

تسریع التیام شکستگی با استفاده از پودر لیوفیلیزه L-PRF زنونژیک (اسب) در ترمیم استخوان در مدل حیوانی موش صحرائی

چکیده:

مقدمه: ضایعات استخوانی ناشی از تروما، موقعیت های پاتولوژیک، یا مداخلات جراحی اغلب نیازمند راهکارهای پیشرفته ترمیمی هستند، خصوصاً زمانی که بدن به خودی خود قادر به ترمیم ضایعه بحرانی استخوان نمی‌باشد. در میان فاکتورهای ترمیمی، فیبرین غنی از پلاکت و لوکوسیت (L-PRF) به دلیل خاصیت ترمیم استخوان آن در هر دو فرم خودی و غیر خودی مورد توجه ویژه ای قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: برای بررسی L-PRF لیوفیلیزه گرفته شده از خون اسب، از موش های صحرائی نر بالغ استفاده شد. موش ها به ۴ گروه تقسیم شدند که در یکسری از گروه ها بر روی ضایعه ای که در استخوان زند زبرین ایجاد شده بود، بافت خودی استخوان قرار گرفت. L-PRF از خون اسب تهیه شد و بعد از لیوفیلیزه کردن در ناحیه ضایعه قرار داده شد. سپس روند ترمیم استخوان بوسیله رادیولوژی و هیستوپاتولوژی بررسی شد و مورد تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج و بحث: تفسیرهای رادیوگرافی و هیستوپاتولوژی نشان دادند که گروه اتوگرافت + L-PRF بیشترین میزان ترمیم استخوان، با بالاترین امتیاز Lane and sandhu، را داشته است. این گروه در مقایسه با گروه L-PRF و گروه خالی پیشرفت بیشتری در تبدیل بافت غضروفی به استخوانی داشته است. گروه اتوگرافت نیز نسبت به گروه L-PRF برتری مشخصی داشت. در این تحقیق گروه خالی نتوانست بافت استخوانی مورد نیاز برای ترمیم ضایعه را تشکیل دهد و تنها بافت پیوندی تشکیل شد. بدین ترتیب اثر هم افزایی L-PRF با گرافت خودی استخوان به خوبی مشخص شد.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه L-PRF به دست آمده از خون اسب خصوصاً در موارد همراهی با اتوگرافت خودی، تاثیر قابل توجهی در ترمیم ضایعات بحرانی استخوان زند زبرین در موش های صحرائی داشته است.

واژگان کلیدی: فیبرین غنی از پلاکت و لوکوسیت (L-PRF)، L-PRF غیر خودی، ترمیم استخوان، ضایعه بحرانی استخوان، موش صحرائی، رادیولوژی، هیستوپاتولوژی

پذیرش مقاله: ۴۸ روز قبل از چاپ

دکتر سبحان رضویان،^۱ دکتر امین بیغم صادق،^۲ دکتر احمد عربان،^۳ دکتر ابوتراب طباطبایی نائینی

مقدمه

بافت استخوانی میتواند تحت تاثیر عوامل مختلفی دچار آسیب شود از جمله تروما، موقعیت های پاتولوژیک و مداخلات جراحی^(۱). پاسخ بیولوژیکی بدن به این آسیب ها بسیار پیچیده و شامل بکارگیری واسطه های مختلف مولکولی و سلولی لازم برای ترمیم استخوان است^(۲-۵). محققان با استفاده از مکانیسم های ترمیمی داخلی و فاکتورهای خودی، پیشرفت قابل توجهی در ترمیم استخوان داشته اند^(۶). تحقیقات اخیر نشان داده اند که بیومتریال ها تاثیر بسزایی در ترمیم ضایعات بحرانی استخوان دارند^(۷). ضایعه بحرانی ضایعه ای است که بدن به خودی خود قابلیت ترمیم آن را نداشته و نیاز به مداخله جراحی وجود دارد^(۸). در میان بیومتریال های استفاده شده، L-PRF نقش قابل توجهی در ترمیم استخوان داشته است خصوصاً در دندانپزشکی و جراحی های فک و دهان^(۹-۱۷).

فیبرین، فرم فعال شده ی مولکول فیبرینوژن می‌باشد که نقش اساسی در تجمع پلاکتی و انعقاد خون دارد. تحقیقات نشان داده اند که در نتیجه سانتریفیوژ خون میتواند فاکتوری به نام L-PRF را استخراج کرد که نقش خوبی در ترمیم و بازسازی استخوان دارد. L-PRF نسل جدیدی از کنسانتره های پلاکتی محسوب می‌شود که در فرآیند ساخت آن هیچ گونه ماده ضد انعقاد و یا ماده خارجی دیگری استفاده نمی‌شود و به همین دلیل ساختار فیبرینی طبیعی و فاکتور های داخل خود را به خوبی حفظ می‌کند^(۱۸).

مطالعه ای در سال ۲۰۱۲ نشان داد که L-PRF می‌تواند در داخل ماتریکس فیبرینی خود مقادیر قابل توجهی از فاکتور های رشد را حبس کند و قابلیت خود در ترمیم ضایعات استخوانی و جراحی های ارتوپدی را افزایش دهد^(۱۹). همچنین مطالعه ای در سال ۲۰۲۲ نشان داد که L-PRF نقش قابل توجهی در ترمیم ضایعات مجسمه انسان ایفا کرده است و در مقایسه با روش های مرسوم ترمیمی دیگر عملکرد بهتری در نتایج مطالعات بالینی داشته است^(۲۰).

۱. بخش جراحی و رادیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز
۲. بخش پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز

نویسنده مسئول:

دکتر امین بیغم صادق

Email address:

dr.bigham@gmail.com

مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ قرار گرفت. بعد از اتمام سانتریفیوژ سه لایه جداگانه در لوله‌ها ایجاد شد: لایه بالایی پلاسمای بدون سلول، لایه میانی حاوی L-PRF، و لایه پایینی حاوی اریتروسیت‌ها. لخته L-PRF با استفاده از یک پنس استریل با دقت از بقیه محتویات، در شرایط کاملاً استریل، جدا شد^(۱۸،۲۳).

تهیه L-PRF لیوفیلیزه

لخته‌های L-PRF تازه بدست آمده از خون اسب در لوله‌های استریل قرار گرفتند. به طوری که تنها یک دهم هر لوله از نمونه پر شد. لوله‌ها با پارافیلیم بسته شدند در حالیکه بر روی آن چند عدد سوراخ تعبیه شد تا جابجایی اندک هوا وجود داشته باشد و نمونه‌ها حین فرآیند لیوفیلیزه کردن به بیرون پرت نشوند. نمونه‌ها یک شب در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و سپس در دستگاه لیوفیلیزه قرار گرفتند. پروتوکول دستگاه به این صورت تنظیم شد:

Cold trap temperature: $-45^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, Initial vacuum pressure: 0.1 mbar, Primary drying time: 17 h, Final vacuum pressure: 0.001 mbar, Secondary drying time: 8 h

بعد از اتمام فرآیند، پودر L-PRF به دست آمده جمع‌آوری شد و در لوله‌های استریل و در بسته به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد.

فرآیند جراحی

حیوانات با استفاده از ترکیبی از داروهای کتامین، آسه پرومازین و دیازپام، بیهوشی عمومی تزریقی دریافت کردند. موهای ناحیه جراحی بر روی دست چپ تراشیده شد و آماده‌سازی جراحی انجام شد. برشی طولی بر روی سطح جلویی-جانبی دست ایجاد شد و قسمت میانی استخوان زنده زبرین در معرض مشاهده قرار گرفت. بوسیله مته ای ۳ میلی متری، ضایعه ای به همان اندازه بر روی استخوان زنده زبرین ایجاد شد در حالیکه قطر خود استخوان در حدود ۱/۲ میلی متر بود. به همین ترتیب و طبق گفته‌های قبلی حیوانات در چهار گروه مجزا تقسیم شدند. محل برش در شرایط کاملاً استریل با یک بخیه ضربدری بسته شد. در نهایت برای جلوگیری از عفونت بعد از جراحی، ۱ میلی لیتر داروی انزوفلوکساسین ۱۰ درصد در آب رقیق شد و به حیوانات تجویز شد.

بررسی رادیولوژی

بعد از اعمال بیهوشی در حیوانات، عکس رادیولوژی از دست چپ در روزهای ۳۵ و ۶۴ بعد از جراحی در نمای جانبی توسط دستگاه رادیولوژی دیجیتال گرفته شد. فاصله منبع تا فیلم ۷۰ سانتی متر تنظیم شد و اشعه x-ray نیز بر روی 45kV و 20mA/s تنظیم شد. رادیوگراف‌های گرفته شده بوسیله سیستم تغییر یافته Lane and Sandhu ارزیابی و امتیاز بندی شد.

بررسی هیستوپاتولوژی

در روز ۶۴، تمام حیوانات به روش انسانی معدوم شدند و نمونه‌های استخوانی تهیه و به آزمایشگاه تخصصی پاتولوژی برای ارزیابی

L-PRF در ترکیب با تکنیک‌های دیگر ترمیمی قابلیت بیشتری در فرآیند‌های ترمیمی و بازسازی استخوان از خود نشان داده است، برای مثال مطالعه Sadeghian et al. نقش مثبت L-PRF در ترکیب با photobiomodulation therapy (PBMT) را در فرآیند ترمیم استخوان نشان داده است^(۲۱). بیشتر تحقیقات بر روی L-PRF خودی تمرکز داشته‌اند، در صورتی که تحقیقات اخیر نشان داده‌اند که L-PRF غیر خودی نیز نقش قابل توجهی در ترمیم و بازسازی ضایعات بحرانی استخوان ایفا می‌کند^(۲۲). در این مطالعه از پودر L-PRF لیوفیلیزه بدست آمده از خون اسب استفاده شده است تا تاثیر آن بر ترمیم ضایعات بحرانی ایجاد شده بر استخوان زنده زبرین موش صحرایی مورد ارزیابی قرار بگیرد. تا امروز آخرین تحقیقی که از L-PRF غیر خودی استفاده کرده است، مطالعه Khanbazi et al. است که از L-PRF بدست آمده از خون گاو استفاده شده است^(۲۳).

مواد و روش‌ها

مدل حیوانی

در این مطالعه از موش‌های صحرایی سفید نر بالغ نژاد Wistar استفاده شد. این مدل حیوانی به دلیل تشابه‌های فیزیولوژیک و بیولوژیک زیادی که با بدن انسان دارد و همچنین امکان ارزیابی آسانی که در اختیار محقق قرار می‌دهد، در تحقیقات بسیاری مورد استفاده قرار می‌گیرد^(۲). تعداد ۲۰ عدد موش صحرایی سالم با وزن ۱۸۰-۲۰۰ گرم در این مطالعه به کار گرفته شد.

گروه بندی حیوانات

حیوانات به صورت تصادفی در ۴ گروه مختلف تقسیم شدند (هر گروه ۵ عدد)، و در قفس‌های مخصوص آزمایشگاهی در یک محیط قابل کنترل قرار گرفتند. حیوانات دسترسی آزاد به پلت استاندارد آزمایشگاهی و آب داشتند. بعد از یک روز تطبیق حیوانات با محیط، و بررسی سلامت آن‌ها، همگی علامت گذاری شدند و به بخش جراحی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز انتقال یافتند. این مطالعه در ۴ گروه انجام شد: گروه اول (کنترل منفی): ضایعه استخوانی بدون درمان. گروه دوم (کنترل مثبت): ضایعه استخوانی به همراه گرفت خودی استخوان بدست آمده از محل ضایعه. گروه سوم: ضایعه استخوانی به همراه پودر L-PRF لیوفیلیزه بدست آمده از خون اسب در ترکیب با گرفت خودی. گروه چهارم: ضایعه استخوانی فقط به همراه پودر L-PRF.

تهیه L-PRF غیر خودی

بعد از بررسی سلامت یکی از اسب‌های نگهداری شده در اصطبل دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، ۲۰ میلی لیتر خون از آن گرفته شد و در لوله مخصوص بدون هیچ ماده ضد انعقادی قرار گرفت. نمونه خون در کمتر از ۱ دقیقه به آزمایشگاه برده شد و بلافاصله در دستگاه سانتریفیوژ طی

Kruskal Wallis در مواردی که اختلاف معنی داری وجود داشت ($p \leq 0/05$)، تست Mann-Whitney U انجام گرفت. بر طبق یافته جدول، گروه خالی در مقایسه با گروه اتوگرافت و گروه اتوگرافت+L-PRF عملکرد ضعیف تری هم در روز ۳۵ و هم در روز ۶۴ داشته است. در روز ۳۵ گروه اتوگرافت عملکرد بهتری در مقایسه با گروه L-PRF نشان داده است ($p \leq 0/05$). همچنین هم در روز ۳۵ و هم ۶۴، گروه اتوگرافت+L-PRF عملکرد بسیار بهتری را نسبت به گروه L-PRF نشان داده است که امتیاز میانگین ۸ را هم کسب کرده است. این نتایج نشان می‌دهد که گروه اتوگرافت+L-PRF پاسخ ترمیمی بهتری را ارائه داده است. در میان باقی گروه‌ها تغییر معنی داری مشاهده نشد ($P > 0/05$).

یافته های هیستوپاتولوژی

ارزیابی پاتولوژی که در روز ۶۴ بعد از جراحی انجام گرفت نشان داد: در گروه خالی، بافت پیوندی نامنظم در محل ضایعه تشکیل شد. حواشی ضایعه دارای سلول‌های فیبروبلاست، فیبروسیت و کلاژن بود ولی هیچ نشانه‌ای از تشکیل استخوان یا غضروف در این گروه مشاهده نشد (شکل ۱). در گروه اتوگرافت، سلول‌های کندروسیت بافت غضروفی و کانال‌های هاورس بافت استخوانی قابل مشاهده هستند (شکل ۲). در گروه اتوگرافت+L-PRF بافت استخوانی نابالغ تشکیل شد و روند تبدیل بافت غضروفی به استخوانی مشهود است (شکل ۳). در گروه L-PRF، بافت پیوندی و غضروفی در محل ضایعه حضور داشتند و بافت استخوانی اسفنجی ابتدایی مشاهده شد (شکل ۴). نتایج ارزیابی هیستوپاتولوژی گروه‌ها در جدول ۳ آمده است. داده‌ها ابتدا توسط تست Kruskal-Wallis مورد ارزیابی قرار گرفتند و در مواردی که اختلاف معنی دار آماری وجود داشت ($p \leq 0/05$)، از تست Mann-Whitney U استفاده شد. با توجه به سیستم درجه بندی امری، گروه خالی تفاوت معنی داری را با گروه اتوگرافت ($p = 0/01$) و اتوگرافت+L-PRF ($p = 0/80$) نشان داد که از هر دو گروه عملکرد ضعیف‌تری داشته است.

هیستوپاتولوژی ارسال شدند. نمونه‌ها در فرمالین ۱۰ درصد فیکس شدند، در اسید فرمیک دکلسیفه شدند و در نهایت در بلوک‌های پارافینی قرار گرفتند. بعد از دهیدئاتاسیون و پاکسازی نمونه‌ها، مقطع‌های ۵ میکرونی تهیه شد و تحت رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) قرار گرفت تا اسلاید هیستوپاتولوژی مربوطه تهیه شود. در نهایت اسلاید‌ها توسط یک پاتولوژیست دامپزشک مورد ارزیابی قرار گرفت و بر اساس سیستم درجه بندی امری^(۲۶) برای ترمیم استخوان امتیاز بندی شد. (جدول ۱)

ارزیابی آماری

داده‌های بدست آمده در نرم افزار اکسل دسته بندی شد، جداول در نرم افزار ورد طراحی شد و تمام داده‌ها در نهایت توسط نرم افزار spss آنالیز آماری شد. از تست Kruskal-Wallis non-parametric one-way ANOVA برای ارزیابی تفاوت معنی دار بین گروه‌ها استفاده شد و هرچاییکه این تفاوت معنی دار بود ($p \leq 0/05$) از تست Mann-Whitney U استفاده گردید.

نتایج

ارزیابی بالینی

در حین این مطالعه هیچ گونه مرگ بعد از جراحی رخ نداد و هیچ یک از موش‌های صحرایی در محل ضایعه استخوان زنده زبرین دچار شکستگی استخوان زنده زیرین نشدند.

یافته های رادیولوژی

نتایج حاصل از بررسی رادیولوژیک proximal union، distal union، bone formation و remodeling در جدول زیر (جدول ۲) آورده شده است. در مقایسه داده‌های گروه‌های مختلف و آنالیز آنها با تست

جدول ۱: سیستم درجه بندی امری

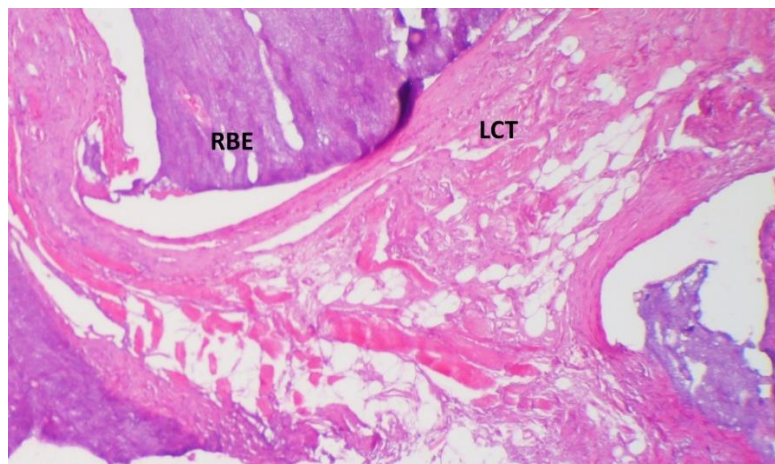
درجه	نقیصه
۰	خالی
۱	فقط بافت پیوندی فیبروزی
۲	بافت فیبروزی بیشتر از غضروف
۳	غضروف بیشتر از بافت فیبروزی
۴	فقط غضروف
۵	غضروف بیشتر از استخوان
۶	استخوان بیشتر از غضروف
۷	فقط استخوان

جدول ۲: نتایج حاصل از بررسی رادیولوژیک proximal union, distal union, bone formation و remodeling در گروه‌های مختلف مورد مطالعه به روش امتیازدهی sandhu و lane

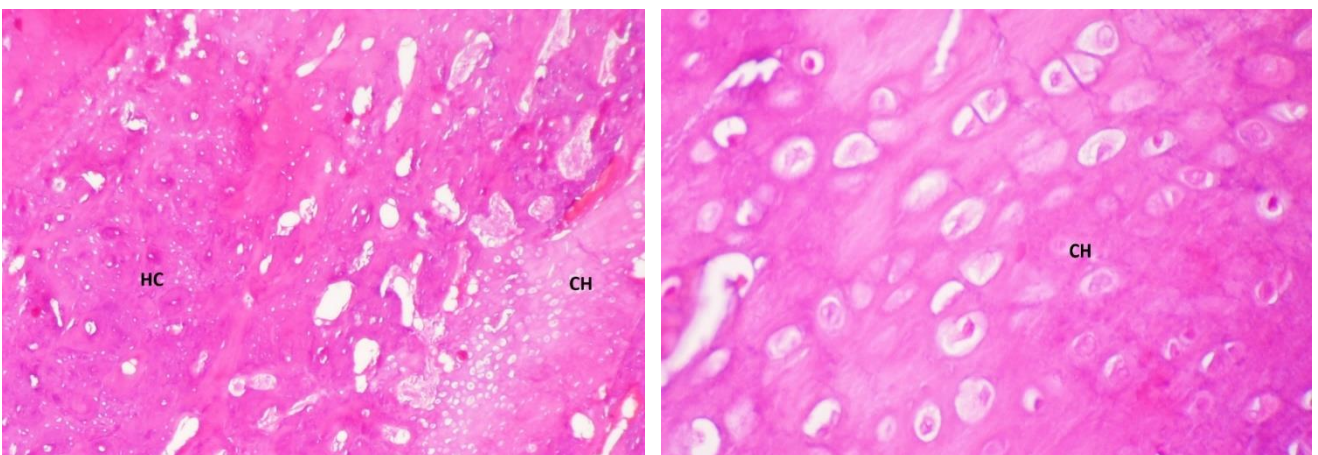
گروه روز	گروه خالی (حداکثر-حداقل) میانه	گروه اتوگرافت (حداکثر-حداقل) میانه	L-PRF (حداکثر-حداقل) میانه	گروه اتوگرافت+L-PRF (حداکثر-حداقل) میانه	p ^a
روز ۳۵	۳(۱-۳)	۷(۵-۸)	۴(۳-۴)	۸(۶-۸)	۰/۰۰۴
روز ۶۴	۴(۴-۵)	۷(۴-۸)	۵(۴-۷)	۸(۸-۸)	۰/۰۱

جدول ۳- نتایج حاصل از بررسی پاتولوژیک در گروه‌های مختلف مورد مطالعه به روش امتیازدهی التیام استخوان امری

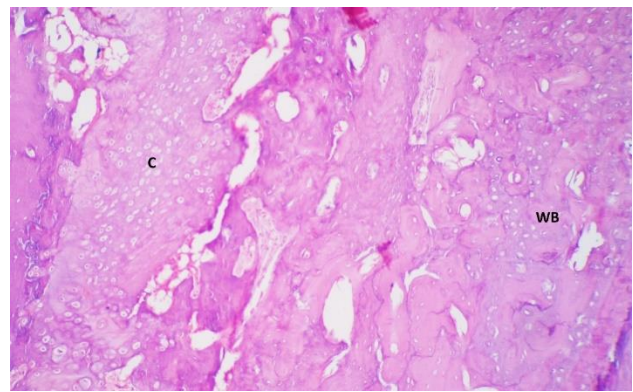
گروه	گروه خالی (حداکثر-حداقل) میانه	گروه اتوگرافت (حداکثر-حداقل) میانه	L-PRF (حداکثر-حداقل) میانه	گروه اتوگرافت+L-PRF (حداکثر-حداقل) میانه	p ^a
نتایج اسکوربندی هیستوپاتولوژی هفته ۸	۱(۱-۳)	۶(۵-۶)	۳(۴-۳)	۵(۴-۵)	۰/۰۰۳



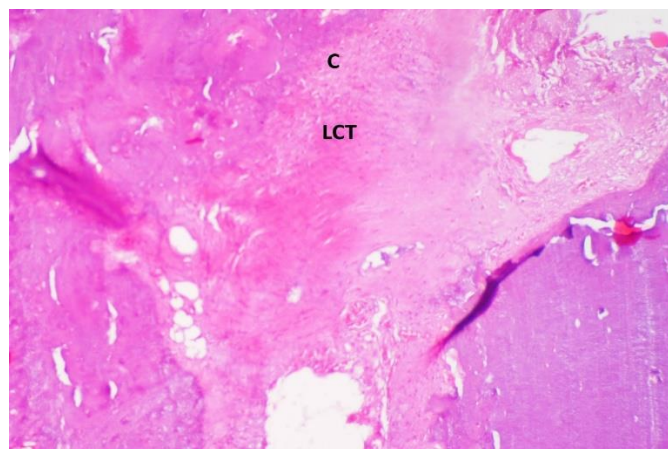
شکل ۱: عکس پاتولوژی از محل ضایعه گروه درمان نشده (defect) با رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین با بزرگنمایی ۴۰ برابر (RBE: radial bone edge, LCT: loose connective tissue)



شکل ۲: عکس‌های پاتولوژی از محل ضایعه گروه اتوگرافت با رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین با بزرگنمایی ۴۰ و ۴۰۰ برابر (HC: Haversian canal, CH: chondrocyte)



شکل ۳: عکس های پاتولوژی از محل ضایعه گروه اتوگرفت L-PRF+ با رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین با بزرگنمایی ۱۰۰ برابر (LCT: loose connective tissue, RBE: radial bone edge, C: cartilage, WB: woven bone).



شکل ۴: عکس پاتولوژی از محل ضایعه گروه L-PRF با رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین با بزرگنمایی ۴۰ برابر (LCT: loose connective tissue, C: cartilage).

بحث

استخوان، خصوصاً در ترکیب با گرافت خودی، می‌شود. L-PRF به عنوان یک بیومتریال خودی ریسک عفونت و انتقال بیماری را کاهش می‌دهد^(۳۰). همچنین ساختار متراکم ماتریکس فیبرینی باعث بهبود اتصال و تکثیر سلول‌ها به هنگام التهاب می‌شود. L-PRF فاکتوری با ارزش در علم پزشکی ترمیمی می‌باشد چرا که باعث بهبود ترمیم بافت نرم و سخت می‌شود^(۳۱).

مطالعه حاضر تاثیر L-PRF بر بهبود ترمیم ضایعه بحرانی استخوان زند زبرین موش صحرایی را مورد ارزیابی رادیولوژی و هیستوپاتولوژی قرار می‌دهد. در این مطالعه از خون اسب استفاده شد تا L-PRF غیر خودی جدیدی تهیه شود، و نتایج نشان داد که تاثیر خوبی بر ترمیم استخوان داشته است. همانطور که تحقیقات بسیاری نشان داده اند که L-PRF تاثیر مثبتی بر ترمیم استخوان دارد^(۳۲-۳۵)، دور از انتظار نبود که در مطالعه حاضر نیز به نتایج قابل قبولی دست پیدا کنیم. مطابق بر تحقیقات گذشته، کنسانتره های پلاکتی دارای فیبرین و L-PRF یک ماتریکس سه بعدی ایجاد می‌کنند که باعث تقویت اتصال سلولی، تکثیر سلولی، عروق‌زایی و آزادسازی تدریجی فاکتورهای رشد می‌شوند و همزمان تاثیر

فیبرین غنی از پلاکت و لوکوسیت (L-PRF) نسبت به کنسانتره های پلاکتی قبل از خود دارای مزایای بسیاری است از جمله اینکه برای تولید این ماده نیاز به هیچ گونه ماده ضد انعقاد و یا افزودنی نمی‌باشد و اینکه ماتریکس متراکمی که توسط این فاکتور ایجاد می‌شود باعث آزادسازی به تدریج سیتوکین‌ها می‌شود. از طرف دیگر تولید آن به صرفه است و حضور لوکوسیت‌ها در ساختار آن باعث فعالسازی سیستم ایمنی بدن می‌شود^(۳۷).

فیبرین غنی از پلاکت و لوکوسیت (L-PRF) یک ماتریکس فیبرینی متراکمی تولید می‌کند که جمعیت قابل توجهی از لوکوسیت‌ها و پلاکت‌ها را در ساختار خود دارد و باعث آزادسازی تدریجی فاکتورهای رشدی مانند BMP-2، TGF- β 1، PDGF-AB، VEGF، به مدت ۷ روز می‌شود^(۲۹ و ۳۸).

شبکه فیبرینی بوجود آمده در حین سانتریفیوژ یک ساختار سه بعدی ایجاد می‌کند که باعث تکثیر سلولی در داخل آن و بهبود ترمیم زخم و

همین ترتیب تحقیقات آینده باید تمرکز بیشتری بر روی این ترکیبات تازه داشته باشند و همچنین تاثیر ترکیب این فاکتورها با فاکتورهای دیگر مثل استخوان خودی را بیشتر بررسی کنند.

نتیجه‌گیری

پودر لیوفیلیزه L-PRF یک بیومتریال خودی است که از طریق ماتریکس فیبرینی متراکم، آزادسازی تدریجی فاکتورهای رشد، کم کردن التهاب، عروق زایی و تکثیر سلولی، باعث بهبود ترمیم استخوان می‌شود. این مطالعه نشان داد که پودر لیوفیلیزه L-PRF غیر خودی بدست آمده از خون اسب نقش مثبتی بر بازسازی ضایعات بحرانی استخوان زند زبرین موش‌های صحرائی دارد. علاوه بر این ترکیب L-PRF با اتوگرافت نتایج بهتری در مقایسه با L-PRF تنها در فرآیند ترمیم استخوان ارائه می‌دهد.

منابع

- 1 Sathyendra V, Darowish M. Basic science of bone healing. *Hand clinics*. 2013;29(4):473-81.
- 2 Oryan A, Monazzah S, Bigham-Sadegh A. Bone injury and fracture healing biology. *Biomedical and environmental sciences*. 2015;28(1):57-71.
- 3 Florencio-Silva R, Sasso GRdS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *BioMed research international*. 2015;2015(1):421746.
- 4 Loi F, Córdova LA, Pajarinen J, Lin T-h, Yao Z, Goodman SB. Inflammation, fracture and bone repair. *Bone*. 2016;86:119-30.
- 5 Schini M, Vilaca T, Gossiel F, Salam S, Eastell R. Bone turnover markers: basic biology to clinical applications. *Endocrine Reviews*. 2023;44(3):417-73.
- 6 Coucke B, Dilissen E, Cremer J, Schrijvers R, Theys T, Van Gerven L. Leukocyte-and Platelet-Rich Fibrin for enhanced tissue repair: an in vitro study characterizing cellular composition, growth factor kinetics and transcriptomic insights. *Molecular Biology Reports*. 2024;51(1):954.
- 7 Călin C, Dima O, Ancuta DL, Coman C, Pameijer CH, Paulsen F, et al. Guided bone regeneration using beta-tricalcium phosphate and leucocyte platelet-rich fibrin versus a novel biodegradable urethane composite in critical-size osseous defects in rabbit tibia: histologic results of a pilot study. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*. 2025:152672.
- 8 Nauth A, Schemitsch E, Norris B, Nollin Z, Watson JT. Critical-size bone defects: is there a consensus for diagnosis and treatment? *Journal of orthopaedic trauma*. 2018;32:S7-S11.
- 9 Mudalal M, Wang Z, Mustafa S, Liu Y, Wang Y, Yu J, et al. Effect of Leukocyte-Platelet Rich Fibrin (L-PRF) on tissue regeneration and proliferation of human gingival fibroblast cells cultured using a modified method. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2021;18(5):895-904.
- 10 Xu J, Ren H, Zhao S, Li Q, Li C, Bao G, et al. Comparative effectiveness of hyaluronic acid, platelet-rich plasma, and platelet-rich fibrin in treating temporomandibular disorders: a systematic review and network meta-analysis. *Head & Face Medicine*. 2023;19(1):39.

ضد میکروبی و ضد درد هم دارند. این یافته‌ها هم جهت با مطالعه ما نشان می‌دهد که L-PRF نقش بسزایی در بهبود فرآیند ترمیم ضایعات استخوانی دارد^(۳۶و۳۷). در حالیکه مطالعات گذشته از فرم‌های دیگر L-PRF استفاده کرده‌اند، ما از L-PRF لیوفیلیزه استفاده کردیم که مطالعه Qi Li et al. نیز نشان داده است که L-PRF لیوفیلیزه نسبت به L-PRF ساده دارای قدرت ترمیمی بالاتر، نفوذ بهتر به محل ضایعه و زمان نگهداری بالاتری می‌باشد^(۳۸). یافته‌های یک مطالعه مروری بر بروی ترمیم بافت اطراف دندان (periodontal regeneration)، نشان می‌دهد که استفاده از PRF همراه با open flap debridement (OFD) نسبت به vertical clinical attachment levels (VCAL) radiographic bone fill و clinical attachment levels (HCAL) (RFB) را در مدیریت شکافتگی کلاس دو، در مقایسه با OFD تنها، افزایش می‌دهد. و همچنین ترکیبی از گرافت استخوانی و PRF بهبود قابل توجه و معنی‌داری در نسبت VCAL/HCAL ایجاد می‌کند^(۳۹). به همین صورت L-PRF در جراحی‌های جمجمه استفاده شده است و تحقیقات نشان داده که تاثیر قابل توجهی در ترمیم سخت شامه در مقایسه با چسب‌های فیبرینی (fibrin sealant) داشته است و به دلیل هزینه تولید پایینتر و در دسترس بودن می‌تواند جایگزین مناسبی باشد^(۴۰). با این که تحقیقات انجام شده نتایج متنوعی داشته‌اند ولی شواهد نشان می‌دهد که L-PRF بوسیله فعال کردن فرآیند‌های سلولی، خاصیت ضد التهابی دارد^(۴۱) و چه تنها و چه در ترکیب با متریال‌های دیگر در مدیریت عفونت بافت اطراف دندان (periodontitis) موثر بوده است^(۴۲).

مطالعه Juan Blanco et al. نشان داد که تاثیر L-PRF بر ترمیم بافت استخوانی شک برانگیز است و نیاز به تحقیقات بیشتر دارد، این در صورتی است که نقش مثبت L-PRF بر روی ترمیم بافت نرم را امری قطعی می‌داند^(۴۳). همچنین مطالعه Fernanda Faot et al. نشان داد که L-PRF باعث بهبود ترمیم ضایعات بحرانی استخوان درشت نی خرگوش نشده است^(۴۴). مطالعه ای نشان داده است که L-PRF در ترکیب با فاکتورهای ترمیمی دیگر می‌تواند تاثیر بهتری در بازسازی استخوان داشته باشد^(۴۵). همانطور که مطالعه José Augusto Gabarra Júnior et al. نشان می‌دهد که ترکیب L-PRF با نانوهیدروکسی آپتیت باعث استخوان‌سازی بیشتری نسبت به بقیه تکنیک‌های ترمیمی شده است^(۴۶). یافته‌های ما نیز منطبق بر مطالب گفته شده است چراکه گروه اتوگرافت+L-PRF توانست بازسازی و ترمیم بیشتری نسبت به گروه L-PRF ایجاد کند و این نشان دهنده این است که ترکیب L-PRF با یک فاکتور ترمیمی دیگر می‌تواند در فرآیند ترمیم استخوان تاثیر بهتری داشته باشد. همانطور که بسیاری از تحقیقات نشان داده‌اند که اتوگرافت به تنهایی نیز قابلیت منحصر به فردی در تشکیل بافت استخوانی در محل ضایعه دارد^(۴۷-۴۹). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که ترکیبات جدید فیبرین غنی از پلاکت مانند فیبرین غنی از پلاکت تزریقی (i-PRF) و فیبرین غنی از پلاکت پیشرفته (A-PRF) می‌تواند نسبت به L-PRF در آزادسازی فاکتورهای رشد و تحریک تشکیل بافت استخوانی بهتر عمل کند. به

- 11 Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Sculean A, Zhang Y. Optimization of platelet-rich fibrin. *Periodontology* 2000. 2024;94(1):79-91.
- 12 Egierska D, Perszke M, Mazur M, Duś-Ilnicka I. Platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in oral surgery: A narrative review. *Dental and Medical Problems*. 2023;60(1):177-86.
- 13 Moraes RP, Costa FWG, SILVA PGdB, Carvalho FSR, Paz JERM, Matos GC, et al. Impact of L-PRF on pain and healing outcomes in lower third molar surgery: a randomized split-mouth trial. *Brazilian Oral Research*. 2024;38:e089.
- 14 Demirok SO, Eroglu CN, Koc A. Comprehensive analysis of bone tissue in extraction sockets of third molars after leukocyte and platelet rich fibrin and photobiomodulation applications. *Clinical Oral Investigations*. 2024;28(9):483.
- 15 Chmielewski M, Pilloni A, Adamska P. Application of Advanced Platelet-Rich Fibrin in Oral and Maxillo-Facial Surgery: A Systematic Review. *Journal of Functional Biomaterials*. 2024;15(12):377.
- 16 Almutairi M, Alshammari SZ, Almutairi D, Alansari TA, Aldhafiri F, Almutairi AN, et al. Leukocyte-Platelet-Rich Fibrin Combined With Demineralized Bovine Bone Mineral for Maxillary Sinus Augmentation: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Cureus*. 2025;17(6).
- 17 Medeiros-Monzón A, Blanco-Carrión A, Gándara-Vila P, Camolesi G, Pérez-Jardón A, Lorenzo-Pouso AI, et al. Efficacy of leukocyte-and platelet-rich fibrin in the treatment and prevention of medication-related osteonecrosis of the jaw: a prospective study. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*. 27249.
- 18 Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2006;101(3):e37-e44.
- 19 A Zumstein M, Berger S, Schober M, Boileau P, W Nyffeler R, Horn M, et al. Leukocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF) for long-term delivery of growth factor in rotator cuff repair: review, preliminary results and future directions. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2012;13(7):1196-206.
- 20 Van Cleemput T, Hendrikx S, Politis C, Spaey Y. Leukocyte-and platelet-rich fibrin: a new method for scalp defect reconstruction. *Dermatologic Surgery*. 2022;48(2):261-2.
- 21 Sadeghian A, Rohani B, Hasannia S, Mashhadiabbas F, Fekrazad R. Synergistic Effect of Photobiomodulation and Leukocyte-Platelet Rich Fibrin on Bone Regeneration in Rat Critical Defects. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2025:104687.
- 22 Khanbazi M, Bigham-Sadegh A, Oryan A, Meimandi-Parizi A, Jannesar A. The effects of allogeneic and xenogeneic lyophilized leukocyte-and platelet-rich fibrin on bone healing in rat. *Injury*. 2024;55(3):111396.
- 23 Crisci A, Lombardi D, Serra E, Lombardi G, Cardillo F, Crisci M. Standardized protocol proposed for clinical use of L-PRF and the use of L-PRF Wound Box®. *Journal of Unexplored Medical Data* | Volume. 2017;2:78.
- 24 Wang Z, Han L, Sun T, Wang W, Li X, Wu B. Preparation and effect of lyophilized platelet-rich fibrin on the osteogenic potential of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro and in vivo. *Heliyon*. 2019;5(10).
- 25 Lane JM, Sandhu HS. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthopedic Clinics of North America*. 1987;18(2):213-25.
- 26 Emery SE, Brazinski MS, Koka A, Bensusan JS, Stevenson S. The biological and biomechanical effects of irradiation on anterior spinal bone grafts in a canine model. *JBJS*. 1994;76(4):540-8.
- 27 Ehrenfest DMD, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in biotechnology*. 2009;27(3):158-67.
- 28 Tablin F, Walker NJ, Hogle SE, Pratt SM, Norris JW. Assessment of platelet growth factors in supernatants from rehydrated freeze-dried equine platelets and their effects on fibroblasts in vitro. *American journal of veterinary research*. 2008;69(11):1512-9.
- 29 Dohan Ehrenfest DM, Pinto NR, Pereda A, Jiménez P, Corso MD, Kang B-S, et al. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets*. 2018;29(2):171-84.
- 30 INCHINGOLO F, Tatullo M, Marrelli M, Inchingolo A, SCACCO S, Inchingolo A, et al. Trial with Platelet-Rich Fibrin and Bio-Oss used as grafting materials in the treatment of the severe maxillar bone atrophy: clinical and radiological evaluations. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*. 2010;14(12).
- 31 Quirynen M, Blanco J, Wang HL, Donos N, Temmerman A, Castro A, et al. Instructions for the use of L-PRF in different clinical indications. *Periodontology 2000*. 2025;97(1):420-32.
- 32 Ehrenfest DMD, Diss A, Odin G, Doglioli P, Hippolyte M-P, Charrier J-B. In vitro effects of Choukroun's PRF (platelet-rich fibrin) on human gingival fibroblasts, dermal prekeratinocytes, preadipocytes, and maxillofacial osteoblasts in primary cultures. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2009;108(3):341-52.
- 33 Ehrenfest DMD, Doglioli P, de Peppo GM, Del Corso M, Charrier J-B. Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) stimulates in vitro proliferation and differentiation of human oral bone mesenchymal stem cell in a dose-dependent way. *Archives of oral biology*. 2010;55(3):185-94.
- 34 Chang IC, Tsai CH, Chang YC. Platelet-rich fibrin modulates the expression of extracellular signal-regulated protein kinase and osteoprotegerin in human osteoblasts. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2010;95(1):327-32.
- 35 Clipet F, Tricot S, Alno N, Massot M, Solhi H, Cathelineau G, et al. In vitro effects of Choukroun's platelet-rich fibrin conditioned medium on 3 different cell lines implicated in dental implantology. *Implant dentistry*. 2012;21(1):51-6.
- 36 Everts PA, Lana JF, Alexander RW, Dallo I, Kon E, Ambach MA, et al. Profound properties of protein-rich, platelet-rich plasma matrices as novel, multi-purpose biological platforms in tissue repair, regeneration, and wound healing. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(14):7914.
- 37 Pinto N, Yu J, Koirala S, Mourão CF, Andrade C, Rescigno E, et al. L-PRF in extra-oral wound care. *Periodontology 2000*. 2025;97(1):342-62.

- 38 Li Q, Reed DA, Min L, Gopinathan G, Li S, Dangaria SJ, et al. Lyophilized platelet-rich fibrin (PRF) promotes craniofacial bone regeneration through Runx2. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(5):8509–25.
- 39 Miron RJ, Moraschini V, Estrin NE, Shibli JA, Cosgarea R, Jepsen K, et al. Periodontal Regeneration using Platelet-Rich Fibrin. Furcation defects: a systematic review with meta-analysis. *Periodontology 2000*. 2025;97(1):191–214.
- 40 Coucke B, De Vleeschouwer S, van Loon J, Van Calenbergh F, Van Hoylandt A, Van Gerven L, et al. Leukocyte-and platelet-rich fibrin in cranial surgery: a single-blinded, prospective, randomized controlled noninferiority trial. *Journal of Neurosurgery*. 2024;141(2):500–8.
- 41 Strauss F-J, Nasirzade J, Kargarpoor Z, Stähli A, Gruber R. Effect of platelet-rich fibrin on cell proliferation, migration, differentiation, inflammation, and osteoclastogenesis: a systematic review of in vitro studies. *Clinical oral investigations*. 2020;24(2):569–84.
- 42 Omar YK, Rashidy MAE, Ahmed GB, Aboulela AG. Evaluation of leukocyte-platelet rich fibrin as an antibiotic slow-release biological device in the treatment of moderate periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *BMC Oral Health*. 2024;24(1):1530.
- 43 Blanco J, García A, Hermida-Nogueira L, Castro AB. How to explain the beneficial effects of leukocyte-and platelet-rich fibrin. *Periodontology 2000*. 2025;97(1):74–94.
- 44 Faot F, Deprez S, Vandamme K, Camargos GV, Pinto N, Wouters J, et al. The effect of L-PRF membranes on bone healing in rabbit tibiae bone defects: micro-CT and biomarker results. *Scientific reports*. 2017;7(1):46452.
- 45 Idulhaq M, Mudigdo A, Utomo P, Wasita B, Warman FI. Platelet-rich fibrin as a tissue engineering material in accelerate bone healing in rat bone defects: A systematic review and meta-analysis. *Annals of Medicine and Surgery*. 2022;84:104869.
- 46 Júnior JAG, Nóbrega F, Oliveira PG, Bergamo ET, Cadore U, Gomes MZdV, et al. Evaluation of Implant Surface Modification with Nanohydroxyapatite Associated with the Use of L-PRF: In Vivo Study in Rats. *Journal of Functional Biomaterials*. 2023;14(7):370.
- 47 Jensen SS, Brogini N, Hjørting-Hansen E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and β -tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clinical oral implants research*. 2006;17(3):237–43.
- 48 Marino JT, Ziran BH. Use of solid and cancellous autologous bone graft for fractures and nonunions. *Orthopedic Clinics*. 2010;41(1):15–26.
- 49 Azi ML, Aprato A, Santi I, Kfuri Jr M, Masse A, Joeris A. Autologous bone graft in the treatment of post-traumatic bone defects: a systematic review and meta-analysis. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2016;17(1):465.
- 50 Farshidfar N, Amiri MA, Estrin NE, Ahmad P, Sculean A, Zhang Y, et al. Platelet-rich plasma (PRP) versus injectable platelet-rich fibrin (i-PRF): A systematic review across all fields of medicine. *Periodontology 2000*. 2025.
- 51 Ravi S, Santhanakrishnan M. Mechanical, chemical, structural analysis and comparative release of PDGF-AA from L-PRF, A-PRF and T-PRF-an in vitro study. *Biomaterials Research*. 2020;24(1):16.