

## 동결해동 활성화 혈소판풍부혈장이 세균 증식에 미치는 효과

임영애<sup>1</sup> · 백세연<sup>2</sup> · 이위교<sup>1</sup>

아주대학교 의과대학 진단검사의학교실<sup>1</sup>, 녹십자의료재단<sup>2</sup>

= Abstract =

### The Effect of Freezing-thawing Activated Platelet Rich Plasmas (PRP) on the Proliferations of Bacteria

Young Ae Lim<sup>1</sup>, SaeYun Baik<sup>2</sup>, Wee Gyo Lee<sup>1</sup>

Department of Laboratory Medicine, Ajou University School of Medicine<sup>1</sup>, Suwon,  
Green Cross Reference Laboratory<sup>2</sup>, Yongin, Korea

**Background:** Fresh platelet rich plasma (PRP) gel has been reported to have anti-bacterial properties. We evaluated the anti-bacterial effects of liquid type activated PRP (tAPRP) using thrombin and heparin treatment after a freezing-thawing (F-T) procedure, using a disk diffusion method.

**Methods:** PRP and platelet poor plasma (PPP) were prepared from CPDA-1 anticoagulated blood received from 20 donors. PRP was concentrated to 8 times the base platelet counts of donors for the first trial and to 11 times the base platelet counts of donors for the second trial. Both F-T PRP and F-T PPP were divided into a nonactivated group and an activated (tA) group, which was then treated with bovine thrombin and CaCl<sub>2</sub>, and heparin was added to prevent gel formation. The anti-bacterial effects of F-T PRP, F-T PPP, F-T tAPRP with heparin and F-T tAPPP with heparin on *S. aureus* and *P. aeruginosa* were evaluated using a disk-diffusion and direct dropping method. All experiments were duplicated.

**Results:** The inhibited diameters resulting for *S. aureus* and *P. aeruginosa*, using the disk-diffusion and direct dropping method, were zero for all 20 sets of results for F-T PRP, F-T PPP, F-T tAPRP with heparin and F-T tAPPP with heparin.

**Conclusion:** No anti-bacterial effects were detected for *S. aureus* or *P. aeruginosa* in the F-T PRP, F-T PPP, F-T tAPRP with heparin and F-T tAPPP with heparin. This negative result may be due to the F-T treatment and/or because liquid instead of gel form of PRP was used. The use of the disk diffusion method for the determination of anti-bacterial ability of PRP may also be a factor in the negative study results. (**Korean J Blood Transfus 2011;22:221-230**)

**Key words:** Platelet rich plasma (PRP), Antibacterial effect, Freezing-thawing

접수일 : 2011년 11월 8일, 수정일 : 2011년 12월 5일, 승인일 : 2011년 12월 5일

책임저자 : 임 영 애 442-749 경기도 수원시 영통구 원천동 산 5번지 아주대학교 의과대학 진단검사의학교실  
TEL: 031) 219-5786, FAX: 031) 219-5778, E-mail: limyoung@ajou.ac.kr

본 연구는 2010년 대한수혈학회 Fenwal 연구상 지원에 의해 이루어졌음.

## 서론

혈소판은 혈관이 손상되었을 때 부착, 분비, 응집, 응고촉진활동을 통한 지혈작용을 담당한다. 과거에는 혈소판이 응집반응과 상처치유의 시작을 담당하는 것으로만 알려졌지만, 성장인자인 cytokine을 방출한다는 것이 알려진 이후로 치과,<sup>1)</sup> 성형외과<sup>2)</sup> 및 정형외과를<sup>3)</sup> 비롯한 다양한 의료분야에서 상처치유와 재생의 목적에 대한 연구가 진행되고 있는 중이다. 혈소판 내 존재하는 성장인자들이 상처치유에 이용되기 위해서는 혈소판 과립으로부터 분비되어야 하는데, 이를 위하여 제조된 혈소판풍부혈장(platelet rich plasma, PRP)을 트롬빈과 calcium chloride를 이용하는 등의 혈소판 활성화 과정이 필요하다. 이는 매우 효과적으로 혈소판 과립 내 물질의 분비시킬 수 있는 방법이지만 트롬빈을 별도 구입하여야 하고, PRP와의 혼주 시는 젤이 형성되면서 젤 이외의 목적으로 다룰 경우 다루기 어렵다는 단점이 있다. 최근에는 젤 형태가 아닌 액상의 활성화 PRP가 세포배양 시 fetal bovine serum (FBS)의 대체물질로서의 가능성이 제기되고 있기 때문이다.<sup>4,5)</sup>

이에 비하여 혈소판의 동결과 해동 방법은 트롬빈 사용보다는 과립분비 효과가 덜 하기는 하나 혈소판 활성화의 간편한 방법으로 알려져 있다.<sup>6)</sup> 더욱이 혈소판은 신선한 전혈로부터 분리한 후 바로 사용하여야 하는 불편함이 있으나 동결할 경우에는 분리한 혈소판을 채혈일에 바로 이용하지 않고 보관한 후 다른 날에 이용할 수 있다는 장점도 있다.

혈소판에 항균 효과가 있다는 보고는 과거부터 있어왔으나 최근에는 상처치유 목적으로 사용되는 활성화 혈소판 젤에도 항균 효과가 있다는 연구가 보고되었다.<sup>7-10)</sup> 이에 따르면 PRP를 트롬빈과 calcium chloride으로 처리하여 생성한 혈소

판 젤이 디스크확산법이나<sup>7)</sup> bacterial kill assay 혹은 bacteriostasis assay<sup>8-10)</sup>을 이용할 경우 일부 세균에서 항균 효과를 보였다고 하였다. 그러나 보고에 따라 관련있는 세균의 종류도 다르며, PRP의 항균 효과를 검증하는 방법에 대한 연구는 없는 실정이다.

또한 이러한 연구들은 채혈한 혈액에서 제조된 신선한 PRP를 트롬빈으로 활성화시킨 젤에서 시행한 결과들이다. 그러나 이러한 젤 형태는 세포배양시의 FBS의 대체물질로서 사용할 수 없으며, 세포배양을 위하여는 동결보관이 필요할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 동결-해동시킨 액상의 활성화된 PRP에서 bacterial kill assay 혹은 bacteriostasis assay가<sup>8-10)</sup> 아닌 간단한 디스크확산법을<sup>7)</sup> 이용하여 항균효과를 조사하여 액상의 활성화된 PRP의 유용성을 연구하는데 도움을 주고자 하였다.

## 대상 및 방법

이 연구에는 헌혈자 선별검사에 합당하고 일주일 이내 혈소판기능에 영향을 미치는 약물을 복용하지 않은 23명의 지원자를 포함하였다. 녹십자의료재단 연구윤리위원회의 승인을 얻은 후에 각 지원자로부터 동의서를 받고 혈액을 채취하였다. 각 지원자로부터 1 mL의 CPDA-1 (Citrate Phosphate Dextrose Adenine-1, GCMS, Yongin, Korea)이 담긴 10 mL 시험관에 9 mL의 전혈을 채취하여 잘 섞은 후 일부를 취하여 일반혈액분석장비인 XE-2100을 이용하여(Sysmex, Kobe, Japan) 지원자의 기본 백혈구, 혈소판과 혈색소 수치를 측정하였다. 참가한 23명의 지원자 중 채혈 후 1차 검사에서 기본 혈구수가 측정되지 않은 3명이 제외되어 연구에는 20명만의 자료만 포함하였다. 20명의 지원자는 남자 9명과 여자 11

명이 포함되었으며, 연령은  $32.1 \pm 5.0$ 세였다.

### 1. PRP 제조와 활성화

채혈한 혈액은 실온 1,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 3,200 rpm 에서 다시 10분간 원심분리를 하여 1차에는 지원자 혈소판수의 약 8배가<sup>7)</sup> 되도록 상층액인 혈소판결핍혈장(platelet poor plasma, PPP)을 제거하여 혈소판풍부혈장인 PRP를 제조하였고, 제거한 PPP의 일부는 대조군으로 수집하였다. 2차 때는 1차 때와 마찬가지로 제조하되 혈소판수 농축시 최종 부피를 500  $\mu$ L 전후에 맞추도록 하였다. 채혈시 실시한 혈색소, 백혈구수 및 혈소판수와 이중으로 원심분리한 후 냉동 직전의 결과들은 1차 시험 때에 비하여 2차 시험 때 기본 혈소판수와 농축한 혈소판 수가 유의하게 높았으며 혈색소 수치에서도 차이를 보였다(Table 1). 해동한 PRP의 부피는 대략 500  $\mu$ L 전후였으며, 냉동 직전의 혈소판수는 기본 혈소판수에 비하여 1차 시험시는  $804 \pm 293\%$ , 2차 시험 때는  $1,152 \pm 543\%$ 으로 농축되었다.

제조된 PRP는 일부를 취하여 혈소판 수치를 측정하고 남은 PRP와 대조군으로서 수집한 PPP는 microtube에 담아  $-70^\circ\text{C}$ 에 냉동보관 하였다.

PRP의 냉동보관, 트롬빈의 혈소판 활성화(thrombin-activated [tA] platelet) 및 헤파린 첨가 방법은 Bieback 등<sup>5)</sup>의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 즉, 냉동 보관한 PRP와 PPP는 24시간 후에 꺼내어 10분간 실온에 방치한 후  $37^\circ\text{C}$  온수조에 약 2시간 방치하여 혈소판용해물(platelet lysate)을 만들었다. 2시간의 근거는 본 연구실의 예비실험에서 냉동해동후(freezing-thawing, F-T) 혈소판이 용해되어 혈소판 수가 가장 많이 저하되었던 적절한 시간으로 정하였다(자료는 제시하지 않음). 해동 후 혈소판용해물에서 생성된 혈소판 파편을 제거하기 위하여 미세원심분리기에서 4,000 g, 15분간 원심분리를 한 후 상층액을 취하여 실험에 사용하였다. 혈소판 활성화 시 젤이 형성되는 것을 방지하기 위하여 각각의 동결-해동된 PRP 상층액과 PPP에 2 U/mL의 heparin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 용액을 첨가하고 250 U bovine thrombin (T4648 Thrombin from bovine plasma-Lyophilized powder, Sigma, USA)과 1 M calcium chloride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 용액을 혼합하여 PRP를 활성화시킨 후 항균 효과 검증에 사용하였다.

**Table 1.** Blood counts of whole blood and platelet rich plasmas (PRP) after double centrifugation from 20 volunteer donors

		1st (n=20)		2nd (n=20)		P value
		Mean	SD	Mean	SD	
Whole blood	WBC ( $\times 10^6/\text{L}$ )	6.86	1.24	6.42	1.4	0.0875
	Hb (g/dL)	13.07	1.67	12.58	1.6	0.0011
	PLT ( $\times 10^9/\text{L}$ )	142.3	28.3	178.0	48.5	0.0027
PRP	WBC ( $\times 10^6/\text{L}$ )	4.56	9.05	1.85	1.1	0.1867
	Hb (g/dL)	0.02	0.04	0.06	0.1	0.0165
	PLT ( $\times 10^9/\text{L}$ )	1,128.5	439.2	1,932.0	765.1	0.0001

Abbreviations: WBC, white blood cells; Hb, hemoglobin; PLT, platelet.

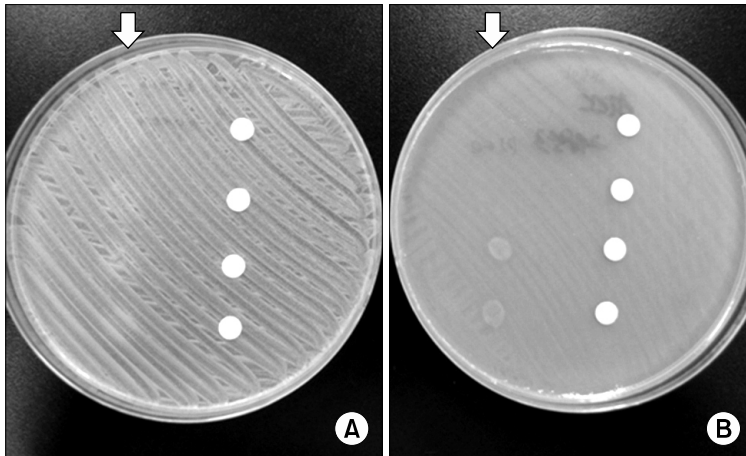
## 2. 항균 효과 검증

동결-해동된 PRP 상층액과 PPP 각각의 항균 효과는 Bielecki 등<sup>7)</sup>이 사용한 디스크확산법과 집적법을 약간 변형하여 사용하였는데, 이는 Bielecki 등이 사용한 혈소판젤은 혈소판제의 디스크 확산법의 판독이 용이하지 않기 때문에 헤파린을 첨가하여 액체상태로 유지하였다. 즉, Kirby-Bauer 디스크(8 mm, Advantec paper disc, Tokyo, Japan) 확산법과 디스크대신 직접 PRP 상층액과 PPP액을 집적하는 방법을 사용하였고, 균주는 *Staphylococcus aureus* (MSSA, ATCC25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853)을 사용하였다. 이를 간단히 설명하면 *S. aureus*와 *P. aeruginosa*를 멸균된 면봉을 이용하여 각각의 Mueller-Hinton 배지에 골고루 도말하였다. 도말한 배지에 각 지원자로부터 얻어진 동결-해동된 PRP 상층액과 PPP 각각의 25  $\mu$ L에 활성화균은 (thrombin activated with heparin, tA with heparin) heparin 2.5  $\mu$ L와 트롬빈이 용해된  $\text{CaCl}_2$  용액 2.5  $\mu$ L를, 비활성화균은 증류수 5  $\mu$ L가 포함된 총 30

$\mu$ L 용액을 8 mm 디스크에 적시거나 혹은 직접 떨어뜨렸다. 접종된 균배지는 37°C 배양기에서 16~18시간 배양하였다. 각 지원자 당 두 개의 균주를 도말하였는데 한 개의 균주 당 4개의 디스크와 4개를 집적하였으므로 8개의 억제대와 8개의 방울을 관찰하였다. 디스크 확산법의 억제대는 mm 단위로 측정하였고, 직접 PRP 상층액과 PPP액을 집적한 경우에는 이들이 확산되어 물리적으로 세균이 자라지 못한 액체 자국의 직경과 이 직경이외의 억제대 부위를 mm로 측정하였고, Bielecki 등<sup>7)</sup>의 보고와 마찬가지로 집적부위 내의 세균 증식여부를 관찰하였다. 모든 실험은 5~6주 후에 각 지원자로부터 다시 채혈하여 동일하게 실시하여 이중으로 시행하였다.

## 3. 통계방법

자료 및 통계처리는 Microsoft Excel 2007 (Microsoft, Redmond, WA, USA)와 SPSS 12.0 for Window (SPSS, Chicago, IL, USA)를 이용하였고, 자료는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. 1차와 2차의 지원자의 혈액학적 소견, 활성화균과 비활성



**Fig. 1.** The agar plates coated with *Staphylococcus aureus* (A) and *Pseudomonas aeruginosa* (B) from a donor. The 8 mm disks coated with each 30  $\mu$ L of freezing-thawing (F-T) platelet rich plasma (F-T PRP), F-T platelet poor plasma (F-T PPP), F-T thrombin activated PRP (F-T tAPRP) with heparin and F-T thrombin activated PPP (F-T tAPPP) with heparin, and the imprints (arrows) of direct droppings of F-T PRP, F-T PPP, F-T tAPRP with heparin and F-T tAPPP with heparin are shown on the agar plates.

화균의 억제대 차이 및 PRP와 PPP의 억제대 차이가 비교는 paired t-test로 시행하였고,  $P$  값은 0.05 이하인 경우에 유의하다고 판정하였다.

## 결 과

각 지원자로부터 얻어진 20개씩의 동결-해동된 PRP 상층액과 PPP 각각의 활성화균과 비활성화균의 디스크 확산법에서의 *S. aureus*와 *P. aeruginosa*에 대한 억제대는 1차와 2차 모두 '0

mm'로 억제대는 관찰되지 않았다(Fig. 1, Table 2). 각 지원자로부터 얻어진 F-T PRP 상층액과 F-T PPP 각각의 활성화균과 비활성화균을 집적한 경우는 집적 부위의 액체 자국 때문에 물리학적으 *S. aureus*와 *P. aeruginosa*가 자라지 못한 직경은 *S. aureus* 1차 8.9~9.7 mm, 2차 8.0~10.0 mm, *P. aeruginosa* 1차 9.8~10.8 mm, 2차 8.0~10.0 mm였으며, 억제대는 모두 '0 mm'이었다. 집적한 경우 PRP과 PPP는 *S. aureus*의 비활성화균에서만 수치가 달랐으나 통계학적 차이가 없었으

**Table 2.** Diameter (mm) of inhibition zones of disk diffusion method and imprints of direct dropping method for F-T PRP, F-T PPP, F-T tAPRP with heparin or t-APPP with heparin on Muller-Hinton agars

		1st (n=20)		2nd (n=20)	
		Mean	SD	Mean	SD
<i>S. aureus</i>					
Drop	F-T tAPRP with heparin	8.9	1.02	9.4	0.94
	F-T PRP	9.7	1.34	9.8	0.62
	<i>P</i> -value	0.002		<0.001	
	F-T tAPRP with heparin	8.9	1.02	9.4	0.94
	F-T PPP	9.65	0.99	9.8	0.62
	<i>P</i> -value	0.0025		<0.001	
Disk	F-T tAPRP with heparin	0	0	0	0
	F-T PRP	0	0	0	0
	F-T tAPPP with heparin	0	0	0	0
	F-T PPP	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>					
Drop	F-T tAPRP with heparin	10.75	1.07	9.2	1.2
	F-T PRP	9.75	1.55	8.3	0.73
	<i>P</i> -value	0.042		<0.001	
	F-T tAPRP with heparin	10.75	1.07	9.2	1.2
	F-T PPP	9.75	1.55	8.3	0.73
	<i>P</i> -value	0.042		<0.001	
Disk	F-T tAPRP with heparin	0	0	0	0
	F-T PRP	0	0	0	0
	F-T tAPPP with heparin	0	0	0	0
	F-T PPP	0	0	0	0

Abbreviations: PRP, platelet rich plasma; PPP, platelet poor plasma; F-T, freezing-thawing; tA, thrombin activation.

며( $P=0.7889$ ), 나머지는 모두 동일하여 이를 제외하고는 PRP과 PPP는 통계처리는 하지 않았다. 또한 집적한 경우 액체자국의 물리적 영향 때문에 활성화균과 비활성화균의 세균이 자라지 못한 직경은 *S. aureus*의 경우 비활성화균의 PRP와 PPP가 활성화균의 PRP와 PPP보다 유의하게 넓었으며, *P. aeruginosa*의 경우는 활성화균의 PRP와 PPP가 비활성화균의 PRP와 PPP보다 유의하게 넓었다(Table 2). 또한 1차와 2차 모두 집적한 경우의 직경 내에는 세균이 증식하지 않음을 관찰할 수 있었다.

### 고 찰

상처부위의 세균감염은 상처를 악화시켜 치유를 더디게 하는 주요 요인이므로 상처나 수술부위에 사용하는 활성화 PRP젤의 항균 효과는 상처치유에 도움을 주므로 활성화 PRP젤의 항균 효과에 대한 연구들이 보고되었다.<sup>7-10</sup> 보고들에 따르면 활성화 PRP젤이 *Staphylococcus aureus*에 대해서는 항균 효과가 있었으나,<sup>7-10</sup> *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, 그리고 *Pseudomonas aeruginosa*에 대해서는 항균 효과가 없었고,<sup>7</sup> *Escherichia coli*에 대해서는 효과가 있다는 보고와<sup>7</sup> 없다는 보고가<sup>9</sup> 있으며, *Pseudomonas aeruginosa*는 오히려 증식효과를 보였다는 보고도 있었다.<sup>7</sup> 본 연구에서도 직접 활성화 PRP를

배지에 집적한 경우 *Pseudomonas aeruginosa*의 증식효과를 보였다는 Bielecki 등<sup>7</sup>의 보고에 따라 디스크확산법 이외에 추가하였으나, 본 연구에서는 증식효과는 확인할 수 없었다. 비록 집적한 경우 액체자국의 물리적 요인 때문에 활성화균과 비활성화균의 세균이 자라지 못한 직경이 세균에 따라 차이를 보였으나 본 연구에서 관찰하고자 하는 PRP 또는 PPP의 고유성상에 의한 것이 아니므로 항균 효과와는 연관이 없는 것으로 판단하였다. 활성화 PRP젤의 항균 효과는 혈소판에서 분비되는 다양한 혈소판항균단백질(platelet antimicrobial proteins)인 fibrinopeptide A, fibrinopeptide B, thymosin beta-4, platelet basic protein, connective-tissue-activating peptide 3, RANTES와 platelet factor 4들과 관련이 있으며,<sup>11</sup> PRP에 포함된 백혈구도 항균 효과에 기여하는 것으로 여겨지고 있다.<sup>8</sup> 그러나 어떠한 기전으로 PRP 젤이 항균 효과에 관여하는지는 확실하지 않으며, 항균 효과에 대한 보고들도 연구자가 알기로는 현재까지 4개<sup>7-10</sup> 정도로 많지 않으며, 보고마다 관련있는 세균의 종류도 다른 경우가 있어 PRP 젤이 항균 효과에 대한 연구는 더 필요할 것으로 여겨진다.

최근 액상의 활성화 PRP가 세포배양시 fetal bovine serum의 대체물질로서의 가능성에 대한 연구들이 보고되었다.<sup>4,5</sup> 따라서 본 연구에서는 활성화 PRP가 젤 형태가 아닌 액상 상태에서도

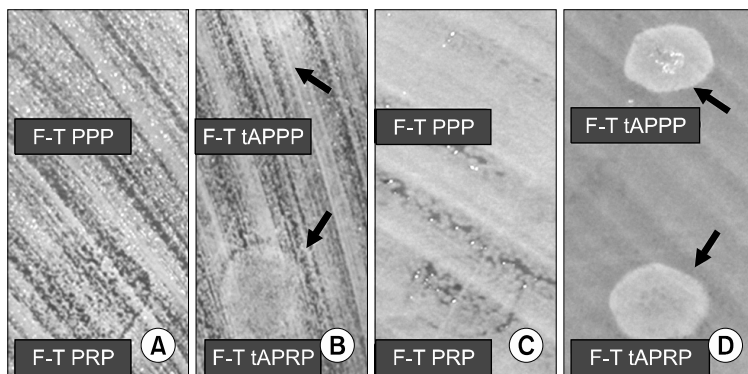
**Table 3.** The possible factors that might affect different results between this study and others for anti-bacterial effects on thrombin activated PRP

1. Effect of addition of freezing-thawing procedure (F-T)
2. Effect of addition of heparin
3. The different total platelet counts
4. The limitation of disk diffusion method to detect anti-bacterial effect of PRP
5. Immediated release of growth factors from plateletst due to thrombin and F-T, both

항균 효과가 있는지를 보고자 하였으나, 본 연구에서는 항균 효과를 관찰할 수 없었다. 이에 본 연구와 활성화 PRP의 항균 효과를 보인 과거 보고들과의<sup>7-10)</sup> 차이점에 대하여 아래의 몇 가지 가능성을 고려해 볼 수 있다(Table 3).

우선 본 연구에서는 혈액에서 분리된 신선한 PRP를 바로 이용한 것이 아니라 냉동 후 해동한 PRP를 이용했다는 점이다. 냉동은 혈소판막을 손상시켜 혈소판 과립들을 분비시켜 혈소판을 간편하게 활성화시키는 역할을 하고, 채혈하여 분리한 후 바로 PRP를 이용할 수 없을 경우에 보관이 가능하다는 이점 때문에 냉동보관 과정을 추가해 보았다. 비록  $-70^{\circ}\text{C}$  이하 보관에서 대부분의 단백질이 안정하며, 혈청을  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관시 혈소판의 성장인자들이 최소 3개월간 안정하다는 보고가 있으므로,<sup>12)</sup> 냉동과정이 항균 효과에 관여하는 혈소판항균단백질의 효과를 변경시켰을 가능성은 적지만 완전히 배제할 수 없다. 이를 증명하기 위해서는 동결하지 않은 신선한 PRP에서 1차적으로 항균효과를 관찰한 후에 동결 PRP에서의 항균 효과를 관찰한 후 냉동 효과를 배제해야 하는데, 본 연구에서는 이를 실시하지 못하였다. 따라서 이에 대해서는 추후 연구가 더 필요할 것으로 보인다.

두번째는 본 연구에서는 PRP젤을 그대로 이용한 것이 아니라 젤화가 되는 것을 방지하기 위해 헤파린을 첨가하여 액상 형태를 사용하였다는 점이다. Bielecki 등<sup>7)</sup>은 활성화 PRP젤에 대한 항균 효과를 디스크확산법으로 관찰하였는데, 본 연구에서도 예비실험에서는 트롬빈으로 활성화된 PRP젤을 그대로 사용하였으나, 디스크확산법상에서 젤이 배지에 달라붙어 억제대와 혼돈을 주어 판정이 어려웠기 때문에 그대로 사용하기 곤란하였다(Fig. 2). 젤 형태가 예방적으로 미생물에 대한 보호막 역할을 하므로 예방적으로 미생물 오염을 방지할 수 있는 이점도 있을 가능성도 있으나, 이 형태가 디스크확산법에서 억제대를 정확하게 판정하는데 혼돈을 주었을 가능성도 배제하기는 어려운 것으로 보여진다. 또한 본 연구에서는 기존의 보고들과는<sup>7-10)</sup> 달리 활성화 PRP의 젤 형태를 방지하기 위하여 헤파린을 사용하였는데, 헤파린에 대해서는 항균 작용이 있다는 보고와,<sup>13)</sup> 비록 헤파린 농도에 비례하여 일부 미생물의 성장을 억제하기는 하나 억제작용을 예측하기 어려우므로 항균효과가 있다고 보기 어렵다는 보고가 있다.<sup>14)</sup> 따라서 헤파린을 더 추가함으로써 항균 효과를 더 억제하였을 가능성은 배제할 수 있을 것으로 보여진다.



**Fig. 2.** The imprints of direct droppings of F-T PPP, F-T PRP, F-T tAPPP and F-T tAPRP on agar plates coated with *Staphylococcus aureus* (A, B) and *Pseudomonas aeruginosa* (C, D). The imprints (arrows) of direct droppings of F-T tAPRP or F-T tAPPP without heparin are marked by gel form. Abbreviations: See Fig. 1.

세번째로는 투여한 활성화 PRP의 양인데, Bielecki 등<sup>7)</sup>은  $228 \pm 59 (\times 10^9/L)$  혈소판수가 760% 농축된 10  $\mu L$  PRP를 사용하여 총 혈소판수  $17,328 \times 10^3$ 를 사용한 반면, 본 연구에서는 1차 때는  $142.3 \pm 28.3 (\times 10^9/L)$  혈소판수가 약 8배 농축, 2차 때는  $178.0 \pm 48.5 (\times 10^9/L)$  혈소판수가 약 11배 농축하여 25  $\mu L$  PRP를 사용하였다. 따라서 본 연구에서 총 혈소판수는 1차  $28,400 \times 10^3$ , 2차  $48,300 \times 10^3$ 이었기 때문에 혈소판수가 적어서 차이가 날 수 있다는 가능성은 제외할 수 있었다.

네번째는 활성화 PRP에 대한 항균 효과를 보고한 연구들은<sup>8-10)</sup> 디스크확산법을 사용한 Bielecki 등<sup>7)</sup>의 보고를 제외하고는 모두 번거로운 bacterial kill assay 혹은 bacteriostasis assay를 사용하였다는 점이다. 항균 효과를 보기 위한 방법으로 디스크 확산법은 비교적 간단하고 편리한 방법이므로 본 연구에서는 bacterial kill assay 혹은 bacteriostasis assay 대신 Bielecki 등<sup>7)</sup>의 보고에 따라 이 방법을 사용하였다. 그러나 bacterial kill assay 혹은 bacteriostasis assay를<sup>8-10)</sup> 사용하여 항균 효과를 관찰한 보고들에서는 *Staphylococcus aureus*에 대하여 항균 효과가 24시간까지 유지되기는 하나 초기 4시간 이내<sup>9,10)</sup> 혹은 초기 4~8시간<sup>8)</sup> 이내에 가장 두드러졌다고 보고하였다. 그러나 초기 4시간 이후부터는 세균의 로그함수적 성장이 세균의 억제 속도를 앞질러 세균이 다시 증식하기 시작하여 24시간이면 stationary phase에 이른다고 하였다.<sup>8)</sup> 그러나 이러한 현상은 세균을 도달하고 활성화 PRP를 적힌 혹은 집적한 후 16~18시간을 배양한 디스크확산법으로는 확인하기 어려운 현상이다. 만약 본 연구에서 제조한 PRP가 도달한 세균을 사멸하기 보다는 초기에 일시적으로 세균 증식을 억제하는 효과를 보였다면 후기에 억제 효과는 약화되고 세균 증식 속도가 더 빠르다면 관찰을 실시한 16~18시간에는 억제대에도 세균

이 자랄 수 있는 가능성도 있겠으나, 본 연구에서는 이를 증명하지는 못하였다.

마지막으로 트롬빈은 혈소판의 과립으로부터 성장인자들을 초기에 한꺼번에 분비시켜 활성화 후기에는 성장인자들의 효과를 감소시키는 역할을 한다고 하였는데,<sup>15)</sup> 이는 혈소판 과립으로부터 유래되는 혈소판항균단백질도 유사한 현상을 보여 트롬빈으로 활성화한 젤형태의 PRP가 초기 수 시간 이내에 강한 항균 효과를 보이다가 후기에 약해지는 현상과 관련이 있는 것으로 보여진다. 더욱이 본 연구에서는 냉동-해동 과정으로 일차로 혈소판을 활성화시킨 후 다시 트롬빈으로 이차 활성화시켰기 때문에 모든 과립들로부터 혈소판항균단백질을 분비시켜 트롬빈으로 활성화한 젤형태의 PRP에 비하여 더 초기에 그리고 더 짧게 항균 효과를 나타내었기 때문에 트롬빈만 사용한 Bielecki 등<sup>7)</sup>의 디스크확산법 결과와 차이를 보였을 가능성도 있다.

결론적으로 본 연구에서는 냉동-해동 후 트롬빈으로 이차 활성화 한 액상의 PRP (F-T tAPRP with heparin)에서 디스크확산법을 이용한 결과 항균 효과를 관찰할 수 없었다. 그러나 본 연구에서는 bacterial kill assay 혹은 bacteriostasis assay 방법을 동시에 사용하여 디스크확산법과 비교하지 않았기 때문에, 항균효과를 관찰하지 못한 것이 디스크확산법의 한계 때문인지, 본 연구과정의 오류 때문인지 혹은 냉동-해동 후 트롬빈으로 이차 활성화한 액상의 PRP는 항균효과가 없는 것인지를 감별할 수 없었다는 큰 제한점이 있다. 이를 감별하기 위하여 추후 동시 비교 연구로 확인할 필요가 있을 것으로 여겨진다.

## 요 약

**배경:** 신선한 혈장풍부혈장(이하 PRP로 약함)



젤은 항균 효과가 있는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서는 동결해동 후(freezing-thawing, FT) 트롬빈으로 활성화하고 헤파린으로 처리한 액상의 PRP에서 디스크확산법을 이용하여 항균효과를 조사하여 이의 유용성을 연구하는데 도움을 주고자 하였다.

**방법:** 20명의 각 지원자로부터 CPDA-1 항응고제가 처리된혈액에서 PRP와 혈소판결핍혈장(이하 PPP로 약함)을 분리하였다. PRP는 지원자의 기본 혈소판수에 비하여 1차 때는 8배, 2차 때는 11배 농축되었다. PRP와 PPP를 동결 해동 후(freezing-thawing, FT) 트롬빈으로 활성화시켰고(thrombin activated, tA) 헤파린을 첨가하여 젤 형성을 방지하였다. *S. aureus*와 *P. aeruginosa*에 대한 항균효과는 디스크확산법과 직접 집적하는 방법을 사용하여 검증하였고, 실험은 반복 시행하였다.

**결과:** *S. aureus*와 *P. aeruginosa*에 대한 디스크 확산법과 직접 집적하는 방법의 억제대는 20개씩의 PRP, PPP, APRP와 트롬빈 활성화된 PPP (이하 APPP로 약함) 모두 0 mm였다.

**결론:** 본 연구에서는 F-T PRP와 F-T PPP, 헤파린 처리한 F-T tAPRP와 F-T tAPPP의 *S. aureus*와 *P. aeruginosa*에 대한 항균효과는 발견할 수 없었다. 이러한 결과는 PRP의 항균 효과가 동결-해동 처리 여부나 혹은 젤이 아닌 형태 때문에 영향을 받았을 가능성도 있다. 그러나 디스크확산법이 PRP의 항균 효과를 검출하기에는 적당하지 않은 방법일 가능성도 배제할 수 없을 것으로 여겨졌다.

## 참고문헌

1. Tayapongsak P, O'Brien DA, Monteiro CB, Arceo-Diaz LY. Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. *J Oral Maxillofac Surg* 1994;52:161-5
2. Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton M. Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg* 2006;118:147e-59e
3. Mehta S, Watson JT. Platelet rich concentrate: basic science and current clinical applications. *J Orthop Trauma* 2008;22:432-8
4. Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, Reinisch A, Kashofer K, Stadelmeyer E, et al. Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion* 2007;47:1436-46
5. Bieback K, Hecker A, Kocaömer A, Lannert H, Schallmoser K, Strunk D, et al. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells* 2009;27:2331-41
6. Schallmoser K, Strunk D. Preparation of pooled human platelet lysate (pHPL) as an efficient supplement for animal serum-free human stem cell cultures. *J Vis Exp* 2009;(32). pii: 1523. doi: 10.3791/1523
7. Bielecki TM, Gazdzik TS, Arendt J, Szczepanski T, Król W, Wielkoszynski T. Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances: an in vitro study. *J Bone Joint Surg Br* 2007;89:417-20
8. Moojen DJ, Everts PA, Schure RM, Overdevest EP, van Zundert A, Knape JT, et al. Antimicrobial activity of platelet-leukocyte gel against *Staphylococcus aureus*. *J Orthop Res* 2008;26:404-10
9. Yang Y, Liu H, Liu G, Ran X. Antibacterial effect of autologous platelet-rich gel derived from health volunteers in vitro. *Zhongguo Xiu*

- Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi 2010;24:571-6
10. Jia W, Zhang C, Wang J, Chen J, Jiang Y. An experimental study on antimicrobial efficacy of platelet-rich plasma for bone infection prophylaxis. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi 2010;24:864-70
  11. Tang YQ, Yeaman MR, Selsted ME. Antimicrobial peptides from human platelets. Infect Immun 2002;70:6524-33
  12. Tsubota K, Goto E, Fujita H, Ono M, Inoue H, Saito I, et al. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren's syndrome. Br J Ophthalmol 1999;83:390-5
  13. Rosett W, Hodges GR. Antimicrobial activity of heparin. J Clin Microbiol 1980;11:30-4
  14. Zappala C, Chandan S, George N, Faoagali J, Boots RJ. The antimicrobial effect of heparin on common respiratory pathogens. Crit Care Resusc 2007;9:157-60
  15. Tsay RC, Vo J, Burke A, Eisig SB, Lu HH, Landesberg R. Differential growth factor retention by platelet-rich plasma composites. J Oral Maxillofac Surg 2005;63:521-8