

# Augimo faktorių išsiskyrimas iš PRP, PRF ir pažangiojo A-PRF lyginamasis tyrimas

Eizaburo Kobayashi<sup>1,3</sup> • Laura Flückiger<sup>2</sup> • Masako Fujioka-Kobayashi<sup>1,4</sup> •  
Kosaku Sawada<sup>1,3</sup> • Anton Sculean<sup>2</sup> • Benoît Schaller<sup>1</sup> & Richard J. Miron<sup>2,5</sup>

Gauta: 2015 m. rugsėjo 18 d. / priimta: 2016 m. sausio 11 d.  
# Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

## Santrauka

**Tikslai.** Pastaraisiais metais vis didesnis dėmesys skiriamas trombocitų koncentratų pritaikymo galimybėms šiuolaikinės odontologijos regeneracinėse procedūrose. Šiuo tyrimu buvo siekiama palyginti augimo faktoriaus išsiskyrimą iš trombocitų prisotintos plazmos (PRP), trombocitų prisotinto fibrino (PRF) ir pažangiojo PRF (A-PRF) (pagal modernizuotą protokolą paruošto PRF).

**Medžiagos ir metodai.** Iš šešių donorų buvo paimta aštuoniolika kraujo mėginių (po tris PRP, PRF ir A-PRF mėginius). Paruošti mėginiai buvo centrifuguojami ir augimo faktorių išsiskyrimas buvo vertinamas po 15 min., 60 min., 8 val., 1 d., 3 d. ir 10 dienų. Po to taikant ELISA metodą buvo kiekybiškai nustatomas PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, TGFβ1, VEGF, EGF ir IGF augimo faktorių išsiskyrimas. **Rezultatai** Iš trombocitų koncentratų daugiausia išsiskyrė PDGF-AA ir šiek tiek mažiau PDGF-BB, TGFβ1, VEGF ir PDGF-AB. Apskritai, po 15–60 min. trukmės centrifugavimo, iš PRP išsiskyrė reikšmingai didesnis augimo faktorių kiekis nei iš PRF ir A-PRF. Vėlesniuose laiko taškuose,

per 10 dienų laikotarpį, iš A-PRF nuolat išsiskyrė didžiausias bendras augimo faktorių kiekis. Be to, palyginti su PRP arba PRF, per 10 dienų laikotarpį iš A-PRF išsiskyrė žymiai didesnis bendras sukauptųjų baltymų kiekis.

**Išvada** Šio tyrimo rezultatai rodo, kad įvairūs trombocitų koncentratai pasižymi gana skirtinga išsiskyrimo kiekiais. PRP privalumas yra tas, jog išsiskiria žymiai didesnis baltymų kiekis ir tai įvyksta anksčiau nei naudojant PRF, kuris pasižymėjo nuolatiniu ir stabilium augimo faktorių išsiskyrimu per 10 d. laikotarpį. Be to, buvo pastebėta, kad naujos formos PRF (A-PRF), palyginti su tradiciniu, lėmė reikšmingai didesnę bendrą išsiskyrusių augimo faktorių kiekį. **Klinikinė reikšmė** Remiantis šiomis išvadomis, PRP galima rekomenduoti tais atvejais, kai reikia greito augimo faktorių poveikio, o A-PRF labiau tinka tada, kai reikia ilgalaikio išsiskyrimo ir poveikio. Vyksta nenutraukiamas regeneracijos bei vaskuliarizacijos procesas visas 10 dienų. Naujų ląstelių susidarymas.

Reikšminiai žodžiai Trombocitų prisotinta plazma.

Trombocitų prisotintas fibrinas. Choukroun'o PRF.

Trombocitų koncentratai. Augimo faktorių išsiskyrimas

\* Richard J. Miron richard.miron@zmk.unibe.ch

<sup>1</sup> Berno universiteto Veido ir žandikaulių chirurgijos katedra, Bernas, Šveicarija

<sup>2</sup> Berno universiteto Periodontologijos katedra, Bernas, Šveicarija

<sup>3</sup> Nijigatos praktinės odontologijos mokyklos Veido ir žandikaulių chirurgijos katedra, „The Nippon Dental University“, Nijigata, Japonija

<sup>4</sup> Tokušimos universiteto podiplominių studijų mokyklos Biomedicinos mokslų instituto Burnos chirurgijos ir klinikinės odontologijos katedra, Tokušima, Japonija

<sup>5</sup> Berno universiteto Dantų medicinos mokyklos Burnos chirurgijos ir stomatologijos katedra, Bernas, Šveicarija

## Įvadas

Šiuolaikinėje odontologijoje taikoma daug kietųjų arba minkštųjų audinių regeneracijos paspartinimo metodų [1–4]. Nors pastaraisiais metais didelis dėmesys buvo skiriamas biologinių preparatų, kaip audinių regeneracijos pagrindinių mediatorių, pritaikymui, tačiau rekombinantiniai augimo faktoriai turi ir trūkumų: būtina skirti suprafizilogines dozes ir jų naudojamas susijęs su didelėmis išlaidomis [5–7]. Vis dėl to buvo įrodyta, kad augimo faktoriai (pvz., rekombinantinis trombocitų išskiriamas augimo faktorius (PDGF)) skatina audinių formavimąsi įvairių odontologinių ir kitokių medicinos procedūrų metu [8].

Published online: 25 January 2016

Nors rekombinantiniai augimo faktoriai pasižymėjo reikšmingais privalumais, taip pat buvo įrodyta, kad audinių regeneraciją skatina ir autologiniai trombocitų koncentratai [9, 10]. Trombocitų prisotinta plazma (PRP) yra autologinis augimo faktorių koncentratas, išgaunamas iš paciento kraujo, kuris centrifuguojamas siekiant išgauti aukštesnę už natūralią koncentraciją [9, 10]. Praėjusio amžiaus aštuntajame dešimtmetyje jis buvo pristatytas kaip fibrino klijai ir tapo populiarius medicinos ir odontologijos srityse tiek kietųjų, tiek ir minkštųjų audinių regeneracijai [11–16]. Ankstyvieji eksperimentai parodė, kad kraujyje randami keli pagrindiniai augimo faktoriai (įskaitant PDGF) pasižymi gebėjimu reikšmingai moduluoti audinių atkūrimo ir žaizdų gijimo procesus [11–16].

Nuo tada PRP plazmą naudoja tiek burnos chirurgai, tiek periodontologai ir ji pasižymi privalumais, susijusiais su jos panaudojimu įvairiose didelės apimties odontologinėse procedūrose [16–21]. Be to, atskaitose daroma išvada, kad PRP gali būti sėkmingai derinamas su įvairiomis biologinėmis medžiagomis, įskaitant kolageno membranas ir kaulų transplantatų medžiagas [22–27]. *Vienas iš pastebėtų PRP trūkumų yra tas, kad dėl jame esančių antikoagulantų PRP trikdo natūralų gijimo procesą, nors jame ir yra keli augimo faktoriai, kurie siejami su audinių regeneracija* [9, 10].

Po to, kai su PRP buvo atlikta daug pritaikymo tyrimų, tiriant toliau buvo nustatyta, kad trombocitų koncentratas, kuris gaminamas natūralaus kraujo nenaudojant koagulantų, taip pat gali būti ir toliau naudojamas kaip žaizdų gijimą gerinanti priemonė [28–32]. *Šis protokolą buvo pavadintas trombocitų prisotinto fibrino (angl. platelet-rich fibrin, PRF; pastaruoju metu taip pat vadinamas leukocitų PRF arba L-PRF) protokolu ir jo metu naudojamas fibrino krešulys, kuris gali būti panaudotas kaip autologinių augimo faktorių turinti membrana, skirta lėtam augimo faktorių išskyrimui odos gijimo proceso metu* [21, 33–36].

Pastaruoju metu šie tyrėjai sukūrė naują PRF protokolą, pagal kurį naudojamos patobulintos centrifugavimo procedūros, todėl dar labiau skatinama audinių regeneracija [37]. Ruošiant standartinį PRF, 12 min. centrifuguojama 2 700 aps./min., o trombocitų prisotintas pažangusis fibrinas (A-PRF) centrifuguojamas mažesniu greičiu (14 min. 1 500 aps./min.). Anksčiau buvo įrodyta, kad dėl tokio centrifugavimo protokolo pakeitimo *gaunama daugiau trombocitų ląstelių ir padidėja monocitų / makrofagų aktyvumas* [37]. Nepaisant šių išvadų, mažai žinoma apie augimo faktorių išsiskyrimą iš įvairių trombocitų koncentratų per tam tikrą laiką ir iki šiol nėra duomenų apie A-PRF. Todėl šio tyrimo tikslas buvo palyginti augimo faktorių išsiskyrimą iš PRP, PRF ir A-PRF per tam tikrą laiką ir ištirti septynių augimo faktorių in vitro išsiskyrimą po 15 min., 60 min., 8 val., 1 d., 3 d. ir 10 dienų po inkubacijos. Tarp tirtų augimo faktorių galima paminėti PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, transformuojantįjį augimo faktorių beta 1 (TGFβ1), kraujagyslinį endotelio augimo faktorių (VEGF), epidermio augimo faktorių (EGF) ir į insuliną panašų augimo faktorių (IGF).

## Medžiagos ir metodai:

### Trombocitų koncentracija

Iš šešių savanorių donorų buvo gauti informuoto asmens sutikimai ir iš kiekvieno buvo paimti trys kraujo mėginiai (iš viso 18 mėginių). Po to kraujas buvo centrifuguojamas siekiant išgauti PRP, PRF arba A-PRF. Visi kraujo mėginiai buvo paimti iš mūsų laboratorijos darbuotojų, kurių amžius svyravo nuo 30 iki 60 metų. PRP trombocitų koncentratas buvo rengiamas pagal pirmiau aprašytą protokolą [38]. 10 ml kraujo buvo centrifuguojama 7 min. 1 000 aps./min. greičiu (45 g) kambario temperatūroje, be stabdžio (centrifuga Eppendorf 5702, Darmštatas, Vokietija). Plazma buvo dekantuojama (atskirta) iki eritrocitų nuosėdų ir tada vėl 10 min. centrifuguojama 3 000 aps./min. (400 g) kambario temperatūroje. Galiausiai, PRP buvo dekantauta (atskirta) ir galutinės PRP nuosėdos suspenduotos 6 duobučių in vitro plastikinėse Petri lėkštelėse su 5 ml mitybinės terpės ir apdorotos toliau aprašytu būdu.

Be to, kaip pirmiau aprašyta, buvo atskirti PRF ir A-PRF [37]. Dešimt mililitrų kraujo be antikoagulianto buvo 12 min. centrifuguojama 2 700 aps./min. (325 g) greičiu, o A-PRF buvo 14 min. centrifuguojamas 1 500 aps./min. (100 g). *Šiuose mėginiuose nėra antikoagulantų, todėl gali susiformuoti fibrino krešulys, kurį vėliau galima surinkti mėgintuvėlio viduryje, tarp raudonųjų kraujo kūnelių apačioje ir neląstelinės plazmos viršuje.* Po to PRP, PRF ir A-PRF krešuliai buvo perkelti į 6 duobučių in vitro plastikines Petri lėkšteles su 5 ml mitybinės terpės ir apdoroti tolesniam tyrimui.

### Baltymų kiekybinis nustatymas taikant ELISA

Siekiant nustatyti išsiskyrusių augimo faktorių kiekį po 15 min., 60 min., 8 val., 1 dienos, 3 dienų ir 10 dienų, mėginiai buvo dedami į 37 °C vibracinį inkubatorių, kad augimo faktoriai galėtų išsiskirti į kultūrų terpę. Kiekvienu laiko momentu buvo surenkama 5 ml mitybinės terpės, ji buvo užšaldoma ir pakeičiama mitybinės terpės papildomais 5 ml. Baltymų kiekybinis nustatymas buvo atliekamas taikant ELISA metodą. Pageidaujamuose laiko taškuose buvo nustatomi šie kiekiai: PDGF-AA (DY221, intervalas = 15,60–1 000 pg/ml), PDGF-AB (DY222, intervalas = 15,60–1 000 pg/ml), PDGF-BB (DY220, 31,20–2 000 pg/ml), TGFβ1 (DY240, intervalas = 31,20–2 000 pg/ml), VEGF (DY293B, intervalas = 31,20–2 000 pg/

ml), IGF (DY291, intervalas = 31,20–2 000 pg/ml) ir EGF (DY236), intervalas = 3,91–250 pg/ml). Tai buvo atliekama taikant ELISA tyrimą („RND Systems“, Minneapolis, MN, JAV), pagal pirmiau aprašytą gamintojo protokolą [39]. 100 μl skiediklio ir 100 μl mėginio buvo trumpai (2 val.) inkubuojama kambario temperatūroje, iš anksto antikūnais padengtose 96 duobučių plokštelėse. Duobutės buvo keturis kartus nuplaautos plovimo buferiu, 2 val. inkubuojamos peroksidaze konjuguotame antikūnų tirpale, dar kartą nuplaautos ir tada 20–čiai minučių buvo pridėta 100 μl substrato tirpalo ir 20–čiai minučių – 50 μl stabdymo tirpalo. Absorbancija mikroplokštelių skaitytuvu „Infinite 200“ („Tecan Group LTD“, Männedorf, Šveicarija) buvo matuojama esant 450 ir 570 nm ir minusuojama esant 570 nm iš rodmenų esant 450 nm. Buvo matuojama po tris visų mėginių egzempliorius ir su kiekvienu trombocitų koncentratu buvo atlikti trys nepriklausomi

eksperimentai. Statistinė analizė buvo atliekama taikant dvifaktoriinę dispersinę analizę ANOVA su Bonferroni bandymu.

## Rezultatai

### Po 10 dienų iš PRP, PRF ir A-PRF išsiskyres bendras baltymų kiekis

Visi baltymai buvo vertinami siekiant nustatyti augimo faktorių išsiskyrimą pageidaujama laiko taškais ir bendrus sukaupytųjų baltymų kiekius (1–3 pav., 1 lentelė). Buvo nustatyta, kad, palyginti su PRF arba PRP, iš A-PRF išsiskyrė didžiausias bendras augimo faktorių kiekis (1 lentelė). Vėliau buvo nustatyta, kad, lyginant su kitais trombocitų koncentratais, jis pasižymėjo didžiausiu išsiskyrusio PDGF-AA kiekiu ir šiek tiek mažesniu TGF-beta1, PDGF-BB, PDGF-AB, VEGF, EGF ir IGF kiekiu. Tarp grupių buvo nustatyta nedidelių skirtumų (1 lentelė). *Buvo nustatyta, kad iš A-PRF po 10 dienų iš viso išsiskyrė 11 048,19 ng/ml baltymų, t. y. reikšmingai daugiau nei iš PRF (9 261,89 ng/ml) ir PRP (6 176,15 ng/ml). Įdomu, kad, palyginti su PDGF-AB ir PDGF-BB, iš visų trombocitų koncentratų išsiskyrusio PDGF-AA koncentracija buvo 6–10 kartų didesnė. Be to, palyginti su PDGF, TGF-beta1 ir VEGF koncentracijomis, buvo rasti žymiai mažesni EGF ir IGF kiekiai (1 lentelė).*

### PDGF-AA, PDGF-AB ir PDGF-BB augimo faktorių išsiskyrimas iš PRP, PRF ir A-PRF laiko atžvilgiu

PDGF-AA, PDGF-AB ir PDGF-BB augimo faktorių išsiskyrimo kiekviename konkrečiame laiko taške ir laikui bėgant susikaupusio kiekio analizė pavaizduota 1 pav. *Buvo nustatyta, kad po 15 min. iš PRP išsiskyrė reikšmingai didesnis PDGF-AA kiekis nei iš PRF ar A-PRF. Įdomu, kad po 60 min. buvo nustatyti žymiai mažesni kiekiai ir tai rodo, kad pirmąsias 15 min. PDGF-AA išsiskyrimas iš PRP yra spartus, o vėliau (iki 10 d.) nustatytas žymiai mažesnis išsiskyrimo lygis (1a pav.).* Vertinant A-PRF ir PRF išsiskyrimą tam tikruose laiko taškuose nuo 15 min. iki 1 d. nebuvo pastebėta jokių reikšmingų skirtumų; tačiau trečiąją dieną, palyginti su PRP arba PRF, A-PRF pasižymėjo reikšmingai didesniu išsiskyrusio PDGF-AA augimo faktoriaus kiekiu (1a pav.). Visas per tam tikrą laiką sukaupytų PDGF-AA baltymų kiekis (1b pav.) rodo, kad nors PRP pasižymėjo žymiai didesniu kiekiu ankstyvame 15 min. laiko taške, po to (nuo 8 val. iki 10 dienų) buvo nustatyti reikšmingai mažesni kiekiai. Kita vertus, reikšmingai didesni iš A-PRF išsiskyrę kiekiai buvo nustatyti nuo 1 iki 10 d., palyginti su PRP arba PRF (1b pav.). Panašios tendencijos buvo nustatytos ir tiriant PDGF AB bei PDGF-BB (1c–f pav.). Tačiau įdomu tai, kad, palyginti su PRF ir A-PRF, bendrasis PDGF-BB augimo faktoriaus baltymų kiekis PRP

mėginiuose buvo reikšmingai didesnis visuose laiko taškuose (1f pav.).

### TGFB1 ir VEGF augimo faktorių išsiskyrimas iš PRP, PRF ir A-PRF laiko atžvilgiu

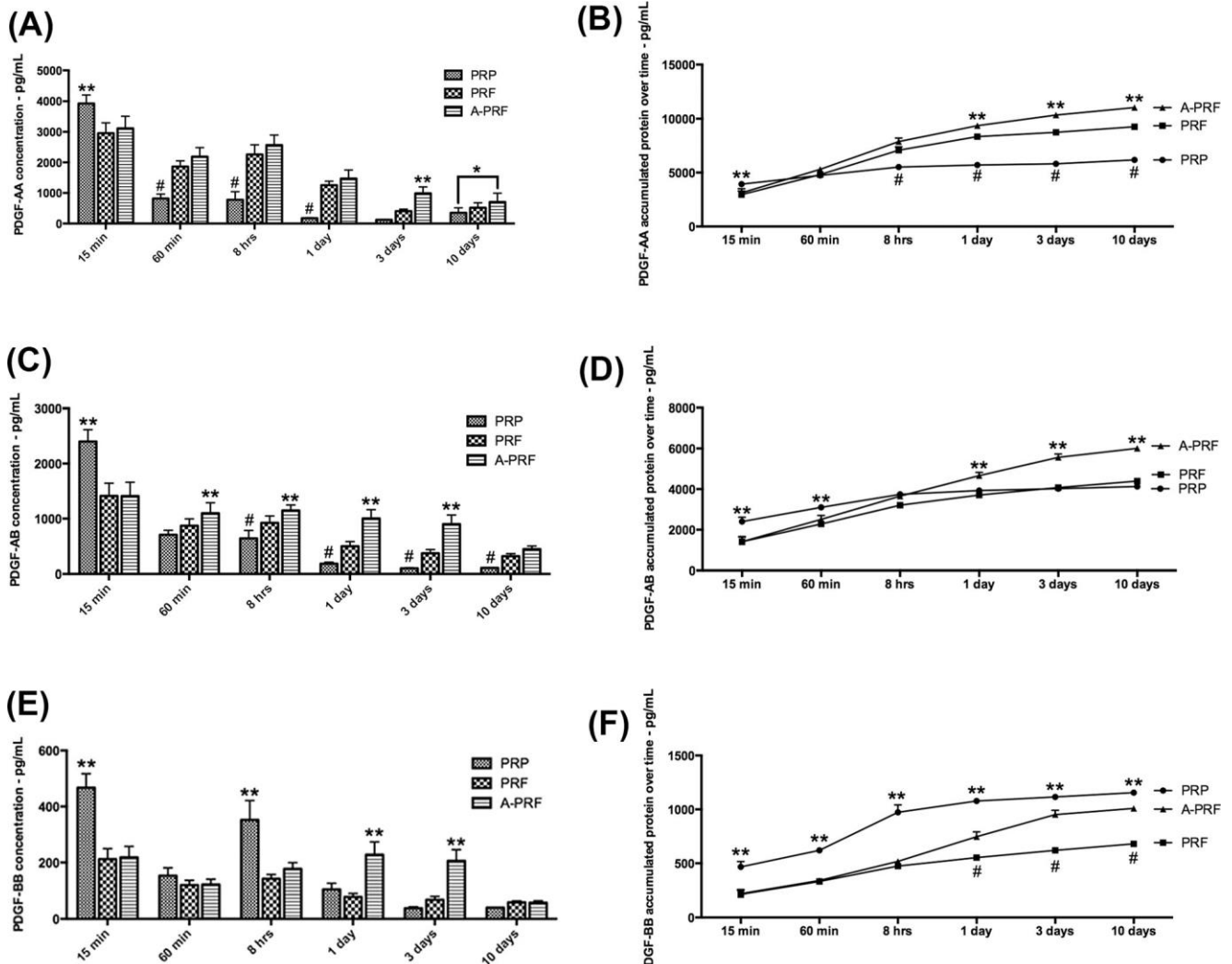
Po to buvo vertinamas TGFB1 ir VEGF išsiskyrimas per tam tikrą laiką (2 pav.). Čia taip pat PRP pasižymėjo žymiai didesniais kiekiais ankstyvuose laiko taškuose (po 15 min ir po 8 val.), palyginti su PRF ir A-PRF (2a, c pav.). Analizuojant PRP vėliau gauti kiekiai sumažėjo žymiai labiau nei tie, kurie buvo gauti su PRF arba A-PRF. A-PRF pasižymėjo reikšmingai didžiausiomis TGFB1 ir VEGF koncentracijomis 1, 3 ir 5 dieną (2a, c pav.). Vertinant PRP rezultatus, panašiai kaip PDGF atveju, bendrasis sukaupytųjų baltymų kiekis buvo reikšmingai didžiausias ankstyvuose laiko taškuose ir 10 dieną, palyginti su PRF ir A-PRF, reikšmingai sumažėjo (2b, d pav.). *Bendrasis iš A-PRF išsiskyrusių baltymų kiekis buvo reikšmingai didžiausias 3 ir 10 d. (TGFB1) ir 1, 3 ir 10 d. (VEGF), palyginti su PRP ir PRF (2b, d pav.).*

### EGF ir IGF augimo faktorių išsiskyrimas iš PRP, PRF ir A-PRF laiko atžvilgiu

Buvo pastebėtos skirtingos EGF ir IGF išsiskyrimo tendencijos (3 pav.). Tiriant PRP, reikšmingai didesni kiekiai buvo nustatyti tik 15 d. (3a pav.). Po jų, reikšmingai didžiausias išsiskyrusių baltymų (EGF) kiekis buvo nustatytas vertinant A-PRF duomenis: 60 min., 8 val., 1 d. ir 3 d. (3a pav.). *Nors beveik visuose laiko taškuose tarp PRF ir A-PRF nebuvo galima pastebėti baltymų (IGF) išsiskyrimo skirtumų, tačiau kai kalbama apie PRP, palyginti reikšmingai mažesnis lygis buvo nustatytas 15 min., 60 min., 8 val. ir 1 d. (3c pav.).* Bendras sukaupytųjų baltymų kiekis parodė, kad didžiausiu EGF augimo faktoriaus kiekiu pasižymėjo A-PRF, o PRP plazmoje šio augimo faktoriaus buvo mažiausiai. Palyginti su A-PRF, PRF fibrinas turėjo šiek tiek daugiau IGF (3d pav.).

## Aptarimas

*Šio tyrimo tikslas buvo palyginti augimo faktoriaus išsiskyrimą iš trijų skirtingų trombocitų koncentratų – PRP, PRF ir naująjį protokolą, kuris vadinamas trombocitų prisotintu pažangiuoju fibrinu PRF (angl. advanced-PRF). Nors manoma, kad pažangesni trombocitų koncentratai pagerina audinių regeneraciją [37], iki šiol nėra duomenų apie augimo faktorių išsiskyrimą iš šių trijų trombocitų koncentratų per tam tikrą laiką. Todėl šio tyrimo tikslas buvo išsamiai ištirti penkis skirtingus augimo faktorius, įskaitant tris PDGF izomerus (AA, AB ir BB), kad būtų galima*



1 pav. PDGF-AA (A), PDGF-AB (C) ir PDGF-BB (E) baltymų kiekybinis nustatymas taikant ELISA metodą kiekviename laiko taške per 10 dienų laikotarpį. Bendras sukaupytasis per 10 dienų laikotarpį išsiskyrusio augimo faktoriaus kiekis, PDGF-AA (B), PDGF-AB (D) ir PDGF-BB (F). (\* $p < 0,05$  reiškia reikšmingą

skirtumą tarp grupių, \*\* $p < 0,05$  reiškia žymiai didesnį kiekį nei visose kitose grupėse, # $p < 0,05$  reiškia žymiai mažesnį kiekį nei visose kitose grupėse.) Tyrimas buvo atliktas su šešiais skirtingais kraujo mėginiais ir pakartotas tris kartus.

nustatyti baltymų išsiskyrimą iš PRP, PRF ir A-PRF per tam tikrą laiką.

Analizuojant šio tyrimo rezultatus galima išskirti tris pagrindinius aspektus. Pirmia, buvo nustatyta, kad, palyginti

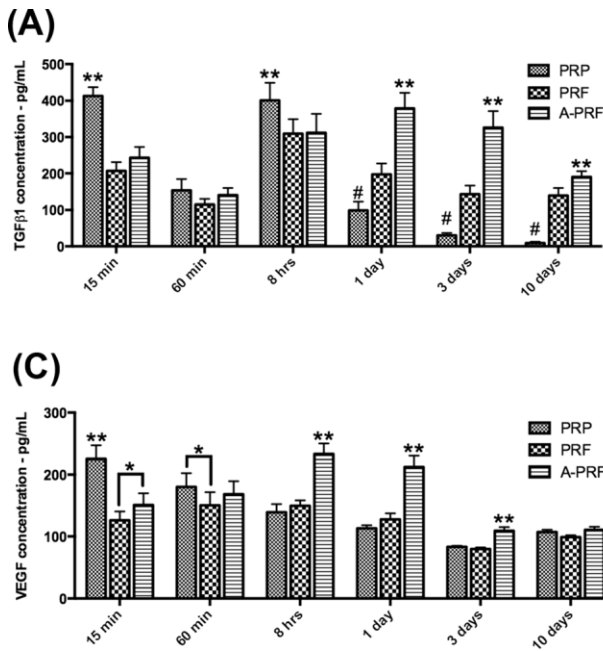
su PRF arba A-PRF, iš PRP didžiausias augimo faktorių kiekis išsiskyrė ankstyvuose laiko taškuose. Galima spėti, kad PRP koncentratuose randamų išskirtųjų baltymų greitas veikimas paspartina ląstelių-pirmtakų mobilizaciją pažeistose vietose

1 lentelė. Per 10 dienų laikotarpį iš įvairių trombocitų koncentratų, įskaitant PRP, PRF, ir A-PRF išsiskyręs augimo galutinis faktorius

	PRP	PRF	A-PRF
PDGF-AA	6176 (2812–9184)	9262 (2877–13839)	11048 (5036–18817)
PDGF-AB	4131 (1837–5492)	4396 (862–7563)	6007 (3455–10298)
PDGF-BB	1155 (531–1371)	680 (220–1147)	1010 (643–1803)
TGF-beta1	1105 (619–1453)	1110 (302–1714)	1589 (1052–2315)
VEGF	847 (693–1009)	732 (537–914)	847 (814–1063)
EGF	363 (210–497)	512 (146–715)	659 (447–795)
IGF	54 (44–67)	166 (55–252)	129 (81–179)

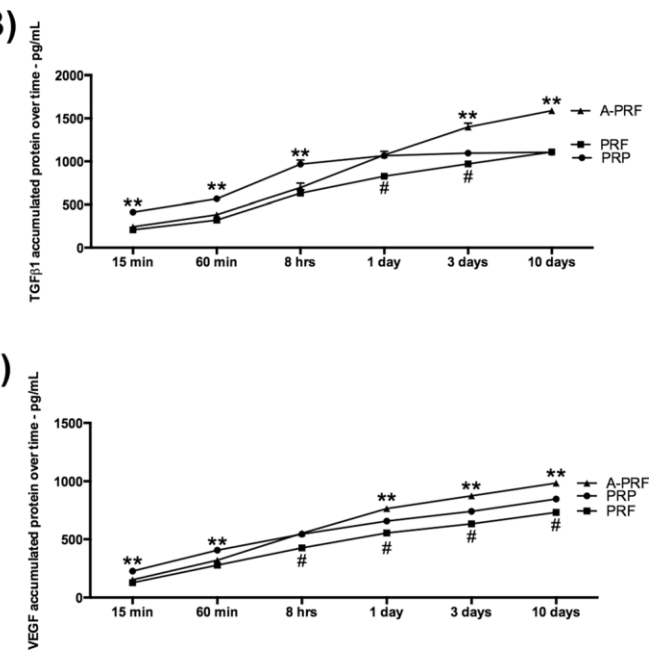
Duomenys reiškia vidurkius (pg/ml) su intervalais (nuo minimalios iki maksimalios verčių)





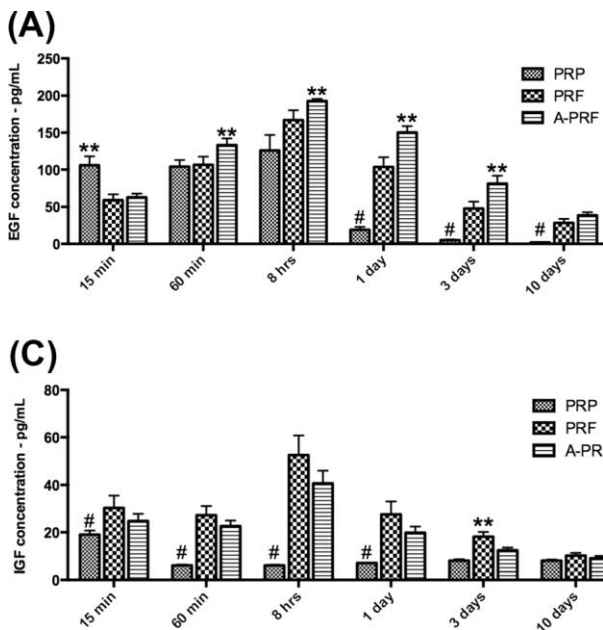
2 pav. PDGF-AA (A), PDGF-AB (C) ir PDGF-BB (E) baltymų kiekybinis nustatymas taikant ELISA metodą kiekviename laiko taške per 10 dienų laikotarpį. Bendras sukaupytas per 10 dienų laikotarpį išsiskyrusio augimo faktoriaus kiekis, TGFβ1 (B) ir VEGF (D). (\* $p < 0,05$  reiškia reikšmingus skirtumus tarp grupių, \*\* $p < 0,05$  reiškia reikšmingai didesnį kiekį

ir gali tapti vertinga priemone atliekant medicininės ir odontologines procedūras, kai reikia greitos regeneracinių ląstelių mobilizacijos. Antra, nors PRP išsiskyrimas lėmė greitą augimo faktorių išsiskyrimą, įdomu pastebėti, kad laikui bėgant iš PRF

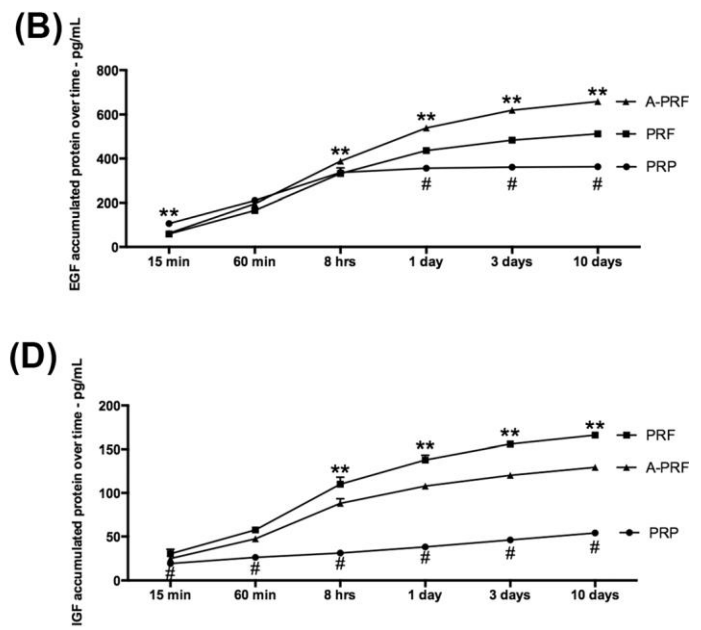


nei visose kitose grupėse, #  $p < 0,05$  reiškia reikšmingai mažesnį kiekį nei visose grupėse.) Tyrimas buvo atliktas su šešiais skirtingais kraujo mėginiais ir pakartotas tris kartus.

fibrino ne tik išsiskyrė daugiau augimo faktorių vėlesniuose laiko taškuose, tačiau didesnis augimo faktorių kiekis taip pat buvo pačioje fibrino matricoje. Manoma, kad viena priežasčių yra ta, jog PRF ir A-PRF fibrine yra daugiau gyvybingų ląstelių.



3 pav. EGF (A) ir IGF (C) baltymų kiekybinis nustatymas taikant ELISA metodą per 10 dienų laikotarpį. Bendras sukaupytas per 10 dienų laikotarpį išsiskyrusio augimo faktoriaus kiekis, EGF (B) ir IGF (D). (\* $p < 0,05$  reiškia reikšmingą skirtumą tarp grupių, \*\* $p < 0,05$  reiškia reikšmingai didesnį kiekį nei visose kitose grupėse, #  $p < 0,05$  reiškia reikšmingai mažesnį kiekį nei visose



grupėse.) Tyrimas buvo atliktas su šešiais skirtingais kraujo mėginiais ir pakartotas tris kartus.

Tai buvo įrodyta tyrimais [37]. Todėl tikėtina, kad šios ląstelės iš dalies lemia rezultatų skirtumą, kuris buvo pastebėtas tarp PRF, A-PRF ir PRP. Galiausiai viena iš nelauktų šio tyrimo išvadų yra reikšmingas bendro iš PRF ir A-PRF išsiskyrusių baltymų kiekio skirtumas. Kadangi buvo įrodyta, kad, palyginti su PRF, A-PRF turi daugiau ląstelių-pirmtakų [37], tolesnis reikšmingas bendro išsiskyrusio baltymų kiekio padidėjimas gali teikti papildomos naudos klinikinėje praktikoje.

Nors tai yra pirmais augimo faktorių išsiskyrimo iš A-PRF tyrimas, ankstesni autoriai tyrė baltymų išsiskyrimą iš PRP arba PRF ir papildomai tyrė jo tolesnį poveikį ląstelių aktyvumui. Pirmajame tyrime El-Sharkawy ir kt. įrodė, kad PRP, palyginti su natūraliu krauju, lėmė didesnį PDGF-AB, PDGF-BB, TGF- $\beta$ 1, VEGF ir EGF kiekį [40]. Be to, kitas ankstesnis tyrimas įrodė, kad iš PRF gali išsiskirti įvairūs augimo faktoriai, kaip antai PDGF-AB, TGF- $\beta$ 1, VEGF, EGF ir IGF-1 [41]. Tas tyrimas įrodė, kad augimo faktoriaus kiekis per tam tikrą laiką (nuo 5 iki 300 min.) didėja, tačiau vėlesni laiko taškai nebuvo tirti. Be to, augimo faktorių išsiskyrimas nebuvo lyginamas su antruoju trombocitų koncentratu, todėl PRF veiksmingumą sunku lyginti su PRP arba A-PRF veiksmingumu [41].

Anksčiau taip pat buvo įrodyta, kad iš PRP plazmos išsiskiria daug PDGF ir TGF $\beta$  [42], kurie vėliau skatina kolageno sintezę periodonto raiščio ląstelėse ir dantenų fibroblastuose [43, 44], sužadina ląstelių proliferaciją [45] ir mineralizacijos procesus osteoblastuose [46] ir padidina endotelio ląstelių aktyvumą [47] in vitro. Gassling ir kt. įrodė, kad PRP arba PRF užauginti osteoblastai ir fibroblastai pasižymėjo įvairuojančia skirtingų augimo faktorių raiška, o tie, kurie buvo užauginti PRP, pasižymėjo reikšmingai didesniais PDGF-AB lygiais ir TGF $\beta$ 1 raiška [38]. Be to, antrojoje šios grupės ataskaitoje PRF (kaip membrana) buvo lyginamas su galvijų kolageno membranomis („BioGide“) ir tiriamas osteoblastų atsakas į dvi biologines medžiagas [48]. Buvo nustatyta, kad, palyginti su galvijų kolageno membrana, vartojant PRF ląstelių augimas buvo reikšmingai aktyvesnis [48].

Kitas aspektas, į kurį reikia atsižvelgti lyginant in vivo ir in vitro tyrimus, yra skirtingų donorų augimo faktoriaus koncentracijų kintamumas. Šiame tyrime pacientų amžius svyravo nuo 30 iki 60 metų. Tarp donorų nustatėme sukaupto augimo faktoriaus kiekio skirtumą, kurie pateikiami 1 lentelėje. Be to, vis sparčiau senstančiai visuomenei tenka skirti vis daugiau regeneracinių procedūrų, todėl galima pagrįstai prognozuoti vyresnio amžiaus (kai padidėja pavojus susirgti sisteminėmis ligomis ir dažniau vartojami medikamentai) lemiama daug didesnį kintamumą. Taigi siekiant optimaliai planuoti šių tyrimų sritį gali prireikti nuolatinių optimalios koncentracijos tyrimų. Šiame tyrime taip pat buvo nustatyta, kad renkantis mažesnių sūkių A-PRF protokolus išsiskyrė didesnis augimo faktoriaus kiekis nei naudojant prototipą PRF. Kadangi vienoje ankstesnėje ataskaitoje buvo įrodyta, kad A-PRF yra didesnis trombocitų ir neutrofilinių granulocitų kiekis [37], galima manyti, kad šios ląstelės prisidėjo prie šiek tiek

didesnio bendrojo sukaupto augimo faktoriaus kiekio praėjus 10 dienų laikotarpiui. Tačiau dėl šios hipotezės dar reikia atlikti daugiau tyrimų.

Vis dar lieka keli tyrimo aspektai, kurie būtini norint toliau palyginti įvairius šiam tyrimo tirtus trombocitų koncentratų. Pirmia, neaišku, kokią įtaką įvairūs trombocitų koncentratai (įskaitant PRP, PRF ir A-PRF) turės ląstelių elgsenai laikui bėgant. Todėl lyginamasis in vitro ląstelių tyrimas, skirtas toliau analizuoti PRP, PRF ir A-PRF poveikį įvairių tipų ląstelių (įskaitant osteoblastus, dantenų fibroblastus ir periodonto raiščių ląsteles) elgseną, gali suteikti dar labiau žinių apie tai, kurie gydymo būdai stimuliuoja didesnį ląstelių atsaką. Be to, yra žinoma, kad trombocitų koncentratai dažnai derinami su įvairiomis biologinėmis medžiagomis, pvz., su kolageno membranomis ir kaulo transplantatais. Todėl taip pat būtų naudinga palyginti augimo faktoriaus išsiskyrimą iš įvairių biologinių medžiagų jas padengus PRP, PRF arba A-PRF. Ateityje atliekami įvairių trombocitų preparatų palyginimo klinikinėje aplinkoje moksliniai tyrimai taip pat būtų vertingi lyginant šių preparatų veiksmingumą įvairių klininių scenarijų atvejais.

## Išvada

Šio tyrimo rezultatai rodo, kad iš atitinkamų PRP, PRF ir A-PRF trombocitų preparatų per tam tikrą laiką išsiskyrė augimo faktorių. Įdomu tai, kad PRP pasižymėjo gebėjimu išskirti žymiai didesnių augimo faktorių kiekį pačiuose ankstyviausiuose laiko taškuose, o augimo faktorių išsiskyrimas iš PRF ir A-PRF buvo labiau laipsniškas ir truko iki 10 dienų. Palyginti su standartiniu PRF, naujos sudėties PRF (vadinamas pažangiuoju PRF) pasižymėjo reikšmingai didesniu per tam tikrą laiką išsiskyrusio augimo faktoriaus kiekiu ir gali būti kliniškai naudingas būsimoms regeneracinėms procedūroms. Ateityje atliekami konkrečių trombocitų preparatų poveikio ląstelių elgsenai tyrimai bei in vivo bandymai toliau pagilins mūsų žinias apie A-PRF ir pirmiau naudotų PRP ir A-PRF panašumus ir skirtumus.

## Atitiktis etikos standartams

Interesų konfliktas. Autoriai pareiškia, kad jie neturi konkuruojančių interesų.

Finansavimas. Projektą finansavo Berno universiteto Veido ir žandikaulių chirurgijos katedra.

Etinis patvirtinimas. Kraujas iš pacientų (laboratorijos darbuotojų) buvo imamas gavus pasirašytą informuoto asmens sutikimą. Etninis patvirtinimas šiam tikslui nebuvo reikalingas. Gyvūnai šiame tyrime nebuvo naudojami.

Informuoto asmens sutikimas. Visas kraujas iš pacientų (laboratorijos darbuotojų) buvo imamas gavus pasirašytą informuoto asmens sutikimą.

## Literatūra

1. Dohan Ehrenfest DM, Wang HL, Galindo-Moreno P, Bowler D, Dym H (2015) Bone morphogenic protein: application in implant dentistry. *BioMed Res Int* 59:493–503. doi:10.1155/2015/34132710.1016/j.cden.2014.10.006
2. Padial-Molina M, O'Valle F, Lanis A and Mesa F (2015) Clinical application of mesenchymal stem cells and novel supportive therapies for oral bone regeneration. *Biom Res Int* 2015:341327. doi:10.1155/2015/341327
3. Sanz-Sanchez I, Ortiz-Vigon A, Sanz-Martin I, Figuero E, Sanz M (2015) Effectiveness of lateral bone augmentation on the alveolar crest dimension: a systematic review and meta-analysis. *J Dent Res* 94:128s–142s. doi:10.1177/0022034515594780
4. Miron RJ, Zhang YF (2012) Osteoinduction: a review of old concepts with new standards. *J Dent Res* 91:736–744. doi:10.1177/0022034511435260
5. Anusaksathien O, Giannobile WV (2002) Growth factor delivery to re-engineer periodontal tissues. *Curr Pharm Biotechnol* 3:129–139
6. Carreira AC, Lojudice FH, Halcsik E, Navarro RD, Sogayar MC, Granjeiro JM (2014) Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives. *J Dent Res* 93:335–345. doi:10.1177/0022034513518561
7. Rocque BG, Kelly MP, Miller JH, Li Y, Anderson PA (2014) Bone morphogenetic protein-associated complications in pediatric spinal fusion in the early postoperative period: an analysis of 4658 patients and review of the literature. *J Neurosurg Pediatr* 14:635–643. doi:10.3171/2014.8.peds13665
8. Kaigler D, Avila G, Wisner-Lynch L, Nevins ML, Nevins M, Rasperini G, Lynch SE, Giannobile WV (2011) Platelet-derived growth factor applications in periodontal and peri-implant bone regeneration. *Expert Opin Biol Ther* 11:375–385. doi:10.1517/14712598.2011.554814
9. Del Corso M, Vervelle A, Simonpieri A, Jimbo R, Inchingolo F, Sammartino G, Dohan Ehrenfest DM (2012) Current knowledge and perspectives for the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 1: periodontal and dentoalveolar surgery. *Curr Pharm Biotechnol* 13: 1207–1230
10. Simonpieri A, Del Corso M, Vervelle A, Jimbo R, Inchingolo F, Sammartino G, Dohan Ehrenfest DM (2012) Current knowledge and perspectives for the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 2: bone graft, implant and reconstructive surgery. *Curr Pharm Biotechnol* 13:1231–1256
11. Medina-Porqueres I, Alvarez-Juarez P (2015) The efficacy of platelet-rich plasma injection in the management of hip osteoarthritis: a systematic review protocol. *Musculoskeletal Care*. doi:10.1002/msc.1115
12. Salamanna F, Veronesi F, Maglio M and Della Bella E (2015) New and emerging strategies in platelet-rich plasma application in musculoskeletal regenerative procedures: general overview on still open questions and outlook. 2015:846045. doi: 10.1155/2015/846045
13. Albanese A, Licata ME, Polizzi B, Campisi G (2013) Platelet-rich plasma (PRP) in dental and oral surgery: from the wound healing to bone regeneration. *Immun Ageing* 10:23. doi:10.1186/1742-4933-10-23
14. Dohan Ehrenfest DM, Andia I, Zumstein MA, Zhang CQ, Pinto NR, Bielecki T (2014) Classification of platelet concentrates (platelet-rich plasma-PRP, platelet-rich fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles, Ligament Tendons J* 4:3–9
15. Maney P, Amornporncharoen M, Palaiologou A (2013) Applications of plasma rich in growth factors (PRGF) in dental surgery: a review. *J West Soc of Periodontol Periodontol Abstr* 61:99–104
16. Panda S, Doraiswamy J, Malaiappan S, Varghese SS and Del Fabbro M (2014) Additive effect of autologous platelet concentrates in treatment of intrabony defects: a systematic review and meta-analysis. *J Investig Clin Dent*. doi: 10.1111/jicd.12117
17. Marx RE (2001) Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent* 10:225–228
18. Marx RE (2004) Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg* 62: 489–496
19. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR (1998) Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 85:638–646
20. Kukreja BJ, Dodwad V, Kukreja P, Ahuja S, Mehra P (2014) A comparative evaluation of platelet-rich plasma in combination with demineralized freeze-dried bone allograft and DFDDBA alone in the treatment of periodontal intrabony defects: a clinicoradiographic study. *J Indian Soc of Periodontol* 18:618–623. doi:10.4103/0972-124x.142457
21. Pradeep AR, Rao NS, Agarwal E, Bajaj P, Kumari M, Naik SB (2012) Comparative evaluation of autologous platelet-rich fibrin and platelet-rich plasma in the treatment of 3-wall intrabony defects in chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol* 83:1499–1507. doi:10.1902/jop.2012.110705
22. Dori F, Arweiler N, Huszar T, Gera I, Miron RJ, Sculean A (2013) Five-year results evaluating the effects of platelet-rich plasma on the healing of intrabony defects treated with enamel matrix derivative and natural bone mineral. *J Periodontol* 84:1546–1555. doi:10.1902/jop.2013.120501
23. Ozdemir B, Okte E (2012) Treatment of intrabony defects with betatricalciumphosphate alone and in combination with platelet-rich plasma. *J Biomed Mater Res B, Appl Biomater* 100:976–983. doi:10.1002/jbm.b.32660
24. Yilmaz S, Kabadayi C, Ipci SD, Cakar G, Kuru B (2011) Treatment of intrabony periodontal defects with platelet-rich plasma versus platelet-poor plasma combined with a bovine-derived xenograft: a controlled clinical trial. *J Periodontol* 82:837–844. doi:10.1902/jop.2010.100503
25. Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Divnic-Resnik T, Pavlovic M, Kenney EB (2009) A surgical reentry study on the influence of platelet-rich plasma in enhancing the regenerative effects of bovine porous bone mineral and guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *J Periodontol* 80: 915–923. doi:10.1902/jop.2009.080600
26. Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Vasilic N, Madzarevic M, Kenney EB (2005) A reentry study on the use of bovine porous bone mineral, GTR, and platelet-rich plasma in the regenerative treatment of intrabony defects in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent* 25:49–59
27. Yassibag-Berkman Z, Tuncer O, Subasioglu T, Kantarci A (2007) Combined use of platelet-rich plasma and bone grafting with or without guided tissue regeneration in the treatment of anterior interproximal defects. *J Periodontol* 78:801–809. doi:10.1902/jop.2007.060318
28. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Dohan DM (2006) Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 101: 299–303. doi:10.1016/j.tripleo.2005.07.012
29. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Gogly B (2006) Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. *Oral*

- Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 101:e45–e50. doi:10.1016/j.tripleo.2005.07.009
30. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Gogly B (2006) Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 101:e37–e44. doi:10.1016/j.tripleo.2005.07.008
  31. Sunitha Raja V, Munirathnam Naidu E (2008) Platelet-rich fibrin: evolution of a second-generation platelet concentrate. *Indian J Dent Res Off Publ Indian Soc Dental Res* 19:42–46
  32. Man D, Plosker H, Winland-Brown JE (2001) The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg* 107: 229–237 discussion 238–9
  33. Lekovic V, Milinkovic I, Aleksic Z, Jankovic S, Stankovic P, Kenney EB, Camargo PM (2012) Platelet-rich fibrin and bovine porous bone mineral vs. platelet-rich fibrin in the treatment of intrabony periodontal defects. *J Periodontol Res* 47:409–417. doi: 10.1111/j.1600-0765.2011.01446.x
  34. Panda S, Jayakumar ND, Sankari M, Varghese SS, Kumar DS (2014) Platelet rich fibrin and xenograft in treatment of intrabony defect. *Contemporary Clinical Dentistry* 5:550–554. doi:10.4103/ 0976-237x.142830
  35. Sharma A, Pradeep AR (2011) Treatment of 3-wall intrabony defects in patients with chronic periodontitis with autologous platelet-rich fibrin: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol* 82: 1705–1712. doi:10.1902/jop.2011.110075
  36. Kumar RV, Shubhashini N (2013) Platelet rich fibrin: a new paradigm in periodontal regeneration. *Cell Tissue Bank* 14:453–463. doi:10.1007/s10561-012-9349-6
  37. Ghanaati S, Booms P, Orlowska A, Kubesch A, Lorenz J, Rutkowski J, Landes C, Sader R, Kirkpatrick C, Choukroun J (2014) Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *J Oral Implantol* 40:679–689. doi:10.1563/aaid-joi-D-14-00138
  38. Gassling VL, Acil Y, Springer IN, Hubert N, Wiltfang J (2009) Platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in human cell culture. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 108:48–55. doi:10.1016/j.tripleo.2009.02.007
  39. Miron RJ, Gruber R, Hedborn E, Saulacic N, Zhang Y, Sculean A, Bosshardt DD, Buser D (2013) Impact of bone harvesting techniques on cell viability and the release of growth factors of autografts. *Clin Implant Dent Relat Res* 15:481–489. doi:10.1111/j.1708-8208.2012.00440.x
  40. El-Sharkawy H, Kantarci A, Deady J, Hasturk H, Liu H, Alshahat M, Van Dyke TE (2007) Platelet-rich plasma: growth factors and pro- and anti-inflammatory properties. *J Periodontol* 78:661–669. doi:10.1902/jop.2007.060302
  41. Su CY, Kuo YP, Tseng YH, Su CH, Burnouf T (2009) In vitro release of growth factors from platelet-rich fibrin (PRF): a proposal to optimize the clinical applications of PRF. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 108:56–61. doi:10.1016/j.tripleo.2009.02.004
  42. Okuda K, Kawase T, Momose M, Murata M, Saito Y, Suzuki H, Wolff LF, Yoshie H (2003) Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor- $\beta$  and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J Periodontol* 74:849–857. doi:10.1902/jop.2003.74.6.849
  43. Kawase T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H (2003) Platelet-rich plasma-derived fibrin clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro. *J Periodontol* 74:858–864. doi:10.1902/jop.2003.74.6.858
  44. Fan WJ, Yang M, Zhang C, Xue R, Zhang W, Qin HX (2013) Effects of Choukroun's platelet-rich fibrin on human gingival fibroblasts proliferation, migration and type I collagen secretion. *Zhonghua kou qiang yi xue za zhi = Zhonghua kouqiang yixue zazhi = Chin J Stomatol* 48:72–76
  45. Dohan Ehrenfest DM, Doglioli P, de Peppo GM, Del Corso M, Charrier JB (2010) Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) stimulates in vitro proliferation and differentiation of human oral bone mesenchymal stem cell in a dose-dependent way. *Arch Oral Biol* 55:185–194. doi:10.1016/j.archoralbio.2010.01.004
  46. Kawase T, Okuda K, Saito Y, Amizuka N, Suzuki H, Yoshie H (2005) Platelet-rich plasma provides nucleus for mineralization in cultures of partially differentiated periodontal ligament cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 41:171–176. doi:10.1290/0502013.1
  47. Kawase T, Tanaka T, Okuda K, Tsuchimochi M, Oda M, Hara T (2015) Quantitative single-cell motility analysis of platelet-rich plasma-treated endothelial cells *in vitro*. *Cytoskeleton (Hoboken, NJ)* 72:246–255. doi:10.1002/cm.21221
  48. Gassling V, Hedderich J, Acil Y, Purcz N, Wiltfang J, Douglas T (2013) Comparison of platelet rich fibrin and collagen as osteoblast-seeded scaffolds for bone tissue engineering applications. *Clin Oral Implants Res* 24:320–328. doi:10.1111/j.1600-0501.2011.02333.x