

ZASTOSOWANIE ŻELU BOGATOPŁYTKOWEGO JAKO BIOMATERIAŁU STYMULUJĄCEGO PROCESY REGENERACJI I REPARACJI TKANEK

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

*KATEDRA I ODDZIAŁ KLINICZNY ORTOPEDII,
ŚLĄSKA AKADEMIA MEDYCZNA, SOSNOWIEC

**I KATEDRA I KLINIKA CHIRURGII SZCZĘKOWO-TWARZOWEJ,
ŚLĄSKA AKADEMIA MEDYCZNA, ZABRZE

Słowa kluczowe: regeneracja tkanki kostnej, surowica bogatopłytkowa, PRP, koncentrat płytek krwi, ubytki kostne, żel

[Inżynieria Biomateriałów, 34, (2004), 22-25]

Wstęp

Organizm ludzki w drodze ewolucji wykształcił komórki i narządy, które mają chronić nasze ciało przed uszkodzeniem, a jeśli już do niego dojdzie ich zadaniem jest jak najszybsza regeneracja uszkodzonych tkanek i powrót do zdrowia. Stale poszukuje się materiałów stymulujących procesy naprawcze powstałe w wyniku uszkodzenia tkanek. Takie biomateriały powinny cechować się określonymi właściwościami: nie mogą wywoływać miejscowej i ogólnoustrojowej odpowiedzi odpornościowej organizmu, nieść ryzyka zakażenia oraz dla powszechnego stosowania powinny być stosunkowo tanie. Wyżej wymienione kryteria spełniają materiały autogenne. Chcąc wykorzystać w pełni potencjały obronne i regeneracyjne ludzkiego organizmu zaczęto izolować i z powodzeniem stosować poszczególne typy własnych, już wyspecjalizowanych komórek.

Doskonałym przykładem takich komórek są płytki krwi, w których odkryto do tej pory ponad 30 czynników wzrostu, a spośród nich najważniejsze znaczenie mają PDGF (Platelet Derived Growth Factor), TGF (Transforming Growth Factor), oraz EGF (Epithelial Growth Factor), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) i IGF (Insulin-like Growth Factors) [8, 11]. PDGF i TGF β są znanymi czynnikami niezbędnymi do regeneracji tkanek. PDGF m.in. stymuluje mitogenezę komórek macierzystych (STEM) i osteoblastów oraz angiogenezę. TGF podobnie jak PDGF stymuluje mitogenezę, a także wpływa na różnicowanie komórek macierzystych w osteoblasty oraz osteoblastów w osteocyty. Osteoblasty podobnie jak płytki krwi uwalniają czynniki wzrostu m.in.: TGF β , IGF 1 i 2 oraz PDGF, a także FGF (fibroblastyczny czynnik wzrostu) - czynnik wytwarzany wyłącznie przez komórki kości. Potwierdzeniem znaczącego udziału czynników wzrostu w procesie osteoindukcji jest jednostka chorobowa, w której wrodzony brak prawidłowego receptora alfa dla PDGF jest jedną z opisanych przyczyn zaburzeń w morfogenezie kości twarzy czaszki i kręgosłupa. Oprócz czynników wzrostu, płytki krwi w swoich ziarnistościach zawierają substancje biologicznie czynne jak serotoninę czy katecholaminy, a także osteokalcynę, proakcelerynę, czynnik von Willebranda. Mnogość substancji znajdująca się w

APPLICATION OF THE PLATELET RICH PLASMA AS BIOMATERIAL STIMULATING TISSUE REGENERATION AND REPARATION PROCESSES

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

*DEPARTMENT AND CLINIC OF ORTHOPAEDICS
SILESIA MEDICAL UNIVERSITY, SOSNOWIEC

**I DEPARTMENT AND CLINIC OF MAXILLO-FACIAL SURGERY,
SILESIA MEDICAL UNIVERSITY, ZABRZE

Key words: bone regeneration, platelet rich plasma, PRP, platelets concentrate, bone losses, gel

[Engineering of Biomaterials, 34, (2004), 22-25]

Introduction

Human body during evolution formed cells and organs, which have to protect body against damage, and even if it happens their task is fast regeneration of injured tissues and back to health. Scientists are still looking for materials which could stimulate regeneration processes during tissues injury. That kind of materials should have following features: they can not cause local and general immunological response, infections, and for common use they should be cheap. That kind of criterions perform autogenous biomaterials. In order to use protective and regenerative potentials of the human body own cells and tissues are applied.

Excellent example of that kind of cells are platelets containing over 30 growth factors, and the most important factors are: PDGF (Platelet Derived Growth Factor), TGF (Transforming Growth Factor) and EGF (Epithelial Growth Factor), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), IGF (Insulin-like Growth Factors) [8, 11]. PDGF and TGF β are well known factors which are indispensable for tissue regeneration. PDGF, among others, stimulates mitogenesis of native cells (STEM), osteoblasts and angiogenesis. TGF like PDGF stimulates mitogenesis and influences on native cells differentiation in osteoblasts and osteoblasts in osteocytes. Osteoblasts like platelets release growth factors like: TGF β , IGF 1 and 2 and PDGF, FGF (Fibroblastic Growth Factor) - factor which is produced only by bone cells. Confirmation of significant participation growth factors in osteoinduction process is disease in which, congenital lack of correct receptor for PDGF is one of reasons disturbances in face, skull and spinal cord bones morphogenesis. Apart from growth factors platelets in granules contain biological active substances like: serotonin and catecholamines and others. Large number of substances in platelets, especially these which take a part in coagulation, osteogenesis processes and in immunological response, testify about role of these morphotic elements in physiology and pathology of the human organism [5, 8, 10, 11, 15].

In late 90s XX century scientists start to think how to use

plytkach krwi, w szczególności dotyczy to tych substancji, które biorą udział w procesie krzepnięcia, kościotworzenia i odpowiedzi immunologicznej, świadczy o roli tych elementów morfotycznych w fizjologii i patologii człowieka [5, 8, 10, 11, 15].

Pod koniec lat 90 XX wieku zaczęto zastanawiać się nad wykorzystaniem biologicznego potencjału płytek krwi, co zaowocowało powstaniem tzw. żelu bogatopłytkowego (TAB.1).

Poprzez odwirowanie i wyizolowanie pełnej autogennej krwi otrzymano koncentrat płytek krwi tzw. surowicę bogatopłytkową (PRP). Zagęszczenie płytek spowodowało, iż wzrosło stężenie PDGF i TGF β , integryn i innych cząsteczek adhezyjnych w otrzymanym preparacie PRP, a po dodaniu do niego trombiny powstała galaretowata masa tzw. żel bogatopłytkowy [8,14].

Chociaż w literaturze światowej stale ukazują się prace na temat roli substancji biologicznie czynnych zawartych w płytkach krwi, nadal istnieje niewiele doniesień związanych z żelem bogatopłytkowym. Surowica bogatopłytkowa dzięki swoim właściwościom znalazła zastosowanie w kardio i torakochirurgii szczególnie w zabiegach przeszczepów płuc i serca [3], neurochirurgii zwłaszcza w operacjach kręgosłupa [12], na oddziałach oparzeniowych i oddziałach zajmujących się trudno gojącymi się ranami [1], a także w chirurgii szczękowo-twarzowej głównie w implantologii [2, 4, 5, 6, 8, 9, 13].

Pomimo że proces sterowanej osteogenezy przez żel bogatopłytkowy został potwierdzony w badaniach in vitro [11], jak również w badaniach na zwierzętach [2,16], nie ma w piśmiennictwie doniesień na temat jego wpływu in vivo na proces osteogenezy u człowieka w złamaniach kości, złamaniach z brakiem zrostu, torbielach, osteotomiach zarówno w ortopedii i traumatologii oraz chirurgii szczękowo - twarzowej.

Obecnie na rynku jest dostępnych kilka zestawów do separacji płytek krwi. Otrzymany koncentrat w zależności od firmy posiada różną ilość płytek krwi. Średnio w organizmie ludzkim we krwi znajduje się około 200 000 płytek/ μ l. Stwierdzono, iż surowica bogatopłytkowa powinna posiadać co najmniej 1 000 000 płytek/ μ l oraz 5 ml objętości, aby przyspieszać gojenie tkanek miękkich i kości [7]. Zestaw do izolacji płytek krwi firmy Biomet-Merck przygotowuje koncentrat o gęstości średnio 2 600 000 płytek/ μ l i w porównaniu z innymi systemami jest od nich kilkakrotnie wydajniejszy.

Materiał i metody

Do przygotowania żelu bogatopłytkowego służy jednorazowy grawitacyjny system separacji płytek krwi. Proces rozpoczyna się pobraniem od pacjenta 54 ml krwi pełnej do strzykawki przed zabiegiem, w której znajduje się antykoagulant (6 ml cytrynianu sodu). Następnie wstrzykuje się ją do specjalnego zbiornika, który poddaje się wirowaniu przez 12 minut przy 3200 obrotów/min. Efektem odwirowania są 3 warstwy - między warstwą 1 i 2 widoczny jest "biały korzuszek", który stanowią płytki krwi. Następnie tłoczek w zbiorniku przesuwamy się w dół, aż zetknie się on z warstwą płytek krwi. Przy pomocy 30 ml strzykawki, ze zbiornika pobiera się surowicę ubogatopłytkową (PPP). Przez 30 sekund ruchami okrężnymi wstrząsa się zbiornikiem, a następnie 10 ml strzykawką izoluje się 5-6 ml surowicy bogatej w płytki (PRP). Do specjalnej dwukaniulowej igły łączy się dwie strzykawki, jedną z PRP, drugą z chlorkiem wapnia i trombiną. Tak przygotowaną podwójną strzykawkę z podwójną kaniulą można zastosować w warunkach sali operacyjnej (RYS. 1-5).

Zalety żelu bogatopłytkowego: Platelet gel advantages:

- Produkt autologiczny
Autogenous product
- Lek bezpieczny, nietoksyczny
Safe drug, non toxic
- ↓ krwawienie śródoperacyjne
↓ intraoperative bleeding
- ↓ potrzebę przetaczania krwi
↓ necessity blood transfusion
- Prosty do przygotowania (20 minut)
Easy to prepare (20 minutes)
- Może być użyty natychmiast
It can be use at once
- Stosunkowo niskie koszty
Low treatment costs

TABELA 1. Zalety żelu bogatopłytkowego.
TABLE 1. Platelet gel advantages.

platelet biological potential, and at that time platelet rich plasma has been elaborated (TAB. 1).

Through full autogenous blood rotation and isolation platelets concentrate was received: platelet rich plasma (PRP). Platelets condensation caused, that PDGF, TGF β and other adhesive molecules in platelet rich plasma was higher, and after adding thrombin to PRP gelous mass:platelet gel is formed [8, 14].

Despite of the fact that in international literature there are publications on the subject of role of the biological active substances presented in platelets, there is still small number of publications on platelet gel. Platelet rich plasma thanks to characteristic properties is used in cardiosurgery and thoracosurgery, especially during lungs and heart transplantations [3], in neurosurgery, mainly in spinal cord surgery [12], on burns divisions, in difficult healing wounds [1], and in maxillofacial surgery, especially in implantology [2, 4, 5, 6, 8, 9, 13].

Although guided bone regeneration process with platelet gel was confirmed in vivo examinations [11] and on animals [2,16], there is no publication on influence of platelet gel in vivo on osteogenesis in human bone fractures, non-union fractures, cystes, osteotomy in orthopaedic and maxillofacial surgery.

Nowaday there are few platelet separation devices accessible on the market. Obtained concentrate in dependence of the firms, have different number of plateletes. The average number of plates in human blood is about 200 000 plateletes/ μ l. Platelet rich plasma should have no less than 1 000 000 plateletes/ μ l and 5 ml volume to accelerate bone and tissue healing [7]. Device for platelets isolation made by Biomet-Merck contain about 2 600 000 platelets/ μ l and in comparison with other firms is more productive.

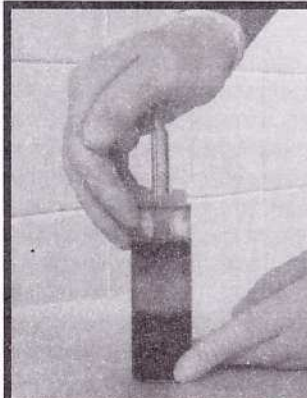
Material and methods

Platelet Separation System consists of few parts. First it is necessary to take blood from vein to disposable syringe. Then slowly load blood-filled 60 ml syringe (6 ml of citrate anticoagulant and 54 ml of whole blood) into blood port. Next put into centrifuge and spin with 3 200 rpm for 12 minutes. As a result of rotating three layers are formed. The plateles layer is created between 1 and 2 layers. Then one must put down the plunger. The plunger will stop when the tip of volume gauge contacts the bottom buoy. Then one have to extract platelet poor plasma (PPP) by connecting the 30 ml syringe to plasma port and extract contents, next shake tube vigorously for 30 seconds to suspend

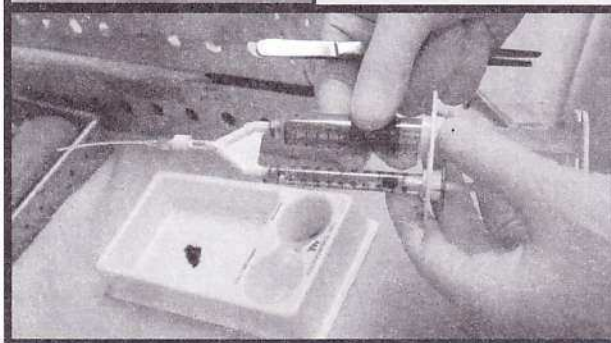


RYS. 1. Napełnianie zbiornika 60 ml strzykawką (6 ml cytrynianu sodu i 54 ml krwi).
FIG. 1. Filling the container by means of 60 ml syringe (6 ml of citrate anti-coagulant and 54 ml of blood).

RYS. 2. Wkładanie zbiornika do wirówki.
FIG. 2. Insertion of container into centrifuge.



RYS. 3. Zsuwanie floczka w dół zbiornika.
FIG. 3. Moving down the plunger.



RYS. 4. System podwójnych strzykawk GPS.
FIG. 4. Double syringes system of GPS.



RYS. 5. Żel bogato-płytkowy.
FIG. 5. Platelet gel.

Właściwości żelu bogatopłytkowego:
Platelet gel properties

- Stymuluje proces angiogenezy
Stimulates angiogenesis process
- Działa chemotaktycznie na monocyty, makrofagi i fibroblasty
Chemotaxical action on monocytes, macrophages and fibroblasts
- Pobudza syntezę kolagenu
Stimulates collagen synthesis
- Stymuluje wzrost nabłonka
Stimulates epithelial growth
- Stymuluje proces osteogenezy
Stimulates osteogenesis process
- Wysoki poziom leukocytów w żelu wywołuje efekt antybakteryjny oraz redukuje uczucie bólu
High level of leucocytes in gel causes antibacterial effect and reduces pain feeling
- Zmniejsza krwawienie poprzez połączenie fibrynogenu (PRP), trombiny i jonów wapnia
Decreases bleeding through connecting fibrinogen (PRP), thrombin and calcium ions

TABELA 2. Właściwości żelu bogatopłytkowego.
TABLE 2. Platelet gel properties.

the platelets. It is necessary to connect 10 ml syringe to the tube and extract Platelet Rich Plasma (PRP). When PRP will be connected with calcium and thrombin we retain Platelet Gel (FIG. 1-5).

Discussion

Healing process of damaged tissues is defined as cell and biochemical reactions, which is caused by injury. Important element of tissue injury is bleeding, which starts that process. Platelets adhere to blood vessels in a place of injury and with fibrin from serum inhibit bleeding. From granules and lysosomes they release growth factors, proteolytic enzymes, serotonin and stimulate healing process of the injured tissues (TAB. 2) [3, 6, 7].

The use of platelet gel reach 90's of the XX century and are connected with maxillofacial surgery. In 1997 Whitman et al. for the first time showed platelet rich plasma isolation method and using platelet gel as an alternative method for fibrin glue [5, 9, 14].

Now it is known that for tissues healing process 3 factors are necessary. First of them is scaffolding or carrier, and it can be autogenous or foreign bone, synthetic resorbable or unresorbable materials and gel. The second element are molecules for example BMPs, TGFs, hormones, vitamins and first of all growth factors, which carry a healing process signal. The last element are cells on which growth factors have an influence, these are undifferentiated cells - native STEM, determined cells like preosteoblasts, fibroblasts, chondroblasts and differentiated cells like fibroblasts and osteocytes. Platelet gel provides to injured tissues all these factors which are necessary in finishing repair process [5, 15].

Features of the growth factors in platelet gel are biological determined in distinguishing from growth factors, synthesized by hamsters ovoid cells, which have a human gene implanted to plasmids. Platelet gel is a mixture of seven native growth factors, in which natural carrier is blood clot, in distinguishing from recombinant factors, which individually in high concentrations are delivered thanks to synthetic carriers or carriers from animals [7].

Because growth factors stimulate cell proliferation processes, it is interesting to know whether they can stimulate

Dyskusja

Proces gojenia uszkodzonych tkanek definiuje się jako lawinowy ciąg reakcji komórkowych i biochemicznych zainicjowanych urazem. Nieodłącznym elementem uszkodzenia tkanek jest krwawienie, które rozpoczyna ten proces. Płytki krwi przylegają do miejsca uszkodzonych naczyń krwionośnych i wraz z włóknikiem z surowicy hamują krwawienie. Uwalniają one ze swoich ziarnistości i lizosomów m.in. czynniki wzrostu, enzymy proteolityczne, tromboksan, serotoninę i prostaglandyny stymulując proces gojenia uszkodzonych tkanek (TAB. 2) [3, 6, 7].

Początki stosowania żelu bogatopłytkowego sięgają lat 90 XX wieku i są ściśle związane z chirurgią szczękowo - twarzową. W 1997 roku Whitman i wsp. jako pierwsi zilustrowali metodę izolowania surowicy bogatopłytkowej (PRP) oraz przygotowania i wykorzystania żelu bogatopłytkowego jako pozytywnej alternatywy dla kleju fibrynowego [5, 9, 14].

Obecnie powszechnie wiadomo, że do procesu gojenia tkanek niezbędne są 3 czynniki. Pierwszym jest rusztowanie lub nośnik, którym może być materiał kostny pochodzenia autogennego lub obcego, materiały syntetyczne resorbowalne lub nieresorbowalne, a także żel. Drugim elementem są cząsteczki przenoszące sygnał procesu gojenia, których przykładem są morfogeny np. BMPs, TGFs, adhezyny, hormony, witaminy, a przede wszystkim znajdujące się w ziarnistościach płytek krwi czynniki wzrostu. Ostatnią składową są komórki na które oddziałują czynniki wzrostu tj. komórki niezróżnicowane - macierzyste STEM, komórki zdeterminowane np. preosteoblasty, fibroblasty, chondroblasty oraz komórki zróżnicowane np. fibrocyty i osteocyty. Żel bogatopłytkowy dostarcza do uszkodzonych tkanek tych wszystkich czynników potrzebnych do zakończenia reparacji uszkodzonych tkanek [5, 15].

Cechy czynników wzrostu znajdujących się w żelu bogatopłytkowym są biologicznie zdeterminowane, w odróżnieniu od rekombinowanych czynników wzrostu, których komórki ludzkie nie wytwarzają, a które są syntetyzowane przez komórki jajowe chomików chińskich, posiadających ludzki gen wszczepiany plazmidom. Żel bogatopłytkowy jest mieszaniną siedmiu natywnych czynników wzrostu, których naturalnym nośnikiem jest skrzep, w odróżnieniu od czynników rekombinowanych, które pojedynczo w wysokich stężeniach są dostarczane za pomocą nośników syntetycznych lub pochodzenia zwierzęcego [7].

Ponieważ czynniki wzrostu stymulują proces proliferacji komórkowej, można by się zastanawiać czy nie będą one również stymulatorem procesu karcinogenezy, obecnie wiadomo jednak, że czynniki te działają na błony komórkowe a nie na ich jądra, więc nie wpływają na procesy nowotworzenia. Z całą pewnością nie są one mutagenami, gdyż aktywują one wewnętrzne białko cytoplazmatyczne, stymulujące prawidłową, a nie wadliwą ekspresję genu [7].

Ważny jest również fakt, iż ponieważ żel bogatopłytkowy powstaje z pozyskania krwi własnej, nie istnieje w związku z tym ryzyko zakażenia się takimi wirusami jak HIV czy wirusem zapalenia wątroby [7].

Podsumowanie

Zastosowanie żelu bogatopłytkowego stało się momentem przełomowym w badaniach nad procesami stymulacji i przyspieszenia gojenia tkanki kostnej oraz tkanek miękkich. Chociaż rola żelu jako czynnika wpływającego na procesy reparacji i regeneracji tkankowej nie została jeszcze do końca poznana, stał się on niewątpliwie reprezentantem nowej generacji biotechnologii związanej z inżynierią tkankową oraz terapią komórkową.

the carcinogenesis process. Nowadays, it is known that these factors influence cell membranes and not on nuclei, so they do not stimulate neoplasia. They are not mutagens, because they activate an internal cytoplasmic protein, which stimulate normal gen expression [7].

Very important is also fact, that platelet gel is made from own blood, so there is no HIV and hepatitis risk infection [7].

Conclusions

Usidg platelet gel became a breach moment in examinations connected with stimulation and acceleration bone and tissues healing processes. Though gel role as a factor which influences tissues reparation and regeneration processes is not still well known gel is a representative new generation biotechnology connected with tissue engineering and cell therapy.

Piśmiennictwo

References

- [1] Bhanot S., Alex J.: Current applications of platelet gel in facial plastic surgery. *Facial Plast Surg.*, 2002, 18: 27-33.
- [2] Block MS., Chang A., Crawford.: Mandibular alveolar ridge augmentation in the dog using distraction osteogenesis. *J Oral Maxillofac Surg.*, 1996, 54: 309.
- [3] Cmolik B. et al.: Redo cardiac surgery: Leed bleeding complications from topical thrombin-induced factor five deficiency. *J Thorac Cardiovasc Surg.*, 1993, 105: 222.
- [4] Kassolis J.D. et al.: Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series. *J. Periodontol.*, 2000, 71:1654-1661.
- [5] Landesberg R, Roy M, Glickman R.: Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet rich plasma gel preparation. *Journal of Oral and Maxillo -Facial Surgery.*, 2000, 25: 297-300.
- [6] Lynch S.E. et al.: The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J. Periodontol.*, 1991, 62:458-467.
- [7] Marx R.E.: Platelet Rich Plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP. *Implant Dentistry.*, 2001, 10: 225-228.
- [8] Marx R.E. et al.: Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol.*, 1998, 85:638-646.
- [9] Robiony M. et al.: Osteogenesis Distraction and Platelet-Rich Plasma for Bone Restoration of the Severely Athrophic Mandible: Preliminary Results. *J Oral Maxillofac Surg.*, 2002, 60: 630-635.
- [10] Siebrecht M. et al.: Platelet concentrate increases bone ingrowth into porous hydroxyapatite. *Orthopedics.*, 2002, 25: 169-172.
- [11] Slater M. et al.: Involvement of Platelets in Stimulating Osteogenic Activity. *J Orthopaedic Res.*, 1995, 13: 655-663.
- [12] Spero JA.: Bovine thrombin-induced inhibitor of factor V and bleeding risk in postoperative neurosurgical patients. *Neurosurgery.*, 1993, 78: 817.
- [13] Thor A.: Reconstruction of the anterior maxilla with platelet gel, autogenous bone, and titanium mesh: case report. *Clin Implant Dent Relat Res.*, 2002, 4: 150-155.
- [14] Whitman DH, Berry RL, Green DM.: Platelet Gel: an autologous alternative to fibrin glue with application in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.*, 1997, 55: 1294-1299.
- [15] Wojtowicz A., Szostak D., Malejczyk J.: Inżynieria tkankowa w chirurgii stomatologicznej - przegląd nowych materiałów i technik. *Nowa Stomatologia.*, 2002, 19: 25-28.
- [16] Zechner W., Tangl S., Tepper G., Furst G. et al.: Influence of platelet rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs. *J Oral Maxillofac Implants*, 2003, 18:12-22.