

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

Τίτλος: «Βιοϊατρικές Μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση»

Διπλωματική Εργασία

Κυτταροβιολογική μελέτη πλάσματος πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP) που προορίζεται για θεραπευτική χρήση



Όνοματεπώνυμο Μεταπτυχιακής Φοιτήτριας:
Υψηλάντη Ευφροσύνη (A.M. DML15019)

Επιβλέπων: Κριεμπάρδης Αναστάσιος
Επ. Καθηγητής Εργαστηριακής Αιματολογίας – Αιμοδοσίας

Τριμελής Επιτροπή: Κριεμπάρδης Αναστάσιος
Παπαγεωργίου Ευσταθία
Φούντζουλα Χριστίνα

Αθήνα 2018

UNIVERSITY OF WESTERN ATTICA
SCHOOL OF HEALTH AND WELFARE SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES
POSTGRADUATE STUDY PROGRAM

Title: "Biomedical Methods and Technologies in Diagnosis"

Postgraduate Study

Cellular and biological study of Platelet Rich Plasma (PRP) intended for
therapeutic use



Name: Ypsilanti Effrosyni (N.S. DML15019)

Supervisor: Kriebardis Anastasios

Assistant Professor of Laboratory Hematology and Transfusion Medicine

Thesis Committee: Kriebardis Anastasios
Papageorgiou Efstathia
Fountzoula Christina

Athens 2018

Η Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1. Κριεμπάρδης Αναστάσιος**
- 2. Παπαγεωργίου Ευσταθία**
- 3. Φούντζουλα Χριστίνα**

Στον πατέρα μου

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία αποτελεί διπλωματική εργασία στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση» του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή της διπλωματικής εργασίας, Επ. Καθηγητή Αναστάσιο Κριεμπάρδη για την πολύτιμη καθοδήγησή του και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Εκφράζω τις ευχαριστίες μου και στα υπόλοιπα δυο μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, Αν. Καθηγήτρια Ευσταθία Παπαγεωργίου και Επ. Καθηγήτρια Χριστίνα Φούντζουλα

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους Καθηγητές του ΜΔΕ που μου μετέδωσαν τις γνώσεις τους κατά την διάρκεια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών με θέμα «Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση».

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στη Δρ. Χρυσούλα Μπέλεση, Διευθύντρια του Αιματολογικού Τμήματος, Γενικό Νοσοκομείο Νίκαιας-Πειραιάς «Άγιος Παντελεήμων» - Γ.Ν. Δυτικής Αττικής «Η Αγία Βαρβάρα» για την πολύτιμη βοήθεια της στη προσπάθειά μου να ολοκληρώσω τη μεταπτυχιακή μου εργασία.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την τέως Διευθύντρια του Αιματολογικού Τμήματος, Γενικό Νοσοκομείο Νίκαιας-Πειραιάς «Άγιος Παντελεήμων» - Γ.Ν. Δυτικής Αττικής «Η Αγία Βαρβάρα» Δρ. Ελένη Μανιουδάκη για την υποστήριξή της.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου που με υπομονή και κουράγιο πρόσφεραν την απαραίτητη ηθική συμπαράσταση για την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Περιεχόμενα

| | |
|--|----|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | 1 |
| ABSTRACT | 3 |
| A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... | 4 |
| A.1. Ιστορική αναδρομή του πλάσματος πλούσιο σε αιμοπετάλια..... | 5 |
| A.2. Πλάσμα Πλούσιο σε Αιμοπετάλια (Platelet Rich Plasma, PRP)- Ορισμός | 6 |
| A.3. ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΟ | 6 |
| A.3.1. Ανατομία και φυσιολογία του αιμοπεταλίου..... | 6 |
| A.3.2. Οι Λειτουργίες των αιμοπεταλίων..... | 10 |
| B. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΠΛΟΥΣΙΟ ΣΕ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ | 16 |
| B.1. Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια και αυξητικοί παράγοντες | 17 |
| B.2. Μονοπάτια ενδοκυτταρικής μεταγωγής σημάτων των αυξητικών παραγόντων | 19 |
| B.3. Αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF, Platelet Derived Growth Factor) | 21 |
| B.4. Τροποποιητικός αυξητικός παράγοντας – β (TGF-b, Transforming Growth Factor-b) | 23 |
| B.5. Ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor) | 26 |
| B.6. Αυξητικός παράγοντας ινσουλίνης 1 (IGF-1, Insulin Like Growth Factor-1) | 27 |
| B.7. Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF, Epidermal Growth Factor) | 29 |
| B.8. Αιμοπεταλιακός παράγοντας 4 (PF 4, Platelet Factor 4)..... | 30 |
| B.9. Βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (bFGF, Basic Fibroblast Growth Factor) | 31 |
| B.10. Συγκέντρωση αιμοπεταλίων και αυξητικών παραγόντων στο Πλάσμα Πλούσιο σε Αιμοπετάλια (PRP)..... | 32 |
| B.11. Πώς λειτουργεί το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια..... | 35 |
| B.12. Ο ρόλος των αυξητικών παραγόντων στην οστική αναγέννηση..... | 36 |
| B.13. Ο ρόλος των αυξητικών παραγόντων στη αγγειογένεση..... | 40 |
| B.14. Ο ρόλος των αυξητικών παραγόντων στην επιθηλιοποίηση | 43 |
| B.15. Ταξινόμηση του πλάσματος πλούσιο σε αιμοπετάλια | 46 |
| B.16. Τρόπος παρασκευής πλάσματος πλούσιο σε αιμοπετάλια..... | 48 |
| B.17. Προφίλ ασφαλείας και πιθανοί κίνδυνοι του πλάσματος πλούσιο σε αιμοπετάλια | 67 |

| | |
|--|-----|
| Γ. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΠΛΟΥΣΙΟ ΣΕ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ | 69 |
| Γ.1. Εφαρμογή του πλάσματος πλούσιο σε αιμοπετάλια σε χρόνια μη θεραπεύσιμα δερματικά έλκη..... | 70 |
| Γ.2. Μελέτες σε ζώα για την θεραπευτική δράση του πλάσματος πλούσιο σε αιμοπετάλια στην επούλωση..... | 110 |
| Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ..... | 113 |
| Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 117 |

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP, Plasma Rich Platelet) είναι μια νέα μέθοδος προσέγγισης στην αναγεννητική ιατρική. Η αναγεννητική ιατρική είναι ένας νέος όρος που άρχισε να γίνεται γνωστός σχετικά τις τελευταίες δεκαετίες και αναφέρεται στη ικανότητα του οργανισμού να αποκαθιστά τόσο δομικά όσο και λειτουργικά την αναγέννηση των ιστών.

Το PRP ορίζεται ως εναιώρημα αιμοπεταλίων σε μικρό όγκο πλάσματος, που χαρακτηρίζεται από υψηλότερη συγκέντρωση αιμοπεταλίων σε σύγκριση με τη συγκέντρωση του αρχικού αυτόλογου αίματος που συλλέγεται. Περιέχει διαφορετικούς αυξητικούς παράγοντες και βιομόρια που είναι απαραίτητα για την αποκατάσταση και την αναγέννηση των ιστών. Οι αυξητικοί παράγοντες που εκκρίνονται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια είναι ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF), ο τροποποιητικός αυξητικός παράγοντας-β (TGF-β), ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), ο ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), ο αυξητικός παράγοντας ινσουλίνης-1 (IGF-1) και ο βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (bFGF). Οι αυξητικοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, στη χημειοταξία, τη διαφοροποίηση και τη αγγειογένεση.

Υπάρχουν διάφορα πρωτοκόλλα για την προετοιμασία του PRP που συνήθως προκύπτει προϊόν PRP με διαφορετικές συγκεντρώσεις αυξητικών παραγόντων. Όλα τα πρωτόκολλα που ακολουθούνται βασίζονται στη βασική αρχή της διαφορικής φυγοκέντρωσης, αλλά τα αποτελέσματα δε μπορούν να τυποποιηθούν για όλους τους ασθενείς επειδή χρησιμοποιείται αυτόλογο αίμα. Το PRP χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο σε κλινικές μελέτες για τη βελτίωση της επούλωσης των τραυμάτων, ιδιαίτερα των μη θεραπεύσιμων τραυμάτων. Χρόνιο τραύμα ορίζεται το τραύμα που δε έχει εμφανίσει επανεπιθηλιοποίηση της περιοχής μέσα σε 3 μήνες. Τα κοινά χρόνια τραύματα περιλαμβάνουν τα διαβητικά έλκη, τα φλεβικά έλκη, τα πιεστικά έλκη, τα αρτηριακά έλκη και τα χρόνια τραύματα οποιασδήποτε αιτιολογίας που δε ανταποκρίνονται σε συμβατές θεραπείες. Η ανεπάρκεια σε έναν ή περισσότερους αυξητικούς παράγοντες επηρεάζει τη φυσιολογική διαδικασία της επούλωσης. Έχει βρεθεί ότι ο PDGF δρα στη πρώιμη φάση της επούλωσης προάγοντας τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών, την παραγωγή του TGF-β, τη χημειοταξία και την αγγειογένεση. Ο TGF-β προάγει τη

χημειοταξία, τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών, τη σύνθεση του κολλαγόνου και την αγγειογένεση. Ο VEGF συμβάλει στη νεοαγγειογένεση κατά την επούλωση του τραύματος. Ο EGF διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων και των ινοβλαστών προάγοντας το σχηματισμό του κοκκιώδους ιστού και την αγγειογένεση. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα που να αποδεικνύεται η αποτελεσματικότητα της εφαρμογής των αυτόλογων προϊόντων του PRP σε μη θεραπεύσιμα χρόνια τραύματα.

ABSTRACT

Platelet-rich plasma (PRP) is a new approach to regenerative medicine. Regenerative medicine is a new term known in recent a decade which refers to the body's ability to restore tissue regeneration both structurally and functionally.

PRP is defined as a dense platelet suspension in plasma characterized by a much higher platelet concentration of the original autologous blood from which it has been collected. It contains various growth factors and biomolecules necessary for recovery and regeneration of tissues. The growth factors secreted by the activated platelets are platelet-derived growth factor (PDGF), *transforming growth factor beta* (TGF- β), epidermal growth factor (EGF), *vascular* endothelial growth factor (VEGF), insulin growth factor -1 (IGF-1) and basic fibroblast growth factor (bFGF). These biological growth factors play an important role in cell proliferation, chemotaxis, differentiation and angiogenesis.

There is a wide variation in the reported protocols for PRP preparation that usually result in a PRP product with different growth factor concentrations. This is mainly due to the fact that while all relative protocols based on differential centrifugation technique, the final product cannot be standardized and is unique for each patient, because of the use of autologous peripheral blood for each patient. PRP is increasingly being used in clinical studies to improve wound healing, especially in untreatable wounds. Chronic trauma is defined as a trauma that has not shown epithelialization of the area within 3 months. Common chronic wounds include diabetic ulcers, venous ulcers, pressure ulcers, arterial ulcers, and chronic wounds of any aetiology that do not respond to conventional treatment. It is well known that deficiency in one or more growth factors affects the normal healing process. PDGF has been found to act in the early healing phase by promoting fibroblast proliferation, TGF- β production, chemotaxis and angiogenesis. TGF- β promotes chemotaxis, fibroblast proliferation, collagen synthesis and angiogenesis. VEGF contributes to new vascularization during wound healing. EGF stimulates the proliferation of epithelial cells and fibroblasts by promoting granulation tissue formation and angiogenesis.

Further research is needed in order to prove the effectiveness of autologous PRP products application to untreatable wounds.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1. Ιστορική αναδρομή του πλάσματος πλούσιο σε αιμοπετάλια

Η χρήση πλάσματος πλούσιο σε αιμοπετάλια (platelet-rich plasma, PRP), αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1987 από τους Ferrari και συν. (Ferrari και συν., 1987) οι οποίοι χρησιμοποίησαν αυτόλογο αίμα μετά από εγχείρηση ανοικτής καρδιάς. Σκοπός τους ήταν να αποφύγουν την εκτεταμένη μετάγγιση παραγώγων ομόλογου αίματος.

Οι πρώτες αναφορές για θεραπευτική χρήση του PRP, χρονολογούνται στις αρχές της δεκαετίας του 1990. Οι γιατροί χρησιμοποίησαν το PRP για την θεραπεία της τενοντοπάθειας, όπου άρχισαν να παρατηρούνται και τα πρώτα θετικά κλινικά αποτελέσματα (International Celluar Medicine Society (ICMS), 2011).

Εργασία ορόσημο θεωρείται αυτή του Marx και συν. (Marx και συν., 1998) οι οποίοι έδειξαν ότι ο συνδυασμός PRP και αυτόλογου οστικού μοσχεύματος στη αποκατάσταση ελλειμμάτων της κάτω γνάθου, κατέληξε σε ταχύτερη αποκατάσταση. Παρουσιάστηκε μια ταχύτερη οστική ωρίμανση και μια πυκνότερη οστική αναγέννηση.

Το 1997 οι Whitman και συν. (Whitman και συν., 1997) με το άρθρο τους, έκαναν δημοφιλή τη χρήση του PRP στη γναθοχειρουργική. Ανέφεραν, ότι το πήκτωμα που δημιουργήθηκε μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, αύξησε την επούλωση των πληγών. Η απελευθέρωση των αυξητικών παραγόντων συνεχιζόταν στο τελικό προϊόν PRP και μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Στις αρχές του 2009, η χρήση του PRP έγινε γνωστή στο ευρύ κοινό από τα Μέσα Μαζικής Ενημέρωσης. Δύο παίχτες από τους Pittsburgh Steelers, έλαβαν θεραπεία με PRP για τραυματισμό στον αστράγαλο, πριν από το θρίαμβο τους στο Super Bowl. Λόγω της έκτασης που πήρε το θέμα από τα Μέσα Μαζικής Ενημέρωσης, η χρήση του PRP έγινε αποδεκτή ως θεραπεία σε αθλητικούς τραυματισμούς (Dhillon και συν., 2012).

Ωστόσο, ο Ehrenfest και συν. (Ehrenfest και συν., 2014) στη βιβλιογραφική αναφορά που έκαναν, αναφέρουν ότι η πρώτη περιγραφή για τις κόλλες ινώδους έγινε από τον Matras το 1970, που χρησιμοποιήθηκαν για την επούλωση δερματικών τραυμάτων σε μοντέλο αρουραίων. Λίγα χρόνια αργότερα (1975-1979) υπήρξαν αρκετές έρευνες που ανέφεραν ότι οι κόλλες ινώδους περιείχαν σημαντική συγκέντρωση αιμοπεταλίων. Ο όρος που δόθηκε στα παρασκευάσματα

αυτά ήταν «μίγματα αιμοπεταλίων-ινωδογόνο-θρομβίνης» ή «ζελατίνη αιμοπεταλίων».

A.2. Πλάσμα Πλούσιο σε Αιμοπετάλια (Platelet Rich Plasma, PRP)- Ορισμός

Το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP) είναι πλάσμα το οποίο μετά από κατάλληλη επεξεργασία, εμφανίζει πολύ μεγάλη συγκέντρωση αιμοπεταλίων. Ορίζεται ως μια ποσότητα αυτόλογου αίματος, της οποίας η συγκέντρωση σε αιμοπετάλια είναι μεγαλύτερη της φυσιολογικής, σε μικρό όγκο πλάσματος. (Marx R., 2001, Marx R., 2004, Smith και συν., 2007, Pavlovic και συν., 2016, Shahid και συν., 2017).

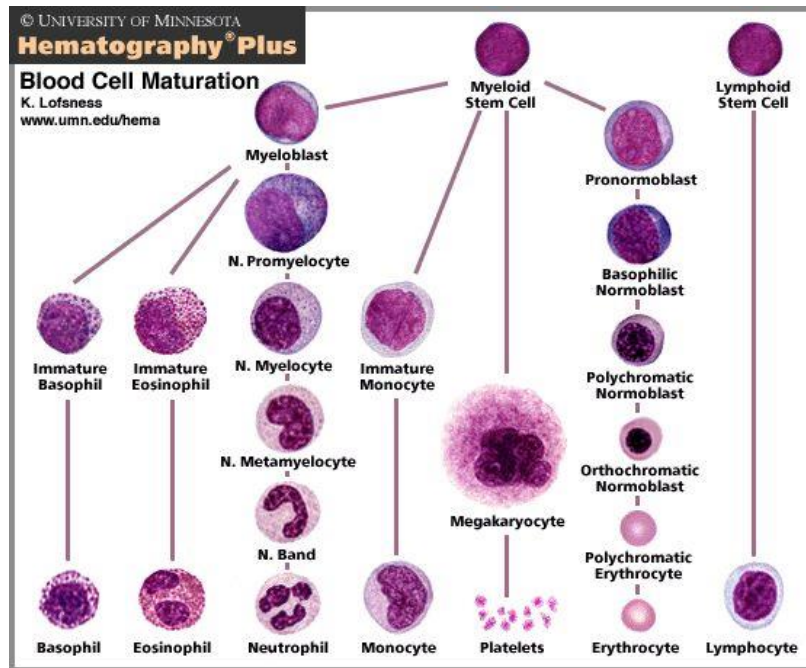
Το PRP επειδή είναι βιολογικό υλικό που προέρχεται από τον ίδιο τον ασθενή, είναι ασφαλές και απαλλαγμένο από μεταδοτικές ασθένειες, ανοσολογικές αντιδράσεις και τον κίνδυνο μόλυνσης (Smith και συν., 2007, Pavlovic και συν., 2016).

A.3. ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΟ

A.3.1. Ανατομία και φυσιολογία του αιμοπεταλίου

Τα αιμοπετάλια παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά στο αίμα από τον Γάλλο φυσίατρο Donne' Alfred (Donne, 1842). Πρόκειται για κυτταρικά θραύσματα, που προέρχονται από τον κατακερματισμό του κυτταροπλάσματος ενός γιγάντιου πολυπλοειδικού κυττάρου, του μεγακαρυοκύτταρου (*Εικόνα 1*). Τα αιμοπετάλια είναι μικρά και απύρνα, με δισκοειδή μορφή και ποικίλο σχήμα, μεγέθους 2-5 μm και με όγκο περίπου 7 fl . Η παραγωγή των αιμοπεταλίων από τον μυελό των οστών επηρεάζεται από την θρομβοποιητίνη (TPO), την ιντερλευκίνη- 3 (IL-3) καθώς και διάφορες κυτοκίνες (Γεωργούλης, 2010).

Τα αιμοπετάλια από την στιγμή που θα εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος έχουν διάρκεια ζωής περίπου 10 ημέρες. Ο φυσιολογικός αριθμός των αιμοπεταλίων σε υγιή ενήλικα άτομο κυμαίνεται μεταξύ 150.000/μl έως 350.000/μl, με μέσο όρο περίπου τις 200.000 /μl (Marx, 2001).

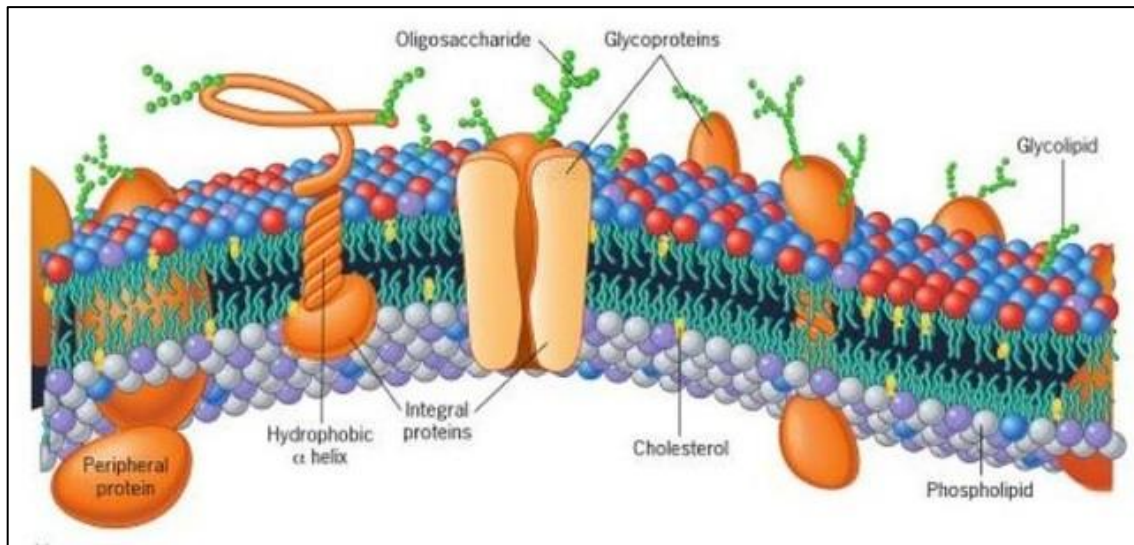


Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση της εξέλιξης των κυττάρων αίματος (Ανατύπωση από: hema.umn.edu/pages/matchart.html)

Το αιμοπετάλιο δομικά αποτελείται, από την κυτταρική μεμβράνη που επικαλύπτεται από ένα γλυκοκάλυκα, τον κυτταρικό σκελετό και το κυτταρόπλασμα. Η κυτταρική μεμβράνη των αιμοπεταλίων έχει ασύμμετρη δομή και όψη, ενώ η δομή της απαντά στο κλασσικό μοντέλο του ρευστού μωσαϊκισμού της δίστιβης μεμβράνης κατά Singer και Nicholson (*Εικόνα 2*) (Singer και Nicholson, 1972).

Η διάτρητη όψη της κυτταρικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων αποδίδει δύο μεμβρανικά συστήματα, το ένα είναι το σύστημα των ανοικτών σωληνίσκων και το άλλο είναι το σύστημα των πυκνών σωληνίσκων. Όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται, μέσω του συστήματος του ανοικτού σωληνίσκου εισέρχονται ιόντα Ca^{++} και εξέρχεται το περιεχόμενο των κοκκίων του αιμοπεταλίου.

Το σύστημα των πυκνών σωληναρίων είναι το σύστημα καναλιών του ενδοπλασματικού δικτύου, το οποίο δεν επικοινωνεί με το έξω περιβάλλον (Μακρής, 1994).



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση διάταξης κυτταρικής μεμβράνης που απαντά στο κλασικό μοντέλο του ρευστού μωσαϊκισμού κατά Singer και Nicholson (Ανατύπωση από: <https://www.timetoast.com/timelines/the-scientific-contributions-and-the-process-towards-the-creation-of-the-fluid-mosaic-model-of-the-cell-membrane>)

Ο κυτταρικός σκελετός των αιμοπεταλίων αποτελείται από (α) σύστημα μικροσωληναρίων, (β) το πυκνό δίκτυο και (γ) από σημαντικά ποσά ακτίνης και μικρά ποσά μυοσίνης. Στο κυτταρόπλασμα διακρίνονται τρία είδη εκκριτικών κοκκίων: (α) τα α-κοκκία, (β) τα δ-κοκκία (πυκνά κοκκία) και (γ) τα λ-κοκκία (λυσσοσωματικά) (Γεωργούλης, 2010).

Τα α-κοκκία είναι τα πιο άφθονα κοκκία μέσα στο αιμοπετάλιο, αποτελούν το 10% περίπου τον όγκο των αιμοπεταλίων, ενώ σε κάθε αιμοπετάλιο υπάρχουν περίπου από 20-200 κοκκία. Περιέχουν πολλές σημαντικές πρωτεΐνες, όπου κάποιες απλά βρίσκονται συνδεδεμένες με την μεμβράνη και κάποιες βρίσκονται αποθηκευμένες και εκκρίνονται στο περιβάλλον σε δεδομένες συνθήκες (Ρανλιovic και συν., 2016).

Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται οι παρακάτω αυξητικοί παράγοντες:

- Αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF-aa,bb,ab, Platelet derived growth factor)
- Τροποποιητικός αυξητικός παράγοντας – β (TGF-b, Transforming growth factor–b)
- Αγγειογενετικός αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDAF, Platelet derived angiogenesis factor)
- Ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF, Vascular endothelial growth factor)

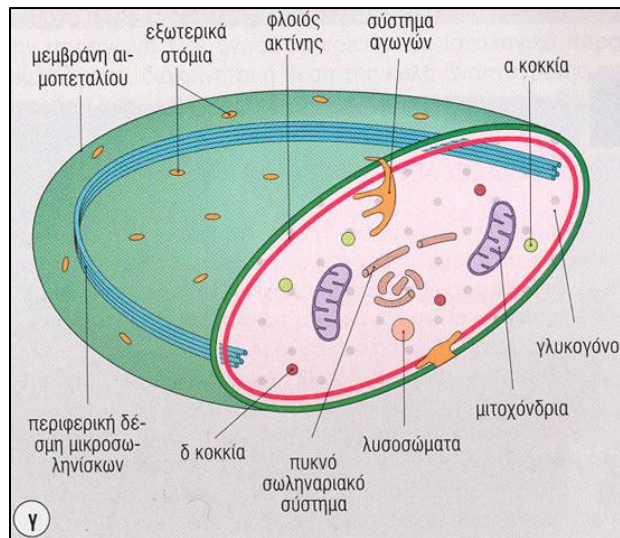
- Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF, Epidermal growth factor)
- Κυτταρικός επιθηλιακός αυξητικός παράγοντας (ECGF, Epithelial cell growth factor)
- Ινσουλινικός αυξητικός παράγοντας 1 (IGF 1, Insulin-like growth factor 1)
- Αιμοπεταλιακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (PDEGF, Platelet derived endothelial growth factor)
- Ηπατοκυτταρικός αυξητικός παράγοντας (HGF, Hepatocyte growth factor)

Επιπλέον, τα α κοκκία των αιμοπεταλίων περιέχουν:

- Ινωδογόνο
- Θρομβίνη
- Παράγοντες V, VIII, XI, XIII
- Von Willebrand (FvW)
- Βιτρονεκτίνη
- Φιμπρονεκτίνη (FN)
- Παράγοντας ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων (PAF, Platelet Activating Factor)
- Πλασμινογόνο
- Ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου (tPA, tissue plasminogen activator)
- Ανασταλτής του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου 1 PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor -1)
- A₂- αντιπλασμίνη
- A₂- μακροσφαιρίνη
- Θρομβοσπονδίνη (TS)
- Ακτομυοσίνη
- Ρ-σελεκτίνη
- Ισταμίνη
- Σεροτονίνη
- Κατεχολαμίνες
- B12
- Β-θρομβογλοβουλίνη
- Αγγειοποιητίνη –I
- Πρωτεΐνη S

- Ιντερλευκίνη – 1 (Interleukin- 1, IL-1)

Τα δ-κοκκία περιέχουν ιόντα Ca^{++} / Mg^{++} , σεροτονίνης, πυροφωσφορικό ADP και ATP, καθώς και μόρια που διεγείρουν την διαδικασία της πήξης. Τα λ- κοκκία είναι κυστίδια με λυσοσωματικά ένζυμα (Γεωργούλης, 2010). Επίσης, υπάρχουν κοκκία γλυκογόνου, υπεροξυσωμάτια καθώς και μιτοχόνδρια ,όπου χρησιμεύουν ως αποθήκες Ca^{++} (Μακρής, 1994). Τα ιόντα ασβεστίου όπως θα δούμε παρακάτω παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της πήξης.



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση της δομής του αιμοπεταλίου (Ανατύπωση από: www.emed.med.uoa.gr)

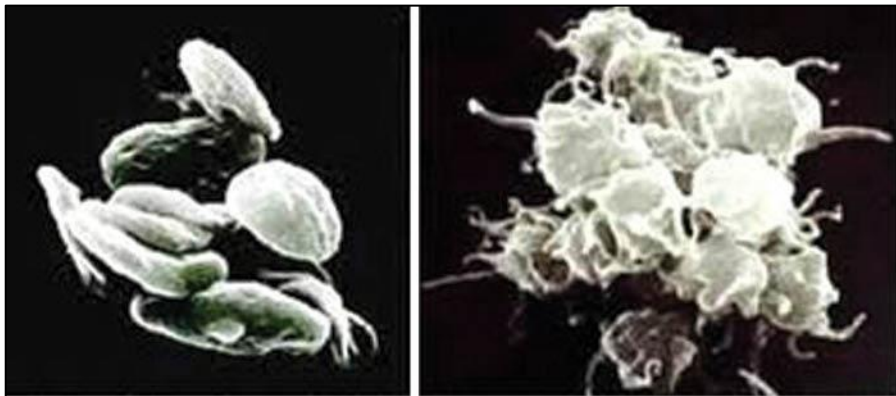
A.3.2. Οι Λειτουργίες των αιμοπεταλίων

Οι κύριες λειτουργίες των αιμοπεταλίων είναι δύο, η αιμόσταση και η έναρξη της ιστικής επούλωσης. Η αιμόσταση είναι μια ισορροπημένη αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων, αγγείων και πρωτεϊνών που είναι υπεύθυνες για την πήξη του αίματος. Στην ουσία, η αιμόσταση εμπλέκεται στα αρχικά στάδια της ιστικής επούλωσης (Holinstat, 2017).

Στην κυκλοφορία του αίματος τα αιμοπετάλια βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας, με δισκοειδή μορφή. Όταν υπάρξει κάποιο ερέθισμα, που μπορεί να είναι χυμικό, φυσικό ή και συνδυασμός των δύο, τα αιμοπετάλια αρχίζουν να αλλάζουν μορφή και να σχηματίζουν ψευδοπόδια. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. *In vivo*, τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται από την παρουσία

υποενδοθηλιακού κολλαγόνου σε συνδυασμό είτε με τον παράγοντα Von Willebrand (FvW)-ιόντα Ca^{++} -ινωδογόνου, είτε με θρομβίνη - ADP, είτε συνδυασμό αυτών. *In vitro*, τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται από το κολλαγόνο, την θρομβίνη και τα ADP.

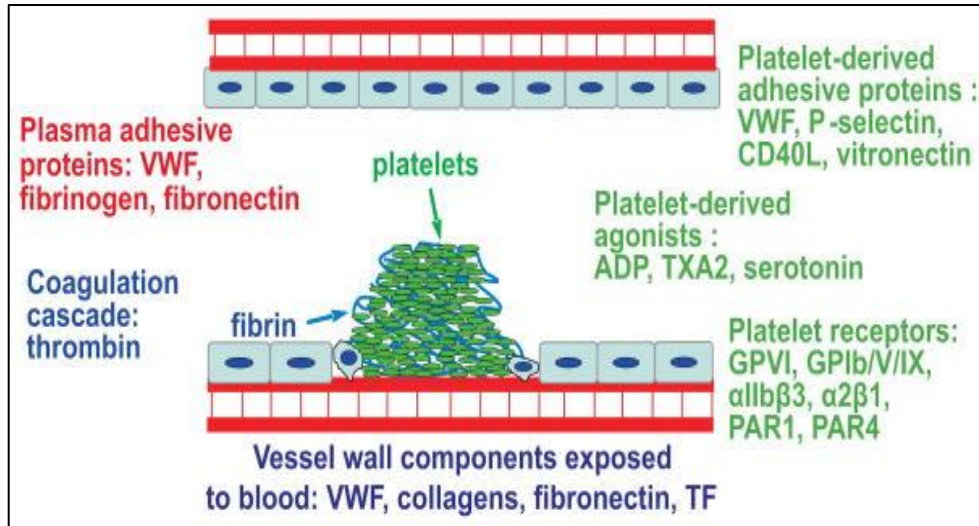
Όταν υπάρξει η λύση της συνέχειας του τοιχώματος ενός αιμοφόρου αγγείου, στο σημείο της βλάβης βρίσκεται εκτεθειμένο υποενδοθηλιακό κολλαγόνο. Αμέσως, μη ενεργοποιημένα αιμοπετάλια οδεύουν προς το σημείο της βλάβης του αιμοφόρου αγγείου. Το κολλαγόνο του ενδοθηλίου συνδέεται με τον παράγοντα Von Willebrand (FvW), όπου το νέο σχηματισμένο μόριο συνδέεται με τον υποδοχέα της γλυκοπρωτεΐνης Ib, IIb, IIIb (GPIb, GPIIb, GPIIIb) που βρίσκεται στην κυτταρική επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως προσκόλληση των αιμοπεταλίων με το υποενδοθήλιο. Μόλις τα αιμοπετάλια προσκολληθούν στην επιφάνεια, αρχίζουν να ενεργοποιούνται. Κατά την ενεργοποίηση ο κυτταρικός σκελετός των αιμοπεταλίων αλλάζει σχήμα και από δισκοειδές μετατρέπεται σε σφαιρικό με προεξέχοντα ψευδοπόδια (*Εικόνα 4*).



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση αιμοπεταλίου σε κατάσταση ηρεμίας (αριστερά) και ενεργοποιημένο αιμοπετάλιο (δεξιά) (Ανατύπωση από: <https://blood.ca/en/blog/2017-01/primer-platelets?pedisable=true>)

Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια αρχίζουν να συσσωρεύονται κατά ομάδες με τη βοήθεια του ινωδογόνου και του παράγοντα Von Willebrand (FvW). Μετά την συσσώρευση των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων, εκκρίνονται από τα α -κοκκία των αιμοπεταλίων σημαντικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σχηματισμό του πρωτογενούς αιμοπεταλιακού θρόμβου (*Εικόνα 5*). Η απελευθέρωση των κοκκίων γίνεται μέσω του συστήματος του ανοικτού καναλιού, ενώ το ADP προωθεί την

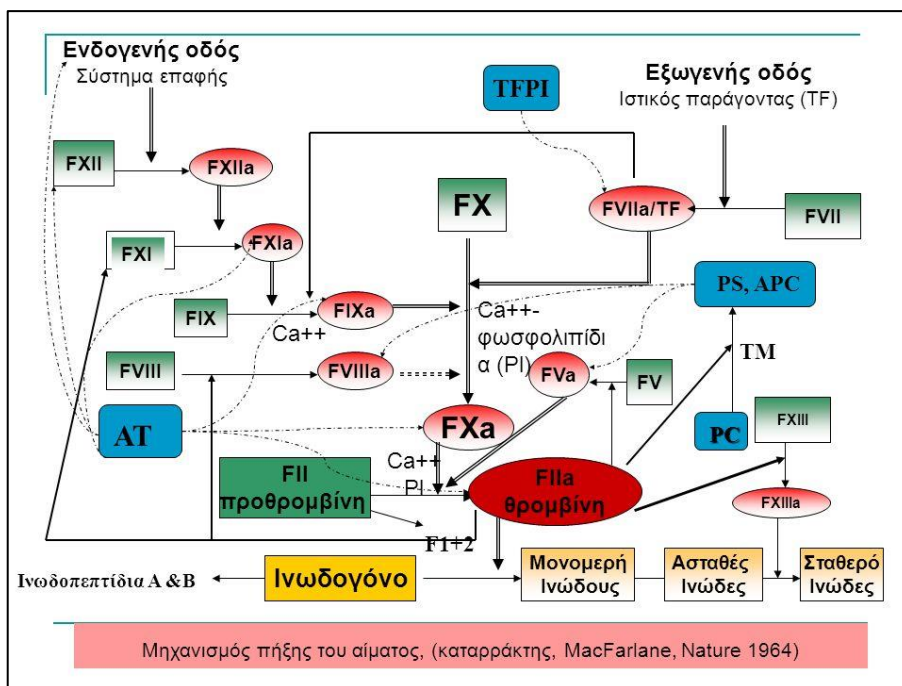
έκκριση ουσιών από τα κοκκία των γύρω αιμοπεταλίων. Ο πρωτογενής αιμοπεταλιακός θρόμβος ονομάζεται και λευκός θρόμβος, γιατί στο εσωτερικό του δεν παγιδεύονται ερυθρά αιμοσφαίρια (Everts και συν., 2006).



Εικόνα 5. Πρωτογενής αιμόσταση – Σχηματισμός αιμοπεταλιακού θρόμβου (Ανατύπωση από: Gale.J.A., 2011)

Ταυτόχρονα, ενεργοποιείται και ο μηχανισμός της αιμόστασης που έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του ινωδογόνου και του ινώδους.

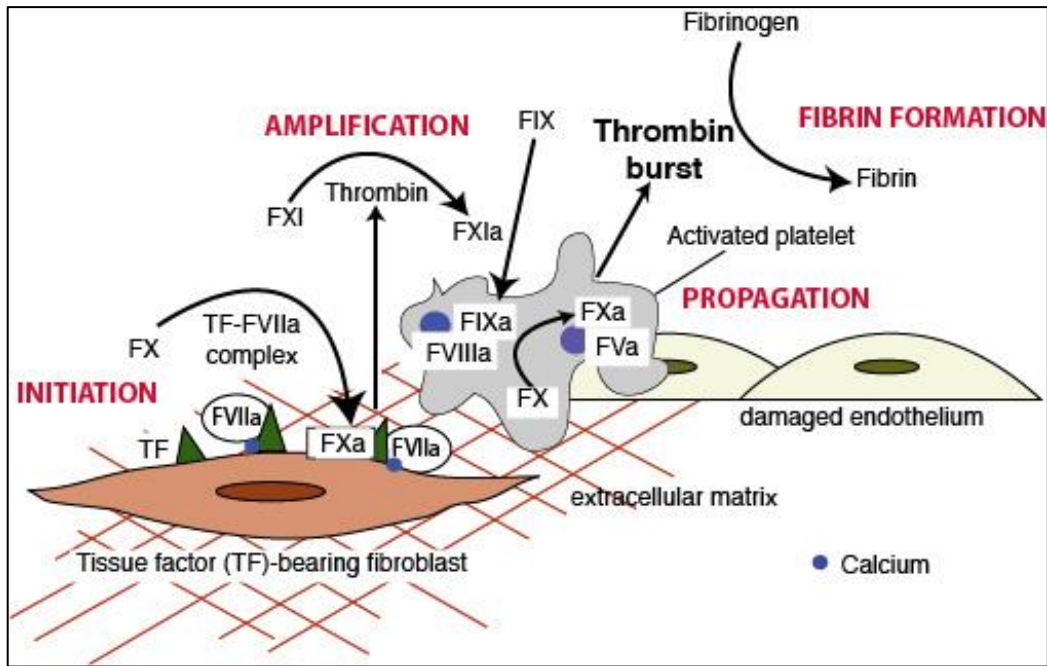
Ο μηχανισμός της αιμόστασης μπορεί να ενεργοποιηθεί με δυο διαφορετικές οδούς, την ενδογενή οδό και την εξωγενή οδό. Και στους δύο μηχανισμούς, συμβαίνει μια αλληλουχία αντιδράσεων στις οποίες ανενεργοί παράγοντες ενεργοποιούνται και καταλύουν το σχηματισμό προϊόντων από πρόδρομες ουσίες. Με την σειρά τους αυτά τα προϊόντα ενεργοποιούν άλλους παράγοντες, έτσι ώστε να σχηματιστεί ο αιμοστατικός θρόμβος. Η ενδογενής οδός ενεργοποιείται από οποιαδήποτε καταστροφή ή διαταραχή του αίματος, χωρίς να υπάρχει καταστροφή κάποιου ιστού. Ενώ, η εξωγενής οδός ενεργοποιείται μόνο όταν υπάρχει η παρουσία διαφόρων παραγόντων που προέρχονται από τους κατεστραμμένους ιστούς. Ο όλος αυτός μηχανισμός της δευτερογενής αιμόστασης απαντά στο κλασσικό μοντέλο της πήξης, που ονομάζεται καταρράκτης της πήξης και καταλήγει στον σχηματισμό του ινώδους (Εικόνα 6) (Couley, 2004, Γεωργούλης, 2010).



Εικόνα 6. Καταρράκτης της πήξης (Ανατύπωση από: MacFarlane, 1964 τροποποιημένο)

Στο τελικό στάδιο της αιμόστασης, γύρω από την περιοχή της βλάβης του αιμοφόρου αγγείου, συσσωρεύονται λευκά αιμοσφαίρια. Τα λευκά αιμοσφαίρια ενεργοποιούνται και απελευθερώνουν κυτοκίνες, οι οποίες λύνουν τον αιμοστατικό θρόμβο, μέσω του ινωδολυτικού συστήματος (Εικόνα 7). Βασικός στόχος του μηχανισμού της αιμόστασης που περιλαμβάνει το μηχανισμό πήξης- ινωδόλυσης είναι η αποκατάσταση της λύσης της συνέχειας του αγγειακού τοιχώματος και παράλληλα η διατήρηση της διαβατότητας του αγγείου (Everts και συν., 2006).

Η πρωτογενής αιμόστασης ξεκινάει μέσα σε 30 δευτερόλεπτα από τον τραυματισμό του αιμοφόρου αγγείου και ολοκληρώνεται μέσα σε 5 λεπτά. Θεωρητικά αυτός είναι και ο χρόνος που απαιτείται για να ενεργοποιηθεί το αιμοπετάλιο. Ο ινωδολυτικός μηχανισμός και η όλη διαδικασία αποκατάστασης της βλάβης του τοιχώματος ενός αιμοφόρου αγγείου ξεκινάει 2 – 3 ώρες μετά τον σχηματισμό του αιμοστατικού θρόμβου και ολοκληρώνεται μέσα σε 2 – 3 μέρες (Γεωργούλης, 2010).



Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση Δευτερογενούς αιμόστασης και Ινωδολυτικού μηχανισμού (Ανατύπωση από: www.eclinpath.com/hemostasis/physiology/secondary-hemostasis/secondary-haemostasis/)

Έχει διαπιστωθεί ότι, η παρουσία των αιμοπεταλίων στην επούλωση και την αποκατάσταση των ιστών είναι σημαντική. Η διεργασία της επούλωσης είναι μια πολυσύνθετη αλυσιδωτή διαδικασία, που εξελίσσεται σε 3 φάσεις. Κάποιες βιβλιογραφίες αναφέρουν ότι η ιστική επούλωση αποτελείται από 4 φάσεις. Μόλις υπάρξει η λύση της συνέχειας του τοιχώματος ενός αγγείου, αμέσως ενεργοποιείτε ο μηχανισμός της αιμόστασης για να σχηματιστεί ο αιμοστατικός θρόμβος. Όταν σχηματιστεί ο αιμοστατικός θρόμβος, ακολουθεί η πρώτη φάση της ιστικής επούλωσης, όπου από τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων εκκρίνονται διάφορες πρωτεΐνες όπου ρόλος τους είναι να σχηματίσουν ένα είδος φραγμού, έναντι των μικροοργανισμών. Η φάση αυτή καλείται φάση φλεγμονής. Ακολουθεί, η φάση του πολλαπλασιασμού. Απελευθερώνονται από τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων διάφορες ουσίες, όπως κυτοκίνες, αυξητικοί παράγοντες κ.α., οι οποίες δρουν πάνω στα κύτταρα-στόχο επηρεάζοντας τις κυτταρικές τους λειτουργίες. Η φάση του πολλαπλασιασμού είναι το κλειδί της θεραπευτικής διαδικασίας. Η διαδικασία της ιστικής επούλωσης τελειώνει με την φάση της αναδιαμόρφωσης, ουσίες που εκκρίνονται από τα α-κοκκία επιδρούν πάνω σε κύτταρα-στόχο, έτσι ώστε να αναπτυχθεί ένα νέο επιθήλιο στη γύρω τραυματισμένη περιοχή. Όλες οι φάσεις της ιστικής επούλωσης ρυθμίζονται από αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες

και διάφορες άλλες ουσίες που εκκρίνονται κυρίως από τα αιμοπετάλια ανάλογα με το ερέθισμα που δέχονται. (Φωτόπουλος, 2011, Lubkoswska και συν., 2012, Riccin και συν., 2017).

B. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΠΛΟΥΣΙΟ ΣΕ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

B.1. Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια και αυξητικοί παράγοντες

Το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (Platelet-Rich Plasma, PRP) εξ' ορισμού είναι η υψηλή συγκέντρωση αιμοπεταλίων σε μικρό όγκο πλάσματος. Οι λειτουργικές ιδιότητες του πλάσματος πλούσιο σε αιμοπετάλια, βασίζονται κυρίως στη σύνθεση και την έκκριση πολλαπλών αυξητικών παραγόντων. Στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων ανευρίσκονται οι αυξητικοί παράγοντες σε ανενεργή μορφή, όπου απελευθερώνονται και καθίστανται λειτουργικοί εφόσον ενεργοποιηθούν τα αιμοπετάλια. Το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (Platelet-Rich Plasma, PRP) μπορεί να θεωρηθεί μια φυσική δεξαμενή αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι παίζουν σημαντικό ρόλο στη αναγέννηση του κατεστραμμένου ιστού και επιταχύνουν την διαδικασία της επούλωσης. Η επισκευή των ιστών είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει τη χημειοταξία, την αγγειογένεση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τον σχηματισμό μήτρας της εξωκυττάριας ουσίας (extracellular matrix, ECM) (Garg, 2000).

Ο αυξητικός παράγοντας είναι ένα ενεργό εκκρινόμενο βιολογικό μόριο, το οποίο έχει τη δυνατότητα να επηρεάσει την εξέλιξη ενός κυττάρου. Αυτά τα βιολογικά μόρια μπορούν να προάγουν ή να αναστείλουν τη μίτωση, ακόμα και να επηρεάσουν την κυτταρική διαφοροποίηση.

Για αυτό και η συμμετοχή τους στη ανάπτυξη και την επούλωση των ιστών θεωρείται σημαντική. Οι αυξητικοί παράγοντες είναι πολυπεπτιδικά διμερή, που αποτελούνται από 2 αντιπαράλληλα μονομερή (Stone και Bhimji, 2017).

Έχει διαπιστωθεί ότι οι αυξητικοί παράγοντες εμφανίζουν τις παρακάτω γενικές λειτουργίες:

- Επιτείνουν τη μιτωτική διαδικασία και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που μετέχουν στη οστική αναγέννηση
- Επιταχύνουν την νεοαγγειογένεση, καθώς συμμετέχουν στο σχηματισμό νέων τριχοειδικών αγγείων
- Επιδρούν χημειοτακτικά στα μακροφάγα, στα μονοκύτταρα και στους ινοβλάστες, έτσι ώστε να εκδηλώσουν τις εξειδικευμένες λειτουργίες τους, όπως τη σύνθεση κολλαγόνου και την φαγοκυττάρωση.
- Καλύπτουν αντιμικροβιακά τη γύρω περιοχή, αφού προκαλούν αύξηση της συγκέντρωσης των λευκών αιμοσφαιρίων

- Κάποιοι αυξητικοί παράγοντες αλλάζουν το φαινότυπο των κυττάρων που επιδρούν. Μετά τη σύζευξη των αυξητικών παραγόντων με τους επιφανειακούς υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης του κυττάρου, ενεργοποιούνται ειδικά ένζυμα στο κυτταρόπλασμα τα οποία επάγουν βιοχημικές αντιδράσεις. Αποτέλεσμα αυτών των διαδοχικών αντιδράσεων είναι η παραγωγή πρωτεϊνών, οι οποίες μεταναστεύουν στο πυρήνα των κυττάρων-στόχο όπου με τη σειρά τους ενεργοποιούν ειδικά γονίδια. Αυτό έχει ως τελικό αποτέλεσμα, να αλλάξει ο φαινότυπος του κυττάρου.

Οι αυξητικοί παράγοντες έχει διαπιστωθεί ότι δρουν με τρεις διαφορετικούς τρόπους. Μπορεί να ενεργούν με αυτοκρινή τρόπο όπου οι αυξητικοί παράγοντες δρουν στα κύτταρα που τα εκκρίνουν ενισχύοντας με αυτό τον τρόπο τη δική του δραστηριότητα. Μπορεί να ενεργούν με παρακρινή τρόπο, όπου οι αυξητικοί παράγοντες που εκκρίνονται από ένα κύτταρο μπορούν να επηρεάσουν τη δράση άλλων γειτονικών κυττάρων. Ενώ, κάποιοι από τους αυξητικούς παράγοντες διαθέτουν επιπλέον μια ενδοκρινή δράση, όπου μπορούν να επηρεάσουν ένα κύτταρο, που είναι φαινοτυπικά διαφορετικό από το αρχικό κύτταρο και βρίσκεται σε απομακρυσμένη περιοχή (Schliephake, 2002).

Οι πιο σημαντικοί αυξητικοί παράγοντες που περιέχονται στο πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP) είναι:

- Αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF, Platelet Derived Growth Factor)
- Αυξητικός παράγοντας ινσουλίνης 1 (IGF 1, Insulin like Growth Factor 1)
- Τροποποιητικός αυξητικός παράγοντας - β (TGF-β, Transforming Growth Factor-β)
- Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF, Epidermal Growth Factor)
- Αιμοπεταλιακός παράγοντας 4 (PF 4, Platelet Factor 4)
- Αυξητικός παράγοντας επιθηλιακών κυττάρων (ECGF, Epithelial Cell Growth Factor)
- Ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor)
- Βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (bFGF, Basic Fibroblast Growth Factor)

Επιπλέον, μέσα στο πλάσμα PRP υπάρχει ο αυξητικός παράγοντας των ηπατοκυττάρων (HGF), καθώς και μόρια όπως: IL-8 (ιντερλευκίνη 8), TNF- α (νεοπλασματικός νεκρωτικός παράγοντας- α), CTGF (αυξητικός παράγοντας συνδετικού ιστού), GM-CSF (παράγοντας διέγερσης αποικιών μακροφάγων κοκκιοκυττάρων), KGF (αυξητικός παράγοντας κερατινοκυττάρων), Ang-2 (αγγειοτενίνη-2) (Lubkowsk και συν., 2012). Επίσης, στο PRP υπάρχουν πρωτεΐνες που δρουν ως μόρια κυτταρικής προσκόλλησης, όπως είναι το ινώδες, η φιμπρονεκτίνη, η βιτρονεκτίνη και η θρομβοσπονδίνη. Τα μόρια αυτά είναι σημαντικά για τη μετανάστευση των οστεοβλαστών, των ινοβλαστών και των επιθηλιακών κυττάρων (Schliephake, 2002).

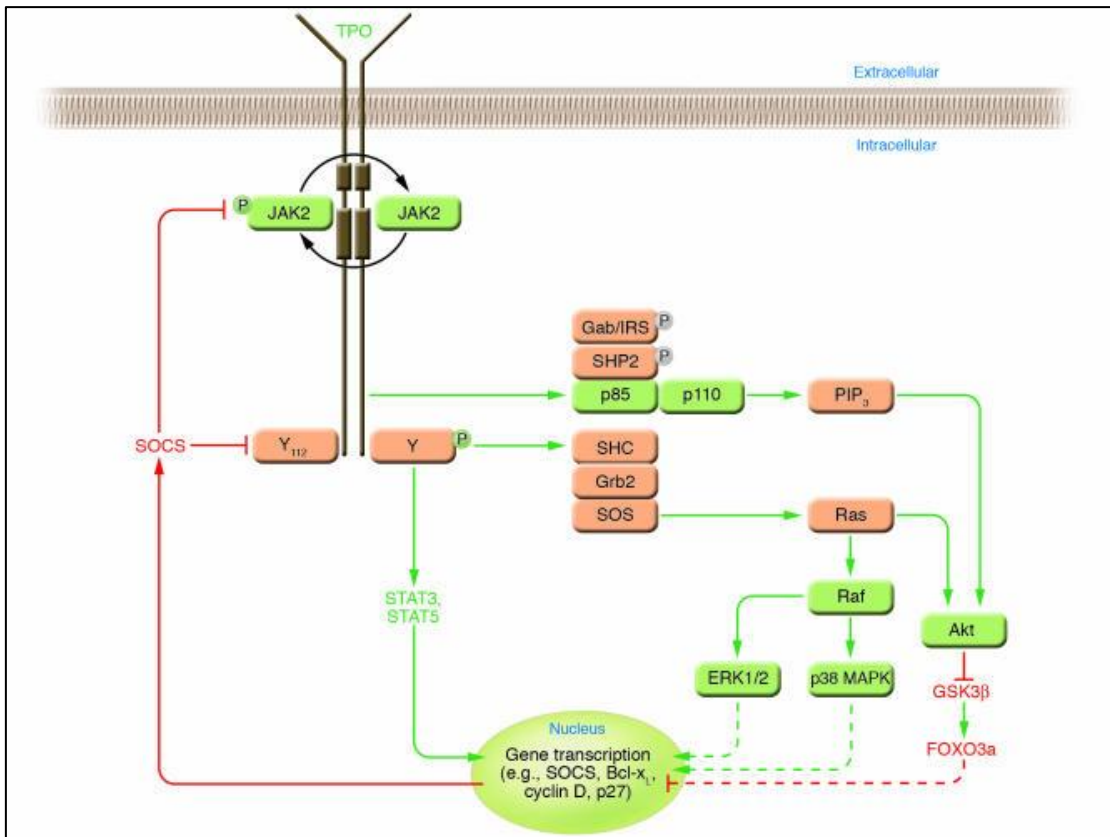
B.2. Μονοπάτια ενδοκυτταρικής μεταγωγής σημάτων των αυξητικών παραγόντων

Οι αυξητικοί παράγοντες και οι κυτοκίνες που απελευθερώνονται από τα α - κοκκία των αιμοπεταλίων δεσμεύονται ειδικά και με υψηλή συγγένεια με τους υποδοχείς των κυττάρων- στόχο. Αυτοί οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς είναι κυρίως υποδοχείς κινάσες τυροσίνης (RTKs, Receptors Tyrosine Kinase). Ο μοναδικός από τους αυξητικούς παράγοντες που δε χρησιμοποιεί διαμεμβρανικούς υποδοχείς τυροσίνης κινάσης είναι ο τροποποιητικός αυξητικός παράγοντας – β (TGF- β , Transforming Growth Factor- β) ο οποίος δεσμεύεται σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς κινάσες σερίνης / θρεονίνης (Textor, 2014, Stone και Bhimji, 2017).

Οι πρωτεϊνικοί υποδοχείς κινάσες τυροσίνης και κινάσες σερίνης / θρεονίνης χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην ενδοκυτταρική μετάδοση σημάτων. Η πρόσδεση των αυξητικών υποδοχέων με τον διαμεμβρανικό υποδοχέα κινάσης τυροσίνης, ενεργοποιούν ενδοκυτταρικούς καταρράκτες σηματοδότησης κινασών τυροσίνης. Μετά τον διμερισμό του υποδοχέα RTKs ακολουθεί η αυτοφωσφωρυλίωση της κυτταροπλασματικής περιοχής της κινάσης τυροσίνης που βρίσκεται κοντά στο ενεργό κέντρο. Αυτά τα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα τυροσίνης, χρησιμοποιούνται ως θέσεις σύνδεσης για πρωτεΐνες μεταγωγής σήματος που περιέχουν περιοχές Src-ομολογίας-2 (SH-2). Το SHP-2 είναι μια μη διαμεμβρανική πρωτεΐνη φωσφατάση τυροσίνης (PTB), που περιέχει περιοχές Src- ομολογίας -2

(SH-2). Πιστεύεται ότι, λειτουργεί με αποφωσφορυλίωση των συνδεδεμένων μορίων σηματοδότησης, μειώνοντας έτσι τα τοπικά σήματα. Εκφράζεται ευρέως σε διάφορους ιστούς και κυτταρικούς τύπους και εμπλέκεται σε ποικίλα μονοπάτια σηματοδότησης που ενεργοποιούνται από τους αυξητικούς παράγοντες και κάποιες κυτοκίνες. Ενισχύει, την προς τα κάτω μεταγωγή του σήματος από την κυτταρική επιφάνεια προς την επιφάνεια του πυρήνα, ενώ εντός μιας οδού σηματοδότησης το SHP-2 μπορεί και δρα σε πολλαπλές θέσεις για την μεταγωγή του σήματος (Cheng-Kui Qu, 2002, Kandadi και συν., 2010).

Οι πρωτεΐνες SH-2 ενεργοποιούνται και συνδέονται με τις πρωτεΐνες Grb2 (Gab) για να ενισχύσουν και να ρυθμίσουν την εξειδίκευση της μεταγωγής του σήματος και να ενεργοποιήσουν τους οδούς σηματοδότησης όπου θα καταλήξει το σήμα στο πυρήνα του κυττάρου. Οι πρωτεΐνες Gab 1, Gab2 και Gab 3 ανήκουν στη οικογένεια των πρωτεϊνών Gab και είναι μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών προσαρμογέα (σύνδεσης) σηματοδότησης του υποστρώματος του υποδοχέα ινσουλίνης 1 (IRS 1- insulin receptor substrate 1). Η Gab 1 πιστεύεται ότι λειτουργεί με αποφωσφορυλίωση των συνδεδεμένων μορίων σηματοδότησης, που προκαλείται από τους αυξητικούς παράγοντες τον ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα VEGF, τον αυξητικό παράγοντα των ηπατοκυττάρων HGF, του νευρικού αυξητικού παράγοντα NGF, τον αιμοπεταλιακό αυξητικό παράγοντα PDGF και τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα EGF. Οι περισσότεροι υποδοχείς RTKs προσελκύουν πρωτεΐνες Gab 1 έμμεσα, μέσω των πρωτεϊνών Grb 2. Οι οδοί σηματοδότησης που ενεργοποιούνται είναι οι οδοί κινάσες Ras-Raf-MAP, Jak-Stat, PI 3 κινάσες (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Σχηματική απεικόνιση οδών σηματοδότησης που ενεργοποιούνται από την θρομβοποιητίνη καθώς και από τους αυξητικούς παράγοντες (Ανατύπωση από: Kaushansky και Kenneth, 2005)

Η σύνδεση του Gab1 με SHP-2 και την υπομονάδα του p85 του PI3K, θεωρείται απαραίτητη για την ενεργοποίηση της οδού σηματοδότησης της κινάσης AKT. Η σύνδεση του Grb 2 με SH-2 και με SOS (ένας παράγοντας για την ανταλλαγή νουκλεοτιδίων γουανίνης για το RAS), θεωρείται απαραίτητη για τη ενεργοποίηση της οδού σηματοδότησης κινάσης RAS-RAF-MAP και RAS- RAF -ERK 1, 2 (Wang και συν., 2015).

B.3. Αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF, Platelet Derived Growth Factor)

Ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF) είναι ο πρώτος αυξητικός παράγοντας που ανακαλύφθηκε στα α κοκκία των αιμοπεταλίων (Kaplan και συν., 1979). Ο PDGF εκτός από τα αιμοπετάλια, εντοπίζεται στα μονοκύτταρα, στα

μακροφάγα, στους ινοβλάστες και στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Nicholidakis και Jansen, 2008).

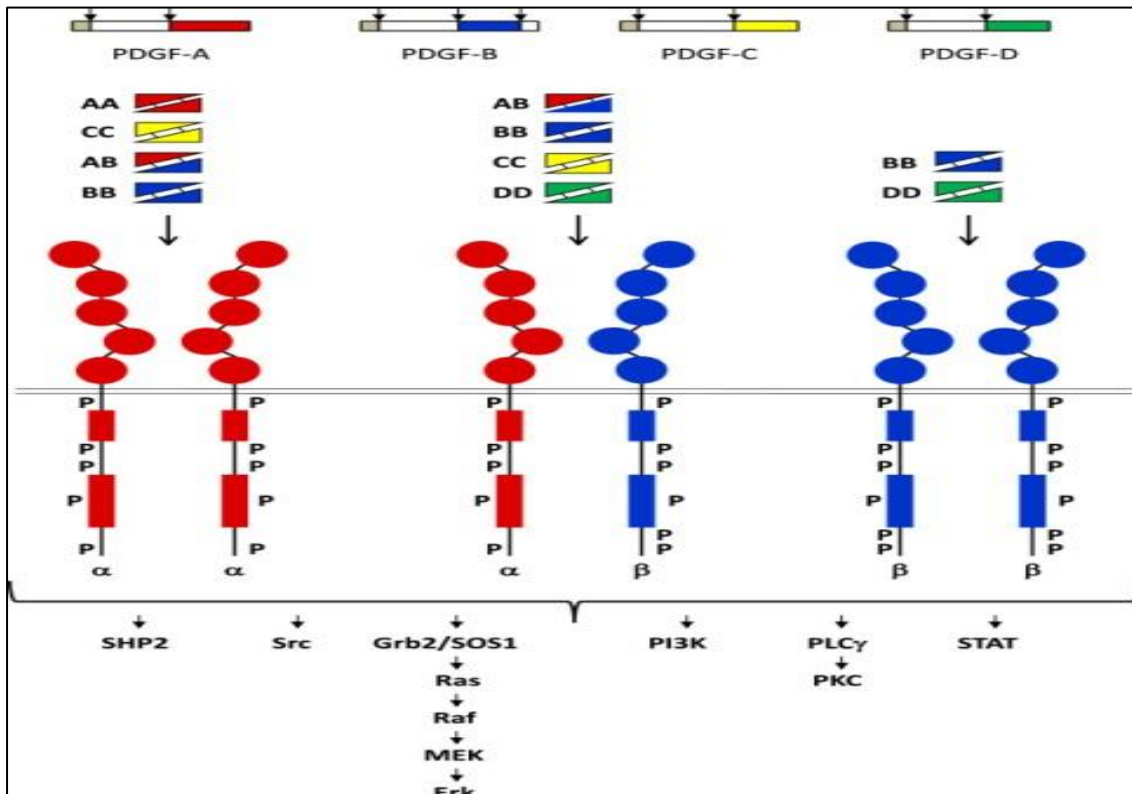
Ο PDGF αποτελείται από 2 πολυπεπτιδικές αλυσίδες, Α και Β, που ενώνονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Παράγονται 3 τύποι ισόμορφες του PDGF, η PDGF –AA (ομοδιμερής), PDGF- BB (ομοδιμερής) και PDGF- AB (ετεροδιμερής). Πρόσφατα ανακαλύφθηκαν δυο νέα μέλη της οικογένειας του αυξητικού παράγοντα PDGF, ο τύπος PDGF- CC (ομοδιμερής) και ο τύπος PDGF- DD (ομοδιμερής). Η αλληλουχία των αμινοξέων στις 2 πολυπεπτιδικές αλυσίδες του PDGF είναι περίπου κατά 60% και αποτελούνται από 100 αμινοξέα. Το Μοριακό Βάρος κυμαίνεται μεταξύ 25 και 30 k Daltons. Οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες έχουν παρόμοια χαρακτηριστικά με τον αυξητικό παράγοντα της οικογένειας των ενδοθηλιακών αυξητικών παραγόντων (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor). Κάθε ισομερής μορφή του PDGF ασκεί διαφορετική δράση και δεσμεύεται σε διαφορετικούς κυτταρικούς υποδοχείς (Alvarez και συν., 2006).

Οι κυριότερες βιολογικές δράσεις του PDGF είναι (Marques και συν.,2015):

- Αυξάνει την χημειοτακτική δράση και την μιτωτική λειτουργία των ινοβλαστών
- Ρυθμίζει την έκκριση κολλαγενάσης και την παραγωγή κολλαγόνου.
- Ενεργοποιεί τα μακροφάγα (για να παράγει περισσότερους αυξητικούς παράγοντες) και τα ουδετερόφιλα, στα οποία δρα και χημειοτακτικά.
- Διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και την παραγωγή βασικής θεμέλιας ουσίας των αγγείων

Ο μηχανισμός δράσης του PDGF, αρχίζει με την ενεργοποίηση των 2 διαμεμβρανικών υποδοχέων τυροσίνης κινάσες, α και β. Οι υποδοχείς α και β έχουν διαφορετικό μοριακό βάρος, 170 k Daltons και 180 k Daltons αντίστοιχα, και εντοπίζονται πάνω σε διαφορετικό χρωμόσωμα, 7 και 22 αντίστοιχα. Κάθε υποδοχέας, εξωτερικά φέρει 5 παρόμοιες περιοχές ανοσοσφαιρίνης και ενδοκυτταρικά φέρει μια χαρακτηριστική αλληλουχία τυροσίνης, η οποία δε έχει ομολογία με τις κινάσες. Ο PDGF συνδέεται με υψηλή συγγένεια με τους υποδοχείς του, οι οποίοι ομοδιμερίζονται ή ετεροδιμερίζονται και εντέλει φωσφορυλιώνονται μεταξύ τους, αφήνοντας εκτεθειμένες περιοχές όπου θα συνδεθούν διάφορες πρωτεΐνες οι οποίες θα ενεργοποιήσουν τον καταρράκτη της

σηματοδότησης. Η σηματοδότηση του PDGF λαμβάνει χώρα με 4 διαφορετικές οδούς: Src, PI3 K, PLC, Ras (Εικόνα 9). Τα κύτταρα – στόχοι του PDGF είναι οι ινοβλάστες, τα λεία μυϊκά κύτταρα. Και οι 2 υποδοχείς του PDGF προάγουν ισχυρά μιτογόνα σήματα (Alvarez και συν., 2006).



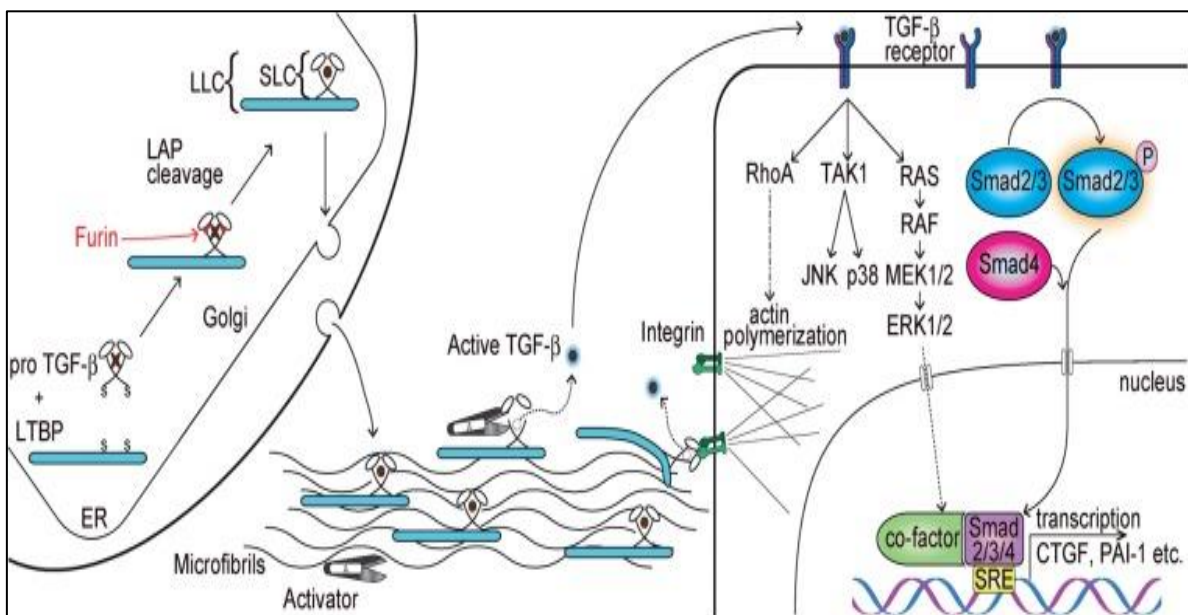
Εικόνα 9. Οδός σηματοδότησης του αυξητικού παράγοντα PDGF (Ανατύπωση από: Heldin, 2013)

B.4. Τροποποιητικός αυξητικός παράγοντας – β (TGF-β, Transforming Growth Factor-β)

Ο τροποποιητικός αυξητικός παράγοντας είναι μέλος της υπερικογένειας των πολυπεπτιδίων που περιλαμβάνει τις ισομορφές του TGF-β, τις μορφογενετικές πρωτεΐνες του οστού (bone morphogenetic proteins, BMPs), την ανασταλίνη ή την ινχιμπίνη (inhibin) και την ακτιβίνη (activin). Ο TGF-β περιλαμβάνει 3 ισομορφές, την TGF-β 1, την TGF-β 2 και την TGF-β 3. Κάθε μια από τις ισομορφές που απαντώνται στον ανθρώπινο οργανισμό κωδικοποιούνται από γονίδια που έχουν διαφορετικές θέσεις σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Οι ισομορφές του TGF-β είναι πολυπεπτίδια με Μοριακό Βάρος 25 k Daltons και

ενώνονται με δισουλφιδικούς δεσμούς. Οι τύποι TGF-β 1 και TGF-β 2 βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα αιμοπετάλια.

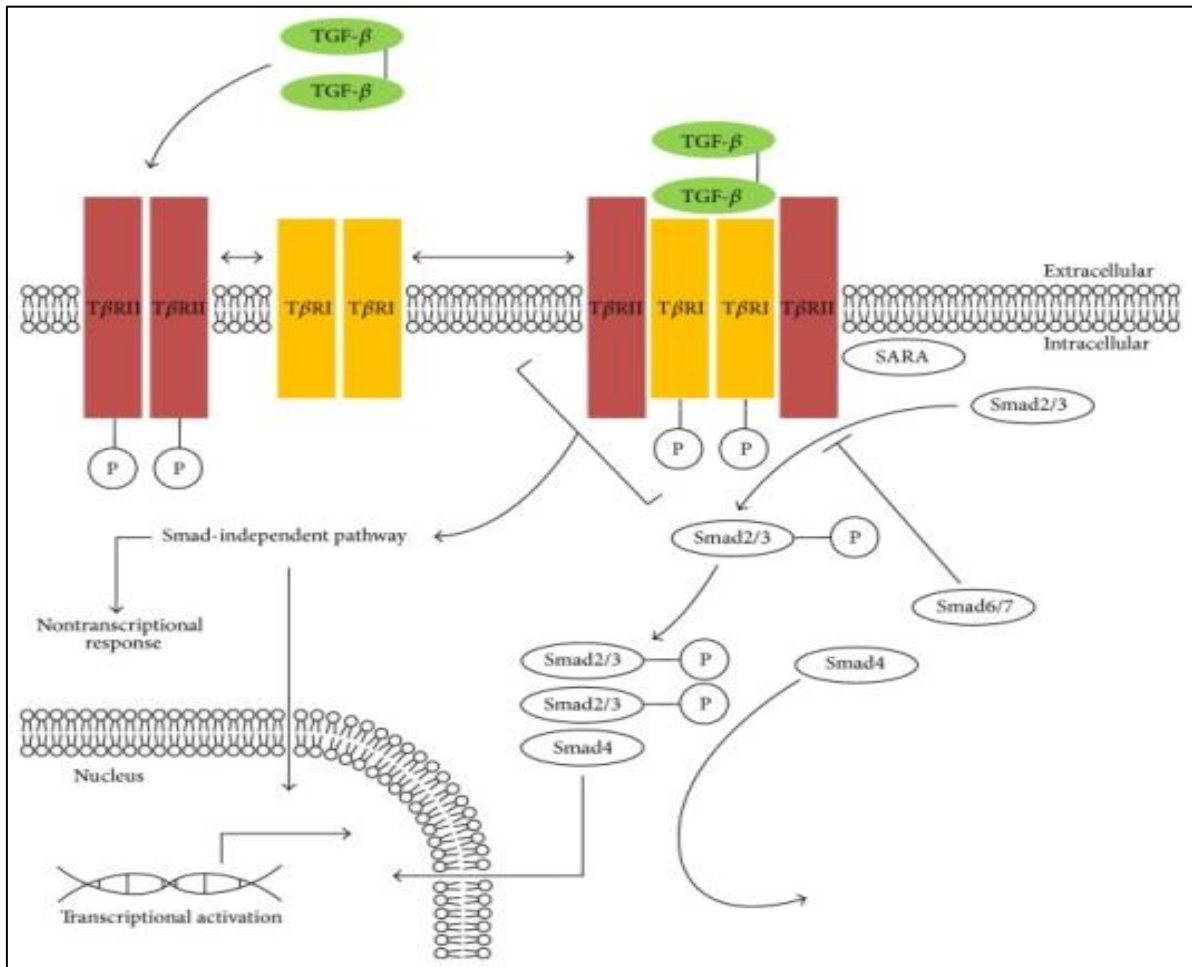
Οι πρωτεΐνες των TGF-β συντίθενται ως προ-πεπτίδια, τα οποία απελευθερώνονται σε ανενεργή μορφή που ονομάζονται λανθάνων TGF-β. Οι λανθάνων πρωτεΐνες των TGF-β βρίσκονται στο εξωκυττάριο χώρο, που μπορεί να είναι συνδεδεμένες με δισουλφιδικούς δεσμούς, με μια λανθάνουσα πρωτεΐνη σύνδεσης (Latent TGF-β Binding Protein, LTBP). Μπορεί όμως, οι λανθάνων πρωτεΐνες των TGF-β να βρίσκονται ελεύθερες. Σε κάθε ερέθισμα, οι λανθάνων πρωτεΐνες των TGF-β οδεύουν και επιδρούν προς το κύτταρο-στόχο (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Σχηματική απεικόνιση της πορείας του TGF-β από το κύτταρο-παραγωγής μέχρι το κύτταρο-στόχο (Ανατύπωση από: Horigushi και συν., 2012)

Οι ισομορφές TGF-β 1, TGF-β 2 και TGF-β 3 ενεργοποιούν παρόμοια μονοπάτια σήμανσης και δρουν σε παρόμοιες κυτταρικές λειτουργίες (Εικόνα 11). Οι υποδοχείς των TGF-β 1 και TGF-β 2, είναι ειδικοί διαμεμβρανικοί υποδοχείς σερίνης / θρεονίνης με δραστηριότητα κινάσες. Μετά την σύνδεση των TGF-β 1 και TGF-β 2 με τον διαμεμβρανικό υποδοχέα, το μόριο υφίσταται φωσφορυλίωση και ενεργοποιείται ο ενδοκυτταρικός καταρράκτης σήμανσης. Για τους TGF-β 1 και TGF-β 2 για την έναρξη της ενδοκυτταρικής σήμανσης απαιτείται η παρουσία των πρωτεϊνών S mad. Οι πρωτεΐνες Smad (receptor-regulated S mads) περιλαμβάνουν τις Smad 1, Smad 2, Smad 3, Smad 5, Smad 8, τον κοινό

μεσολαβητή Smad (Co- Smad) που περιέχει και τον Smad 4, και τον ανασταλτικό Smad (inhibitory Smad- I-Smad) που περιέχει τους Smad 6 και Smad 7. Τα Smad 2 και Smad 3 φωσφορυλιώνονται απευθείας από τους υποδοχείς των TGF-β 1, σχηματίζουν ένα σύμπλοκο με το Smad 4, το οποίο εισέρχεται μέσα στο πυρήνα αλληλεπιδρώντας με μεταγραφικούς παράγοντες επηρεάζοντας τη μεταγραφή του γονιδίου.



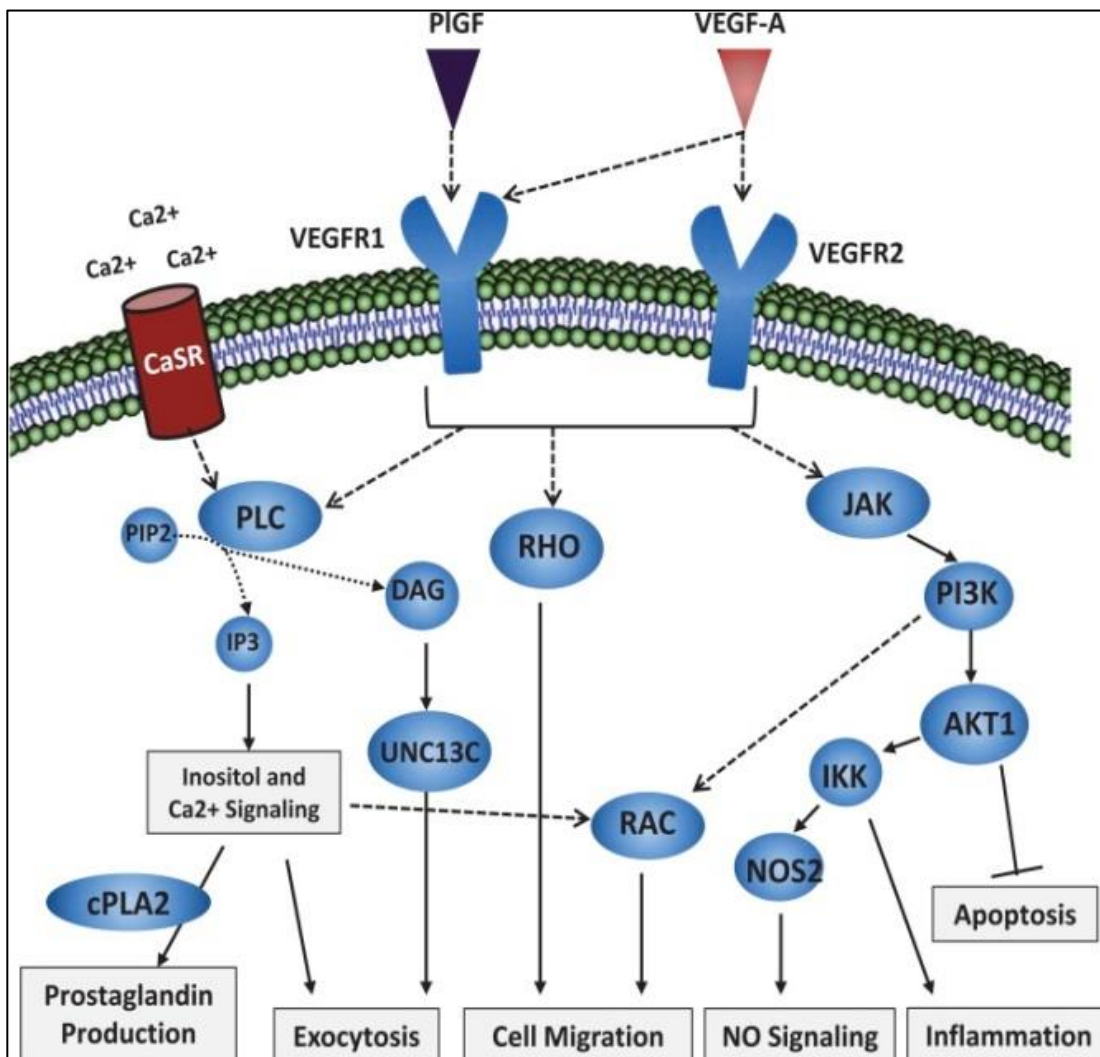
Εικόνα 11. Ενδοκυτταρικές οδοί σήμανσης του TGF-β (Ανατύπωση από: Poniatowski και συν., 2015)

Ο TGF-β που απελευθερώνεται σε δραστική μορφή από τα α κοκκία των αιμοπεταλίων επιδρά στα αρχικά στάδια της ιστικής επούλωσης, καθώς ο TGF-β 1 προάγει τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις, την αγγειογένεση και την επούλωση οξείων και χρόνιων τραυμάτων. Ο TGF-β παρουσιάζει αυτοκρινή και παρακρινή δράση. Δρα χημειοτακτικά και επάγει τη μίτωση των πρόδρομων μορφών των

οστεοβλαστικών κυττάρων (Flanders και Burmester, 2003, Blakytny και συν., 2004, Horigushi και συν., 2012, Poniatowski και συν., 2015).

B.5. Ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor)

Ο ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor) ανακαλύφθηκε πριν από 25 χρόνια, όπου αρχικά θεωρούταν ο παράγοντας που ήταν υπεύθυνος για την αγγειακή διαπερατότητα. Ο VEGF είναι ένας σημαντικός αγγειογενετικός αυξητικός παράγοντας, που δρα μόνος του ή με άλλους αγγειογενετικούς παράγοντες απευθείας πάνω στο ιστό. Ο VEGF και ο PDGF ανήκουν στη υπερικογένεια των αυξητικών παραγόντων PDGF/VEGF. Έχουν εντοπιστεί 4 μέλη της οικογένειας του αυξητικού παράγοντα VEGF. Τα μέλη αυτά είναι οι VEGF-A, οι VEGF-B και το ζεύγος VEGF-C / VEGF-D. Όπως ο PDGF, έτσι και ο VEGF συνδέεται με διαμεμβρανικούς υποδοχείς κινάσες τυροσίνης. Όλα τα μέλη της οικογένειας VEGF έχουν ένα κοινό VEGF υποδοχέα 3 (*VEGF-R 3*) (*Εικόνα 12*). Οι υποδοχείς VEGF-R 3 παρουσιάζουν ομοιότητες στη δομή με τους υποδοχείς του PDGF, με την μόνη διαφορά ότι οι υποδοχείς *VEGF-R 3* έχουν 7 εξωκυττάριας περιοχές ανοσοσφαιρίνης (Ig), σε σύγκριση με τους υποδοχείς του PDGF που έχουν 5. Ο VEGF παίζει σημαντικό ρόλο στη αγγειογένεση και στη νέο αγγειογένεση. Επίσης, θεωρείται ότι δρα ως αγγειοδιασταλτικό και αυξάνει την μικροαγγειακή διαπερατότητα. Σε *in vitro* μελέτη, έδειξε ότι όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται με την μέθοδο της θρομβίνης απελευθερώνονται όλες οι ισομορφές του VEGF-A (Ferrara και Gerber, 2001, Sanchez - Gonzales και συν., 2012).

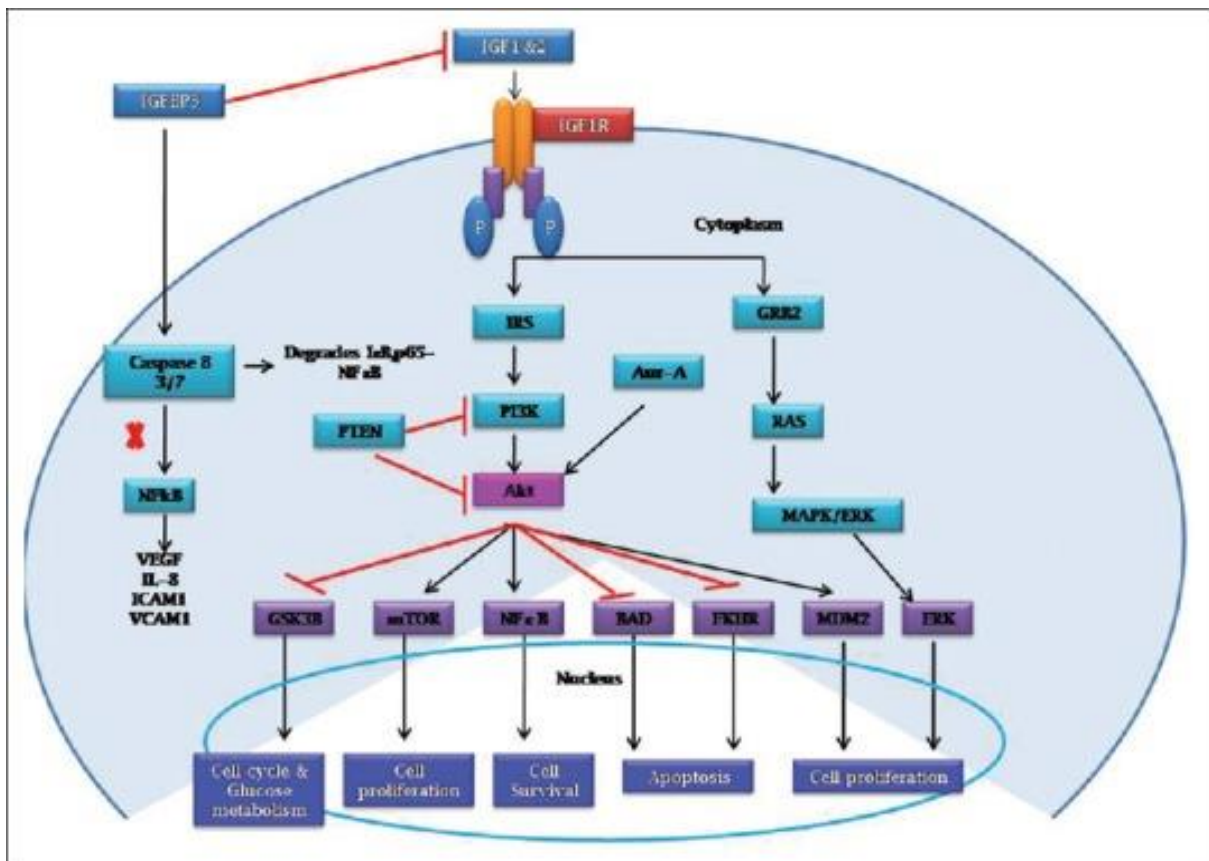


Εικόνα 12. Το μοντέλο σηματοδότησης του αυξητικού παράγοντα VEGF (Ανατύπωση από: Hoffmann και συν., 2013)

B.6. Αυξητικός παράγοντας ινσουλίνης 1 (IGF-1, Insulin Like Growth Factor-1)

Ο ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας 1 (IGF-1, Insulin like Growth Factor-1) είναι μια πολυπεπτιδική αυξητική ορμόνη που αποτελείται από 70 αμινοξέα. Η οικογένεια του IGF αποτελείται από την ινσουλίνη και τους παράγοντες IGF-1 και IGF-2, που παρουσιάζουν παρόμοια δομική ομολογία. Αυτοί οι παράγοντες ρυθμίζουν άμεσα τις κυτταρικές λειτουργίες, αλληλεπιδρώντας με συγκεκριμένους

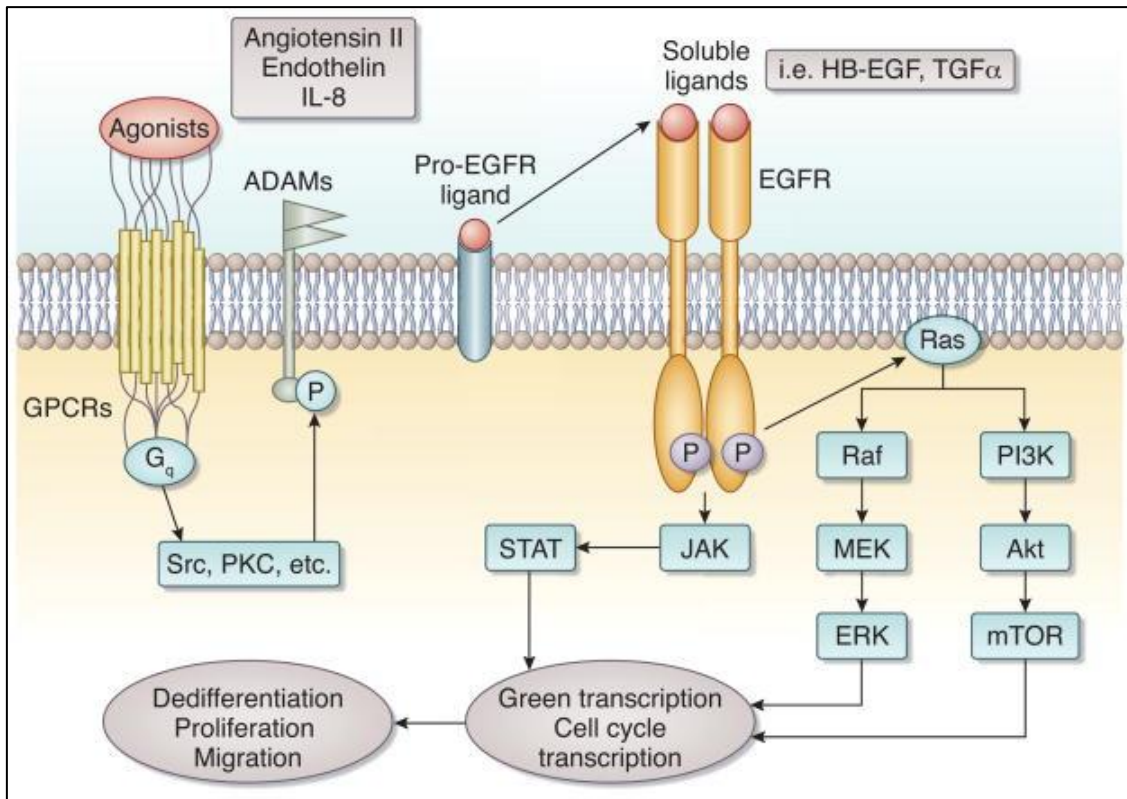
υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας και ενεργοποιούν διάφορους καταρράκτες της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης. Ο υποδοχέας IGF-1 είναι μέλος της οικογένειας του διαμεμβρανικού υποδοχέα κινάσης τυροσίνης (Εικόνα 13). Ο IGF-1 κυκλοφορεί σε υψηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα, περίπου 150-400 ng ανά ml, και υπάρχει κυρίως ως πρωτεϊνική μορφή. Ο IGF παράγεται κυρίως από το ήπαρ. Η δράση του IGF-1 μπορεί να είναι αυτοκρινής και παρακρινής. Ο IGF-1 διεγείρει τη διαφοροποίηση και την μιτογένεση των μεσεγχυματικών κυττάρων. Ο IGF-1 επιδρά στους προστεοβλάστες, οι οποίοι πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες (Marques και συν., 2015, Brahmkhatri και συν., 2015).



Εικόνα 13. Οδός σηματοδότησης του αυξητικού παράγοντα IGF-1 (Ανατύπωση από: Amutha και Rajkumar, 2017)

B.7. Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF, Epidermal Growth Factor)

Ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF, Epidermal Growth Factor) είναι ένα πεπτίδιο που αποτελείται από 53 αμινοξέα που ενώνονται με δισουλφιδικούς δεσμούς. Ο EGF ονομάζεται και αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDEGF, Platelet-derived epidermal growth factor). Ο EGF παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης, της επιβίωσης, της μετανάστευσης, της απόπτωσης, του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης του κυττάρου. Συμμετέχει στην αναγέννηση του δέρματος, προάγοντας την επούλωση των τραυμάτων. Ο EGF ενεργοποιεί τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων και των ινοβλαστών του δέρματος. Επιπλέον, ενισχύει τη δράση και την παραγωγή άλλων αυξητικών παραγόντων. Ο EGF συνδέεται με ένα διαμεμβρανικό υποδοχέα κινάσες τυροσίνης *Erb B* (Εικόνα 14). Ακολουθεί η φωσφορυλίωση και η αποφωσφορυλίωση του υποδοχέα κινάσες- τυροσίνης *Erb B*, ο οποίος με την σειρά του ενεργοποιεί τους οδούς σηματοδότησης Ras/Mapk, Akt (PI3/AKT), PLC-γ/ PKC (Einhorn, 2005, Tang και συν., 2016).



Εικόνα 14. Σύνδεση του αυξητικού παράγοντα EGF με το διαμεμβρανικού υποδοχέα Erb B και ενεργοποίηση του καταρράκτη σήμανσης μέσω των οδών MAPK/ ERK, PI3 / Akt και JAK/ STAT (Ανατύπωση από: Tang και συν., 2013)

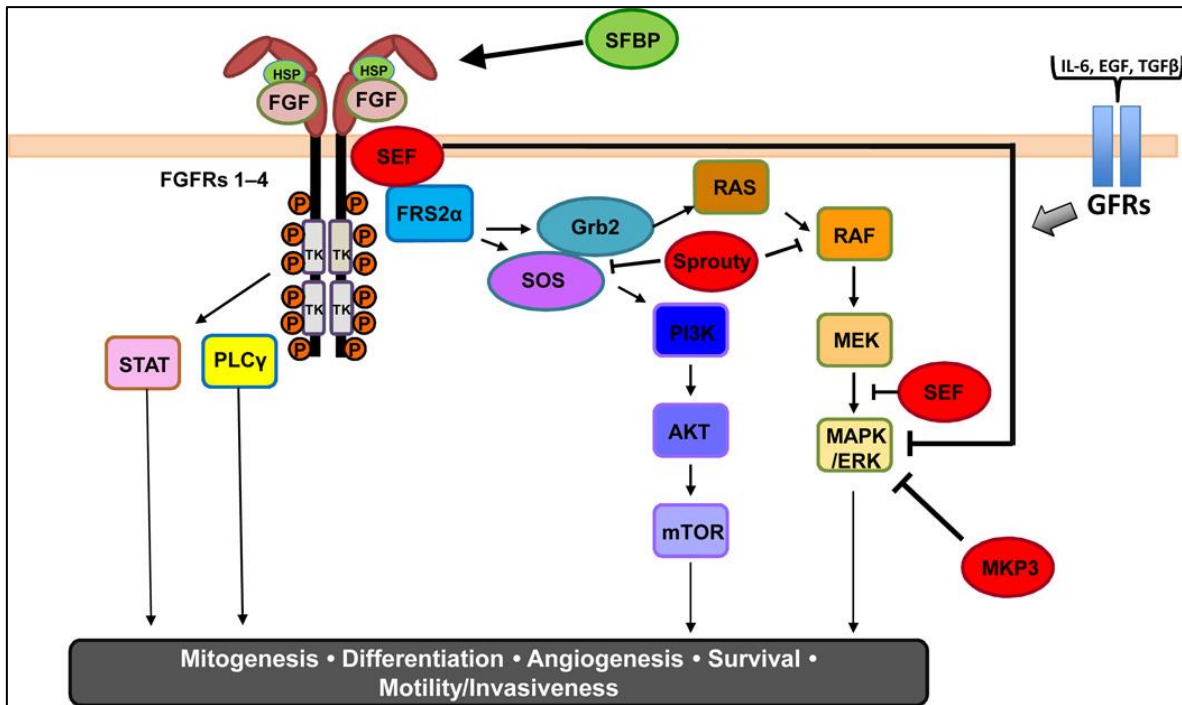
B.8. Αιμοπεταλιακός παράγοντας 4 (PF 4, Platelet Factor 4)

Ο αιμοπεταλιακός παράγοντας 4 (PF4, Platelet Factor 4) είναι ένα τετραμερές πρωτεϊνικό μακρομόριο, που αποτελείται από 70 αμινοξέα. Κάθε μονομερές έχει Μοριακό Βάρος περίπου 7.8 k Daltons. Ανήκει στην οικογένεια των χημειοκινών ELR-CXC. Το PF 4 συντίθεται στα μεγακαρυοκύτταρα και εκκρίνεται από τα α κοκκία των αιμοπεταλίων. Η συγκέντρωση του PF 4 στο πλάσμα εξαρτάται από το βαθμό ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, σε *in vitro* και *in vivo*. Μια από τις ιδιότητες του παράγοντα PF 4 είναι η ικανότητά του να συνδέεται με φορτισμένες γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs, Glycosaminoglycans) με τις υδατανθρακικές πλευρικές αλυσίδες των πρωτεογλυκανών. Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι πρωτεογλυκάνες λειτουργούν ως υποδοχείς για τους παράγοντες PF 4. Ενεργοποιούνται οι οδοί σήμανσης Src-κινάσες, μονομερή GTPases και MAP κινάσες. Ο PF 4 ασκεί τη δράση του στη διαδικασία της αιμόστασης. Συνδέεται ισχυρά με την ηπαρίνη, με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η σύνδεση της ηπαρίνης

με την αντιθρομβίνη III. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να αναστέλλεται η απενεργοποίηση της θρομβίνης, που εξαρτάται από την ηπαρίνη. Η αναστολή του παράγοντα XII (ενδογενής οδός της αιμόστασης) καθώς και των παραγόντων που εξαρτώνται από την βιταμίνη K, μπορεί να προκαλέσει αντιπηκτική δραστηριότητα που να ευθύνεται ο PF 4. Ο PF 4 μπορεί να αναστείλει την διαδικασία της πήξης με την παραγωγή της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C. Ο PF 4 αποτρέπει τη δέσμευση του VEGF στον υποδοχέα KDR/flk-1, αναστέλλει την αγγειογένεση. Επίσης, αναστέλλει τη μιτογόνο δραστηριότητα του βασικού ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα (bFGF). Τέλος, ασκεί χημειοτακτική δράση σε ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα και ινοβλάστες (von Hundelshausen και συν., 2007, Pilatona και συν., 2013).

B.9. Βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (bFGF, Basic Fibroblast Growth Factor)

Ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (bFGF, Basic Fibroblast Growth Factor) ανήκει στην υπερικογένεια των bFGF. Είναι πολυπεπτίδια που φέρουν 22 μέλη, τα οποία μοιάζουν δομικά μεταξύ τους και χωρίζονται σε 7 υποικογένειες. Οι bFGF κωδικοποιούνται από 22 γονίδια FGF1-14 και FGF16-23. Οι παράγοντες του bFGF παρουσιάζουν αυτοκρινή και παρακρινή δράση. Οι υποδοχείς του bFGF είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς τυροσίνης-κινάσες. Έχουν αναγνωριστεί 4 διαμεμβρανικοί υποδοχείς τυροσίνης κινάσες για το bFGF (FGFR1, FGFR2, FGFR3, και FGFR4), που φέρουν εξωτερικά 3 περιοχές ανοσοσφαιρίνης (Ig). Οι υποδοχείς ενεργοποιούνται από το σχηματισμένο του συμπλόκου bFGF-με πρωτεογλυκάνες θειικής ηπαρίνης (HSPs) (*Εικόνα 15*). Η αυτοφωσφωρυλίωση του υποδοχέα αφήνει ελεύθερες περιοχές, όπου πάνε και συνδέονται οι πρωτεΐνες σύνδεσης FRS-2α και PLCγ.



Εικόνα 15. Σχηματική απεικόνιση οδού σηματοδότησης του FGF (Ανατύπωση από: Corn και συν., 2013)

Οι πρωτεΐνες σύνδεσης ενεργοποιούν την προς τα κάτω πορεία του καταρράκτη σήμανσης MAPK/ERK, PI3K/AKT, p38 MAPK, RAS. Ο bFGF είναι ένας ισχυρός μιτογόνο αυξητικός παράγοντας, με πολλαπλές δράσεις σε πολλούς τύπους κυττάρων, όπως τα χονδροκύτταρα και τους οστεοβλάστες. Εμπλέκεται στη διαδικασία της αγγειογένεσης (Corn και συν., 2013, Raju και συν., 2014).

Β.10. Συγκέντρωση αιμοπεταλίων και αυξητικών παραγόντων στο Πλάσμα Πλούσιο σε Αιμοπετάλια (PRP)

Ο αριθμός των αιμοπεταλίων που πρέπει να υπάρχουν μέσα στο πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP, Plasma-rich Platelet) δε καθορίζεται από κάποιο συγκεκριμένο πρωτόκολλο. Ως δείκτης αναφοράς του «θεραπευτικού PRP», έχει ορισθεί η αριθμητική συγκέντρωση των 1.000.000 αιμοπεταλίων/μικρόλιτρο σε τυπικό κλάσμα πλάσματος των 6 ml. Αυτή είναι η συγκέντρωση των αιμοπεταλίων που πετυχαίνεται από τα συστήματα PRP, που είναι πιστοποιημένα από το FDA (Marx, 2004).

Η συγκέντρωση των αυξητικών παραγόντων θα μπορούσε να ταυτιστεί με την συγκέντρωση των αιμοπεταλίων μέσα στο PRP. Οι Lubkowska και συν.(

Lubkowska και συν., 2012) σε βιβλιογραφική ανασκόπηση αναφέρουν ότι, ο αριθμός των αιμοπεταλίων είτε στο ολικό αίμα, είτε μέσα στο PRP δε αποτελεί τον απόλυτο δείκτη που να καθορίζει την συγκέντρωση των αυξητικών παραγόντων μέσα στο PRP. Θεωρητικά, η συγκέντρωση των αυξητικών παραγόντων μέσα στο PRP θα εξαρτάται από την συγκέντρωση των αιμοπεταλίων. Από την άλλη όμως, πολλοί είναι οι παράγοντες που μπορεί να επηρεάζουν τη σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης των αιμοπεταλίων και της συγκέντρωσης των αυξητικών παραγόντων. Παράγοντες όπως, η επαρκής ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων για την απελευθέρωση των αυξητικών, η παρουσία των λευκών αιμοσφαιρίων, η μέθοδος επιλογής παρασκευής του PRP, η ατομική μεταβλητότητα στην κυτταρική παραγωγή και η αποθήκευση του PRP.

Οι Weibrich και συν. (Weibrich και συν., 2002), πραγματοποίησαν μια μελέτη για να δείξουν την συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης των αιμοπεταλίων και της συγκέντρωσης των αυξητικών παραγόντων. Χρησιμοποίησαν ως ομάδα μελέτης, 115 υγιής άτομα και των δύο φύλων, ηλικίας 16 – 62 ετών. Διαπίστωσαν ότι, ο αριθμός των αιμοπεταλίων στο PRP είναι 5 φορές μεγαλύτερος από τον αριθμό των αιμοπεταλίων στο ολικό αίμα. Οι αυξητικοί παράγοντες PDGF AB, TGF-β, IGF-I ανευρέθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις, ενώ οι αυξητικοί παράγοντες PDGF BB, TGFβ-2 ανευρέθηκαν σε μικρότερες συγκεντρώσεις. Κατέληξαν στο γεγονός ότι, δε υπάρχει καμία επίδραση του φύλο και της ηλικία του δότη, σε ότι αφορά την συγκέντρωση των αιμοπεταλίων και την συγκέντρωση του αυξητικών παραγόντων στο PRP.

Οι Alsousou και συν. (Alsousou και συν., 2009) σε βιβλιογραφική ανασκόπηση μελέτησαν, τις *in vitro* μελέτες που έγιναν για την επίδραση του PRP σε καλλιέργειες πρωτογενών κυτταρικών σειρών, τις *in vivo* μελέτες σε ζώα αξιολογώντας την επίδραση του PRP στην αναγέννηση σκληρού και μαλακού ιστού, τα διάφορα δημοσιευμένα κλινικά άρθρα για τη θεραπεία με PRP και τα κλινικά αποτελέσματα ερευνών. Συγκέντρωσαν τα αποτελέσματα της μελέτης τους και κατασκεύασαν ένα πίνακα (Πίνακας 1) όπου αναγράφεται η δράση και η μέση συγκέντρωση κάθε αυξητικού παράγοντα που βρίσκεται μέσα στο PRP. Οι αυξητικοί παράγοντες μετρήθηκαν με την μέθοδο της ανοσοενζυματικής μεθόδου της ELISA.

Πίνακας 1. Μέση συγκέντρωση αυξητικών παραγόντων στο PRP και τρόπος δράσης αυτών (Ανατύπωση από: Alsousou και συν., 2009 τροποποιημένο)

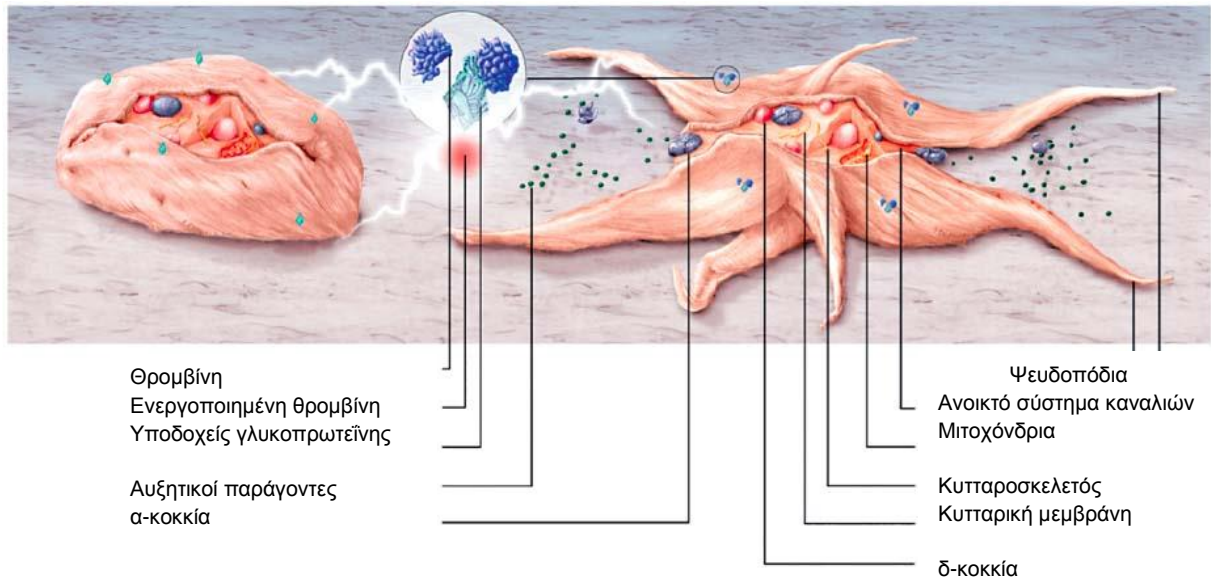
| Αυξητικός παράγοντας | Δράση | Συγκέντρωση στο PRP (SD) |
|----------------------|---|---|
| PDGF | <ul style="list-style-type: none"> Ενεργοποίηση των μακροφάγων και της αγγειογένεσης Πολλαπλασιαστική δράση και χημειοταξία στους ινοβλάστες Ενισχύει την σύνθεση του κολλαγόνου Ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των οστικών κυττάρων | PDGFαβ:117.5ng/ml (63.4) PDGFββ: 9.9 ng/ml (7.5) |
| TGF-β | <ul style="list-style-type: none"> Ενισχύει την πολλαπλασιαστική δραστηριότητα των ινοβλαστών Διεγείρει τη βιοσύνθεση του κολλαγόνου τύπου I και της φιβρονεκτίνη Προκαλεί εναπόθεση μητρικού οστού Αναστέλλει τον σχηματισμό οστεοβλαστών | TGF-β1: 169.9ng/ml(84.5) TGF-β2: 0.4ng/ml(0.3) |
| IGF-1 | <ul style="list-style-type: none"> Επιδρά χημειοτακτικά στους ινοβλάστες και βελτιώνει την πρωτεϊνοσύνθεσης Ενισχύει τον σχηματισμό οστού με πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των οστεοβλαστών | 84.2ng/ml(23.6) |
| PDEGF | <ul style="list-style-type: none"> Ενισχύει την επούλωση μαλακών ιστών διεγείροντας τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων και των δερματικών ινοβλαστών | 470 pg/ml (320) |
| PDAF | <ul style="list-style-type: none"> Προκαλεί νέο αγγειογένεση διεγείροντας τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων | 0.189nmol/ml (0.07) |
| PF-4 | <ul style="list-style-type: none"> Διεγείρει την εισροή ουδετερόφιλων στο τραύμα Είναι χημειοελκυστικό για τους ινοβλάστες Είναι ισχυρός αντί ηπαρινικός παράγοντας | 0.189nmol/ml(0.07) |
| EGF | <ul style="list-style-type: none"> Κυτταρικός πολλαπλασιασμός Διαφοροποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων | 51 pmol/ml (5) |
| VEGF | <ul style="list-style-type: none"> Αγγειογένεση και στη δημιουργία του αυλού του αιμοφόρου αγγείου Επιδρά στη μετανάστευση και την μίτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων Προκαλεί αγγειοδιαστολή, έμμεσα απελευθερώνοντας ελεύθερες ρίζες Λειτουργεί χημειοτακτικά στα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα | 76 έως 854pg/ml |

Οι Kim και οι συν. (Kim και οι συν., 2010) πραγματοποίησαν μια έρευνα όπου σύγκριναν 4 διαφορετικούς μεθόδους ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι, για κάθε μέθοδο που επιλέχθηκε για να ενεργοποιηθούν τα αιμοπετάλια, παρατηρήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις των αυξητικών παραγόντων σε μέσα στο PRP.

B.11. Πώς λειτουργεί το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια

Το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP) λειτουργεί μέσω της αποκοκκοποίησης των αιμοπεταλίων. Οι αυξητικοί παράγοντες είναι μη λειτουργικοί όταν βρίσκονται μέσα στα α κοκκία των μη ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων. Για να γίνουν λειτουργικοί οι αυξητικοί παράγοντες, θα πρέπει να ενεργοποιηθούν τα αιμοπετάλια. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων στο PRP γίνεται με την προσθήκη συνδυασμού μείγματος θρομβίνης και χλωριούχου ασβεστίου ή με την προσθήκη του καθ'ένα από αυτά ξεχωριστά, ή με την φυσιολογική διαδικασία όταν έρθει το PRP σε επαφή με το κολλαγόνο. Η θρομβίνη είναι ο πιο ισχυρός ενεργοποιητής των αιμοπεταλίων στο PRP, όπου προάγει τον καταρράκτη της πήξης. Σε 10 λεπτά μετά τον σχηματισμό του αιμοστατικού θρόμβου στο τελικό στάδιο της πήξης, αρχίζει η απελευθέρωση των αυξητικών παραγόντων, όπου φτάνουν στο 95% της απελευθέρωσης τους στην 1 ώρα. Οι αυξητικοί παράγοντες απελευθερώνονται από τα αιμοπετάλια, μέσω του ανοικτού συστήματος των καναλιών της κυτταρικής μεμβράνης (*Εικόνα 16*).

Οι αυξητικοί παράγοντες μετατρέπονται σε ένα βιενεργό μόριο με την προσθήκη ιστονών και υδατανθρακικών αλυσίδων. Αμέσως, δεσμεύονται από ειδικούς προς αυτούς διαμεμβρανικούς υποδοχείς, όπου εκφράζονται στα μεσεγχυματικά κύτταρα οστεοβλαστών, στους ινοβλάστες και στα ενδοθηλιακά και επιδερμικά κύτταρα. Με τη σειρά τους, οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς επάγουν την ενεργοποίηση μιας οδού σήμανσης με πορεία προς τα κάτω, η οποία ευθύνεται για την έκφραση ενός φυσιολογικού γονιδίου. Η έκκριση των αυξητικών παραγόντων συνεχίζεται 3 έως 5 ημέρες μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με οποιαδήποτε μέθοδο επιλογής. Οι αυξητικοί παράγοντες παραμένουν ενεργοί μέχρι να εξαντληθούν τα αιμοπετάλια, με την μόνη διαφορά ότι παρουσιάζουν διαφορετική συγκέντρωση στο χρόνο απελευθέρωσης τους.



Εικόνα 16. Σχηματική αναπαράσταση ενεργοποίησης αιμοπεταλίου από θρομβίνη και απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων (Ανατύπωση από:

https://www.researchgate.net/publication/46680722_τροποποιημένο)

Οι δράσεις του PRP οφείλονται στις βιολογικές ιδιότητες των ακόλουθων αυξητικών παραγόντων: του αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα (PDGF), του τροποποιητικού αυξητικού παράγοντα-β (TGF-β), του ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF), του αυξητικού παράγοντα ινσουλίνης 1 (IGF-1), του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF) και του επιθηλιακού αυξητικού παράγοντα (ECGF) (Marx, 2004, Albanese και συν., 2013, Liao και συν., 2014).

B.12. Ο ρόλος των αυξητικών παραγόντων στην οστική αναγέννηση

Η αναγέννηση των οστών απαιτεί την πρόσληψη, τον πολλαπλασιασμό και την ωρίμανση των οστεοβλαστών που προέρχονται από μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSC). Οι ιστοί που φέρουν μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSC) ή κύτταρα παρόμοιας δράσης με MSC είναι το αίμα, το δέρμα, το ήπαρ, οι πνεύμονες, ο λιπώδης ιστός, το δοκιδωτό οστό και το εμβρυικό αίμα.

Η διαδικασία της επούλωσης αποτελείται από 3 μεγάλες φάσεις, την οξεία φλεγμονώδη φάση, την φάση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των μεσεγχυματικών κύτταρων και τέλος τη φάση της αναγέννησης του οστίτη ιστού. Έχει διαπιστωθεί ότι, η φλεγμονή παίζει σημαντικό ρόλο στη πρόωρη αποκατάσταση του οστού. Όταν υπάρχει μια βλάβη στον οστίτη ιστό, τα

αιμοπετάλια διεγείρονται, ενεργοποιούνται και με την σειρά τους ενεργοποιούν τον μηχανισμό του καταρράκτη της πήξης. Από τα αιμοπετάλια απελευθερώνονται ουσίες ισταμίνης και σεροτονίνης, οι οποίες αυξάνουν τη διαπερατότητα των φλεγμονώδη κυττάρων στα τριχοειδή και ενεργοποιούν τα μακροφάγα. Εκκρίνονται προφλεγμονώδης μορφές κυτοκινών όπως οι IL1, IL6 και TNF- α . Οι κυτοκίνες αυτές συμμετέχουν ενεργά σε μεγάλο βαθμό στην αποκατάσταση του κατάγματος και παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετάβαση από χονδρογένεση σε οστεογένεση κατά τη διάρκεια της ενδοχονδρικής ωρίμανσης.

Για τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των μεσεγχειματικών κυττάρων (MSC), παίζει μεγάλο ρόλο αυξητικοί παράγοντες που έχουν μιτογονική, μορφογενετική και αγγειογενετική δράση. Οι παράγοντες αυτοί είναι: ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF), ο τροποποιητικός αυξητικός παράγοντας - β (TGF- β), ο αιμοπεταλιακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (PDEGF), ο αυξητικός παράγοντας ινσουλίνης-1 (IGF-1), ο αιμοπεταλιακός παράγοντας 4 (PF-4), ο βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (bFGF), ο ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) και ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF). Ο κάθε ένας από τους αυξητικούς παράγοντες δρα διαφορετικά. Ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF) είναι ο πρώτος αυξητικός παράγοντας που ανιχνεύεται στη περιοχή της βλάβης του ιστού. Ο PDGF προάγει την επούλωση του ιστού μέσω της σύνθεσης του κολλαγόνου και της πρωτεϊνοσύνθεσης. Η δράση του PDGF στην αναγέννηση του οστίτη ιστού φαίνεται να σχετίζεται με την μιτογόνο δραστηριότητα που ασκεί πάνω στους ινοβλάστες, στα αγγειακά μυϊκά κύτταρα, τα νευρογλοιακά κύτταρα και τα χονδροκύτταρα. Προσελκύει και ενεργοποιεί τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα και τους ινοβλάστες, καθώς διεγείρει τη σύνθεση επιπρόσθετων αυξητικών παραγόντων. Παρουσιάζει χημειοτακτική δραστηριότητα πάνω στους ινοβλάστες, ενώ παρουσιάζει ισχυρή χημειοτακτική και μιτογονική δραστηριότητα πάνω στους οστεοβλάστες.

Ο τροποποιητικός αυξητικός παράγοντας - β (TGF- β) είναι ένας από τους βασικούς αυξητικούς παράγοντες διαφοροποίησης στην επούλωση του συνδετικού ιστού και της αναγέννησης του οστίτη ιστού. Ως μέλος της υπερικογένειας του αυξητικού παράγοντα TGF- β είναι η οστική μορφογενετική πρωτεΐνη BMPs (Bone Morphogenetic Proteins). Ο Urist (Urist, 1965) όταν ανακάλυψε την αρχή της επαγωγής του οστού, ισχυρίστηκε ότι η μήτρα των οστών

περιέχει επαγωγικούς παράγοντες που θα μπορούσαν να βοηθήσουν στη δημιουργία νέου οστίτη ιστού. Ο TGF-β μπορεί να ξεκινήσει τη διαδρομή της σήμανσης σε οστεοπρογονετικά κύτταρα, για τη σύνθεση των πρωτεϊνών BMPs, ρυθμίζοντας κατά κάποιο τρόπο την έκφραση αυξητικών παραγόντων στον οστίτη ιστό και στον χόνδρο. Κατά την διάρκεια της οστικής αναγέννησης, οι πρωτεΐνες BMPs παράγονται από τα μεσεγχυματικά κύτταρα (MSC), από τα χονδροκύτταρα και τους οστεοβλάστες. Οι αυξητικοί παράγοντες TGF-β 1 και TGF-β 2, δρουν χημειοτακτικά και μιτογονικά στους προστεοβλάστες, ενώ προάγουν την σύνθεση της εξωκυττάριας ουσίας. Επίσης, οι μορφές του TGF-β διεγείρουν τη σύνθεση του κολλαγόνου τύπου I και της ινωδεκτίνης.

Ο αυξητικός παράγοντας ινσουλίνης-1(IGF-1) έχει αποδειχθεί ότι διεγείρει τους οστεοβλάστες και τους προστεοβλάστες να ξεκινήσουν την οστεογένεση. Ο IGF-1 αναστέλλει την απόπτωση των οστικών κυττάρων, ενώ διεγείρει άμεσα την παραγωγή του κολλαγόνου τύπου I. Παράγεται από τους χονδροβλάστες, τους ινοβλάστες και τους οστεοβλάστες.

Ο βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (bFGF) είναι γνωστό ότι έχει σημαντικό ρόλο στη αγγειογένεση. Δρα μιτογονικά στα μεσεγχυματικά κύτταρα (MSC, Mesenchymal Stem Cells). Ο bFGF προάγει την ανάπτυξη και την διαφοροποίηση διαφόρων κυττάρων τύπων, όπως των επιθηλιακών κυττάρων, των οστεοβλαστών, των χονδροκυττάρων και των μυοκυττάρων. Τα μέλη FGF- 1 και FGF-2 της οικογένειας FGF, που ανήκει και ο bFGF, σχετίζονται με την παραγωγή των χονδροκυττάρων και εκφράζονται στους οστεοβλάστες, αντίστοιχα. Ο αυξητικός παράγοντας bFGF έχει αναγνωριστεί ότι η δράση του ξεκινάει από τα πρώτα στάδια της επούλωσης.

Για να ολοκληρωθεί η αναγέννηση του οστίτη ιστού είναι απαραίτητο να σχηματιστούν νέα αιμοφόρα αγγεία, διαφορετικά η αναγέννηση του οστού θα είναι ελλιπής. Κατά την επούλωση η μετάβαση από ένα χόνδρινο οστέινο χόνδρο σε νεοσύστατο οστό, είναι μια διαδικασία που ολοκληρώνεται σε 4 στάδια. Ξεκινάει με την απόπτωση των χονδροκυττάρων, συνεχίζεται με την αποικοδόμηση και αφαίρεση της μήτρας του χόνδρου, ακολουθεί ο σχηματισμός νέων αγγείων στη γύρω περιοχή και τελειώνει με την πρόσληψη και την διαφοροποίηση των οστεογονικών κυττάρων και την παραγωγή της μήτρας του οστού. Η αγγειογένεση ρυθμίζεται από τον ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF) και την αγγειοποιητίνη-1,-2. Ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας

(PDGF) είναι ένας παράγοντας που συμμετέχει στο σχηματισμό των νέων αιμοφόρων αγγείων. Ο αιμοπεταλιακός παράγοντας 4 (PF-4) διεγείρει την αρχική εισροή ουδετερόφιλων στο τραυματισμένο ιστό. Δρα ως χημειοελκυστικό για τους ινοβλάστες και συμμετέχει στη μετανάστευση και τη μίτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ο αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας (VEGF) έχει αποδειχθεί ότι κατέχει τον πιο σημαντικό ρόλο στη νέο αγγειογένεση, καθώς και στον σχηματισμό του ενδοχονδρικού οστού. Είναι γνωστό ότι οι οστεοβλάστες περιέχουν μεγάλες ποσότητες από VEGF. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι οι μορφογενετικές πρωτεΐνες BMPs διεγείρουν την έκφραση του VEGF. Ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) διεγείρει την επιδερμική αναγέννηση, προάγει την επούλωση του τραύματος διεγείροντας τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων και των ινοβλαστών του δέρματος, καθώς και την παραγωγή άλλων αυξητικών παραγόντων (Lieberman και συν., 2006, Al- Aql και συν., 2008, Civinini και συν., 2011, Zhang και συν., 2013, Fioravanti και συν., 2015). Το PRP λειτουργεί μέσω της βιολογικής δράσης των αυξητικών παραγόντων και των κυτοκινών στη οστική αναγέννηση, όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Αυξητικοί παράγοντες και κυτοκίνες που συμμετέχουν στη οστική αναγέννηση (Ανατύπωση από: Zhang και συν., 2013 τροποποιημένο)

| Μηχανισμός Δράσης Σταδίου | Αυξητικοί Παράγοντες και Κυτοκίνες | Δραστηριότητα |
|--|---|---|
| Προφλεγμονώδης κυτοκίνες | IL- 1, IL- 6, TNF-alpha | Σημαντικό ρόλο στη πρώτη ανταπόκριση για οστική αναγέννηση |
| Αυξητικοί Παράγοντες | PDGF, TGF-b, PDEGF, PDAF, IGF-1, PF-4, VEGF, EGF | Βοηθούν στη αναγέννηση του οστίτη ιστού. Βιοχημικές ιδιότητες παρόμοιες με τις φυσιολογικές. |
| Αγγειογενετικοί Παράγοντες | VGF, VEGF, PMP (platelet derived membrane microparticles), PBMNCs (peripheral blood mononuclear cells) | Πρωθούν τη γρήγορη αγγειογένεση σε μόσχευμα οστού από τα αρχικά στάδια |
| Άλλοι παράγοντες που βρίσκονται μέσα στο PRP | Σεροτονίνη, Ισταμίνη, Ντοπαμίνη, Ασβέστιο, Αδενοσίνη | Δρουν στα α κοκκία και έχουν θεμελιώδη αποτελέσματα στις βιολογικές πτυχές της επούλωσης των ιστών. |

B.13. Ο ρόλος των αυξητικών παραγόντων στη αγγειογένεση

Η αγγειογένεση είναι μια ζωτικής σημασίας διεργασία που λαμβάνει χώρα στον ανθρώπινο ιστό, όταν αυτός διαρραγεί από κάποια αιτία. Σε αυτή τη διαδικασία, νέα τριχοειδή αναπτύσσονται από προϋπάρχοντα αγγεία για να στηρίξουν το αγγειακό δίκτυο. Τα αιμοπετάλια με τους αυξητικούς παράγοντες και άλλα μόρια, συμμετέχουν στην αγγειογένεση. Η αγγειογένεση είναι αποτέλεσμα μιας πολύπλοκης αλληλεπίδρασης αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων, αυξητικών παραγόντων, χημειοκινών, μορίων της εξωκυττάριας μήτρας και των μορίων της σηματοδότησης των κυττάρων. Οι αυξητικοί παράγοντες που εμπλέκονται στην αγγειογένεση είναι ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF), ο τροποποιητικός αυξητικός παράγοντας-β (TGF-β), ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), ενώ ο βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (bFGF) και ο ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), κατέχουν τον πιο σημαντικό ρόλο στη αγγειογένεση (Oklu και συν., 2010).

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα, όταν ενεργοποιηθούν από κάποιο αγγειογενετικό ερέθισμα, υφίστανται μια έκρηξη από μορφολογικά και βιοχημικά γεγονότα, τα οποία οδηγούν στο σχηματισμό νέων αγγείων. Όταν προκαλείται τρώση της συνέχειας του τοιχώματος του αγγείου, το αγγείο υφίσταται αγγειοδιαστολή. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκτείνονται, με αποτέλεσμα να είναι θελκτικά σε διάφορους αγγειογενετικούς παράγοντες. Αγγειογενετικοί παράγοντες είναι οι αυξητικοί παράγοντες και οι κυτοκίνες. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα φέρουν στην επιφάνεια τους διαμεμβρανικούς υποδοχείς για αυτούς του αγγειογενετικούς παράγοντες, και δεσμεύονται. Με την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, αυξάνεται η παραγωγή του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου και της κολλαγενάσης. Ο ενεργοποιητής του πλασμινογόνου προστατεύει το νέο-σχηματισμένο αγγείο από την θρόμβωση, ενώ η κολλαγενάση αποικοδομεί τη βασική μεμβράνη του αγγειακού τοιχώματος. Παρατηρείται αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα η οποία έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ινώδους πλέγματος στον εξωαγγειακό χώρο. Μετά από την αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης, τα ενδοθηλιακά κύτταρα υφίσταται την χημειοτακτική δράση των αγγειογενετικών παραγόντων. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα αυξάνουν τον αριθμό των οργανιδίων και σχηματίζουν προσεκβολές. Πάνω σε αυτές τις προσεκβολές τα ενδοθηλιακά κύτταρα θα πολλαπλασιαστούν. Θα σχηματιστεί ο αυλός και η βασική μεμβράνη των νέων

αγγείων. Στο νέο τριχοειδικό αγγείο θα συναθροιστούν περικύτταρα, τα οποία έλκονται προς τα ενδοθηλιακά κύτταρα με την επίδραση των αυξητικών παραγόντων που εκκρίνονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Αυτά τα περικύτταρα σε συνεργασία με τα λεία μυϊκά κύτταρα αποτελούν την δομή των νέων αγγείων. Μετά, ακολουθεί η ωρίμανση του αγγείου (Δρόσου 2007).

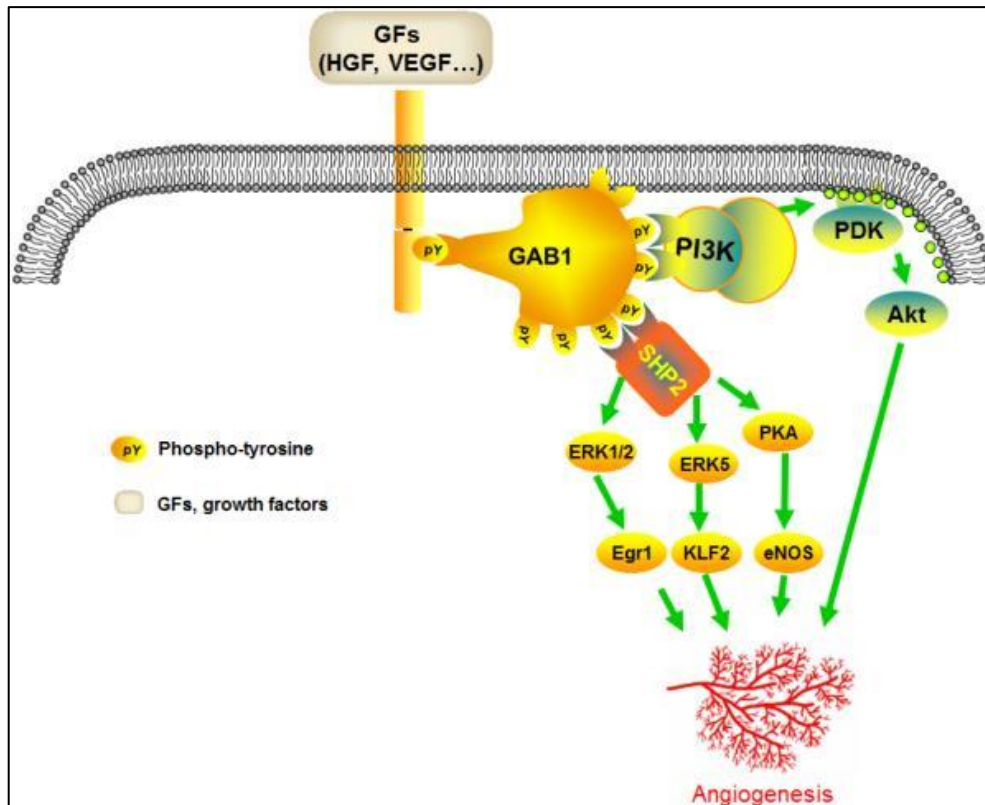
Οι αυξητικοί παράγοντες που σχετίζονται με την αγγειογένεση και ο τρόπος που δρουν, φαίνονται στον παρακάτω Πίνακα 3

Πίνακας 3. Δράση των αυξητικών παραγόντων στην αγγειογένεση (Ανατύπωση από: Martinez και συν., 2015 τροποποιημένο)

| Αυξητικοί Παράγοντες | Δράση |
|---|--|
| Ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) | <ul style="list-style-type: none"> • Ρυθμίζει την αγγειογένεση • Επιδρά στον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση του ενδοθηλιακού κυττάρου • Προωθεί την διεύρυνση και την διακλάδωση των αιμοφόρων αγγείων |
| Αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF) | <ul style="list-style-type: none"> • Οι PDGF B και PDGF C σχετίζονται με την ωρίμανση του αγγείου και με την πρόσληψη των προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων από το μυελό των οστών • Προσελκύει περικύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα για να ενισχυθεί το τοίχωμα του νέου αγγείου |
| Ηπατοκυτταρικός αυξητικός παράγοντας (HGF) | <ul style="list-style-type: none"> • Δρα μιτογονικά στα ενδοθηλιακά κύτταρα και διεγείρει την έκκριση του VEGF |
| Βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (bFGF) | <ul style="list-style-type: none"> • Μειώνει τον πολλαπλασιασμό των προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων και τον σχηματισμό του αυλού των αγγείων • In vitro, διεγείρει την έκκριση του VEGF σε προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα |
| Αγγειοποιητίνη | <ul style="list-style-type: none"> • Διατηρεί την αγγειακή διαπερατότητα • Μειώνει στα περικύτταρα την χημειοταξία |
| Αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από στρωματικά κύτταρα (SCGF – Stromal Cell Derived Factor) | <ul style="list-style-type: none"> • Μειώνει τη χημειοταξία πρόδρομων επιθηλιακών κυττάρων • Ενισχύει τη δομή των αγγείων |
| Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) | <ul style="list-style-type: none"> • Μειώνει την παραγωγή και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων • Δρα αρνητικά στον σχηματισμό του αυλού του αγγείου |

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν στην επιφάνεια τους διαμεμβρανικούς υποδοχείς κινάσης τυροσίνης (RTKs), οι οποίοι συνδέονται με τους αυξητικούς παράγοντες για να ρυθμίσουν τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την επιβίωση του κυττάρου. Ο VEGF δεσμεύεται από τους διαμεμβρανικούς υποδοχείς κινάσης τυροσίνης *VEGF 1-3*, και διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η σηματοδότησή του ρυθμίζεται από την αγγειοποιητίνη που δεσμεύεται από υποδοχείς τυροσίνης κινάσης *Tie 1-2*. Η αγγειοποιητίνη εκκρίνεται από τα αιμοπετάλια, ενώ η δράση της σχετίζεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα επίπεδα του VEGF αυξάνονται σε τριπλάσια επίπεδα, μέσα σε λίγα λεπτά μετά τον σχηματισμό του θρόμβου. Έχει αποδειχθεί *in vivo*, ότι ο VEGF συσσωρεύεται μέσα στους θρόμβους των αιμοπεταλίων. Επίσης, από τα α κοκκία των αιμοπεταλίων, εκκρίνονται ουσίες που θεωρούνται αναστολείς της αγγειογένεσης. Τέτοια μόρια είναι ο ηπατοκυτταρικός αυξητικός παράγοντας (HGF), ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων 4 (PF 4), η θρομβοσπονδίνη - 1 (TSP-1) και ο βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (bFGF). Ο bFGF είναι ένας ισχυρός αυξητικός παράγοντας με μιτογονική δραστηριότητα και χημειοτακτική δράση στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Lubkowska και συν., 2012, Walsh και συν., 2015).

Η ενεργοποίηση των διαμεμβρανικών υποδοχέων των ενδοθηλιακών κυττάρων από τους αυξητικούς παράγοντες, συνδέεται με τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών Gab 1. Οι πρωτεΐνες Gab 1 μαζί με την υπομονάδα p 85 και p110 του PI3K, θεωρούνται απαραίτητες για την ενεργοποίηση της οδού σηματοδότησης AKT. Οι πρωτεΐνες Gab 1 μαζί με τις πρωτεΐνες μεταγωγής SHP-2 θεωρούνται απαραίτητες για την ενεργοποίηση της οδού σηματοδότησης ERK (Εικόνα 17). Οι πρωτεΐνες Gab1 αναστέλλουν την μεταγωγή σήματος, προάγουν τη μετανάστευση και την επιβίωση των επιθηλιακών κυττάρων και προάγουν τον σχηματισμό του αυλού των νέων αγγείων. Οι πρωτεΐνες Gab1 είναι απαραίτητες πρωτεΐνες για τους αυξητικούς παράγοντες VEGF, HGF για να ενεργοποιήσουν την νέο αγγειογένεση (Wang και συν., 2015).



Εικόνα 17. Σχηματική απεικόνιση μεταγωγής σήματος στη αγγειογένεση (Ανατύπωση από: Wang και συν., 2015)

B.14. Ο ρόλος των αυξητικών παραγόντων στην επιθηλιοποίηση

Όλες οι κυτταρικές και βιοχημικές διεργασίες που παίρνουν μέρος στην επιδιόρθωση του ιστού χωρίζονται σε 4 στάδια, στη αιμόσταση, στη φλεγμονώδη αντίδραση, στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και στην αναδιαμόρφωση. Οι διαδικασίες αποκατάστασης και αναγέννησης ενός ιστού ξεκινάνε αμέσως μετά την έναρξη της βλάβης. Στο στάδιο του πολλαπλασιασμού των κυττάρων γίνεται η αγγειογένεση ή η νέο-αγγειογένεση, η ανασυγκρότηση του συνδετικού ιστού η σύνθεση της εξωτερικής μήτρας και η επιθηλιοποίηση (Rozman και Bolta, 2007, Gonzales και συν., 2016).

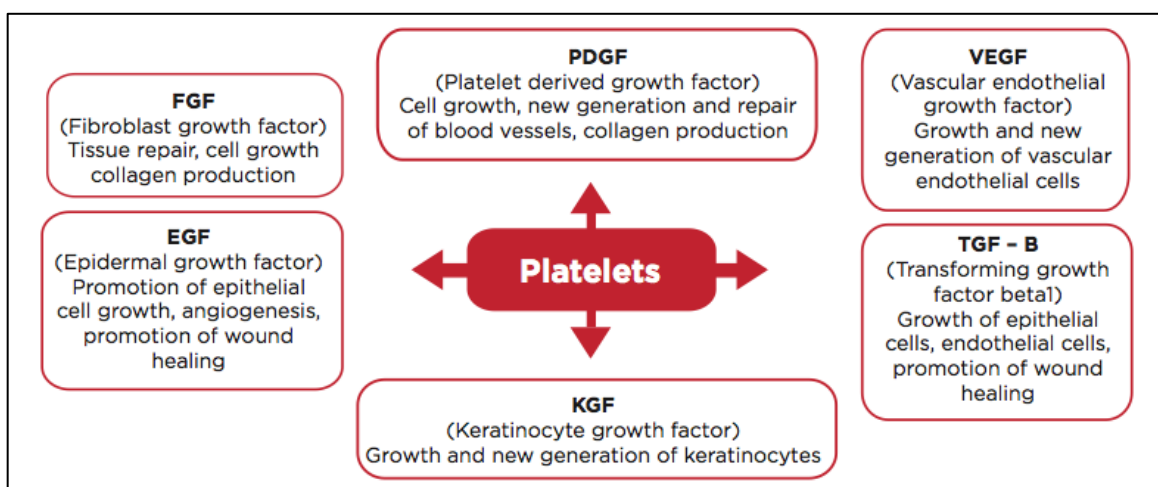
Τα κερατινοκύτταρα είναι το κύριο κυτταρικό συστατικό της επιδερμίδας. Έχουν τον κυρίαρχο ρόλο στη επιθηλιοποίηση. Σε κανονικές συνθήκες, πολλές στιβάδες από κερατινοκύτταρα συγκροτούνται μαζί, έτσι ώστε να σχηματιστεί ένας φυσικός φραγμός μεταξύ του δέρματος και του εξωτερικού περιβάλλοντος. Μόλις υπάρξει κάποιος τραυματισμός του δέρματος, τα κερατινοκύτταρα αναλαμβάνουν δράση προκειμένου να διατηρήσουν την ακεραιότητα αυτού του φυσικού φραγμού. Τα

κερατινοκύτταρα ενεργοποιούνται και μεταναστεύουν προς την περιοχή της βλάβης, για να πολλαπλασιαστούν και να διαφοροποιηθούν. Όλες αυτές διεργασίες γίνονται με την επίδραση αυξητικών παραγόντων, κυτοκινών και χημειοκινών. Η όλη αυτή διαδικασία είναι γνωστή ως επιθηλιοποίηση, που ορίζεται ως η διαδικασία που απαιτείται για την κάλυψη της απογυμνωμένης επιθηλιακής περιοχής. Μια επιτυχής επιθηλιοποίηση κρίνεται απαραίτητη για την επιτυχή επούλωση των τραυμάτων του δέρματος.

Αμέσως μετά τον τραυματισμό, τα κερατινοκύτταρα θα ξεκινήσουν την επιθηλιοποίηση του δέρματος. Τα κερατινοκύτταρα συνδέονται μεταξύ τους με λεπτά ινίδια που ονομάζονται δεσμοσωμάτια. Τα δεσμοσωμάτια είναι ειδικοί σχηματισμοί των κυτταρικών μεμβρανών δυο γειτονικών κερατινοκυττάρων και απαντώνται μόνο στα επιθηλιακά κύτταρα. Αν για οποιαδήποτε αιτία ασκηθεί πίεση πάνω στα δεσμοσωμάτια, οι ίνες τους σπάνε και χαλαρώνουν την μεταξύ τους σύνδεση των κερατινοκυττάρων. Αμέσως, τα ενεργοποιημένα κερατινοκύτταρα που βρίσκονται στην άκρη του τραύματος διαλύουν τις αιμιδοσωματικές επαφές που έχουν με τη βασική στιβάδα. Έτσι, τα κερατινοκύτταρα μεταναστεύουν προς την τραυματισμένη περιοχή και πολλαπλασιάζονται. Αρχικά, τα κερατινοκύτταρα θα σχηματίσουν μια πρώτη στοιβάδα, όπου μετά θα ξεκινήσουν να πολλαπλασιάζονται για να εξασφαλίσουν μια επαρκή συγκέντρωση κυττάρων, ικανή για να σχηματίσουν το φυσικό φραγμό του δέρματος. Ο πολλαπλασιασμός των κερατινοκυττάρων εξαρτάται από την επάρκεια των αυξητικών παραγόντων, τον βαθμό διαφοροποίησης των κυττάρων, καθώς και από την ικανότητα προσκόλλησης των κυττάρων μεταξύ τους. Μόνο τα κερατινοκύτταρα που βρίσκονται στη βασική στιβάδα έχουν μιτωτική δραστηριότητα, τα κερατινοκύτταρα που βρίσκονται άνωθεν της βασικής στιβάδας δε μπορούν να πολλαπλασιαστούν. Στα χρόνια τραύματα του δέρματος, η μιτωτική δραστηριότητα των κερατινοκυττάρων γίνεται από τα κύτταρα που βρίσκονται άνωθεν της βασικής στιβάδας του δέρματος.

Όλες αυτές οι βιολογικές διεργασίες που υφίστανται τα κερατινοκύτταρα καθοδηγούνται από διάφορους ρυθμιστές. Οι ρυθμιστές αυτοί είναι: οι αυξητικοί παράγοντες, οι κυτοκίνες, οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs, matrix metalloproteinases) οι οποίες αποδομούν τις πρωτεΐνες της εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας, οι χημειοκίνες, τα μακροφάγα και τα λευκοκύτταρα. Κατά τον τραυματισμό των επιδερμικών κυττάρων, με τον σχηματισμό του αιμοστατικού

θρόμβου προκαλείται η απελευθέρωση των αυξητικών παραγόντων από τα αιμοπετάλια (Εικόνα 18).



Εικόνα 18. Αυξητικοί παράγοντες που εκκρίνονται από τα αιμοπετάλια και συμμετέχουν στη επιθηλιοποίηση (Ανατύπωση από: [http:// www. Viscontimedical.com/prp](http://www.Viscontimedical.com/prp))

Ο τροποποιητικός αυξητικός παράγοντας-β (TGFβ) που εκκρίνεται από μακροφάγα κατά την φλεγμονώδη φάση της ιστικής επούλωσης, διεγείρει τα κερατινοκύτταρα και προάγει την μετανάστευση τους. Στη συνέχεια, ο TGF- β που εκκρίνεται από τους ινοβλάστες κατά την φάση του πολλαπλασιασμού, επιδρά στα κερατινοκύτταρα προάγοντας τον πολλαπλασιασμό τους κατά την διάρκεια της επιθηλιοποίησης. Ο ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντα (bFGF), με μια παρακρινή δράση επηρεάζει τη μετανάστευση των κερατινοκυττάρων καθώς και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό τους. Ο αυξητικός παράγοντας των ηπατοκυττάρων (HGF) εκκρίνεται από τους ινοβλάστες και συμβάλει στον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων. Ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF) που εκκρίνεται από τα αιμοπετάλια, κατά την αρχική φάση της επούλωσης στη θέση του αιμοστατικού θρόμβου δρα με αυτοκρινή τρόπο στη σηματοδότηση των επιθηλιακών κυττάρων. Ο αυξητικός παράγοντας ινσουλίνης-1 (IGF-1) που παράγεται από τους ινοβλάστες, σε συνεργασία με τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF) διεγείρουν τα κερατινοκύτταρα για να πολλαπλασιαστούν. Οι κυτοκίνες IL-1, IL-6 και ο νεοπλασματικός νεκρωτικός παράγοντας-α (TNF-α, Tumor Necrosis Factor-α) διαμορφώνουν το μεταναστευτικό φαινότυπο των κερατινοκυττάρων. Ο TNF-α μπορεί να απελευθερωθεί από τα μακροφάγα ή

απευθείας από τα επιθηλιακά κύτταρα (Leopold και συν., 2012, Pastar και συν., 2014).

Ο αυξητικός παράγοντας των κερατινοκυττάρων (KGF, keratinocyte growth factor) είναι ένας παράγοντας με μιτογονική δραστηριότητα, παράγεται από τα μεσεγχυματικά κύτταρα και δρα με παρακρινή τρόπο στα επιθηλιακά κύτταρα. Ο KGF συνδέεται με τον υποδοχέα 2b του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (KGFG2b). Ο KGF, επίσης γνωστός ως FGF7, θεωρείται ότι είναι ο διαμεσολαβητής της μεσεγχυματικής - επιθηλιακής επικοινωνίας, προάγοντας με αυτό τον τρόπο τον πολλαπλασιασμό (Rubin και συν., 1995, Pastar και συν., 2014).

Ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες για την επούλωση του δέρματος. Διεγείρει άμεσα τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων. Σε οξείες πληγές, ο EGF εκκρίνεται κυρίως από τα αιμοπετάλια, τα μακροφάγα και τους ινοβλάστες. Έχει διαπιστωθεί ότι, η συγκέντρωση του EGF αυξάνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά τον τραυματισμό (Pastar και συν., 2014, Shen και συν., 2017). Οι αυξητικοί παράγοντες EGF, TGF-β, PDGF, IGF-1, HGF και KGF, παρουσιάζουν ακριβώς την ίδια δραστικότητα στην επανεπιθηλιοποίηση του τραύματος (Leopold και συν., 2012).

B.15. Ταξινόμηση του πλάσματος πλούσιο σε αιμοπετάλια

Οι Ehrenfest και συν. (Ehrenfest και συν., 2009) ταξινόμησαν το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια σε τέσσερις οικογένειες. Χρησιμοποίησαν ως κριτήρια την παρουσία ή την απουσία των λευκών αιμοσφαιρίων και την αρχιτεκτονική του δικτύου του ινώδους. Η ταξινόμηση αυτή ακολουθείτε μέχρι και σήμερα.

Το PRP ταξινομήθηκε από τους Ehrenfest και συν. ως εξής:

- I. Προϊόντα PRP φτωχά σε λευκά-Pure Platelet- Rich Plasma (P-PRP)
Πρόκειται για παρασκευάσματα PRP χωρίς λευκά αιμοσφαίρια και με χαμηλής πυκνότητας δίκτυο ινώδους, μετά την ενεργοποίηση. Τα προϊόντα αυτής της κατηγορίας μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υγρά διαλύματα ή σε μορφή ενεργοποιημένου πηκτώματος. Υπάρχουν πολλές μέθοδοι παρασκευής P-PRP. Μια από αυτούς τις μεθόδους είναι η μέθοδος

διαχωρισμού κυττάρων (πλάσμαφαίρεσης συνεχούς ροής) που γίνεται στα εργαστήρια αιματολογίας- αιμοδοσίας. Στο εμπόριο κυκλοφορεί μια μέθοδος του P-PRP γνωστή ως PRGF (Plasma Rich in Growth Factors or Preparations Rich in Growth Factors or EndoRet, Biotechnology Institute BTI(dental implant company), Vitoria, Spain). Έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλές κλινικές δοκιμές, κυρίως στην αθλητική ιατρική. Άλλη τεχνική του P-PRP έχει προταθεί για τα έλκη του δέρματος, που κυκλοφορεί με την εμπορική ονομασία Vivostat PRF (Platelet- Rich Fibrin, Vivostat A/S, Alleroed, Denmark)

II. Προϊόντα PRP με λευκά αιμοσφαίρια-Leukocyte and Platelet- Rich Plasma (L-PRP)

Πρόκειται για παρασκευάσματα PRP με λευκά αιμοσφαίρια , αλλά με χαμηλής πυκνότητας δίκτυο ινώδους μετά από την ενεργοποίηση. Τα προϊόντα αυτής της μεθόδου μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υγρά διαλύματα ή με τη μορφή πηκτώματος. Σε αυτή την κατηγορία ανήκει και ο μεγαλύτερος αριθμός εμπορικών ή πειραματικών συστημάτων. Πολλά αυτοματοποιημένα πρωτόκολλα έχουν βασιστεί πάνω στη χρήση των συγκεκριμένων εμπορικών kit. Ενδεικτικά είναι η Harvest Smart –Pre P(Harvest Technologies, Plymouth, MA, USA), η Biomet GPS III(Biomet INC., Warsaw, IN, USA), η Platelex (Praque, Czech Republic), η Regen PRP(Regen Lab , Le Mont-sur- Lausanne, Switzerland)

III. Προϊόντα PRP πλούσια σε ινώδες και φτωχό σε λευκά αιμοσφαίρια-Pure Platelet- Rich Fibrin ή Leukocyte- Poor Platelet – Rich Fibrin (P-PRF)

Πρόκειται για παρασκευάσματα PRP φτωχά σε λευκά αιμοσφαίρια, αλλά με υψηλής πυκνότητας δίκτυο ινώδους. Τα προϊόντα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποκλειστικά και μόνο με την μορφή ισχυρών πηκτωμάτων. Δεν μπορούν να εγχυθούν είτε να χρησιμοποιηθούν ως κόλλες ινώδους. Έχουν όμως την δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν ως στερεό υλικό για άλλες εφαρμογές, λόγω της ισχυρής μήτρας του ινώδους. Στο εμπόριο κυκλοφορεί μόνο το προϊόν με την εμπορική ονομασία Fibrinet PRFM (Platelet –Rich Fibrin Matrix, Cascade Medical , Wayne, NJ, USA) που χρησιμοποιείται σε ορθοπεδικά περιστατικά.

IV. Προϊόντα PRP πλούσια σε λευκά αιμοσφαίρια και ινώδες-Leukocyte- and Platelet –Rich Fibrin (L-PRF)

Πρόκειται για προϊόντα με λευκά αιμοσφαίρια και με υψηλής πυκνότητας δίκτυο ινώδους. Είναι γνωστά και ως προϊόντα δεύτερης γενιάς. Τα προϊόντα αυτά υπάρχουν μόνο με την μορφή ισχυρών πηκτωμάτων. Δεν μπορούν να εγχυθούν είτε να χρησιμοποιηθούν ως κόλλα ινώδους. Το παρασκεύασμα L-PRF είναι το μοναδικό που έχει εγκριθεί από τον διεθνή οργανισμό του FDA με πιστοποίηση για χρήση υλικού CE. Στο εμπόριο κυκλοφορεί με την ονομασία Intra- Spin L-PRF (Intra-Lock Inc., Boca Raton, FL, USA). Πρόκειται για μια τεχνική πολύ απλή, γρήγορη και οικονομική, που βρίσκει εφαρμογή κυρίως στη στοματογναθοχειρουργική, ενώ σε πειραματικό στάδιο εφαρμόζεται στην ορθοπεδική και την αθλητική ιατρική.

Ο Ehrenfest και συν. (Ehrenfest και συν., 2014) δημοσίευσαν μια νέα πρόταση για την ταξινόμηση του PRP. Η ταξινόμηση αυτή αναφέρεται για προϊόντα του PRP που χρησιμοποιούνται για τοπική εφαρμογή με διεισδυτική δράση και σε ενέσιμα προϊόντα για ορθοπεδικά περιστατικά και στη αθλητική ιατρική. Τα κριτήρια που έθεσαν για την συγκεκριμένη ταξινόμηση είναι ακριβώς τα ίδια με τα κριτήρια που χρησιμοποίησαν για την ταξινόμηση που ανακοίνωσαν το 2009. Τα προϊόντα του PRP ταξινομήθηκαν σε 4 οικογένειες. Στη ίδια μελέτη, γίνεται αναφορά και σε άλλα 2 συστήματα ταξινόμησης και αφορά αποκλειστικά τη χρήση του PRP στη αθλητική ιατρική. Η πρώτη ταξινόμηση χρησιμοποιεί ως κριτήρια τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια. Τα προϊόντα του PRP ταξινομούνται σε 4 οικογένειες, ανάλογα με την παρουσία ή την απουσία των λευκοκυττάρων και την μέθοδο ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Η δεύτερη ταξινόμηση, που ονομάζεται PAW (Platelet Activation White cells) χρησιμοποιεί ως κριτήρια τον απόλυτο αριθμό των αιμοπεταλίων, την μέθοδο ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και την παρουσία των λευκών αιμοσφαιρίων.

B.16. Τρόπος παρασκευής πλάσματος πλούσιο σε αιμοπετάλια

Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του πλάσματος πλούσιο αιμοπετάλια εξελίσσονται συνεχώς τα τελευταία χρόνια. Με τις τεχνικές αυτές λαμβάνεται προϊόν PRP σε ενέσιμη μορφή ή σε μορφή πηκτώματος. Η βασική αρχή παρασκευής των προϊόντων αυτών βασίζεται στη διαφορική φυγοκέντρηση του αυτόλογου δείγματος. Σημαντικό ρόλο παίζουν και άλλοι παράγοντες που

τροποποιούνται κάθε φορά, όπως η θερμοκρασία, η επιλογή της μεθόδου ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, το προπαρασκευαστικό μέρος της προετοιμασίας του PRP κ.α.

Για να αποδοθούν στο μέγιστο οι αυξητικοί παράγοντες από τα αιμοπετάλια δίνεται μεγάλη προσοχή στο προπαρασκευαστικό κομμάτι της προετοιμασίας του PRP. Οι ερευνητές αναφέρουν ως βασική αρχή της προπαρασκευής του PRP τη καλή αιμοληψία του αυτόλογου δείγματος. Με άσηπτη διαδικασίες λαμβάνεται μικρή ποσότητα φλεβικού αίματος, περίπου 20-60 ml. Σε κλινική μελέτη που έγινε από τους Waters και Roberts (Waters και Roberts, 2004) παρατήρησαν ότι ο αριθμός των αιμοπεταλίων στο τελικό προϊόν ήταν υψηλότερος, όταν η αιμοληψία γινόταν από κεντρική ή περιφερική φλέβα και όχι από αρτηρία. Εξίσου βασική θεωρείται και η σωστή επιλογή της διαμέτρου της βελόνας με την οποία θα γίνει η αιμοληψία. Πρώτοι, οι Marx και Garg (Marx και Garg, 2005) επισήμαναν ότι η διάμετρος της βελόνας θα πρέπει να είναι 19 G ή ακόμα και μεγαλύτερη. Σε μια πιο πρόσφατη έρευνα που έγινε από τους Akhundov και συν. (Akhundov και συν., 2012) σχετικά με την αποτελεσματικότερη και οικονομικότερη μέθοδο παρασκευής τοπικών επιθεμάτων για την επούλωση των τραυμάτων, αναφέρουν και εκείνοι ότι η διάμετρος της βελόνας θα πρέπει να είναι στα 19 G. Με βελόνες αιμοληψίας μικρότερης διαμέτρου, η αιμοληψία θα γίνεται πιο εργώδης, οπότε τα αιμοπετάλια θα ενεργοποιούνται πρόωρα ή θα καταστρέφονται. Οπότε θα μειώνεται ο αριθμός των αιμοπεταλίων. Η αιμοληψία θα πρέπει πάντα να γίνεται λίγο πριν την παρασκευή του προϊόντος PRP.

Το PRP παρασκευάζεται από το πλάσμα του αίματος. Σημαντική για το PRP είναι η επιλογή του σωστού αντιπηκτικού, το οποίο δε θα επηρεάζει τις μεταβολικές ιδιότητες των αιμοπεταλίων και την λειτουργικότητά τους, μέχρι το τέλος της επεξεργασίας. Το αντιπηκτικό που προτιμάται, είναι η αντιπηκτική κιτρική δεξτρόζη A (ACD-A), η οποία διατηρεί βιώσιμα τα αιμοπετάλια. Το αντιπηκτικό ACD-A δεσμεύει το ασβέστιο και εμποδίζει τις πρωτεΐνες να ενεργοποιήσουν τον καταρράκτη της πήξης. Οι διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες του ICMS (International Cellular Medicine Society) αναφέρουν ότι το pH στο τελικό προϊόν του PRP θα πρέπει να είναι σε φυσιολογικά επίπεδα, όταν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί στη φυσική του μορφή. Το κιτρικό προσδίδει πιο όξινο pH στο αίμα από ό,τι είναι φυσιολογικά. Κάποιοι από τους αυξητικούς παράγοντες επηρεάζονται από το pH του ιστού-στόχου και για το λόγο αυτό τα περισσότερα πρωτόκολλα συστήνουν

Η βασική αρχή παρασκευής του PRP βασίζεται στη διαφορική φυγοκέντρωση του αυτόλογου αίματος. Πρόκειται για την κλασική μέθοδο φυγοκέντρωσης, όπου ο διαχωρισμός των κυτταρικών στοιχείων βασίζεται στο μέγεθος και την πυκνότητά τους. Ακολουθούν διαδοχικές φυγοκεντρώσεις, με συνεχώς αυξανόμενη ταχύτητα. Η πρώτη φυγοκέντρωση οδηγεί στον σχηματισμό ενός ιζήματος με το υπερκείμενό του, όπου τα μικρότερα σωματίδια αιωρούνται στο υπερκείμενο. Ακολουθεί μια δεύτερη φυγοκέντρωση του υπερκείμενου σε μεγαλύτερες ταχύτητες.

Οι Dhurat και Sukesh (Dhurat και Sukesh, 2014) σε βιβλιογραφική μελέτη, αναφέρουν ότι υπάρχουν πολλοί τρόποι για να παρασκευαστεί ένα προϊόν του PRP. Πάντα όμως θα είναι το αποτέλεσμα δύο διαδοχικών φυγοκεντρώσεων ενός αυτόλογου αίματος. Η πρώτη φυγοκέντρωση γίνεται για να διαχωριστούν τα ερυθρά αιμοσφαίρια από το ολικό αίμα και θα ακολουθήσει μια δεύτερη φυγοκέντρωση κατά την οποία λαμβάνεται εναιώρημα αιμοπεταλίων σε μικρό όγκο πλάσματος. Επισημαίνουν ότι δε υπάρχει κάποιο συγκεκριμένο πρωτόκολλο που να ορίζει την επιτάχυνση της φυγοκέντρωσης και τον χρόνο που απαιτείται. Οι περισσότεροι ερευνητές βασίστηκαν πάνω στην βασική έννοια της διαφορικής φυγοκέντρωσης αλλά χρησιμοποίησαν διαφορετικές ταχύτητες φυγοκέντρωσης και τήρησαν διαφορετικούς χρόνους. Εξίσου βασική, θεωρείται η θερμοκρασία που πρέπει να έχει η φυγόκεντρος κατά την διάρκεια της λειτουργίας της για την Παρασκευή του PRP. Η θερμοκρασία με την οποία θα φυγοκεντρείται το αυτόλογο δείγμα δε θα πρέπει να επηρεάσει την πρόωρη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Παρατήρησαν ότι οι θερμοκρασίες που χρησιμοποιήθηκαν από τους περισσότερους ερευνητές είχαν ένα εύρος μεταξύ 12°C-16°C. Οι συγγραφείς κατέληξαν ότι η καλύτερη απόδοση σε αιμοπετάλια και κατ'επέκταση σε αυξητικούς παράγοντες, γίνεται όταν η πρώτη φυγοκέντρωση του αυτόλογου δείγματος πραγματοποιείται στις 900 στροφές «g» για 5 λεπτά και η δεύτερη στις 1000 στροφές «g» για 10 λεπτά, στους 16°C.

Ο Marx (Marx, 2001) σε μια από τις εργασίες ορόσημο που έχει δημοσιευτεί, αναφέρει ότι για την παρασκευή PRP θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ειδικές συσκευές και όχι μια απλή εργαστηριακή φυγόκεντρος. Αυτές οι συσκευές θα πρέπει να στηρίζονται στις βασικές αρχές της διαφορικής φυγοκέντρωσης, να τηρούν της προδιαγραφές της FDA (Federal Drug and Food Association, Αμερικάνικη Ομοσπονδιακή Επιτροπή Φαρμάκων και Τροφίμων). Ο Marx, σε

αντίθεση με τους Dhurat και Sukesh, αναφέρει ότι η πρώτη φυγοκέντρηση θα πρέπει να πραγματοποιείται σε υψηλές στροφές για να διαχωριστούν τα ερυθρά αιμοσφαίρια από το πλάσμα, το οποίο και περιέχει τα αιμοπετάλια, τα λευκά αιμοσφαίρια και τους παράγοντες πήξης. Και η δεύτερη φυγοκέντρηση να γίνεται σε πιο χαμηλές στροφές, όπου θα διαχωρίσει τα αιμοπετάλια από τα λευκά αιμοσφαίρια μαζί με μερικά ερυθρά αιμοσφαίρια.

Υπάρχουν πολλά συστήματα του PRP που κυκλοφορούν στο εμπόριο και χρησιμοποιούνται. Όμως, όλα τα συστήματα του PRP δε είναι πιστοποιημένα από τον κρατικό οργανισμό FDA (Federal Drug and Food Association, Αμερικάνικη Ομοσπονδιακή Επιτροπή Φαρμάκων και Τροφίμων) των Η.Π.Α.. Ο FDA είναι υπεύθυνος για τον έλεγχο της ασφάλειας και της επάρκειας των συσκευών που χρησιμοποιούνται για ιατρική χρήση. Ο FDA έχει πιστοποιήσει τα συστήματα του PRP με την πιστοποίηση 510(k). Η πιστοποίηση 510(k) αφορά συσκευές που έχουν ταξινομηθεί σε χαμηλής επικινδυνότητας από τους επιστήμονες του FDA και έχουν αξιολογηθεί στο πλαίσιο του συστήματος εκθέσεων αξιολόγησης προϊόντων πριν την εμπορική διάθεση. Το 510(k) επικεντρώνεται κυρίως στη ασφάλεια της συσκευής, στα χαρακτηριστικά της απόδοσης και δε απαιτείται να προηγηθούν κλινικές δοκιμές. Το FDA διευκρινίζει ότι τα συστήματα του PRP που έχουν την πιστοποίηση 510(k) παράγουν πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια, το οποίο προορίζεται για να αναμιχθεί με μοσχεύματα οστού και να ενισχύσουν τις ιδιότητες των οστικών μοσχευμάτων σε ορθοπεδικά περιστατικά. Συνεχίζει αναφέροντας ότι το PRP δε θα προορίζεται για άμεση έγχυση, ή να εμφυτευτεί χωρίς να αναμιχθεί πρώτα με οστικά μοσχεύματα (Beitzel και συν., 2015). Τα μοναδικά συστήματα που πληρούν τις προδιαγραφές αυτές είναι το σύστημα *HSPCS* (Harvest SmartPreP Platelet Concentrate System) της εταιρείας Harvest Technologies Inc., Plymouth MA, USA (Εικόνα 20) και το σύστημα *3i PCCS* (3i Platelet Concentrate Collection System) της εταιρείας 3i Biomet Palm Beach, Florida, USA. Τα δύο αυτά συστήματα παράγαν προϊόντα με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε αιμοπετάλια (Marx, 2004). Στο εμπόριο κυκλοφορεί και ένας δεύτερος τύπος συστημάτων παρασκευής του PRP, το οποίο χρησιμοποιείται όταν απαιτείται συλλογής μεγάλου όγκου PRP. Τα συστήματα αυτά μπορούν να απομονώσουν PRP από μια μονάδα αίματος (450ml). Τα πλεονεκτήματα των συστημάτων αυτών είναι ότι μπορούν και παράγουν μεγάλους όγκους PRP και δίνεται η δυνατότητα να μεταγγιστούν ξανά στον δότη τα ερυθρά αιμοσφαίρια και το πλάσμα φτωχό σε

αιμοπετάλια (PPP). Τα συστήματα αυτά είναι οι συσκευές διαχωρισμού των κυττάρων (Erpley και συν., 2006).



Εικόνα 20. Κιτ εμπορίου και σύστημα HSPCS (Harvest SmartPReP Platelet Concentrate System) για παρασκευή PRP (Ανατύπωση από:

<https://www.harvesttech.com/clinician/clinician-home/prp/products>)

Το 2002, οι Weibrich και Kleis (Weibrich και Kleis, 2002) δημοσίευσαν μια μελέτη μεταξύ του συστήματος PRP kit 3i PCCS (3i Platelet Concentrate Collection System) και του συστήματος Curasan PRP kit (Fa Curasan, Kleinostheim, Germany). Στη μελέτη αυτή, ομάδα ελέγχου ήταν 47 υγιή άτομα, ηλικίας 20-59 ετών και με αριθμό αιμοπεταλίων πάνω από 150.000/μl. Διαπίστωσαν, ότι η μέθοδος του PRP που ακολουθείται από το σύστημα PCCS παρουσίασε μια σειρά από πλεονεκτήματα σε σχέση με το σύστημα Curasan. Από το σύστημα PCCS παρασκευάστηκε προϊόν PRP με μεγαλύτερο αριθμό αιμοπεταλίων, σε σύγκριση με το προϊόν PRP που προήλθε από το σύστημα Curasan. Χρειάστηκε λιγότερος χρόνος για την ολοκλήρωση της διαδικασίας, είχε τις λιγότερες επεμβατικές ενέργειες, επομένως μειώθηκε κατά πολύ ο κίνδυνος να εμφανιστούν εξωγενείς παράγοντες που να προκαλέσουν την πρόωρη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Οι Marx και Garg (Marx και Garg, 2005) μελέτησαν με ενδιαφέρον τα προϊόντα του PRP που παρασκευάστηκαν από επτά διαφορετικές κατασκευαστικές εταιρείες. Κατέληξαν στο συμπέρασμα, ότι τα πιο αποδοτικά συστήματα του PRP είναι οι

SmartPReP της εταιρείας Harvest Technologies και *PCCS* της εταιρείας 3i Biomet. Το σύστημα *SmartPReP* της εταιρείας Harvest Technologies με πιο εύκολη διαδικασία και σε λιγότερο χρόνο, αποδίδει περισσότερα αιμοπετάλια στο τελικό προϊόν του PRP (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Σύγκριση δεδομένων μεταξύ συστημάτων PRP 3i PCCS και HSPCS (Ανατύπωση από: Marx και Garg, 2005 τροποποίηση)

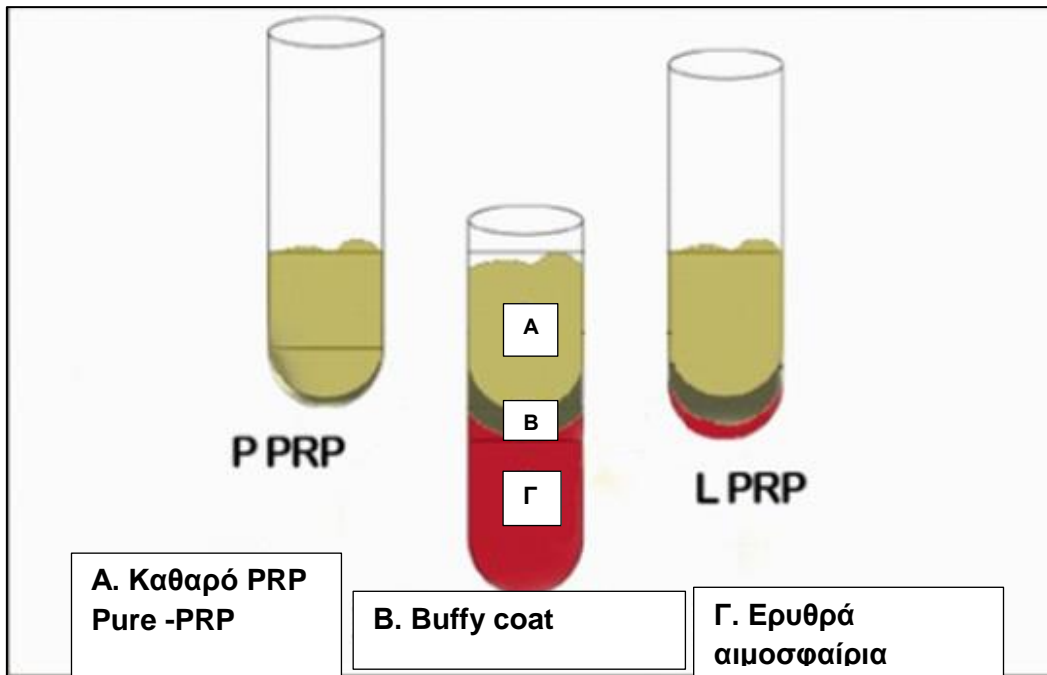
| ΔΕΔΟΜΕΝΑ | 3i PCCS PRP kit | HSPCS PRP kit |
|--|-----------------|---------------|
| Απόδοση σε αιμοπετάλια | 65% | 68% |
| Μέσος όρος συγκέντρωσης αιμοπεταλίων /ml σε 4 ml PRP | 1.818.000 | 2.278.000 |
| Μέσος όρος συγκέντρωσης αιμοπεταλίων /ml σε 5 ml PRP | 1.454.000 | 1.823.000 |
| Μέσος όρος συγκέντρωσης αιμοπεταλίων /ml σε 6 ml PRP | 1.212.000 | 1.519.000 |
| Συνολικός χρόνος προετοιμασίας | 20 min | 15 min |
| Αυτοματοποίηση – Εκπαίδευση | +++ | ++ |

Υπάρχουν πολλά και διαφορετικά πρωτόκολλα που ακολουθούνται από τους ερευνητές και τους κλινικούς γιατρούς για την παρασκευή του PRP. Οι επιστήμονες με βάση πάντα τις αρχές διαφορικής φυγοκέντρωσης κατασκευάζουν πρωτόκολλα με τις δικές τους τυποποιημένες παραμέτρους που ορίζουν την τεχνική παρασκευής του PRP. Το 2011 η διεθνής κοινότητα κυτταρικής ιατρικής- *ICMS* (*ICMS- International Cellular Medicine Society, 2011*) εξέδωσε κατευθυντήριες οδηγίες σχετικά με την φυσική ενέσιμη μορφή του PRP. Οι οδηγίες αφορούν το προπαρασκευαστικό κομμάτι της τεχνικής του PRP και οδηγίες που έχουν να κάνουν με την ακριβή χρήση του PRP σε ενέσιμη μορφή στις μυοσκελετικές παθήσεις.

Ο διεθνής οργανισμός του FDA τον Απρίλιο του 2017 (FDA, 2017) εξέδωσε κατευθυντήριες οδηγίες που αφορούν την επεξεργασία του πλάσματος για την παρασκευή του PRP. Συγκεκριμένα αναφέρει ότι το PRP θα πρέπει να παρασκευάζεται από αίμα του δότη, το οποίο θα συλλέγεται από μια μη εργώδη φλεβοκέντηση για να ελαχιστοποιείται η βλάβη στο ιστό του δότη. Το πλάσμα θα

αποχωρίζεται από τα ερυθρά αιμοσφαίρια με την διαδικασία της φυγοκέντρησης έως και 4 ώρες μετά την φλεβοκέντηση ή όπως ορίζεται από τις οδηγίες που ισχύουν για την συλλογή, επεξεργασία και αποθήκευση του αίματος. Ο χρόνος και η ταχύτητα με την οποία θα φυγοκεντρείται το δείγμα θα πρέπει να είναι τόσος όσος χρειάζεται για να παραχθεί ένα προϊόν με κατά μέσο όρο συγκέντρωσης αιμοπεταλίων 250.000/μικρόλιτρο. Το πλάσμα θα αποθηκεύεται σε θερμοκρασία μεταξύ 20°-24°C. Για όσο διάστημα θα φυλάσσεται το πλάσμα, θα πρέπει να αναδεύεται συχνά με ήπιες κινήσεις.

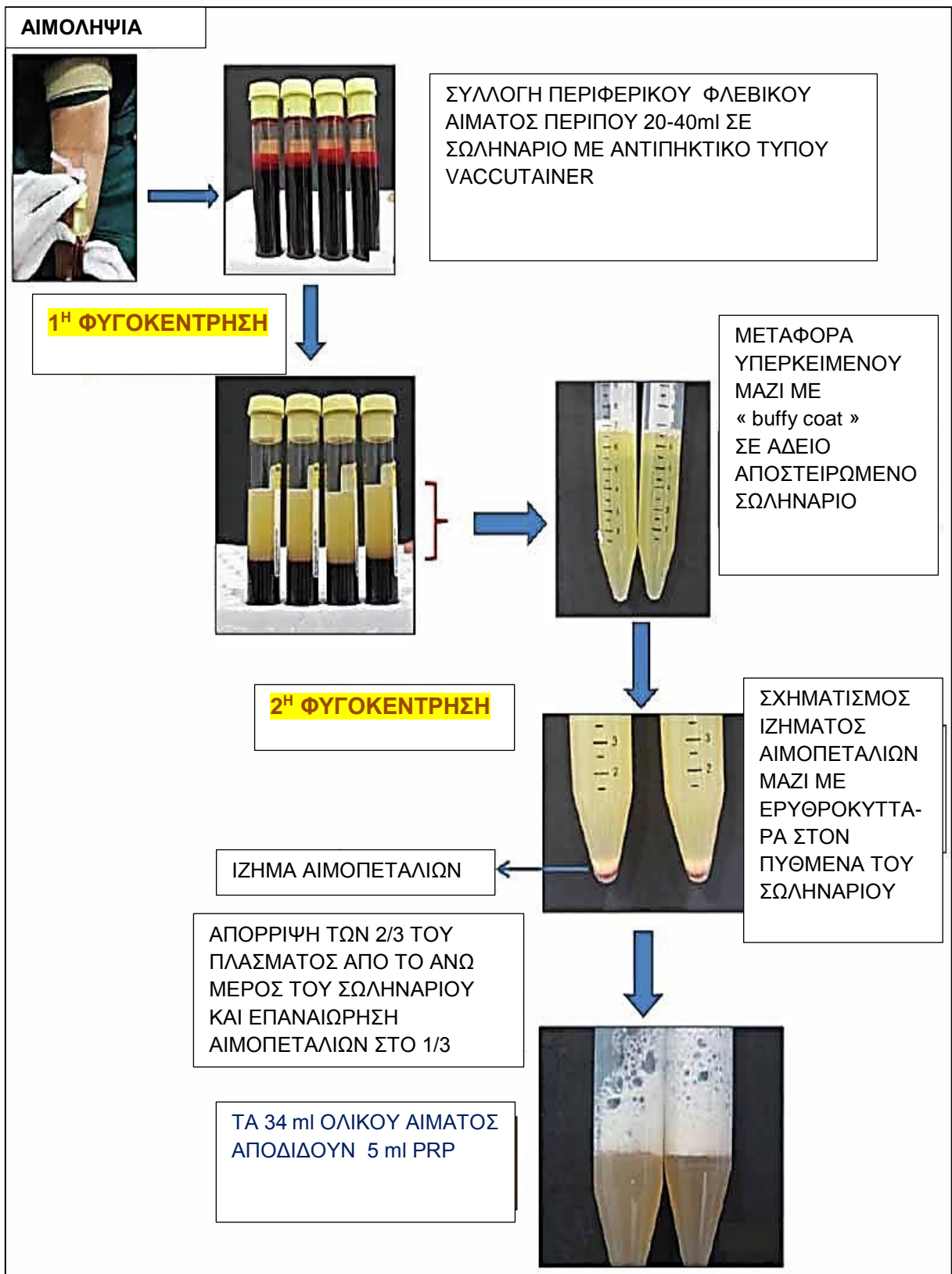
Ως τεχνική, η PRP απαιτεί μια άσηπτη, καλή και μη εργώδη φλεβική αιμοληψία από τον δότη. Τα σωληνάρια τύπου vacutainer που χρησιμοποιούνται θα πρέπει να φέρουν αντιπηκτικό ACD-A. Ο συνολικός όγκο αίματος που λαμβάνεται είναι γύρω στα 20-40 ml, όπου τέτοιοι όγκοι αποδίδουν γύρω στα 5 ml προϊόντος PRP. Η 1^η φυγοκέντρηση του αυτόλογου δείγματος γίνεται σε ειδική φυγόκεντρο για PRP, για να ξεχωρίσουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια από το ολικό αίμα. Το ολικό αίμα με την φυγοκέντρηση διαχωρίζεται σε τρεις στοιβάδες, την άνω στοιβάδα η οποία περιέχει αιμοπετάλια και λευκά αιμοσφαίρια, μια λεπτή ενδιάμεση στοιβάδα η οποία είναι γνωστή ως buffy coat και είναι πλούσια σε λευκά αιμοσφαίρια και την κάτω στοιβάδα που είναι τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Για την παρασκευή πλάσματος PRP φτωχού σε λευκά αιμοσφαίρια (P-PRP, Pure Platelet-Rich Plasma) θα ληφθεί λίγη ποσότητα από το buffy coat. Για την παρασκευή πλάσματος PRP πλούσιου σε λευκά αιμοσφαίρια (L-PRP, Leukocyte and Platelet-Rich Plasma) θα ληφθεί όλη η στοιβάδα του buffy coat μαζί με λίγα ερυθρά αιμοσφαίρια (*Εικόνα 21*).



Εικόνα 21. Α. Καθαρού PRP (Pure Platelet- Rich Plasma, P-PRP) Β. Στοιβάδα buffy coat Ερυθρά αιμοσφαίρια. Το L-PRP είναι πλάσμα PRP πλούσιο σε λευκά αιμοσφαίρια (Leukocyte and Platelet- Rich) (Ανατύπωση από: <http://alhawamedic.com/en/hair-implantations/prp-plasma-treatment/> τροποποιημένο)

Η 2^η φυγοκέντρηση διαχωρίζει τα αιμοπετάλια και τα λευκά αιμοσφαίρια από το πλάσμα. Το τελικό προϊόν που προκύπτει αποτελείται από το *pellet* των αιμοπεταλίων (*pellet*: ίζημα που προκύπτει στον πυθμένα του σωληναρίου μετά από την φυγοκέντρηση) μαζί με κάποια ερυθρά αιμοσφαίρια στο πυθμένα του σωληναρίου και από το πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (PPP, Platelet Poor Plasma). Απορρίπτεται τα 2/3 του πλάσματος PPP από το άνω μέρος του σωληναρίου και επαναιωρείται το 1/3 του πλάσματος που περιέχει αιμοπετάλια σε 1ml με συχνή και έντονη ανάδευση (Εικόνα 22) (Dhurat και Sukesh, 2014).

Τα διαθέσιμα εμπορικά kit που υπάρχουν για τα συστήματα του PRP στην αγορά διακρίνονται σε εμπορικά kit τα οποία αποδίδουν προϊόντα με χαμηλή κατά μέσο όρο συγκέντρωση αιμοπεταλίων (2-3 φορές πάνω από την φυσιολογική συγκέντρωση) και σε εμπορικά kit που αποδίδουν προϊόντα με υψηλή κατά μέσο όρο συγκέντρωση αιμοπεταλίων (5-9 φορές πάνω από τη φυσιολογική συγκέντρωση).



Εικόνα 22. Περιγραφή τεχνικής PRP με τελικό προϊόν L-PRP (Ανατύπωση από: Dhurat και Sukesh, 2014 τροποποιημένο)

Τα εμπορικά kit που αποδίδουν τις υψηλές συγκεντρώσεις είναι τα Biomet GPS II & III (αριθμός αιμοπεταλίων 3-8 x), Harvest SmartPRP 2APC+(4-6X), ArterioCyte-Medtronic Magellan (3-7x), ενώ τα εμπορικά kit που αποδίδουν προϊόντα με χαμηλές συγκεντρώσεις είναι τα Arthrex ACP (2-3x), Cascade PRP therapy (1-1.5x), PRGF by Boitech Institute Vitoria, Spain(2-3x), Regen PRP (Regen Laboratory, Mollens Switzerland) (Dhurat και Sukesh, 2014). Επίσης, τα συστήματα Curasan και Symphony II είναι σχεδιασμένα για να αποδώσουν 6ml PRP από συνολικό όγκο ολικού αίματος 45-60 ml (Liao και συν., 2014).

Το παραγόμενο προϊόν του PRP βρίσκεται αποθηκευμένο μέσα σε συντηρητικό υλικό μέχρις ότου ξεκινήσει η διαδικασία της ενεργοποίησης. Έχει βρεθεί ότι τα βιενεργά αιμοπετάλια παραμένουν με ασφάλεια σε αυτή την κατάσταση μέχρι και 8 ώρες μετά την διαδικασία της παρασκευής τους. Η ενεργοποίηση είναι μια διαδικασία αποκοκκίωσης των αιμοπεταλίων, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τα α κοκκία να συγκολληθούν πάνω στη μεμβράνη των αιμοπεταλίων και οι εκκριτικές πρωτεΐνες να γίνονται βιενεργές με την προσθήκη ιστονών και πλευρικών αλυσίδων υδατανθράκων. Ανάλογα με την μέθοδο επιλογής της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, θα προκύψει διαφορετικός αριθμός συκέντρωσης αυξητικών παραγόντων. Το παραγόμενο PRP μπορεί να ενεργοποιηθεί με εξωγενή ή με ενδογενή τρόπο. Η ανάμειξη του PRP στη φυσική του μορφή με ασβέστιο (σε μορφή χλωριούχου ασβεστίου) και με θρομβίνη προκαλεί το σχηματισμό ενός πήκτωματος PRP (Εικόνα 23). Η ενεργοποίηση του PRP με χλωριούχο ασβέστιο και θρομβίνη ρυθμίζει την έκκριση των αυξητικών παραγόντων PDGF, TGF- β , TGF- α , VEGF, bFGF και ιντερλευκίνη.

Εκτός από χλωριούχο ασβέστιο και την θρομβίνη, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η χιτοζάνη και η βατροξόβη. Η χιτοζάνη ενισχύει τη συσσωμάτωση και την προσκόλληση των α κοκκίων των αιμοπεταλίων (Salamanna και συν., 2015). Ο Marx είναι ο πρώτος που περιγράφει τον τρόπο με τον οποίο γίνεται η ενεργοποίηση του PRP με τη μέθοδο χλωριούχου ασβεστίου/θρομβίνη. Αρχικά, αναμειγνύονται 1000 μονάδες βόειας θρομβίνης σε 10 ml φυσιολογικού ορού που περιέχει 10% χλωριούχο ασβέστιο. Με μια σύριγγα των 10 ml αναρροφούνται 6 ml PRP, 1ml από το διάλυμα χλωριούχο ασβεστίου, 1ml διάλυμα θρομβίνης και 1 ml αέρας. Ακολουθεί ήπια ανάδευση για μερικά δευτερόλεπτα για να ξεκινήσει η διαδικασία της πήξης (Marx, 2001, 2004). Φυσικά, από τότε έχουν υιοθετηθεί αρκετές μέθοδοι ενεργοποίησης του PRP. Τα περισσότερα πρωτόκολλα

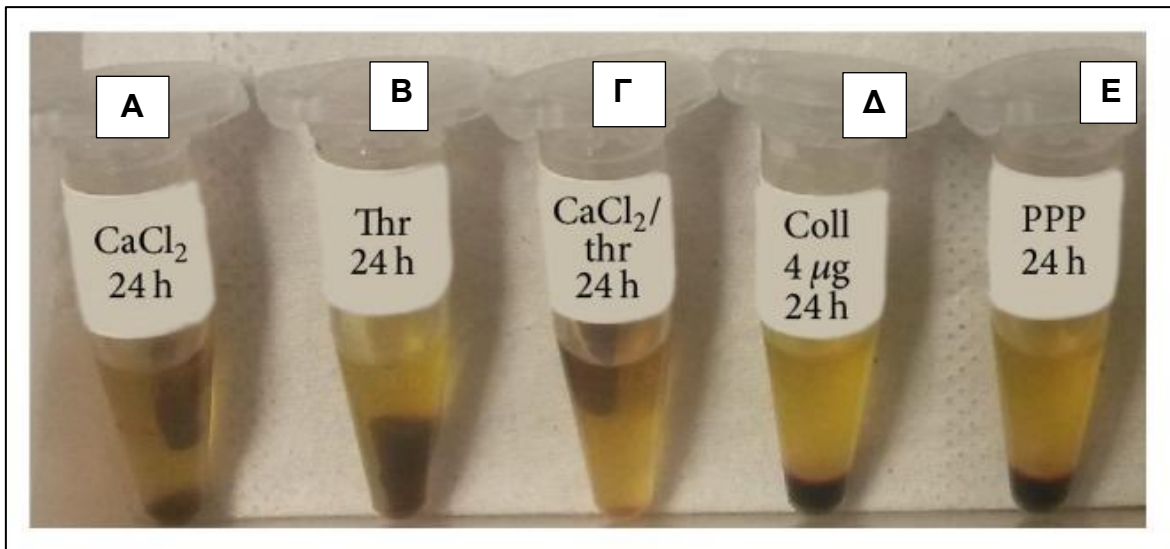
χρησιμοποιούν για την ενεργοποίηση του PRP τη μέθοδο χλωριούχου ασβεστίου /θρομβίνης, γιατί βρέθηκε ότι αποδίδουν στο μέγιστο την απελευθέρωση σε αυξητικούς παράγοντες.



Εικόνα 23. Τελικό προϊόν PRP πλούσιο σε Ινωδογόνο σε μορφή πηκτώματος (Ανατύπωση από: Saluja και συν., 2011)

Μια άλλη μέθοδος ενεργοποίησης είναι να χρησιμοποιηθεί διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου. Το χλωριούχο ασβέστιο θα επιδράσει πάνω στη προθρομβίνη που υπάρχει μέσα στο PRP και θα την μετατρέψει σε θρομβίνη. Έτσι, μαζί με την επίδραση της αυτόλογης θρομβίνης θα σχηματιστεί μια μήτρα ινώδους, θα παγιδεύσει τους αυξητικούς παράγοντες, οι οποίοι θα αρχίσουν να εκκρίνονται αργά σε διάστημα 7 ημερών. Μια άλλη μέθοδος ενεργοποίησης είναι ο κύκλος ψύξης/απόψυξης. Τα PRP φυλάσσονται μέσα σε ένα στείρο σωληνάριο και τοποθετούνται σε καταψύκτη -80°C για 24 ώρες. Στη συνέχεια, επωάζονται μέσα σε υδατόλουτρο στους 37°C για ώρα και κατόπιν φυγοκεντρώνονται στις 2000 «g» για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο στη συνέχεια διηθείται με αποστειρωμένο φίλτρο $0,22\ \mu\text{m}$ και αποθηκεύεται σε κλάσματα των 5 ml στους -80°C (Liao και συν., 2014).

Σε μελέτη που δημοσίευσαν οι Cavallo και συν. (Cavallo και συν., 2016), αναζήτησαν αποδοτικές μεθόδους για την ενεργοποίηση του PRP και κατά πόσο αυτές επηρεάζουν την απελευθέρωση σε αυξητικούς παράγοντες. Στη συγκεκριμένη μελέτη, ομάδα ελέγχου ήταν 10 υγιείς άνδρες, ηλικίας 31.4+-5.1έτη, που τηρούσαν τα κριτήρια που ορίστηκαν. Για την παρασκευή του PRP έγινε αιμοληψία 150 ml αυτόλογου φλεβικού αίματος και χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Angel (Cytomedix Inc., Gaithersburg, MD) όπου φυγοκεντρήθηκε το αυτόλογο αίμα για 25 λεπτά σε δύο διαφορετικές ταχύτητες, στις 3.500 στροφές και στις 3.000 στροφές. Σε ένα στείρο σωληνάριο απομονώθηκε το PRP από το buffy coat, ενώ από το πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (PPP) παρασκευάστηκε αυτόλογη θρομβίνη. Μάρτυρας αναφοράς ορίσθηκε το πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (PPP). Κατά μέσο όρο, ο αριθμός των αιμοπεταλίων/μικρόλιτρο που μετρήθηκε στο περιφερικό αίμα, πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (PPP) και στο PRP ήταν 215.7+-76.3, 23.7+-13.6, 974.7+-353.2, αντίστοιχα. Για τις ανάγκες της μελέτης, το PRP ενεργοποιήθηκε ξεχωριστά με χλωριούχο ασβέστιο 10% (CaCl₂), με αυτόλογη θρομβίνη 10%, με συνδυασμό χλωριούχου ασβεστίου 10% (CaCl₂) και θρομβίνης, και με κολλαγόνο τύπου (I) 10% (σε τελική συγκέντρωση 4μg). Το κολλαγόνο τύπου (I) χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθεί, η *in situ* ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων που γίνεται στους ιστούς, όταν χρησιμοποιείται στη φυσική μορφή το PRP και να μετρηθεί ο αριθμός των αυξητικών παραγόντων που απελευθερώνονται. Τα δείγματα επωάστηκαν για 15 λεπτά, 30 λεπτά, 1 ώρα, 2 ώρες και 24 ώρες στους 37°C. Μετά τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 2.800 στροφές για 15 λεπτά στους 20°C, όπου το υπερκείμενο στη συνέχεια φυλάχθηκε στους -80°C μέχρι την χρήση του. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι για την κάθε μέθοδο που επιλέχθηκε για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, σχηματίστηκε θρόμβος του PRP σε διαφορετικό χρόνο. Συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση με θρομβίνη και με CaCl₂/ θρομβίνη προκάλεσε τον σχηματισμό σταθερού θρόμβου ο οποίος ήταν ορατός από τα πρώτα 15 λεπτά, το CaCl₂ άρχισε να σχηματίζει θρόμβο μετά από 15 λεπτά και σταθεροποιήθηκε στα 30 λεπτά. Ενώ, η ενεργοποίηση του PRP με το κολλαγόνο δεν προκάλεσε κανένα ορατό θρόμβο σε κανένα από τους χρόνους που κρατήθηκαν (Εικόνα 24).



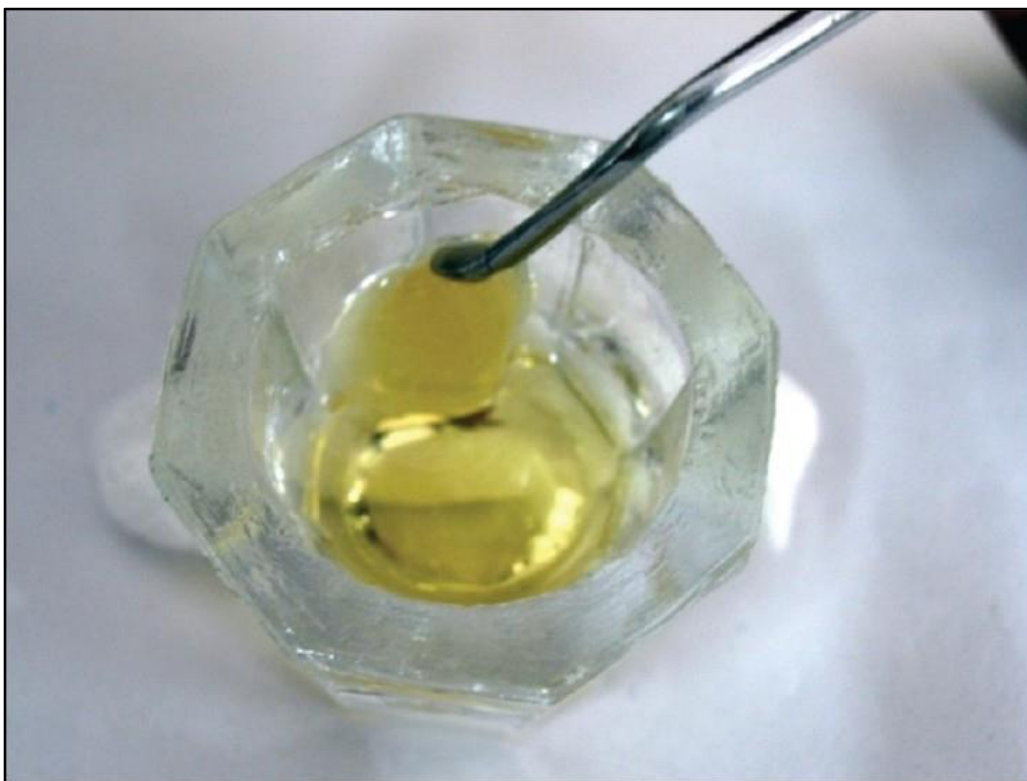
Εικόνα 24. Σχηματισμός θρόμβου PRP μετά από 24 ώρες με διαφορετική μέθοδο ενεργοποίησης. Α. Χλωριούχο ασβέστιο (CaCl_2) Β. Αυτόλογη Θρομβίνη Γ. Συνδυασμός Χλωριούχου ασβεστίου / Θρομβίνης Δ. Κολλαγόνο τύπου (I) Ε. Μάρτυρας- πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (PPP, Plasma pure platelet) (Ανατύπωση από: Cavallo και συν., 2016 τροποποιημένο)

Για κάθε χρόνο επώασης που κρατήθηκε, μετρήθηκαν οι αυξητικοί παράγοντες VEGF, TGF- β , PDGF-AB, IL- β και TNF- α με την μέθοδο sandwich της ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA. Πριν από κάθε ανάλυση, το δείγμα αποψύχθηκε στους 4°C και φυγοκεντρήθηκε. Σε αυτή την μελέτη, αξιολογήθηκαν οι αυξητικοί παράγοντες TGF- β 1, PDGF-AB και VEGF, οι οποίοι παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της επούλωσης. Παρατηρήθηκε ότι στα πρώτα 15 λεπτά, 30 λεπτά και 1 ώρα, μετά από την ενεργοποίηση με θρομβίνη και CaCl_2 / θρομβίνη ανιχνεύτηκαν πολύ υψηλά ποσοστά του αυξητικού παράγοντα PDGF σε σύγκριση με την ενεργοποίηση με CaCl_2 . Στη 1 ώρα, μετά την ενεργοποίηση το CaCl_2 και η αυτόλογη θρομβίνη παρήγαγαν ίδιες συγκεντρώσεις PDGF, όμως μεγαλύτερες από ό,τι ανιχνεύτηκαν με το 10% κολλαγόνο τύπου (I). Στις 2 ώρες, η θρομβίνη, το CaCl_2 /θρομβίνη και το CaCl_2 παρήγαγαν ίδιες συγκεντρώσεις PDGF και μεγαλύτερες από ό,τι ανιχνεύτηκαν από το 10% κολλαγόνο τύπου (I). Μετά από 24 ώρες, τα ποσοστά του PDGF είναι υψηλά με την μέθοδο ενεργοποίησης CaCl_2 σε σύγκριση με την θρομβίνη. Ενώ, σε αυτούς του χρόνους η ενεργοποίηση με θρομβίνη και CaCl_2 / θρομβίνη έδειξε υψηλότερη συγκέντρωση PDGF σε σύγκριση με το 10% κολλαγόνο τύπου (I). Στα πρώτα 15 λεπτά και 30 λεπτά, μετά από την ενεργοποίηση με θρομβίνη και CaCl_2 /θρομβίνη ανιχνεύτηκαν πολύ υψηλά επίπεδα

του αυξητικού παράγοντα VEGF σε σύγκριση με την μέθοδο ενεργοποίηση με CaCl₂ και 10% κολλαγόνο τύπου (I). Στη 1 ώρα, η ενεργοποίηση με CaCl₂/θρομβίνη έδειξε πολύ υψηλά επίπεδα από τον VEGF σε σύγκριση με το CaCl₂, ενώ η ενεργοποίηση με CaCl₂ και αυτόλογης θρομβίνης παράγααν ίδιες ποσότητες. Το κολλαγόνο τύπου (I) υστερούσε σε σύγκριση με τα υπόλοιπα. Στις 2 ώρες και στο πρώτο 24ώρο, το CaCl₂, η θρομβίνη και η CaCl₂/θρομβίνη παράγααν υψηλές συγκεντρώσεις VEGF, σε σύγκριση με το 10% κολλαγόνο τύπου (I). Ενώ, το CaCl₂/θρομβίνη παρουσίασε υψηλά επίπεδα από την θρομβίνη. Στα πρώτα 15 λεπτά, μετά από την ενεργοποίηση με θρομβίνη και CaCl₂/θρομβίνη ανιχνεύτηκαν υψηλά ποσοστά του αυξητικού παράγοντα TGF-β1 σε σύγκριση με την ενεργοποίηση με CaCl₂ και με το 10% κολλαγόνο τύπου (I). Μετά από 30 λεπτά, της ενεργοποίησης με θρομβίνη και CaCl₂/θρομβίνη ανιχνεύτηκαν πολύ υψηλά ποσοστά του αυξητικού παράγοντα TGF-β1 σε σύγκριση με την ενεργοποίηση με κολλαγόνο τύπου (I). Στη 1 ώρα, η θρομβίνη παράγει υψηλότερα ποσοστά TGF-β1 σε σχέση με το CaCl₂, ενώ το κολλαγόνο τύπου (I) υστερούσε σε σύγκριση με τα υπόλοιπα. Στις 2 ώρες και στο πρώτο 24 ώρο, το CaCl₂, η θρομβίνη και η CaCl₂/θρομβίνη παράγααν υψηλές συγκεντρώσεις VEGF, σε σύγκριση με το κολλαγόνο τύπου (I). Η μελέτη αυτή αποδεικνύει ότι η ενεργοποίηση του PRP επηρεάζεται από την μέθοδο που θα επιλεγεί και ανάλογα με τον χρόνο θα υπάρξει διαφορετική κινητική στη απελευθέρωση των αυξητικών παραγόντων. Το κολλαγόνο είναι ένας ασθενής ενεργοποιητής του PRP, με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις στους αυξητικούς παράγοντες TGF-β1, PDGF-AB και VEGF. Η θρομβίνη, το CaCl₂/θρομβίνη και το κολλαγόνο τύπου I, παρουσίασαν παρόμοια κινητική στην απελευθέρωση των αυξητικών παραγόντων. Η ενεργοποίηση με θρομβίνη και με κολλαγόνο προκάλεσε την άμεση απελευθέρωση των αυξητικών παραγόντων. Αντιθέτως, το CaCl₂ παρουσίασε μια σταδιακά αυξανόμενη απελευθέρωση των αυξητικών παραγόντων στους χρόνους που κρατήθηκαν. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι καμία από τις μεθόδους ενεργοποίησης που χρησιμοποιήθηκε δεν προκάλεσε την απελευθέρωση φλεγμονώδη κυττάρων από τα λευκά αιμοσφαίρια. Σε κανέναν από τους χρόνους που τήρησαν δεν ανιχνεύτηκε IL-1β και TNF-α. Η μορφή του PRP που χρησιμοποιείται μπορεί να ορίσει τα επίπεδα των αυξητικών παραγόντων. Για παράδειγμα, μπορεί το κολλαγόνο τύπου I να προκαλεί μια αργή ενεργοποίηση του PRP, να έχουν ανιχνευτεί οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις των

παραγόντων που εξετάστηκαν, στην πραγματικότητα όμως οι υψηλές συγκεντρώσεις δρουν ανασταλτικά στη κυτταρική λειτουργία των ιστών και επιπλέον προκαλούν φλεγμονώδη και ινώδη συμβάντα. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η θρομβίνη, ο συνδυασμός CaCl_2 /θρομβίνη και κολλαγόνο τύπου I παρουσίασαν ταχεία απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων με παρόμοια κινητική απελευθέρωση που παρέμεινε σταθερή έως 24 ώρες.

Το PRP μπορεί να βρίσκεται σε υγρή μορφή όπως λαμβάνεται από τα συστήματα του PRP ή να είναι σε μορφή πήκτωματος. Αυτό καθορίζεται ανάλογα με την θεραπευτική χρήση του PRP. Σε κάποιες κλινικές περιπτώσεις, το PRP επιβάλλεται να χρησιμοποιείται σε μορφή πήκτωματος, όπου το προϊόν τοποθετείται πάνω στη περιοχή ή σε συνδυασμό με μοσχεύματα (Εικόνα 25). Το πήκτωμα προκύπτει μετά από την ενεργοποίηση του προϊόντος του PRP.



Εικόνα 25. Πήκτωμα πλάσματος πλούσιο σε αιμοπετάλια (Ανατύπωση από: Vaishnavi και συν., 2011)

Η ενέσιμη μορφή του PRP αποτελεί την φυσική μορφή του. Σε αυτή τη μορφή παραλαμβάνεται το PRP από τα συστήματα, το οποίο στη συνέχεια εγχέεται μη ενεργοποιημένο μέσα στο οργανισμό. Το ενέσιμο PRP ενεργοποιείται φυσιολογικά

με την παρουσία του κολλαγόνου (Εικόνα 26). Το PRP που θεωρείται βιολογικό υλικό και είναι αποδεκτό όταν χρησιμοποιείται όπως ορίζει η πιστοποίηση 510(k) του FDA . Σε περιπτώσεις, που το PRP χρησιμοποιείται εκτός της προϋπόθεσης που ορίζει το 510(k), χαρακτηρίζεται ως 'off label'. Η ενέσιμη μορφή του PRP χαρακτηρίζεται ως 'off label', όπου για να εγκριθεί η χρήση του θα πρέπει να ελέγχθη και να εγκριθεί από τους Biologics License Applications (BLA) ή από το Premarket Approval (PMA) και να πραγματοποιηθούν κλινικές δοκιμές σε ζώα και σε ανθρώπους από το Investigational New Drug (IND) ή από το Investigational Device Exemption (IDE) του οργανισμού FDA.



Εικόνα 26. Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP) σε ενέσιμη μορφή. Έγχυση PRP σε επιγονατίδα με τη καθοδήγηση υπερήχου (Ανατύπωση από: Ferrero και συν., 2012)

Το FDA αναφέρει ότι οι κλινικοί γιατροί μπορούν να χρησιμοποιούν το PRP που έχει χαρακτηριστεί ως 'off label', εφόσον πληρούνται κάποιες προϋποθέσεις. Θα πρέπει η χρήση του να είναι για ιατρική πράξη, να χορηγείται σε υγιή άτομα και να διατηρείται ένα αρχείο σχετικά με τη χρήση του και τα κλινικά αποτελέσματα. Αντίθετα για τους κλινικούς γιατρούς που θα χρησιμοποιήσουν το PRP για ερευνητικό σκοπό απαιτείται έγκριση από το Investigational New Drug (IND) ή το Investigational Device Exemption (IDE) του οργανισμού FDA. Το 1997, ο

οργανισμός του FDA εξέδωσε την οδηγία 21CFR1271 (Τίτλος 12, Μέρος 1271 του Κώδικα Ομοσπονδιακών Κανονισμών) και αφορά τον κίνδυνο για την διαχείριση των ανθρώπινων κυττάρων και προϊόντων κυτταρικών ιστών (HCT/Ps), τα οποία προορίζονται για εμφύτευση, μεταμόσχευση, έγχυση και μεταφορά σε ανθρώπινο λήπτη. Ταξινόμησε τα προϊόντα HCT/Ps σε δύο κατηγορίες, η μία κατηγορία αναφέρεται σε προϊόντα χαμηλής επικινδυνότητας και η δεύτερη κατηγορία αναφέρεται σε προϊόντα υψηλής επικινδυνότητας. Τα προϊόντα χαμηλής επικινδυνότητας είναι προϊόντα που έχουν υποστεί την λιγότερη επεξεργασία, είναι για αυτόλογη χρήση και δε προορίζονται να συνδυαστούν με άλλα προϊόντα, εκτός από ρυθμιστικά διαλύματα είτε αυτόλογα διαλύματα για συντήρηση. Τα προϊόντα που δε πληρούν τις παραπάνω προϋποθέσεις, χαρακτηρίζονται ως προϊόντα υψηλής επικινδυνότητας. Ο οργανισμός του FDA το 2005 εξέδωσε νέες οδηγίες σχετικά με την επεξεργασία του HCT/Ps. Αναφέρει ότι, οποιαδήποτε διαδικασία επεξεργασίας χρησιμοποιηθεί στην οποία τα ανθρώπινα κύτταρα θα προορίζονται για κλινική χρήση υπόκειται σε επιτήρηση. Ανεξάρτητα αν τα κύτταρα ή ο ιστός είναι περισσότερο ή λιγότερο από την ελάχιστη επεξεργασία που μπορούν να υποστούν. Όταν ο ιστός ή τα ανθρώπινα κύτταρα υποστούν τροποποίηση περισσότερη από την ελάχιστη επεξεργασία, τότε αντιμετωπίζονται ως « φάρμακο» και απαιτείται έγκριση με βάση τους ισχύοντες κανονισμούς. Ο οργανισμός του FDA ξεκαθαρίζει ότι ο κώδικας 21CFR1271 αναφέρεται σε προϊόντα του PRP που βρίσκονται στη φυσική τους μορφή και δε είναι ενεργοποιημένα προϊόντα. Το ενεργοποιημένο PRP δε υπάγεται στο κώδικα 21CFR1271, γιατί όταν γίνει η ενεργοποίηση του PRP με χλωριούχο ασβέστιο ή αυτόλογη θρομβίνη ή με συνδυασμό χλωριούχου ασβεστίου/θρομβίνη, τότε υπάρχει μια διακύμανση στην απελευθέρωση των αυξητικών παραγόντων από τα αιμοπετάλια και διαφορετική κινητική δραστηριότητα. Ο οργανισμός FDA θεωρεί ότι το προϊόν έχει υποστεί περισσότερη επεξεργασία από την ελάχιστη επεξεργασία που μπορεί να γίνει (Beitzel και συν., 2015).

Οι Megalon και συν. (Megalon και συν., 2016), με βάση τα κλασσικά πρότυπα που χρησιμοποιούνται στο τομέα της κυτταροθεραπείας, πρότειναν την ταξινόμηση *DEPA* για να δοθεί ένας χαρακτηρισμός του ενέσιμου παρασκευάσματος του PRP που χρησιμοποιείται ως θεραπευτικό προϊόν. Η ταξινόμηση *DEPA* βασίζεται σε τέσσερα διαφορετικά στοιχεία: 1)Την δόση των εγχυμένων αιμοπεταλίων, 2)Την απόδοση της παραγωγής, 3)Την καθαρότητα του

PRP (Pure PRP), 4) Την ενεργοποίηση του PRP. Η δόση των εγχυμένων αιμοπεταλίων θα πρέπει να μετρείται σε δισεκατομμύρια ή εκατομμύρια και ταξινομούνται ως εξής: α) πολύ υψηλή δόση ενέσιμων αιμοπεταλίων πάνω από 5 δισεκατομμύρια, β) υψηλή δόση ενέσιμων αιμοπεταλίων που κυμαίνεται μεταξύ 3-5 δισεκατομμυρίων, γ) μέτρια δόση ενέσιμων αιμοπεταλίων που κυμαίνεται μεταξύ 1-3 δισεκατομμυρίων και δ) χαμηλή δόση ενέσιμων αιμοπεταλίων κάτω από 1 δισεκατομμύριο. Ο ρυθμός ανάκτησης των αιμοπεταλίων αντιστοιχεί στο ποσοστό των αιμοπεταλίων που προέρχονται από το ολικό αίμα και ταξινομούνται ως εξής: α) Συσκευή υψηλής απόδοσης, αν ο ρυθμός ανάκτησης στα αιμοπετάλια είναι πάνω από το 90%, β) Συσκευή μεσαίας απόδοσης, αν ο ρυθμός ανάκτησης στα αιμοπετάλια κυμαίνεται μεταξύ από 70-90%, γ) Συσκευή χαμηλής απόδοσης, αν ο ρυθμός ανάκτησης στα αιμοπετάλια κυμαίνεται μεταξύ 30-70% και δ) Συσκευή φτωχής απόδοσης, αν ο ρυθμός ανάκτησης στα αιμοπετάλια κάτω από 30%. Η καθαρότητα του PRP (Pure PRP) ταξινομείται ως εξής: α) Πολύ καθαρό PRP, αν το ποσοστό των αιμοπεταλίων στο PRP σε σύγκριση με τα λευκά αιμοσφαίρια και ερυθρά αιμοσφαίρια είναι πάνω από το 90%, β) Καθαρό PRP, αν το ποσοστό των αιμοπεταλίων στο PRP σε σύγκριση με τα λευκά αιμοσφαίρια και ερυθρά αιμοσφαίρια κυμαίνεται μεταξύ 70-90%, γ) Ετερογενής PRP, αν το ποσοστό των αιμοπεταλίων στο PRP σε σύγκριση με τα λευκά αιμοσφαίρια και ερυθρά αιμοσφαίρια κυμαίνεται μεταξύ 30-70% και δ) Ολικό αίμα PRP, αν το ποσοστό των αιμοπεταλίων στο PRP σε σύγκριση με τα λευκά αιμοσφαίρια και ερυθρά αιμοσφαίρια είναι κάτω από το 30%. Η ενεργοποίηση του PRP είναι καθαρά επιλογή του κλινικού που θα επιλέξει με ποιο τρόπο θα ενεργοποιήσει το PRP ανάλογα με την θεραπευτική του χρήση. Η ενεργοποίηση με χλωριούχο ασβέστιο προκαλεί την απελευθέρωση των αυξητικών παραγόντων στη υγρή του μορφή ενώ, για να σχηματιστεί το πήκτωμα PRP η ενεργοποίηση γίνεται με συνδυασμό χλωριούχου ασβεστίου/θρομβίνη. Οι ερευνητές αξιολόγησαν 20 διαφορετικές μελέτες, όπου με βάση την ταξινόμηση *DEPA* κατέληξαν σε τρία συμπεράσματα, α) η δόση των εγχυμένων αιμοπεταλίων ανάλογα με τη συσκευή που χρησιμοποιείται κυμαίνεται μεταξύ 0.21 έως 5.43 δισεκατομμυρίων, β) κανένα σύστημα του PRP δε αποδίδει το 90% και γ) ορισμένα συστήματα παρέχουν στο PRP περισσότερα ερυθρά αιμοσφαίρια από αιμοπετάλια.

B.17. Προφίλ ασφαλείας και πιθανοί κίνδυνοι του πλάσματος πλούσιο σε αιμοπετάλια

Το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP) προέρχεται από αυτόλογο αίμα. Αυτό σημαίνει ότι δεν υπάρχει ο κίνδυνος μετάδοσης κάποιας μολυσματικής ασθένειας. Επίσης, το γεγονός ότι πρόκειται για αυτόλογο αίμα δεν προκαλεί αλλεργικές αντιδράσεις ούτε και ευαισθητοποίηση. Το μόνο που μπορεί να παρουσιαστεί σε μερικές περιπτώσεις, είναι εμφάνιση τοπικής φλεγμονώδους αντίδρασης στο σημείο όπου θα γίνει η ένεση.

Στα άτομα που πρόκειται να υποβληθούν σε θεραπεία με PRP, θα πρέπει να προηγηθεί εργαστηριακός έλεγχος των αιμοπεταλίων τους. Είναι σημαντικό να εξεταστεί ο αριθμός των αιμοπεταλίων καθώς και η λειτουργικότητά τους. Ο αριθμός των αιμοπεταλίων θα πρέπει να κυμαίνεται εντός φυσιολογικών ορίων, όπως ορίζονται. Τα άτομα που παρουσιάζουν διαταραχές ή δυσλειτουργίες θα πρέπει να απορρίπτονται. Είναι εξίσου σημαντικό να διατηρούν ένα επίπεδο αιμοσφαιρίνης (Hb) πάνω από 10 g/ml. Άτομα με δυσινωδογοναιμία, ανινωδογοναιμία, υποινωδογοναιμία, εγκυμοσύνη και παρουσία νεοπλασματικής νόσου αποτελούν αντένδειξη για PRP.

Οι εκκρινόμενοι αυξητικοί παράγοντες από τα αιμοπετάλια παρά το γεγονός ότι είναι μιτογόνοι, δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι προάγουν την καρκινογένεση. Οι αυξητικοί παράγοντες προσδένονται στην εξωτερική μεμβράνη των κυττάρων-στόχων, όπου μέσω των διαμεμβρανικών υποδοχέων ενεργοποιούν πρωτεΐνες σηματοδότησης στο εσωτερικό του κυττάρου, οι οποίες με την σειρά τους προκαλούν μια αλληλουχία γεγονότων. Επομένως, οι ίδιοι οι αυξητικοί παράγοντες ποτέ δε εισδύουν μέσα στο κύτταρο είτε στο πυρήνα. Επιταχύνουν τη φυσιολογική διεργασία της επούλωσης, χωρίς να είναι καρκινογόνοι.

Η χρήση της βόειας θρομβίνης για την ενεργοποίηση του PRP ενέχει τον κίνδυνο ευαισθητοποίησης των δοτών και ανάπτυξης αντισωμάτων έναντι των παραγόντων V και XI και της θρομβίνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να αυξηθεί κατά πολύ ο κίνδυνος διαταραχής της πήξης.

Το PRP μετά την ενεργοποίησή του, εκτός από τους αυξητικούς παράγοντες απελευθερώνει και προθρομβωτικούς παράγοντες (π.χ. IL-1β, TF). Για το λόγο αυτό απαιτείται μεγάλη προσοχή, όταν εφαρμόζεται σε μεγάλα αγγεία σε άτομα με

αυξημένο κίνδυνο θρόμβωσης (Anitua και συν., 2004, Everts και συν., 2006, Dhillon και συν., 2012, Salamanna και συν., 2015).

Ο Marx όπως αναφέρει, το PRP δε είναι τίποτα περισσότερο από τον ίδιο φυσιολογικό θρόμβο αίματος που σχηματίζεται σε μια πληγή, με την διαφορά ότι περιέχει μεγαλύτερη συγκέντρωση αιμοπεταλίων (Marx, 2001).

**Γ. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΠΛΟΥΣΙΟ
ΣΕ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ**

Η βιολογική δράση του πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια (PRP) βασίζεται στην αυξημένη συγκέντρωση των αυξητικών παραγόντων που απελευθερώνονται από τα α-κοκκία των συμπυκνωμένων αιμοπεταλίων, καθώς και στην έκκριση πρωτεϊνών που ενισχύουν τη διαδικασία της επούλωσης σε κυτταρικό επίπεδο. Το PRP συστήνεται για κλινική εφαρμογή, για την αύξηση του ρυθμού της οστικής αναγέννησης. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί αναμεμειγμένο με διάφορα υλικά μοσχεύματος, όπως οστικό αυτομόσχευμα, αλλομόσχευμα, αλλοπλαστικά υλικά. Ο Marx και συν. (Marx και συν., 1998) πρότειναν την χρήση του ως βιολογικό για την ενίσχυση του μοσχεύματος. Το PRP θεωρείται ότι επιταχύνει την επούλωση των ιστών, ενισχύοντας την επαναγγείωση, την επανεπιθηλιοποίηση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Σήμερα, η μέθοδος του PRP χρησιμοποιείται στην αθλητική ιατρική, σε οδοντιατρικές και γναθοπροσωπικές επεμβάσεις, στην οφθαλμολογία, στην καρδιοχειρουργική και σε ορθοπεδικές επεμβάσεις. Σε αυτήν την εργασία θα γίνει αναφορά σε μελέτες και κλινική χρήση του πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια σε χρόνια μη θεραπεύσιμα δερματικά έλκη.

Γ.1. Εφαρμογή του πλάσματος πλούσιο σε αιμοπετάλια σε χρόνια μη θεραπεύσιμα δερματικά έλκη

Το δέρμα είναι το μεγαλύτερο όργανο του ανθρώπινου σώματος και καταλαμβάνει περίπου το 2 m² της μέσης επιφάνειας του σώματος. Αποτελείται από τρεις στοιβάδες, την εξωτερική επιθηλιακή στοιβάδα ή αλλιώς επιδερμίδα, την εσωτερική στοιβάδα ή αλλιώς χόριο και την υποδόριο στοιβάδα που βρίσκεται κάτω από το χόριο και περιέχει άφθονο λίπος.

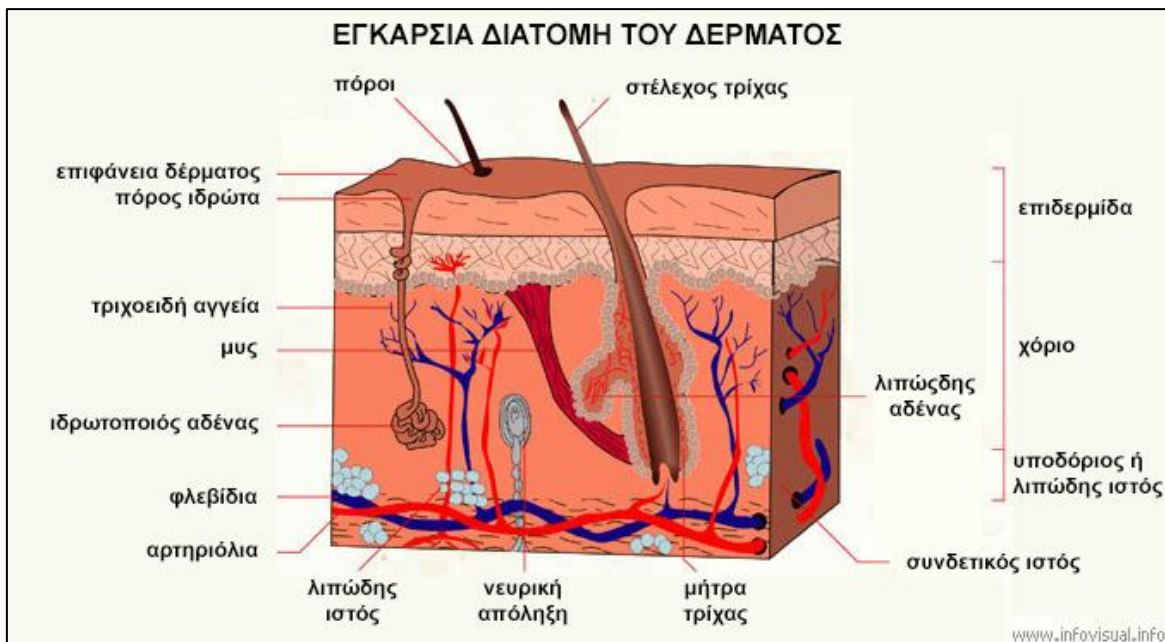
Η επιδερμίδα αποτελείται από τέσσερις στοιβάδες, τη βασική στοιβάδα, την ακανθωτή στοιβάδα, την κοκκώδη και την κεράτινη στοιβάδα. Ξεκινώντας από κάτω και προς επάνω, υπάρχει η βασική στοιβάδα της οποίας τα κύτταρα παρουσιάζουν μιτώσεις, πολλαπλασιάζονται και ανεβαίνουν προς την επιφάνεια, έτσι ώστε να σχηματίσουν την κεράτινη στοιβάδα. Η ακανθωτή στοιβάδα περιέχει πολλά κύτταρα σε συστοιχία, τα οποία καθώς ανεβαίνουν προς την επιφάνεια του δέρματος συγκροτούν την κοκκώδη στοιβάδα. Η κοκκώδης στοιβάδα περιέχει κοκκία κερατουαλίνης, η οποία αποτελεί την πρόδρομη μορφή της κερατίνης. Στη εξωτερική επιφάνεια βρίσκεται η κεράτινη στοιβάδα. Στις παλάμες και τα πέλματα

υπάρχει μια ακόμα στοιβάδα, η διαυγής στοιβάδα. Η στοιβάδα αυτή βρίσκεται ανάμεσα στη ακανθωτή και την κεράτινη στοιβάδα.

Η επιδερμίδα έχει τέσσερα είδη κυττάρων, τα επιθηλιακά κύτταρα ή αλλιώς τα κερατινοκύτταρα, τα μελανοκύτταρα, τα κύτταρα Langerhans και τα κύτταρα του Merkel. Τα κερατινοκύτταρα παρουσιάζουν την μέγιστη μιτωτική δραστηριότητα και έχουν τον κυριότερο ρόλο στη επιθηλιοποίηση του δέρματος. Η διαδικασία αυτή ξεκινάει από την βασική στοιβάδα και κινείται προς την εξωτερική μέχρι να φθάσει στην κεράτινη στοιβάδα. Τα μελανοκύτταρα βρίσκονται μεταξύ και κάτω από τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας και είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της μελανίνης. Τα κύτταρα Langerhans είναι μεσεγγυματικά κύτταρα και βρίσκονται πάνω στη βασική στοιβάδα. Τα κύτταρα του Merkel είναι άφθονα σε περιοχές με μεγάλη ευαισθησία, αφού ο βασικός ρόλος είναι η αισθητική λειτουργία του δέρματος.

Η επιδερμίδα από το χόριο χωρίζεται με μια μεμβράνη, τη βασική μεμβράνη. Η μεμβράνη αυτή αποτελείται από δύο πέταλα, το διαυγές και το πυκνό πέταλο. Το πυκνό πέταλο είναι πλούσιο σε ίνες κολλαγόνου, οι οποίες δένουν την επιδερμίδα με το χόριο.

Το χόριο ή αλλιώς κυρίως δέρμα τρέφει και υποστηρίζει όλη την επιδερμίδα. Στο χόριο υπάρχουν οι ιδρωτοποιοί αδένες, οι σμηγματογόνοι αδένες, οι θύλακες των τριχών, νεύρα και απολήξεις αυτών, καθώς και αρτηρίες και φλεβίδια (*Εικόνα 27*). Το χόριο περιέχει αυτόχθονα και ετερόχθονα κύτταρα. Τα περισσότερα από τα αυτόχθονα κύτταρα είναι ινοβλάστες, οι οποίοι συνθέτουν τρία διαφορετικά είδη ίνες τις κολλαγόνου, ελαστικές και δικτυωτές. Οι ίνες κολλαγόνου εξασφαλίζουν τη δομική στήριξη του δέρματος, ενώ η ελαστικές ίνες εξασφαλίζουν την ελαστικότητα του δέρματος. Τα ετερόχθονα κύτταρα είναι τα μαστοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα λεμφοκύτταρα.



Εικόνα 27. Εγκάρσια διατομή του δέρματος (Ανατύπωση από: <https://bioximikos.gr/topics/physiology-anatomy/100-anatomia-dermatos>)

Τα αγγεία του δέρματος που βρίσκονται στο χόριο είναι αρτηρίες, φλέβες και τριχοειδή, τα οποία δημιουργούν δύο κύρια οριζόντια πλέγματα. Υπάρχουν επίσης, λεμφαγγεία καθώς και πλήθος από αισθητικών νευρών και νευρικών απολήξεων, τα οποία εξασφαλίζουν την αίσθηση αφής, πόνου, πίεσης, αίσθηση θερμού- ψυχρού κ.λ.π..

Οι σμηγματογόνοι αδένες εκκρίνουν το σμήγμα, και μαζί με τον θύλακα της τρίχας και τον ανελκυστήρα μυ της τρίχας αποτελούν τον τριχοσμηγματογόνο θύλακα. Οι τριχοσμηγματογόνοι θύλακες βρίσκονται σε όλη την επιφάνεια του δέρματος, εκτός από τις παλάμες, τα πέλματα, την ονυχοφόρο φάλαγγα των δακτύλων και το δέρμα της πόσθης.

Ο ιδρωτοποιός αδένας είναι ένας εκκρινής αδένας, ο οποίος υπάρχει σε όλο το σώμα και σχετίζεται με την θερμορρύθμιση (Πυριόχου, 2013).

Μόλις γίνει η λύση της συνέχειας του δέρματος, τα κερατινοκύτταρα ενεργοποιούνται και αναλαμβάνουν δράση. Γίνεται μια αλληλουχία διεργασιών όπου συμμετέχουν οι αυξητικοί παράγοντες, οι χημειοκίνες και οι κυτοκίνες. Τα κερατινοκύτταρα μεταναστεύουν προς τη περιοχή του δέρματος που έχει υποστεί τη βλάβη, όπου πολλαπλασιάζονται διαφοροποιούνται και ξεκινούν την διαδικασία της επιθηλιοποίησης του δέρματος. Μια επιτυχημένη επούλωση της

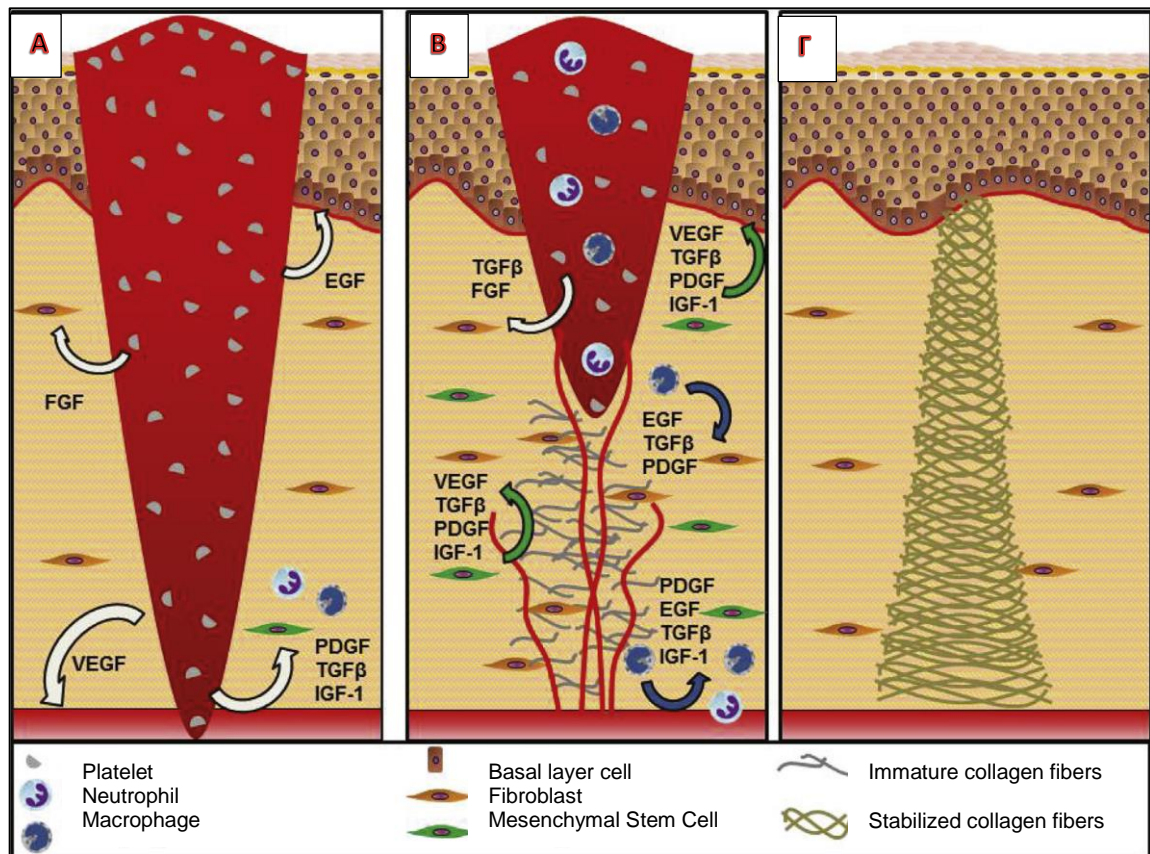
τραυματισμένης περιοχής του δέρματος είναι το αποτέλεσμα μιας επιτυχημένης επιθηλιοποίησης.

Σε φυσιολογικές συνθήκες, όταν υπάρξει ο τραυματισμός του δέρματος και προκύψει κάποια πληγή, τότε κινητοποιείται ένας ολόκληρος κυτταρικός μηχανισμός για να αποκαταστήσει την βλάβη στο σημείο του τραυματισμού. Η επούλωση των τραυμάτων είναι μια πολύπλοκη φυσιολογική διαδικασία η οποία λαμβάνει χώρα σε 3 φάσεις και συμμετέχουν διάφοροι τύποι κυττάρων, αυξητικοί παράγοντες, κυτοκίνες, συστατικά εξωκυττάριας μήτρας μεσεγχυματικών κυττάρων και πρωτεϊνάσες. Η διαδικασία της επούλωσης ενός τραύματος ξεκινάει από την φάση της αιμόστασης και της φλεγμονής, τα αιμοπετάλια που προσελκύονται στη γύρω περιοχή του τραύματος όπου εκτίθενται σε υποενδοθηλιακό κολλαγόνο και σχηματίζεται η θρομβίνη. Τα αιμοπετάλια που ενεργοποιούνται με την παρουσία της θρομβίνης, απελευθερώνουν διάφορες πρωτεΐνες, μεταξύ αυτών αυξητικούς παράγοντες και σχηματίζουν το αιμοστατικό θρόμβο. Οι αυξητικοί παράγοντες που απελευθερώνονται μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων είναι ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), ο αυξητικός παράγοντας ινσουλίνης 1 (IGF-1), ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF), ο τροποποιητικός αυξητικός παράγοντας alpha, beta (TGF-a) (TGF-b), ο ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF). Οι αυξητικοί παράγοντες βρίσκονται στο μικροπεριβάλλον των ιστών και προσελκύουν χημειοτακτικά τα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα στην περιοχή του τραύματος. Τα μονοκύτταρα με την σειρά τους διαφοροποιούνται σε μακροφάγα, τα οποία συμμετέχουν σε μια σειρά ζωτικής σημασίας διαδικασία για τη φυσιολογική επούλωση των πληγών. Η όλη αυτή διαδικασία διαρκεί 1-2 ημέρες.

Αμέσως μετά ακολουθεί η φάση του πολλαπλασιασμού, όπου χαρακτηρίζεται από τον σχηματισμό του κοκκιώδους ιστού και την έναρξη της αγγειογένεσης. Ο κοκκιώδης ιστός αποτελείται από ινοβλάστες, μακροφάγα, νέο σχηματισμένα αγγεία όπου όλα αυτά βρίσκονται πάνω σε μια χαλαρή μήτρα κολλαγόνου, υαλουρονικού οξέος και φιμπρονεκτίνης, που καταλάβουν τον χώρο στη περιοχή του τραύματος. Σε αυτή τη φάση, ο αριθμός των φλεγμονώδη κυττάρων μειώνεται και οι αυξητικοί παράγοντες PDGF και TGF-a, TGF-b που απελευθερώθηκαν από τα φλεγμονώδη κύτταρα, δρουν χημειοτακτικά προσελκύνοντας τους ινοβλάστες στη περιοχή του τραύματος. Τα μακροφάγα, τα οποία προήλθαν από την διαφοροποίηση των μονοκυττάρων στη αρχική φάση, εφοδιάζουν συνέχεια την

περιοχή με αυξητικούς παράγοντες. Μεταξύ των αυξητικών παραγόντων βρίσκεται ο αυξητικός ινοβλαστικός παράγοντας (FGF), ο οποίος επάγει την ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών, οι οποίοι θα σχηματίσουν αργότερα την εξωκυττάριο μήτρα μεσεγχυματικών κυττάρων. Η μετανάστευση και ο πολλαπλασιασμός των ινοβλαστών, παρατηρείται δύο με τρεις ημέρες μετά τον τραυματισμό. Στη συνέχεια, οι ινοβλάστες θα απελευθερώσουν κολλαγόνο και γλυκοζαμινογλυκάνες, τα οποία θα σχηματίσουν μια άμορφη γέλη πάνω στη οποία εναποτίθενται οι ίνες κολλαγόνου. Οι ίνες κολλαγόνου στη συνέχεια συσσωματώνονται. Το κολλαγόνο μαζί με την ινωδεκτίνη σχηματίζουν την εξωκυττάριο μήτρα των μεσεγχυματικών κυττάρων (ECM), η οποία είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό του κοκκιώδους ιστού. Η μήτρα των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs, Matrix metalloproteinases) εξαλείφουν τις ίνες κολλαγόνου που είναι σε περίσσεια και δε χρειάζονται για την αύξηση της δομικής ακεραιότητας του τραύματος. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες καθώς και οι αναστολείς τους προέρχονται από τους ινοβλάστες. Μαζί με τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών γίνεται και η αγγειογένεση. Με την αγγειογένεση παρατηρείται η είσοδος των θρεπτικών συστατικών των αυξητικών παραγόντων στην περιοχή του τραύματος. Οι αγγειογενετικοί αυξητικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την αγγειογένεση είναι ο ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) ο οποίος απελευθερώνεται από τα μακροφάγα ή τα κερατινοκύτταρα και ο βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (bFGF) ο οποίος απελευθερώνεται από τα μακροφάγα και τα κατεστραμμένα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Τέλος, ακολουθεί η τελική φάση της ωρίμανσης του τραύματος, που μπορεί να διαρκέσει από 3 εβδομάδες έως και 2 χρόνια μετά τον τραυματισμό. Καθώς αυξάνεται η εναπόθεση του κολλαγόνου, οι ινοβλάστες αρχίζουν να μειώνονται. Φυσιολογικά το δέρμα αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο τύπου I και κολλαγόνο τύπου II. Στη τραυματισμένη περιοχή ο κοκκιώδης ιστός έχει υψηλή περιεκτικότητα σε κολλαγόνο τύπου III, ενώ χωροταξικά οι ίνες του κολλαγόνου βρίσκονται ανοργάνωτες μέσα στο τραύμα. Καθώς προχωράει η επούλωση του τραύματος, οι ίνες κολλαγόνου τύπου III αρχίζουν να αντικαθίσταται βαθμιαία με ίνες κολλαγόνου τύπου I, οι οποίες επανατάσσονται σε μια πιο οργανωμένη δομή πλέγματος, αυξάνοντας έτσι τη μηχανική αντοχή του ιστού (*Εικόνα 28*) (Park και συν., 2017).



Εικόνα 28. Σχηματική απεικόνιση της κυτταρικής κίνησης μέσα σε μια δερματική πληγή μετά από τραυματισμό. Α. Φάση αιμόστασης- φλεγμονής Β. Φάση πολλαπλασιασμού Γ. Φάση αναδιαμόρφωσης (Ανατύπωση από: Fernandez – Moure και συν., 2017)

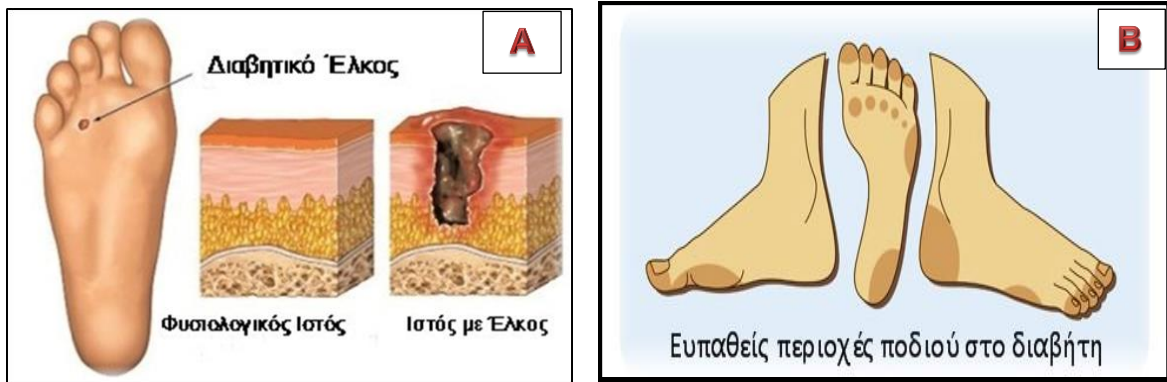
Ένας μεγάλος αριθμός από παθοφυσιολογικούς παράγοντες μπορεί να επηρεάσουν αρνητικά την φυσιολογική επούλωση ενός τραύματος. Τα χρόνια τραύματα και τα έλκη αποτελούν παθολογικές επιπλοκές της φυσιολογικής πορείας της επούλωσης των τραυμάτων. Χρόνιο τραύμα ορίζεται το τραύμα που δε μπόρεσε να επανεπιθηλιωθεί μετά από 3 μήνες. Τα χρόνια έλκη ή τα μη θεραπεύσιμα έλκη ορίζονται ως κεραυνοβόλες ή τραυματικές αλλοιώσεις, συνήθως στα κάτω άκρα, που δε ανταποκρίνονται στη αρχική θεραπεία, ή δε αλλάζει η γενική τους εικόνα ακόμα και αν λάβουν την κατάλληλη θεραπεία. Πολλές είναι οι αιτίες που μπορεί να οδηγήσουν στη εμφάνιση ενός χρόνιου έλκους, είτε να επηρεάσουν την επούλωση κάποιου οξέος τραύματος και να το μετατρέψουν σε χρόνιο έλκος. Οι αιτίες που μπορεί να μπλοκάρουν την φυσιολογική επούλωση ενός τραύματος είναι: α) Τοπικές διαταραχές, όπως η παρουσία κατεστραμμένου ή νεκρωτικού ιστού, η επιμόλυνση του έλκους, η

υποξία ιστών και το επαναλαμβανόμενο τραύμα, β) Συστηματικές ασθένειες, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η ανοσοανεπάρκεια, ο υποσιτισμός, γ) Φάρμακα, όπως τα κορτικοστεροειδή. Άλλες πιθανές αιτίες είναι τα έλκη από κατάκλιση, τα εξελκούμενα νεοπλάσματα του δέρματος και των υποκείμενων ιστών, το έλκος από φλεγμονή (μυκητιάσεις, φυματίωση, μικροβιακές λοιμώξεις), τα νευροπαθητικά ή νευροδιστροφικά έλκη (π.χ. συγγενείς βλάβες νωτιαίου μυελού, δισχιδής ράχη κλπ.). Υπάρχουν πολλοί τύποι μη θεραπεύσιμων δερματικών ελκών των κάτω άκρων. Δερματικά μη θεραπεύσιμα έλκη όπως είναι τα διαβητικά πιεστικά έλκη, τα φλεβικά έλκη, τα αρτηριακά έλκη και τα τραυματικά έλκη. Κοινά χαρακτηριστικά των χρόνιων αυτών τραυμάτων είναι οι επίμονες μολύνσεις, η φλεγμονή, η ανάπτυξη ανθεκτικότητας των μικροβίων σε φάρμακα και η απώλεια ικανότητας των δερματικών και των επιδερμικών κυττάρων να ανταποκρίνονται σε ερεθίσματα αποκατάστασης (Διδάγγελος και συν., 2006, Ευθυμίου και Μπουγουλιά, 2006, Zapata και συν., 2013, Park και συν., 2017, Suthar και συν., 2017).

Πολλές μέθοδοι έχουν προταθεί για την σταδιοποίηση των ελκών, με βάση πολλών και διαφορετικών κριτηρίων. Η πρώτη αναφορά έγινε στη μέθοδο σταδιοποίησης κατά Daniel, η οποία κατατάσσει τα έλκη σε πέντε βαθμίδες με κριτήρια την επέκταση της βλάβης σε βάθος. Ακολουθεί η κατάταξη των ελκών κατά Shea – Seiler, η οποία κατατάσσει τα έλκη σε τρία στάδια με κριτήρια την παρουσία ή απουσία φλεγμονής στο τραύμα. Συνήθως, για την σταδιοποίηση ενός έλκους χρησιμοποιούνται ο συνδυασμός των δύο αυτών μεθόδων. Από την Ευρωπαϊκή και Διεθνής Συμβουλευτική Επιτροπή Χρόνιων Ελκών χρησιμοποιείται η σταδιοποίηση κατά Shea, η οποία κατατάσσει τα έλκη σε τέσσερις βαθμίδες με κριτήρια την επέκταση της βλάβης σε βάθος. Ενώ το 2007 συστήθηκε από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή για την Αντιμετώπιση των Ελκών μια λεπτομερή σταδιοποίηση, με κριτήριο το βαθμό νοσηρότητας των ελκών. Η σταδιοποίηση αυτή της EPUAP (European Pressure Ulcer Advisory Panel) χρησιμοποιείται ευρύτατα και περιλαμβάνει τέσσερα στάδια (Διονυσίου, 2009).

Οι ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη παρουσιάζουν σε υψηλά ποσοστά έλκος στα πόδια. Η διαβητική περιφερική αισθητικοκινητική νευροπάθεια με τη μειωμένη αντίληψη της αίσθησης του πόνου και τη ανάπτυξη στο πέλμα περιοχών που δέχονται υψηλή πίεση, καθιστούν το πόδι ευάλωτο στη ανάπτυξη ελκών, ακόμα και από μικρά τραύματα. Η διαβητική μακρο- και μικροαγγειοπάθεια προκαλούν

ισχαιμία, με αποτέλεσμα να επιτείνεται το πρόβλημα. Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία είναι μια χρόνια φλεγμονώδης κατάσταση που εμφανίζουν τα διαβητικά άτομα με διαβήτη τύπου 1 και τύπου 2. Το αγγειακό ενδοθήλιο αποτελεί τον μεγαλύτερο μεταβολικό ιστό του ανθρώπου με αυτοκρινή, παρακρινή και ενδοκρινή δράση, και καλύπτει την εσωτερική επιφάνεια όλων των αγγείων του οργανισμού. Τα κύτταρα του ενδοθηλίου είναι οι ρυθμιστές της αιμόστασης. Διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στη διατήρηση της ροής του αίματος και την αποκατάσταση των αγγείων όταν αυτό υποστεί κάποια βλάβη. Διατηρεί την ισορροπία μεταξύ της πήξης και της ινωδολύσης. Ο κύριος αναστολέας του ινωδολυτικού συστήματος είναι ο αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου PAI-1, ο οποίος αυξάνει σε παθολογικές καταστάσεις που εμφανίζουν αντίσταση στη ινσουλίνη όπως στην παχυσαρκία και τον διαβήτη τύπου 2. Επίσης, τα κύτταρα του ενδοθηλίου παίζουν σπουδαίο ρόλο στη ανάπτυξη και διαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων (VSMC) καθώς στη φλεγμονή. Η δραστηριότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων προάγεται από τη τοπική παραγωγή του αυξητικού παράγοντα των αιμοπεταλίων (PDGF) και της Αγγειοτενσίνης II (Ag II) και αναστέλλεται από την παρουσία των ελεύθερων ριζών (NO) και την προστακυκλίνη. Επομένως, με αφορμή οποιασδήποτε διαταραχής στη αιμόσταση ή στη αγγειογένεση εμποδίζεται η φυσιολογική επούλωση του έλκους. Το 15% των ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη θα εμφανίσουν έλκος στο πόδι κατά τη διάρκεια της ζωής του. Ενώ, το 70-80% των περιπτώσεων αυτών θα καταλήξει σε ακρωτηριασμό του άκρου, που συναντάται συχνά σε άτομα με διαβήτη τύπου 1, δηλαδή σε ινσουλινοεξαρτώμενα άτομα. Τα πρώτα συμπτώματα ενός αρχόμενου διαβητικού ποδιού είναι τα σημάδια της αγγειοπάθειας, όπου το πόδι γίνεται στυλπνό, λείο, δείχνει πρησμένο, πολλές φορές αλλάζει χρώμα, μπορεί να γίνει σκούρο ή μελανό και φεύγουν οι τρίχες (Εικόνα 29).



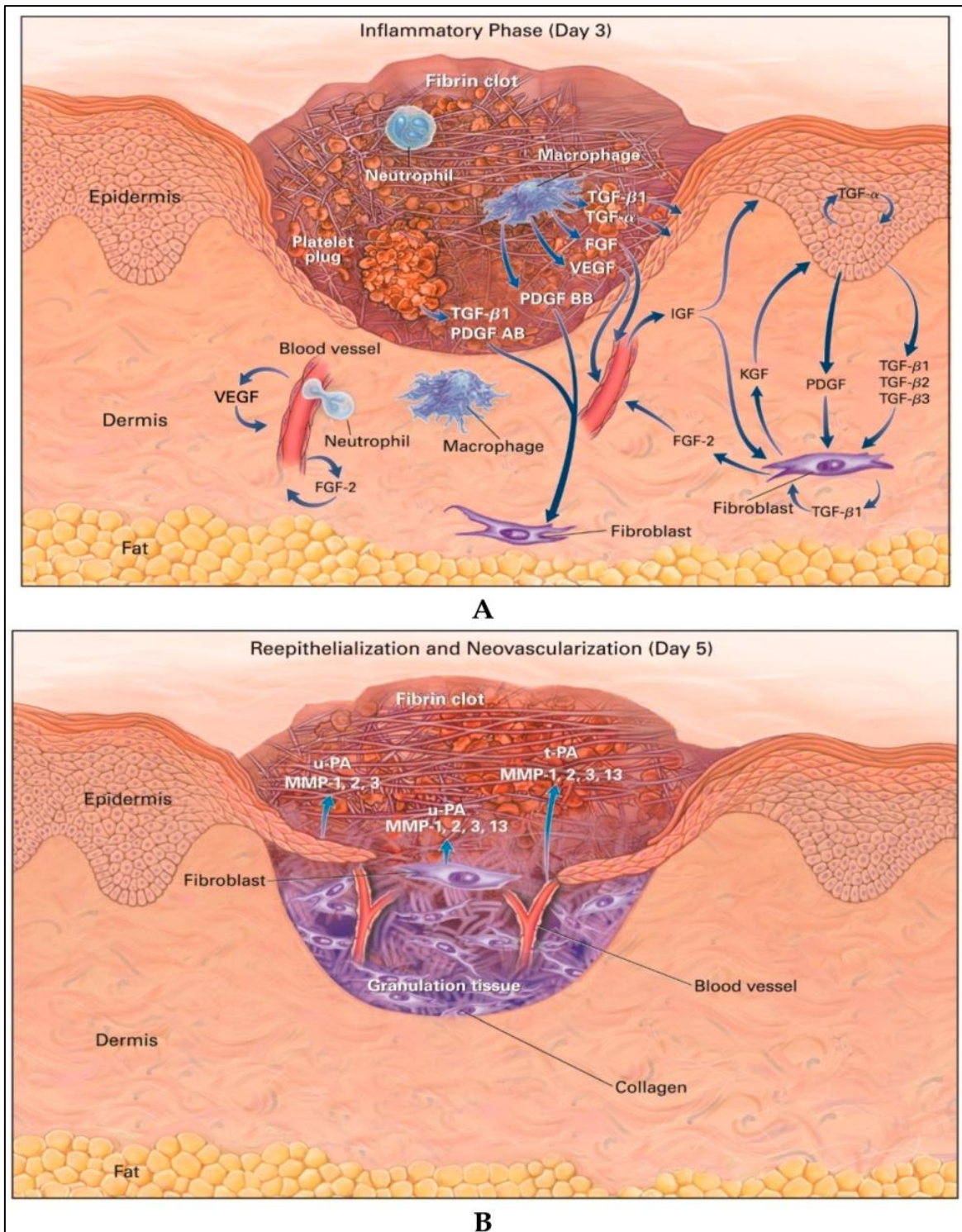
Εικόνα 29. Διαβητικό πόδι. Α. Στάδια καταστροφής φυσιολογικού ιστού από διαβητικό έλκος. Β. Ευπαθείς περιοχές του ποδιού για εμφάνιση διαβητικού έλκους (Ανατύπωση από: <http://www.elodi.org/?p=1924>)

Οι πλειονότητα των χρόνιων έλκων στα κάτω άκρα είναι αποτέλεσμα κάποιας φλεβικής ασθένειας, η οποία προκαλεί βλάβη στα τοιχώματα των αγγείων και τελικά οδηγεί σε διάσπαση του δέρματος.

Στόχος της θεραπείας του έλκους είναι να κλείσει το τραύμα όσο το δυνατόν πιο γρήγορα. Οι συμβατές θεραπείες που ακολουθούνται, είναι ο χειρουργικός καθαρισμός της περιοχής και η απομάκρυνση του νεκρού ιστού, η σωστή αναζωογόνηση, η αντιμετώπιση πιθανής λοίμωξης, η διατήρηση σε φυσιολογικά επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα, η πλήρης ανακούφιση της πίεσης για το διαβητικό πόδι και συμπίεση για το φλεβικό έλκος. Παρόλο αυτά, πολλά χρόνια έλκη δε θεραπεύονται ή δε βελτιώνεται η κλινική τους εικόνα και χαρακτηρίζονται ως χρόνια μη θεραπεύσιμα.

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, οι κυτταρικές θεραπείες όπως το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια αποτελεί μια σημαντική ανακάλυψη για την αντιμετώπιση των μη θεραπεύσιμων χρόνιων έλκων. Το αυτόλογο PRP χρησιμοποιείται όλο και πιο πολύ στη κλινική πράξη ως μέσο θεραπείας με ικανοποιητικά αποτελέσματα. Η αποτελεσματικότητά του βασίζεται στην ιδιότητα που έχει να φέρει ένα μεγάλο αριθμό από αιμοπετάλια, τα οποία θεωρούνται μια φυσική δεξαμενή από αυξητικούς παράγοντες. Οι αυξητικοί παράγοντες εμπλέκονται στη κυτταρική ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τη διαφοροποίηση. Οι αυξητικοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των φλεγμονώδη αποκρίσεων, την ενίσχυση του σχηματισμού του κοκκιώδους ιστού, καθώς και στη επαγωγή της αγγειογένεσης. Είναι απαραίτητη η παρουσία τους στο σχηματισμό της εξωκυττάριας μήτρας των μεσεγχυματικών κυττάρων και στο τελικό στάδιο της

διαδικασίας της φυσιολογικής επούλωσης. Έχει βρεθεί ότι η ανεπάρκεια σε έναν ή πολλούς αυξητικούς παράγοντες ευθύνεται για τα χρόνια τραύματα. Στα διαβητικά έλκη καταστρέφεται η φυσιολογική λειτουργία του φραγμού στο δέρμα. Παρεμποδίζεται η ομαλή λειτουργία των κυττάρων που συμμετέχουν στην επούλωση, λόγω των υψηλών επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα και των μειωμένων επιπέδων σε αυξητικούς παράγοντες και υποδοχέων αυτών. Σε χρόνια τραύματα υπάρχει μειωμένη έκφραση του αυξητικού παράγοντα PDGF, σε σύγκριση με τα οξεία χειρουργικά τραύματα. Στα χρόνια πιεστικά έλκη υπάρχει μειωμένο επίπεδο των αυξητικών παραγόντων bFGF, PDGF, EGF και TGF- α TGF- β , σε σύγκριση με τα οξεία χειρουργικά τραύματα. Ο ενεργός ρόλος των αυξητικών παραγόντων στην επούλωση των δερματικών τραυμάτων φαίνεται στη παρακάτω εικόνα (Εικόνα 30). Απεικονίζεται η ευεργετική δράση των αυξητικών παραγόντων FGF, IGF, KGF, PDGF, TGF, VEGF, MMPs, ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI) κατά την φλεγμονώδη φάση την 3^η ημέρα μετά τον τραυματισμό, αλλά και στην επανεπιθηλιοποίηση και νεοαγγειογένεση την 5^η ημέρα μετά τον τραυματισμό. Αποδεικνύεται ότι σε πιθανή ανεπάρκεια ενός ή περισσότερων αυξητικών παραγόντων, επηρεάζεται η φυσιολογική διαδικασία της επούλωσης και τα τραύματα γίνονται μη θεραπεύσιμα. Ο PDGF δρα στη πρώιμη φάση της επούλωσης προάγοντας τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών, την παραγωγή TGF- β , τη χημειοταξία και την αγγειογένεση. Ο TGF- β αποτελεί προϊόν των αιμοπεταλίων και των μακροφάγων, προάγει τη χημειοταξία, τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών, τη σύνθεση του κολλαγόνου και την αγγειογένεση. Η συμβολή VEGF είναι σημαντική στη νεοαγγειογένεση κατά την επούλωση του τραύματος. Ο EGF διεγείροντας τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων και των ινοβλαστών προάγει το σχηματισμό του κοκκιώδους ιστού και την αγγειογένεση.



Εικόνα 30. Τραυματισμένη περιοχή δέρματος. Α. Αυξητικοί παράγοντες που συμμετέχουν κατά την φλεγμονώδη φάση της επούλωσης- 3^η μέρα μετά τον τραυματισμό Β. Αυξητικοί παράγοντες που συμμετέχουν στη επανεπιθηλιοποίηση και την νεοαγγειογένεση - 5^η μέρα μετά τον τραυματισμό (Ανατύπωση από: Singer και Clark, 1999)

Το PRP ως μέσο θεραπείας βοηθά στη δημιουργία ενός βιολογικού περιβάλλοντος που είναι ευνοϊκό για την αποκατάσταση της ομοιοστασίας των ιστών. Παρέχει πολυάριθμες κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες που είναι σημαντικοί για την επισκευή των ιστών με διάφορους μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένης της ρύθμισης της φλεγμονής, της αγγειογένεσης, της σύνθεσης και της αναδιαμόρφωσης του νέου ιστού (Διδάγγελος και συν., 2006, Ευθυμίου και Μπουγουλιά, 2006, Zapata και συν., 2013, Park και συν., 2017, Suthar και συν., 2017).

Ήδη από το 1990, προτάθηκαν αυτόλογα πηκτώματα αιμοπεταλίων, για να ρυθμίσουν την επούλωση ανθεκτικών δερματικών ελκών, προάγοντας τον σχηματισμό κοκκιώδους ιστού στη πρώιμη φάση της επούλωσης. Σε αυτό το συμπέρασμα κατέληξαν, μετά από μια μελέτη που έγινε σε 23 ασθενείς με 27 δερματικά έλκη και παρουσίασαν κατά μέσο όρο σημάδια βελτίωσης 10 εβδομάδες μετά την εφαρμογή τους. Επίσης, σε μια βιβλιογραφική ανασκόπηση που έγινε από τους Margolis και συν. (Margolis και συν., 2001) σύγκριναν έρευνες από 26.599 περιστατικά, ασθενείς με νευροπαθητικά διαβητικά έλκη ποδιού, οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε θεραπεία με PRP. Όλοι οι συγγραφείς κατέληξαν στην αποτελεσματικότητα που παρουσίασε το PRP, σε σύγκριση με τις συμβατικές θεραπείες.

Έχουν προταθεί πολλές μελέτες που αναφέρουν την αποτελεσματικότητα του PRP σε δύσκολα δερματικά έλκη. Επιπλέον, σε αυτά τα περιστατικά τα αιμοπετάλια έχουν ασκήσει μια επιπλέον αντιμικροβιακή δράση, κατά ορισμένων μικροβίων του δέρματος, όπως δείχνουν κάποια κλινικά δεδομένα. Η λοίμωξη έχει μειωθεί σε αυτά τα τραύματα μετά από θεραπεία με PRP. Τα αιμοπετάλια όταν ενεργοποιηθούν, απελευθερώνουν από τα α-κοκκία αντιμικροβιακά πολυπεπτίδια (AMP) τα οποία είναι ζωτικής σημασίας για την άμυνα του οργανισμού έναντι των μικροοργανισμών. Επίσης, από τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων εκκρίνονται φλεγμονώδη κύτταρα, χημειοκίνες και κυτοκίνες.

Οι Hongshuai και Bingyun το 2013 (Hongshuai και Bingyun, 2013) στη μελέτη που έκαναν παρουσίασαν το PRP ως μια νέα εκδοχή για την αντιμετώπιση της μόλυνσης. Διαπίστωσαν ότι το PRP εμφάνισε ισχυρές αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι βακτηριδίων όπως *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus Group A*, *Neisseria gonorrhoeae*. Ο ακριβής αντιμικροβιακός μηχανισμός δράσης του PRP είναι άγνωστος και απαιτούνται περαιτέρω μελέτες. Όμως το PRP μπορεί να

θεωρηθεί ως μια εναλλακτική λύση γιατί οι μικροβιοκτόνες πρωτεΐνες των αιμοπεταλίων που βρίσκονται σε μεγάλη συγκέντρωση μέσα στο PRP έχουν χημειοτακτικές ιδιότητες για τα ανοσοκύτταρα όπως είναι τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα και τα Τ-κύτταρα, τα οποία παίζουν σπουδαίο ρόλο στη άμυνα του ανθρώπινου οργανισμού. Οι μικροβιοκτόνες πρωτεΐνες των αιμοπεταλίων είναι δύσκολο να εκδηλώσουν κάποιο βαθμό ανθεκτικότητας σε σύγκριση με τα συμβατικά αντιβιοτικά, γιατί είναι δύσκολο να μεταβληθεί η δομή στη μεμβράνη των βακτηριδίων.

Το 2017 οι D'asta και συν. (D'asta και συν., 2017) σε βιβλιογραφική ανασκόπηση, μελέτησαν τις αντιμικροβιακές ιδιότητες του L-PRP (PRP πλούσιο σε λευκά αιμοσφαίρια) και την επίδραση του στην επούλωση των τραυμάτων. Ο ρόλος των λευκοκυττάρων στην επούλωση των ιστών και στην άμυνα του οργανισμού είναι δεδομένος, όμως υπάρχουν μελέτες που είναι σε αντιπαράθεση σχετικά με τα οφέλη των λευκών σε παρασκεύασμα του PRP. Κάποιες μελέτες έχουν αποδείξει τα οφέλη από τα L-PRP στην επούλωση των τραυμάτων και τις αντιμικροβιακές ιδιότητες τους. Κάποιες μελέτες όμως αναφέρουν, ότι το L-PRP διεγείρει τη δημιουργία ενός προφλεγμονώδους περιβάλλον το οποίο μπορεί να επηρεάσει αρνητικά κύτταρα που συμμετέχουν στη αναγέννηση των ιστών. Τα παρασκευάσματα PRP με ή χωρίς λευκά αιμοσφαίρια παρουσίασαν βακτηριοστατικές ιδιότητες έναντι της πλειοψηφίας των βακτηριακών στελεχών, αλλά δε υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Τα στελέχη των βακτηρίων ανταποκρίθηκαν διαφορετικά στο PRP με ή χωρίς λευκά αιμοσφαίρια. Στη μελέτη ελέγχθηκε η αντιμικροβιακή δραστηριότητα του L-PRP έναντι βακτηρίων όπως *Staphylococcus aureus* ευαίσθητων στη μεθικιλίνη (MSSA) και ανθεκτικά (MRSA), *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria gonorrhoeae* και *Propionibacterium acnes*.

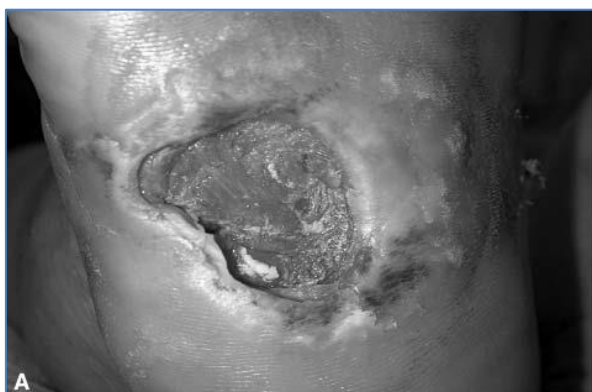
Η πρώτη κλινική μελέτη *in vivo*, έγινε το 2007 από τους Bielecki και συν. (Bielecki και συν., 2007), σε ομάδα μελέτης που ήταν 20 υγιείς εθελοντές. Αξιολόγησαν την αντιμικροβιακή δράση του PRP έναντι των πιο συχνών βακτηρίων που ευθύνονται για τις λοιμώξεις σε τραύματα και στα οστά. Μελέτησαν τα βακτήρια, *Staphylococcus aureus* MSSA, MRSA και *Escherichia coli* (βήτα λακταμάση εκτεταμένου φάσματος, ESBL) και μη-ESBL, *Klebsiella pneumoniae* (ESBL),

Enterococcus faecalis και *Pseudomonas aeruginosa*. Παρελήφθησαν υψηλές συγκεντρώσεις τόσο σε αιμοπετάλια, όσο και σε λευκά αιμοσφαίρια. Η αντιμικροβιακή δράση του L-PRP προσδιορίστηκε με τη μέθοδο διάχυσης δίσκου Kirby- Bauer. Η έρευνα έδειξε διαφορετικά αποτελέσματα για διαφορετικά στελέχη βακτηρίων, διαβάστηκε μια έντονη αντιμικροβιακή δράση έναντι των MSSA, MRSA και *Escherichia coli*, ενώ δεν εκδηλώθηκε καμία αντιμικροβιακή δράση έναντι των *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* και *Pseudomonas aeruginosa*. Μάλιστα με τον *Pseudomonas aeruginosa* παρατηρήθηκε μια μεγάλη ανάπτυξη αποικίας του βακτηρίου με την προσθήκη του L-PRP. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι δε υπάρχει συσχέτιση της αντιμικροβιακής δράσης μεταξύ του L-PRP και του PRP. Δε μπορούν να εξηγήσουν αν η αντιμικροβιακή δράση προέρχεται από τις πρωτεΐνες που εκκρίνονται από τα αιμοπετάλια ή από τα λευκά αιμοσφαίρια. Ομοίως, οι Cielsik-Bielecka και συν. (Cielsik-Bielecka και συν., 2009) ήταν οι πρώτοι που αναφέρουν την χρήση του L-PRP σε τραυματισμένο μαλακό ιστό, οι οποίοι απέδειξαν την αποτελεσματικότητα του L-PRP στην επούλωση του ιστού και απέδειξαν την αντιμικροβιακή δράση του. Όμως, δεν κατάφεραν να αποδείξουν αν η αντιμικροβιακή δράση προήλθε από τις πρωτεΐνες των αιμοπεταλίων ή από τα λευκά αιμοσφαίρια.

Στα χρόνια δερματικά έλκη, το PRP χρησιμοποιείται με την μορφή του πήκτωματος. Τις περισσότερες φορές το πήκτωμα τοποθετείται πάνω στη περιοχή του δερματικού έλκους. Όλες σχεδόν οι ερευνητές ή οι κλινικοί γιατροί που μελέτησαν την επίδραση του PRP στη επούλωση του χρόνιου έλκους κατασκεύασαν πρωτόκολλο του PRP που στηρίζεται στις βασικές αρχές της διαφορικής φυγοκέντρωσης. Διαφορές στα πρωτόκολλα εντοπίζονται στους χρόνους που κρατήθηκαν, τις στροφές που χρησιμοποίησαν καθώς και στην μέθοδο επιλογής για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων για την παρασκευή του PRP. Οι περισσότεροι ερευνητές επέλεξαν για μέθοδο ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων την μέθοδο της θρομβίνης. Τα αποτελέσματα των ερευνών δε μπορούν να τυποποιηθούν ώστε να ακολουθείτε ένα κοινό πρωτόκολλο. Και αυτό συμβαίνει γιατί η μέθοδος του PRP απαιτεί αυτόλογο αίμα από τους ασθενείς. Ένας υγιής άνθρωπος έχει διαφορετική συγκέντρωση αιμοπεταλίων, παρουσιάζει διαφορετική λειτουργία και ποιότητα των αιμοπεταλίων και διαθέτει διαφορετική συγκέντρωση των αυξητικών παραγόντων στο αίμα του. Οπότε είναι δύσκολο να τυποποιηθούν τα αποτελέσματα των ερευνών όσο αφορά τη χρήση του PRP για

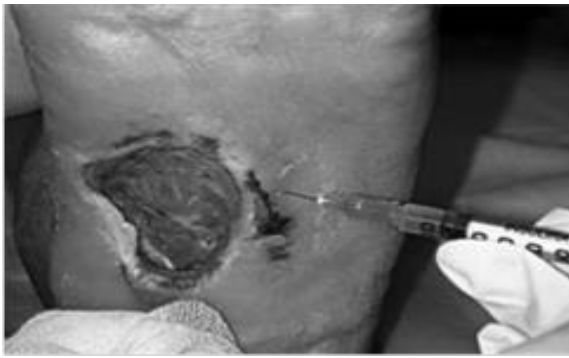
θεραπευτικούς σκοπούς, από την στιγμή ο κάθε άνθρωπος είναι μια ξεχωριστή οντότητα.

Το 2006, ο Διδάγγελος και συν. (Διδάγγελος και συν., 2006) παρουσίασαν μια εργασία όπου περιέγραψαν την κλινική περίπτωση μιας γυναίκας ηλικίας 64 ετών, η οποία έπασχε από σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Η εν λόγω γυναίκα έπασχε από διαβητική νευροπάθεια, χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, στεφανιαίο νόσο και καρδιακή ανεπάρκεια, αμφιβληστροειδοπάθεια, και είχε ένα βαθύ άτονο μη επουλούμενο έλκος πέλματος εδώ και 18 μήνες. Το έλκος ήταν και επιμολυσμένο παρά τους συνεχείς χειρουργικούς καθαρισμούς που είχε υποβληθεί (*Εικόνα 31*). Επιπλέον, η ασθενής παρουσίαζε αρθροπάθεια Charlot. Οι επιστήμονες για να αντιμετωπίσουν ένα τόσο δύσκολο περιστατικό έλκους, κάνανε χρήση τοπικών επιθεμάτων εμποτισμένων με αυξητικό παράγοντα διέγερσης σχηματισμού αποικιών των κοκκιοκυττάρων- μακροφάγων (GM-CSF, Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor) καθώς και τοπικές διηθήσεις με αυξητικό παράγοντα στα χείλη του έλκους. Αν και το περιστατικό ήταν δύσκολο, τα αποτελέσματα ήταν θεαματικά, όπως φαίνεται στις εικόνες (*Εικόνα 32*). Η θεραπεία διήρκησε ένα χρόνο, αλλά επετεύχθη μια θεαματική επούλωση του έλκους και θεραπεία της φλεγμονής, με την εφαρμογή του αυξητικού παράγοντα GM-CSF στη περιοχή του μη θεραπεύσιμου άτονου έλκους στο πέλμα ενός νευροπαθητικού διαβητικού άκρου.



Εικόνα31. Άτονο έλκος πέλματος σε διαβητική ασθενή, διαμέτρου 5 εκ. πριν ακόμα ξεκινήσει την θεραπεία με τον αυξητικό παράγοντα GM-CSF

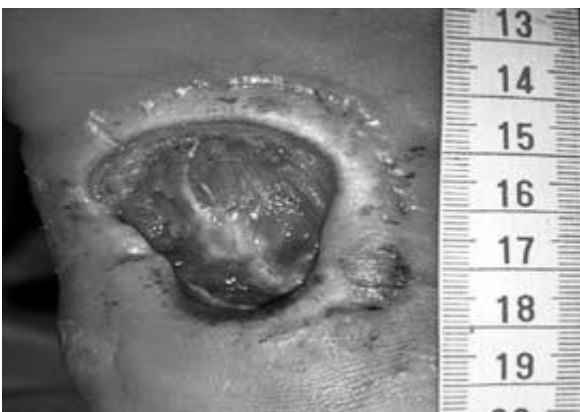
(Ανατύπωση από: Διδάγγελος και συν., 2006)



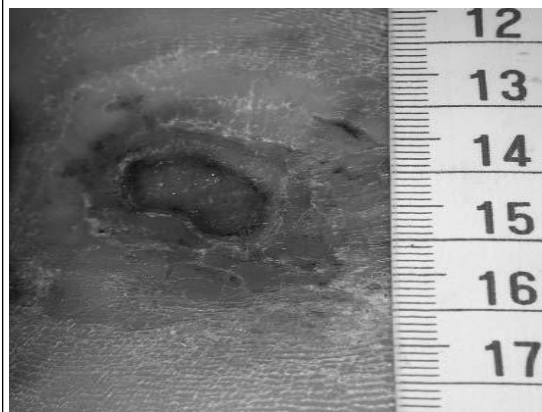
A. Έναρξη θεραπείας



B. Μια εβδομάδα μετά



Γ. Ένα μήνα μετά



Δ. 7 μήνες μετά

Ε. Μετά ένα χρόνο θεραπεία



Εικόνα 32. Σχηματική απεικόνιση θεραπευτικής πορείας του έλκους μετά από την τεχνική έγχυσης του αυξητικού παράγοντα GM-CSF στα χείλη του έλκους (Ανατύπωση από: Διδάγγελος και συν., 2006 τροποποιημένο)

Το 2010 οι Scimeca και συν. (Scimeca και συν., 2010) παρουσίασαν ένα περιστατικό ενός άνδρα ηλικίας 49 ετών, ο οποίος έπασχε από σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, υπέρταση και υπερχοληστερολαιμία. Ο άνδρας είχε από τριμήνου ένα μη θεραπεύσιμο μη ισχαιμικό νευροπαθητικό έλκος στο μεγάλο δάκτυλο του δεξιού ποδιού (*Εικόνα 33*). Το έλκος δε εμφάνιζε σημάδια φλεγμονής.



Εικόνα 33. Έλκος στο μεγάλο δάκτυλο του ποδιού χωρίς στοιχεία φλεγμονής.
(Ανατύπωση από: Scimeca και συν., 2010)

Ο ασθενής υποβλήθηκε σε χειρουργική επέμβαση αποκατάστασης. Πραγματοποιήθηκαν δυο χειρουργικές επεμβάσεις αρθροπλαστικής, η μια έγινε στη μεταταρσιοφαλαγγική άρθρωση του μεγάλου δακτύλου του ποδιού του και η δεύτερη έγινε στη εγγύς μεσοφαλαγγική άρθρωση του ποδιού του. Για να ενισχυθεί η επούλωση του έλκους, ακολούθησε θεραπεία με PRP. Τα αποτελέσματα της θεραπείας ήταν ικανοποιητικά, τέσσερις εβδομάδες μετά την επέμβαση βελτιώθηκε αρκετά η εικόνα του δακτύλου του. Έγινε πλήρης επανεπιθηλιοποίηση του τραύματος επτά εβδομάδες μετά την επέμβαση (*Εικόνα 34*). Το PRP στο συγκεκριμένο ασθενή λειτούργησε ως μέσο «θωράκισης» των ιστών και ως σύστημα «αντλίας» που περιέχει μια ποικιλία από αυξητικούς παράγοντες που δρουν μιτογονικά και χημειοτακτικά.



Εικόνα 34. Έλκος μετά από μετά από 7 εβδομάδες (Ανατύπωση από: Scimeca και συν., 2010)

Οι Akingboye και συν. (Akingboye και συν., 2010) σε βιβλιογραφική ανασκόπηση αναφέρουν ότι η κυτταρική θεραπεία μπορεί να είναι μια ιδανική λύση για τα έλκη σε διαβητικά πόδια. Η εφαρμογή κυτταρικής θεραπείας συνιστάται όταν το μέγεθος του τραύματος δεν μπορεί να μειωθεί κατά περισσότερο από 10% μέσα σε 3 εβδομάδες. Πιστεύεται ότι με το PRP επιταχύνουν τον χρόνο επούλωσης και μειώνουν τον κίνδυνο μόλυνσης στα διαβητικά έλκη. Από όλες τις διαθέσιμες μεθόδους της κυτταρικής θεραπείας κυκλοφορούν στο εμπόριο και είναι εγκεκριμένα από το FDA, το Apligraf™ και το Hyalograft-3D™ έχουν δείξει σημάδια βελτίωσης στη θεραπεία των χρόνιων διαβητικών ελκών. Η θεραπεία για τη επούλωση του έλκους μπορεί να ενισχυθεί με χρήση του PRP, όπου το προϊόν μπορεί να παραμείνει με ασφάλεια πάνω στο περιοχή του έλκους για 5-10 μέρες. Σε μελέτη που πραγματοποίησαν οι Tzeng και συν. (Tzeng και συν., 2013) αξιολόγησαν κατά πόσο είναι αποτελεσματική η χρήση αυτόλογου PRP σε συνδυασμό με μόσχευμα δέρματος, για τη θεραπεία των χρόνιων μη θεραπεύσιμων διαβητικών ελκών. Μελέτησαν περιπτώσεις οκτώ διαβητικών ατόμων ηλικίας από 25 έως 82 ετών, οι οποίοι είχαν στο σύνολο εννέα μη θεραπεύσιμα έλκη κάτω άκρων μέσου μεγέθους 50 cm², περιοχή 15-150 cm². Για την παρασκευή του PRP, αρχικά λήφθηκε από τους δότες 100 ml ολικού αίματος και χρησιμοποιήθηκε το σύστημα SEPAX system (Biosafe SA, Eysins, Switzerland). Για την ενεργοποίηση του PRP χρησιμοποιήθηκε αυτόλογη

θρομβίνη, η οποία κατασκευάστηκε από το πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (PPP) όταν ενεργοποιήθηκε με χλωριούχο ασβέστιο. Προηγήθηκε χειρουργικός καθαρισμός των ελκών και τοποθετήθηκε το πήκτωμα του PRP στη περιοχή της πληγής. Μετά, εφαρμόστηκε μόνοςχευμα δέρματος που σταθεροποιήθηκε πάνω στη περιοχή του έλκους με ράμματα ή με συρραπτικό. Από τα εννέα μόνοςχευματα που τοποθετήθηκαν συνολικά στους οκτώ ασθενείς, μόνο ένα μόνοςχευμα απορρίφθηκε. Τα υπόλοιπα μόνοςχευματα διατηρήθηκαν στη θέση τους. Ο χρόνος που χρειάστηκε για την επούλωση των ελκών ήταν από 2 έως 3 εβδομάδες. Παρατηρήθηκε μια συνεχή βελτίωση στη κλινική εικόνα των ελκών των ασθενών για ένα διάστημα από 10 έως 19 μήνες. Οι αυξητικοί παράγοντες που απελευθερώθηκαν με τη χρήση του συστήματος SEPAX και με τη μέθοδο ενεργοποίησης αυτόλογη θρομβίνης, ήταν ο PDGF-AA, ο PDGF-AB και ο PDGF-BB, ο TOP-β1, ο TOP-β2, ο VEGF και ο EGF. Όλοι αυτοί οι παράγοντες είναι σημαντικοί για την νεοαγγειογένεση με την πρόσληψη των μεσεγχυματικών κυττάρων και τη σύνθεση της εξωκυτταρικής μήτρας με αποτέλεσμα την ευνοϊκή ενσωμάτωση του μόνοςχευματος με τη περιοχή του έλκους. Τα αποτελέσματά της έρευνας υποδεικνύουν ότι ο συνδυασμός του PRP με μόνοςχευματα του δέρματος ενισχύουν την αποτελεσματικότητα στην θεραπεία των χρόνιων διαβητικών πληγών αυξάνοντας τον ρυθμό της επούλωσης και μειώνοντας το ποσοστό της υποτροπής. Μια από τις κλινικές περιπτώσεις διαβητικού ασθενή που συμμετείχε στη μελέτη αυτή, είναι μια γυναίκα ηλικίας 45 ετών με σακχαρώδη διαβήτη τα τελευταία 13 χρόνια, υπέφερε από μη επουλώσιμο διαβητικό έλκος πάνω από το δεξιό αστράγαλο. Το έλκος αποτέλεσε μη θεραπεύσιμο εγκαύματος, που είχε δημιουργηθεί μετά από 2μηνη έκθεση της γυναίκας σε υπεριώδη ραδιενεργή ακτινοβολία. Μια εβδομάδα μετά τον χειρουργικό καθαρισμό (*Εικόνα 35*), στην περιοχή του τραύματος έγινε ενδοτραυματική ένεση PRP μαζί με αυτόλογη θρομβίνη (*Εικόνα 36*). Μετά, τοποθετήθηκε μόνοςχευμα δέρματος που κάλυψε όλη την περιοχή του έλκους και σταθεροποιήθηκε με συρραπτικό (*Εικόνα 37*). Ο οργανισμός της γυναίκας δέχτηκε το μόνοςχευμα. Μετά από 12 μήνες, η περιοχή του έλκους παρατηρείται πλήρους επούλωσης σε όλη την έκταση του (*Εικόνα 38*).



Εικόνα 35. Εικόνα διαβητικού έλκους 1 εβδομάδα μετά από τον χειρουργικό καθαρισμό (Ανατύπωση από: Tzeng και συν., 2013)



Εικόνα 36. Ενδοτραυματική ένεση με PRP και θρομβίνη (Ανατύπωση από: Tzeng και συν., 2013 τροποποιημένο)



Εικόνα 37. Μόσχευμα που είναι σταθεροποιημένο με συρραπτικό στη περιοχή του τραύματος (Ανατύπωση από: Tzeng και συν., 2013)



Εικόνα 38. Μετά από 12 μήνες θεραπείας με PRP (Ανατύπωση από: Tzeng και συν., 2013)

Μια άλλη μελέτη από τους Axmed και τους συν. (Axmed και συν., 2017) ήρθε να επιβεβαιώσει την αποτελεσματικότητα του PRP όταν χρησιμοποιείται για την επούλωση χρόνιων διαβητικών ελκών. Στη μελέτη αυτή, συμμετείχαν 56 ασθενείς ηλικίας από 18 έως 80 ετών, με χρόνιο έλκος σε διαβητικό πόδι. Οι συμμετέχοντες χωρίστηκαν από τους ερευνητές σε δύο ομάδες. Η μια ομάδα που έλαβε την θεραπεία με PRP δύο φορές την εβδομάδα ονομάστηκε ομάδα μελέτης και η δεύτερη ομάδα που υποβλήθηκε σε συμβατική θεραπεία χαρακτηρίστηκε ως ομάδα ελέγχου. Το PRP που χρησιμοποιήθηκε ήταν σε μορφή πηκτώματος. Παρατηρήθηκε ότι στη ομάδα ελέγχου το 7% παρουσίασε πλήρης επούλωση των ελκών μετά από 2 εβδομάδες θεραπείας. Σε αντίθεση με την ομάδα μελέτης που παρουσίασε πλήρη επούλωση των ελκών το 29% μετά από 2 εβδομάδες θεραπείας. Τα ίδια αποτελέσματα βρέθηκαν σχεδόν και μετά από 4 εβδομάδες θεραπείας. Ενώ μέχρι το τέλος της όγδοης εβδομάδας θεραπείας παρατηρήθηκε ένα ποσοστό επιβράδυνσης στη επούλωση των ελκών. Αυτό μπορεί να συμβεί γιατί κατά την αρχική φάση οι αυξητικοί παράγοντες βρίσκονται σε υψηλή συγκέντρωση, που μετά εξαντλούνται αφού έχουν καταλάβει σχεδόν όλους τους υποδοχείς - στόχους. Μια πρόταση από τους συγγραφείς ήταν το PRP να χρησιμοποιείται μέχρι και οκτώ εβδομάδες θεραπείας και μετά η θεραπεία να συνεχίζεται με συμβατική αγωγή. Μέχρι το τέλος της 3μηνιαίας θεραπείας, το 68% των ασθενών από την ομάδα ελέγχου παρουσίασαν επούλωση του έλκους, σε αντίθεση με την ομάδα μελέτης που το ποσοστό των ασθενών που εμφάνισε επούλωση των ελκών ήταν 86%. Εξίσου σημαντική ήταν η παρατήρηση ότι η ομάδα μελέτης εμφάνισε μικρότερο ποσοστό μόλυνσης του έλκους, σε αντίθεση με την ομάδα ελέγχου. Αυτό δηλώνει ότι το πήκτωμα του PRP μπορεί να περιέχει ανοσολογικούς παράγοντες. Η χρήση του PRP ως τοπικό επίθεμα πάνω στη περιοχή του έλκους δρα ευεγερτικά στα έλκη γιατί προσφέρει όλους αυτούς τους αυξητικούς παράγοντες που είναι σε έλλειψη στα διαβητικά έλκη.

Οι Suthar και συν. (Suthar και συν., 2017) πραγματοποίησαν μια έρευνα σχετικά με την αποτελεσματικότητα του PRP σε χρόνια έλκη. Για την μελέτη τους χρησιμοποίησαν μια ομάδα από 24 ασθενείς με χρόνια έλκη. Μεταξύ των περιπτώσεων, τα έλκη που μελετήθηκαν, ήταν φλεβικά έλκη, διαβητικά έλκη και πιαστικά έλκη. Για την διεξαγωγή της έρευνας χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Res-Q™ 60 PRP, από όπου λήφθηκε 6 ml αυτόλογου PRP από τον κάθε ασθενή. Πριν ξεκινήσει η διαδικασία, προηγήθηκε χειρουργικός καθαρισμός των ελκών. Από τα

6 ml αυτόλογου PRP, τα 2-3 ml με τη χρήση με ανθρώπινης θρομβίνης σχηματίστηκε πήκτωμα PRP. Ενώ τα 3-4 ml PRP χορηγήθηκαν υποδόρια σε ενέσιμη μορφή εντός και γύρω από την περιοχή του έλκους. Η περιοχή γύρω από το έλκος καλύφτηκε με ένα μη απορροφητικό επίδεσμο. την 3η μέρα έγινε αλλαγή στον επίδεσμο για να ελεγχθεί το τραύμα για πιθανή εμφάνιση λοίμωξης. Μετά η αλλαγή του επιδέσμου γινόταν μια φορά την εβδομάδα. Η έρευνα διήρκεσε 24 εβδομάδες. Οι ασθενείς με μέσο χρόνο επούλωσης των ελκών οι $8,2 \pm 1,9$ εβδομάδες παρουσίασαν μείωση του μεγέθους του τραύματος. Ακόμα μειώθηκε σημαντικά το αίσθημα του πόνου σχεδόν σε όλους τους ασθενείς. Σε 17 (70,83%) ασθενείς παρατηρήθηκε μείωση του μεγέθους του τραύματος του κάτι περισσότερο από το 90% της επιφάνειας, ενώ 3 (12,5%) ασθενείς παρουσίασαν μείωση κατά 80-90%. Τέσσερις εβδομάδες μετά την εφαρμογή του πήκτωματος, εμφανίστηκαν μικρά νησίδα κοκκιώδους ιστού πάνω από το τραύμα και παρατηρήθηκε σημαντική ελάττωση του μεγέθους του τραύματος και αύξηση της μάζας του ιστού, σημάδια επούλωσης και βελτίωσης. Τα αποτελέσματα της μελέτης απέδειξαν την αποτελεσματικότητα του αυτόλογου PRP στη θεραπεία των χρόνιων μη θεραπευτικών ελκών. Η χρήση PRP για τη θεραπεία χρόνιων ελκών με ασφάλεια μπορεί να ενισχύσει την επούλωση. Ενδεικτικά, στην παρακάτω εικόνα (*Εικόνα 39*) φαίνεται οι περιπτώσεις τριών ασθενών με χρόνια έλκος και η πορεία της επούλωσης τους στις 11 εβδομάδες θεραπείας, 7 εβδομάδες και 8 εβδομάδες αντίστοιχα.



Εικόνα 39. Εικόνες που αποτυπώνουν την πορεία θεραπείας τριών ασθενών με PRP κατά τη διάρκεια της ολοκλήρωσης της παρακολούθησης (Ανατύπωση από: Suthar και συν., 2017)

Οι Barrientos και συν. (Barrientos και συν., 2014) σε βιβλιογραφική ανασκόπηση μελέτησαν την επίδραση των αυξητικών παραγόντων GM-CSF, PDGF, bFGF και VEGF που χορηγήθηκαν για εξωτερική χρήση σε χρόνια έλκη. Παρατήρησαν την επίδραση των παραγόντων αυτών σε πιεστικό έλκος, σε φλεβικό έλκος και σε διαβητικό έλκος. Ο αυξητικός παράγοντας διέγερσης σχηματισμού αποικιών των κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (GM-CSF) είναι μια κυτοκίνη, η οποία έχει σημαντικές βιολογικές επιδράσεις στη επούλωση του τραύματος. Το 1991 το FDA ενέκρινε το Sargramostin (Λεύκίνη) που πρόκειται για μια ενέσιμη ανασυνδυασμένη ανθρώπινη μορφή του GM-CSF (rh-GM-CSF) το οποίο προτάθηκε ως ανοσο-διεγερτικό μετά από χημειοθεραπεία και μεταμόσχευση μυελού των οστών. Η Sargramostin βρίσκεται σε υγρή ή λυοφιλοποιημένη μορφή, ενώ στο εμπόριο διατίθενται και το αντίστοιχο Molgramostin (Leucomax). Δύο μελέτες που έγιναν για την θεραπευτική επίδραση του rh- GM-CSF σε φλεβικό έλκος έδειξαν ικανοποιητικά αποτελέσματα. Το 50% των περιπτώσεων επουλώθηκε πλήρως μέχρι την όγδοη εβδομάδα θεραπείας. Ενώ όταν εφαρμόστηκε το rh- GM-CSF τοπικά, το 90% των περιστατικών εμφάνισε πλήρη επούλωση σε διάστημα 19 εβδομάδων. Στα πιεστικά έλκη τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τη χρήση του rh- GM-CSF είναι διαφορετικά. Για τα διαβητικά έλκη έχει γίνει αναφορά μόνο μιας μελέτης. Ενώ, σε εγκαύματα μερικής πάχυνσης

μετά από την τοπική εφαρμογή της υδρογέλης rh-GM-CSF υπήρξε πλήρης επούλωση εντός 28 ημερών. Ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF) είναι σημαντική η δράση του για το κάθε στάδιο της διαδικασίας της επούλωσης. Το 1997, το FDA ενέκρινε το Becserlermin (Regranex) για τη θεραπεία των διαβητικών ελκών, που εκτείνονται στο υποδόριο ιστό ή πέρα από αυτόν αλλά διατηρούν τα διαβητικά έλκη ακόμα καλή αιμάτωση. Η Becserlermin είναι ένας ανθρώπινος ανασυνδυσασμένος αυξητικός παράγοντας του PDGF (rh-PDGF-BB). Σε τυχαίοποιημένες μελέτες έχει αποδειχθεί ότι το rh-PDGF-BB επιταχύνει την επούλωση σε διαβητικά έλκη. Το Becserlermin όταν χρησιμοποιήθηκε σε νευροπαθητικά διαβητικά έλκη υπό μορφή γέλης, αύξησε το ποσοστό επούλωσης στο 32%. Ενώ μείωσε σε σημαντικό βαθμό τους ακρωτηριασμούς αυτών των άκρων. Το 2008 το FDA εξέδωσε ανακοίνωση εκφράζοντας τον κίνδυνο εμφάνισης κακοήθειας με την χρήση του Becserlermin. Η τοπική εφαρμογή του rh-PDGF σε πιεστικά έλκη προχωρημένου σταδίου (σταδίου III και IV) έδειξε σημαντική βελτίωση της επούλωσης. Η χρήση της γέλης Regranex μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια φορά την ημέρα από άτομα με πιεστικά έλκη μέχρι να επιτύχουν πλήρη επούλωση ή για 16 εβδομάδες. Ενώ, η χρήση του πηκτώματος αύξησε σημαντικά την επούλωση των πιεστικών ελκών σε ποσοστό μέχρι και πάνω από το 90% των περιπτώσεων. Η τοπική εφαρμογή του PDGF σε φλεβικά έλκη δεν παρουσίασε κανένα αξιόλογο αποτέλεσμα.

Ο βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (bFGF) έχει αποδειχθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη επούλωση των δερματικών τραυμάτων. Η ανασυνδυσασμένη μορφή του ανθρώπινου bFGF (rh-bFGF) στα πιεστικά έλκη έδειξε μια σχετική αύξηση της επούλωσης, ενώ στον ιστολογικό έλεγχο παρατηρήθηκε μεγάλη αύξηση των ινοβλαστών και των τριχοειδών αγγείων. Πάνω από το 70% των ασθενών που έλαβαν θεραπεία με rh-bFGF παρουσίασε επούλωση των πιεστικών ελκών. Σε άλλη μελέτη, που εξετάστηκαν τα μακροπρόθεσμα αποτελέσματα της χρήσης του rh-bFGF διαπιστώθηκε ότι το 84,6% των ασθενών εμφάνισε επούλωση που διατηρήθηκε και μετά τον πρώτο χρόνο θεραπείας. Η επίδραση του rh-bFGF σε διαβητικά έλκη έδειξε διαφορετικά αποτελέσματα όταν χρησιμοποιήθηκε σε έλκος στην πελματιαία επιφάνεια του ποδιού και όταν χορηγήθηκε σε ισχαιμικά διαβητικά έλκη. Ασθενείς με ισχαιμικά διαβητικά έλκη παρουσίασαν επούλωση του έλκους σε ποσοστό πάνω από το 75% μέχρι και 8 εβδομάδες θεραπείας. Ικανοποιητικά αποτελέσματα έδειξε η θεραπεία με rh-bFGF

σε εγκαύματα δευτέρου βαθμού, οι ασθενείς παρουσίασαν ταχύτατο σχηματισμό κοκκιώδους ιστού και επούλωση της επιδερμίδας μέσα σε διάστημα 9,9 ημερών. Ο αυξητικός παράγοντας των κερατινοκυττάρων (KGF) παίζει σημαντικό ρόλο στην επανεπιθηλίωση, είναι σημαντικός ο ρόλος του στη διάρκεια των μεταγενέστερων σταδίων της νεοαγγειογένεσης, είναι ισχυρά μιτογόνος για τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και ενεργοποιεί τον VEGF. Η repifermin είναι μια ανασυνδυσασμένη ανθρώπινη μορφή του KGF (rh-KGF). Η δράση της στα φλεβικά έλκη είναι διφορούμενη. Σε μια μελέτη το ποσοστό επούλωσης έφθασε στο 75%, ενώ σε μια άλλη μελέτη δε είχε αξιόλογη επούλωση. Στα πιεστικά έλκη, στα διαβητικά έλκη και σε εγκαύματα τα ποσοστά επούλωσης ήταν μικρά. Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) έχει τον πιο σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση. Σε in vivo μελέτες ο VEGF βελτίωσε την επανεπιθηλιοποίηση σε διαβητικά άκρα, ενώ σε μελέτες σε ζώα αποδείχτηκε ότι αποκαταστάθηκε η αγγειογένεση. Η ανασυνδυσασμένη ανθρώπινη μορφή του VEGF (rh-VEGF) που φέρει ένα πλασμώδιο, VEGF165, σε ενδοτραυματική ένεση σε ασθενείς με διαβητικά ισχαιμικά έλκη, βελτίωσε την εικόνα του άκρου σε σημείο που σώθηκε το άκρο από τον ακρωτηριασμό και μείωσε την αίσθηση του πόνου. Με την τοπική εφαρμογή του rh-VEGF σε νευροπαθητικά διαβητικά έλκη παρουσιάστηκε πλήρης επούλωση του έλκους σε ποσοστό 41,4% σε διάστημα 32,5 ημερών. Η θεραπεία με τοπική εφαρμογή του rh-VEGF σε φλεβικά έλκη και σε πιεστικά έλκη μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα έλκη αυτά διαθέτουν περιοχές που είναι ισχαιμικές οπότε να επηρεάσει την επούλωση τους. Όλες οι μελέτες γίνανε συγκριτικά με μια ομάδα ελέγχου. Σαφώς οι συγγραφείς τονίζουν την ανάγκη να γίνουν και άλλες μελέτες που να αποδεικνύει την αποτελεσματικότητα των αυξητικών παραγόντων σε χρόνια έλκη.

Σε μια άλλη μελέτη από τους Woo-Jin και συν. (Woo-Jin και συν., 2017) αναφέρουν ότι η τοπική χορήγηση των αυξητικών παραγόντων είναι μια πολλά υποσχόμενη θεραπεία που μπορεί να προκαλέσει επούλωση των ελκών λόγω των ιδιοτήτων τους. Υπάρχουν διάφορα παρασκευάσματα και σε διάφορες μορφές, όπως διαλύματα, πηκτώματα, κρέμες, αλοιφές, τα οποία είναι εγκεκριμένα και κυκλοφορούν στο εμπόριο. Το Regranex gel είναι ένα πήκτωμα του ανασυνδυσασμένου ανθρώπινου παράγοντα PDGF, το οποίο έχει εγκριθεί από το FDA για τοπική εφαρμογή. Ενδείκνυται η χρήση του σε διαβητικά έλκη, όταν χρησιμοποιείται συνεπικουρικά με τις συμβατικές θεραπείες. Έχει χρησιμοποιηθεί

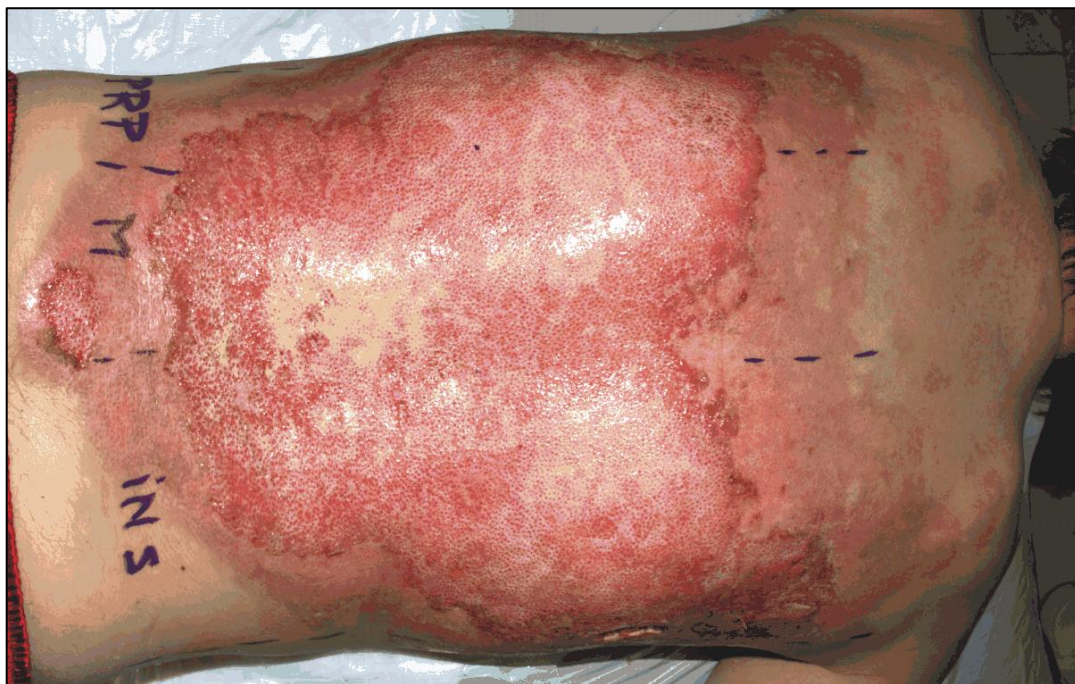
σε θεραπείες για έλκη, μόνο του είτε και σε συνδυασμό με γέλη beparlerin και παρουσίασε ικανοποιητικά αποτελέσματα. Το Spray Fiblast, είναι ένα εμπορικό προϊόν του ανασυνδυασμένου ανθρώπινου παράγοντα bFGF, το οποίο ενδείκνυται για δερματικά έλκη και έλκη από εγκαύματα. Για πρώτη φορά η χρήση του για θεραπεία σε διαβητικά έλκη εγκρίθηκε στη Ιαπωνία, σε συνδυασμό με μόσχευμα λίπους. Τα Heberprot-P, Regen-D, Easyef είναι τα διαθέσιμα εμπορικά προϊόντα του ανασυνδυασμένου ανθρώπινου παράγοντα EGF(rh-EGF). Το Heberprot-P κυκλοφορεί σε λυοφιλοποιημένη μορφή και χορηγείται σε ασθενείς με διαβητικά έλκη για την αποφυγή ακρωτηριασμού του άκρου. Χορηγείται ενδομυϊκά τρεις φορές την εβδομάδα. Το Regen-D κυκλοφορεί σε μορφή πηκτώματος, χορηγείται σε ασθενείς με διαβητικό έλκος και εφαρμόζεται τοπικά δύο φορές την εβδομάδα έως και την πλήρη επούλωση. Το Easyef είναι ένα διάλυμα σε μορφή σπρέι και χορηγείται σε ασθενείς με διαβητικά έλκη.

Οι Marck και συν. (Marck και συν., 2013) σε βιβλιογραφική ανασκόπηση αναφέρουν μελέτες που έχουν δείξει ενθαρρυντικά αποτελέσματα και αποδεικνύουν την αποτελεσματικότητα μεμονωμένων ανασυνδυασμένων αυξητικών παραγόντων σε εγκαύματα. Ένα έγκαυμα παρουσιάζει διαφορετική φυσιολογική κατάσταση σε σχέση με ένα τραύμα, έχει αυξημένη συστηματική και τοπική φλεγμονώδη ανταπόκριση, αυξημένο οίδημα, υπερπηκτικότητα καθώς και σχηματίζονται μικροί θρόμβοι. Στους εγκαυματίες μπορεί να επηρεαστεί η λειτουργικότητα και η ποιότητα των αιμοπεταλίων, επειδή σε αυτή την κατηγορία των ασθενών τα αιμοπετάλια είναι μαζικά ενεργοποιημένα. Ο αριθμός των αιμοπεταλίων μειώνεται αισθητά την 3^η ημέρα του εγκαύματος, ακολουθεί μια περίοδος έντονης παραγωγής την 15^η μέρα και επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα την 24^η μέρα. Οι εγκαυματίες μπορούν να επωφεληθούν από τα θετικές επιδράσεις του PRP για την επούλωση του τραύματος. Ένα βαθύ δερματικό έγκαυμα, θα μπορούσε να ωφεληθεί από τις αιμοστατικές ιδιότητες του PRP, που μπορεί να μειώσει την περιεγχειρητική απώλεια αίματος, καθώς και να βοηθήσει τον οργανισμό να δεχτεί το μόσχευμα και να περιορίσει την τυχόν αιμορραγία και την ένταση του πόνου. Σε μελέτες που γίνανε σε ζώα, με εγκαύματα πλήρους πάχους η θεραπεία με γέλη πλούσια σε αυξητικούς παράγοντες έδειξε σημαντική αύξηση στην αγγειακή ανάπτυξη και στον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών, αλλά δεν εμφανίστηκε ικανοποιητική επανεπιθηλίωση. Γίνεται αναφορά σε μια κλινική μελέτη, σε εγκαύματα τριβής, όπου με θεραπεία με PRP αυξήθηκε ο ρυθμός

επούλωσης. Σε μια άλλη περίπτωση, θεραπείας PRP σε συνδυασμό με πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (PPP) σε εγκαυματία με εγκαύματα στο 34% της συνολικής επιφάνειας του σώματος του, μειώθηκε ο χρόνος επούλωσης και δε εμφανίστηκαν επιπλοκές. Από την άλλη όμως οι συγγραφείς αναφέρουν ότι κάποιοι από τους αυξητικούς παράγοντες και τα λευκοκύτταρα του PRP δρουν χημειοτακτικά στη πρόσληψη φλεγμονώδη κυττάρων και μια παρατεταμένη φλεγμονή μπορεί να οδηγήσει σε υπερτροφικές ουλές. Οι αυξητικοί παράγοντες TGF, PDGF έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται σε πληγές που έχουν έντονα αναπτύξει ουλώδη ιστό. Επομένως, όταν θα εμπλουτιστεί ένα έγκαυμα με ένα μίγμα από αυξητικούς παράγοντες μπορεί να αυξήσει την πιθανότητα να σχηματιστεί ουλώδης ιστός.

Οι Teodoreanu και συν. (Teodoreanu και συν., 2014) σε βιβλιογραφική ανασκόπηση κάνουν αναφορά σε ένα θεραπευτικό πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε σε ασθενείς με σοβαρά ηλεκτρικά εγκαύματα. Ο εγκαυματίας από ρεύμα υψηλής τάσης θεωρείται στην ουσία πολυτραυματίας γιατί οι τραυματισμοί του είναι αποτέλεσμα τριών διαφορετικών διαδοχικών τραυματισμών: α) Αρχικά η ηλεκτρική ενέργεια προκαλεί άμεση βλάβη στο ιστό, β) Η ηλεκτρική ενέργεια μετατρέπεται σε θερμική ενέργεια, προκαλώντας μαζική καταστροφή και νέκρωση του ιστού και γ) Υπάρχει μηχανικός τραυματισμός, άμεσο τραύμα που προκύπτει από την βίαιη πτώση του εγκαυματία στο έδαφος. Από τις επτά σοβαρές περιπτώσεις ασθενών με σοβαρά εγκαύματα λόγω ηλεκτροπληξίας, επιλέγησαν τρεις περιπτώσεις ασθενών οι οποίοι είχαν και μηχανικούς τραυματισμούς. Τα άτομα που επιλέγησαν παρουσίαζαν πιο αργή ιστική επούλωση, παρουσίαζαν ισχαιμικές περιοχές στην εγκαυματική περιοχή με τάσεις εξέλιξης να επηρεάσει την έκταση της εγκαυματικής επιφάνειας ή το βάθος του εγκαύματος. Τα αγγεία, τα νεύρα και οι νευρικές απολήξεις ήταν εκτεθειμένα χωρίς να υπάρχει η δυνατότητα επούλωσης από τις γύρω στηρικτικές δομές. Σε αυτά τα άτομα εφαρμόστηκε θεραπεία PRP, σε διάστημα 7 ημερών. Το PRP παρασκευάστηκε σύμφωνα με τις βασικές αρχές διαφορικής φυγοκέντρωσης. Σε δύο περιπτώσεις, εφαρμόστηκε PRP απευθείας πάνω στη εγκαυματική περιοχή, ενώ σε μια περίπτωση εφαρμόστηκε ενδοτραυματική ένεση του PRP όπου χορηγήθηκε λίγη ποσότητα και σε ίσες αποστάσεις σε όλη την επιφάνεια. Ταυτόχρονα με την θεραπεία με PRP χρησιμοποιήθηκε ινσουλίνη ταχείας αποδέσμευσης στη εγκαυματική περιοχή. Αρχικά, η ινσουλίνη χρησιμοποιήθηκε απευθείας σε μεγάλη εγκαυματική περιοχή, αλλά παρουσιάστηκαν παρενέργειες

οπότε εφαρμόστηκε ενδοτραυματικά σε μικρές επιφάνειες του εγκαύματος. Η εγκαυματική περιοχή χωρίστηκε σε τρεις περιοχές, μια περιοχή όπου έλαβε θεραπεία με PRP, μια περιοχή με συμβατική θεραπεία και μια περιοχή όπου έλαβε θεραπεία με ινσουλίνη (Εικόνα 40) .

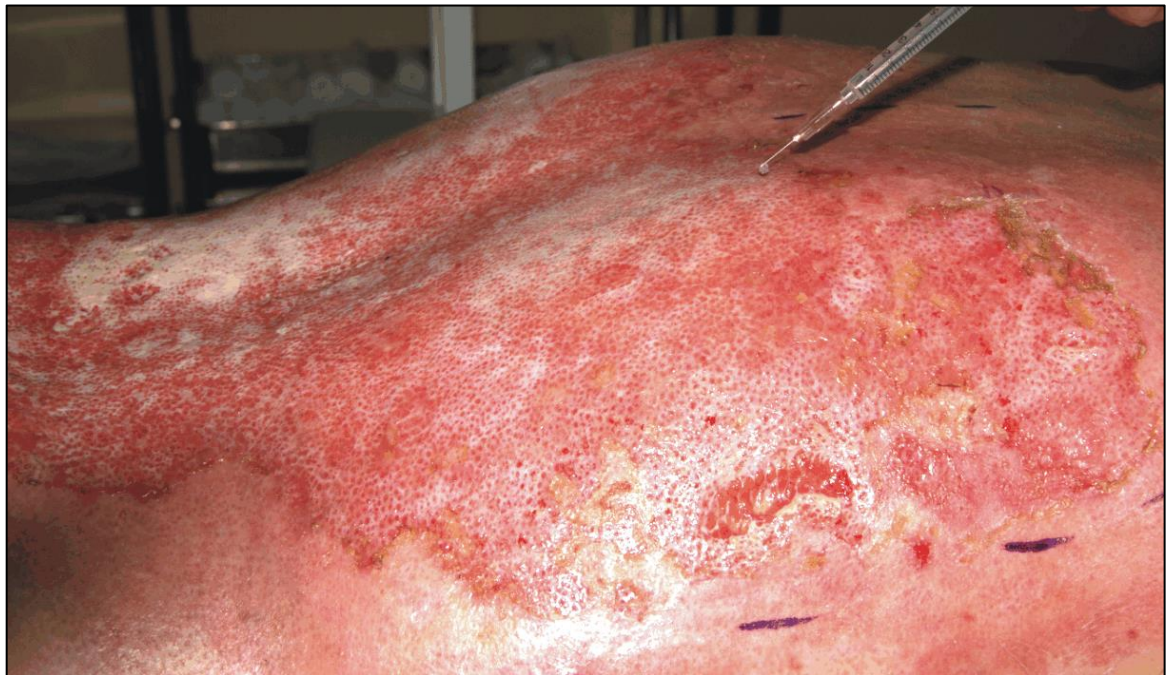


Εικόνα 40. Εγκαυματική περιοχή ασθενούς με ηλεκτρικό έγκαυμα θεραπεία χωρισμένη σε περιοχές με θεραπεία με PRP, ινσουλίνη και συμβατική θεραπεία (Ανατύπωση από: Teodoreanu και συν., 2014)

Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε ενδοτραυματική ένεση με PRP (Εικόνα 41) και με ινσουλίνη (Εικόνα 42) πάνω στη εγκαυματική περιοχή. Στη συνέχεια, προχώρησαν σε μεταμόσχευση του δέρματος όπου κάλυψαν όλη την εγκαυματική επιφάνεια που έχει λάβει θεραπεία με τρεις διαφορετικές μεθόδους. (Εικόνα 43). Από τις πρώτες 48 ώρες άρχισαν να εμφανίζονται σημάδια βελτίωσης στις περιοχές που έλαβαν θεραπεία PRP σε σύγκριση με τις περιοχές που έλαβαν συμβατική θεραπεία (Εικόνα 44). Μετά την μεταμόσχευση του δέρματος, παρατηρήθηκε αύξηση της κοκκιοποίησης στη περιοχή του εγκαύματος που έλαβε θεραπεία με PRP, σε σύγκριση με τις περιοχές που λάμβανε θεραπεία με ινσουλίνη και με συμβατές θεραπείες. (Εικόνα 45).



Εικόνα 41. Εφαρμογή PRP στην εγκαυματική επιφάνεια
(Ανατύπωση από: Teodoreanu και συν., 2014)



Εικόνα 42. Εφαρμογή ινσουλίνης πάνω στην εγκαυματική περιοχή
(Ανατύπωση από: Teodoreanu και συν., 2014)



Εικόνα 43. Ασθενής μετά από μεταμόσχευση δέρματος όπου χρησιμοποιήθηκε μόνο PRP, υπάρχει και η περιοχή ελέγχου (Ανατύπωση από: Teodoreanu και συν., 2014)



Εικόνα 44. Ασθενής 48 ώρες μετά από την μεταμόσχευση δέρματος και χρήσης PRP (Ανατύπωση από: Teodoreanu και συν., 2014)



Εικόνα 45. Αποτελέσματα χρήσης PRP, ινσουλίνης και συμβατικές μεθόδους, μετά την μεταμόσχευση δέρματος σε ασθενή με ηλεκτρικό έγκαυμα (Ανατύπωση από: Teodoreanu και συν., 2014)

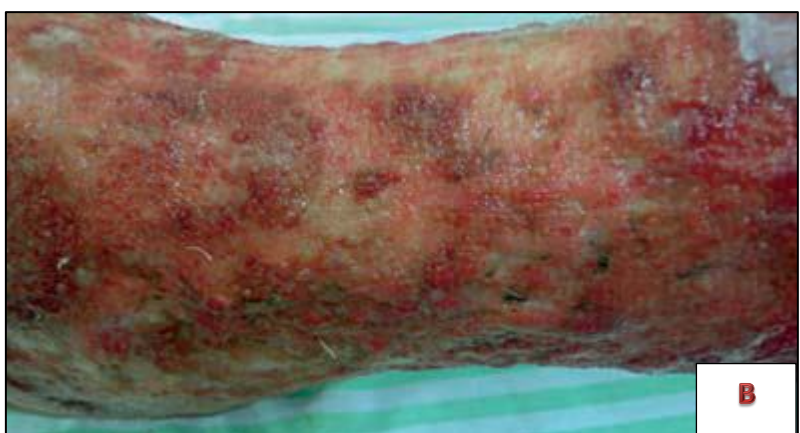
Η θεραπεία με τοπική ενδοτραυματική χρήση της ινσουλίνης στα περιστατικά εμφάνισε καλά αποτελέσματα όσον αφορά την κοκκιοποίηση και την επανεπιθηλιοποίηση του εγκαύματος. Όμως, η θεραπευτική χρήση του PRP πρόσφερε ένα καλό ποιοτικό αποτέλεσμα, σταθερό και δε παρουσιάστηκε καμία μεταγενέστερη αλλοίωση, σε σύντομο χρονικό διάστημα (Εικόνα 46). Μειώθηκε ο χρόνος νοσηλείας των ασθενών κατά μέσο όρο σε 7 ημέρες. Το PRP εφαρμόστηκε τοπικά ή ενδοτραυματικά στη εγκαυματική περιοχή.



Εικόνα 46. Ασθενής μετά την μεταμόσχευση δέρματος και θεραπείας με PRP
(Ανατύπωση από: Teodoreanu και συν., 2014)

Οι Neffa Pinto και συν. (Neffa Pinto και συν., 2014) περιέγραψαν μια κλινική περίπτωση ασθενούς που είχε ένα δερματικό έλκος στο κάτω άκρο φλεβικής αιτιολογίας επί 13 χρόνια. Η ασθενής είχε ακολουθήσει διαφορετικές θεραπείες κατά καιρούς, όπως επιδέσμους εμποτισμένους με βασικά λιπαρά οξέα (2007-2009), θεραπεία με υπερβαρικό οξυγόνο, χωρίς όμως εμφανή σημάδια βελτίωσης. Προοδευτικά υπήρξε μια αύξηση της διαμέτρου του χρόνιου έλκους. Υποβλήθηκε σε βιοψία, που έδειξε ότι υπήρχε ένα πυκνό αγγειακό δίκτυο από συνδετικό ιστό που είχε στοιχεία ινοπλασίας, καθώς και οξεία και χρόνια φλεγμονώδη διείσδυση κυττάρων κοντά στον κοκκιώδη ιστό και στην περιοχή του έλκους. Η ασθενής ξεκίνησε να ακολουθεί θεραπεία με PRP (Νοέμβριο 2012). Από την αρχή της θεραπείας παρατηρήθηκε αισθητή αύξηση του κοκκιώδους ιστού, μειώθηκε τοπικά η ίνωση που εμφάνιζε στα χείλη του έλκους, ενώ στο εσωτερικό του έλκους εμφανίστηκαν στοιχεία επανεπιθηλίωσης (*Εικόνα 47*). Για την παρασκευή του PRP χρειάστηκαν 20 ml αυτόλογου αίματος, ακολουθήθηκαν οι βασικές αρχές διαφορικής φυγοκέντρησης, όπου το PRP ενεργοποιήθηκε με χλωριούχο ασβέστιο για να πάρει την τελική μορφή του πηκτώματος. Σε μεγάλα και επώδυνα δερματικά

έλκη είναι προτιμότερο να χρησιμοποιείται το PRP σε μορφή πηκτώματος, παρά στη φυσική του μορφή.



Εικόνα 47. Ασθενής με χρόνιο έλκος κάτω άκρου

A. Κλινική εικόνα του έλκους Ιούνιο 2011

B. Κλινική εικόνα του έλκους μετά από την θεραπεία PRP Μάιος 2013

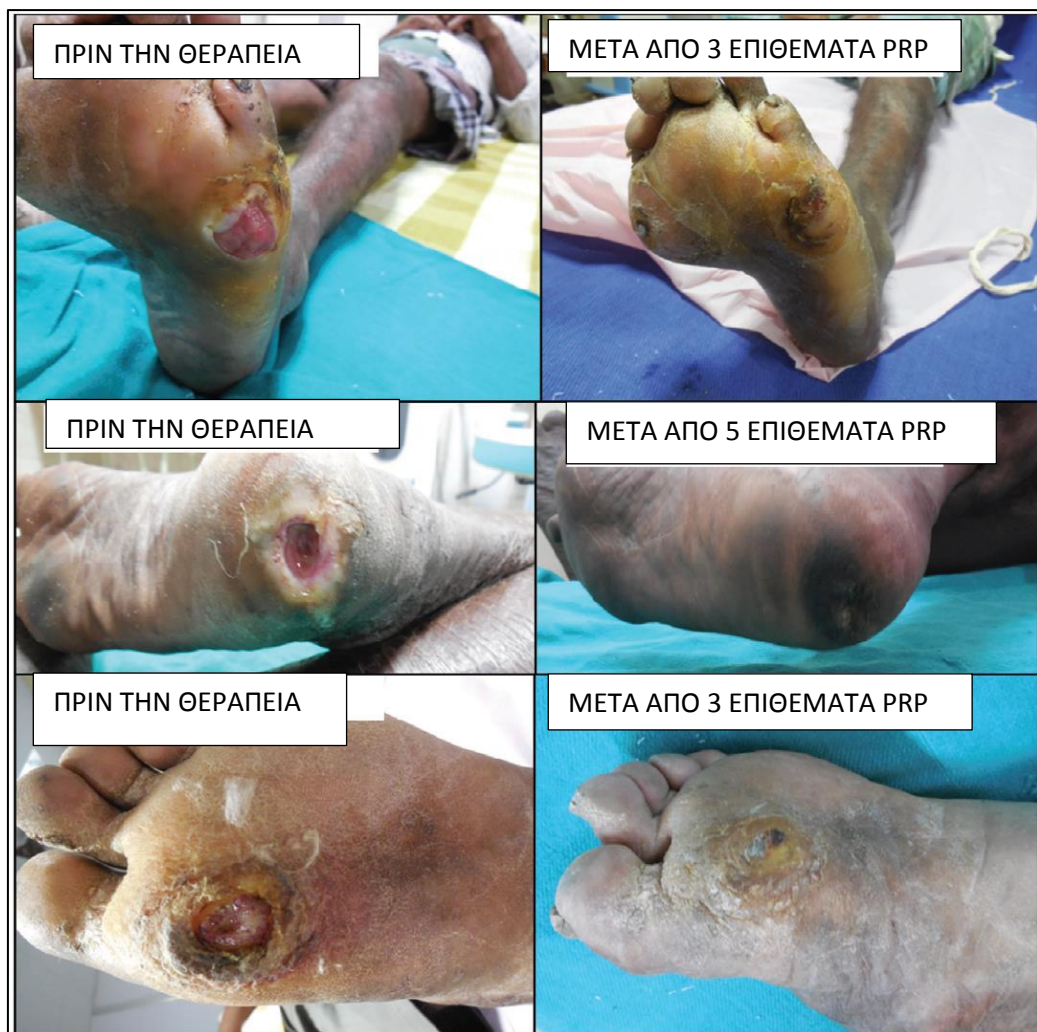
(Ανατύπωση από: Neffa Pinto και συν., 2014)

Οι Zarata και συν. (Zarata και συν., 2016) σε βιβλιογραφική έρευνα τυποποίησαν μια νέα κλινική μελέτη, η οποία αποτέλεσε από 10 τυχαίες κλινικές μελέτες, που συμμετείχαν συνολικά 442 άτομα, από τους οποίους το 42% ήταν γυναίκες. Ο μέσος αριθμός συμμετεχόντων στις κλινικές μελέτες ήταν 29 άτομα. Τέσσερις κλινικές μελέτες αφορούν γενικά τα χρόνια έλκη, τρεις κλινικές μελέτες αφορούσαν τα φλεβικά δερματικά έλκη και τρεις κλινικές μελέτες αφορούσαν τα διαβητικά έλκη. Ο μέσος χρόνος θεραπείας ήταν οι 12 εβδομάδες. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η θεραπεία με αυτόλογο PRP δε είναι τόσο ξεκάθαρη όσον αφορά τη χρήση του για την επούλωση των χρόνιων έλκων, σε σύγκριση με τις συμβατές θεραπείες. Αναφέρουν ότι, ο βαθμός της επούλωσης επηρεάζεται από την αιτία του χρόνιου έλκους. Σε χρόνια έλκη υπάρχουν ενδείξεις ότι η θεραπεία με PRP ενισχύει την ιστική τους επούλωση. Όμως, σε ένα έλκος που η αιτία του είναι ο διαβήτης ή στα φλεβικά έλκη τα αποτελέσματα των μελετών είναι διφορούμενα. Γενικά, σε ασθενείς με διαβήτη ή με φλεβικό έλκος το κυκλοφορικό τους σύστημα είναι πολύ κακής ποιότητας, χαμηλής αντίδρασης, γεγονός που επηρεάζει τη

θεραπεία με PRP. Οι κλινικές μελέτες έδειξαν ότι το PRP μπορεί να ενισχύσει την επούλωση των διαβητικών ελκών, αλλά τα φλεβικά έλκη δεν παρουσιάζουν ενδιαφέρουσα μεταβολή. Τρεις μελέτες ανέφεραν επιπλοκές των τραυμάτων όπως λοίμωξη ή δερματίτιδα μετά από θεραπεία με PRP, ενώ αποτελέσματα άλλων ερευνών δεν έδειξαν διαφορά στο ποσοστό εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών σε άτομα που έλαβαν PRP και σε άτομα που έλαβαν πρότυπη θεραπεία. Οι συγγραφείς καταλήγουν ότι δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι η θεραπεία με PRP μπορεί να μειώσει το ποσοστό εμφάνισης ανεπιθύμητων παρενεργειών.

Οι Anandan και συν. (Anandan και συν., 2016) στη μελέτη που πραγματοποίησαν απέδειξαν την επίδραση του PRP στη θεραπεία σε χρόνια τροφικά έλκη σε άτομα με τη νόσο Hansen's. Στη λέπρα, τα έλκη των νευροπαθητικών ή των τροφικών ελκών οφείλονται σε έσω διάσπαση του ιστού ή σε εγγενή μυϊκή παράλυση, ή ακόμα και μετά από κάποιο εξωτερικό τραυματισμό. Στη μελέτη συμμετείχαν 50 ασθενείς με τη νόσο του Hansen's που εμφάνιζαν τροφικό έλκος. Από τους συμμετέχοντες οι 33 ήταν άνδρες και οι 17 γυναίκες, με μέση ηλικία τα 41,9% έτη. Σε ασθενείς με λέπρα η θεραπεία με PRP για την επούλωση έδειξε ότι δεν επηρεάστηκε από το γεγονός ότι: α) Το 24% των ασθενών που συμμετείχαν λάμβαναν θεραπεία με φαρμακευτικά σκευάσματα, όπου οι 38 από τους συμμετέχοντες ολοκλήρωσαν τη θεραπεία χωρίς να επηρεαστεί η επούλωση από τα φαρμακευτικά σκευάσματα, β) Σε όποιο σημείο του άκρου και αν είχε εκδηλωθεί ατροφικό έλκος, η μελέτη έδειξε ότι δεν επηρεάστηκε η θεραπεία με PRP, γ) Το 42% των ασθενών εμφάνιζε κινητικές παραμορφώσεις στους ενδογενείς μύες του ποδιού, παρόλο αυτά δε επηρεάστηκε η επούλωση της περιοχής, δ) Αν και η μέση διάρκεια του έλκους ήταν 11 και 62 εβδομάδες, τα συνεχή ποσοστά εμφάνισης επούλωσης δε επηρεάστηκαν από το μεγάλο διάστημα αποκατάστασης, ε) Σε ηλικιωμένους ασθενείς, η επούλωση είναι αργή με μειωμένη φλεγμονώδη ανταπόκριση και με μεταβλητό προφίλ σε κυτοκίνες, όμως η μελέτη έδειξε ότι το γήρας δεν επηρέασε την επούλωση, στ) Το 58% των ασθενών ήταν οριακό στο να εμφανίσει φυματίωση, γεγονός που έδειξε ότι δεν έχει καμία επιβάρυνση στην επούλωση. Στη μελέτη, 46 ασθενείς (92%) έδειξαν πλήρη επούλωση με PRP. Μεταξύ των ασθενών που έδειξαν πλήρη επούλωση, το 88% των ασθενών το πέτυχε αυτό μετά την 4η συνεδρίαση, ενώ το 8% παρουσίασε βελτίωση στην τρίτη συνεδρίαση. Ο μέσος χρόνος για την επούλωση του έλκους με PRP ήταν περίπου 4,38 εβδομάδες και 92% των ασθενών εμφάνισαν πλήρη επανεπιθηλίωση εντός 6

συνεδριών θεραπείας PRP χωρίς την εμφάνιση καμίας επιπλοκής. Η μέση διάρκεια θεραπείας του έλκους ήταν 11 και 62 εβδομάδες. Για την παρασκευή του PRP λήφθηκαν 10 ml αυτόλογου αίματος, ακολουθήθηκαν οι βασικές αρχές διαφορικής φυγοκέντρησης και το PRP ενεργοποιήθηκε λίγο πριν χρησιμοποιηθεί με χλωριούχο ασβέστιο. Πριν την εφαρμογή των επιθεμάτων PRP γινόταν χειρουργικός καθαρισμός των ελκών. Η θεραπεία με PRP είναι η προτιμώμενη επιλογή θεραπείας σε ασθενείς με λέπρα που πάσχουν από χρόνια έλκη που δεν επουλώνονται. (Εικόνα 48).

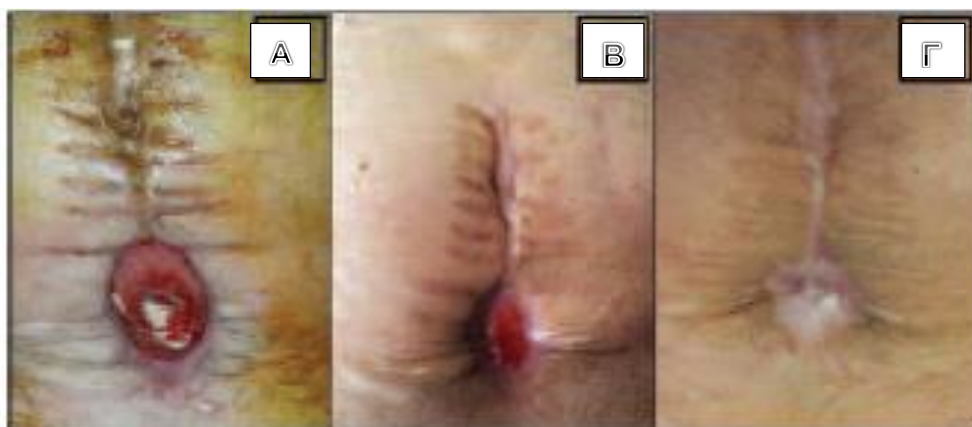


Εικόνα 48. Κάποιες κλινικές περιπτώσεις που συμμετείχαν στη μελέτη πριν και μετά την θεραπεία με PRP (Ανατύπωση από: Anandan και συν., 2016 τροποποιημένο)

Οι Iesari και συν. (Iesari και συν., 2017) περιγράφουν την κλινική εφαρμογή πηκτώματος PRP σε ασθενή που είχε υποβληθεί σε μεταμόσχευση νεφρού. Ο

ασθενής παρουσίασε αυτόματη ρήξη ουροδόχου κύστεως λόγω γαγγραινώδους κυστίτιδας, όπου μετά την λαπαροστομία και την αποκατάσταση της ουροδόχου κύστεως εμφάνισε λοίμωξη από *Acinetobacter baumannii*. Πρόκειται για ένα βακτήριο αρκετά ανθεκτικό σε πολλά αντιβιοτικά που προκαλεί εκτεταμένη απόφραξη στη πληγή. Όλες οι συμβατικές θεραπείες απέτυχαν. Χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα PRP στο τραύμα 39 ημέρες μετά την εγχείρηση. Χρησιμοποιήθηκαν ομόλογα αιμοπετάλια γιατί ο ασθενής παρουσίασε αναιμία και βρισκόταν σε χρόνια ανοσοκαταστολή. Συνολικά, λήφθηκε 450 ml αίμα από πολλούς δότες. Το τελικό προϊόν του PRP είχε τελική συγκέντρωση αιμοπεταλίων $1 \times 10^6 \pm 2 \times 10^5$ αιμοπετάλια / μL , το οποίο ενεργοποιήθηκε με θρομβίνη και γλυκονικό ασβέστιο. Το PRP αφέθηκε για 5 λεπτά να πήξει σε θερμοκρασία 37°C και μετά φυλάχθηκε στους -80°C . Κάθε 48 ώρες, γινόταν ο χειρουργικός καθαρισμός της περιοχής και τοποθετούνταν μέσα στο τραύμα πήκτωμα PRP .

Το τραύμα επουλώθηκε πλήρως σε 131 ημέρες, η λειτουργία του μοσχεύματος ήταν εξαιρετική και δεν παρατηρήθηκαν ανεπιθύμητες ενέργειες, ούτε οξείες ανοσολογικές αντιδράσεις κατά την διάρκεια της θεραπείας (Εικόνα 49). Οι συγγραφείς αναφέρουν το γεγονός ότι το πήκτωμα PRP μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια και αποτελεσματικότητα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, χρησιμοποιήθηκε ως πρόσθετη θεραπεία μετά από λοίμωξη της χειρουργικής περιοχής σε ανοσοκατεσταλμένο ασθενή που χρησιμοποιήθηκε αλλογενή αίμα σε ασθενή με υψηλό ποσοστό κινδύνου εμφάνισης ανοσολογικής αντίδρασης.

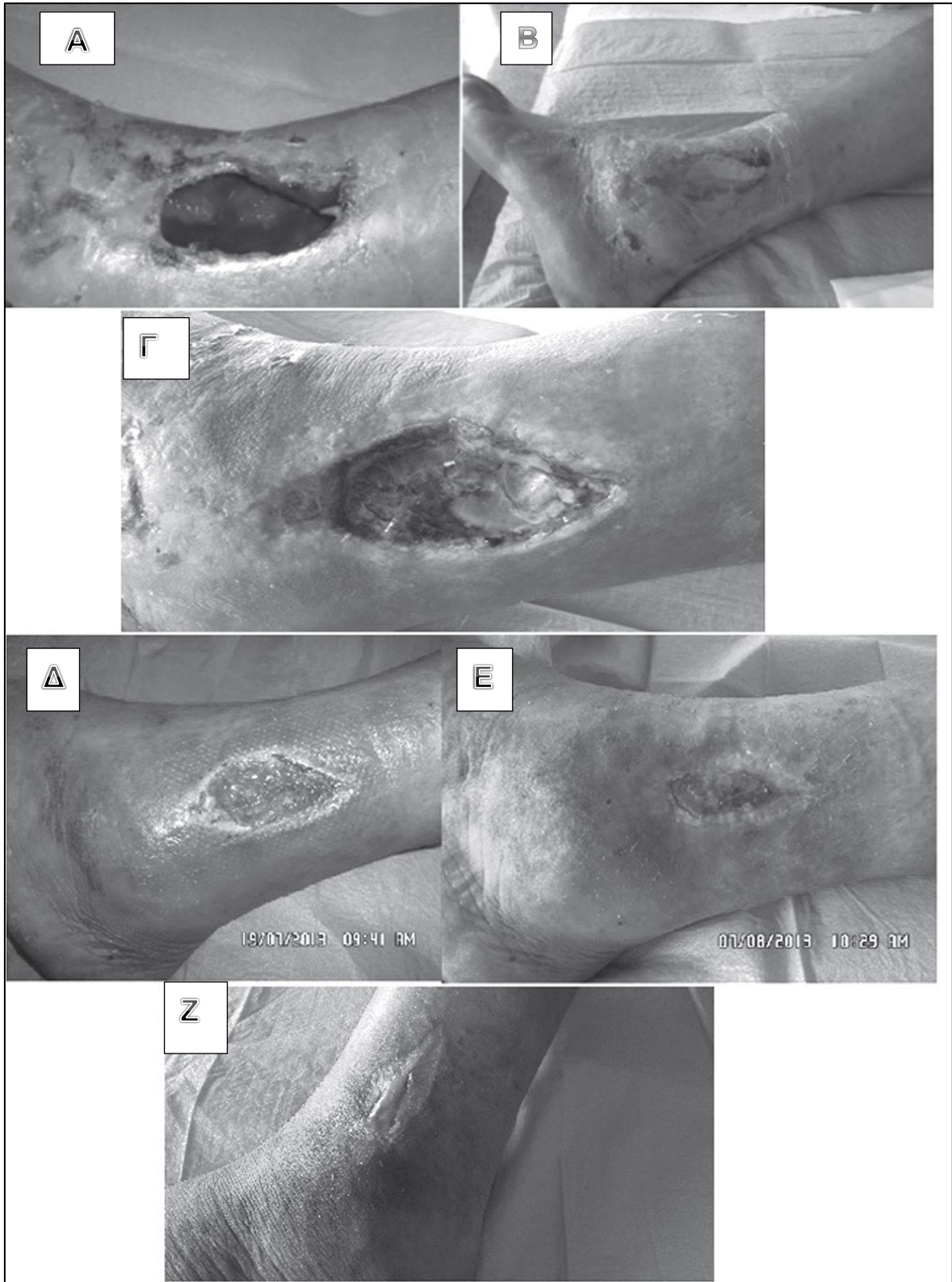


Εικόνα 49. Α. Εικόνα τραύματος 60^η μετεγχειρητική ημέρα, το κοιλιακό τοίχωμα είναι πλήρως κλειστό και στο κέντρο του τραύματος παρατηρείται κοκκιώδης ιστός Β. Την 105^η μετεγχειρητική ημέρα παρατηρείται προοδευτική επανεπιθηλίωση Γ. Μετά από 131 ημέρες το τραύμα επουλώνεται πλήρως (Ανατύπωση από: Iesari και συν., 2017)

Οι Velier και συν. (Velier και συν., 2017) πραγματοποίησαν την πρώτη πιλοτική μελέτη χρήσης αυτόλογου αίματος από ηλικιωμένους ασθενείς, οι οποίοι λάμβαναν αντιπηκτική και αντιθρομβωτική αγωγή για την παρασκευή πηκτώματος PRP. Σε όλες τις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, η ομάδα των ηλικιωμένων ασθενών με χρόνια δερματικά έλκη οποιαδήποτε αιτιολογίας ήταν εκτός ομάδας μελέτης, λόγω της φαρμακευτικής αγωγής που λάμβαναν. Τα αντιθρομβωτικά φάρμακα φαίνεται να επηρεάζουν την διαδικασία της πήξης καθώς και την λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων. Στη συγκεκριμένη μελέτη, η ομάδα μελέτης ήταν πέντε ηλικιωμένοι ασθενείς, ηλικίας $84 \pm 8,89$ έτη, με χρόνιες παθήσεις που λάμβαναν αντιθρομβωτική αγωγή και η ομάδα ελέγχου ήταν πέντε υγιείς ασθενείς. Από την ομάδα μελέτης, τέσσερις ασθενείς ήταν υπό αντιαιμοπεταλιακή αγωγή (Ασπιρίνη ή Κλοπιδογρέλη) και ένας ασθενής ήταν υπό αντιπηκτική αγωγή. Δύο από τους ασθενείς έλαβαν προληπτική αγωγή με ηπαρίνη χαμηλού μοριακού βάρους. Όλοι οι δότες είχαν αριθμό αιμοπεταλίων πάνω από 150×10^9 G/L. Συλλέχθηκε 36.3 ml αυτόλογου αίματος για την παρασκευή πηκτώματος PRP, για την ενεργοποίηση του PRP χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος αυτόλογης θρομβίνη και χλωριούχου ασβεστίου και ακολουθήθηκαν οι βασικές αρχές διαφορικής φυγοκέντρησης. Το σύστημα PRP που επιλέγει, παράγει PRP φτωχό σε λευκά αιμοσφαίρια. Έχει την ικανότητα να παράγει μεγάλο όγκο PRP για να παρασκευαστεί πηκτώμα που να καλύπτει επιφάνεια, διαμέτρου 8 cm, που συνήθως έχουν τα χρόνια έλκη. Το αποτέλεσμα της μελέτης αυτής έδειξε ότι δεν παρουσιάστηκε καμία διαφορά στη λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων τόσο από τους ηλικιωμένους όσο και τους υγιείς δότες. Τα βιολογικά χαρακτηριστικά του πηκτώματος ήταν παρόμοια και στις δύο ομάδες. Ο χρόνος παρασκευής του PRP ήταν σχεδόν ο ίδιος και στις δύο ομάδες .

Άλλη μια αποτελεσματική εφαρμογή πηκτώματος PRP για την επούλωση χρόνιων μη επουλωτικών τραυμάτων αποτελεί η αναφορά από τους Follo και συν. (Follo και συν., 2017). Παρουσίασαν τρεις περιπτώσεις με πολύ σοβαρή μορφή χρόνιου τραύματος. Χρησιμοποίησαν το δικό τους πρωτόκολλο για PRP, που βασίζεται στις αρχές της διαφορικής φυγοκέντρησης και για την ενεργοποίηση του PRP επιλέχθηκε αυτόλογη θρομβίνη και γλυκονικό ασβέστιο. Το πηκτώμα PRP εφαρμόστηκε έτσι ώστε να καλυφθεί ολόκληρη η περιοχή του τραύματος. Σε όλες τις περιπτώσεις προηγήθηκε χειρουργικός καθαρισμός της περιοχής. Και οι τρεις ασθενείς παρουσίασαν πλήρη ιστική επούλωση με πλήρη αισθητική

αποκατάσταση. Η πρώτη περίπτωση ήταν ένας ασθενής με τραύμα στο έσω σφυρό, όπου μετά από 14 μέρες η γύρω περιοχή παρουσίασε στοιχεία νέκρωσης και έντονο πόνο λόγο ισχαιμίας. Προηγήθηκε χειρουργικός καθαρισμός του τραύματος. Στον ασθενή χρειάστηκε να τοποθετηθούν 4 νέα πηκτώματα ανά 10 ημέρες, λόγω της φύσης του τραύματος. Μετά από 5 εβδομάδες θεραπείας με πήκτωμα PRP, παρουσιάστηκε ορατή μείωση της βλάβης στη τραυματική περιοχή, εντοπίστηκε κοκκιώδης ιστός και εμφανίστηκε ιστική επούλωση του άκρου με στοιχεία επανεπιθηλίωσης (Εικόνα 50). Μετά από 7 εβδομάδες μειώθηκε η έκταση του τραύματος, ενώ σε 98 ημέρες από την έναρξη της θεραπείας και 14 ημέρες φαρμακευτικής αγωγής υπήρξε η πλήρης επούλωση του τραύματος. Η δεύτερη περίπτωση, αφορά ένα τραύμα στη κνήμη ενός άντρα, στο οποίο μετά από 8 εβδομάδες παρατηρήθηκε καθυστέρηση στη επούλωση του. Εφαρμόστηκε μόνο ένα πήκτωμα PRP, όπου 3 ημέρες μετά άρχισαν να εμφανίζεται κοκκιώδης ιστός. Συνολικά, χρειάστηκε να περάσουν 105 ημέρες από την ημέρα τραυματισμού για να επουλωθεί πλήρως το τραύμα. Η τρίτη περίπτωση, αφορά ένα νεαρό ασθενή με μεγάλη πληγή στο αντιβραχιόνιο μετά από κάταγμα του ωλένιου οστού με απώλεια μαλακού ιστού. Ο ασθενής παρουσίασε το σύνδρομο της διαμερισματοποίησης. Μετά από 19 ημέρες το τραύμα άρχισε να εμφανίζει κοκκιώδη ιστό, όπου 45 ημέρες μετά από τον τραυματισμό το τραύμα μολύνθηκε με *Staphylococcus aureus*. Μετά από δύο μήνες θεραπείας με PRP έμεινε μόνο ένα ήπιο εξίδρωμα, οι άκρες του τραύματος εμφάνισαν στοιχεία επαναιμάτωσης χωρίς να υπάρχουν στοιχεία μόλυνσης. Μετά από 146 ημέρες το τραύμα θεραπεύθηκε πλήρως εμφανίζοντας άφθονο ουλώδη ιστό. Τα κλινικά αποτελέσματα της μελέτης αυτής επιβεβαιώνουν την θεραπευτική χρήση πηκτώματος PRP, το οποίο είναι ασφαλές, εύκολο στη χρήση, χαμηλού κόστους για ασθενείς με οξεία τραύματα και επιπλοκές που επηρεάζουν την επουλωτική διαδικασία. Στο εν λόγω ορθοπεδικό κέντρο τραύματος το πήκτωμα PRP χρησιμοποιείται για θεραπευτικούς λόγους από το 2008.



Εικόνα 50. Α. Αποκάλυψη της έκτασης της τραυματικής περιοχής, μετά από χειρουργικό καθαρισμό Β. Εφαρμογή θεραπευτικού πηκτώματος PRP Γ. Τοποθέτηση δεύτερου πηκτώματος PRP, χωρίς να αφαιρεθεί το πρώτο πήκτωμα Δ. Εικόνα τραύματος μετά από 5 εβδομάδες θεραπείας Ε. Εικόνα τραύματος μετά από 7 εβδομάδες θεραπείας Ζ. Τοποθέτηση τελευταίου πηκτώματος PRP (Ανατύπωση από: Follo και συν., 2017)

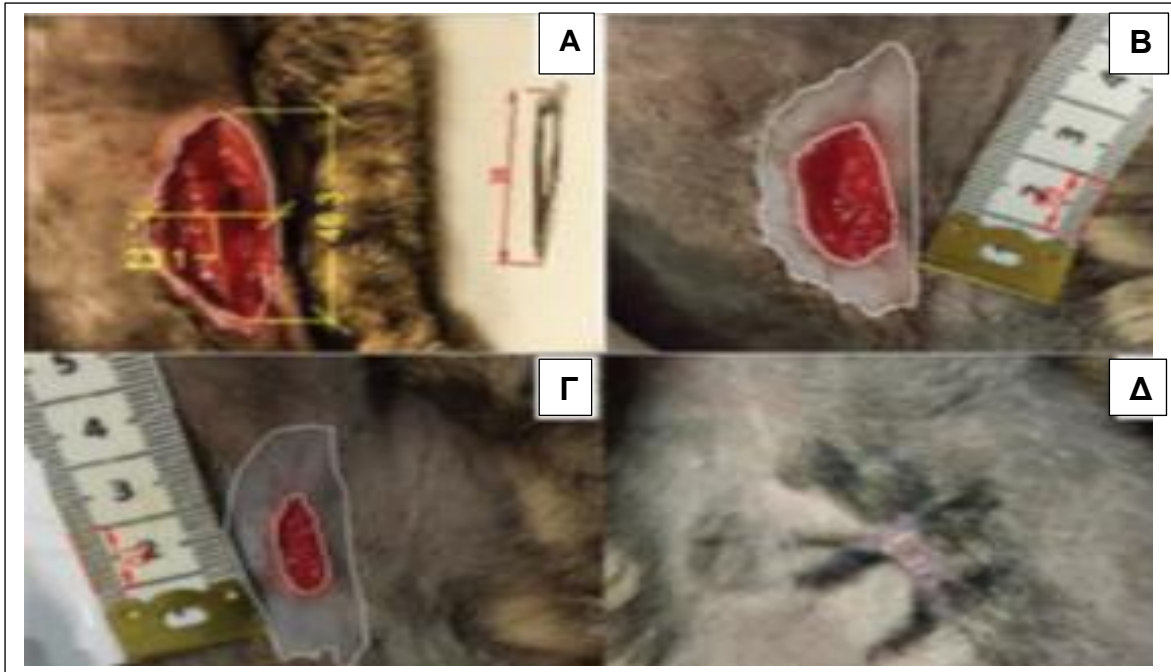
Γ.2. Μελέτες σε ζώα για την θεραπευτική δράση του πλάσματος πλούσιο σε αιμοπετάλια στην επούλωση

Η χρήση του πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια (PRP) σε ζώα και η επίδραση στην επούλωση του τραύματος έχουν αναφερθεί σε αρκετές μελέτες, ειδικά για την αναγέννηση των οστών και την ανασυγκρότηση συνδέσμων και τενόντων. Έχει γίνει αναφορά από μελέτες που υποδηλώνουν θεραπευτικά αποτελέσματα σε δερματικά τραύματα σε σκύλους, κατσίκια, άλογο και άλλα είδη. Το PRP μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μορφή πηκτώματος απευθείας πάνω στη πληγή είτε στη φυσική του μορφή σε ορθοπεδικές επεμβάσεις, σε χειρουργικές επεμβάσεις και σε τραύματα του δέρματος. Τις περισσότερες φορές για την ενεργοποίηση του PRP χρησιμοποιείται θρομβίνη και χλωριούχο ασβέστιο.

Οι Jee και συν. (Jee και συν., 2016) πραγματοποίησαν μια μελέτη για να αποδείξουν την αποτελεσματικότητα του PRP, όταν χρησιμοποιείται στη φυσική του μορφή και γίνεται ενέσιμη εφαρμογή σε οξεία δερματικά τραύματα. Την ομάδα μελέτης αποτέλεσαν τρεις υγιείς σκύλοι, εκ των οποίων οι δύο ήταν κουτάβια και ο τρίτος ήταν ενήλικας. Σε κάθε σκύλο η δερματική πληγή χωρίστηκε σε δύο περιοχές, όπου η μια περιοχή έλαβε θεραπεία με PRP και η άλλη περιοχή δεν έλαβε γι' αυτό και θεωρήθηκε περιοχή ελέγχου. Για την παρασκευή του PRP λήφθηκαν από κάθε σκύλο 52 ml αυτόλογου αίματος με συγκέντρωση αιμοπεταλίων $3.57 \times 10^{11}/L$. Ακολουθήθηκαν οι βασικές αρχές διαφορικής φυγοκέντρωσης, όπου λήφθηκε PRP μαζί με buffy coat με τελική συγκέντρωση αιμοπεταλίων $30.70 \times 10^{11}/L$, σχεδόν 8 φορές πάνω από το μέσο όρο. Το PRP χρησιμοποιήθηκε στη φυσική του μορφή. Η διάρκεια της θεραπείας ήταν 21 ημέρες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, οι περιοχές που υποβλήθηκαν σε θεραπεία PRP έδειξαν μια ορατή επούλωση του τραύματος, η οποία επιβεβαιώθηκε ιστολογικά, σε σύγκριση με την περιοχή ελέγχου. Η πολλαπλασιαστική φάση της επουλωτικής διαδικασίας έγινε εμφανής κατά την 7^η ημέρα θεραπείας, 14^η ημέρα και 21^η ημέρα. Για να εκτιμηθεί ο ρυθμός κοκκιοποίησης του τραύματος, την 14^η ημέρα έγινε έγχυση κολλαγόνου. Ενώ, μέχρι την 7^η ημέρα ο ρυθμός κοκκιοποίησης ήταν υψηλός, μετά από το κολλαγόνο ο ρυθμός μειώθηκε. Μετά από την θεραπεία PRP παρατηρήθηκε επαρκής ενίσχυση αγγειογένεσης, σχηματισμός κοκκιώδους ιστού, οργάνωση των στηρικτικών δομών των ινών κολλαγόνου και εμφανίστηκε επανεπιθηλίωση του

δέρματος. Σύμφωνα με τη μελέτη αυτή, το PRP θεωρείται μια χρήσιμη, πρακτική και οικονομική θεραπεία για τη διαχείριση των δερματικών τραυμάτων.

Οι Gemignani και συν. (Gemignani και συν., 2017) περιέγραψαν την χρήση ετερόλογου PRP για την επούλωση τραύματος σε αιλουροειδή. Η μελέτη αφορούσε μια γάτα η οποία μετά από τραυματισμό εμφάνισε έλλειμμα της περιοχής του δέρματος στο λαιμό. Το τραύμα της γάτας εμφάνισε σημάδια μόλυνσης. Λόγω του μικρού μεγέθους, δε ήταν εφικτό να χρησιμοποιηθεί αυτόλογο δείγμα αίματος για την παρασκευή PRP. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε ετερόλογο αίμα από σκύλο. Λήφθηκαν 16 ml ολικό αίμα από τον σκύλο, με αριθμό αιμοπεταλίων $322 \times 10^3/\mu\text{L}$, αρκετά ικανοποιητικών για την παρασκευή PRP. Ακολουθήθηκαν οι βασικές αρχές διαφορικής φυγοκέντρησης και αποδόθηκαν 2 ml όγκος PRP, με τελική συγκέντρωση αιμοπεταλίων 1513×10^3 αιμοπετάλια / μL . Το PRP χρησιμοποιήθηκε στη φυσική του μορφή, όπου πριν γίνει έγχυση στη περιοχή πραγματοποιήθηκε χειρουργικός καθαρισμός. Από το πρώτο 24ώρο παρατηρήθηκαν σημάδια βελτίωσης. Την 4^η ημέρα θεραπείας παρατηρήθηκε μείωση έκτασης της τραυματικής περιοχής κατά 50%, την 10^η ημέρα το ποσοστό έφθασε στο 90% και στις επόμενες 10 ημέρες παρατηρήθηκε πλήρης επούλωση του τραύματος. Κοκκιώδης ιστός άρχισε να παρατηρείται στο κέντρο του τραύματος κατά την 2^η ημέρα θεραπείας και ακολούθως την 4^η ημέρα είχε καλυφθεί το 50% του τραύματος και την 6^η ημέρα σχεδόν το 90%. Την 8^η ημέρα η τραυματική περιοχή καλύφθηκε ολόκληρη από κοκκιώδης ιστό, ώσπου την 10^η ημέρα ο κοκκιώδης ιστός εμφανίστηκε να είναι πιο μαλακός και ακανόνιστος στο κέντρο του τραύματος και πιο άφθονος προς την περιφέρεια. Η επανεπιθηλίωση άρχισε να γίνεται εμφανής σε ποσοστό 50% κατά την 6^η ημέρα θεραπείας, ενώ έφθασε σε ποσοστό 80% την 10^η ημέρα. Η επούλωση του τραύματος ολοκληρώθηκε 20 ημέρες μετά την θεραπεία PRP, με ελαφρύ σχηματισμό χυλώδης ιστού (Εικόνα 51). Υπήρχε επανεμφάνιση μαλλιών 25 ημέρες μετά τη θεραπεία, εκτός από την περιοχή του χυλώδους ιστού. Κατά την διάρκεια της θεραπείας δε παρατηρήθηκαν στοιχεία φλεγμονής, ανεπιθύμητες παρενέργειες είτε ανοσολογικές αντιδράσεις από την γάτα, επειδή χρησιμοποιήθηκε ετερόλογο αίμα για την παρασκευή PRP.



Εικόνα 51. Η πορεία της επούλωση του τραύματος Α. Η αποκάλυψη του τραύματος μετά τον χειρουργικό καθαρισμό Β. Το τραύμα μετά από 8 ημέρες θεραπείας με PRP Γ. Το τραύμα μετά από 13 ημέρες θεραπείας με PRP Δ. Το τραύμα μετά από 20 ημέρες θεραπείας με PRP (Ανατύπωση από: Gemignani και συν., 2017)

Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP, Plasma Rich Platelet) ορίζεται ως εναιώρημα αιμοπεταλίων σε μικρό όγκο πλάσματος, που χαρακτηρίζεται από υψηλότερη συγκέντρωση αιμοπεταλίων σε σύγκριση με τη συγκέντρωση του αρχικού αίματος που συλλέγεται. Το PRP είναι πλούσιο σε βιολογικούς παράγοντες, όπως οι αυξητικοί παράγοντες, οι κυτοκίνες, οι πρωτεΐνες και τα κυτταρικά συστατικά που είναι απαραίτητα για την ανταπόκριση του οργανισμού στη αποκατάσταση και την αναγέννηση των ιστών. Οι βιολογικές ιδιότητες του PRP βασίζονται στη βιολογική δράση των αυξητικών παραγόντων που εκκρίνονται από τα α κοκκία των αιμοπεταλίων. Όταν ενεργοποιηθούν τα αιμοπετάλια απελευθερώνεται ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF), ο τροποποιητικός αυξητικός παράγοντας-β (TGF-β), ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), ο ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), ο αυξητικός παράγοντας ινσουλίνης-1 (IGF-1) και ο βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (bFGF). Οι αυξητικοί παράγοντες είναι ένας από τους τρεις πυλώνες της αναγεννητικής ιατρικής, δεδομένου τον καθοριστικό ρόλο στη οργάνωση της επιδιόρθωσης των ιστών και της επιθηλιακής αναγέννησης.

Για να γίνει κατανοητό η έννοια της αναγεννητικής ιατρικής, αξίζει να γίνει αναφορά στο μύθο του Προμηθέα που έδωσε φωτιά στους ανθρώπους. Για αυτή την πράξη ο Δίας τον τιμώρησε, δένοντας τον πάνω σε ένα βράχο και στέλνοντας κάθε πρωί έναν αετό να του τρώει το συκώτι. Μέχρι όμως το επόμενο πρωί, το συκώτι είχε ξανασηματιστεί. Η αναγεννητική ιατρική είναι η φυσική προέκταση της ικανότητας του οργανισμού να αποκαθιστά τόσο δομικά όσο και λειτουργικά τον ανθρώπινο ιστό. Η αναγεννητική ιατρική αναφέρεται σε θεραπείες με τις οποίες η περιοχή που έχει υποστεί την βλάβη ή ακόμα και η γύρω από αυτήν περιοχή, εφοδιάζεται τουλάχιστον με ένα από τα τρία συστατικά που θεωρούνται απαραίτητα για την αναγέννηση των ιστών. Το PRP θεωρείται θεραπεία που περιλαμβάνεται στην αναγεννητική ιατρική, προσφέροντας σε υψηλές συγκεντρώσεις τους αυξητικούς παράγοντες, που παίζουν σημαντικό ρόλο στη αναγέννηση του κατεστραμμένου ιστού και επιταχύνουν την διαδικασία της επουλώσης.

Το PRP προτείνεται ως μια νέα εναλλακτική μέθοδος εφαρμογής στην αντιμετώπιση των χρόνιων ελκών. Χρόνιο έλκος ή μη επουλώσιμο χαρακτηρίζεται ένα τραύμα που δεν μπορεί επανεπιθηλιωθεί μετά από 3 μήνες ή δεν ανταποκρίνεται σε συμβατές θεραπείες. Επιταχύνοντας την διαδικασία της επουλώσης, το PRP συντελεί ακόμα και στην πλήρη ίαση της βλάβης. Οι αυξητικοί

παράγοντες εμπλέκονται στη κυτταρική ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τη διαφοροποίηση. Οι αυξητικοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των φλεγμονώδη αποκρίσεων, την ενίσχυση του σχηματισμού του κοκκιώδους ιστού, στη επαγωγή της αγγειογένεσης και την επιθηλιοποίηση του τραύματος. Έχει βρεθεί ότι η ανεπάρκεια σε έναν ή σε περισσότερους αυξητικούς παράγοντες επηρεάζει τη φυσιολογική διαδικασία της επούλωσης και ευθύνονται για τα μη θεραπεύσιμα χρόνια τραύματα. Στα χρόνια τραύματα υπάρχει μειωμένη έκφραση του αυξητικού παράγοντα PDGF, ενώ σε χρόνια πιαστικά έλκη υπάρχει μειωμένο επίπεδο των αυξητικών παραγόντων bFGF, PDGF, EGF και TGF- α TGF- β . Έχει βρεθεί αυξημένη συγκέντρωση του TGF και του PDGF σε χρόνια τραύματα που έχουν αναπτύξει ουλώδη ιστό. Ο βαθμός της επούλωσης επηρεάζεται από την αιτία του έλκους. Γενικά, τα χρόνια μη θεραπεύσιμα τραύματα ευνοούνται από τις βιολογικές ιδιότητες του PRP. Τα χρόνια διαβητικά και φλεβικά έλκη παρουσιάζουν ένα βαθμό δυσκολίας στη επούλωση με θεραπεία PRP. Μελέτες έδειξαν ότι τα χρόνια διαβητικά έλκη και τα πιαστικά έλκη ανταποκρίνονται καλύτερα στη θεραπεία με PRP, σε σύγκριση με τα χρόνια φλεβικά έλκη. Ίσως, η παθοφυσιολογία της φλεβικής ανεπάρκειας μπλοκάρει την βιολογική δράση των αυξητικών παραγόντων. Σε εγκαύματα μεγάλης έκτασης και βάθος της εγκαυματικής επιφάνειας, μελέτες έδειξαν τον σχηματισμό κοκκιώδους ιστού και την επιθηλιοποίηση της εγκαυματικής περιοχής μετά την χρήση του PRP. Σε αρκετές μελέτες επιβεβαιώθηκε η αντιμικροβιακή δράση του PRP σε χρόνια μη θεραπεύσιμα τραύματα, λόγω της παρουσίας των αυξητικών παραγόντων και των κυτοκινών που εμποδίζουν την ανάπτυξη φλεγμονώδη κυττάρων.

Η θεραπεία με PRP παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα. Παράγεται από αυτόλογο αίμα, με την ελάχιστη επεμβατική διαδικασία, σε σύντομο χρονικό διάστημα. Πρόκειται για μία μέθοδο που απαιτεί ελάχιστο διαθέσιμο εξοπλισμό και με προσιτή τιμή.

Έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες και κλινικές δοκιμές που αποδεικνύουν τα ευεργετικά αποτελέσματα της εφαρμογής του PRP σε πολλούς τομείς της Ιατρικής. Επειδή όμως το προϊόν του PRP είναι αποτέλεσμα αυτόλογου δείγματος, δε μπορούν να ληφθούν τυποποιημένα αποτελέσματα για όλους τους ασθενείς. Κρίνεται απαραίτητο να πραγματοποιηθούν περισσότερες πειραματικές μελέτες,

για τη βελτιστοποίηση κάθε μιας από τις μεταβλητές που εμπλέκονται στην προετοιμασία και την χρήση του πλάσματος πλούσιο σε αιμοπετάλια.

Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Γεωργούλης Επα. Ιωάννης** (2010). Αιματολογία Εργαστηριακό μέρος, Θεσσαλονίκη, Κεφ.13, σελ.375-415
- Διδάγγελος Τ., Γεώργα Σ., Άρσος Γ., Ριζοπούλου Δ., Καρακατσάνης Κ., Καταμήτσος Δ.** (2006). Επούλωση χρόνιου διαβητικού νευροπαθητικού έλκους πέλματος με τοπική εφαρμογή αυξητικού παράγοντα, Ελληνικά Διαβητολογικά Χρονικά 19(4):313-319
- Διονυσίου Δ. Δημήτριος** (2009). Ο ρόλος της τοπικής εφαρμογής συμπυκνώματος αιμοπεταλίων στα μορφομετρικά χαρακτηριστικά της επούλωσης χρόνιων ελκών. Πειραματική και κλινική μελέτη, Ιατρική Σχολή Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, σελ.21-24
- Δρόσου Γεωργία** (2017). Μελέτη του ρόλου του αυξητικού παράγοντα HARP στην αγγειογένεση in vivo, Σ.Ε.Υ. Τμήμα Φαρμακευτικής, Πάτρα, σελ.4-6
- Ευθυμίου Η., Μπουγουλιά Μ.** (1994). Δυσλειτουργία του ενδοθηλίου σε σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 και 2, Ελληνικά Διαβητολογικά Χρονικά 19(4):247-260
- Μακρής Ε. Παντελής** (1994). Αιμόσταση - Φυσιολογία, Θεσσαλονίκη,Κεφ.2, σελ. 65-151
- Πυριόχου Διονυσία** (2013). Ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα CREB σε καρκινικά κύτταρα του δέρματος, Νημερτής, Τμήμα Ιατρικής (ΜΔΕ), σελ. 2-6
- Φωτόπουλος Αθανάσιος** (2011). Παθοφυσιολογία και φάσεις της φυσιολογικής επούλωσης, Σισμανόγλειο Νοσοκομείο Αττικής
- Academy of Sciences** (1842). Paris: Donne on the Blood Globules, Prov. Med. Surg. J. (1840) 3:498-499
- Akhundov K., Pietramaggiore G., Waselle L., Darwiche S., Guerid S., Scaletta C., Hirt-Burri N., Applegate L.A., Raffoul W.V.** (2012). Development of a cost effective method for platelet rich plasma (PRP) preparation for topical wound healing, Annals of Burns and Fire Disasters, Vol. XXV, No 4
- Akingboye Akinfemi Ayobami, Gibbins Stephen, Gamston Philip, Tucker Arthur, Navsaria Harshad, Kyriakides Constantions** (2010). Application of autologous derived-platelet rich plasma gel in the treatment of chronic wound ulcer: Diabetic foot ulcer, The Journal of Extra Corporeal Technology 42:20-29
- Al-Aql Z.S., Alagl A.S., Graves D.T., Gerstenfeld L.C., Einhorn T.A.** (2008). Molecular Mechanisms Controlling Bone Formation during Fracture Healing and Distraction Osteogenesis, J. Dent. Res 87(2): 107-118

- Albanese Antonino, Licata E. Maria, Polizzi Bianca, Campisi Giuseppina** (2013). Platelet –rich plasma (PRP) in dental and oral surgery: from the wound healing to bone regeneration, *Immunity &Ageing* 10:23
- Alsousy J., Thompson M., Hulley P., Noble A., Willett K.** (2009). The biology of platelet- rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery, *Journal Bone Joint Surgery (Br)* 91-B: 987-96
- Alvarez H. Ricardo, Kantarjian M. Hagor, Cortes E. Jorge** (2006). Biology of Platelet- Derived Growth Factor and Its Involvement in Disease, *Mayo Clin. Proc.* 81(9): 1241-1257
- Amytha Periyasamy, Rajkumar Thangarajan** (2017). Role of Insulin-Like Growth Receptors, and Insulin- like Growth Factor –binding Proteins in Ovarian Cancer, *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology* 38:198-206
- Anandan V., Afthab Jameela W., Saraswathy P., Sarankumar S.** (2016). Platelet rich plasma: Efficacy in treatment trophic ulcers in Leprosy, *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 10(10): 6-9
- Anitua E., Andia I., Ardanza B., Nurden P., Nurden A.T.** (2004). Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration, *Thromb. Haemost.* 91(1):4-15
- Axmed Marwa, Reffat A. Sherif, Hassan Amany, Eskander Fikry, Egypt Ismailia** (2017). Platelet rich plasma for the treatment of clean diabetic foot ulcers, *Ann. Vasc. Surg.* 38:206-211
- Barrientos Stephan, Brem Harold, Stojadinovic Olivera, Tomic-Canic Marjana** (2014). Clinical application of growth factors and cytokines in wound healing, *Wound Repair Regeneration* 22(5):569-578
- Beilecki T.M., Gazdzik T.S., Arendt J., Szczepanski T., Krol W., Wielkoszynski T.** (2007). Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other substances: an in vitro study, *The Journal of the Bone and Joint Surgery* 89(3):417-420
- Beitzel K., Allen D., Apostolakos J., Russell R., Mc Carthy M.B., Gallo J.G., Cote P.M., Mazzocca D.A.** (2015). US Definitions, Current Use, and FDA Stance on Use of Platelet-Rich Plasma in Sports Medicine, *J. Knee Surg.* 28(1):29-34
- Blakytyn Robert, Ludlow Anna, Martin E.M. Gail, Ireland Grenham, Lund R. Leif, Ferguson W. J. Mark, Brunner George** (2004). Latent TGF – β 1 Activation by Platelets, *Journal of Cellular Physiology* 199:67-76

Brahmkhatri P. Varsha, Prasanna Chinmayi, Altreya S. Hanudatta (2015). Insulin –Like Growth Factor System in Cancer: Novel Targeted Therapies, Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International Article ID 538019, 24 pages

Cavallo Carola, Roffi Alice, Grigolo Brunella, Mariani Erminia, Pratelli Loredana, Merli Giulia, Kon Elizaveta, Marcacci Maurilio, Filardo Giuseppe (2016). Platelet-Rich Plasma: The Choice of Activation Method Affects the Release of Bioactive Molecules, Biomed Research International Article ID 6591717 7 pages

Cheng-Kui Qu (2002). Role of the SHP- 2 tyrosine phosphatase in cytokine-induced signaling and cellular response, Biochimica et. Biophysica Acta 1592:297-301

Cielsik-Bielecka A., Bielecki T., Gazdzik T.S., Arendt J., Kro'ł W., Szczepanski T. (2009). Autologous platelets and leukocytes improve healing of infected high- energy soft tissue injury, Transfusion Apheresis Science 41:9-12

Civinini Roberto, Macera Armando, Nistri Lorenzo, Redl Birgit, Innocenti Massimo (2011). The use of autologous blood-derived growth factors in bone regeneration, Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism 8(1):25-31

Conley C.I. (2004). Hemostasis In, Mountcastle VB, Ed Medical physiology St Louis: The C.V. Mosby Company 1137-1146

Corn Paul, Wang Fen, Mc Keehan L. Wallace, Navone Nora (2013). Targeting Fibroblast Growth Factor Pathways in Prostate Cancer, Clin. Cancer Res. 19(21):5856-5866

D'asta Federica, Halstead Fenella, Harrison Paul, Orlandini Sandra Zecchi, Moiemem Naiem, Lord Janet (2017). The contribution of leucocytes to the antimicrobial activity of platelet- rich plasma preparations: a systematic review, Platelets DOI:10.1080/09537104.2017.1317731

Dhillon S. Robinder, Schwarz M. Edward, Maloney D. Micael (2012). Platelet-rich plasma therapy-future or trend, Arthritis Research and Therapy 14:219

Dhurat Rachita, Sukesh M.S. (2014). Principles and Methods of Preparation of Platelet Rich Plasma: A Review and Author's Respective, Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery 7(4):189-197

Ehrenfest Dohan M. David, Andia Isabel, Zumstein A. Matthias, Zhang Chang- Qing, Pinto R. Nelson, Bielecki Tomasz (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, Ligaments and Tendons Journal* 4(1):3-9

Ehrenfest D., Andia I., Zumstein A.M., Zhang C.Q., Pinto R.N., 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, Ligaments and Tendons Journal* 4(1):3-9

Ehrenfest Dohan, Rasmusson L., Albrektsson T. (2009). Classification of platelet concentrates: From pure platelet- rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF), *Trends Biotechnology* 27:158-67

Enihorn TA (2005). The science of fracture healing, *Journal of Orthopaedic Trauma* 19(10 Suppl.): S 4-6

Eppley B.L., Pietrzak W.S., Blanton M. (2006). Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery, *Plastic Reconstructive Surgery* 118(6):147-159

Everts A.M.P., Knape T.A.J., Weibrich G., Schonberger P.A.M.J., Hoffman J., Overdevest P.E., Box A.M.H., Zundert A. (2006). Platelet-rich plasma and Platelet gel: A review, *The Journal of The American Society of Extra-Corporeal Technology* 38:174-187

FDA (Federal Drug and Food Association), Food and Drug Administration Department of Health and Human Services (2017). Subchapter: Biologics. Part 640 Additional Standards for Human Blood and Blood Products. Subpart: Plasma, Code of Federal Regulations 21(7), CITE: 21CFR640.34

Fernandez- Moure S. Joseph, Van Eps L. Jeffrey, Cabrera J. Fernando, Barbosa Zonia, Medrano del Rosal Guillermo, Weiner K. Bradley, Ellsworth IV A. Warren, Tasciotti Ennio (2017). Platelet rich plasma: a biomimetic approach to enhancement of surgical wound healing, *Journal of Surgical Research* 207:33-34

Ferrara N., Gerber H.P. (2001). The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis, *Acta Hematologica* 106:148-56

Ferrari M., Zia S., Valcobonesi M. (1987). A new technique for hemodilution preparation of autologous platelet-rich plasma and intraoperative blood salvage in cardiac surgery, *International Journal.Artif.Organs* 10:47-50

Ferrero G., Fabbro E., Orlandi D., Martini C., Lacelli F., Serafini G., Silvestri E., Sconfienza L.M. (2012). Ultrasound – guided injection of

platelet- rich plasma in chronic Achilles and patellar tendinopathy, Journal of Ultrasound 15:260-266

Fioravanti C., Frustaci I., Armellin E., Condo R., Arcuri C., Cerroni L.

(2015). Autologous Blood Preparations Rich in Platelets, Fibrin and Growth Factors, Oral & Implantology, Anno VIII- (4)

Flanders C. Kathleen, Burmester K. James (2003). Medical Applications of Transforming Growth Factor – β , Clinical Medicine & Research Vo.1; 1:13-20

Follo Fioralba, Dejana Dario Oliver, Belletti Marzia, Bongiovanni Nicolina, Scarpa Giuseppina, Pezzali Patrizia, Borsi Sandra, Sanfilippo Laura,

Lusetti Nadia, Zaini Luigi, Loritto Patrizia, Pogliacomì Francesco,

Pedrazzini Alessio (2017). Management and effect of platelet rich plasma on wound healing: small reality of Oglio Po Hospital 88(5):66-70

Gale J. Andrew (2011). Current Understanding of Hemostasis, Toxicology Pathol. 39(1):273-280

Garg A.K. (2000). The use of platelet- rich plasma to enhance the success of bone grafts around dental implants, Dentist Implantol. Update 11:17-21

Gemignani Francesco, Perazzi Anna, Iacopetti Illaria (2017). Use of soyrced platelet rich plasma in a feline contaminated cutaneous wound, Can Vet J 58:141–144

Gonzales Ana Cristina de Oliveira, Costa Tila Fortuna, Andrade Zilton de Araujo, Medrado Alena Ribeiro Alves Peixoto (2016). Wood healing-A literature review, An Bras Dermatol. 91(5):614-20

Heldin Carl-Henrik (2013). Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment, Cell Communication Signal. 11:97

Hoffmann R Brian, Wagner R Jordan, Prisco R Antony, Janiak

Agnieszka, Greene S Andrew (2013). Vascular endothelial growth factor- A signaling in bone marrow- derived endothelial progenitor cells exposed to hypoxic stress, Physiological Genomics 45(21):1021-1034

Holinstat Michael (2017). Normal platelet function, Cancer and Metastasis Reviews Volume 13, Issue 2, 195-198

Hongshuai Li, Bingyun Li (2013). PRP as a new approach to prevent infection: Preparation and in vitro antimicrobial properties of PRP, Journal of Visualizes Experiments 74:1-7

Horigushi Masahito, Ota Mitsuhiro, Rifkin B. Daniel (2012). Matrix control of transforming growth factor – β function, Journal of Biochemistry 152(4):321-329

Iesari Samuele, Lai Quirino, Rughetti Anna, Dell'Orso Luigi, Clemente Katia, Famulari Antonio, Pisani Francesco, Favi Evaldo (2017). Infected non healing wound in a kidney transplant recipient: Successful treatment with topical homologous platelet rich gel, *Experimental and Clinical Transplantation* 2:222-225

International Celluar Medicine Society (ICMS) (2011). Platelet rich plasma, Guidelines Section VIII

Jee Cho-Hee, Eom Na-Young, Jang Hyo-Mi, Choi Eul- Soo, Hong Li-Hwa, Kang Byeong –Teck, Jeong Dong Wook, Jung Dong-In (2016). Effect of autologous platelet rich plasma application on cutaneous wound healing in dogs, *Journal Vet Science* 17(1):79-87

Kandadi R Machender, Stratton S Matthew, Ren Jun (2010). The role of Src homology 2 containing protein tyrosine phosphatase 2 in vascular smooth muscle cell migration and proliferation, *Acta Pharmacologica Sinica* 31:1277-1283

Kaplan D.R., Chao F.C., Stiles C.D., Antoniades H.N., Scher C.D. (1979). Platelet alpha granules contain growth factors for fibroblasts, *Blood* 53 (6):1043-1052

Kaushansky Kenneth (2005). The molecular mechanisms that control thrombopoiesis, *The Journal of Clinical Investigation* 115 (12): 3339-3347

Kim E.S., Kim J.J, Park E.J. (2010). Angiogenic factor- enriched platelet – rich plasma enhances in vivo bone formation around alloplastic graft material, *The Journal of Advanced Prosthodontics* 2:7-13

Leopold L.Philip, Vincent Jan, Wang Hongjun (2012). A comparison of epithelial- to – mesenchymal transition and re- epithelialization, *Semin Cancer Biol.* 22(5-6):471-483

Liao Han-Tsung, Kacey G. Marra, Rubin J Peter (2014). Application of Platelet-Rich Plasma and Platelet- Rich Plasma in Fat Grafting: Basic Science and Literature Review, *TISSUE ENGINEERING: Part B*

Liao Han-Tsung, Marra G. Kacey, Rubin J. Peter (2014). Application of Platelet-Rich Plasma and Platelet–Rich Fibrin in Fat Grafting: Basic Science and Literature Review, *Tissue Engineering. Part B, Reviews* 20(4):267-276

Lieberman R. Jay, Daluiski Aaron, Einhorn A. Thomas (2002). The Role of Growth Factors in the Repair of Bone: Biology and Clinical Applications, *J. Bone Joint Surg.* 84:1032-1044

- Lubkowska A., Doleqowska B., Banfi G.** (2012). Growth factors content in PRP and their applicability in medicine, *Journal of Biological Regulators and Hemostasis Agents* 26 (2 Supp.): 3S-22S
- Macfarlane R.G.** (1964). An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and it's Function as a Biochemical Amplifier, *Nature* 2, 02:498-499
- Magalon J., Chateau L.A., Bertrand B., Louis L.M., Silvestre A., Giraudo L., Veran J., Sabatier F.** (2016). DEPA classification: a proposal for standardising PRP use and a retrospective application of available devices, *BMJ Open Sport Exerc. Med.* 2:e000060
- Marck E. Rose, Middelkoop Esther, Brrederveld S. Roelf** (2014). Considerations on the use of platelet rich plasma, specifically for burn treatment, *Journal of Burn Care & Research* 35(3):219-227
- Margolis D.J., Kantar J., Santana B.L., Berlin J.A.** (2001). Effectiveness of platelet releasate for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers, *Diabetics Care* 24:483-8
- Marques L.F., Stessuk T., Camargo I.C., Sabeh J.N., dos Santos L., Ribeiro- Paes J.T.** (2015). Platelet – rich plasma (PRP): methodological aspects and clinical applications, *Platelets* 26:101-113
- Martinez E. Constanza, Smith C. Patricio, Palma Alvarado A. Veronica** (2015). The influence of platelet derived products on angiogenesis and tissue repair: a concise update, *Frontiers in Physiology* 6:290
- Marx E. Robert** (2004). Platelet -rich plasma: evidence to support its use, *J. Oral. Maxillofacial. Surg.* 62(4):489-96
- Marx E. Robert** (2001). Platelet-rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP, *Implant Dentistry* Vol.10.No 4
- Marx R.E., Garg A.K.** (2005). Dental and craniofacial applications of platelet rich plasma, *British Dental Journal*, Vol. 199, No 12
- Marx R.E.** (2000). Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet –rich plasma preparation, *Journal Oral Maxillofacial Surgery* 58:300-301
- 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.* (6):638-646
- Neffa Pinto Jane Marcy, Soares Pizani Natassia, Chung kang Hye, Knecht Silva Luis Augusto** (2014). Application of platelet rich plasma in the

treatment of chronic skin ulcer- Case report, An. Bras. Dermatology 89(4):638-40

Nicholidakis D., Jansen J.A. (2008). The biology of platelet-rich plasma and its application in oral surgery: literature review, Tissue Engineering. Part B, Reviews 14(3):249-58

Oklu Rahmi, Walker G. Thomas, Wicky Stephan, Hesketh Robin (2010). Angiogenesis and Current Antiangiogenic Strategies for the Treatment of Cancer, Journal of Vascular and Interventional Radiology 21(12):1791-805

Park Woo Jin, Hwang Rim Seung, Yoon In-Soo (2017). Advanced growth factor delivery systems in wound management and skin regeneration, Molecules 22 (8):1259

Pastar Irena, Stojadinovic Olivera, Yin C. Natalie, Ramirez Horacio, Nusbaum G. Aron, Sawaya Andrew, Patel B. Shailee, Khalid Laiqua, Isseroff R. Rivkah, Tomic-Canic Marjana (2014). Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review, Advances in Wound Care 3(7):445-464

Pavlovic Voja, Cirin Milan, Javonovic Vladimir, Stojanovic Predrag (2016). Platelet rich plasma: a short overview of certain bioactive components, Open Medicine (Warsaw, Poland) 11:242-247

Piccin A., Di Pierro A.M., Canzian L., Primerano M., Corvetta D., Negri G., Mazzoleni G., Gastl G., Steurer M., Gentilini I., Eisendle K., Fontanella F. (2017). Platelet gel: a new therapeutic tool with great potential, Blood Transfusion 15:333-40

Pilatova Katerina, Greplova Kristina, Demlova Regina, Bencsikova Beatrix, Lakka Klement Giannoula, Zdrzilova –Dubska Lenka (2013). Role of platelet chemokines, PF 4 and CTAP-III, in cancer biology, Journal of Hematology & Oncology 6:42

Poniatowski A. Lukasz, Wojdasiewicz Piotr, Gasik Robert, Szukiewicz Dariusz (2015). Transforming Growth Factor Beta Family: Insight into the Role of Growth Factor in Regulation of Fracture Healing Biology and Potential Clinical Applications, Mediators of Inflammation 2015:137823

Raju Rajesh, Palapetta Shyam Mohan, Sandhya K. Varot, Sahu Apeksha, Alipoor Abbas, Balakrishnan Lavanya, Advani Jayshree, George Bijesh, Kini K. Ramachandra, Geetha P.N., Prakash S. H., Keshava Prasad S.T., Chang Yu-Jung, Chen Linyi, Pandey Akhilesh, Gowda Harsha (2014). A Network Map of FGF-1 / FGFR Signaling System, Hindawi Publishing Corporation Journal of Signal Transduction Article ID 962962, 16 pages

Rozman P., Bolta Z. (2007). Use of platelet growth factors in treating wounds and soft- tissue injuries, *Acta Dermatoven APA* 16(4):156-165

Rubin J.S., Bottaro D.P., Chedid M., Miki T., Ron P., Cheon G., Taylor W.G., Fortney E., Sakata H., Finch P.W. (1995). Keratinocyte growth factor, *Cell Biology International* 19(5):399-411

Salamanna Francesca, Veronesi Francesca, Maglio Melania, Bella Della Elena, Sartori Maria, Fini Milena (2015). New emerging strategies in Platelet-Rich Plasma application in musculoskeletal Regenerative procedures: General Overview on Still Open Questions and Outlook, Hindawi Publishing Corporation *BioMed Research International* Article ID 846045, 24 pages

Saluja Harish, Dehane Vipin, Mahindra Uma (2011). Platelet- rich Fibrin: A second generation platelet concentrate and a new friend of oral and maxillofacial surgeons, *Ann Maxillofacial Surg.* 1:53-7

Sanchez-Gonzalez Dolores Javier, Mendez- Bolaina Enrique, Trejo-Bahena Nayeli Isabel (2012). Platelet- Rich Plasma Peptides: Key for Regeneration, Hindawi Publishing Corporation *International Journal of Peptides* Article ID 532519, 10 pages

Schilephake H. (2002). Bone growth factors in Maxillofacial Skeletal Reconstruction, *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 31(5): 469-84

Scimera L. Christy, Bharara Manish, Fisher K. Timothy, Kimbriel Heather, Armstrong G. David (2010). Novel use of platelet- rich plasma to augment curative diabetic foot surgery, *Journal of Diabetes Science and Technology* 4(5):1121-1126

Shahid Mohammad, Kundra Rik (2017). Platelet-rich plasma (PRP) for knee disorders, *Effort open reviews* 2:28-34

Shen Congcong, Sun Linlin, Zhu Ningwen, Qi Fashi (2017). Kindlin-1 contributes to EGF-induced re- epithelialization in skin wound healing, *International Journal of Molecular Medicine* 39:949-959

Singer A.J., Clark R.A. (1999). Cutaneous wound healing, *The New England journal of medicine* 341(10):738-46

Singer S.J., Nicolson G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science (New York, N.Y.)* 175(4023):720-31

Smith G. Rick, Gassmann J. Craig, Campbell S. Mark (2007). Platelet rich plasma: properties and clinical applications, *The Journal of Lancaster General Hospital* 2(2):73-77

Stone L. William, Bhimji S. Steve (2017). Physiology, Growth Factor, Stat Pearls

Suthar Manish, Gupta Saniya, Bukhari Suhail, Ponemone Venkatesh (2017). Treatment of chronic non-healing ulcers using autologous platelet rich plasma: a case report, *Journal of Biomedical Science* 24:16

Tang Jinhya, Liu Na, Zhuang Shougang (2013). Role of epidermal growth factor receptor in acute and chronic kidney injury, *Kidney International* 85 (5): 804-810

Tang Xiaopeng, Liu Hu, Yang Shufen, Zuohua Li, Zhong Jinfeng, Fang Rejun (2016). Epidermal Growth Factor and Intestinal Barrier Function, Hindawi Publishing Corporation *Mediators of Inflammation* Article ID 1927348, 9 pages

Teodoreanu Razvan Nicolae, Popescu Serban Arghir, Lascar Ioan, Vulturescu Virginia, Grigore Alice (2014). Therapeutic protocol using growth factors in electrocution wounds- case reports and review of the literature, *Rom. J. Morphology. Embryol.* 55(2):473-482

Textor Jamie (2014). Platelet-Rich Plasma (PRP) as a Therapeutic Agent: Platelet Biology, Growth Factors and a review of the Literature, Berlin, Platelet Rich Plasma σελ.61-94

Tzeng Yuan-Sheng, Deng Shou-Cheng, Wang Chih-Hsing, Tsai Jui-Che, Chen Tim-Mo, Burnouf Thierry (2013). Treatment of non-healing diabetic lower extremity ulcers with skin graft and autologous gel: A case report, Hindawi Publishing Corporation *BioMed Research International* Article ID 837620, 9 pages

Urist M.R. (1970). The substratum for bone morphogenesis. *Symp. Soc. Dev. Biol.* 29:125-63

Vaishnavi C., Mohan B., Narayanan L. Lakshmi (2011). Treatment of endodontically induced periapical lesions using hydroxyapatite, platelet-rich plasma and a combination of both: An vivo study, *Journal of Conservative Dentistry* 14(2):140-146

Velier M., Magalon J., Dumas A., Cassar M., Francois A., Ghazouane A., Philandrianos C., Bertrand B., Frere D., Bernot D., Villani P., Dignat F. George, Sabatier F. (2017). Production of platelet rich plasma gel from elderly patients under antithrombotic drugs: Perspectives in chronic wounds care, *Platelets early on line*: 1-8 Volume 20, Number 4

- Von Hundelshausen Philipp, Peterson Frank, Brandt Ernst** (2007). Platelet-derived chemokins in vascular biology, *Thromb. Haemost.* 97:704-713
- Walsh T.G., Metharom P., Berndt M.C.** (2015). The functional role of platelets in the regulation of angiogenesis, *Platelets* 26(3): 199-211
- Wang Weiye, Xu Suowen, Yin Meimei, Jin Zheng Gen** (2015). Essential role of Gab 1 tyrosine phosphorylation in growth factor- mediated signaling and angiogenesis, *International Journal Cardiolologic* 181:180-184
- Waters J.H., Roberts K.C.** (2004). Database review of possible factors influencing point of care platelet gel manufacture 36(3):250-4
- Webrich Gernot, Kleis K.G. Wilfried, Hafner Gerd, Hitzler E. Walter** (2002). Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex and platelet count, *Journal of Cranio- Maxillo -Facial Surgery* 30(2):97-102
- Webrich Gernot, Kleis K.G. Wilfried** (2002). Curasan PRP kit vs PCCS system. Collection efficiency and platelet counts of two different methods for the preparation of platelet- rich plasma, *Clin. Oral Impl. Res.* 13:437-443
- Whitman DH, Berry RL, Green DM** (1997). Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery, *J .Oral. Maxillofacial. Surg.* 55:1294-1299
- Zapata M.J. Martinez, Carvajal A.J. Marti, Montoya S. Bellmunt, Cid J., Urrutia G.** (2013). Autologous platelet rich plasma for treating surgical wounds (Protocol), *Cochrane Database of Systematic Reviews Issue 9.* Art. No.:CD010739
- Zapata Martinez, Carnajal Marti, Sola I., Exposito J.A., Bolibar I., Rodriguez L., Garcia J., Zaror C.** (2016). An autologous platelet rich plasma for the treatment chronic wounds (Reniew), *Cochrane Database of Systematic Reviews* 5, Art No: CD006899
- Zhang Ning, Wu Yong-Ping, Qian Sheng-Jun, Teng Chong, Chen Shuai, Li Hang** (2013). Research Progress in the Mechanism of Effect of PRP in Bone Deficiency Healing, *Hindawi Publishing Corporation the Scientific World Journal Article ID 134582*, 7 pages