

Dantenų fibroblastų paviršiaus reakcija su titaniniais implantais panaudojus leidžiamą PRF arba PRP

Abstraktu: Buvo atlikta nemažai bandymų norint pagreitinti audinio atstatymą naudojant bioaktyvias molekules. Įdomu tai, kad paskutiniaisiais metais buvo naudojami trombocitų koncentratai gauti iš paties paciento kraujo. Šiame tyrime buvo lyginama nauja skysta trombocitų formuluo­ tė, paruošta be antikoagulantų (injektuojamas trombocitais praturtintas fibrinas, i-PRF) su standartine trombocitais praturtinta plazma (PRP) su dantenų fibroblastais gautais nuo lygaus bei šiurkštaus titaninių implantų paviršiaus. Įprastas PRP ir i-PRF (centrifuguoti prie 700 rpm (60g x g) 3 minutes) buvo palyginti fibroblastų biologinio atitikimo, migracijos, sukibimo, proliferacijos aspektais, taip pat trombocitų kilmės augimo faktoriaus (PDGF), transformuojančio augimo faktoriaus β (TGF- β), kolageno1 (COL1) ir fibronektino (FN) išraiškos aspektais. Rezultatai parodė, kad i-PRF paskatino didesnę ląstelės migravimą, taip pat padidino RNA (mRNA) lygius esančius PDGF, TGF- β , kolagene1 ir fibronektine lyginant su PRP. Dar daugiau, kolageno1 sintezė buvo aukščiausia i-PRF grupėje. Šie rezultatai parodo, kad skysti trombocito koncentratai gali būti formuluojami nenaudojant antikoagulantų ir turi daug pritaikymo būdų ateities tyrimams. Tolimesni klinikiniai tyrimai bei tyrimai su gyvūnais yra būtini norint ištirti i-PRF potencialo panaudojimą minkštojo audinio atstatomuosiuose protokoluose sumaišius jį su kitomis biomedžiagomis.

Optimizuoto trombocitais praturtinto fibrino konceptas su žemu centrifugacijos greičiu: augimo faktorių išskyrimas, biologinis suderinamumas bei ląstelės atsakas

Prieš 15 metų trombocitais praturtintas fibrinas (PRF) buvo pristatytas kaip naujas autogeninis kraujo augimo faktorių šaltinis, kuris galėjo būti panaudojamas audinio atstatymo procedūrose medicinoje. Konceptai kilo po to, kai pirmos kartos trombocito koncentratas, trombocitais praturtinta plazma (PRP) buvo pradėti naudoti keliose medicinos srityse, nepaisant galimo neigiamo antikoagulantų poveikio. Dėl šios priežasties buvo galima nepilna koaguliacija, kuri labai svarbi audinio žaizdų gijimui. PRF (pervadintas PRF leukocitas L-PRF) savo sudėtyje neturi antikoagulantų ir suteikia tolimesnę 3D fibrino matricą, kuri gali būti panaudota kaip daugelio procedūrų pagrindas (pasitarnauti kaip barjerinė membrana kaulo atstatyme bei audinio atsinaujinimo procedūrose).

Nuo produkto pristatymo 2001-aisiais metais PRF buvo plačiai naudojamas odontologijoje atliekant nemažai procedūrų. PRF efektyvumas yra įrodytas ištraukto danties gydyme, dantenų nuslinkimo gydyme, vidinių dantų defektų atstatyme bei sinuso panaikinimo procedūrose. Taip pat labai svarbus pranašumas yra pilnas imuniškai suderintas PRF augimo faktorių surinktas praktiškai nepanaudojus papildomų lėšų bei tai, kad PRF sudėtyje nėra antikoagulantų. Tačiau tyrimai parodė, kad PRP koncentracijoje buvo didelis kiekis autologinių augimo faktorių (nuo 6 iki 8 kartų didesnis nei įprastose kraujo koncentracijose). Taip pat sudėtyje buvo trombocitų kilmės augimo faktorių (PDGF), kraujagyslių endotelinis augimo faktorius (VEGF) bei transformuojantis augimo faktorius (TGF)- β 1. PRF paskleidžia didesnę bendrą augimo faktorių kiekį per ilgesnį laiko tarpą.

Pirminė lėtesnio augimo faktorių paskleidimo priežastis yra fibrino matricos galimybė išlaikyti baltymus fibrino tinkle, taip pat ir ląstelių galimybė paskleisti augimo faktorių į jas supančią mikroaplinką. Leukocitai yra labai svarbūs kaip imuninės ląstelės, galinčios nukreipti ir priimti keletą ląstelių tipų žaizdos gijimo procese. Kadangi didelė centrifugacijos galia gali perkelti ląstelės populiacijas į vamzdelių dugną (kai PRF yra surenkamas iš trečio sluoksnio viršaus) neseniai buvo iškelta hipotezė,

kad sumažinus centrifugacijos greitį (G-jėgą) leukocitų kiekio padidėjimas gali būti pasiektas PRF matricoje. Nuo to laiko buvo įrodyta, kad sumažinus centrifugacijos jėgą (dabar vadinama pagerintu PRF (A-PRF)), padidėjo bendras leukocitų kiekis su PRF matrica kaip pagrindu. Taipogi sutinkant su šia hipoteze buvo įrodyta, kad keletas augimo faktorių, tokių kaip PDGF, TGF- β 1, VEGF, EGF, IGF išskyrimas buvo žymiai didesnis A-PRF nei L-PRF bei PRP.

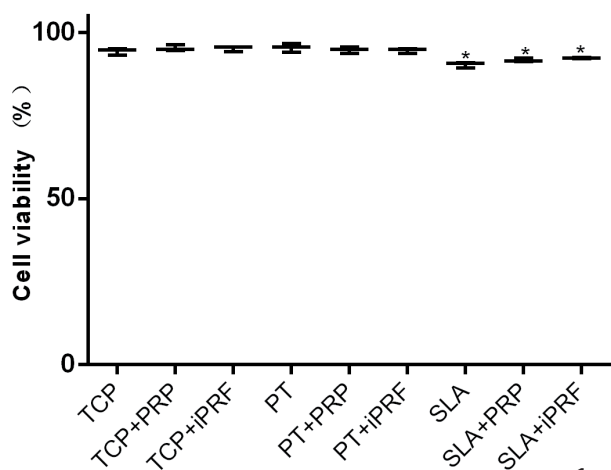
Kadangi centrifugacijos jėga daro tiesioginę įtaką augimo faktorių išskyrimui naudojant PRF kaip pagrindą, šio tyrimo tikslas toliau ištirti ar centrifugacijos laikas pagerins augimo faktorių išskyrimą pagrindo viduje. Iš principo mažesnis centrifugacijos laikas sumažintų ląstelės išskleidimą ir tai teoriškai padidintų bendrą viršutiniame paviršiuje (PRF matricoje) likusių ląstelių kiekį. Dar daugiau, kadangi iki šiol nėra visiškai aišku kokį poveikį tai sukels audinio atstatymo procese buvo ištirta kiekviena PRF matrica (taip pat L-PRF, A-PRF bei A-PRF+). Buvo tirtas ląstelių biologinis atitikimas bei ląstelių veikla. Ląstelės buvo augintos su augimo faktoriais iš kiekvienos PRF matricos (L-PRF, A-PRF bei A-PRF+) bei buvo ištirtas ląstelių migravimas, proliferacija, augimo faktorių išskyrimas bei kolageno sintezė in vitro.

Injektuojamo trombocitais praturtinto fibrino (i-PRF) galimybės atstatomojoje odontologijoje

Abstraktu: Trombocitais praturtinta plazma (PRP) buvo naudojama atstatomojoje odontologijoje kaip supra-fiziologinis autologinių augimo faktorių koncentratas, kuris stimuliuoja audinio atsinaujinimą. Nepaisant šio fakto, buvo nemažai abejonių dėl antikoagulantų panaudojimo. Antikoagulantai žinomi kaip slopinantys žaizdos gijimą. Šiame tyrime buvo tiriama skysta trombocitais praturtinto fibrino formulė (PRF), vadinama injektuojamu i-PRF, nenaudojant antikoagulantų.

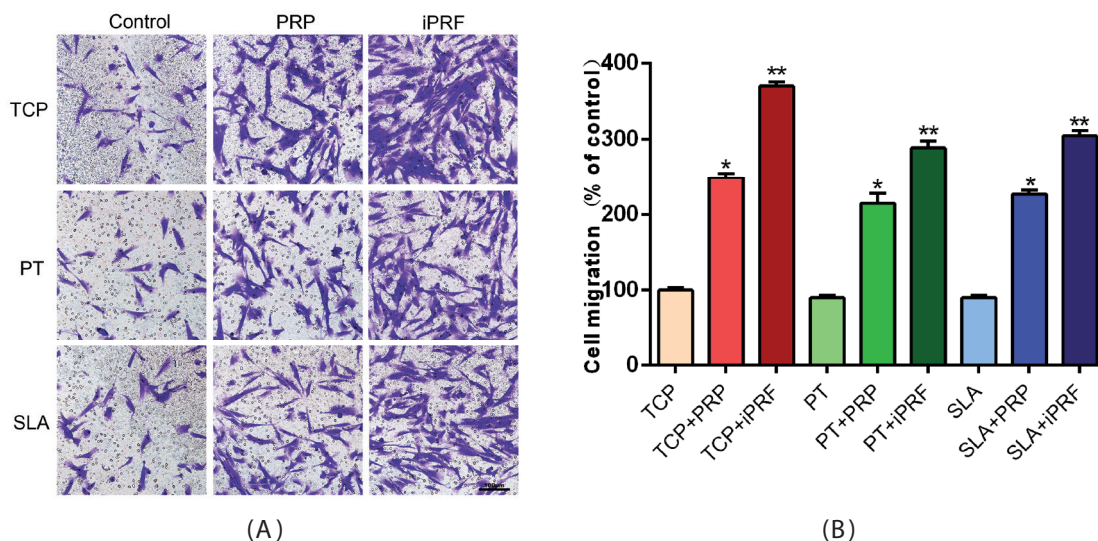
Medžiagos ir metodai: Standartinis PRP bei i-PRF (centrifuguotas prie 700 rpm (60G) 3 minutes) buvo lyginami pagal augimo faktorių išskyrimą iki 10 dienos (8 donorų pavyzdžiai). Taip pat buvo tirtas fibroblastų biologinis tinkamumas 24 valandą (gyvas/negyvas tyrimas), migraciją 24 valandą, proliferaciją 1, 3, 5 dienomis bei PDGF, TGF- β bei kolageno1 išraišką 3 bei 7 dieną.

Rezultatai: Augimo faktorių išskyrimas parodė, kad bendrai PRP turėjo didesnę ankstyvą augimo faktorių išskyrimą, kai i-PRF parodė didesnius bendrus ilgalaikius PDGF-AA, PDGF-AB, EGF bei IGF-I išskyrimus po 10 dienų. PRP parodė didesnius TGF- β 1 bei VEGF lygius 10 dieną. Abi formulės parodė biologinį suderinamumą bei didelę fibroblasto migraciją, proliferaciją lyginant su kontroliniu audinio tipo plastikumu. I-PRF sukėlė žymiai didesnę migraciją, o PRP parodė žymiai didesnę ląstelės proliferaciją. Taip pat i-PRF parodė žymiai didesnius TGF- β mRNA lygius per 7 dieną, PDGF per 3 dieną bei kolagenas1 per 3 ir 7 dienas lyginant su PRP.



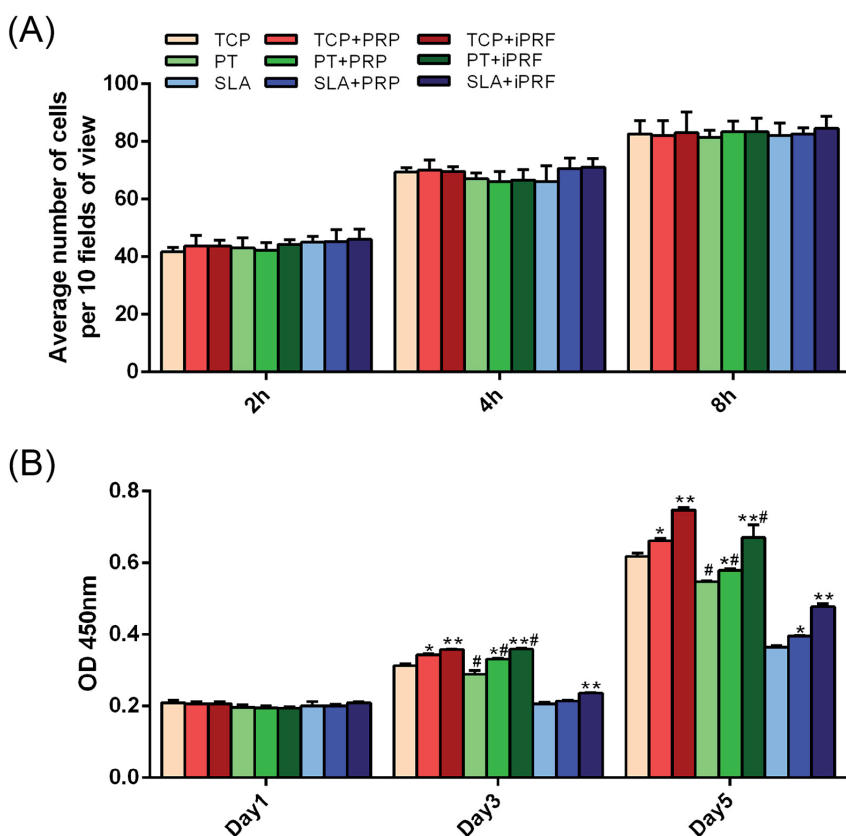
1 pav.

1 pav. Žmogaus dantenų fibroblastų procentinis santykis, apskaičiuotas su gyvais / negyvais bandiniais per 24 val. ant audinių kultūrų plastiko (angl. ir toliau TCP), ėsinto rūgštimi titano (angl. ir toliau PT) naudojant smėliasrovę su didelio grūdėtumo dalelėmis, po to rūgštinį ėsdinimą (angl. ir toliau SLA) su trombocitais praturtinta plazma (PRP) arba injekciniu trombocitais praturtintu fibrinu (i-PRF) (* žymi skirtumą tarp TCP kontrolės ir eksperimentinės grupės, $p < 0.05$)



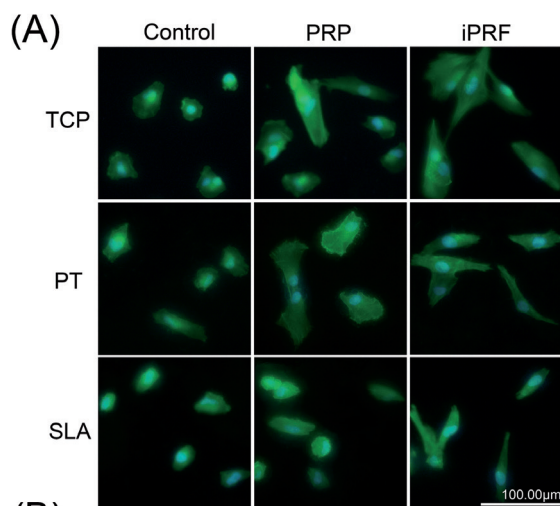
2 pav.

2 pav. Paviršiaus topografijos ir PRP / i-PRF poveikis žmogaus dantenų fibroblastų migracijai (A) Ląstelių migracija buvo įvertinta po 24 val. (Masto barai = 100 m); (B) Ląstelių migraciją buvo apskaičiuota normalizuojant TCP kontrolines grupes. (* žymi reikšmingą skirtumą tarp kontrolės ir eksperimentinės grupės, $p < 0.05$; ** žymi reikšmingai didesnę nei visos kitos grupės, $p < 0.05$).

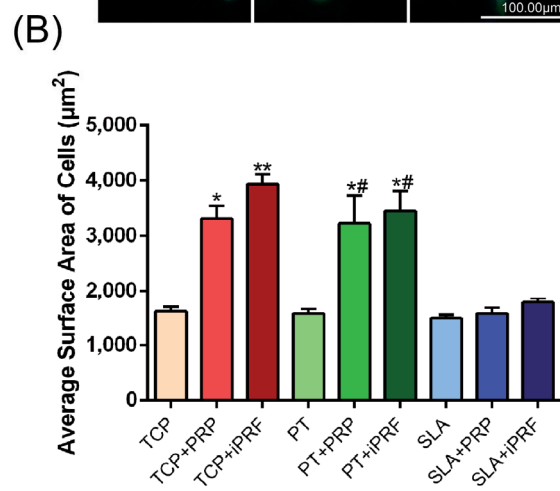


3 pav.

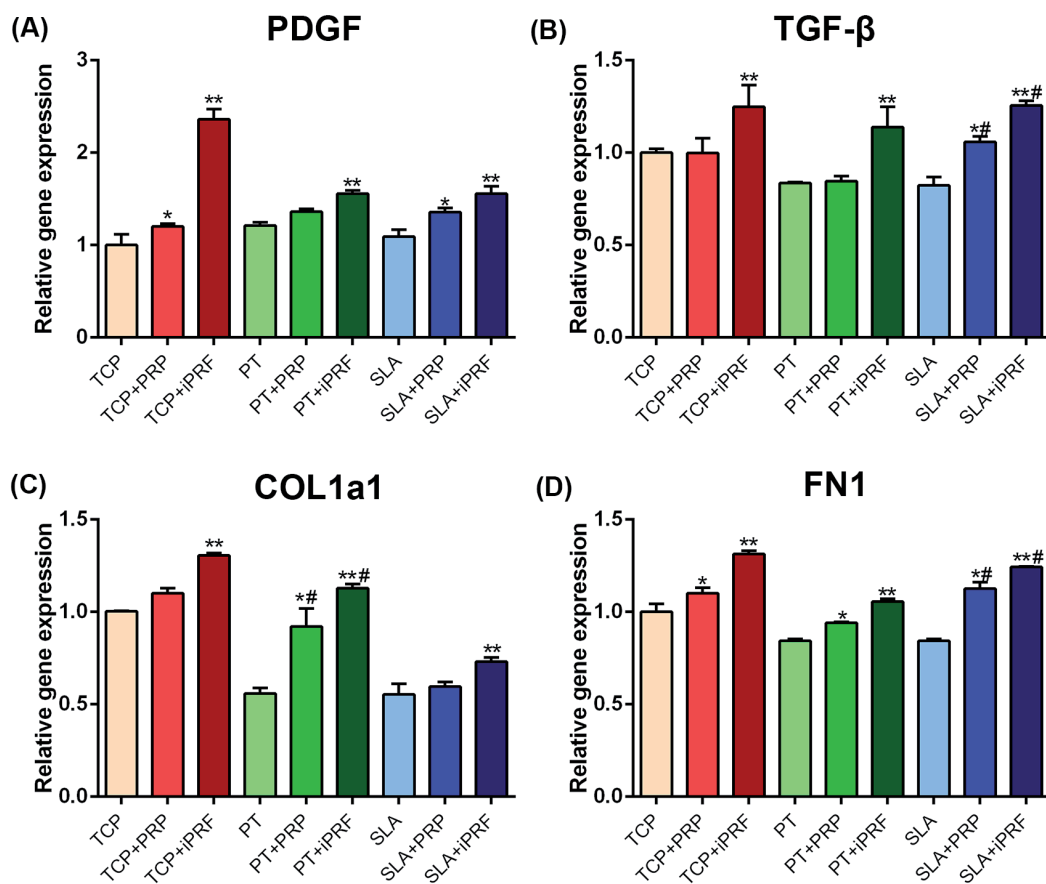
3 pav. Paviršiaus topografijos poveikis su PRP ir i-PRF adhezijai ir žmogaus dantenų fibroblastų proliferacijai. (A) Ląstelių adhezija, esant 2, 4 ir 8 val. ir (B) Ląstelių proliferacija, 1, 3 ir 5 dienomis. (* žymi reikšmingą skirtumą tarp kontrolės ir eksperimentinės grupės, $p < 0.05$; ** žymi reikšmingai didesnę nei visos kitos grupės, $p < 0.05$; # žymi reikšmingą skirtumą tarp PT ir SLA paviršių $p < 0.05$).



4 pav. Paviršiaus topografijos su PRP ir i-PRF poveikis žmogaus dantenų fibroblastų morfologijai (A) Žmogaus dantenų fibroblastai, auginti su ir be PRP arba i-PRF, 8-ą val. buvo dažomi F-aktinas (žalia) ir branduoliai (mėlyna) (masto barai = 100 m); (B) Vidutinis ląstelių plokštuminis plotas. (* žymi reikšmingą skirtumą tarp kontrolės ir eksperimentinės grupės, $p < 0.05$; ** žymi reikšmingai didesnę nei visos kitos grupės, $p < 0.05$; # žymi reikšmingą skirtumą tarp PT ir SLA paviršių $p < 0.05$).

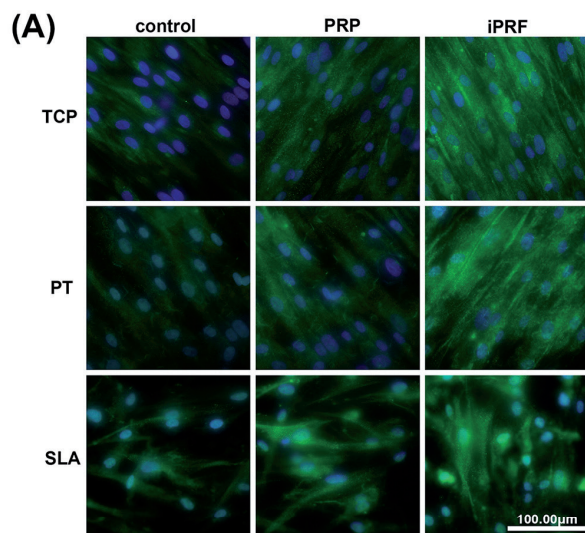


4 pav.

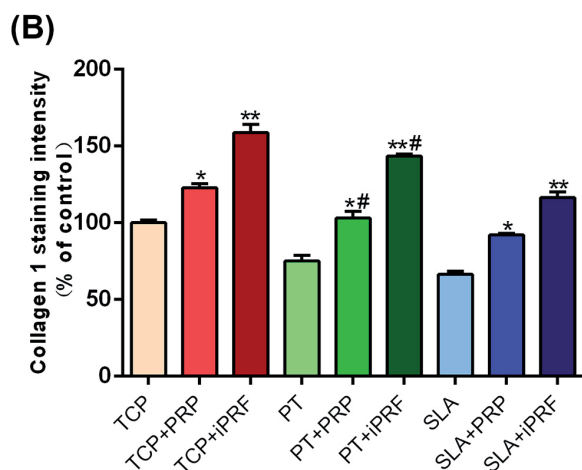


5 pav.

5 pav. Realus laiko polimerazės grandininė reakcija žmogaus dantenų fibroblastams, augintoms su TCP, PT ir SLA, su ir be PRP arba i-PRF mRNA lygiams (A) PDGF; (B) TGF- β ; (C) COL1 ir (D) FN1. (* žymi reikšmingą skirtumą tarp kontrolės ir eksperimentinės grupės, $p < 0.05$; ** žymi reikšmingai didesnę nei visos kitos grupės, $p < 0.05$; # žymi reikšmingą skirtumą tarp PT ir SLA paviršių $p < 0.05$).



6 pav. Imunofluorescentinis kolageno 1 tipo dažymas žmogaus dantenų fibroblastams, pasėtoms 7 dienoms ant TCP, PT ir SLA paviršių su ir be PRP ir i-PRF. (A) Sujungti kolageno 1 tipo dažų (žalia) su DAPI dažais (mėlyna) fluorescenciniai vaizdai. (Masto barai = 100 μ m) (B) Apskaičiuotos kolageno 1 tipo dažymo vertės lyginant su TCP mėginio valdymu (* žymi reikšmingą skirtumą tarp kontrolės ir eksperimentinės grupės, $p < 0.05$, ** žymi reikšmingai didesnę nei visos kitos grupės, $p < 0.05$; # žymi reikšmingą skirtumą tarp PT ir SLA paviršių $p < 0.05$).



6 pav.

Išvada:

i-PRF parodė galintis išleisti didesnes įvairių augimo faktorių koncentracijas ir paskatino didesnę fibroblasto migraciją bei PDGF, TGF- β , kolageno1 išraišką. Yra reikalingi tolimesni tyrimai su gyvūnais norint patvirtinti i-PRF naudojimą kaip bioaktyvią medžiagą, galinčią stimuliuoti audinio atstatymą.

Klinikiniai rezultatai:

Šie duomenys parodo, kad galima skystų trombocitais praturtintų koncentratų formuluotė gali būti gauta nenaudojant antikoagulantų.