

WPŁYW AUTOGENNYCH CZYNNIKÓW WZROSTU Z PŁYTEK KRWI NA PROCESY GOJENIA TKANKI KOSTNEJ - DONIESIENIE WSTĘPNE

AGATA CIEŚLIK-BIELECKA*, TOMASZ BIELECKI**,
TADEUSZ SZYMON GAŹDZIK**, TADEUSZ CIEŚLIK*

*I KATEDRA I KLINIKA CHIRURGII SZCZĘKOWO-TWARZOWEJ W ZABRZU, ŚLĄSKA AKADEMIA MEDYCZNA W KATOWICACH

**KATEDRA I ODDZIAŁ KLINICZNY ORTOPEDII W SOSNOWCU, ŚLĄSKA AKADEMIA MEDYCZNA W KATOWICACH

Streszczenie

Płytki krwi są elementami morfotycznymi krwi, które w dużych stężeniach zawierają naturalne czynniki wzrostu, z których dwa: PDGF i TGF beta odgrywają kluczową rolę w procesach regeneracji. Do tej pory w płytkach krwi odkryto ponad 30 czynników wzrostu, z których najważniejszymi są: PDGF (Platelet Derived Growth Factor), TGF (Transforming Growth Factor), EGF (Epidermal Growth Factor) oraz IGF (Insulin-like Growth Factor). Płytki krwi uwalniają ze swoich ziarnistości i lizosomów m.in. czynniki wzrostu stymulując w ten sposób procesy gojenia tkanki kostnej. Celem pracy była ocena wpływu żelu bogatopłytkowego na procesy gojenia tkanki kostnej.

Na podstawie uzyskanych obrazów radiologicznych oraz wyników badań densytometrycznych u pacjentów z torbielami w żuchwie zaobserwowano przyspieszenie procesu przebudowy tkanki kostnej w grupie z zastosowanym żelem bogatopłytkowym w porównaniu do grupy kontrolnej. U pacjentów z torbielami kości długich obserwowano stały proces przebudowy tkanki kostnej.

Słowa kluczowe: żel bogatopłytkowy, tkanka kostna, gojenie kości, czynniki wzrostu

[Inżynieria Biomateriałów, 54-55,(2006),50-53]

Wstęp

Procesy regeneracji tkanek są możliwe dzięki aktywacji kaskady czynników wzrostu. Płytki krwi są elementami morfotycznego krwi, które w dużych stężeniach zawierają naturalne czynniki wzrostu, z których dwa: PDGF i TGF beta odgrywają kluczową rolę w procesach regeneracji [1, 8].

Do tej pory w płytkach krwi odkryto ponad 30 czynników wzrostu, z których najważniejszymi są: PDGF (Platelet Derived Growth Factor), TGF (Transforming Growth Factor), EGF (Epidermal Growth Factor) oraz IGF (Insulin-like Growth Factor). PDGF jest glikoproteiną produkowaną przez trombocyty, ale syntetyzowaną i wydzielaną również przez makrofagi i komórki śródbłonka. Jest istotnym czynnikiem wzrostowym regulującym i rozpoczynającym wszystkie procesy gojenia, a przede wszystkim pierwszym czynnikiem wzrostu w ranie, pobudzającym rewaskularyzację, syntezę kolagenu oraz regenerację kości. Jego główną funkcją jest stymulacja mitozy, podziału komórek śródbłonka, a także regulacja działania innych czynników wzrostu i komórek. PDGF występuje w trzech formach: PDGF aa, bb, ab [1,9]. TGF jest czynnikiem wzrostu występującym w dwóch formach tj. jako TGF beta1 oraz beta2. Są to glikoproteiny produkowane przez płytki krwi, ale znajdujące się również

INFLUENCE OF AUTOGENOUS GROWTH FACTORS FROM TROMBOCYTES ON BONE HEALING PROCESSES - PRELIMINARY REPORT

AGATA CIEŚLIK-BIELECKA*, TOMASZ BIELECKI**,
TADEUSZ SZYMON GAŹDZIK**, TADEUSZ CIEŚLIK*

*I DEPARTMENT AND CLINIC OF ORAL AND MAXILLOFACIAL SURGERY IN ZABRZE, MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, KATOWICE

**DEPARTMENT AND CLINIC OF ORTHOPEDICS IN SOSNOWIEC, MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, KATOWICE

Abstract

Platelets are blood elements, which contain natural growth factors, from which PDGF i TGF beta play important role in regeneration processes. In platelets until now 30 growth factors are described, from which the most important are: PDGF (Platelet Derived Growth Factor), TGF (Transforming Growth Factor), EGF (Epidermal Growth Factor) oraz IGF (Insulin-like Growth Factor). Thrombocytes growth factors release from granules and lysosomes and stimulate bone healing processes. The aim of this experiment was estimation of influence platelet rich plasma on bone healing processes.

On a base of X - rays and dual X - rays in patients with mandibular cysts it was observed that platelet rich plasma stimulates bone healing processes in experimental group. In patients with long bone cysts constant bone remodeling was observed.

Key words: platelet rich plasma, bone tissue, bone healing, growth factors

[Engineering of Biomaterials, 54-55,(2006),50-53]

Introduction

Tissues regeneration process is possible thanks to activation growth factors cascade. Platelets are cells which in high concentrations contain natural growth factors. The most important are TGF beta and PDGF which play important role in regeneration process [1, 8]. Until now over 30 growth factors were discovered from which the most important are: PDGF (Platelet Derived Growth Factor), TGF (Transforming Growth Factor), EGF (Epidermal Growth Factor) oraz IGF (Insulin-like Growth Factor). PDGF is a glycoprotein which is produced by platelets and synthesized and released also by macrophags and endothelial cells. This growth factor starts and regulates al healing processes and first of all stimulates revascularization, collagen synthesis and bone regeneration process. Its main function is mitosis and endothelial cells division stimulation, and regulation of other growth factors and cells activity. There are three types of PDGF: aa, ab, bb [1, 9].

TGF occurs in two forms: beta1 and beta2. These glycoproteins are produced by platelets and also are situated in macrophags, osteoblasts and other cells. TGF regulates multiplying and differentiation different cell types. Its main function is chemotaxis and mitogenesis of preosteoblasts and ability of collagen deposition stimulation in connective tissue healing process and bone tissue forming. TGF inhibits osteoclast forming and bone resorption [11,14]. EGF and IGF stimulate cell differentiation and en-

w makrofagach, osteoblastach, czy innych komórkach. TGF reguluje namnażanie i różnicowanie różnych typów komórek. Jego najważniejszą funkcją jest chemotaksja i mitogeneza prekursorów osteoblastów oraz zdolność pobudzania odkładania kolagenu w procesie gojenia tkanki łącznej i powstawania tkanki kostnej. TGF hamuje równocześnie procesy tworzenia osteoklastów oraz resorpcję kości [11, 14]. EGF jest czynnikiem odpowiedzialnym za różnicowanie komórek. Stymuluje on procesy powstawania nabłonka oraz angiogenezę. VEGF oraz IGF są równie ważnymi czynnikami wzrostu odpowiedzialnymi za różnicowanie komórek oraz stymulację powstawania nabłonka i angiogenezę [9].

Początkowym etapem gojenia uszkodzonej tkanki kostnej jest krwawienie, które zostaje zahamowane w wyniku przylegania płytek krwi oraz włókniaka z surowicy, w miejscu uszkodzenia naczyń krwionośnych. Płytki krwi uwalniają ze swoich ziarnistości i lizosomów m.in. czynniki wzrostu stymulując w ten sposób procesy gojenia tkanki kostnej [9, 14].

Cel pracy

Celem pracy była ocena wpływu autogennych czynników wzrostu z żelu bogatopłytkowego na procesy gojenia tkanki kostnej.

Material i metody

W I Katedrze i Klinice Chirurgii Szczękowo-Twarzowej w Zabrze oraz w Klinice Ortopedii w Sosnowcu w ramach projektu badawczego 2 PO5C 001 26 finansowanego przez KBN w okresie od października 2003 roku do listopada 2004 roku u 26 pacjentów w wieku 16-81 lat, w znieczuleniu ogólnym wykonywano zabiegi cystektomii. Pacjentów z torbielami żuchwy podzielono na 2 grupy. Grupę kontrolną stanowiło 5 pacjentów, u których wykonywano zabieg cystektomii metodą osteoplastyczną. Grupa doświadczalna obejmowała 19 pacjentów, u których w znieczuleniu ogólnym wykonano zabiegi cystektomii metodą osteoplastyczną, z podaniem żelu bogatopłytkowego w miejsce powstałego po wyluszczeniu torbieli ubytku kostnego. Grupę trzecią stanowili 2 pacjenci, z torbielami nasady bliższej kości udowej, u których w znieczuleniu dołędźwiowym wykonywano operacje z podaniem żelu bogatopłytkowego i kości allogennej do powstałego ubytku kostnego po wyluszczeniu torbieli. Żel bogatopłytkowy uzyskiwano przy pomocy zestawu do separacji płytek firmy Biomet.

Do przygotowania żelu bogatopłytkowego służy jednorazowy zestaw do izolacji płytek krwi. Po pobraniu od pacjenta 54 ml krwi pełnej do strzykawki przed zabiegiem, w której znajduje się antykoagulant: 6 ml cytrynianu sodu i wstrzyknięciu jej do specjalnego zbiornika, poddaje się zbiornik wirowaniu przez 12 minut przy 3200 obrotów/min. Otrzymuje się 3 warstwy - między warstwą 1 i 2 widoczny jest biały kożuszek, który stanowią płytki krwi. Następnie ze zbiornika za pomocą 30 ml strzykawki pobiera się surowicę ubogopłytkową (PPP). Przez 30 sekund ruchami okrężnymi wstrząsa się zbiornikiem i 10 ml strzykawką izoluje się 6 ml surowicy bogatej w płytki (PRP). Do specjalnej dwukaniulowej igły załącza się dwie strzykawki, jedną z PRP, drugą z chlorkiem wapnia i trombiną. Tak przygotowaną podwójną strzykawkę z podwójną kaniulą używa się do doświadczenia.

W 3 dobie oraz w 3, 5, 8, 12, 18 i 24 tygodniu doświadczenia wykonywano pacjentom badania radiologiczne oraz densytometryczne. W wyznaczonych okresach badawczych pobierano pacjentom krew do oceny laboratoryjnej. W wyznaczonych okresach badawczych oznaczano liczbę leukocytów z podziałem na limfocyty, monocyty, neutrofile,

dothelium forming and angiogenesis process [11]. First stage of damaged tissue healing is bleeding which is inhibited by adhesion of platelets and fibrin from the serum in a place where blood vessels are injured. Platelets release from its granules and lizosoms growth factors and that way stimulate bone tissue healing [1, 2].

Aim

The aim of the experiment was estimation an influence of platelet rich plasma on bone healing processes.

Material and methods

From October 2003 to November 2004, 29 patients from I Department and Clinic Oral and Maxillofacial Surgery in Zabrze, Silesian Medical University, Poland and from Department and Clinic of Orthopedics in Sosnowiec Silesian Medical University, Poland were selected for the study. Patient ages ranged from 16 to 85 years. The following criteria qualified patients for the study: mandible and long bones cysts diagnosed on the basis of clinical and radiological examinations.

Patients were divided into 3 groups:

I - 5 patients with mandible cysts treated operatively without PRP - control group,

II - 19 patients with mandible cysts treated operatively with PRP - (after cyst removing PRP filled bone hole) - experimental group,

III - 2 patients with long bone cysts treated operatively with allografts and with PRP (after cyst removing PRP with auto or allograft filled bone hole).

The PRP was prepared by extracting blood from the patient before operation and by using a cell separator to sequester and concentrate the platelets.

Venous blood was obtained from 9 patients. 54 ml of whole blood was drawn from the patient into syringe with 6 ml sodium citrate to achieve anticoagulation. Next the blood was drawn into sterile tube and centrifuged. Whole blood was drawn at a rate of 12 minutes, with a centrifuged speed of 3600 RPM (Biomet separator). The blood was centri-



RYS. 1. Rentgenogram torbieli zębopochodnej trzonu żuchwy. 3 doba po operacji.

FIG. 1. X-ray of dental cyst in mandible. 3 days after operation.



RYS. 2. Badanie densytometryczne żuchwy. 3 doba po operacji.

FIG. 2. Densitometrical examination of mandible. 3 days after operation.

bazofile i eozynofile, skład morfotyczny krwi oraz poziom wapnia i fosforu w surowicy krwi. Dla oceny procesów kościotworzenia i kościogubienia, przed zabiegiem operacyjnym, a także w 3, 5, 8, 12, 18 oraz 24 tygodniu po operacji, pobierano krew do oznaczenia poziomów IL-1, IL-6, M-CSF, osteoprotegeryny oraz ligandu RANK metodą ELISA - badania w toku. Wyniki przeprowadzonych zostaną poddane analizie statystycznej.

Wyniki

Pacjenci byli hospitalizowani po operacji w czasie od 4-10 dni. Po zabiegach operacyjnych czuli się dobrze, rany pooperacyjne goiły się bez powikłań.

Na zdjęciach pantomograficznych żuchwy zaobserwowano, iż proces mineralizacji tkanki kostnej w 5 tygodniu obserwacji w grupie doświadczalnej był bardziej zaawansowany w porównaniu do grupy kontrolnej (RYS.1). W późniejszych okresach badawczych różnice między grupami były niewidoczne.

Wyniki badań densytometrycznych u chorych po zabiegach cystektomii w żuchwie wskazują na stały, wysoki przyrost gęstości tkanki kostnej w grupie doświadczalnej w porównaniu z grupą kontrolną (RYS.2). Począwszy od 5 tygodnia różnica między grupami była znamienista statystycznie.

U chorych z torbielami kości długich również stwierdzono stały przyrost gęstości tkanki kostnej.

Dyskusja

Proces gojenia i regeneracji tkanki kostnej nie został jeszcze w pełni poznany. Główne założenie inżynierii genetycznej stwierdza, iż aby zainicjować sterowaną regenerację tkanek i/lub sterowaną regenerację kości, wszczepione rusztowanie musi być fizycznie lub chemicznie wzbogacone w czynniki wzrostu, cytokiny, komórki autogenne [1,13].

Triadę czynników warunkujących regenerację tkanek zaproponował w 1998 roku Lynch. Zakłada ona, iż do prawidłowego i wydajnego przebiegu procesu regeneracji tkanek niezbędne są trzy składowe. Pierwszym elementem jest rusztowanie lub nośnik, którym może być materiał kostny pochodzenia autogenego lub obcego, syntetyczny materiał zarówno resorbowalny jak i nie resorbowalny oraz żel. Drugą składową stanowią cząsteczki przenoszące sygnał procesu gojenia. Przykładem takich cząsteczek są BMPs, TGFs, adhezyzny, hormony, witaminy oraz zlokalizowane w ziarnistościach trombocytów czynniki wzrostu. Trzecim czynnikiem dopełniającym triadę Lyncha są komórki, na które oddziałują czynniki wzrostu, są nimi komórki niezróżnicowane - macierzyste STEM, komórki zdeterminowane np.: preosteoblasty, fibroblasty, chondroblasty, oraz komórki zróżnicowane takie jak fibrocyty i osteocyty [8].

Lynch wraz z Marxem po raz pierwszy zaproponowali również możliwość zastosowania żelu bogatopłytkowego jako autogenego biomateriału odgrywającego zasadniczą rolę w procesach przyspieszania i stymulacji gojenia tkanki kostnej [8,9]. Cechy czynników wzrostu zlokalizowanych w żelu bogatopłytkowym, w odróżnieniu od czynników rekombinowanych są biologicznie zdeterminowane. Ponieważ czynniki wzrostu stymulują procesy proliferacji komórek, można by się zastanawiać czy nie będą one stymulować procesu karcinogenezy. Obecnie wiadomo jednak, że czynniki te wykazują bezpośrednie działanie na błony komórkowe a nie na jądra, nie mają więc wpływu na procesy nowotworzenia [1,9,10].

Wytworzenie i zastosowanie żelu bogatopłytkowego stało się momentem przełomowym w badaniach nad procesa-

fuged into its three basic components: red blood cells, platelet rich plasma (PRP) sometimes referred to as "buffy coat", and platelet poor plasma (PPP). Because of differential densities, the red blood cell layer forms at the lowest level, the PRP layer in the middle and PPP layer at the top. The cell separator separates each layer from the less dense to the more dense; therefore it separates PPP first and PRP second, leaving the residual red blood cells.

Then the top yellow serum component PPP was removed into 30 ml syringe. Next the tube was shaken vigorously for 30 seconds to suspend platelets and then 10 ml syringe was connected to the tube to extract PRP.

The PRP application requires initiating the coagulation process with a mixture of 10 ml 10% calcium chloride mixed with 10 000 units of bovine thrombin. For PRP application an individual 10 ml sterile syringe for each mix was used (Biomet). Each mix draws in order: 6 ml of PRP, 1 ml of calcium chloride/ thrombin mix, and 1 ml of air to act as a mixing bubble. The syringe was gently agitated to initiate clotting (gelling). The PRP was stored in the operating room at room temperature until we were ready for its use.

The patients in the trial were examined 3 days and 3, 5, 8, 12, 18 and 24 weeks after operation. X ray and dual X ray examinations and laboratory examinations were performed.

In these periods clinical examinations were taken and the blood of the patients was taken to biochemical analysis. Levels of OB and leukocytes divided into lymphocytes, monocytes, basophiles, neutrophiles, eosinophiles were measured.

Results

Patients were in the hospital since 4-10 days after surgery. After operation patients felt good, wounds healed without complications. On X-ray it was observed that bone mineralization process was faster in 5 week of observation in experimental group in comparison with control group (FIG.1) In later experimental periods differences between groups were invisible. In patients with cysts in long bones regeneration process is finished. Dual X-ray results in patients after mandible cyst removing show constant high increase of bone density in experimental group in comparison with control group (FIG.2). Since 5 week differences between groups were statistically significant. In patients with long bone cysts constant increase of bone density was observed.

Discussion

Bone regeneration and healing process is not known yet to the end. Main theory of genetics points to the fact, that in order to initiate control tissue and/or bone regeneration, implanted scaffolding has to be physically or chemically rich in growth factors, cytokins and autologous cells [12,13]. Three factors which are indispensable to tissue regeneration offered by Lynch in 1998. It establishes that to correct and efficient tissues healing course three factors are indispensable. First element is scaffolding or carrier, which can be autogenous or allogeneous bone synthetic resorptive or nonresorptive material and gel. The second elements are particles which carry on healing process signal. The example that kind of particles are: BMPs, TGFs, vitamins, hormones and growth factors which are localized in platelets granules. Third factor are cells on which growth factors influence. There are undifferentiated - native cells, determined cells: preosteoblasts, fibroblasts, chondroblasts and determined cells like fibrocyts and osteocyts [6,15].

Lynch and Marx proposed for the first time, possibility of

mi stymulacji i przyspieszania gojenia tkanek, a w szczególności tkanki kostnej. W literaturze w ostatnich latach pojawiło się szereg doniesień na temat stosowania żelu bogatopłytkowego [2, 3, 4, 10, 12, 15].

W dostępnej literaturze w badaniach prowadzonych z wykorzystaniem PRP, ocenia się wpływ tego biomateriału na procesy gojenia tkanki kostnej na podstawie wyników badań radiologicznych, densytometrycznych oraz histopatologicznych, nie ma natomiast doniesień na temat oceny wpływu PRP na podstawie analizy poziomów markerów kościotworzenia [4, 5, 6, 7].

Wnioski

Przedstawiona praca ma charakter doniesienia wstępnego. Na podstawie uzyskanych obrazów radiologicznych oraz wyników badań densytometrycznych u pacjentów z torbielami w żuchwie zaobserwowano przyspieszenie procesu przebudowy tkanki kostnej w grupie z zastosowanym żelem bogatopłytkowym w porównaniu do grupy kontrolnej. U pacjentów z torbielami kości długich obserwowano stały proces przebudowy tkanki kostnej.

Piśmiennictwo

- [1] Bielecki T., Gaździk T.Sz., Cieślík-Bielecka A., Cieślík T.: Zastosowanie żelu bogatopłytkowego jako biomateriału stymulującego procesy regeneracji i reparacji tkanek. *Inżynieria Biomateriałów*, 2004, 34, 22-26.
- [2] Bielecki T., Gaździk T.Sz., Cieślík-Bielecka A., Cieślík T.: Using the platelet rich plasma in treatment of nonunions and cystes - preliminary report. *Acta Chirurgiae Orthopaedicae et Traumatologiae Cechoslovaca*, 2004, 1, 55.
- [3] Cmolik B.: Redo cardiac surgery: Leed bleeding complications from topical thrombin-induced factor five deficiency. *Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 1993, 105, 222.
- [4] Dugrillon A., Eichler H., Kern S.: Autologous concentrated platelet rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2002, 31, 615-619.
- [5] Jensen T.B., Rahbek O., Overgaard S., Soballe K.: Platelet rich plasma and fresh frozen bone allograft as enhancement of implant fixation an experimental study in dogs. *Journal of Othopaedic Research*, 2004, 22, 653-658.
- [6] Kassolis J.D.: Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft case series. *Journal of Periodontology*, 2000., 71, 1654-61.
- [7] Landsberg R.: Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2000, 58, 297-300.
- [8] Lynch S.E.: The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *Journal of Periodontology*, 1991, 62, 458-467.

using platelet gel as autogenous biomaterial which plays important role in stimulation bone healing process [4,10]. Growth factors features in platelets are biological determined in comparison with recombinated factors. Because growth factors stimulate cell proliferation processes they could stimulate carcinogenic processes. But it is well known, that these factors influences on cell membranes not for nucleus, that is why they do no influences on neoplasia processes [3]. Forming and using platelet gel become a breakthrough in experiments on stimulation bone healing processes. Last time on literature there are many reports about using platelet gel [5, 8].

Conclusion

This is preliminary report. We observed that platelet gel enhances bone healing processes. Platelet-rich plasma can be used also with autogenous bone transplants in cysts treatment.

References

- [9] Marx R.E.: Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 1998, 85, 638-646.
- [10] Robiony M.: Osteogenesis Distraction and Platelet-Rich Plasma for Bone Restoration of the Severely Athrophic Mandible: Preliminary Results. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2002, 60, 630-635.
- [11] Smolik B.: Redo cardiac surgery: Leed bleeding complications from topical thrombin-induced factor five deficiency. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 1993, 105, 222.
- [12] Spero J.A., Thor A.: Reconstruction of the anterior maxilla with platelet gel, autogenous bone, and titanium mesh: case report. *Clinical Implant and Dental Research*, 2002, 4, 150-155.
- [13] Whitman D.H., Berry R.L., Green D.M.: Platelet Gel: an autologous alternative to fibrin glue with application in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.*, 1997, 55, 1294-99.
- [14] Wojtowicz A., Szostak D., Malejczyk J.: Inżynieria tkankowa w chirurgii stomatologicznej-przegląd nowych materiałów i technik. *Nowa stomatologia*, 2002, 19, 15-21.
- [15] Zechner W., Tangl S., Tepper G., Furst G., Bernhart T., Hass R., Mailath G., Watzek G.: Influence of platelet rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2003, 18, 15-22.