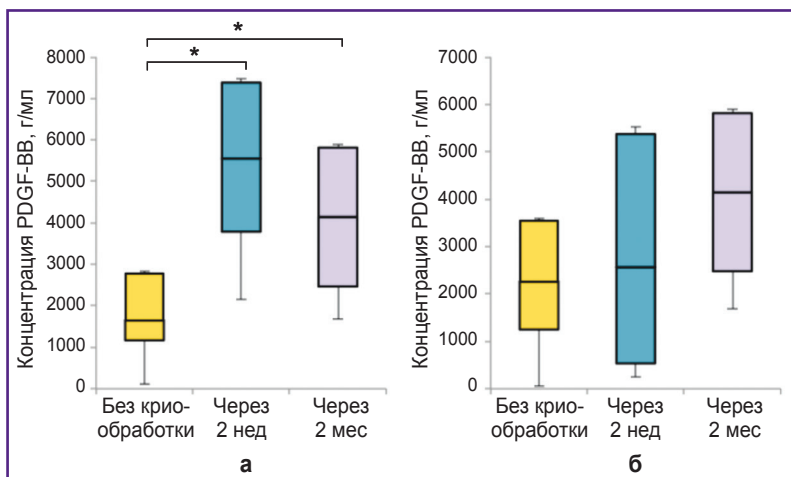


Рис. 5. Зависимость концентрации фактора роста PDGF-BB от срока заморозки: а — неактивированная P-PRP, * — $p < 0,05$; б — активированная P-PRP

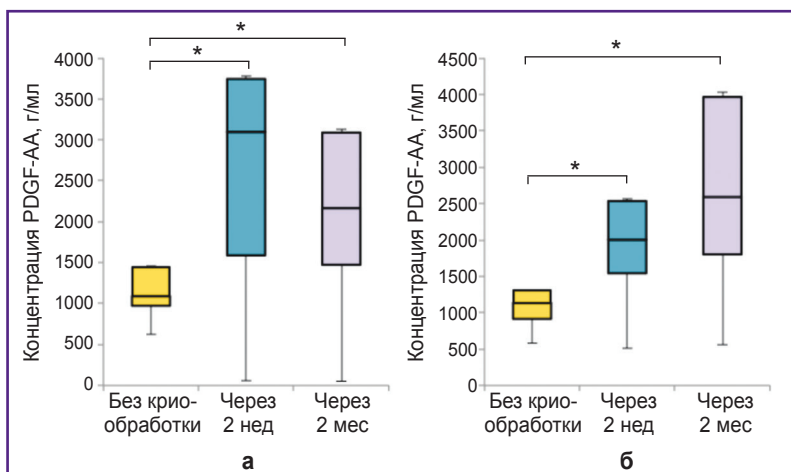
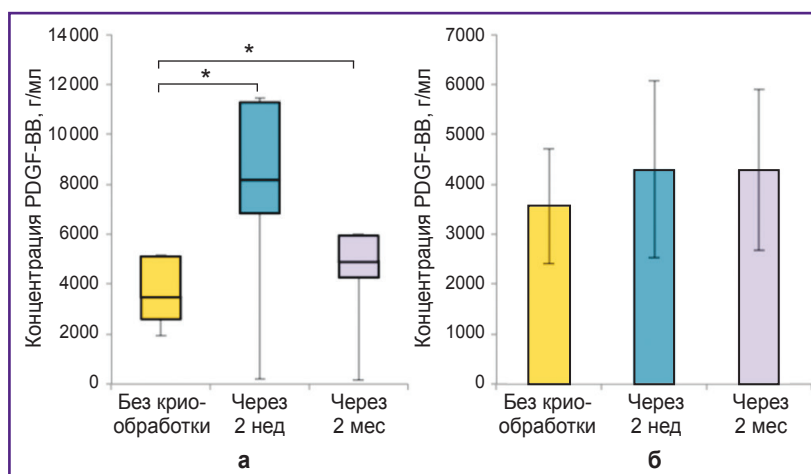


Рис. 6. Зависимость концентрации фактора роста PDGF-AA от срока заморозки: а — неактивированная L-PRP; б — активированная L-PRP; * — $p < 0,05$

Рис. 7. Зависимость концентрации фактора роста PDGF-BB от срока заморозки:

а — неактивированная L-PRP, * — $p < 0,05$;
б — активированная L-PRP



Концентрация PDGF-BB в неактивированной L-PRP статистически значимо возрастает через 2 нед после заморозки, а через 2 мес уменьшается, оставаясь при этом выше исходного уровня ($p < 0,05$). Концентрация PDGF-BB в активированной плазме не меняется на всех сроках исследования ($p > 0,05$) (рис. 7).

Обсуждение

Альфа-гранулы тромбоцитов АОТ содержат огромное количество факторов роста, стимулирующих процессы естественной регенерации тканей. Установлено, что высвободившиеся после активации тромбоцитов проангиогенные факторы (VEGF, HGF, TGF- β 1, β FGF, PDGF-A, -B, и -C, ангиопоэтин и т.д.) индуцируют миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток, а также образование сосудов [26–28]. За счет широкого спектра действия факторов роста АОТ стимулируется репаративная регенерация и восстановление тканей [5, 13, 17].

Неоспоримым является необходимость стандартизации препаратов PRP начиная с их подготовки до клинического применения, а также возможность хранения данных препаратов, поскольку некоторые исследователи избегают замораживания/оттаивания, опасаясь потенциально вредных эффектов воздействия на функцию тромбоцитов и факторов роста [6].

Цель нашего исследования состояла в том, чтобы проверить, можно ли использовать препараты PRP после криоконсервации, на примере тромбоцитарного фактора роста (PDGF-AA и PDGF-BB). Оба фактора играют важную роль в активации миграции и пролиферации клеточных компонентов тканей [7]. Мы измерили уровень PDGF-AA и PDGF-BB в свежих препаратах и препаратах после криообработки (P-PRP и L-PRP) как в активированных, так и в неактивированных образцах. Проанализирован уровень PDGF-AA и PDGF-BB в каждой группе на предмет сравнения концентрации фактора роста.

Полученные нами данные показали повышенные уровни факторов PDGF-AA, PDGF-BB в L-PRP по срав-

нению с P-PRP как в изначальном концентрате, так и после активации и криоконсервации. Такие результаты подтверждают данные об искусственно спровоцированной полимеризации в P-PRP, приводящей к немедленному высвобождению факторов роста и их утилизации, что отсутствует в L-PRP [29]. Механизмы данного процесса до конца не изучены, однако существует предположение [30], что в результате истощения характерных структурных единиц цельной крови происходит дисрегуляция взаимоотношения активирующих, ингибирующих и других регулирующих факторов, влияющих на действие факторов роста. Следовательно, технология изготовления P-PRP подразумевает отсутствие или минимальное количество лейкоцитарных элементов, которые, вероятно, продолжают играть ключевую роль в регулировании процесса высвобождения факторов роста вне кровяного русла. Дальнейшее изучение особенностей L-PRP является необходимым этапом усовершенствования методики.

С целью определения длительности активности факторов роста во фракциях L-PRP и P-PRP проведена криопрезервация. Результаты показали, что по сравнению с P-PRP L-PRP достоверно дольше сохраняет активность факторов роста (PDGF-AA) вне зависимости от активации. Однако выявлена важная закономерность в активности факторов роста в P-PRP. При криообработке их активность возрастает ко 2 нед, что свидетельствует о торможении процессов спонтанной активации на фоне низких температур. Такая же тенденция прослеживается и в препаратах L-PRP.

Установленное нами определенное сохранение активности криообработанной плазмы потенциально связано с частичным разрушением тромбоцитов после криоконсервации и дополнительным высвобождением факторов роста. Дальнейшее изучение процессов, рассмотренных в данной статье, должно включать определение конкретных популяций лейкоцитов. Более того, необходимо определить спектр других клеток в препаратах PRP, таких как циркулирующие стволовые клетки, которые могут играть ключевую роль в активности фракций. Углубленное

изучение клеточно-белкового состава фракций PRP, вероятно, приведет к новым классификациям и более точному клиническому применению. Унификация процессов получения различных фракций PRP является необходимым этапом для дальнейших клинических исследований.

Заключение

Препараты L-PRP в значительной степени превосходят препараты P-PRP: во-первых, концентрация тромбоцитов в них значительно выше, во-вторых, концентрация факторов роста PDGF-AA и PDGF-BB статистически значимо выше.

Содержание факторов роста PDGF-AA и PDGF-BB увеличивается при криообработке неактивированных фракций аутоплазмы. Таким образом, процесс криообработки неактивированной аутоплазмы может быть с успехом применен для сохранения и последующего более эффективного применения плазмоконцентрата.

Результаты исследования подтверждают наличие как теоретических, так и прикладных оснований для применения L-PRP в клинической практике. Тем не менее нельзя исключить и возможность применения аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, в других модификациях. Выбор препаратов аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, осуществляет практикующий врач в зависимости от поставленных целей и задач, решаемых при использовании данной методики.

Необходимо проведение дальнейших исследований с целью выработки унифицированного метода получения препаратов аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, — при условии, что количество факторов роста в ней должно соответствовать выработанным стандартам и быть эффективным в регенеративных и репаративных процессах в организме человека.

Финансирование исследования. Исследование не финансировалось какими-либо источниками.

Конфликт интересов. Конфликты интересов, связанные с данным исследованием, отсутствуют.

Литература/References

1. Brown S.A., Levi B., Lequex C., Wong V.W., Mojallal A., Longaker M.T. Basic science review on adipose tissue for clinicians. *Plast Reconstr Surg* 2010; 126(6): 1936–1946, <https://doi.org/10.1097/prs.0b013e3181f44790>.
2. Turner A., Abu-Ghname A., Davis M.J., Winocour S.J., Hanson S.E., Chu C.K. Fat grafting in breast reconstruction. *Semin Plast Surg* 2020; 34(1): 17–23, <https://doi.org/10.1055/s-0039-1700959>.
3. Rigotti G., Marchi A., Galìè M., Baroni G., Benati D., Krampera M., Pasini A., Sbarbati A. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast Reconstr Surg* 2007; 119(5): 1409–1422, <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000256047.47909.71>.

4. Locke M.B., de Chalain T.M. Current practice in autologous fat transplantation: suggested clinical guidelines based on a review of recent literature. *Ann Plast Surg* 2008; 60(1): 98–102, <https://doi.org/10.1097/spa.0b013e318038f74c>.
5. Fernandes G., Yang S. Application of platelet-rich plasma with stem cells in bone and periodontal tissue engineering. *Bone Res* 2016; 4: 16036, <https://doi.org/10.1038/boneres.2016.36>.
6. Kon E., Filardo G., Di Matteo B., Marcacci M. PRP for the treatment of cartilage pathology. *Open Orthop J* 2013; 7: 120–128, <https://doi.org/10.2174/1874325001307010120>.
7. Gonsior A. Technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate: background and process. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2002; 22(6): 547–557.
8. Marx R.E., Carlson E.R., Eichstaedt R.M., Schimmele S.R., Strauss J.E., Georgeff K.R. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85(6): 638–646, [https://doi.org/10.1016/s1079-2104\(98\)90029-4](https://doi.org/10.1016/s1079-2104(98)90029-4).
9. Marx R.E. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent* 2001; 10(4): 225–228, <https://doi.org/10.1097/00008505-200110000-00002>.
10. Jain N.K., Gulati M. Platelet-rich plasma: a healing virtuoso. *Blood Res* 2016; 51(1): 3–5, <https://doi.org/10.5045/br.2016.51.1.3>.
11. Marx R.E. In situ tissue engineering bone regeneration in jaw reconstruction. *Transl Regen Med* 2015; 31: 437–447, <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-410396-2.00031-1>.
12. Kevy S.V., Jacobson V.S. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. *J Extra Corp Technol* 2004; 36(1): 28–35.
13. Alves R., Grimalt R. A review of platelet-rich plasma: history, biology, mechanism of action, and classification. *Skin Appendage Disord* 2018; 4(1): 18–24, <https://doi.org/10.1159/000477353>.
14. Eppley B.L., Woodell J.E., Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2004; 114(6): 1502–1508, <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000138251.07040.51>.
15. Weibrich G., Kleis W.K., Kunz-Kostomanolakis M., Loos A.H., Wagner W. Correlation of platelet concentration in platelet-rich plasma to the extraction method, age, sex, and platelet count of the donor. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001; 16(5): 693–699.
16. Issa J.P.M., Tiossi R., da Silva Mello A.S., Lopes R.A., Di Matteo M.A.S., Iyomasa M.M. PRP: a possibility in regenerative therapy. *Int J Morphol* 2007; 25(3): 587–590, <https://doi.org/10.4067/s0717-95022007000300019>.
17. Sarban S., Tabur H., Baba F., İşikan U.E. The positive impact of platelet-derived growth factor on the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *Eklemler Hastalıkları Cerrahisi* 2018; 30(2): 91–96, <https://doi.org/10.5606/ehc.2019.64018>.
18. Samadi P., Sheykhhasan M., Khoshinani H.M. The use of platelet-rich plasma in aesthetic and regenerative medicine: a comprehensive review. *Aesthetic Plast Surg* 2019; 43(3): 803–814, <https://doi.org/10.1007/s00266-018-1293-9>.
19. Masuki H., Okudera T., Watanebe T., Suzuki M., Nishiyama K., Okudera H., Nakata K., Uematsu K., Su C.Y., Kawase T. Growth factor and pro-inflammatory cytokine

contents in platelet-rich plasma (PRP), plasma rich in growth factors (PRGF), advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), and concentrated growth factors (CGF). *Int J Implant Dent* 2016; 2(1): 19, <https://doi.org/10.1186/s40729-016-0052-4>.

20. Mazzocca A.D., McCarthy M.B.R., Chowanec D.M., Cote M.P., Romeo A.A., Bradley J.P., Arciero R.A., Beitzel K. Platelet-rich plasma differs according to preparation method and human variability. *J Bone Joint Surg Am* 2012; 94(4): 308–316, <https://doi.org/10.2106/jbjs.k.00430>.

21. Ehrenfest D.M., Bielecki T., Mishra A., Borzini P., Inchingolo F., Sammartino G., Rasmusson L., Everts P.A. In search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes. *Curr Pharm Biotechnol* 2012; 13(7): 1131–1137, <https://doi.org/10.2174/138920112800624328>.

22. Зорина А.И., Зорин В.Л., Черкасов В.Р. PRP в эстетической медицине. *Экспериментальная и клиническая дерматокосметология* 2013; 6: 10–21.

Zorina A.I., Zorin V.L., Cherkasov V.R. PRP in aesthetic medicine. *Eksperimental'naya i klinicheskaya dermatokosmetologiya* 2013; 6: 10–21.

23. Mishra A., Pavelko T. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. *Am J Sports Med* 2006; 34(11): 1774–1778, <https://doi.org/10.1177/0363546506288850>.

24. Wasterlain A.S., Braun H.J., Dragoo J.L. Contents and formulations of platelet-rich plasma. *Oper Tech Orthop* 2012; 22(1): 33–42, <https://doi.org/10.1053/j.oto.2011.11.001>.

25. Старцева О.И., Мельников Д.В., Захаренко А.С., Кириллова К.А., Пищикова Е.Д., Епифанова М.В., Сафронов В.В., Истранов А.Л. Способ аугментационной маммопластики. Патент РФ 2675019. 2018.

Startseva O.I., Melnikov D.V., Zakharenko A.S., Kirillova K.A., Pishchikova E.D., Epifanova M.V., Safronov V.V., Istranov A.L. *Method of augmentation mammoplasty*. Patent RU 2675019. 2018.

26. Andia I., Sánchez M., Maffulli N. Joint pathology and platelet-rich plasma therapies. *Expert Opin Biol Ther* 2012; 12(1): 7–22, <https://doi.org/10.1517/14712598.2012.632765>.

27. Eppley B., Pietrzak W.S., Blanton M. Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg* 2006; 118(6): 147e–159e, <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000239606.92676.cf>.

28. Kazakos K., Lyras D.N., Verettas D., Tilkeridis K., Tryfonidis M. The use of autologous PRP gel as an aid in the management of acute trauma wounds. *Injury* 2009; 40(8): 801–805, <https://doi.org/10.1016/j.injury.2008.05.002>.

29. Dohan D.M., Choukroun J., Diss A., Dohan S.L., Dohan A.J., Mouhyi J., Gogly B. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 101(3): e45–e50, <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.009>.

30. Agrawal A.A. Evolution, current status and advances in application of platelet concentrate in periodontics and implantology. *World J Clin Cases* 2017; 5(5): 159–171, <https://dx.doi.org/10.12998/wjcc.v5.i5.159>.