



## Optimalni protokol za pripremu plazme bogate trombocitima iz uzoraka goveđe krvi

Branislava Belić<sup>a\*</sup>, Marko R. Cincović<sup>a</sup>, Ivana Lakić<sup>a</sup>, Zorana Kovačević<sup>a</sup>,  
Nenad Stojanac<sup>a</sup>, Ognjen Stevančević<sup>a</sup>, Mira Majkić<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sad, Srbija

\*Autor za kontakt: [branislava.belic@polj.uns.ac.rs](mailto:branislava.belic@polj.uns.ac.rs)

### SAŽETAK

U trombocitu se nalaze brojne strukture koje sadrže glikogen, lizosome i faktorima rasta koji deluju hemoatraktno i aktiviraju stem ćelije, indukuju njihovu mitozu i diferencijaciju, a vrše i lokalnu kontrolu inflamacije i imaju neuroprotektivnu ulogu. Zbog korisnog delovanja trombocita postoje brojne tehnike kojima se vrši koncentrisanje trombocita i njihova upotreba u kliničkoj praksi. Derivati krvi bogati trombocitima se klasifikuju na sledeći način: 1) Trombocitima bogata plazma (eng., Platelet-Rich Plasma, PRP) se priprema dvostrukim centrifugiranjem krvnog uzorka. 2) Trombocitima bogat fibrin (eng., Platelet-Rich Fibrin, PRF) – gde se krv centrifugira odmah nakon vađenja, kako bi se sprečila koagulacija, a fibrinska mreža se gradi postepeno tokom centrifugiranja uz odsustvo antikoagulantnih agenasa. Iz fibrinske mreže se dobija postepeno otpuštanje faktora rasta i drugih medijatora, uzrokujući produženo održavanje i aktivaciju stem ćelija. Cilj ovog rada je da se ispita mogućnost koncentrovanja trombocitima iz uzoraka krvi krava dobijenih redovnim postupkom uzimanja u EDTA vakutajnere. Ovo je prvi put da se koristi EDTA kao antikoagulans u dobijanju goveđe PRP. Rezultati ispitivanja pokazuju da je najbolji protokol dvostrukog centrifugiranja, gde se u prvom ciklusu vrši centrifugiranje na 500g u trajanju od 10 minuta, a u drugom od 800g u trajanju od 10 minuta. Broj trombocita u konačnom proizvodu se povećava za 252% u odnosu na originalni uzorak krvi, a dobija se zanemarljivo mali broj leukocita i eritrocita. Od 9 ml krvi iz vakutajnera može se napraviti 1 ml PRP proverenog kvaliteta. PRP dobijen korišćenjem niže centrifugalne sile i kraćeg vremena centrifugiranja ima veći broj leukocita i eritrocita, dok je prinos trombocita manji. Upotrebom velike sile od 800 g tokom 15 minuta centrifugiranja dobija se veliki broj trombocita i leukocita ali je učešće fragmenata eritrocita u PRP veoma visoko, što umanjuje kvalitet PRP dobijene ovim protokolom.

**KLJUČNE REČI:** goveda, hematologija, plazma bogata trombocitima, regenerativna medicina.

### Uvod

U trombocitu se nalaze brojne strukture koje sadrže glikogen, lizosome i dva tipa granula. Razlikujemo  $\beta$ -alfa i  $\beta$ -guste granule (Everts i sar., 2006). Alfa granule kontrolišu proces zarastanja rana uz pomoć nekoliko tipova faktora rasta. Tu spadaju: trombocitni derivat faktora rasta (PDGF), epitelijalni faktor rasta (EGF), vaskularni endotelijalni faktor rasta (VEGF), endotelijalni ćelijski faktor rasta (ECGF), fibroblasni faktor rasta (FGF), transformišući faktor rasta beta (TGF $\beta$ ) i faktor rasta sličan insulinu (IGF). U osnovi, svi ovi faktori rasta deluju hemoatraktno i aktiviraju stem ćelije, indukuju njihovu mitozu i diferencijaciju. Faktori iz trombocita vrše i lokalnu kontrolu inflamacije, a neuroprotekciju.

Zbog navedenih fizioloških osobina i činjenice da su trombociti veoma značajni u regeneraciji tkiva, razvijene su brojne osobine za izdvajanje i koncentrovanje trombocita iz pune krvi. Derivati krvi bogati trombocitima se klasifikuju na sledeći način (Masoudi i sar., 2016): 1) Trombocitima bogata plazma (eng., Platelet-Rich Plasma, PRP) se priprema dvostrukim centrifugiranjem krvnog uzorka. Nakon prvog centrifugiranja mogu se uočiti tri sloja u epruveti: plazma na površini, eritrociti kao donji sloj, a u sredini je sloj koji sadrži trombocite i leukocite. Nakon odbacivanja eritrocita, uzorak se ponovo centrifugira kako bi se omogućilo dobro odvajanje plazme. PRP dobijamo tako što odbacimo plazmu. Ovaj proces dovodi do četvorostruke, pa i sedmostruke, koncentracije trombocita u uzorku u poređenju sa celom netretiranom krvlju; 2) Trombocitima bogat fibrin (eng., Platelet-Rich Fibrin, PRF) – U nekoliko navrata pokušano je sa pripremom novog, jednostavnog za upotrebu, trombocitnog preparata. Ovo je dovelo do razvika trombocitno bogatog fibrina koji je jednom centrifugovan proizvod koji ne zahteva dodavanje različitih hemijskih jedinjenja. Krv se centrifugira odmah nakon vađenja, kako bi se sprečila koagulacija. Postepeno, srednji sloj se razdvaja na još dva sloja. Glavna razlika između PRF i PRP je u strukturi fibrina. U PRF-u se fibrinska mreža gradi postepeno tokom centrifugiranja uz odsustvo antikoagulantnih agenasa. Ovo dovodi do stvaranja gustog fibrina i PRF se

ponaša kao mreža u koju su uhvaćeni leukociti i trombociti tokom centrifugiranja. Ovo ponašanje fibrinske mreže kao rezervoara dovodi do postepenog otpuštanja faktora rasta i drugih medijatora, uzrokujući produženo održavanje i aktivaciju stem ćelija.

Cilj ovog rada je da se ispita mogućnost koncentrovanja trombocitima iz uzoraka krvi krava dobijenih redovnim postupkom uzimanja u EDTA vakutajnere.

## Material i metod rada

Uzimanje i transport uzoraka krvi – U analizu je uključeno 350 uzoraka krvi. U ogled je uključeno 50 krava i od svake je krv uzeta u 7 EDTA vakutajnera. Vakutajneri su transportovani tokom dana u Laboratoriju za patološku fiziologiju na Departmanu za veterinarsku medicine Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu.

Analiza primarnih uzoraka – Analiza primarnih uzoraka podrazumevala je ispitivanje hematoloških parametara krvi na hematološkom brojaču Nihon Kohden MEK-6550 sa posebnim softverom za goveda.

Protokoli za pravljenje plazme bogate trombocitima – Posle hematološke analize epruvete su podeljene u 7 grupa za 7 različitih protokola. Protokoli dvostrukog centrifugiranja epruveta za izdvajanje PRP prikazani su u tabeli 1 i napravljeni su na osnovu različitih kombinacija g sile i dužine centrifugiranja. Posle primarnog centrifugiranja izvučena je ista zapremina (4ml) plazme sa leukocitima i trombocitima (PPP, plazma siromašna trombocitima, eng. poor platelet plasma) i presuta u falkoneovu tubu. Ponovnim centrifugiranjem dobijen je PRP na dnu, izvučeno je 3ml plazme iz gornjeg sloja, a preostali 1 ml plazme sa PRP je obrađen vorteksom u cilju resuspendovanja trombocita i ostalih elemenata krvi. Raspored zapremina je išao tako da se od pune epruvete krvi (9ml) dobije 1 ml PRP koji je analiziran. Korišćena je centrifuga Hettich EBA200.

### Tabela 1.

Protokoli dvostrukog centrifugiranja za pravljenje PRP iz pune krvi

#### Table 1.

Protocols of double centrifugation for preparation of PRP from whole blood

Protokol broj	Prvo centrifugiranje		Drugo centrifugiranje	
	g	vreme	g	vreme
1	250	5	250	5
2	250	5	500	5
3	500	10	250	10
4	500	5	500	5
5	500	10	800	10
6	800	10	500	10
7	800	15	800	15

## Rezultati i diskusija

Rezultati originalnih hematoloških podataka su prikazani u tabeli 2. Protokoli od 4 do 7 daju bolji kvalitet PPP u odnosu na protokole 1-3, obzirom da se primenom protokola 4-7 dobija manji broj leukocita i eritrocita u proizvodu PPP. Upotrebom protokola broj 5 dobija se najveći prinos trombocita u konačnom proizvodu PRP plazme. Pored navedenog upotrebom ovog protokola sa silom od 500 i 800 g tokom 10 minuta dobija se najmanji broj leukocita i nizak broj eritrocita, a praktično nema eritrocita koji su se raspali kao posledica centrifugiranja, a koji bi mogli da remete kvalitet PRP. PRP dobijen korišćenjem niže centrifugalne sile i kraćeg vremena centrifugiranja ima veći broj leukocita i eritrocita, dok je prinos trombocita manji. Upotrebom velike sile od 800 g tokom 15 minuta centrifugiranja dobija se veliki broj trombocita i leukocita ali je učešće fragmenata eritrocita u PRP veoma visoko, što umanjuje kvalitet PRP dobijene ovim protokolom. Rezultati su prikazani u tabeli 3, kao i na slikama 1-4. Upotreba EDTA vakutajnera i izdvajanje malih zapremina PRP je moguće kod goveda primenom različitih protokola dvostepenog centrifugovanja. Najbolje se pokazao protokol gde je u prvom centrifugovanju korišćena sila od 500 g, a u drugom od 800 g u trajanju od po 10 minuta.

Od 9 ml krvi iz vakutajnera može se napraviti 1 ml PRP proverenog kvaliteta. Tehnološko rešenje može biti primenjeno u bilo kojoj veterinarskoj ambulanti ili stanici koja je opremljena centrifugom i može se koristiti u radu sa redovnim uzorcima krvi dobijenim iz EDTA vakutajnera. PRP se može koristiti u terapiji vimena, uterusu i papaka krava zbog svog imunomodulatornog efekta, efekta u remodeliranju tkiva, a postoje i rezultati koji pokazuju da PRP ima antimikrobni efekat. Njegova promena bi mogla pomoći u redukciji upotrebe antibiotika i drugih lekova. Ovo posebno može biti od koristi kod sezonskih promena u vimenu ili uterusu, jer toplotni stres dovodi do slabljenja imunog sistema i metaboličkog stresa, pa je upotreba PRP kao modulatora potencijalno od velike koristi.

U novije vreme rezultati koje su dali López i sar. (2012), Tsuzuki i sar. (2012), Lange-Consiglio i sar. (2014, 2015) i Marini i sar. (2016) su dali protokole za izdvajanje plazme bogate trombocitima. Ovi autori su PRP koristili u različite svrhe, kao što su terapija mastitisa, metritisa i čira papka. Protokoli su detaljno opisani. Ni u jednom od publikovanih radova nije utvrđeno da li se mogu koristiti EDTA vakutajneri tokom prikupljanja krvi i pripreme PRP poreklom od goveda. EDTA se pokazao kao dobar antikoagulans kada se radi o prinosu trombocita tokom njihovog koncentrovanja. Mana korišćenja je promena u zapremini trombocita, što smanjuje mogućnost prolongiranog korišćenja PRP.

Veoma je važno odrediti koji je to broj trombocita u PRP koji je dovoljan da dovede do pozitivnog terapijskog efekta. Iako egzaktnih podataka nema, današnji aparati za separaciju koji služe za dobijanje PRP-a koncentrišu trombocite u 6-10<sup>x</sup> većem broju od bazalnog. Nađeni su pozitivni efekti kada su koncentracije trombocita bile oko 10<sup>6</sup>/mL. Izuzetno visoko koncentrisanje, pa samim tim i visok broj trombocita može izazvati negativne efekte u procesu reparacije tkiva (Everts i sar., 2006).

**Tabela 2.**

Hematološki nalaz primarnih uzoraka krvi koji su služili za pravljenje PRP

**Table 2.**

Hematology parameters from original blood sample for PRP preparation

	<b>Srednja</b> <b>×10<sup>3</sup>/μL</b>	<b>SD</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>
Trombociti	489	150	202	595
Leukociti	9,32	2,17	7,01	12,4
Eritrociti	8549	1412	6267	11315

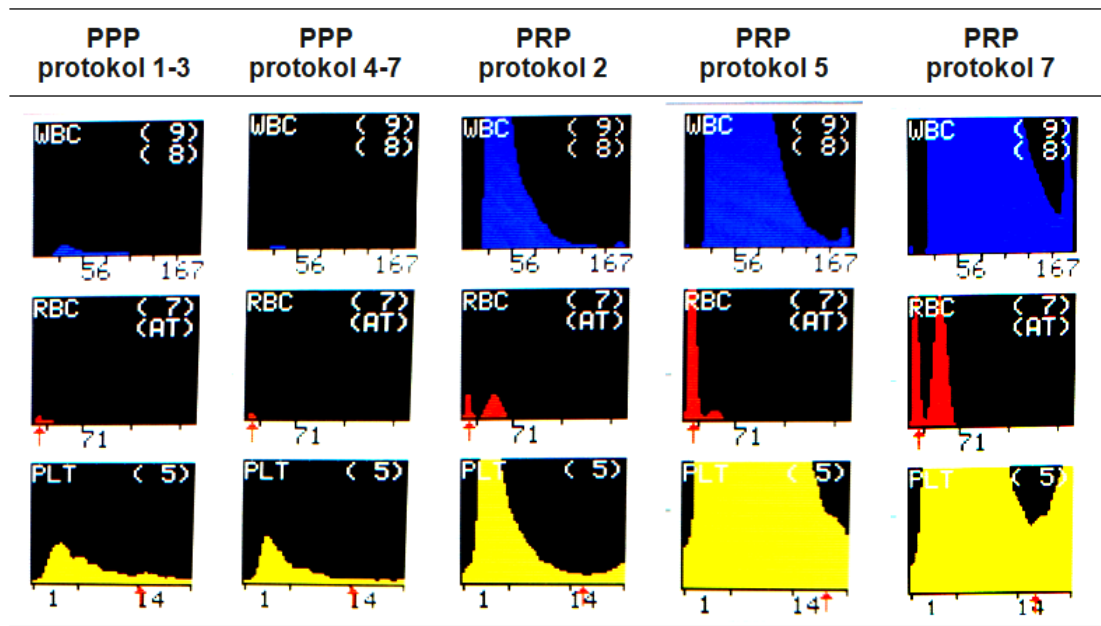
**Tabela 3.**

Apsolutne vrednosti trombocita, leukocita i eritrocita u PRP

**Table 3.**

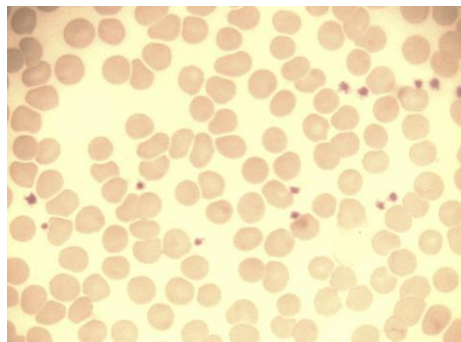
Absolute value of platelet, WBC and RBC in PRP

<b>Protokol broj</b>	<b>Trombociti</b> <b>×10<sup>3</sup>/μL</b>	<b>Porast u odnosu na</b> <b>primarni uzorak</b>	<b>Leukociti</b> <b>×10<sup>3</sup>/μL</b>	<b>Eritrociti /μL</b>
1	650	+33%	1,7	780
2	725	+48%	1,5	811
3	994	+103%	1,4	690
4	1047	+114%	0,92	550
<b>5</b>	<b>1723</b>	<b>+252%</b>	<b>0,65</b>	<b>442</b>
6	1155	+136%	0,77	451
7	811	+66%	0,67	503

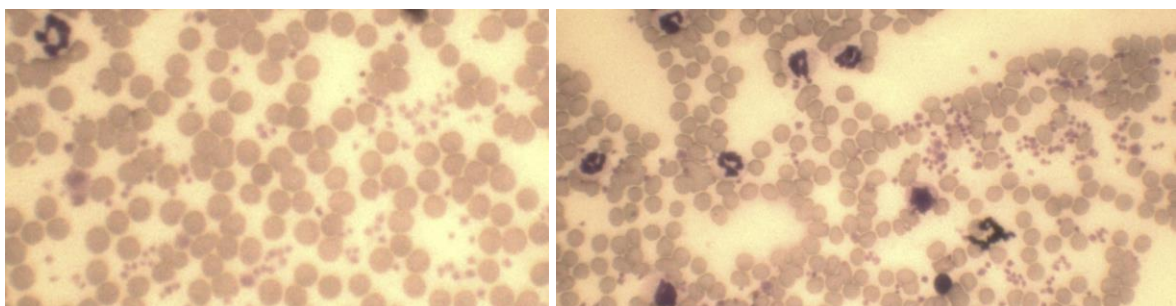


Slika 1. Distribucija frekvencije uobličjenih elemenata krvi dobijenih primenom protokola za pravljenje PRP

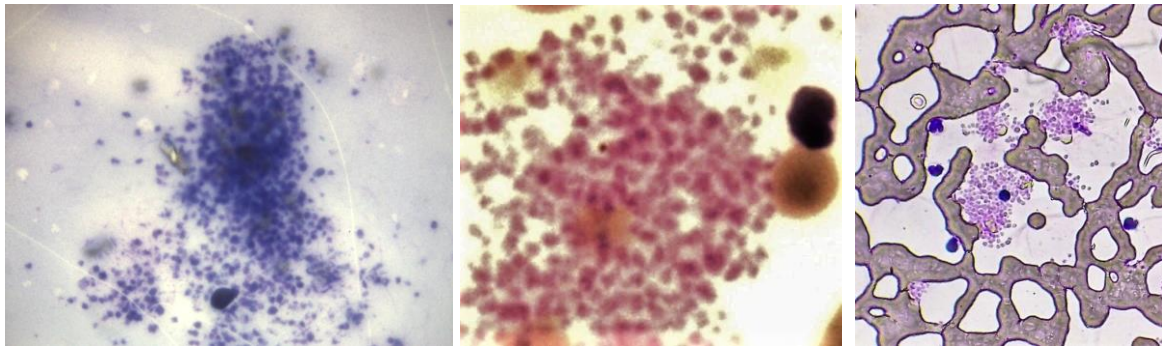
Figure 1. Frequency distribution of blood cells in different protocols for PRP preparation



Slika 2. Razmaz krvi iz primarnog uzorka  
Figure 2. Blood smear from original sample



Slika 3. Razmaz PPP kod primene protokola 1 (levo) i 2 (desno)  
Figure 3. Smear of PPP obtained by protocol 1 (left) and 2 (right)



**Slika 4.** Razmaz PRP kod primene protokola 5 (levo i u sredini) i protokola 7 desno  
**Figure 4.** Smear of PRP obtained by protocol 5 (left and central) and protocol 7 (right)

### Zaključci

Upotreba EDTA vakutajnera i izdvajanje malih zapremina PRP je moguće kod goveda primenom različitih protokola dvostepenog centrifugovanja. Najbolje se pokazao protokol gde je u prvom centrifugovanju korišćena sila od 500 g, a u drugom od 800 g u trajanju od po 10 minuta. Od 9 ml krvi iz vakutajnera može se napraviti 1 ml PRP proverenog kvaliteta.

### Zahvalnica

Ovaj rad je deo projekta TR31062 koji je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja R.Srbije.

### Literatura

- Everts, P. A., Knape, J. T., Weibrich, G., Schönberger, J. P., Hoffmann, J., Overdeest, E. P., ... & van Zundert, A. (2006). Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *The Journal of extra-corporeal technology*, 38(2), 174.
- Lange-Consiglio, A., Spelta, C., Garlappi, R., Luini, M., & Cremonesi, F. (2014). Intramammary administration of platelet concentrate as an unconventional therapy in bovine mastitis: first clinical application. *Journal of dairy science*, 97(10), 6223-6230.
- Lange-Consiglio, A., Cazzaniga, N., Garlappi, R., Spelta, C., Pollera, C., Perrini, C., & Cremonesi, F. (2015). Platelet concentrate in bovine reproduction: effects on in vitro embryo production and after intrauterine administration in repeat breeder cows. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(1), 65.
- Marini, M. G., Perrini, C., Esposti, P., Corradetti, B., Bizzaro, D., Riccaboni, P., ... & Lange-Consiglio, A. (2016). Effects of platelet-rich plasma in a model of bovine endometrial inflammation in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 14(1), 58.
- Masoudi, E. A., Ribas, J., Kaushik, G., Leijten, J., & Khademhosseini, A. (2016). Platelet-rich blood derivatives for stem cell-based tissue engineering and regeneration. *Current stem cell reports*, 2(1), 33-42.
- López, C., Giraldo, C. E., & Carmona, J. U. (2012). Evaluation of a double centrifugation tube method for concentrating bovine platelets: Cellular study. *Archivos de medicina veterinaria*, 44(2), 109-115.
- Tsuzuki, N., Seo, J. P., Yamada, K., Haneda, S., Tabata, Y., & Sasaki, N. (2012). Effect of compound of gelatin hydrogel microsphere incorporated with platelet-rich-plasma and alginate on sole defect in cattle. *Journal of Veterinary Medical Science*, 74(8), 1041-1044.



## Optimal protocol for preparation of platelet-rich plasma (PRP) from bovine blood

Branislava Belić<sup>a\*</sup>, Marko R. Cincović<sup>a</sup>, Ivana Lakić<sup>a</sup>, Zorana Kovačević<sup>a</sup>,  
Nenad Stojanac<sup>a</sup>, Ognjen Stevančević<sup>a</sup>, Mira Majkić<sup>a</sup>

<sup>a</sup>University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Department of veterinary medicine, Novi Sad, Serbia

\*Corresponding author: [branislava.belic@polj.uns.ac.rs](mailto:branislava.belic@polj.uns.ac.rs)

### ABSTRACT

Platelets contain numerous structures that contain glycogen, lysosomes and growth factors that act chemoactively and activate stem cells, induce their mitosis and differentiation, and they also perform local control of inflammation and have a neuro-sportive role. Due to the useful effect of platelets, there are numerous techniques for platelet concentrating and their use in clinical practice. Platelet-rich blood derivatives are classified as follows: 1) platelet rich plasma (PRP) is prepared by double centrifuging the blood sample. 2) Platelet-Rich Fibrin (PRF) where the blood is centrifuged immediately after extraction, in order to prevent coagulation, and the fibrin network builds gradually during centrifugation with the absence of anticoagulant agents. The fibrin network provides a gradual release of growth factors and other mediators, causing prolonged maintenance and activation of stem cells. The aim of this study is to investigate the possibility of platelet concentrations from blood samples of cows obtained by the regular procedure of taking EDTA vacutainers. This is the first time that EDTA is used as an anticoagulant in the production of bovine PRP. The results of the test show that the best double centrifugation protocol is where the first cycle is centrifuged to 500g for 10 minutes and in the second from 800g for 10 minutes. The platelet count in the final product increases by 252% compared to the original blood sample, and a negligible number of leukocytes and erythrocytes are obtained. Of 9 ml of blood from a vacuum cleaner, 1 ml PRP of proven quality can be made. The PRP obtained by using a lower centrifugal force and a shorter centrifugation time has a higher number of leukocytes and erythrocytes, while the platelet yield is lower. Using a large force of 800 g over 15 minutes of centrifugation, a large number of platelets and leukocytes are obtained, but the participation of erythrocyte fragments in the PRP is very high, which reduces the quality of the PRP obtained by this protocol.

**KEY WORDS:** bovine, hematology, platelet-rich plasma, regenerative medicine.

Primljen: 08.03.2019.

Prihvaćen: 18.06.2019.