

Centrifugacijos jėgos sumažinimas su injektuojamo trombocitais praturtinto fibrino (PRF) koncentratais pagerina pacientų uždegiminių ląstelių, trombocitų bei augimo faktorių būklę: pirmasis lėtos centrifugacijos koncepto pristatymas.

ABSTRAKTU.

Tikslas: Šio tyrimo tikslas yra sistemiškai išanalizuoti centrifugacijos jėgos (RCF) įtaką leukocitams, trombocitams bei augimo faktorių išskyrimui PRF matricoje.

Medžiagos ir metodai: Sistemiškai panaudojus periferinį šešių sveikų savanorių kraują RCF buvo sumažintas keturis kartus kiekviename iš trijų eksperimentinių protokolų (I-III), 710-44g spektre išlaikant pastovų centrifugacijos laiką. Norint apibrėžti trombocitų ir leukocitų kiekį buvo pritaikyta tėkmės citometrija. Augimo faktoriaus koncentracija buvo apskaičiuota po 1h ir 24h krešėjimo naudojant ELISA.

Rezultatai: RCF sumažinimas pagal II (177g) protokolą žymiai padidino trombocitų ir leukocitų kiekį lyginant su I protokolu (710g). III (44g) protokolo rezultatai parodė žymiai padidėjusius leukocitų ir trombocitų kiekius lyginant su I ir II. VEGF ir TGF- β 1 augimo faktorių koncentracija buvo žymiai didesnė II protokole lyginant su I, kai III protokolas parodė žymiai didesnę augimo faktorių koncentraciją lyginant su I ir II. Šie rezultatai buvo pastebėti 1 ir 24h po krešėjimo, o pagreitėjusi augimo faktorių koncentracija po 24h.

Diskusija: Remiantis rezultatais buvo įrodyta, kad įmanoma praturtinti PRF fluido matricas leukocitais, trombocitais bei augimo faktoriais vos pakeitus centrifugacijos nustatymus.

Išvados: Mes keliame hipotezę, kad taip vadinamas mažo greičio centrifugacijos konceptas (LSCC) pasirinktinai padidina leukocitų, trombocitų ir augimo faktorių kiekį PRF fluido matricose. Tolimesni tyrimai reikalingi norint įvertinti ląstelės ir augimo faktorių padidinimą žaizdų gijimo procese bei audinių atstatymo procese, taip pat lyginant kraujo koncentratų, gautus prie aukšto arba žemo RCF. Pagrindiniai žodžiai: uždegimas, leukocitai, trombocitai, trombocitais praturtintas fibrinas, audinio inžinerija, skausmas, centrifugacija, A-PRF+, I-PRF.

Santrumpos: PRF - trombocitais praturtintas fibrinas; LSCC – mažo greito centrifugacijos konceptas. Tokiu būdu šios technikos tikslas yra pristatyti trombocitais praturtintos produkcijos alternatyvą skystai (suleidžiamai) arba polimerizuotai (krešulio) formai.

ĮVADAS.

Pastaraisiais metais buvo pristatyta keletas kliniškai patvirtintų audinio inžinerijos konceptų panaudojant minimalią invaziją. Šiuo metu į priimtinių modelių sąrašą įeina grynos biomedžiagos taikymas ir biomedžiagų kombinacija su autologiniu kaulo čiulpo aspiracija, taip pat rekombinantiniai morfogeniniai kaulo baltymai (BMP). Nors invazija yra mažesnė lyginant su autologine kaulo transplantacija, anksčiau paminėtas minimalus invazinis kaulo čiulpo aspiravimas yra skirtas tik didelę patirtį turintiems chirurgams, kadangi taikant šiuos metodus gali atsirasti tokių komplikacijų kaip: skausmas, infekcija, taip pat kaulo čiulpų trukimo metu gali būti pažeisti šalia esantys organai. Taip pat naudojant BMP turi būti apibrėžta optimali augimo faktoriaus koncentracija.

Norint išspręsti šias problemas visai neseniai buvo pasiūlyta naudoti periferinio kraujo koncentratą kaip potencialią paramą sudėtingoje audinio inžinerijoje. Šiame kontekste buvo pristatyta keletas

kraujo koncentrato sistemų, tarp jų: plazma praturtinta augimo faktoriais (PRGF) {9} ir trombocitais praturtinta plazma (PRP). Abi sistemos reikalauja neautologinių antikoagulantų įmaišymo norint pagaminti kraujo koncentratų fluidą po centrifugacijos {9}. Norint išgauti PRP taip pat reikalinga keletos žingsnių centrifugacija.

Taip pat, PRGF ir PRP susikoncentruoja ties trombocitų teigiamomis savybėmis bei jų išskiriamais augimo faktoriais, kurie remia audinio regeneraciją skirtingose medicinos srityse bei pašalina leukocitus iš galutinių kraujo koncentratų.

PRF įvedimas 2001 m. buvo pirmo žingsnio link kraujo kilmės PRF matricų pavyzdys, kuris nereikalauja papildomų antikoagulantų medžiagų. Centrifugacija vykstanti specialiaame stikliniame vamzdyje aktyvuoja fiziologinę koaguliacijos kaskadą ir tokiu būdu aktyvuoja fibrino krešulio, praturtinto ląstelėmis su periferiniu krauju (trombocitais ir leukocitais) formavimąsi.

Neseniai atlikti ląstelės ir molekulės biologiniai tyrimai padidino žaizdų gijimo ir atstatymo proceso sąvoką. Taigi leukocitų vaidmuo gijimo procese modeliuoja keletą fazių žaizdos gijimo procese. Taip pat trombocitai bei fibrino tinklai yra gerai žinomi kaip atliekantys svarbų vaidmenį žaizdos gijimo procese.

Leukocitai dalyvauja angiogenezeje ir limfogenezeje, kai fibrino tinklas yra pagrindinis ankstyvajame žaizdos gijimo etape ir perteikia sinergetinį poveikį trombocitų pagalbai. Taip pat fibrino tinklas tarnauja kaip citokinų rezervas.

Tačiau norint pagaminti PRF svarbu pritaikyti dideles centrifugacijos jėgas (RCF) (708g) centrifugacijos metu. Taipogi prieš tai atlikti histologiniai tyrimai, analizuojantys PRF krešulį, parodė, kad trombocitai ir uždegiminės ląstelės fibrino atramoje pagrinde pagreitėja proksimalinėje PRF krešulio porcijoje {19}. Dėl to mes klausiamo kokių mastu pritaikytas RCF galėtų įtakoti ląstelių paskirstymą kietoje PRF matricoje norint generuoti modifikuotus centrifugacijos protokolus norint padidinti atstatomąją PRF matricų galimybę. Dėl šios priežasties centrifugacijos proceso reguliavimas sumažinant RCF ir nedidelis centrifugacijos laiko padidėjimas padidino leukocitų skaičių, o ypač neutrofilinių granulocitų skaičių. Dar daugiau, trombocitai ir leukocitai pagerinto PRF sudėtyje buvo paskirstyti lygiau visame krešulyje nei PRF.

Remiantis šiais rezultatais, buvo iškeltas svarbiausias klausimas: kokios apimtys RCF sumažinimas su PRF fluido matricomis gali įtakoti trombocitų ir leukocitų kiekio padidėjimą, taip pat augimo faktorių padidėjimą iš gautų kraujo koncentratų.

Šis tyrimas parodo sistematinę RCF įtakos analizę fluido kilmės PRF matricos atžvilgiu. Remiantis anksčiau pristatytu PRF, mes padalinome per pusę apsisukimus per minutę (rpm), kurie, pagal centrifugos spindulį (110 mm) sumažino RCF keturis kartus tiriant plačią RCF įvairovę (740-44 g), įskaitant aukštą, vidutinį ir žemą RCF. Tuo pačiu metu buvo palaikomas pastovus centrifugacijos laikas norint išvengti jos įtakos. Šis tyrimas yra pirmas tyrimas, kuris analizuoja RCF įtaką žmogaus kraujo koncentratams norint apibrėžti leukocitų ir trombocitų kiekį, taip pat augimo faktorių išskyrimą PRF tipo matricose. Šio tyrimo tikslas buvo apibrėžti kontroliuojamo RCF sumažinimo, keičiant centrifugacijos parinktį (rpm) įtakos apimtį bendram trombocitų ir leukocitų kiekiui, taip pat įtakos apimtį augimo faktorių išskyrimą naudojant PRF tipo matricas.

MEDŽIAGOS IR METODAI.

Sisteminiai protokolai PRF tipo matricoms.

Norint įvertinti aukštą, vidutinį ir žemą RCF spektrą buvo nustatyti trys skirtingi eksperimentinės centrifugacijos protokolai trims atskiroms sisteminėms analizių serijoms. Buvo sumažintas RCF (710-44 g) pastoviu centrifugacijos laiku. Remiantis PRF (708 g), buvo palaipsniui pusiau mažinamas rpm ir tokiu būdu buvo atliktas RCF sumažinimas (4 kartus mažesnis) visiems protokolams:

- I: 710g; 24000 rpm; 8 min
- II: 177g; 1200 rpm; 8 min
- III: 44g; 600 rpm; 8 min

PRF PARUOŠIMAS.

Šiam eksperimentui buvo naudojamas šešių sveikų savanorių kraujas (trys vyrai ir trys moterys). Vamzdeliai buvo iš karto įdėti į centrifugą ir ruošiami pagal anksčiau paminėtus protokolus. Duo centrifuga (Process for PRF, Nice, France) buvo naudojama atliekant centrifugaciją. Ši centrifuga turi užfiksuotą kampinį rotorių su 110mm spinduliu. Taip pat buvo pasirašytas sutikimas su savanoriais dėl jų kraujo mėginių naudojimo tyrime. Visi donoriai neturėjo jokių infekcinių ligų ir nevartojo nikotino ar alkoholio. Nė vienas subjektas nevartojo narkotinių medžiagų.

VAMZDELIAI KRAUJO SURINKIMUI.

Šio tyrimo tikslais buvo naudojami sterilūs 10 ml plastikiniai vamzdeliai (Process for PRF, Nice, France). Į juos buvo surenkamas kraujo koncentratų fluidas pagal anksčiau aprašytus protokolus. Šis metodas buvo naudojamas dėl to, kad buvo reikalinga fluideo matrica tėkmės simetrijai. Kraujas buvo paimtas pagal drugelio kraujo paėmimo metodą. Kiekvieno protokolo centrifugacija prasidėjo po to kai buvo surinktas paskutinis šios grupės vamzdelis per 2-3 minutes.

AUTOMATINIS LĄSTELIŲ SKAIČIAVIMAS.

Kiekvieno protokolo surinkto fluideo matricos buvo antikoaguluotos naudojant BD vakutainerius su 4 ml etilenodiaminetetracine rūgštimi (EDTA). Ši antikoaguliacija buvo atlikta tik tyrimo tikslais, kadangi nebuvo galimi kiti ląstelių skaičiavimo matavimai. Toliau mėginiai buvo tiriami su ADVIA LabCell Automation Solution (Siemens, France) medicinos laboratorijoje (Labazur laboratory, Nice, France) norint apskaičiuoti leukocitų ir trombocitų kiekį viename mililitre. Automatizuotas ląstelių skaičiavimas buvo atliktas tėkmės citometrijos priemonėmis. Šis metodas sumažina multiparametrinę ląstelių skaičiaus analizę skystyje. Ląstelės suspensija pereina per lazerinę siją, kur viena ląstelė per vieną laiko vienetą įtakoja lazerio išsklaidymą skirtingomis kryptimis pagal ląstelės dydžius ir savybes. Išsklaidyta šviesa aptinkama šone bei priekiniame jutiklyje. Priekinis išsklaidymas yra proporcingas ląstelės dydžiui, tačiau šoninis išsklaidymas yra sukeltas ląstelės charakteristikos, tokios kaip detalumo ir struktūrinės sudėties [20]. Šie duomenys yra automatiškai analizuojami norint aptikti bendrą leukocitų ar trombocitų kiekį ląstelės sulaikyme, t.y. PRF matricų fluide.

AUGIMO FAKTORIŲ SKAIČIAVIMAS SU ELISA.

Po centrifugacijos, surinktas skystas PRF iš kiekvieno protokolo buvo pervestas į ląstelinės kilmės plokštelę. Plokštelė buvo padėta į 37 °C inkubatorių kol visi mėginiai suformavo krešulį. Po to į visus krešulius buvo pridėtas Dulbecco's Modified Eagle Medium (Biochrom GmbH, Berlin, Germany) ir mėginiai toliau inkubuojami prie tos pačios temperatūros leidžiant sklisti augimo faktoriui. Paviršinis

skystis (5ml) buvo surinktas po 1h šaldymo. Surinktas skystis buvo pakeistas šviežia ląsteline medžiaga ir toliau inkubuojamas 24h. Vėliau buvo renkama daugiau paviršinių sluoksnių. Surinkti mėginiai tuo pačiu laiko metu buvo analizuojami žmogaus kraujagyslių epitelio augimo faktoriaus atžvilgiu (VEGF) bei žmogaus kintančio augimo faktoriaus atžvilgiu (TGF- β 1). Baltymo skaičiavimas buvo atliktas naudojant ELISA (Duoset ELISA RND system) pagal gamintojo instrukcijas. Optinis tankis buvo vertinamas naudojant mikroplokštelių skaitiklį prie 450 ir 570 nm. Prie 570 nm išmatuoti duomenys buvo atimami iš duomenų gautų prie 450 nm. Matavimai buvo atlikti trimis egzemplioriais kiekvienam protokolui bei donorui. Galiausiai surinkti duomenys buvo analizuojami statistiškai.

STATISTINĖ ANALIZĖ.

Statistinė analizė buvo atlikta naudojant Prism Version 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, La Jolla, USA). Duomenys išreikšti kaip reikšmės ir standarto deviacija. Skirtumų reikšmė buvo analizuojama naudojant vieno būdo ir dviejų būdų variacijų analizes (ANOVA), su Tukey daugkartiniu lyginamuoju testu ($\alpha = 0.05$). Reikšmės skirtumai buvo pažymėti kaip reikšmingi jei P vertės buvo mažiau nei 0,05 ($P < 0,05$) ir labai reikšmingi jei P buvo mažiau nei 0,01 ($P < 0,01$), 0,001 ($P < 0,001$) arba 0,0001 ($P < 0,0001$).

REZULTATAI

BENDRAS LEUKOCITŲ KIEKIS.

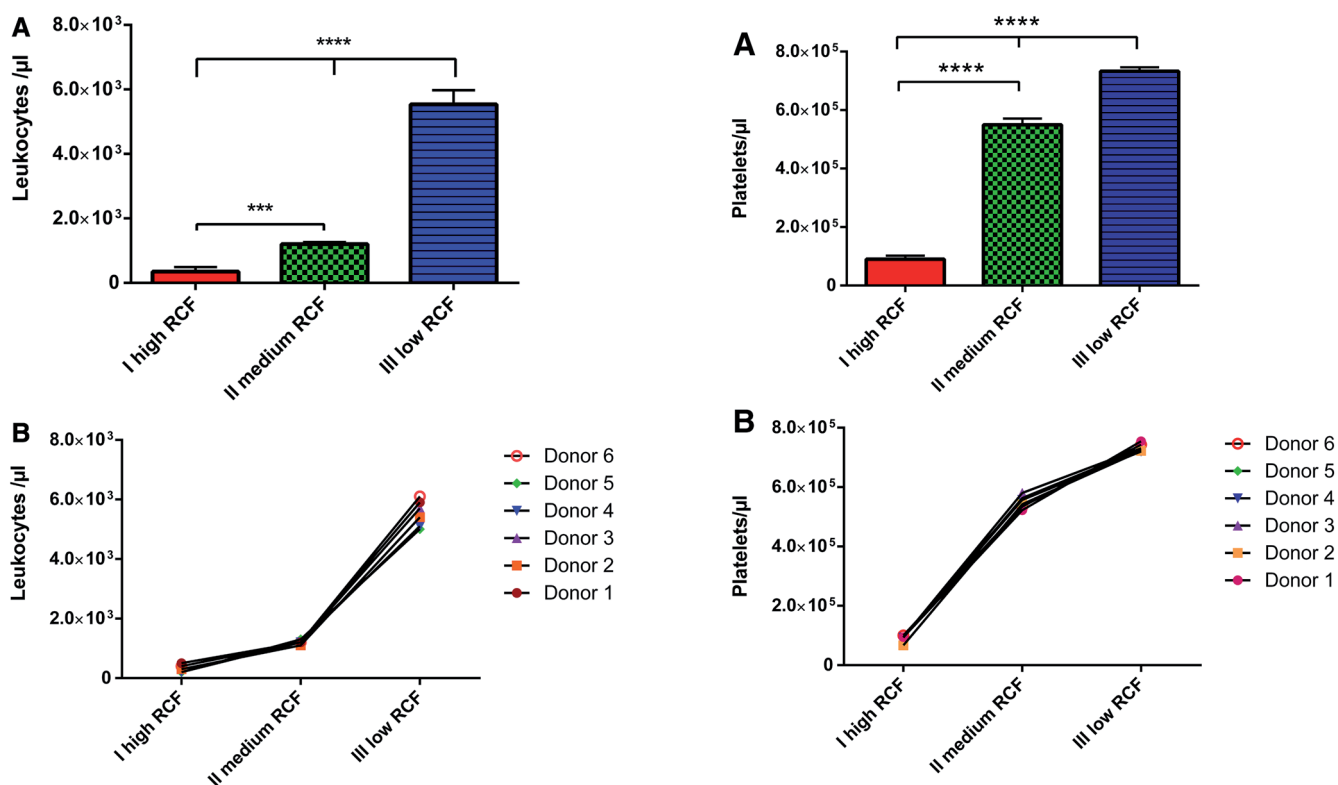
Bendras leukocitų kiekis buvo tiriamas su eksperimentiniais PRF protokolais. Bendrai kalbant, RDF sumažinimas žymiai padidino bendrą leukocitų kiekį PRF tipo matricose. Pirmas protokolai-I (710 g), kuris buvo centrifuguotas didžiausiu RCF, parodė mažiausią leukocitų kiekį tarp visų trijų protokolų. Antri protokolai I-II (177 g) naudojo keturis kartus lėtesnį RCF nei protokole-I parodė žymiai didesnį leukocitų kiekį lyginant su protokolu-I ($P < 0,001$). Galiausiai trečias protokolai-III (44 g) su keturiais kartais mažesniu RCF nei protokolas-II ir 16 kartų mažesniu RCF nei protokolas-I parodė didžiausią leukocitų kiekį, kuris statistiškai buvo žymiai didesnis lyginant su protokolu-I ($P < 0,0001$) ir protokolu-II ($P < 0,0001$) (Fig. 1a).

Tiriant donoro atžvilgiu bendras leukocitų kiekis parodė panašius rezultatus kiekviename subjekte. Visi vertinti mėginiai parodė vienodą kreivės progresą padidėjus leukocitų kiekiui sumažinus RCF (Fig. 1b).

BENDRAS TROMBOCITŲ KIEKIS.

Bendras trombocitų kiekis po automatizuoto ląstelių skaičiavimo parodė tendenciją link didėjančio bendro trombocitų kiekio su RCF symažinimu PRF tipo matricose. Pirmasis eksperimentinis protokolai-I (710 g) parodė žemiausią trombocitų kiekį lyginant su kitomis tirtomis grupėmis. Žvelgiant į antrą protokolą-II (177 g), buvo aptiktas didelis bendro trombocitų kiekio padidėjimas lyginant su protokolu-I ($P < 0,0001$). Dar daugiau, tolimesnis RCF sumažinimas parodė didžiausią bendrą trombocitų kiekį protokole-III (44 g). Statistinė analizė parodė žymiai didesnius trombocitų kiekius protokole-III lyginant su protokolu-II ($P < 0,0001$) ir protokolu-I ($P < 0,0001$) (Fig. 2a).

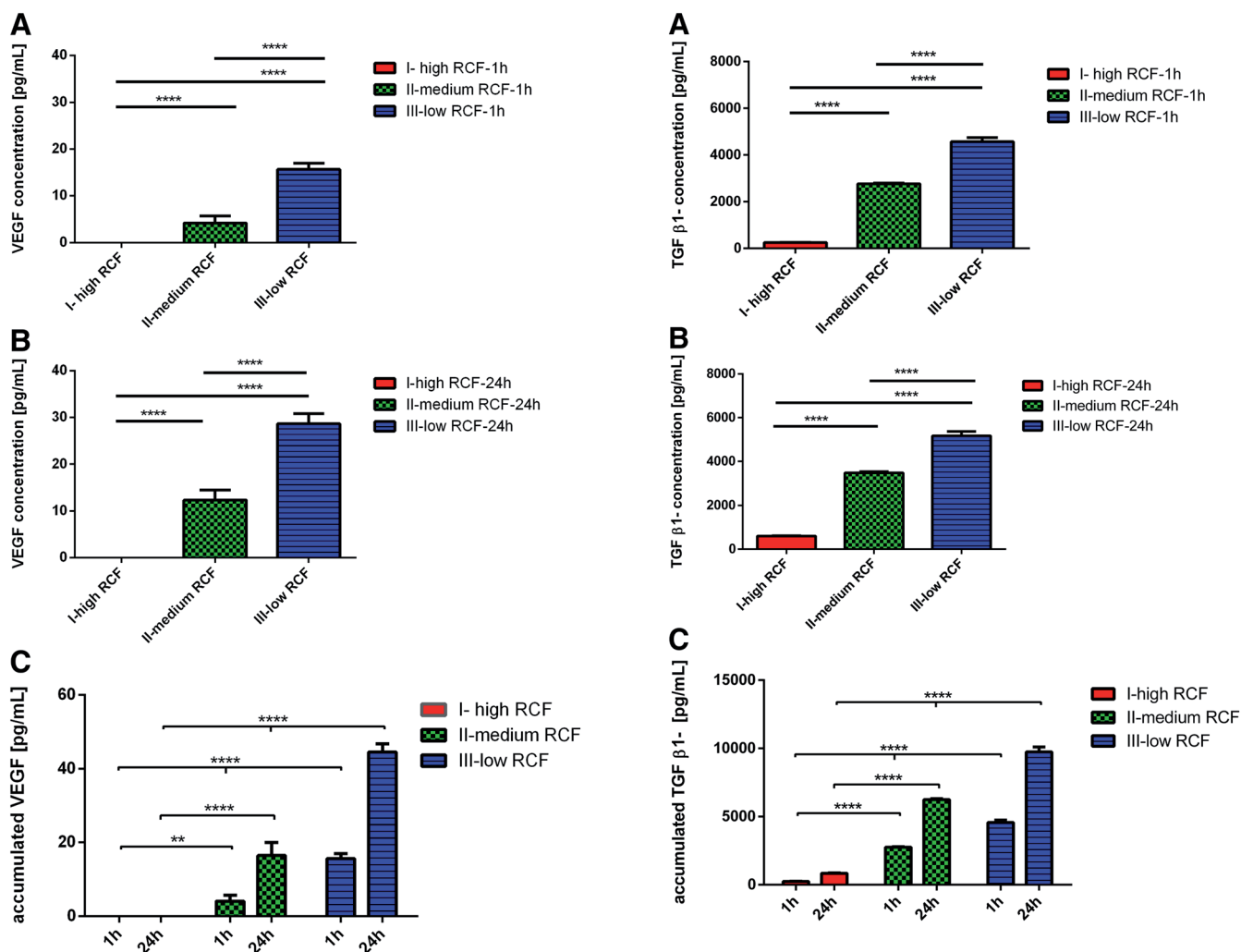
Tiriant donoro aspektą buvo gaunamos labai panašios reakcijos įtakos RCF keletyje PRF tipo matricų. Kreivės forma buvo gaunama iš vieno donoro pavyzdžių, parodanti padidėjusį trombocitų kiekį sumažinus RCF (Fig. 2b).



VEGF KONCENTRACIJA.

VEGF koncentracija buvo apskaičiuota 1 ir 24h po sukresėjimo. Abiejuose laiko taškuose buvo stebėta aiški tendencija. Augimo faktorių koncentracija padidėjo sumažinus RCF. Praėjus valandai po sukresėjimo, VEGF koncentracija protokole-I su didžiausiu RCF parodė žemiausią koncentraciją lyginant su vidutinio intervalo RCF ir žemo intervalo RCF protokolais. Tuo pačiu laiku, protokolas-II, su vidutiniu RCF intervalu, parodė padidėjusią VEGF koncentraciją. Šie rezultatai buvo labai reikšmingi lyginant su protokolu-I ($P < 0,0001$). Taip pat protokolas-III su mažiausiu RCF taikymu parodė didžiausią VEGF koncentraciją. Šie duomenys buvo reikšmingi lyginant su protokolu-I ($P < 0,0001$) ir protokolu-II ($P < 0,0001$) (Fig. 3a). Panašūs rezultatai buvo aptikti 24h po sukresėjimo. Šiuo laiku protokolas-I parodė mažiausią VEGF koncentraciją. Kartu su RCF sumažinimu, VEGF koncentracija žymiai padidėjo protokole-II. Statistinė analizė parodė žmų protokolo-II padidėjimą lyginant su protokolu-I ($P < 0,0001$). Gالياusiai protokolas-III, kuris buvo paruoštas naudojant žemiausią RCF, parodė didžiausią VEGF koncentraciją, kuri buvo reikšminga lyginant su protokolu-I ($P < 0,0001$) ir protokolu-II ($P < 0,0001$) (Fig.3b)

Per 24h susikaupusi VEGF koncentracija buvo apskaičiuota visuose tirtuose protokoluose. Išskirtos VEGF koncentracijos visuose protokoluose didėjo nuo 1 iki 24h. 24h susikaupusi koncentracija protokole-I buvo žemiausia iš visų tirtų grupių. Protokolas-II parodė žymiai didesnę sukauptą VEGF koncentraciją lyginant su protokolu-I ($P < 0,01$). Taipogi susikaupusi VEGF koncentracija protokole-III buvo didžiausia ir tai buvo svarbu lyginant su protokolu-I ($P < 0,0001$) ir protokolu-II ($P < 0,0001$) (Fig. 3c).



TGF-B1 KONCENTRACIJA.

Žmogaus augimo faktoriaus TGF-β1 koncentracija buvo matuota 1 ir 24h po sukrešėjimo. Buvo pastebėta bendra šių laikų tendencija. Sumažinus taikomą RCF padidėjo augimo faktoriaus koncentracija. Žvelgiant į rezultatus praėjus 1h po sukrešėjimo, protokolas-I parodė žemiausius TGF-β1 koncentracijos rezultatus praėjus 1h po sukrešėjimo. Taigi protokolas-II, kuris buvo paruoštas su vidutiniu RCF intervalu, parodė žymiai didesnę TGF-β1 koncentraciją lyginant su protokolu-I ($P < 0,0001$), kuris buvo paruoštas su dideliu RCF intervalu. Taipogi protokolas-III, išreiškiantis žemą RCF intervalą, parodė didžiausią TGF-β1 koncentraciją tarp visų tirtų protokolų. Ši koncentracija buvo ypatingai reikšminga lyginant su protokolu-I ($P < 0,0001$) ir protokolu-II ($P < 0,0001$) (Fig. 4a).

Praėjus 24h po sukrešėjimo, TGF-β1 buvo aptiktas visuose protokoluose. Tačiau protokolas-I parodė mažiausią koncentraciją, lyginant su kitais. Pirmas žingsnis sumažinant RCF protokole-II vidutiniu intervalu parodė didelį TGF-β1 koncentracijos padidėjimą lyginant su dideliais RCF intervalais protokole-I ($P < 0,0001$). Tolimesnis RCF mažinimas iki žemo RCF intervalo protokole-III pasiekė aukščiausią TGF-β1 koncentraciją tarp visų tirtų protokolų. Taigi šis padidėjimas buvo svarbus lyginant su protokolu-I ($P < 0,0001$) ir protokolu-II ($P < 0,0001$) (Fig. 4b).

Susikaupusi TGF-β1 koncentracija padidėjo nuo 1 iki 24h visuose protokoluose. Tačiau protokolas-I parodė mažiausią sukauptą TGF-β1 koncentraciją tarp visų tirtų protokolų. Kalbant apie protokolą-II, kuris buvo paruoštas su vidutinio intervalo RCF, buvo pastebėtas žymiai didesnis sukauptos TGF-β1

koncentracijos lygis lyginant su protokolu-I. Galiausiai, protokolas-II su žemu RCF intervalu parodė didžiausią sukaupto TGF- β 1 koncentraciją. Ši vertė buvo statistiškai didesnė lyginant su protokolu-I ir protokolu-II (Fig. 4c).

IŠVADOS.

Šiame tyrime buvo tiriamas augimo faktoriaus išskyrimas bei bendras leukocitų ir trombocitų kiekis atsižvelgiant į sisteminius RCF pakeitimus. Gauti duomenys parodė, kad sumažinus RCF nuo didelio intervalo link mažo naudojant autologines PRF tipo matricas padidėjo leukocitų ir trombocitų kiekis, taip pat kaip augimo faktorių koncentracija (VEGF ir TGF- β 1). Remiantis šiais rezultatais mes keliame hipotezę kad žemo greičio centrifugacijos konceptas (LSCC) padidina atstatomąjį potencialą ar fluideo PRF tipo matricas. Dėl šios priežasties RCF sumažinimas taikant LSCC atveria naujas perspektyvas pagerinto PRF matricoms, kuriose vyksta tarpląstelinė sąveika tarp trombocitų ir leukocitų ir taip pat kad šios ląstelės recipiento audinyje gali pagerinti žaizdų gijimą ir padidinti audinio atstatymą. Tačiau reikalingi tolimesni klinikiniai tyrimai norint įvertinti šio koncepto klinikines naudas.