

STRESZCZENIE PRACY DOKTORSKIEJ

Tytuł: Kliniczne i molekularne aspekty leczenia entezopatii nadkłykcia bocznego kości ramiennej z użyciem autologicznego osocza bogatopłytkowego

Doktorant: Maciej Dejneki

Promotor: prof. dr hab. n. med. Paweł Reichert

STRESZCZENIE

Wstęp

Entezopatia nadkłykcia bocznego kości ramiennej, powszechnie znana jako „łokiec tenisisty” jest częstym schorzeniem znacznie utrudniającym codzienne funkcjonowanie. W przypadku gdy odpoczynek, leki przeciwbólowe, ćwiczenia i fizykoterapia nie przyniosą oczekiwanej ulgi, choroba może przeistoczyć się w proces przewlekły trwający od kilku miesięcy do kilku lat. Aktualnie nie istnieje jedna skuteczna terapia, która przyniosłaby szybką pomoc takim pacjentom. Jedną z wielu proponowanych metod leczenia jest iniekcja autologicznego osocza bogatopłytkowego (PRP). Jej istotą jest dostarczenie do zmienionej chorobowo tkanki wysokiego stężenia czynników wzrostu zawartych w płytkach krwi, które poprzez swoje oddziaływanie parakryne stymulujące procesy regeneracyjne. Istnieją liczne kontrowersje związane ze skutecznością tej metody wynikające często ze sprzecznych wyników badań klinicznych. Do przyczyn tego stanu można zaliczyć zarówno różnice w składzie komórkowym i molekularnym osocza poszczególnych pacjentów jak i różnice w sposobach przygotowywania PRP, co w konsekwencji może powodować uzyskanie preparatów o zupełnie innej zawartości składników biologicznie aktywnych.

Cel pracy

Celem powyższej pracy doktorskiej było ustalenie czy istnieje zależność pomiędzy zawartością składników biologicznie aktywnych w PRP, takich jak składniki komórkowe i molekularne (czynniki wzrostu, cytokiny zapalne) a skutecznością kliniczną leczenia iniekcyjnego z jego pomocą pacjentów z entezopatią nadkłykcia bocznego kości ramiennej. Dodatkowo za cel obrano ocenę różnic zawartości składników biologicznie aktywnych w preparatach PRP przygotowanych z użyciem różnych dostępnych metod.

Material i metody

W pierwszym etapie wykonano badania porównujące zawartość składu komórkowego oraz wybranych czynników wzrostu i cytokin zapalnych w próbkach PRP przygotowanych z użyciem czterech różnych metod. Analizy stężenia cząsteczek parakrynych dokonano z wykorzystaniem immunofluorescencyjnej metody multipleksowej LEGENDplex™ (BioLegend, USA) i cytometrii przepływowej. Na podstawie badań przedklinicznych wytypowano najbardziej optymalną metodę pozyskiwania PRP. W kolejnym etapie wykorzystano PRP w ramach iniekcyjnego leczenia 30 pacjentów z entezopatią nadkłykcia bocznego kości ramiennej. Próbkę krwi każdego pacjenta oraz uzyskanego z nich PRP poddano analizie laboratoryjnej na zawartość składników biologicznie aktywnych. Skuteczność leczenia oceniano poprzez określenie zmiany natężenia dolegliwości bólowych w skali VAS i badaniem

algometrycznym, zmianę siły wybranych grup mięśniowych kończyny górnej w badaniu dynamometrycznym jak również zmiany w punktacji uzyskanej w kwestionariuszach funkcjonalnych (Disability of Arm, Shoulder and Hand (DASH), Patient Rated Tennis Elbow Evaluation (PRTEE)). W trakcie analizy statystycznej ustalono różnice ilościowe i jakościowe pomiędzy zawartością składników biologicznie aktywnych we krwi pacjentów oraz uzyskanym z niej PRP, a także określono ich zależność w stosunku do skuteczności klinicznej leczenia pacjentów w trakcie 3 miesięcznej obserwacji.

Wyniki

W próbkach PRP przygotowanych z użyciem czterech różnych komercyjnych zestawów wykazano istotne różnice w zawartości płytek krwi, białych i czerwonych krwinek, czynników wzrostu, cytokin zapalnych oraz powtarzalności uzyskiwanych zagęszczeń. Spośród badanych zestawów do dalszych badań wybrano Mini GPS III Platelet Concentration System (Biomet Inc., USA) jako zestaw pozwalający na pozyskiwanie PRP o powtarzalnie wysokiej zawartości płytek krwi (5-krotny wzrost stężenia w porównaniu do krwi pełnej) i czynników wzrostu. Pomędzy próbkami osocza a przygotowanym z niego PRP stwierdzono występowanie istotnych różnic w zawartości pięciu z sześciu badanych czynników wzrostu oraz pięciu z trzynastu cytokin zapalnych. Stwierdzono również występowanie istotnych korelacji pomiędzy zawartością składników komórkowych a stężeniem części z badanych czynników wzrostu i cytokin zapalnych. W badaniu oceniającym skuteczność kliniczną leczenia entezopatii nadkłykcia bocznego kości ramiennej uzyskano poprawę funkcjonalną oraz redukcję dolegliwości bólowych (Minimal Clinically Important Difference) po 3 miesiącach u większości badanych pacjentów. Stwierdzono występowanie istotnej dodatniej korelacji pomiędzy wielkością uzyskanego zmniejszenia dolegliwości bólowych a zawartością w PRP płytek krwi, naskórkowego czynnika wzrostu (EGF), naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu oraz płytkopochodnych czynników wzrostu. Stężenie EGF w PRP pozytywnie korelowało również z poprawą funkcjonalną mierzoną przy pomocy kwestionariusza PRTEE, poprawą siły uścisku oraz siły prostowników nadgarstka.

Wnioski

Uzyskane wyniki badań przedklinicznych potwierdziły występowanie istotnych różnic pomiędzy zawartością składników biologicznie aktywnych w PRP przygotowanym przy użyciu czterech różnych protokołów. Przeprowadzone analizy laboratoryjne wykazały również, że PRP przygotowane z pomocą dostępnych komercyjnie zestawów może stanowić efektywne źródło molekuł o działaniu parakrynnym biorących udział w fizjologicznych procesach naprawczych. W przeprowadzonym badaniu klinicznym iniekcje PRP okazały się skuteczną i bezpieczną metodą leczenia pacjentów z entezopatią nadkłykcia bocznego kości ramiennej. Wykazano również, iż zawartość płytek krwi oraz stężenie czynników wzrostu w zastosowanym do iniekcji PRP pozytywnie koreluje z uzyskaną poprawą kliniczną.

ABSTRACT

Introduction

Lateral humeral enthesopathy, widely known as "tennis elbow," is a common condition that significantly impairs daily functioning. When rest, pain medications, exercise, and physical therapy fail to bring the expected improvement, the condition can develop into a chronic process lasting from several months to several years. Currently, there is no single effective therapy that will bring quick relief to such patients. One of the many proposed treatment methods is the injection of autologous platelet-rich plasma (PRP). The essence of this method is to provide the affected tissue with a high concentration of growth factors contained in platelets, which by their paracrine action stimulate local regenerative processes. There are numerous controversies related to the effectiveness of this method, often resulting from contradictory results of clinical studies. The reasons for this state include differences in the cellular and molecular composition of plasma from individual patients and differences in the methods of PRP preparation, which may result in the final product with a completely different content of biologically active components.

Purpose of the study

The aim of this dissertation was to determine whether there is any correlation between the content of biologically active components in PRP, such as cells and molecules (growth factors, inflammatory cytokines), and the clinical efficacy of PRP-based injection treatment of patients with lateral humeral enthesopathy. The additional aim was to evaluate the differences in the content of biologically active components in PRP samples prepared with the use of different available methods.

Material and methods

In the first stage, we performed studies comparing the content of cellular composition, selected growth factors and inflammatory cytokines in PRP samples obtained using four different methods. The concentrations of paracrine molecules were analyzed using multiplex bead immunoassays that use fluorescence-encoded beads LEGENDplex™ (BioLegend, USA) and flow cytometer measurements. Based on preclinical studies, the most optimal method for obtaining PRP was selected. In the next step, PRP was used for the injection treatment of 30 patients with lateral humeral enthesopathy. Blood samples from each patient and the PRP obtained from them were analyzed for the content of biologically active components. The efficacy of the treatment was evaluated by determining the change in pain intensity according to VAS scale and algometric examination, the change in strength of selected muscle groups of the upper limb according to dynamometric examination, and the change in scores obtained in functional questionnaires (Disability of Arm, Shoulder and Hand (DASH) and Patient-Rated Tennis Elbow Evaluation (PRTEE)). Statistical analysis was performed to determine quantitative and qualitative differences between the content of biologically active components in the patients' blood and the PRP obtained from it and to determine their relation to the clinical efficacy of the patients' treatment during the 3-month follow-up.

Results

PRP samples prepared using four various commercial systems showed significant differences in the content of platelets, white and red blood cells, growth factors, inflammatory cytokines and repeatability of the obtained concentrations. Among the tested kits, the Mini GPS III Platelet Concentration System (Biomet Inc., USA) was selected for further studies as

a system that allows to obtain PRP with a repetitively high concentration of platelets (5 times compared to the baseline of whole blood) and growth factors. Significant differences in the content of five out of six growth factors tested and five out of thirteen inflammatory cytokines were found between plasma samples and the PRP prepared from them. Significant correlations were also found between the content of cellular components and the concentration of some of the growth factors and inflammatory cytokines tested. In a study that evaluated the clinical efficacy of lateral humeral enthesopathy treatment, functional improvement and pain reduction (Minimal Clinically Important Difference) were observed after 3 months in the majority of patients. There was a significant positive correlation between the amount of pain reduction and the concentration of platelets, epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor, and platelet-derived growth factors in PRP. The concentration of EGF in PRP was also positively correlated with the functional improvement measured by the PRTEE questionnaire, the improvement in grip strength and the strength of wrist extensors.

Conclusions

The results of the preclinical studies confirmed the existence of significant differences in the content of biologically active components in PRP prepared using four different protocols. Laboratory analyses also demonstrated that PRP prepared with commercially available kits may be an effective source of paracrine molecules involved in physiological repair processes. In the clinical trial, PRP injections proved to be an effective and safe treatment option for patients with lateral humeral enthesopathy. It has also been shown that the platelet content and the concentration of growth factors in the injected PRP positively correlate with clinical improvement.