

Injektuojamas trombocitais praturtintas fibrinas, išgautas naudojant žemą centrifugacijos greitį, pagerina kremzlės atstatymą geriau nei trombocitais praturtinta plazma.

ABSTRAKTU.

Šio tyrimo tikslas – įvertinti injektuojamo trombocitais praturtinto fibrino (i-PRF) poveikį gautiems chondrocitams bei osteochondriniam atstatymui gydant kritinės apimties osteochondrinio defekto triušio keliį, lyginant su autologine trombocitais praturtinta plazma (PRP). Chondrocitai pirmą kartą buvo tiriami dėl galimybės daugintis ir dalintis reaguojant su PRP ir i-PRF. Dėl šios priežasties pilno tankio kritinės apimties osteochondriniai defektai (5 mm skersmens ir 5 mm gylio) buvo sukurti 12 suaugusių Naujosios Zelandijos Baltųjų triušių kelio sąnaryje. Defektai buvo atkuriami naudojant PRP arba i-PRF, tuo pačiu metu lyginant su kontroline grupe. Gyvūnai buvo užmigdomi 4-tą ir 12-tą savaitę po operacijos. Po to buvo atlikti histologiniai tyrimai naudojant makroskopinius bei mikroskopinius patikrinimus kremzlės atstatymui. I-PRF stipriai padidino chondrocitų platinimą bei Sox9 mRNA lygius, taip pat II tipo kolgeno bei agrekano kiekį lyginant su PRP ir kontroline grupe. Histologiniai tyrimai parodė, kad ketvirtos savaitės makroskopiniai ICRS duomenys gauti iš i-PRF grupės buvo žymiai padidėję lyginant su PRP bei kontrolinėmis grupėmis. Dvyliktos savaitės pooperaciniai mikroskopiniai ICRS duomenys parodė, kad i-PRF grupėje žymiai padidėjo kremzlės atstatymas lyginant su PRP. Galima daryti išvadą, kad i-PRF naudojimas panaudojant mažą centrifugacijos greitį žymiai padidino chondrocitų aktyvumą ir toliau gerino kremzlės atstatymą lyginant su PRP. Histologiniuose tyrimuose galima pastebėti, kad ankstyvas ir geresnis kremzlės atstatymas vyksta ketvirtą pooperacinę savaitę naudojant i-PRF ir lyginant tyrimus, gautus dvyliktą savaitę. Reikalingi tolimesni klinikiniai tyrimai, kurie ištyrų i-PRF potencialą kelio atstatymui lyginant su PRP.

ĮVADAS.

Sąnario kremzlė turi ribotą vidinio atsinaujinimo gebėjimą. Susidarius tam tikroms fiziologinėms aplinkybėms, sąnario kremzlės traumos retai sugyja ir to pasekoje sąnarys pradeda irti ar net susidaro osteoartritas [1-3]. Viena iš pagrindinių prasto gijimo priežasčių yra ribotas kraujo kiekis ir jo izoliavimas nuo sisteminio reguliavimo, kuris gali sukelti hipozeuliaciją [3]. Todėl kremzlės gydymo procedūrų tikslas yra atstatyti sužaloto sąnario paviršius naudojant funkcinį audinį [4]. Tačiau tai išlieka tikru iššūkiu ortopedijos chirurgams, neturint jokių tikslų priemonių pilnam prarastų ar pažeistų audinių atstatymui.

Per pastaruosius 20 metų buvo siūlyta keletas kelio atstatymo gydymo būdų. Vienas iš jų – autologinių chondrocitų persodinimas (ACI) [5]. Kiti kremzlės pažeidimų gydymų pavyzdžiai – kaulo čiulpų stimuliavimo technikos, tokios kaip mikrofrakcijos procedūros, kurių tikslas sustiprinti kaulo čiulpus norint atstatyti kremzlės defektus [6]. Iš šių tyrimų gauti rezultatai išlieka kontraversiški, be idealaus gydymo modelio ilgalaikiam rezultatui [1]. Dažniau šios gydymo strategijos pasireiškia fibrokremzlės audinio formavimusi, o ne normalaus sąnario audinio formavimusi. Atstatytas audinys neturi reikalingų veikimo savybių arba ekstraląstelinės matricos (ECM) vietos organizavimo, kurie yra panašūs į vietinės sąnario kremzlės biologines funkcijas. Dėl šios priežasties biologiniai ir funkciniai šių gydymų rezultatai turi būti toliau tiriami ir gerinami [7-9]. Idealus gydymo modelis turėtų suteikti puikų atstatomąjį užpildymą naudojant hialininę kremzlę, palaikant subchondrinio kaulo kokybę [10].

Norint pagerinti osteochondrinių defektų atstatymą didelio dėmesio sulaukia biologiniai produktai, naudojami kaip papildoma priemonė atlikus operaciją, taip pat jie yra naudojami kaip pirminis gydymo būdas [11,12]. Vienas iš tokių produktų yra trombocitais praturtinta plazma (PRP), kuri gali būti lengvai gaunama iš autologinio periferinio kraujo centrifuguojant kraujo klostes nuo 6 iki 8, taip padidinant augimo faktorių koncentraciją [13]. Trombocitų koncentratai yra praturtinti augimo faktoriais, tame tarpe trombocitų kilmės augimo faktoriais (PDGF), transformuojančiais augimo faktoriais (TGF- β), kraujagyslių endoteliniais augimo faktoriais (VEGF), pagrindiniais fibroblastų augimo faktoriais (bFGF) bei insulino tipo augimo faktoriais (IGF) [13,14]. Taip pat, PRP padidina chondrocitų ir mezenchimo kamieninių ląstelių proliferaciją, proteoglikano gaminimą bei II tipo kolageno nusodinimą [15, 16].

Vienas iš aprašomų PRP trūkumų yra papildomas antikoagulantų naudojimas, kitaip žinomas kaip žaizdų gijimo slopintuvas. Dėl šių priežasčių buvo sukurtas antros kartos trombocitų koncentratas, vadinamas trombocitais praturtintu fibrinu (PRF). Jis buvo tobulinamas lyginant žaizdų gijimą naudojant PRP [17]. Standartinis PRF turi trijų dimensijų fibrino matricą po centrifugacijos, tačiau jis netinka kelio atstatymui, kadangi PRP injekcija parodė žymiai geresnius rezultatus dėl paprasto naudojimo būdo. Įdomu tai, kad novatoriškas žemo greičio centrifugacijos konceptas yra vystomas naudojant naujos sudėties PRF, kuriame skystas PRF gali būti gaunamas injekcijos tikslams (i-PRF) nenaudojant antikoagulantų [18-20]. Šio naujo trombocitų koncentrato sudėtyje nėra antikoagulantų, jis palaiko skystą tąsumą apie 15 minučių po centrifugacijos. Taip pat įdomu, kad jis gali būti injekuojamas panašiu būdu kaip ir PRP, tačiau turi savybę formuoti fibrino krešulį iškart po injekcijos. Dėl šios priežasties, šio tyrimo tikslas buvo įvertinti i-PRF poveikį kremzlinio audinio atstatyme. Pirmas šio tyrimo tikslas buvo palyginti i-PRF ir PRP poveikį auginamuose chondrocituose *in vitro*. Antras šio tyrimo tikslas buvo palyginti i-PRF ir PRP efektyvumą kritinio dydžio osteochondriniais defektams esantiems triušio kelyje.

Medžiagos ir metodai.

I-PRF IR PRP PARUOŠIMAS.

PRP ir i-PRF izoliavimui buvo panaudoti penki suaugę triušiai. Ruošiant PRP buvo panaudota 10 ml kraujo apdoroto antikoagulantu (sodos citratu), kraujas centrifuguotas prie 900 x g 5 minutes norint atskirti plazmą nuo hemocito (eritrocito ir leukocito) dalelių ir tada plazma buvo centrifuguota antrą kartą prie 2000 x g 15 minučių norint atskirti PRP nuo maža trombocitų kiekį turinčios plazmos (PPP) [21]. Bendras 1 mL PRP kiekis buvo izoliuotas nuo 10 mL bendro kraujo kiekio. I-PRF buvo gautas šiuo būdu: 10 mL kraujo be antikoagulianto buvo nedelsiant centrifuguojami prie 700 rpm 3 minutes (60g jėga) naudojant Čiokrūno PRF Duo Centrifugą (Process for PRF, Nice, France). Buvo surinkta 1 mL viršutinio plazmos sluoksnio. Jis buvo paženklintas kaip i-PRF. Surinktas PRP ir i-PRF buvo perpilti į 6 vietų *in vitro* plastikinius indus su 5 mL auginimo medžiaga (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM); HyClone, Thermo Fisher Scientific Inc., Beijing, China) ir apdirbta kaip aprašoma toliau.

CHONDROCITŲ IZOLIAVIMAS.

Suaugusio triušio kremzlės gabalėliai iš šlaunikaulio buvo surinkti ir tris kartus praplauti su fosfato druskos tirpalu (PBS; pH 7.2) turinčio 1 % antibiotikų ir supjaustyti į mažus gabalėlius steriliomis chirurginėmis žirkklėmis. Kremzlės audinio gabalėliai tada buvo perkelti į T25 audinio kilmės kolbas, kuriose buvo minimalus DMEM kiekis ir buvo paliktos 2 valandoms. Po to buvo pridėta 3 mL DNEM, kurio sudėtyje yra 20 % galvijų vaisiaus serumo (FBS; Gibco, Australia) bei antibiotikai. Praėjus vienai savaitei, kai ląstelės susiliejo, jos buvo tripsinizuotos ir auginamos DNEM su 10 % FBS. Tyrimuose naudoti chondrocitai buvo pasirinkti iš 3-7 ištraukų.

LĄSTELIŲ AUGINIMAS.

Trombocito koncentratai, taip pat PRP ir i-PRF buvo inkubuoti tris dienas 5% drėgnumo CO₂ aplinkoje prie 37 laipsnių temperatūros ir po to kondicionuota medžiaga buvo surinkta ir panaudota tolimesniems tyrimams, 20 % bendro kiekio, kaip aprašyta anksčiau [22]. Chondrocitai buvo atskirti nuo audinio auginimo plastiko naudojant tripsiną (HyClone), prieš sutirštėjant. Ląstelės buvo augintos drėgnoje aplinkoje prie 37 laipsnių temperatūros augimo terpėje, sudarytoje iš DMEM, 10 % FBS ir 1 % antibiotikų.

PRP IR I-PRF POVEIKIS CHONDROCITŲ PLATINIMUI.

PRP ir i-PRF poveikis chondrocitų platinimui buvo aprašytas Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Japan) 1, 3 ir 5 dienų laiko taškuose ir išmatuotas mikroplokštės skaitytuvu skenuojant prie 450 nm (PowerWave XS2, BioTek, Winooski, VT, USA) kaip anksčiau aprašyta [23].

PRP IR I-PRF POVEIKIS SU CHONDROGENEZE SUSIJUSIAI GENŲ IŠRAIŠKAI.

Realaus laiko PCR buvo panaudotas tiriant PRP ir i-PRF poveikį su chondrogeneze susijusiai genų išraiškai. Chondrocitai buvo auginami kartu su PRP arba i-PRF 24 padėkliukuose. Po septynių dienų auginimo bendras RNA kiekis buvo išgautas iš auginamų ląstelių naudojant AxyPrep Multisource Total RNA Miniprep Kit (AXYGEN, Union City, CA, USA) remiantis gamintojo instrukcijomis. RNA koncentracija buvo aprašyta pagal NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer, kaip anksčiau aprašyta [24]. 1 µg RNA tirpalo buvo konvertuotas į papildomą DNR naudojant First Strand cDNA Synthesis Kit (GeneCopoeia, Rockville, MD, USA) iki bendro 100 µL kiekio. Pagrindų SOX9 sekos – II tipo kolageno alpha 1 (COL2A1), agrekano (ACAN) ir gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenazės (GAPDH) triušio genai yra išvardinti papildomoje lentelėje 1. ΔΔCt metodas buvo panaudotas skaičiuojant geno išraiškos lygius atitinkančius „naminio“ geno GAPDH. Taip pat šis metodas buvo normalizuotas iki kontrolinių ląstelių.

PRP IR I-PRF POVEIKIS KREMZLĖS ATSTATYMO UŽDEGINĖJE APLINKOJE, SUMAŽINTAS IL-1β.

Chondrocitai buvo auginami kartu su IL-1β iki netikros osteoartritinės aplinkos. Trumpai tariant, chondrocitai buvo auginami su arba be 10 ng/mL IL-1β ir pridėdant PRP bei i-PRF 48 valandoms ir po to bendras RNA buvo izoliuotas nuo chondrocitų norint aptikti SOX9, COL2A1, ACAN išraiškas, dezintegriną ir metaloproteinazę naudojant 4 trombospondino motyvus (ADAMTS4), prostaglandino-endoperoksido 2 sintazės (PTGS2) ir matricos 13 metaloproteinazės (MMP13) genus su RT-PCR kaip aprašyta anksčiau. GAPDH buvo naudotas kaip „naminis“ genas.

STATISTINĖ IN VITRO TYRIMO ANALIZĖ.

Vienpusė ANOVA statistinė analizė buvo atlikta naudojant Graphpad Software v.6 (Graphpad Software, La Jolla, CA, USA). Statistinis rodmuo buvo nustatytas prie $p < 0,05$. Visi duomenys yra išreikšti kaip \pm SE priemonė. Visi in vitro eksperimentai buvo atlikti tris kartus trimis atskirais eksperimentais.

GYVŪNAI IR CHIRURGINĖ PROCEDŪRA.

Šiame tyrime buvo panaudota 12 suaugusių Naujosios Zelandijos Baltųjų triušių (NZW), kurių svoris buvo 2,5-3,0 kg. Prieš pradedant eksperimentus, buvo atlikti gyvūnų apdorojimo ir chirurginiai protokolai, remiantis Kinijos Respublikos Vuhano Universiteto gyvūnų priežiūros ir naudojimo direktyvomis bei patvirtinti Odontologijos Mokyklos Etikos Komiteto. Šis gyvūnų tyrimas taip pat rėmėsi ARRIVE gairėmis skirtomis tyrimams su gyvūnais. Visiems triušiams iš pradžių buvo leidžiami priprasti

prie patalpų savaitę prieš operaciją. Jie buvo maitinami atskiruose narvuose, kurie buvo patalpoje su reguliuojama temperatūra. Taip pat triušiai galėjo laisvai maitintis maistu ir vandeniu be antibiotikų. Gyvūnai buvo suskirstyti į tris grupes: 1) Kontrolinė, 2) PRP grupė, 3) i-PRF grupė.

Triušiai buvo užmigdyti su intraperitonine chloralio hidrato injekcija (10 % 4 mL/kg kūno svorio) ir buvo paguldyti ant nugaros. 30 minučių prieš operaciją profilaktiškai buvo sumaitinti antibiotikai [25]. Prieš operaciją buvo atliktas apatinės kūno dalies nuskutimas bei įprastas sterilizavimas. Operacija buvo atlikta iš dviejų šalių (kairiajame ir dešiniajame kelyje). Kelio sąnarys buvo atvertas vidutiniu parapatelariniu būdu [10]. Buvo atlikta 4 cm vidutinė parapatelarinė artrotija ir šonuose buvo pakeista girnelės pozicija norint atidengti femoropateliarinio griovelio paviršių. Po to sąnarys buvo atidžiai apžiūrėtas norint įsitikinti ar nebuvo jokios prieš tai buvusios patologijos.

Per sąnario kremzlę ir subchondrinį kaulą, girnelės griovelio centre buvo atliktas pilnas 5mm skersmens ir 5 mm gylio tankio defektas kiekvienos grupės triušiams naudojant gręžimo įrangą su 5mm svoriu. Po to defektai buvo mirkomi norint nuplauti kaulo ar kremzlės likučius ir buvo drėkinami su 0,9% steriliu fiziologiniu tirpalu. 1 Grupėje defektai buvo neapdoroti (kontrolinė grupė, n =4). 2 Grupėje defektai buvo užpildyti 1 mL PRP (PRP grupė, n =4). 3 Grupėje defektai buvo užpildyti 1 mL i-PRF (i-PRF grupė, n =4).

Žaizda buvo užverta dvejomis eilėmis atskirų siūlių. Prieš operacijos užbaigimą, naudojant pilną judesį, buvo pajudintas kelis norint įsitikinti, kad įvyko normalus pateliarinis sekimas. Tris dienas prieš operaciją visiems triušiams buvo sumaitintas penicilinas (15g /kg kūno svorio). Gyvūnai buvo apgyvendinti atskirai narvuose ir jiems buvo leidžiama laisvai judėti.

Gyvūnai buvo užmigdyti ketvirtą ir dvyliktą savaitę po operacijos anesteziniu būdu. Mėginiai buvo tiriami bendrais ir histopatologiniais tyrimais. Kiekviename laiko taške buvo tiriami 4 vienetai mėginių iš kiekvienos grupės.

MAKROSKOPINĖ MORFOLOGIJA.

Atliekant autopsiją, buvo pašalintos distalinės šlaunies dalys. Jos buvo nufotografuotos ir suskirstytos nuo 0 iki 12 pagal kremzlės atstatymo makroskopinį vertinimą, nustatytą Tarptautinės Kremzlės Atstatymo Bendruomenės (ICRS) (Papildoma Lentelė 2) kaip aprašyta anksčiau [25].

HISTOLOGINIAI TYRIMAI.

Po makroskopinio vertinimo, mėginiai buvo laikomi 4% formaldehyde 7 dienas. Taip pat jie buvo nukalkinti 10% metileno tiamino tetraacto rūgštyje (EDTA) keturias savaites laikant kambario temperatūroje bei dehidratuoti keletu alkoholio tirpalų (nuo 70% iki 90%) ir po to įdėti į parafino vašką. Po įdėjimo mėginiai buvo supjaustyti į 5µm dalis. Po to šios dalys buvo pažymėtos hematoksilinu ir eozinu ICRS histologiniam rezultatui bei Safraninu O/ glikosaminoglikano turinio vertinimui. ICRS histologinis rezultatas yra matuojamas nuo 0 iki 18 (Papildoma Lentelė 3) [26].

STATISTINĖ ANALIZĖ IN VIVO TYRIMUI.

Visi rezultatai buvo aprašomi kaip \pm standartiniai nukrypimai. Vienpusis ANOVA metodas buvo panaudotas atliekant statistinę analizę. $p \leq 0,05$ buvo naudojamas kaip statistinis rodmuo. Visos vertės buvo tirtos naudojant SPSS įrangą (versija 20.0; IBM, America.)

REZULTATAI.

Chondrocitų proliferacija

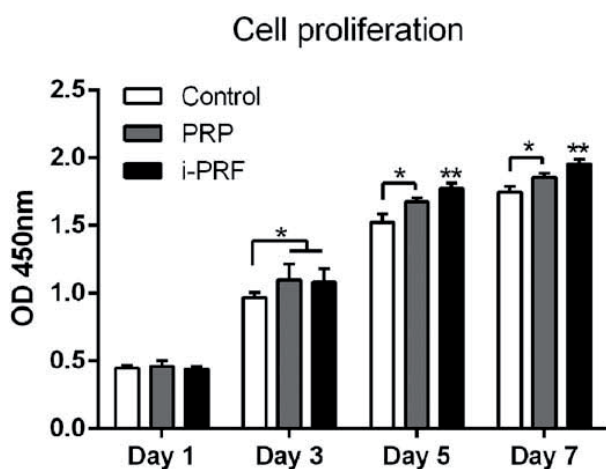
Pirmąją dieną po ląstelių paskleidimo žymesnių chondrocitų skaičiaus skirtumų tarp visų grupių nestebėta, nepriklausomai nuo to, ar buvo PRP (platelet rich plasma – trombociais praturtinta plazma) ir i-PRF (injectable platelet rich fibrin – injekuojamas trombociais praturtintas fibrinas). Tačiau 3-ą, 5-ą ir 7-ą dieną po ląstelių paskleidimo buvo nustatyta, kad tiek PRP, tiek i-PRF labai padidina chondrocitų proliferacijos greitį palyginus su kontrolinėmis plastinėmis audinių kultūromis. Be to, 5-ą ir 7-ą dieną i-PRF buvo gerokai didesnis, nei PRP (1 piešinys).

Susijusių su chondrogenze genų raiška

Su chondrogenze susijusių genų SOX9, COL2A1 ir ACAN mRNR kiekius galima išmatuoti naudojant realaus laiko PGR (polimerazės grandininę reakciją (PCR, polimerase chain reaction)). Nustatyta, kad tiek PRP, tiek i-PRF didino SOX9, COL2A1 ir ACAN raišką palyginus su kontrole, ir i-PRF labiausiai didino šių trijų genų raišką (2 piešinys).

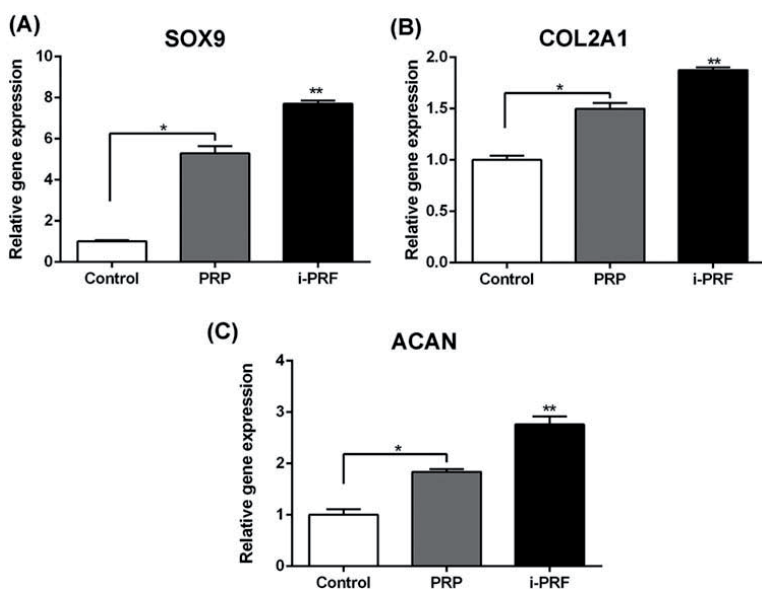
PRP ir i-PRF poveikis kremzlės regeneracijai esant IL-1b indukuotai uždegiminei būklei

Osteoartritui stimuliuoti buvo naudojamas IL-1b. Buvo nustatyta, kad IL-1b slopina SOX9, COL2A1 ir ACAN raišką chondrocituose tuo pat metu didindamas ADAMTS4 ir PTGS2 raišką. Palyginus su IL-1b grupe, PRP ir i-PRF didino proregeneracinių genų SOX9, COL2A1 ir ACAN raišką ir mažino ADAMTS4, PTGS2 ir MMP13 raišką. Be to, naudojant i-PRF buvo stebima didžiausia SOX9, COL2A1 ir ACAN raiška ir mažiausia ADAMTS4 ir PTGS2 raiška (3 piešinys).



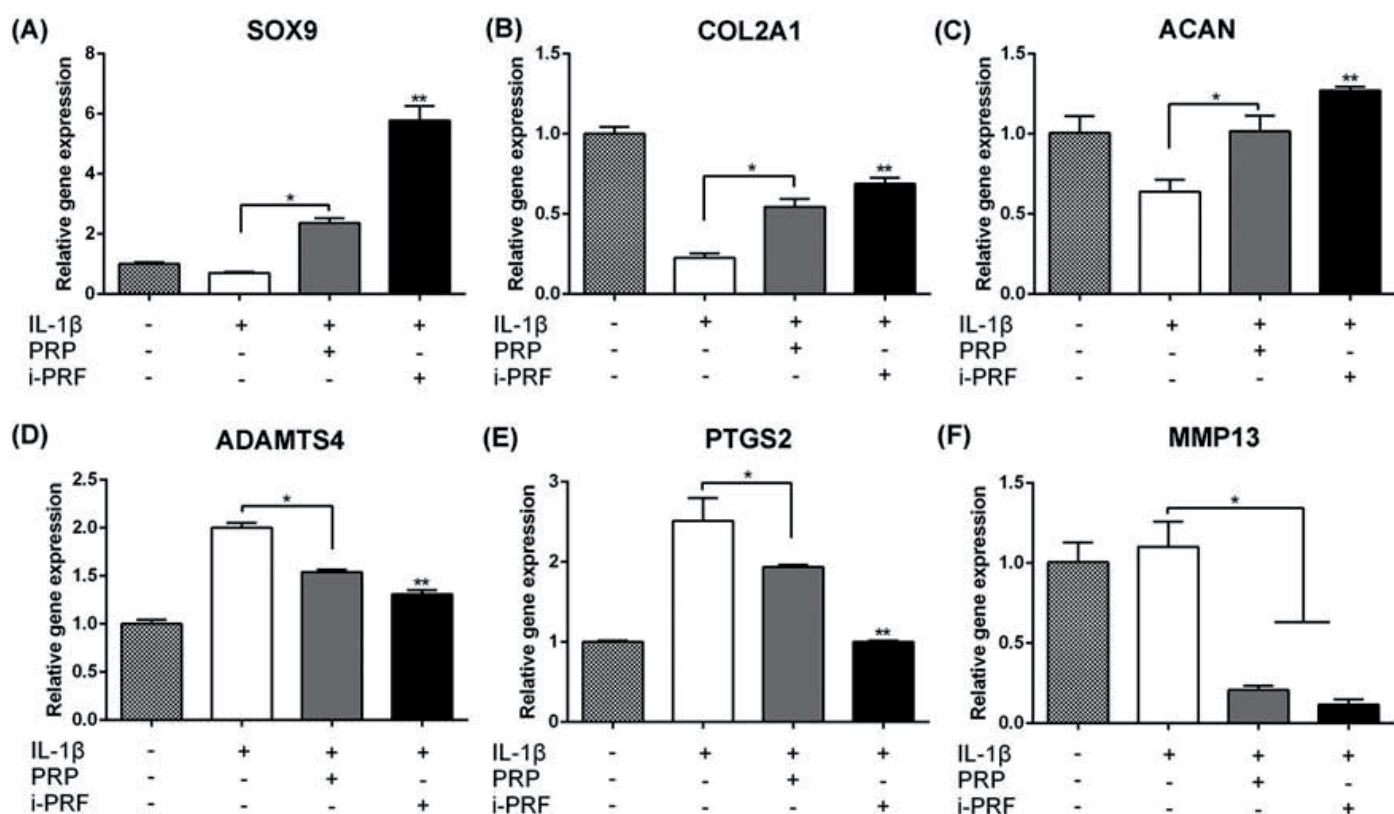
1 piešinys.

PRP ir i-PRF poveikis triušio chondrocitų proliferacijai 1-ą, 3-ą ir 5-ą dieną (* reiškia žymius skirtumus tarp dviejų grupių, $p < 0,05$; ** reiškia žymiai didesnę skirtumą, palyginus su visomis kitomis gydymo grupėmis, $p < 0,05$). Tyrimas kartotas tris kartus atliekant 3 nepriklausomus eksperimentus.



2 piešinys.

PRP ir i-PRF poveikis su regeneracija susijusiems ir su ECM (ekstracelulinis matiksas) susijusiems genams po 7 dienų. (A) SOX9; (B) COL2A1; ir (C) ACAN. (* reiškia žymius skirtumus tarp dviejų grupių, $p < 0,05$; ** reiškia žymiai didesnę skirtumą, palyginus su visomis kitomis gydymo grupėmis, $p < 0,05$). Tyrimas kartotas tris kartus atliekant 3 nepriklausomus eksperimentus.

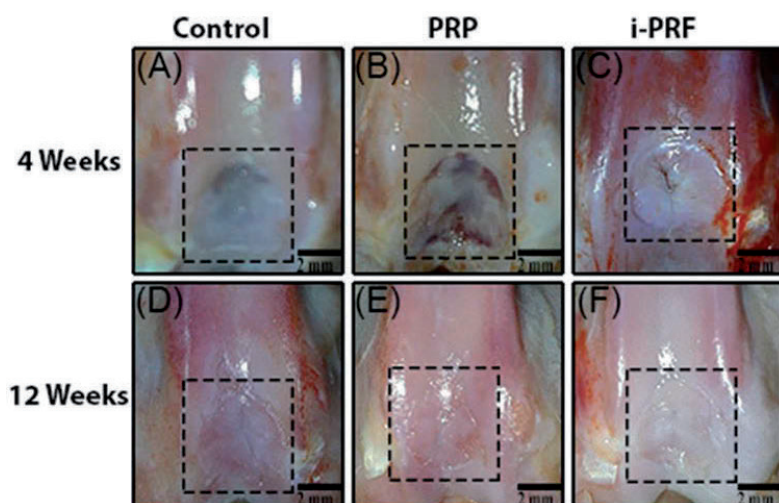


3 piešinys.

PRP ir i-PRF poveikis su regeneracija susijusiems ir su ECM (ekstracellular matrix – ekstraląstelinis matiksas) susijusiems genams po 7 dienų esant ir nesant IL1b. (A) SOX9; (B) COL2A1; (C) ACAN; (D) ADAMTS24; (E) PTGS2 ir (F) MMP13. (* reiškia žymius skirtumus tarp dviejų grupių, $p < 0,05$; ** reiškia žymiai didesnį skirtumą, palyginus su visomis kitomis gydymo grupėmis, $p < 0,05$). Tyrimas kartotas tris kartus atliekant 3 nepriklausomus eksperimentus.

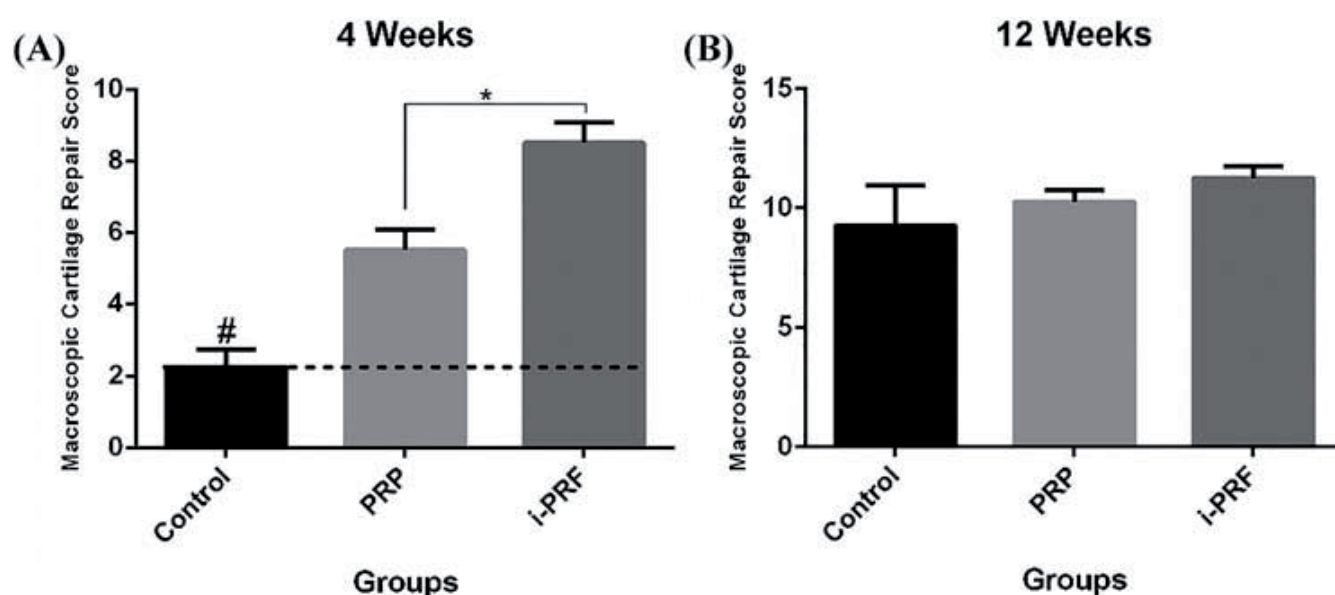
MAKROSKOPINIS KREMZLĖS DEFECTŲ STEBĖJIMAS.

Visose grupėse regeneruotų kaulų ir kremzlių defektų plotai buvo pažiūrėti makroskopiškai praėjus 4 ir 12 savaičių po operacijos (4 piešinys). Po 4 savaičių i-PRF grupėje apdoroti defektai makroskopiškai atrodė beveik visiškai sugiję, padengti balta nepermatoma medžiaga, jų integracija su aplinkiniais sveikais kremzlės audiniais buvo gera (4 piešinys). PRP ir kontrolinėje grupėse apdoroti plotai buvo padengti balta ir rausva nepermatoma, dėmėta medžiaga, palyginus su i-PRF grupe integracijos su aplinkiniais sveikais kremzlės audiniais nestebėta (4A, B ir C piešinys). Kontrolinės grupės ICRF (International Cartilage Repair Society – Tarptautinė kremzlės atkūrimo draugija) rodiklis kontrolinėje grupėje buvo gerokai žemesnis, nei PRP ir i-PRF grupėse, ir ICRF rodiklis i-PRG grupėje buvo gerokai didesnis, nei PRP grupėje ($p < 0,05$) (5a piešinys). Po 12 savaičių visose grupėse makroskopinė išvaizda buvo vienoda, paviršius buvo lygus, integracija su aplinkiniais sveikais kremzlės audiniais buvo gera (4D, E ir F piešiniai). Didesnio ICRS rodiklio skirtumo nebuvo ($p < 0,05$) (5b piešinys).



4 piešinys.

Kaulo ir kremzlės defektų makroskopinis vaizdas 4-ą ir 12-ą savaitę po operacijos kontrolinėje grupėje (A ir D), PRP grupėje (B ir E) ir i-PRF grupėje (C ir F).



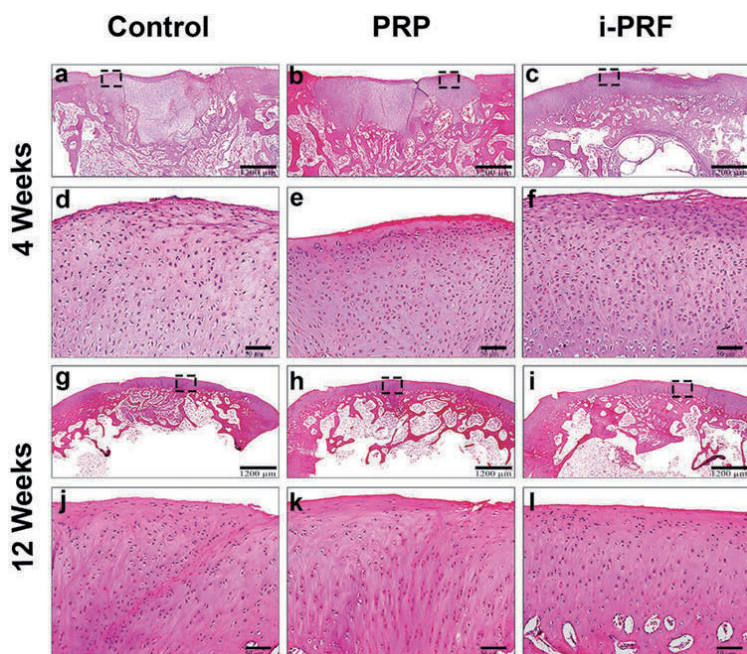
5 piešinys.

Trochlearinio griovelio regeneruotų kaulo ir kremzlės defekto ICRS makroskopiniai rodikliai praėjus 4 savaitėms (A) ir 12 savaitėms (B) po operacijos. Pateikiami vidurkiai \pm standartinis nuokrypis (SN). #: žymiai mažiau, nei PRP ir i-PRF grupėse; $p < 0,05$

KREMZLĖS DEFEKTŲ MIKROSKOPINIS APRAŠYMAS.

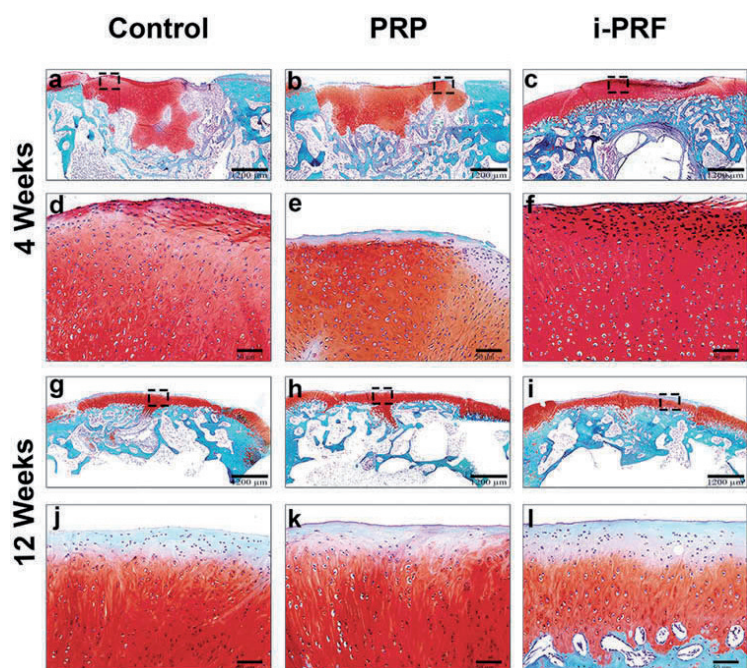
Praėjus 4 ir 12 savaitėms po operacijos, kaulo ir kremzlės defektų regeneruoti plotai visose grupėse buvo įvertinti mikroskopiškai, naudojant dažymą hematoksilinu ir eozinu ir safraninu O. Po 4 savaitėms i-PRF grupėje (6c ir f piešiniai) (7c ir f piešiniai) mikroskopinė apdorotų defektų apžiūra parodė, kad kremzlės defektas visiškai sugijom jis padengtas hialino audinių (teigiamas nudažymas safraninu O), jo paviršius lygus, o šalia esančio normalaus kremzlės audinio storis normalus. Taip pat stebėta geresnė atkurto audinio integracija su aplinkine sąnario kremzle. Be to, atkurtame audinyje stebėti didelių ląstelių su gausia citoplazma klasteriai (į chondrocitus panašios ląstelės). Po atkurta kremzle esantis kaulas i-PRF grupėje taip pat regeneravo, suintensyvėjo kaulo remodeliavimas. PRP grupėje ir kontrolinėje grupėje defektai buvo visiškai užpildyti audiniu, kuriame daug proteoglikanų, teigiamai nusidažančiu safraninu O, pokremzlinio kaulo remodeliavimas buvo suintensyvėjęs (stebėta į fibrozinį audinį panaši kremzlė, o ne kaulinis audinys ((6a, b, d ir e piešiniai) (7a, b, d ir e piešiniai). Atkurtame audinyje stebėtos arba išsisklaidę, arba izogeninės gana didelių apvalių ląstelių, kuriose yra daug citoplazmos, grupės. Po 4

savaičių ICRS rodiklis i-PRF grupėje buvo gerokai didesnis, nei PRP ir kontrolinėje grupėje ($p < 0,05$) (8a piešinys). Po 12 savaičių i-PRF grupėje mikroskopiškai stebėta visiška apdoroto kremzlės defekto regeneracija (6i ir l piešiniai) (7i ir l piešiniai) ir pokremzlinių kaulo dalių regeneracija su visiška integracija su aplinkiniais normaliais audiniais ir normaliais chondrocitais. PRP ir kontrolinėje grupėje tik po 12 savaičių stebėta ne visai užbaigta regeneracija su gera integracija su aplinkiniu sveiku kremzlės audiniu (6g, h, j ir k piešiniai) (7g, h, j ir k piešiniai). Tiek PRP, tiek kontrolinėje grupėse pokremzlinio kaulinio audinio regeneracija buvo neužbaigta, stebėti liekamieji kaulų defektai. Kontrolinėje grupėje ICRS rodiklis buvo gerokai žemesnis, nei i-PRF ir PRP grupėse, tačiau i-PRF grupėje jis buvo ženkliai didesnis, nei PRP grupėje ($p < 0,05$) (8b piešinys).



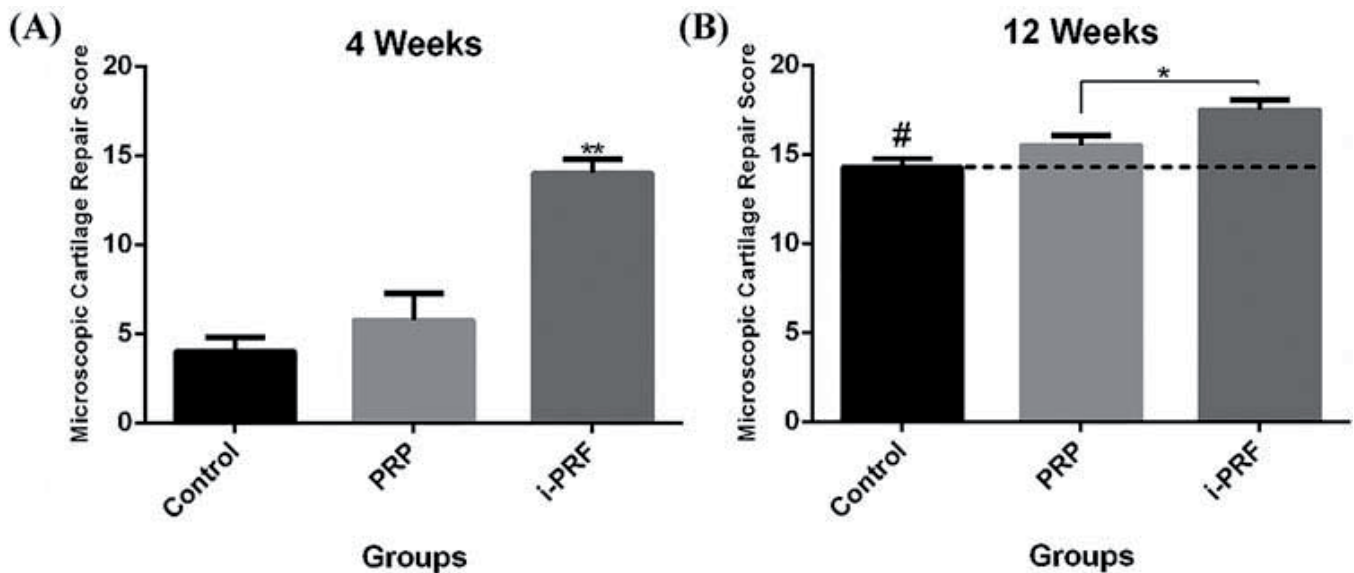
6 piešinys.

Trochlearinio griovelio regeneruoto kaulų ir kremzlių defektų histologinė išvaizda po dažymo hematoksilinu ir eozinu po 4 savaičių (a-f) ir 12 savaičių (g-l).



7 piešinys.

Trochlearinio griovelio regeneruoto kaulų ir kremzlių defektų histologinė išvaizda po dažymo safraninu po 4 savaičių (a-f) ir 12 savaičių (g-l).



8 piešinys.

Trochlearinio griovelio regeneruotų kaulų ir kremzlių defektų ICRS rodikliai praėjus po operacijos 4 savaitėms (A) ir 12 savaičių (B). Duomenys pateikti kaip vidurkiai \pm SN. **: gerokai didesnis, nei kontrolinėje ir PRP grupėse; #: gerokai mažesnis nei PRP ir i-PRF grupėse.

APTARIMAS.

Nepaisant didelės chirurginių metodikų ir procedūrų pažangos, kremzlės pažeidimas ir jos pažeidimų gydymas yra rimta klinikinė problema. Pastaruoju metu daug pastangų buvo dedama siekiant praplėsti kremzlės gijimo potencialą pasitelkus natūralius procesus [27]. Šio tyrimo tikslas yra pirmą kartą ištirti modernios injekuojamos PRF metodikos poveikį kremzlės gijimui esant kritinio dydžio kaulų ir kremzlių defektui ir palyginti jį su dažnai naudojamu PRP, pasitelkus triušio modelį.

Per paskutinįjį dešimtmetį PRP tapo auksiniu audinių regeneracijos standartu gydant kelio sąnarį, kadangi jis yra autologinių augimo faktorių šaltinis, jis pelnė platų pripažinimą chirurgijoje, tokiose srityse kaip kaulų regeneracija ortopedijoje, periodonto bei veido ir žandikaulių chirurgijoje, otorinolaringologijoje ir plastinėje chirurgijoje [28, 29]. PRP atpalaiduoja endogeninius augimo faktorius, kurie vaidina svarbų vaidmenį audinių atkūrimo procese, ypač tais atvejais, kai vaskuliarizacija negausi ir ląstelių tankis nedidelis [30].

Vis dėlto, nors PRP išlieka auksiniu standartu atliekant minimaliai invazines operacijas sportininkams ir vyresnio amžiaus žmonėms, kremzlinio audinio atkūrimo tyrimų rezultatai yra prieštaringi [31, 32], ir manoma, kad tai gali būti susiję su įvairiais PRP frakcijų plazmoje deriniais [32]. Wu su bendraautorais 2007 metais paskelbė, kad kremzlės susiformavimo galimybė PRP sukurtoje struktūroje padidėja, kai naudojant triušio modelį PRP buvo naudojama kaip kultivuotų autologinių chondrocitų nešėjo sistema [33]. Qi su bendraautorais 2009 metais atliktas autologinės PRF tyrimas parodė, kad PRF gerina kolageno matriksą sintezę ir stimuliuoja kremzlės formavimąsi esant didelėms defektams, kurių gydymui reikėjo osteochondrinių transplantatų ir autologinių chondrocitų implantacijos [10]. Kitas Lee ir bendraautorių 2013 metų tyrimas leido padaryti prielaidą, kad triušio kelio sąnario kaulų ir kremzlių defektų gydymas gali būti pagreitinamas naudojant PRP gelio su sinovine membrana iš mezenchimos kamieninių ląstelių transplantaciją (SDSC) [1]. Pagaliau, jau anksčiau buvo nurodyta, kad PRF augimo faktoriai turėtų būti laikomi terapine galimybe, skatinančia kremzlės atkūrimą gydant ankstyvos stadijos degeneraciją dėl keliosąnario osteoartrito [13].

Per paskutinįjį dešimtmetį trombocitų koncentratai buvo gerokai patobulinti. PRF yra trombocitų koncentratas, kuris suformuoja trimatį matriksą, kuriame yra visi ląsteliniai ir molekuliniai elementai, būtini audinių atkūrimui [34]. Jame yra daugiau gaunamų iš kraujo augimo faktorių, tačiau jį lengviau pagaminti, jam centrifuguoti reikia mažiau laiko, ir jo sudėtyje nėra jokių priedų [35]. PRF matriksas geba „pagauti“ cirkuliuojančius citokinus [36], todėl padidėja jų gyvavimo trukmė ir pagerėja jų naudojimas ankstyvose matriksų remodeliacijos stadijose. Haleem su bendraautoriais 2010 m. papildomai naudodami PRF šalia BM-MSCTransplantatų nustatė, kad PRF per 6 mėnesius gerokai pagerino kelio sąnario funkcijos rodiklius vertinant juos MRI [37]. PRF buvo naudojamas kaip trimatis rėmas, tačiau neseniai buvo nustatyta, kad mažesnis centrifugavimo greitis ir laikas daro įtaką augimo faktorių atpalaidavimui ir ląstelių biologiniam aktyvumui PRF suformuotame matrikse [18-20, 22]. Esant dideliame centrifugos greičiui ląstelės stumiamos į centrifugavimo mėgintuvėlio dugną ir toliau nuo PRF matriksų krešulio, kuris formuojasi viršutiniams sluoksniams [17]. Todėl nustatyta, kad gravitacinės jėgos sumažinimas optimizuoja PRF [17]. Nepaisant to, kad PRF trimatė fibrino matrica nebūtinai yra ideali kelio regeneracijai, nustatyta, kad injekuojama PRP receptūra yra auksinis standartas minimaliai invazinėms procedūroms. Įdomu tai, kad nauja injekuojama skysta PRF receptūra (i-PRF) buvo sukurta dar labiau mažinant centrifugavimo greitį (gravitacinės jėgos reikšmė 60 per 3 minutes), todėl i-PRF tinka injekcijoms. Tai labai skiriasi nuo gravitacinės jėgos, naudojamos gaminant trombocitų koncentratą, kadangi anksčiau gaminant PRP buvo naudojama 2000 vienetų gravitacinė jėga. Šio naujo trombocitų koncentrato sudėtyje nėra jokių antikoagulantų, jis išlaiko skysčio klampumą maždaug 15 minučių ir po injekcijos suformuoja fibrino krešulį kelio sąnaryje. Todėl jis turi idealių savybių kremzlės regeneracijai.

PRP ir i-PRF turi daug privalumų palyginus su gyvulinės kilmės produktais ir rekombinantiniais augimo faktoriais, kadangi jie nesukelia imunologinių reakcijų ir neturi kancerogeninio poveikio, be to, jų naudojimo kaštai gerokai mažesni. Be to i-PRF, palyginus su PRP, turi papildomų privalumų, kadangi i-PRF gaminamas pagal vieną centrifugavimo protokolą ir jo sudėtyje yra didesnė leukocitų koncentracija. Šio tyrimo metu mes pirmą kartą tyrėme i-PRF, kaip potencialaus trombocitų koncentrato kremzlės proliferacijos regeneracinį potencialą.

Rezultatai parodė, kad i-PRF daro ženklų teigiamą poveikį kaulo ir kremzlės formavimuisi, tai parodė ir histologinė analizė (6 ir 7 piešiniai). Šis tyrimas taip pat parvirtino neseniai paskelbtą Evans su bendraautoriais (2007) idėją kaip paspartinti endogeninę kremzlės atkūrimą naudojant molekulinis stimulus, inicijuojančius reparacinius procesus *in situ* [38]. Nustatyta, kad viso storio didesnis nei 3 mm kremzlės defektas negali užgyti spontaniškai [39]. Šio darbo metu standartiniai 5 mm skersmens ir 5 mm gylio defektai buvo gydomi PRP, i-PRF ar negydomi. Įdomu tai, kad autologinis i-PRF inicijavo ir stimulavo greitą ir visišką kremzlės atkūrimą daug greičiau nei PRP. Rezultatai parodė, kad i-PRF buvo veiksmingesnis tiek praėjus 4, tiek 12 savaičių po operacijos ir vaidino teigiamą vaidmenį vykstant kremzlės defektų reparacijos procesams. Tai gali būti siejama su padidinta trombocitų, leukocitų ir augimo faktorių koncentracija, kuri inicijuoja chondroblastų migraciją ir proliferaciją ir BMSC ankstyvose kremzlės regeneracijos stadijose [10]. Verta atkreipti dėmesį, kad šio tyrimo metu defektai buvo sukurti jauno triušio gyvūnų modeliui. Žmonių osteoartritas yra ilgalaikė lėtinė liga, kuria visame pasaulyje serga milijonai žmonių. Akivaizdu, kad žmonių patologiniai defektai regeneruoja sunkiau, nei tie, kurie buvo sukurti šio tyrimo metu, kai nebuvo sisteminio uždegimo. Todėl šio tyrimo metu nustačius, kad i-PRF labai pagerina regeneraciją, galima tikėtis, jog atsiras galimybė gydyti sunkiai gyjančią kremzlę vyresnio amžiaus žmonėms. Norint patvirtinti šią hipotezę būtini tolesni klinikiniai tyrimai.

Ankstesnio Qi su bendraautoriais tyrimo (2009) duomenimis, atkurtos kremzlės kokybė defekto kraštuose buvo geresnė, nei centrinėje defekto srityje (naujas kremzlinis audinys formavosi nuo natyvinės kremzlės kraštų link defekto centro, ir pats defektas nebuvo visiškai uždengiamas). Autorių nuomone, tai galėjo nulemti chondrocitų migracijos nuo šalia esančios natyvinės kremzlės

potencialas [10]. Šis tyrimas patvirtino tokius duomenis. Neseniai tiriant įvairius ląstelių kultūrų modelius buvo nustatyta, kad i-PRF, palyginus su PRP, gerokai labiau skatino įvairių ląstelių įtraukimą į procesą [20, 21, 40]. Todėl galima buvo tikėtis, kad šio tyrimo metu i-PRF dėl savo gebėjimo pasitelkti ląsteles ir nukreipti jas audinių defekto link nulems lygesnę kremzlės regeneraciją. Šis tyrimas taip pat patvirtino mūsų hipotezę, kad ankstyva pokremzlinio kaulo regeneracija naudojant i-PRF daro ankstesnį teigiamą poveikį atkurtiems kremzlės audiniams. Vienas iš aspektų, kuriuos dar reikėtų ištirti, yra leukocitų inkorporavimas į trombocitų koncentratą. Leukocitų, esančių trombocitų koncentratų sudėtyje, poveikis buvo aptariamas ne tik kremzlės atkūrimo srityje, bet ir kitose srityse, įskaitant minkštųjų audinių ir kaulų regeneraciją. Todėl keletas mokslininkų grupių atliko eksperimentus siekiant ištirti tiesioginį leukocitų, esančių įvairiuose trombocitų koncentratuose, vaidmenį. Kaulų regeneracijos srityje nepriklausomos mokslininkų grupės atliko tris atskirus PRP su leukocitais ar be jų regeneracinio potencialo tyrimus. Kiekvienas šių tyrimų parodė, kad pridėjus leukocitų PRP regeneracinis potencialas padidėdavo [41–43].

Kremzlės regeneracijos srityje duomenų apie tiesioginį leukocitų vaidmenį vykstant trombocitų indukuotai regeneracijai yra nedaug. Kiek autoriams žinoma, dauguma tyrimų yra neįtikinami ar neanalizavo tiesiogiai leukocitų vaidmens naudodami „išjungimo“ ar „įjungimo“ modelius. Tačiau mūsų grupė išanalizavo seriją leukocitų priedo poveikio ląstelių elgesiui ir augimo faktorių atpalaidavimui tyrimų in vitro. Šių tyrimų metu nustatyta, kad didesnis leukocitų skaičius skatino atpalaiduoti daugiau augimo faktorių ir skatino audinių gijimą [22, 44]. Atsižvelgdama į dvi metodikas, naudotas šiame tyrime (PRP ir i-PRF), mūsų grupė neseniai atliko 3 in vitro tyrimus, tiesiogiai lygindama skystą injekuojamą PRF (didelė leukocitų koncentracija) su PRP (maža leukocitų koncentracija) [20, 21, 40]. Kiekviename iš šių tyrimų i-PRF rezultatai buvo geresni, ir buvo iškelta hipotezė, kad leukocitų inkorporavimas vaidino svarbiausią vaidmenį, kadangi augimo faktorių koncentracija i-PRF ir PRP buvo labai panaši. Todėl manoma, kad geresnis žaizdų gijimas, kurį nulemia i-PRF, susijęs su A) antikoaguliantų pašalinimu ir (arba) B) leukocitų inkorporavimu [20, 21, 40]. Vis dėlto siekiant patvirtinti leukocitų naudą vykstant kremzlės atkūrimui būtina atlikti daugiau tyrimų.

IŠVADOS.

Šios tyrimo rezultatai pirmą kartą parodė, kad naudojant mažo greičio centrifugavimo būdu pagamintą i-PRF, kremzlės regeneracija ankstyvose atkūrimo stadijose vyksta sparčiau. Nors buvo nustatyta, kad PRP pagerino kaulo ir kremzlės atkūrimo procesą per 12 savaičių, rezultatai naudojant i-PRF buvo akivaizdžiai geresni praėjus po operacijos vos 4 savaitėms. Apibendrinant galima teigti, kad autologinis i-PRF ankstyvoje kremzlės regeneracijos stadijoje pagerino subchondrinės kaulinės plokštelės formavimąsi praėjus po operacijos vos 4 savaitėms. Būtina atlikti tolesnius gyvūnų tyrimus ir žmonių klinikinius tyrimus siekiant ištirti i-PRF potencialą atkuriant kremzlę.