

©Borgis

\*Lena Bielawska<sup>1</sup>, Przemysław Kopczyński<sup>2</sup>, Paulina Szubińska<sup>3</sup>, Aleksandra Baszczuk<sup>1</sup>, Zygmunt Kopczyński<sup>1</sup>

## Ocena dynamiki uwalniania czynnika wzrostu śródbłonka naczyń (VEGF) przez zaktywowane *in vitro* płytki krwi w osoczu bogatopłytkowym

### Evaluation of release rate of vascular endothelial growth factor (VEGF) by activated *in vitro* platelets in platelet-rich plasma

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań  
Kierownik Katedry: prof. dr hab. med. Zygmunt Kopczyński

<sup>2</sup>Pracownia Miniimplantów Ortodontycznych, Katedra i Klinika Ortopedii Szczękowej i Ortodoncji,  
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań  
Kierownik Pracowni: dr med. Przemysław Kopczyński

<sup>3</sup>Szpital Kliniczny Przemienienia Pańskiego, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań  
Dyrektor Szpitala: lek. med. Jan Talaga

#### Słowa kluczowe

osocze bogatopłytkowe, czynniki wzrostowe, czynnik wzrostu śródbłonka naczyń, płytki krwi

#### Key words

platelet-rich plasma, growth factors, vascular endothelial growth factor, blood platelets

#### Streszczenie

**Wstęp.** Osocze bogatopłytkowe to autogeny koncentrat płytek krwi wykorzystywany coraz szerzej w medycynie regeneracyjnej. Płytki krwi stanowią bogate źródło czynników wzrostu, które po uwolnieniu w obszarze uszkodzonej tkanki stymulują procesy gojenia i regeneracji.

**Cel pracy.** Celem pracy była ocena dynamiki uwalniania czynnika wzrostu śródbłonka naczyń przez zaktywowane *in vitro* płytki krwi w osoczu bogatopłytkowym.

**Materiał i metody.** Materiał badany stanowiło 15 koncentratów krwinek płytkowych pozyskanych od zdrowych dawców. Stężenie VEGF oznaczono metodą immunoenzymatyczną ELISA za pomocą testu Human VEGF ELISA EIA-4820 firmy DRG Medtek. Oznaczenie wykonano w KKP przed aktywacją płytek krwi oraz w trzech punktach czasowych po dodaniu mieszaniny aktywującej, tj.  $t_1$  – po 6 minutach,  $t_2$  – po 10 minutach,  $t_3$  – po 30 minutach od aktywacji płytek krwi.

**Wyniki.** W większości badanych preparatów zaobserwowano znaczny wzrost stężenia czynnika wzrostu śródbłonka naczyń po 6 minutach od aktywacji płytek, po czym w dalszych odstępach czasu (po 10 i 30 minutach od aktywacji płytek krwi) jego stężenie ulegało obniżeniu. Liniowy wzrost stężenia VEGF zaobserwowano jedynie w dwóch preparatach KKP. Wykazano znamiennej statystycznie różnicę między stężeniem VEGF przed aktywacją i po aktywacji płytek krwi *in vitro*. Nie obserwowano natomiast znamiennej statystycznej pomiędzy wartościami uwolnionego VEGF z trombocytów po 6, 10 i 30 minutach od ich aktywacji.

**Wnioski.** Dynamika uwalniania czynnika wzrostu śródbłonka naczyń przez zaktywowane *in vitro* płytki krwi jest zróżnicowana i wymaga dalszych badań naukowych.

#### Summary

**Introduction.** Platelet-rich plasma is an autologous concentration of blood platelets, which is increasingly used in regenerative medicine. Platelets are rich source of growth factors, that stimulate healing and tissue regeneration when applied in damaged tissue area.

**Aim.** The aim of the study was evaluation of release rate of vascular endothelial growth factor (VEGF) by activated *in vitro* platelets in platelet-rich plasma.

**Material and methods.** In this case study, 15 concentrates of platelets acquired from healthy donors were used. VEGF was quantified by an immunoenzymatic assay – Human VEGF ELISA EIA-4820 kit by DRG Medtek was used for this purpose.

The assay was performed before activation of platelets and in 3 timestamps after adding activation mixture:  $t_1$  – 6 minutes from activation,  $t_2$  – 10 minutes from activation,  $t_3$  – 30 min after activation.

#### Adres/address:

\*Lena Bielawska  
Katedra i Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej  
Uniwersytet Medyczny  
im. Karola Marcinkowskiego  
ul. Szamarzewskiego 82/84, 60-569 Poznań  
tel. +48 (61) 854-90-42  
lenakesy@wp.pl

**Results.** In most cases, huge increase in vascular endothelial growth factor was present after 6 minutes from platelets activation. In next timestamps (10 and 30 min from activation) the vascular endothelial growth factor concentration has decreased. The linear VEGF growth was observed in just 2 concentrates. A significant difference between VEGF concentration before and after activation of platelets *in vitro* was shown. On the other hand, no significant difference between VEGF concentration after 6, 10 and 30 min from activation was observed.

**Conclusions.** Release rate of vascular endothelial growth factor (VEGF) by activated *in vitro* platelets is diverse and requires further studies.

## WSTĘP

Osocze bogatopłytkowe (ang. *platelet-rich plasma* – PRP) jest to autogeny koncentrat płytek krwi zawieszonych w małej objętości osocza, który otrzymuje się w procesie wirowania świeżej krwi pełnej pobranej od pacjenta tuż przed zabiegiem. Stosowanie PRP jest stosunkowo tanie, bezpieczne dla pacjenta, proste w wykonaniu i, jak podaje wiele źródeł literaturowych, przynosi pozytywne rezultaty klinicznie (1-4). Mimo tych zalet wciąż brakuje odpowiedzi na istotne dla klinicysty pytania. Do tej pory nie ustalono bowiem, ile dokładnie trombocytów powinno zawierać PRP dla uzyskania najlepszych efektów klinicznych, jakie powinny być stężenia czynników wzrostu (ang. *growth factors* – GF), jaka metoda otrzymywania PRP jest najlepsza oraz jaki stosować sposób aktywacji płytek. Nie zbadano definitywnie, czy lepiej stosować PRP bogato- czy ubogoleukocytarne. Nadal nie wiadomo także, czy można przewidzieć efekt kliniczny po zastosowaniu preparatu o określonym składzie. Dla uzyskania odpowiedzi na te pytania konieczne jest przeprowadzenie licznych badań laboratoryjnych i klinicznych, których wyniki stanowiłyby źródło wielu cennych informacji pozwalających na zoptymalizowanie stosowania PRP w różnych dziedzinach medycyny.

W ostatnich latach PRP znalazło szerokie zastosowanie w medycynie regeneracyjnej jako preparat przyspieszający gojenie się ran. Na szczególną uwagę zasługuje wykorzystywanie PRP w chirurgii szczękowo-twarzowej (5). Wzmocnienie regeneracji tkanki kostnej w przypadku stosowania technik zabiegowych w połączeniu z PRP było przyczyną większego zainteresowania specjalistów z innych dziedzin medycyny, m.in. chirurgii ortopedycznej i traumatologii (2). Coraz częściej PRP wykorzystuje się także w medycynie sportowej. Kurację z zastosowaniem osocza bogatopłytkowego stosuje się już jako zamiennik inwazyjnych operacji (4). Obiecujące wyniki badań przyczyniły się do zastosowania PRP również w leczeniu ran przewlekłych, m.in. u pacjentów z objawami stopy cukrzycowej (6-8). Dodatkowym atutem tych preparatów jest działanie antibakteryjne oraz przeciwgrzybicze, które zostało wykazane w badaniach klinicznych (9, 10).

Znaczne zainteresowanie klinicystów PRP wynika z jego dużego potencjału regeneracyjnego. Płytki krwi stanowią źródło wielu czynników wzrostu, których działanie w obszarze uszkodzonej tkanki przyspiesza procesy gojenia i regeneracji. Do czynników wzrostu

wydzielanych przez trombocyty zalicza się głównie: płytkopochodny czynnik wzrostu (ang. *platelet derived growth factor* – PDGF), transformujący czynnik wzrostu (ang. *transforming growth factor* – TGF), nabłonkowy czynnik wzrostu (ang. *epidermal growth factor* – EGF) oraz czynnik wzrostu śródbłonka naczyń (ang. *vaso-endothelial growth factor* – VEGF) (1, 11-13). Zaktywowane osocze bogatopłytkowe przypomina skrzep występujący w fizjologicznie gojącej się ranie; różni się od niego jedynie znacznie większą liczbą płytek krwi, a w związku z tym większą ilością wydzielanych do otoczenia czynników wzrostu. Trombocyty izoluje się z krwi własnej pacjenta, co wyklucza wzbudzenie reakcji immunologicznej, a także minimalizuje ryzyko zakażenia wirusowego czy bakteryjnego. Bezpieczeństwo stosowania PRP zostało wykazane w oparciu o długoterminowe badania kliniczne na tysiącach pacjentów (1, 3, 11, 12, 14, 15).

W badaniach własnych w osoczu bogatopłytkowym oznaczano stężenie uwolnionego z płytek krwi czynnika wzrostu śródbłonka naczyń (VEGF). Przyjmuje się, że VEGF odgrywa kluczową rolę na etapie inicjacji tworzenia nowych naczyń krwionośnych. Począwszy od rozwoju embrionalnego jest jednym z głównych czynników wzrostu i proliferacji komórek śródbłonka naczyniowego. VEGF bierze również czynny udział w procesach reorganizacji macierzy zewnątrzkomórkowej poprzez indukcję ekspresji aktywatorów plazminogenu i ich inhibitorów oraz metaloproteinaz. Zwraca się także uwagę na ochronną rolę tego czynnika wzrostu poprzez pobudzanie szlaków antyapoptotycznych. Dzięki działaniu VEGF możliwe jest utrzymanie prawidłowej struktury naczyń krwionośnych (16-18). Przeprowadzone w ostatnich latach badania uwzględniają także inne niż proangiogenność funkcje VEGF. Przedstawiają rolę tego czynnika w procesach neurogenezy i neuroprotekcji zarówno w ośrodkowym, jak i obwodowym układzie nerwowym. Wykazano, iż VEGF m.in. stymuluje wzrost i przeżywalność komórek Schwanna narażonych na hipoksję oraz zwiększa proliferację i migrację astrocytów. Stymuluje także śródbłonek do uwalniania substancji neurotroficznych (19). Za pomocą technik biologii molekularnej udowodniono, że trombocyty wykazują ekspresję mRNA VEGF121 i VEGF165. Przeprowadzone dotychczas badania naukowe wykazały, że VEGF uwalnia się z płytek krwi w czasie tworzenia skrzepu (20).

## CEL PRACY

Głównym celem przeprowadzonych badań była ocena dynamiki uwalniania VEGF przez trombocyty w osoczu bogatopłytkowym po 6, 10 i 30 minutach od chwili ich aktywacji *in vitro*.

## MATERIAŁ I METODY

Materiał badany stanowiło 15 koncentratów krwinek płytkowych (KKP) uzyskanych z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa (RCKiK) w Poznaniu. Krew do otrzymania KKP pobierano zgodnie z wymogami RCKiK od osób zdrowych, obojga płci, w wieku od 18 do 65 lat. Liczba płytek krwi dawców, jak i inne parametry hematologiczne mieściły się w zakresie wartości referencyjnych.

KKP otrzymywano metodą manualną z wykorzystaniem techniki podwójnego wirowania. Tego samego dnia preparaty były dostarczane do Laboratorium nr 2 Szpitala Klinicznego Przemienienia Pańskiego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, gdzie poddawano je obróbce analitycznej. Każdy z KKP rozdzielano na mniejsze porcje, a następnie aktywowano płytki krwi przy użyciu mieszaniny trombiny bydlęcej i chlorku wapnia w stosunku objętościowym 1:1. Po aktywacji materiał wirowano przy 4000 rpm w czasie 6 minut, a następnie zbierano nadsącz i zamrażano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ . Schemat postępowania podczas obróbki analitycznej KKP przedstawiono na rycinie 1.

Liczbę płytek krwi oraz liczbę leukocytów we krwi obwodowej dawców i w KKP oznaczono w RCKiK w Poznaniu metodą cytometrii przepływowej. Stężenie VEGF oznaczono w Katedrze i Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu metodą immunoenzym-

atyczną ELISA za pomocą testu Human VEGF ELISA EIA-4820 firmy DRG Medtek. Oznaczenie wykonano w KKP przed aktywacją płytek krwi oraz w trzech punktach czasowych po dodaniu mieszaniny aktywującej, tj.  $t_1$  – po 6 minutach,  $t_2$  – po 10 minutach,  $t_3$  – po 30 minutach od aktywacji płytek krwi.

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono przy użyciu programu komputerowego STATISTICA 10 (StatSoft, Polska). Wszystkie hipotezy statystyczne przyjmowano na poziomie istotności statystycznej  $\alpha = 0,05$ .

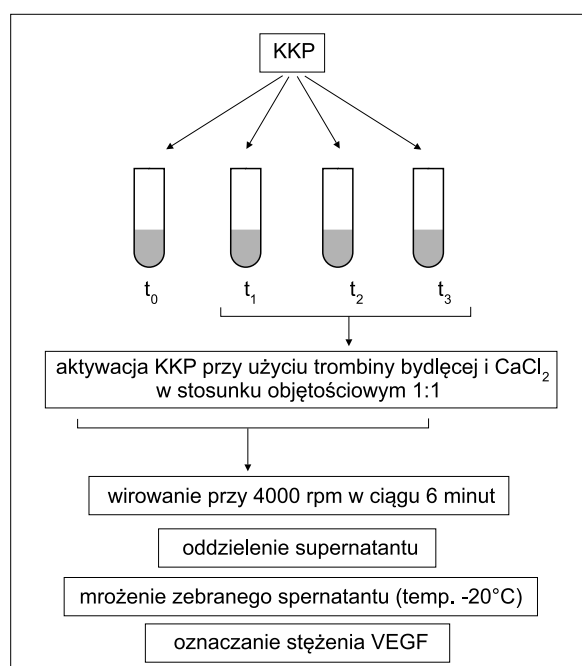
## WYNIKI

Średnia liczba trombocytów we krwi obwodowej dawców ( $n = 15$ ) wynosiła  $259,13 \pm 29,79 \times 10^9/l$ , natomiast w koncentracie krwinek płytkowych ( $n = 15$ )  $953,13 \pm 353,67 \times 10^9/l$  i różnica ta wykazuje cechy znamienności statystycznej. Różnicę statystycznie istotną wykazano też pomiędzy liczbą leukocytów we krwi obwodowej i w KKP. Średnia liczba leukocytów we krwi obwodowej dawców ( $n = 15$ ) wynosiła  $6,77 \pm 1,05 \times 10^9/l$ , natomiast w preparacie KKP ( $n = 15$ )  $0,71 \pm 0,72 \times 10^9/l$ , co stanowiło 10,5% ich pierwotnej liczby. W tabeli 1 przedstawiono średnie wartości liczby płytek krwi i leukocytów we krwi obwodowej dawców i w KKP.

**Tabela 1.** Średnia liczba płytek krwi i leukocytów we krwi obwodowej i w KKP.

Cecha badana	Krew obwodowa (n = 15)	Koncentrat krwinek płytkowych (n = 15)
Płytki krwi ( $10^9/l$ )		
Średnia $\pm$ SD	$259,13 \pm 29,79$	$953,13^* \pm 353,67$
Mediana	243,00	828,00
$X_{\min}-X_{\max}$	225,00-311,00	502,00-1870,00
Leukocyty ( $10^9/l$ )		
Średnia $\pm$ SD	$6,77 \pm 1,05$	$0,71^* \pm 0,72$
Mediana	6,80	0,50
$X_{\min}-X_{\max}$	5,20-9,30	0,20-3,10

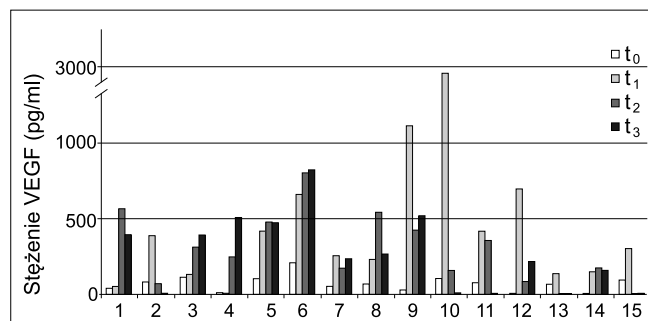
\*Różnice statystycznie istotne w porównaniu z wartościami we krwi obwodowej ( $p < 0,05$ )



**Ryc. 1.** Schemat obróbki analitycznej koncentratu krwinek płytkowych.

Analiza uzyskanych wyników stężeń VEGF po 6, 10 i 30 minutach po aktywacji KKP wykazała, że dynamika uwalniania tego czynnika wzrostu ze zaktywowanych płytek krwi jest zróżnicowana. Średnie stężenie VEGF w KKP ( $n = 15$ ) niepoddanych aktywacji wynosiło  $72,85 \pm 52,48$  pg/ml. Po 6 minutach od aktywacji płytek krwi *in vitro* średnie stężenie uwolnionego VEGF wzrosło ponad 7-krotnie i wynosiło  $542,08 \pm 720,49$  pg/ml. Niższe wartości uzyskano po 10 i 30 min od aktywacji, które wynosiły odpowiednio  $259,15 \pm 232,72$  pg/ml oraz  $269,15 \pm 246,10$  pg/ml (tab. 2). Analiza statystyczna wykazała znamienne różnice pomiędzy stężeniem VEGF w KKP przed aktywacją płytek oraz po 6, 10 i 30 min od chwili ich aktywacji. Nie wykazano natomiast znamienności statystycznej pomiędzy wartościami uwolnionego VEGF z płytek krwi po 6, 10 i 30 minutach od aktywacji. Dalsza analiza wyników wykazała, że w 8 preparatach maksymalne stężenie uwolnionego VEGF przypadało po 6 minucie ( $t_1$ ) od

aktywacji płytek krwi, a w 4 preparatach po 10 minutach ( $t_2$ ). Liniowy wzrost stężenia VEGF zaobserwowano jedynie w 2 preparatach KKP. Rycina 2 stanowi graficzne przedstawienie stężenia VEGF przed aktywacją i po aktywacji płytek krwi w 15 preparatach KKP.



**Ryc. 2.** Graficzne przedstawienie stężenia VEGF przed aktywacją i po aktywacji płytek krwi w 15 preparatach KKP. 1-15 – nr preparatu;  $t_0$  – stężenie VEGF przed aktywacją płytek krwi;  $t_1$  – 6 min po aktywacji;  $t_2$  – 10 min po aktywacji;  $t_3$  – 30 min po aktywacji

## DYSKUSJA

Brak potencjału autoregeneracyjnego organizmu ludzkiego stanowi dla medycyny eksperymentalnej bodziec do poszukiwania innowacyjnych metod poszerzających możliwości regeneracji uszkodzonych tkanek. Liczne badania wskazują, iż bogatym źródłem czynników wzrostu biorących udział w gojeniu się ran jest osocze bogatopłytkowe. Jak wykazano w części wstępnej pracy w literaturze znaleźć można wiele przykładów doświadczeń klinicznych potwierdzających terapeutyczne działanie PRP wspomagające procesy regeneracyjne organizmu (3).

Jedną z nierozstrzygniętych jak dotąd kwestii jest liczba płytek krwi, jaka powinna być zawarta w PRP, aby zastosowanie preparatu przyniosło maksymalny efekt kliniczny. Według Marxa i wsp. liczba 1 mln płytek krwi w 1  $\mu$ l PRP zapewnia skuteczność terapeutyczną przeprowadzanych z jego użyciem zabiegów (12). Z kolei Anitua i wsp. podają, że wystarczająca jest liczba trombocytów przekraczająca 300 tysięcy w 1  $\mu$ l (21). Jungbluth i wsp. proponują użycie 3-5-krotnej koncentracji płytek krwi względem krwi obwodowej, natomiast Cho i wsp. zasugerowali stosowanie osocza bogatopłytkowego zagęszczonego 3-7-krotnie (2, 22). W badaniach własnych średnia liczba płytek krwi w KKP wynosiła  $953,13 \pm 353,67 \times 10^9/l$ . Uzyskano tym samym 3,7-krotną koncentrację trombocytów względem krwi pełnej dawców, u których liczba płytek we krwi obwodowej mieściła się w granicach wartości refe-

rencyjnych. Można zatem stwierdzić, że wykorzystane w badaniach własnych preparaty spełniały kryteria sugerowane przez wymienionych wyżej autorów. Przeprowadzona analiza statystyczna potwierdziła istnienie różnicy znamiennej statystycznie pomiędzy liczbą trombocytów we krwi obwodowej i w KKP.

Natomiast liczba leukocytów w KKP uległa znacznemu, niemal 10-krotnemu zmniejszeniu w porównaniu z liczbą tych komórek we krwi obwodowej. Opinie badaczy na temat funkcji WBC zawartych w PRP nadal są podzielone. Zwraca się szczególnie uwagę na udział leukocytów w procesach zapalnych, a także na ich aktywność antybakteryjną (2, 23). Weibrich i wsp. zaznaczają jednak, że leukocyty zdolne są do wydzielania pewnych ilości GF, stąd nawet niewielka ich liczba może zmienić ostateczny skład otrzymywanego preparatu (24). Dragoo i wsp. przeprowadzili badania na modelu zwierzęcym, których celem było m.in. porównanie działania PRP z dużą zawartością leukocytów i pozbawionego tych komórek stosowanego w formie iniekcji do ścięgien. Po 5 dniach od podania preparatów zaobserwowano znacznie większą ostrą odpowiedź zapalną w przypadku PRP bogatoleukocytarnego. Natomiast po 14 dniach stan zapalny był w obu grupach porównywalny (25).

Z danych zawartych w piśmiennictwie wynika, że średnie wartości stężenia VEGF we krwi osób zdrowych mieszczą się w granicach 15-90 pg/ml (26-29). W badaniach własnych stężenie VEGF w 5 preparatach niepoddanych aktywacji było wyższe niż 105 pg/ml. Z uwagi na brak wyznaczonych wartości referencyjnych stężenia VEGF w osoczu nie można jednoznacznie ocenić uzyskanych wyników. Dawcy zgłaszający się do Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa to osoby potencjalnie zdrowe. Należy jednak zauważyć, że istnieje wiele przyczyn podwyższonego stężenia VEGF we krwi. Niedotlenienie jest uważane za najsilniejszy bodziec stymulujący syntezę VEGF. Wykazano również, że podczas odpowiedzi zapalnej stężenie VEGF ulega szybkiemu wzrostowi, nieadekwatnemu z nasileniem zjawiska hipoksji. Poza tym na jego uwalnianie wpływają też cytokiny prozapalne czy hormony. Wykazano, że estrogeny mogą być przyczyną zarówno zmniejszenia, jak i zwiększenia transkrypcji genu dla VEGF (30). Istnieje hipoteza, że istotne w syntezie GF mogą być również inne, nieznane dotąd substancje biologicznie czynne (31). Z danych literaturowych wynika, że nie tylko trombocyty są zdolne do uwalniania VEGF, ale także neutrofile, bazofile, eozynofile, komórki śródbłonna, nabłonek dróg oddechowych, fibroblasty, limfocyty T, monocyty,

**Tabela 2.** Stężenie VEGF przed aktywacją i po aktywacji płytek krwi.

Cecha badana	$t_0$ – przed aktywacją	$t_1$ – 6 min po aktywacji	$t_2$ – 10 min po aktywacji	$t_3$ – 30 min po aktywacji
Stężenie VEGF (pg/ml)				
Średnia $\pm$ SD	72,85 $\pm$ 52,48	539,88* $\pm$ 713,11	259,30* $\pm$ 232,72	269,15* $\pm$ 246,10
Mediana	68,08	304,44	247,73	238,27
$X_{min}-X_{max}$	9,00-211,13	9,00-2767,00	9,00-801,27	9,00-820,50

\*Różnice statystycznie istotne w porównaniu z wartościami VEGF w preparacie przed aktywacją płytek krwi ( $p < 0,05$ )

keratynocyty, komórki dendrytyczne czy też komórki nowotworowe (32). Powyższe informacje dowodzą dużej zmienności osobniczej w produkcji i przechwytywaniu cytokin komórkowych. Należy zatem przyjąć, że efekt terapeutyczny u każdego pacjenta zostanie osiągnięty, stosując odmienny, indywidualnie dobrany preparat bogatopłytkowy (33, 34).

Przedmiotem przeprowadzonych badań własnych było oznaczenie stężenia VEGF w preparatach bogatopłytkowych przed aktywacją i po aktywacji płytek krwi *in vitro*. W dostępnych pracach badawczych oznaczenie stężenia VEGF przed aktywacją i po aktywacji płytek krwi *in vitro* występuje stosunkowo rzadko. W badaniach własnych wykazano istotnie statystyczną różnicę pomiędzy stężeniem tego czynnika wzrostu w preparacie przed aktywacją i po aktywacji płytek krwi.

Zasadniczym celem niniejszej pracy była ocena dynamiki uwalniania VEGF po aktywacji płytek krwi *in vitro*. W piśmiennictwie brakuje danych literaturowych dotyczących dynamiki uwalniania VEGF w czasie do 30 min od dodania mieszaniny aktywującej. W badaniach własnych zaobserwowano, że już po 6 minutach od aktywacji trombocytów następuje istotny statystycznie wzrost stężenia VEGF. W ponad 50% próbek maksymalne stężenie uwolnionego czynnika wzrostu zaobserwowano po 6 minutach od aktywacji płytek, a w kolejnych czterech preparatach po 10 minutach. Liniowy wzrost stężenia VEGF zaobserwowano jedynie w dwóch preparatach. W przypadku pozostałych prób stężenie VEGF z upływem czasu ulegało obniżeniu. Świadczy to o zróżnicowanym tempie degranulacji płytek krwi i uwalnianiu VEGF. Zrozumiałe są zatem zalecenia praktyków o konieczności stosowania PRP w jak najkrótszym czasie od jego aktywacji (12).

Dokonano próby interpretacji zaobserwowanych zmian uwalniania czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego, co przy małej liczbie prób nie jest łatwe. Z pewnością należy zwrócić uwagę na zmienność biologiczną stężenia VEGF we krwi dawców. Można też przypuszczać, że przyczyną zmniejszania się stężenia VEGF uwolnionego z płytek krwi może być wiązanie się cząsteczek tego czynnika wzrostu z obecnymi w osoczu wolnymi receptorami. W ostatnich latach przedmiotem badań naukowców stały się rozpuszczalne postaci receptorów VEGF-R1 oraz VEGF-R2. Udowodniono, że połączenie cząsteczki VEGF z tego typu receptorem skutkuje niemal całkowitym (82%) zablokowaniem pro-

liferacji i migracji komórek śródbłonka, a także spadkiem stężenia wolnego VEGF w osoczu (26, 32, 35). W badaniach własnych nie dysponowano informacją na temat wyjściowej zawartości rozpuszczalnych form receptorów we krwi dawców. Można jedynie przypuszczać, że uwolnione w procesie aktywacji cząsteczki VEGF zostały przez te receptory związane. Jednak dla potwierdzenia takiej hipotezy konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań naukowych.

Potencjał regeneracyjny preparatu niewątpliwie zależy od stężenia GF. Informacja o nich wydaje się być zatem niezbędna dla zapewnienia użyteczności i powtarzalności stosowania osocza bogatopłytkowego podczas zabiegów klinicznych. Jak dotąd dla żadnego czynnika wzrostu nie ustalono progowej wartości terapeutycznej (23, 25). Nie poznano również mechanizmów działania wielu innych substancji wydzielanych z płytek pod wpływem ich aktywacji, które także mogą oddziaływać na komórki w obszarze uszkodzonej tkanki. Badania proteomiczne wykazują, że w trombocytach zawarty jest ponad 800 różnych białek. Uwzględniając posttranslacyjne modyfikacje liczba białkowych bioaktywnych cząsteczek mogących oddziaływać na komórki organizmu wynosi około 1500 (36, 37). Niezwykle ważne zatem wydaje się prowadzenie dalszych badań laboratoryjnych i klinicznych w tym kierunku.

## WNIOSKI

Dynamika uwalniania VEGF z trombocytów we krwi uzyskanej od różnych dawców jest zróżnicowana. W większości badanych preparatów zaobserwowano znaczny wzrost stężenia tego czynnika wzrostu po 6 minutach od aktywacji płytek, po czym w dalszych odstępach czasu (po 10 i 30 minutach od aktywacji płytek krwi) jego stężenie ulegało obniżeniu. Wykazano znamienne statystycznie różnicę między stężeniem VEGF przed aktywacją i po aktywacji płytek krwi *in vitro*. Nie obserwowano natomiast znamiennej statystycznej pomiędzy wartościami uwolnionego VEGF z trombocytów po 6, 10 i 30 minutach od ich aktywacji.

## PODZIĘKOWANIA

Autorzy składają podziękowania dla Dyrekcji i Pracowników Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Poznaniu za udostępnienie materiału do badań.

## PIŚMIENNICTWO

1. Czuryżkiewicz-Cyrana J, Sobczyńska-Jakubowska P, Dembowska E: Biological aspect of platelet-rich plasma concentrate application in healing soft and hard periodontal tissues – review of literature. *J Stoma* 2011; 64(12): 929-946.
2. Cho JM, Lee YH, Baek RM: Effect of platelet-rich plasma on ultraviolet b-induced skin wrinkles in nude mice. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2010; 64(1): e31-e39.
3. De Vos RJ, Weir A, van Schie HT et al.: Platelet-rich plasma injection for chronic Achilles tendinopathy: a randomized controlled trial. *JAMA* 2010; 303(3): 144-149.
4. Ficek K, Kamiński T, Wach E et al.: Application of Platelet Rich Plasma in Sports Medicine. *J Hum Kinet* 2011; 30: 85-97.
5. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM et al.: Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85: 638-646.
6. Anitua E, Andı J, Sánchez M: Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Ortop Res* 2005; 23: 281-286.
7. Nowak L, Olejek A: Biologiczno-molekularne aspekty leczenia ran pooperacyjnych. *Gin Prakt* 2004; 6: 26-30.

8. Pietrzykowska A: Osocze bogatopłytkowe – perspektywy klinicznego zastosowania w medycynie estetycznej. *AAAAM* 2010; 3: 16-24.
9. Bielecki TM, Gaździk TS, Arendt J et al.: Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances: an *in vitro* study. *J Bone Joint Surg Br* 2007; 89(3): 417-420.
10. Tang Y, Yeaman MR, Selsted ME: Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun* 2002; 70(12): 6524-6533.
11. Marx RE: Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent* 2001; 10: 225-228.
12. Marx RE: Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 62: 489-496.
13. Kęsy L, Kopczyński P, Baszczuk A et al.: Metody otrzymywania osocza bogatopłytkowego wykorzystywanego w medycynie regeneracyjnej jako preparat przyspieszający regenerację tkanek. *Pol Merk Lek* 2014; 36(214): 283-286.
14. Anitua E, Aguirre JJ, Algorta J et al.: Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers. *J Biomed Mater Res* 2008; 84B: 415-421.
15. Engebretsen L, Schamasch P: The use of platelet-rich plasma in sports medicine – the International Olympic Committee Opinion. *Oper Tech Orthop* 2011; 22(1): 43-48.
16. Barańska P, Jerczyńska H, Pawłowska Z: Czynniki wzrostu śródbłonka naczyń – budowa i funkcje. *Post Bioch* 2005; 53(1): 12-21.
17. Ferrara N: Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 1999; 77: 527-543.
18. Łojko A, Komarnicki M: Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu a angiogeneza w chorobach nowotworowych. *Współcz Onkol* 2004; 8(1): 1-4.
19. Namiecińska M, Marciniak K, Nowak JZ: VEGF jako czynnik angiogeny, neurotroficzny i neuroprotektoryjny. *Postepy Hig Med Dosw* 2005; 59: 573-583.
20. Webb NJ, Bottomley MJ, Watson CJ et al.: Vascular endothelial growth factor (VEGF) is released from platelets during blood clotting: implications for measurement of circulating VEGF levels in clinical disease. *Clin Sci (Lond)* 1998; 94(4): 395-404.
21. Anitua E, Andia I, Ardanza B et al.: Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2004; 91: 4-15.
22. Jungbult P, Wild M, Grassmann JP: Platelet Rich Plasma on calcium phosphate granules promotes metaphyseal bone healing in mini-pigs. *J Orthop Res* 2010; 28: 1448-1455.
23. Weibrich G, Kleis WK, Hafner G et al.: Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Craniomaxillofac Surg* 2002; 30: 97-102.
24. Weibrich G, Kleis WK, Hafner G: Growth factor levels in the platelet-rich plasma produced by different methods: Curasan-type PRP kit versus PCCS PRP system. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002; 17: 184-190.
25. Wasterlain AS, Braun HJ, Dragoo JL: Contents and formulations of platelet-rich plasma. *Oper Tech Orthop* 2012; 22: 33-42.
26. Thielemann A, Kopczyński Z: Ocena stężenia receptorów sVEGFR-1 i sVEGFR-2 w surowicy kobiet chorych na raka gruczołu piersiowego. *Nowotwory* 2009; 59(1): 23-24.
27. Litwiniuk M, Łojko A, Thielemann A et al.: Zależność stężenia naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) od wybranych parametrów histologicznych w niezaawansowanym raku piersi. *Współcz Onkol* 2007; 11(6): 300-304.
28. Thielemann A, Kopczyński Z, Grodecka-Gazdecka S et al.: Ocena stężenia naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) u chorych na raka gruczołu piersiowego. *Diag Lab* 2005; 41(2): 154-164.
29. Werther K, Christensen J, Nielsen HJ: Prognostic impact of matched preoperative plasma and serum VEGF in patients with primary colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 2002; 86: 417-423.
30. Kajdaniuk D, Marek B, Fołtyn W et al.: Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) w endokrynologii i onkologii. *Endokrynol Pol* 2011; 62(2): 14-22.
31. Wrotniak M, Bielecki T, Gaździk TS: Współczesne poglądy na temat wykorzystania żelu bogatopłytkowego w ortopedii i traumatologii. *Ortop Traumatol Rehabil* 2007; 3(6): 227-238.
32. Koczy-Baron E, Kasperska-Zajac A: Rola naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu w procesach zapalnych. *Postepy Hig Med Dosw* 2014; 68: 57-65.
33. Kon E, Filardo G, Di Martino A et al.: Platelet-rich plasma (PRP) to treat sport injuries: evidence to support in use. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2011; 19: 516-527.
34. Weibrich G, Hansen T, Kleis WK et al.: Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* 2004; 34: 665-671.
35. Thielemann A, Baszczuk A, Kopczyński Z et al.: Clinical usefulness of assessing VEGF and soluble receptors sVEGF-1 and sVEGF-2 in woman with breast cancer. *Ann Agric Environ Med* 2013; 20(2): 293-297.
36. Qureshi AH, Chaoji V, Manguel D et al.: Proteomic and phospho-proteomic profile of human platelets in basal, resting state: Insights into integrin signaling. *PLoS One* 2009; 4(10): e7627.
37. Senzel L, Gnatenko DV, Bahou WF: The platelet proteome. *Curr Opin Hematol* 2009; 16: 329-333.

otrzymano/received: 10.11.2014  
zaakceptowano/accepted: 04.12.2014