



## I concentrati piastrinici di seconda generazione nella terapia dell'osteomielite cronica: una chirurgia rigenerativa moderna

*Second-generation platelet concentrates in the therapy of chronic osteomyelitis: a modern regenerative surgery*

Gaetano Giuliano<sup>1</sup>, Michela Crisci<sup>2</sup>  <https://orcid.org/0000-0002-1264-8467>,  
Raffaele D'Adamo<sup>4</sup>, Alessandro Crisci<sup>3,4,5</sup> (foto)  <https://orcid.org/0000-0002-4478-5714>

<sup>1</sup> Unit of Ortopedia, "Villa del Sole" Private Hospital, Caserta, Italy; <sup>2</sup> Faculty of Medicine and Surgery, Vasile Goldis Western University of Arad, Arad, Romania; <sup>3</sup> School of Medicine, University of Salerno, Fisciano (SA), Italy; <sup>4</sup> Unit of Dermosurgery Cutaneous Transplantations and Hard-to-HealWound, "Villa Fiorita" Private Hospital, Aversa (CE), Italy; <sup>5</sup> Institute for the Studies and Care of Diabetics, Abetaia, Casagiove (CE), Italy

Ricevuto: 24 agosto 2020  
Accettato: 11 dicembre 2020

### Corrispondenza

**Alessandro Crisci**

Department of Medicine, Surgery and Dentistry  
"Salernitan Medical School", University of Salerno,  
Fisciano (SA), Italy  
E-mail: [alcrisci@unisa.it](mailto:alcrisci@unisa.it); [alessandrocrisci@libero.it](mailto:alessandrocrisci@libero.it)

### Conflitto di interessi

Gli Autori dichiarano di non avere alcun conflitto di interesse con l'argomento trattato nell'articolo.

**Come citare questo articolo:** Giuliano G, Crisci M, D'Adamo R, et al. I concentrati piastrinici di seconda generazione nella terapia dell'osteomielite cronica: una chirurgia rigenerativa moderna *Giornale Italiano di Ortopedia e Traumatologia* 2020;46:252-263; <https://doi.org/10.32050/0390-0134-271>

© Copyright by Pacini Editore Srl



OPEN ACCESS

L'articolo è OPEN ACCESS e divulgato sulla base della licenza CC-BY-NC-ND (Creative Commons Attribuzione – Non commerciale – Non opere derivate 4.0 Internazionale). L'articolo può essere usato indicando la menzione di paternità adeguata e la licenza; solo a scopi non commerciali; solo in originale. Per ulteriori informazioni: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.it>

### Riassunto

**Scopo.** L'ipotesi è che l'uso di fibrina ricca di leucociti e piastrine avanzata (A-PRF) nell'osteomielite da ulcera su piede diabetico, consenta il recupero da questa grave patologia. In questo studio, l'obiettivo era di standardizzare l'utilizzo di PRF in pazienti con osteomielite, per utilizzare questo concentrato piastrinico di seconda generazione, come facilitatore della guarigione.

**Metodi.** Gli autori hanno prodotto e utilizzato ai fini preliminari membrane A-PRF (1300 g × 8 min) da sangue periferico in 7 pazienti (tutti diabetici) con osteomielite e lesioni cutanee da almeno 6 mesi. Le membrane, insieme al liquido surnatante derivato dalla compressione, sono state inserite nella lesione cutanea fino all'osso dopo uno sbrigliamento chirurgico. È stata analizzata l'evoluzione delle lesioni nel tempo.

**Risultati.** Tutti i sette pazienti hanno avuto positività al test Probe-to-Bone, la RMN ha rilevato ispessimento cortico-periosteale e/o focolai di osteolisi della cortico-spongiosa in adiacenza all'ulcera. Batteri Gram-positivi sono stati trovati nei nostri pazienti nel 52% dei casi. Cocci Gram+, come *S. Aureus* (15,6%), *S. β-emo litico* (12,1%), *S. Viridans* (7,1%) e Bacilli Gram- come *Pseudomonas* (10,6%), *Proteus* (7,8%), *Enterobacter* (5,7%) sono presenti. La *Candida Albicans* è presente nel 2,8%. L'emocromo non mostrava alterazioni importanti. Ad oggi, le lesioni cutanee sono guarite in 6 dei sette pazienti trattati (un paziente da più di cinque anni) senza segni di infezione, né di recidive.

**Conclusioni.** I risultati ottenuti sui nostri pazienti suggeriscono che le membrane PRF potrebbero in futuro diventare un'opzione terapeutica in questa patologia di difficile trattamento.

**Parole chiave:** osteomielite, *buffy coat*, livello dei fattori di crescita, fibrina ricca di piastrine, concentrato di trombociti

### Summary

**Background.** Hypothesis is that the use of Advanced Platelet-Rich Fibrina (A-PRF) in ulcer osteomyelitis on diabetic foot, allows recovery from this serious disease. In this study, the goal was to standardize the use of PRF in patients with osteomyelitis, to use this second-generation platelet concentrate, as a facilitator of healing.

**Methods.** Authors produced and used peripheral blood A-PRF (1300 g × 8 min) membranes in 7 patients (all diabetic) with osteomyelitis and skin lesions for at least 6 months. Membranes, together with the supernatant liquid derived from compression, were inserted into the skin lesion down to the bone after surgical debridement. Evolution of the lesions over time was analyzed.

**Results.** All seven patients had a positive Probe-to-Bone test, MRI detected cortico- periosteal thickening and/or foci of cortico-cancellous osteolysis adjacent to the ulcer. Gram-positive bacteria were found in 52% of cases: Cocci Gram +, such as *S. Aureus* (15.6%), *S. β-haemolytic* (12.1%), *S. Viridans* (7.1%), and Bacilli Gram- such as *Pseudomonas* (10.6%), *Proteus* (7.8%), *Enterobacter* (5.7%) are present. *Candida Albicans* is present in 2.8%. Blood count showed no major changes.

To date, skin lesions have healed in 6 of the seven patients treated (one patient for more than five years) with no signs of infection or recurrence.

**Conclusions.** The results obtained on our patients suggest that PRF membranes could in the future become a therapeutic option in this difficult treatment condition.

**Key words:** osteomyelitis, buffy coat, growth factor level, platelet-rich fibrin, thrombocyte concentrate

## Introduzione

La fibrina ricca di piastrine (PRF) di Choukroun <sup>1</sup> è un concentrato piastrinico di seconda generazione, praticamente un superamento del PRP (Plasma ricco di piastrine), è, quindi, un nuovo passo nel concetto terapeutico di gel piastrinico con una preparazione semplificata e piccole modifiche biochimiche artificiali. A differenza di altri concentrati piastrinici, questa tecnica non richiede anticoagulanti, trombina o qualsiasi altro agente gelificante, il che rende il sangue non più di un centrifugato naturale senza additivi. PRF può essere preparato, infatti, semplicemente stimolando la via intrinseca della coagulazione senza l'aiuto di anticoagulanti o fattori di coagulazione <sup>2</sup>. Sebbene le piastrine e le citochine leucocitarie giochino un ruolo importante nella biologia di questo biomateriale, la matrice fibrinica di supporto costituisce certamente il fattore decisivo del reale potenziale terapeutico del L-PRF. Entro pochi minuti, l'assenza di un anticoagulante consente l'attivazione della maggior parte delle piastrine contenute nel campione per innescare la cascata della coagulazione.

L'osteomielite (OM) si riferisce specificamente all'infezione del midollo osseo in contrasto con l'osteite in cui il periostio o la superficie corticale si infetta attraverso una ferita o un'ulcera penetrante. Nonostante queste differenze, le due sono clinicamente diagnosticate o trattate in modo molto simile. Molto è stato scritto sulla diagnosi di OM nel corso degli anni e, cosa più importante, su come complichi le ulcere del piede diabetico (DFU). L'OM che complica il piede diabetico deriva quasi sempre da una ferita contigua o da un'ulcera del piede <sup>3</sup>. L'incidenza mondiale è da 1:1.000 a 1:20.000 abitanti, in Italia 19.000 casi/anno, in Europa 100.000 casi/anno. Il rapporto Maschi:Femmine è 2:1.

Le infezioni delle ossa e delle articolazioni sono dolorose per i pazienti e frustranti per loro e per i sanitari che li curano. Gli alti tassi di successo della terapia antibiotica avutasì nella maggior parte delle malattie infettive non sono ancora stati raggiunti in questa patologia. I vari tipi

di questa patologia includono, in ordine decrescente di frequenza: OM secondaria ad un focolaio contiguo di infezione (dopo trauma, intervento chirurgico o inserimento di una protesi articolare); quella secondaria all'insufficienza vascolare (nelle infezioni del piede diabetico); ed infine la OM di origine ematogena e richiedono differenti strategie terapeutiche mediche e chirurgiche. L'OM cronica è associata alla necrosi avascolare dell'osso ed alla formazione del sequestro (osso morto) e l'approccio chirurgico è necessario per la cura oltre alla terapia antibiotica. Al contrario, l'OM acuta può rispondere ai soli antibiotici. In generale, è necessario un approccio multidisciplinare per un risultato di successo, che coinvolga le competenze di chirurgia ortopedica, malattie infettive e chirurgia plastica, così come di chirurgia vascolare, in particolare per i casi complessi con perdita dei tessuti molli <sup>4,5</sup>.

L'utilizzo dei concentrati piastrinici di seconda generazione nella DFU con OM non era noto agli Autori fino a tempi recenti ed è stato adottato da essi per la prima volta (2018) <sup>6</sup>.

In questo studio vengono descritti i risultati ottenuti su sette pazienti portatori di osteomielite cronica da DFU degli arti inferiori.

## Materiali e metodi

### Preparazione di PRF

Sono stati raccolti campioni di sangue con il consenso informato di tutti i sette volontari indagati. Tutte le procedure di coinvolgimento dei partecipanti in questo studio sono state eseguite in conformità con gli standard etici del comitato di ricerca istituzionale e/o nazionale e con la Dichiarazione di Helsinki del 1964 ed i suoi emendamenti successivi. Il Comitato Etico ha rinunciato ad una richiesta etica per questo studio poiché il sangue non è stato usato come una fonte identificabile <sup>7</sup> (*Researchregistry*: n° 5927).

I fattori che influenzano la formazione e la struttura del coagulo di fibrina includono fattori genetici, fattori acquisiti (come una concentrazione anormale di trombina e del fattore XIII nel plasma, il flusso sanguigno, l'attivazione piastrinica, lo stress ossidativo, l'iperglicemia, l'iperomocitemia, i farmaci e il fumo di sigaretta) ed altri parametri (come microgravità, pH, temperatura) <sup>7,8</sup>. È stato confermato che tutti i donatori sono portatori di osteomielite cronica da ulcera diabetica delle estremità inferiori.

Il CBC (Conta Cellulare Ematica) dei donatori è stato anche studiato prima di iniziare gli esperimenti per confermare l'intervallo standard del conteggio delle cellule ematiche.

Al fine di classificare quantitativamente e seguire il decor-

so clinico della riparazione, è stato stabilito un punteggio di gravità della ferita osservando la ferita e segnando le diverse variabili cliniche, anatomiche dei pazienti (*Wound Severity Score* Tab. I-IV).

Il sangue è stato raccolto in provette di vetro per A-PRF (Advanced PRF) senza anticoagulante né un gel separatore (provette per A-PRF Vacutainer per siero 9,0 ml), per la produzione di coaguli e membrane PRF. Il sangue è stato raccolto rapidamente con un ago nelle provette (22" di valore medio, inferiore a 25" per provetta) e immediatamente (entro 1 min) centrifugato secondo la descrizione ad una temperatura superiore a 21°C (tra 21° e 30°C). Usando il L-PRF Wound Box, il processo di compressione della membrana

**Tabella I.** Caratteristiche del paziente.

N° soggetto	Età	Sesso	Durata ammissione (giorni)	Comorbidità	DDY	Dimensione della ferita (cm) L x W x H	Sede della ferita	Tempo di trattamento	Follow-up (giorni)	Risultato	Punteggio di gravità totale
1	68	M	103	PAD, Osteomielite	25	2 x 2 x 5	Terzo inferiore gamba sinistra	40	1825	Chiusura spontanea	25
2	71	F	64	PAD, Osteomielite, HTN	40	1 x 1 x 2	Piede destro V° dito	25	365	Chiusura spontanea	24
3	63	F	56	PAD, Osteomielite, ESRD	24	2 x 2 x 2	Pianta piede destro	32	180	Chiusura spontanea decesso per CAD	40
4	60	M	46	PAD, Osteomielite, HTN	20	1 x 3 x 5	Piede sinistro V° dito	27	120	Chiusura spontanea	15
5	66	M	45	PAD, Osteomielite, ESRD	15	1 x 2 x 5	Piede destro I° dito	33	211	Chiusura spontanea	20
6	58	M	94	PAD, Osteomielite, HTN	23	1 x 1 x 5	Pianta piede sinistro	33	388	Chiusura spontanea	35
7	70	M	86	PAD, Osteomielite, HTN	35	2 x 2 x 5	Pianta piede destro	30	905	Chiusura spontanea	23
Media	65,14	5/2	70,57		26,0	1,4 x 1,8 x 4,1		31,43	570,6		26,0
± D.S.	± 4,61		± 22,88		± 8,0			± 4,5	± 566,4		± 8,0

\*il miglioramento è definito come recupero degli arti entro un anno e mezzo, ma senza chiusura della ferita. DDY: anno di diagnosi del diabete; PAD: Arteriopatia periferica; ESRD: malattia renale allo stadio terminale; HTN: ipertensione; CAD: Malattia Coronarica Arteriosa.

**Tabella II.** Punteggio totale della ferita - Parametri generali della ferita.

	Nessuna	Lieve	Marcata	Total
Eritema perilesionale	0	2	5	7
Edema perilesionale	1	2	4	7
Purulenza della ferita	0	3	4	7
Fibrina della ferita	0	2	5	7
Edema violaceo	1	2	4	7
Edema rosso	0	3	4	7
Granulazione della ferita	0	0	0	7

**Tabella III.** Punteggio totale della ferita – Considerazioni anatomiche.

Osso esposto	Score	Tendine esposto	Score	Dorsale		Posteriore	
				Pulsazione pedidia	Score	Pulsazione tibiale	Score
Si	10	Si	7	0-1+	5	0-1+	5
No	0	No	0	2+	2	2+	2
				3-4+	0	3-4+	0

**Tabella IV.** Punteggio totale della ferita - Misurazioni della ferita.

Dimensione (cm <sup>2</sup> )	Score	Profondità	Score	Indeterminato (mm)	Score	Durata	Score
< 1	0	< 5	0	< 2	3	< 8 settimane	0
1-2	1	5-10	3	2-5	5	8 settimane-6 mesi	1
2-5	3	10-20	7	>5	8	6 mesi-1 anno	2
5-10	6	> 20	10			2-3 anni	5
10-30	8					5-10 anni	7
> 30	10					10 anni	9

nei coaguli viene eseguito attraverso una leggera e omogenea compressione, e la membrana finale rimane sempre omogeneamente bagnata e imbevuta di siero.

La tecnica di produzione del PRF è molto semplice ed ha richiesto solo un campione ematico e una centrifuga da tavolo appositamente progettata per questa applicazione (DUO Quattro per PRF)<sup>6-9</sup>.

Il protocollo seguito è il seguente: i campioni di sangue vengono raccolti in provette di vetro da 9 mL, senza anticoagulante o gel di separazione, e vengono immediatamente centrifugati secondo il seguente programma: accelerazione di 30 sec, 8 min a 1300 rpm (189 g), 36 sec di decelerazione e arresto. Dopo la centrifugazione, tre parti sono localizzate nel tubo: i globuli rossi sul fondo, un coagulo di fibrina che rappresenta il PRF nel mezzo e il

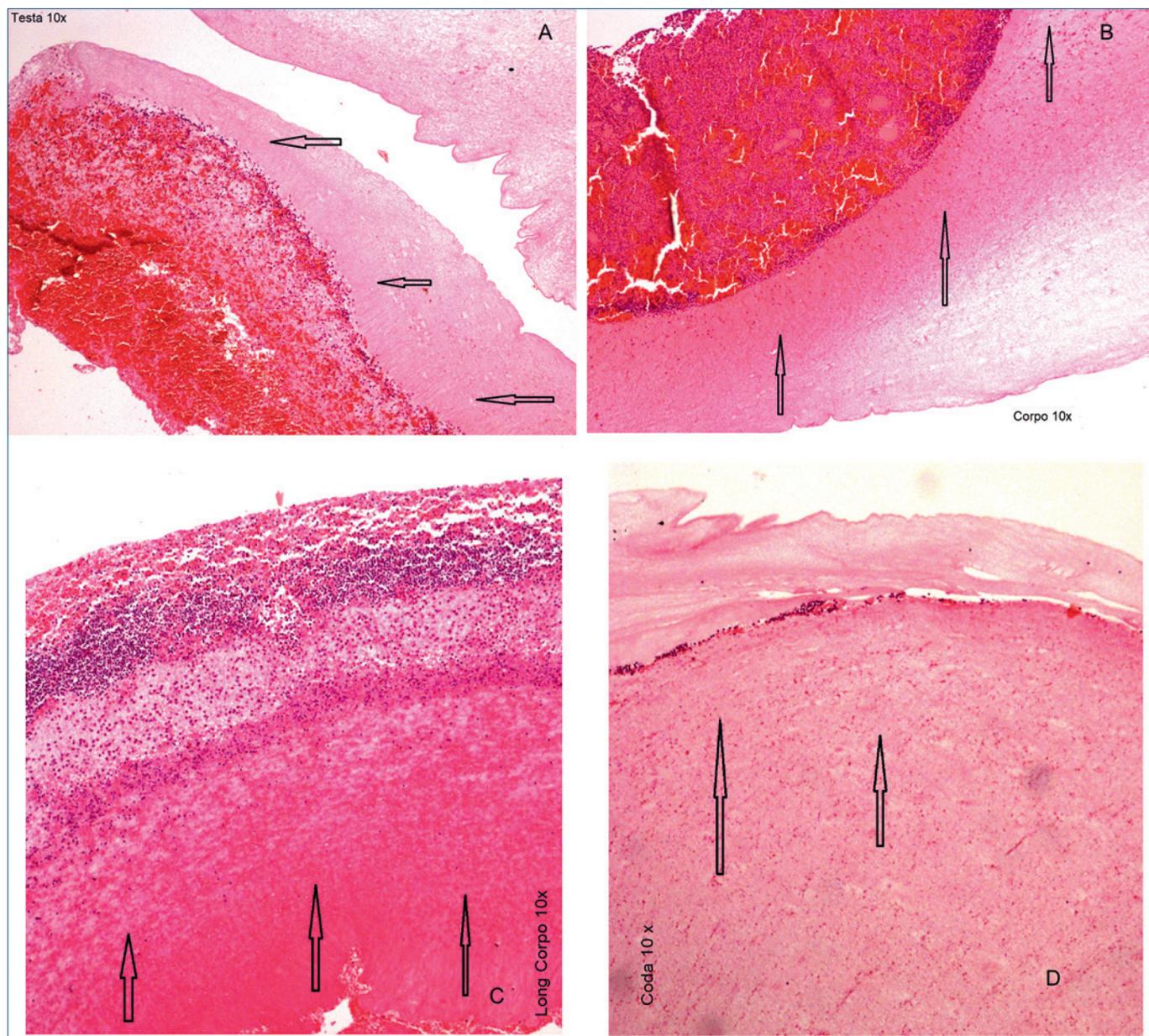
plasma acellulare nella parte superiore. Si estrae il coagulo di fibrina dalla provetta con una pinza sterile ed eliminando il coagulo rosso dalla sua estremità inferiore si ottiene il PRF. Il successo di questa tecnica dipende interamente dalla facilità di raccolta del sangue e dalla velocità di trasferimento nella centrifuga<sup>10</sup>. L'intero processo deve essere sempre effettuato in modo sterile, perché i fattori di crescita contenuti stimolano la rigenerazione dei tessuti e, quindi, probabilmente, anche quella dei batteri. Questo metodo delicato evita l'estrazione e la perdita di una quantità significativa di fattori di crescita. I PRF-Box presenti sul mercato sono disponibili in una varietà di forme ed esercitano, attraverso la piastra di compressione, diverse pressioni in base al peso, dando origine a una membrana di spessore, larghezza e lunghezza variabili. Il Wound L-PRF

Box progettato dagli Autori <sup>10</sup> è costituito da un contenitore metallico di 17,5 × 7,6 × 2 cm contenente una piastra di acciaio perforata di 150 × 68 × 1,5 mm. Esiste una seconda piastra in acciaio che funge da compressore, 150 × 68 × 1,5 mm, con un peso di 148 grammi. Questa seconda piastra sagomata ad U esercita una pressione di 142,437 Pa/cm<sup>2</sup>. In questo studio, la compressione per

produrre le membrane è stata esercitata sul coagulo per 2 minuti. Ogni membrana è separata in tre aree di uguale dimensione: prossimale (testa), centro (corpo) e distale (coda) attraverso un taglio con bisturisterile.

È stata utilizzata solo la parte prossimale della membrana <sup>9,10</sup> e, solo se necessario, la parte centrale (Fig. 1).

Con la procedura di preparazione del PRF, la coagulazione

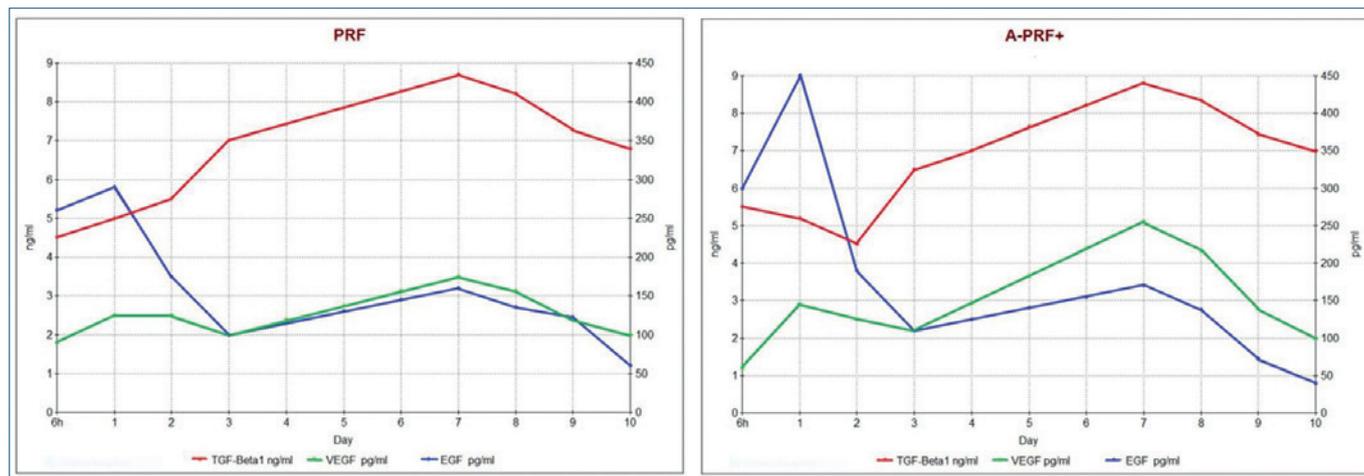


**Figura 1.** Advanced-PRF (A-PRF). Distribuzione di piastrine e leucociti in matrici preparate usando provette in vetro per A-PRF+ a bassa centrifugazione (1300 rpm, 8 minuti). Sezioni delle 10 × regioni della testa (A), corpo (B, C) e la coda (D), macchiate di ematossilina/eosina. Le frecce indicano la direzione della forza centrifuga. I margini superiori della membrana PRF, a cui sono attaccate le cellule del sangue e le proteine del siero, rappresentano la regione di fronte la parete interna della provetta.

del sangue inizia appena dopo il prelievo istantaneamente quando viene a contatto con la superficie di vetro della provetta, per via della mancanza di anticoagulante. Se il tempo richiesto per la raccolta di sangue e l'inizio della centrifugazione (vari rpm, g/min) è estremamente prolungato, la polimerizzazione della fibrina è così diffusa che sarà ottenuta solo una piccola parte del coagulo senza consistenza (PRF-like). Di conseguenza, la raccolta del sangue deve essere facile e rapida, seguita da una centrifugazione immediata ed è un prerequisito nelle specifiche dell'output della PRF. È formulato per produrre una membrana spessa circa 3 mm ( $3,08 \pm 0,5$ )<sup>10</sup>, omogeneamente idratata e con un essudato ricco di piastrine, leucociti, vitronectina e fibronectina, espressi nel reticolo di fibrina che si forma, nonché di cellule staminali ematopoietiche CD34+<sup>11</sup>. Il fibrinogeno è inizialmente concentrato nella parte superiore della provetta, fino a causare la formazione della trombina autologa circolante che lo trasforma nella rete di fibrina. Il risultato è un coagulo di fibrina contenente le piastrine situate al centro, proprio tra lo strato inferiore di globuli rossi e la parte superiore acellulare plasmatica. Il coagulo di PRF così ottenuto viene poi posizionato sulla griglia nella scatola metallica del Wound L-PRF Box e coperto con il coperchio compressore. La scatola L-PRF è progettata per la produzione di membrane a spessore costante che rimangono idratate per diverse ore e consente il recupero dell'essudato sierico espresso dai coaguli di fibrina, questo è ricco di proteine (vitronectina e fibronectina)<sup>7</sup>. Il coagulo L-PRF sembra essere responsabile di un lento rilascio di fattori di crescita e glicoproteine dalla matrice ( $\geq 7$  dd fino a 28 dd)<sup>8</sup>. Le proteine adesive: fibri-

nogeno (Fg), fibronectina (Fn), vitronectina (Vn) e trombospodina-1 (TSP-1) sono abbondanti nella struttura fibrinosa. Tra i fattori di crescita immagazzinati nelle piastrine e che sono essenziali per la riparazione delle ferite, vi sono PDGF, con -AB e -C; sono anche presenti come VEGF-A, TGF- $\beta$ 1, EGF (Fig. 2), FGF-2, HGF e il fattore di crescita insulino-simile-1 (IGF-1).

Analizzando tre citochine proinfiammatorie (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ), una citochina infiammatoria (IL-4) e un promotore dell'angiogenesi (VEGF), è stato dimostrato che il PRF potrebbe essere anche un punto cruciale nella modulazione immunitaria con abilità nel controllo dell'infiammazione e nella proliferazione delle cellule staminali adulte, incluse le cellule progenitrici CD34+, MSC (cellule staminali mesenchimali), progenitrici di SMCs (cellule muscolari lisce) e progenitrici endoteliali<sup>8-11</sup>. La multipotenza di questi tipi di cellule staminali e la loro capacità di aumentare la riparazione del tessuto vascolare e dovuta ai meccanismi paracrini, li rendono anche veicoli terapeutici in medicina rigenerativa. Inoltre, i danni ai tessuti generano forti segnali chemoattraenti per le cellule staminali, fornendo la base per la loro attività rigenerativa. Le piastrine regolano il reclutamento di cellule staminali adulte verso le cellule ferite e può dunque essere un meccanismo sostanziale nell'esecuzione di risposte cellulari rigenerative. Le piastrine attivate rilasciano HGF e sono state descritte promuovere l'assunzione di MSC nelle cellule endoteliali di arteria umana. La proliferazione delle cellule staminali umane (hMSCs) è proporzionale alla concentrazione piastrinica nel A-PRF.



**Figura 2.** Diversa concentrazione dei fattori di crescita TGF- $\beta$ 1, VEGF, EGF nel tempo prodotta da L-PRF e A-PRF. Analisi statistica dei rilasci del fattore di crescita per punti temporali come media  $\pm$  deviazione standard per PRF e A-PRF+. VEGF, TGF- $\beta$ 1 rilasciato, EGF rilasciato (da Crisci et al., 2020, mod.)<sup>23,24</sup>.

### **Analisi ematochimiche**

Sono stati prelevati anche campioni di sangue da ciascun paziente per eseguire un esame emocromocitometrico (CBC) utilizzando le provette K3E con 5.4 mg di EDTA (VacuMed). In accordo con studi precedenti<sup>6-11</sup> tre campioni di sangue sono stati prelevati dalla vena brachiale sinistra di ciascun paziente attraverso un ago da 18 gauge, due per la produzione di PRF e uno per il conteggio ematico cellulare. Gli esami sono stati eseguiti con un contatore di cellule Cell Dyn 3500 R (ABBOTT). La valutazione diagnostica dell'OM nei pazienti studiati è stata effettuata prima attraverso il metodo *Probe-to-Bone* (PTB) e poi attraverso una risonanza magnetica e una coltura di cellule ossee per l'evidenza microbiologica.

### **Procedura di innesto di A-PRF**

Ciascuno dei sette pazienti dopo una preparazione appropriata (sospensione da almeno 7 giorni dei farmaci anticoagulanti e sostituzione con eparina a basso peso molecolare per via sottocutanea) è stato sottoposto a *debridement* chirurgico, in anestesia sub aracnoidea, in sala operatoria, con rimozione di tessuti non vitali e possibili frammenti ossei sul fondo della lesione, anche per eseguire i test di coltura batterica pianificati. Non sono stati utilizzati farmaci vasodilatatori periferici (iloprost, alprostadil). Dopo la disinfezione della lesione chirurgica con una miscela al 50% di perossido di idrogeno e iodopovidone e appropriato controllo dell'emostasi con elettrocauterio, A-PRF è stato preparato sotto forma di membrane dopo compressione del coagulo per 2 minuti. Il surnatante derivato dalla spremitura è stato raccolto dal Wound L-PRF Box con una siringa sterile da 10 cc ed è stato inserito con cura nella lesione cutanea fino all'osso insieme al frammento di PRF costituente il terzo prossimale della membrana A-PRF<sup>10,11</sup>. Prima dell'innesto di PRF la lesione è stata lavata con perossido di idrogeno poiché il sanguinamento attivo impedisce l'azione dei fattori di crescita. La medicazione è stata eseguita con garza grassa, garza sterile, cotone germanico e bendaggio elastico adesivo. La terapia farmacologica post-chirurgica è stata con levofloxacina 500 mg cp, 1 cp al giorno per 5 giorni ed eparina a basso peso molecolare (enoxaparina sodica) per 7 giorni, in aggiunta ai farmaci che ogni singolo paziente assume regolarmente per le altre patologie. Sulla base dei risultati della coltura e dell'antibiogramma, sono stati aggiunti antibiotici specifici per uso generale per 15 giorni. La prima medicazione è stata eseguita dopo 7 giorni. I pazienti sono stati esaminati ogni settimana ambulatorialmente fino alla guarigione. Se non ci fossero segni di guarigione della ferita, la PRF sarebbe riapplicata 5 settimane più tardi. Tutti i residui di PRF sono stati rimossi con acqua e garza sterile alla prima applicazione. I pazienti hanno continuato

con una medicazione rifatta tra le sessioni di PRF come era stato utilizzato in precedenza.

Per due pazienti è stato necessario eseguire la procedura una seconda volta dopo 40 giorni.

### **Severity Score della ferita**

Un punteggio della gravità della ferita è stato assegnato in base alla situazione clinica, anatomica, e misurando la ferita e le variabili del paziente. I punteggi sono stati assegnati arbitrariamente e ponderati utilizzando l'esperienza clinica tradizionale sulla guarigione delle ferite. Questi parametri generali della ferita sono elencati nella Tabella II. Considerazioni anatomiche come la presenza di osso esposto o tendine, la posizione della ferita, e la qualità degli impulsi dell'arteria pedidia e della tibiale posteriore (e la posizione rispetto alla ferita) sono stati registrati e ottenuti (Tab. III). Le ferite sono state misurate per determinare la superficie totale della ferita, la profondità e l'estensione dello scollamento. La misurazione della superficie della ferita è stata determinata fotografando la ferita e confrontandola con una striscia graduata al millimetro e poi analizzata con un software di misurazione (IC Measure 2.0.0.133), reperito gratuitamente sul Web.

Tre misurazioni sono state fatte e la superficie finale era la media tra le tre misurazioni. La durata della ferita è stata determinata dalla storia del paziente. I punteggi assegnati a queste varie misurazioni della ferita si trovano nella Tabella IV. Sono stati registrati i punteggi iniziali e successivi della ferita e tabulati ad ogni visita clinica da due clinici ricercatori e da infermieri specialisti nella guarigione delle ferite. Queste determinazioni sono state periodicamente controllate dal proponente investigatore.

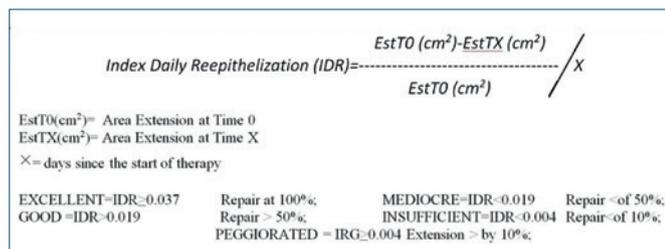
Il *Severity Score* della ferita è riportato in Tabella I per ogni paziente.

### **Definizione di successo della guarigione**

La comparsa di nuovo epitelio di copertura è stata considerata come indice di avvenuta guarigione della ferita. Questo è stato determinato visivamente durante la valutazione della ferita effettuata nel corso del programma di follow-up di routine. Ad ogni visita sono state prese le misure e le fotografie della ferita per documentare lo stato di avanzamento. Il risultato del trattamento è basato sulla variazione percentuale della superficie e volume, calcolato come misurazione meno misurazione al giorno della valutazione iniziale diviso per la misurazione iniziale (IDR) (Fig. 3).

## **Risultati**

Gli autori hanno prodotto e utilizzato membrane A-PRF create da sangue periferico, in pazienti con osteomielite,



**Figura 3.** Indice ri-epitelizzazione giornaliera (IDR).

con lesioni cutanee dei piedi per almeno 6 mesi. Le membrane, insieme al liquido derivato dalla compressione del Wound L-PRF Box, sono state inserite nella lesione cutanea, fino all'osso, dopo lo sbrigliamento chirurgico. L'evoluzione delle lesioni è stata successivamente analizzata nel tempo.

I risultati ottenuti con questa tecnica sono riportati in Tabella I, insieme alle caratteristiche globali dei pazienti trattati.

L'età media dei pazienti trattati è 65,14 anni ± 4,61, con un rapporto maschi/femmine di 5/2, tutti i pazienti erano portatori di Osteomielite Cronica ed Arteriopatia Cronica Ostruttiva in Malattia Diabetica non Insulino-dipendente diagnosticata da 26,00 anni ± 8,0 in media. La durata media della patologia osteomielitica era di 70,57 giorni ± 22,88. Il punteggio medio del *severity score* dei pazienti trattati è stato di 26,0 ± 8,0 (Tab. I).

Tutti i pazienti hanno mostrato positività al test PTB, e la Risonanza Magnetica Nucleare ha mostrato un ispessimento cortico-periostale e/o osteolisi con focolai della cortico- spugnosa, adiacente all'ulcera. Era anche presente osteonecrosi con severa frammentazione ed erosione a carico delle ossa (Figg. 4-6).

I batteri Gram-positivi sono stati trovati nei nostri pazienti nel 52% dei casi. Tra gli agenti trovati vi sono cocci Gram-positivi come *S. aureus* (15,6%), Streptococchi β-emolitici (12,1%), *S. viridans* (7,1%) e bacilli Gram-negativi come *Pseudomonas* (10,6%), *Proteus* (7,8%), *Enterobacter* (5,7%). La candida era presente nel 2,8% dei casi.

Il tempo medio del trattamento dopo l'innesto di PRF è stato di 31,43 giorni ± 4,5. Il follow-up medio ad oggi è di 570,6 giorni ± 566,4.

## Discussione

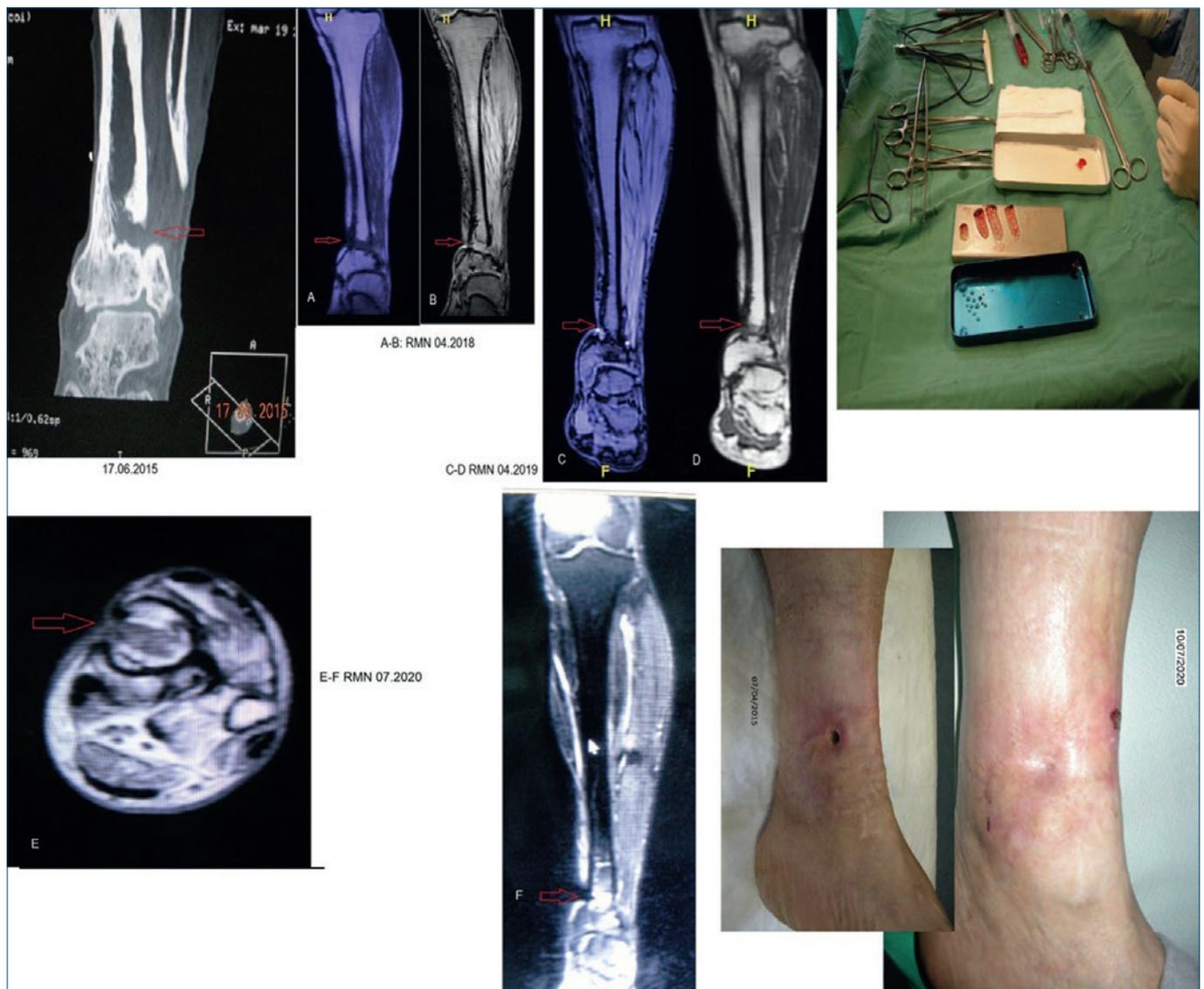
A tutt'oggi, le lesioni osteomielitiche cutanee sono guarite in tutti i pazienti trattati (solo un paziente dopo due anni dall'intervento è deceduto per cause cardiache, ma la lesione era già completamente guarita), senza segni di infezione o ricadute. In uno dei pazienti (n. 1) stiamo os-

servando a distanza di cinque anni dalla cicatrizzazione della lesione cutanea una certa ricrescita ossea (Fig. 4F). L'uso di PRF nel trattamento delle lesioni cutanee del piede da parte degli autori può aver contribuito ad ottenere i risultati riportati, con uno sforzo moderato in termini di tecnica chirurgica, e costi economici per la struttura sanitaria in cui i pazienti sono stati trattati. Inoltre, anche il rischio chirurgico a cui il paziente è sottoposto è basso.

Il trattamento della DFU è correlato a un onere finanziario significativo e il costo aumenta con la permanenza prolungata e la necessità di un intervento chirurgico. La presenza di osteomielite quindi, è un fattore critico per costi elevati, maggiore durata della degenza, uso di antibiotici a lungo termine e necessità di amputazione. Inoltre, tra tutti i fattori che influenzano la qualità delle cicatrici, quello che sembra avere il maggiore impatto è il tempo che ci vuole per guarire una ferita<sup>13</sup>. Un'ampia letteratura sostiene l'affermazione che la guarigione della ferita entro 21 giorni riduce al minimo le cicatrici. Pertanto, una delle principali aree di ricerca sulle ustioni e sulla guarigione delle ferite è quella di chiarire la fisiopatologia del processo di guarigione di una ferita, accorciando i tempi di chiusura della ferita stessa, i fattori di rischio legati al processo cicatriziale e la conversione di queste conoscenze in soluzioni terapeutiche. L'uso del PRF nella guarigione della ferita come acceleratore della riparazione della ferita sembra giustificare l'uso. L'inclusione dei leucociti nel PRF deve essere attentamente valutata in particolare quando il biomateriale viene utilizzato per la riparazione della ferita e quando la formazione della cicatrice è una delle principali preoccupazioni.

Un punto da considerare è l'inclusione dei leucociti. L'opinione di Marx et al. (1998)<sup>14</sup> secondo cui il tasso di concentrazione ideale delle piastrine era 3-4 volte nelle preparazioni del PRP suggerisce la necessità di evitare non solo piastrine altamente concentrate, ma anche l'inclusione dei leucociti. Fino ad oggi, questo è stato un argomento di dibattito: alcuni ricercatori, tra i quali gli Autori, sostengono che i leucociti dovrebbero essere inclusi per facilitare lo sbrigliamento delle ferite, la guarigione delle ferite e la successiva rigenerazione dei tessuti, mentre alcuni sono preoccupati per l'inaspettata esacerbazione dell'infiammazione<sup>15</sup>. Pertanto, altre domande ed ulteriori indagini, saranno necessarie al fine di giungere a conclusioni.

In questo studio tutti e sette i pazienti hanno eseguito il test "Probe-To-Bone" con esito positivo, la RMN ha rilevato ispessimento cortico-periostale e/o punti focali di osteolisi cortico-spongiosa con ridotta intensità del segnale nell'adiacenza dell'ulcera cutanea. Sono stati riscontrati inoltre edema dovuto a infiammazione settica e ascessi dei tessuti molli (Tab. IV). Nei nostri pazienti, come accade



**Figura 4.** Paziente n. 1. In A-C-D-E-F, RMN in vari momenti nell'evoluzione della ferita fino alla guarigione, stabile dopo cinque anni. Alla RNM ultima si apprezza anche una certa ricrescita ossea (da Crisci et al., 2020, mod.)<sup>23,24</sup>.

frequentemente nelle lesioni croniche, sono stati trovati diversi germi contemporaneamente: i batteri sono i patogeni di più comune riscontro, ma sono state identificate anche infezioni fungine.

Il trattamento dell'osteomielite cronica è attualmente costituito da trattamento chirurgico, antibioticoterapia, ossigenoterapia iperbarica (OTI), stimolazione antibatterica attiva (ITSB). Il trattamento chirurgico è il punto fondamentale della terapia<sup>16</sup>. L'obiettivo è la rimozione dell'infezione ed il ripristino funzionale del segmento osseo in trattamento. Con le procedure chirurgiche fino ad ora adottate per la terapia dell'osteomielite la possibilità di eradicare l'infezione è

quella di asportare l'osso e tutti i tessuti limitrofi interessati fino ad arrivare al tessuto vitale sano. Talvolta può però bastare una piccola asportazione che non compromette né la stabilità né la funzione dell'arto trattato, ma in molti casi dopo la rimozione dell'osso infetto si rende necessaria una idonea ricostruzione chirurgica. Insieme ai tessuti infetti è altresì opportuno rimuovere tutti i mezzi di sintesi interna (placche, viti, chiodi, cambre, ecc.) presenti nell'area infetta, e ricorrere a una nuova stabilizzazione mediante fissazione esterna. Tutte le tecniche chirurgiche esistenti possono offrire ottimi risultati, ma a fronte di trattamenti estremamente lunghi ed impegnativi, e ad un rischio di complicanze e falli-



**Figura 5.** Paziente n. 4. In A situazione radiografia del V dito, B: Condizioni intraoperatorie; C: Innesto di L-PRF profondamente nella lesione; D: evoluzione della ferita fino alla guarigione dopo 4 mesi ed un solo innesto di PRF; E: RNM al 16/07/2020 a guarigione ottenuta (da Crisci et al., 2020, mod.)<sup>23,24</sup>.

menti non trascurabile. L'utilizzazione di A-PRF nelle lesioni osteomielitiche da noi trattate hanno dato i risultati riportati con un impegno moderato in termini di tecnica chirurgica ed economico per la struttura sanitaria dove viene operato il paziente. Inoltre, è basso anche il rischio chirurgico a cui viene sottoposto il paziente (i nostri pazienti sono stati trattati tutti in anestesia sub-aracnoidea). Inoltre, l'effetto del PRF sulle cellule ossee non può essere dovuto all'azione di un singolo fattore di crescita, ma agli effetti sinergici di vari fattori di crescita piastrinici.

Ulteriori studi clinici, istologici e statistici sono richiesti per comprendere i vantaggi di questa nuova tecnica. Tuttavia, non si può ignorare che poiché ottenuto da un campione di sangue autologo, il PRF prodotto è scarso e solo un volume limitato può essere utilizzato. Questo fatto limita l'utilizzazione sistematica di PRF in grosse lesioni osteomielitiche. Anche se le potenziali applicazioni di PRF sono quindi ampie, è necessaria un'accurata conoscenza del funzionamento del biomateriale, la sua biologia, l'efficienza ed i limiti, per ottimizzare il suo utilizzo nella pratica clinica quotidiana.

## Conclusioni

Nel complesso, il A-PRF è meccanicamente resistente, in grado di sopportare carichi, ha una capacità di due volte di stirarsi sotto tensione e mantiene le suture chirurgiche in modo da poter suturare due o più membrane tra loro con punti chirurgici (si deforma in modo significativo prima della lacerazione; modulo:0.2 MPa; sforzo:140%; energia alla rottura:3.2 N.mm)<sup>16-20</sup>. La membrana ha mostrato una resistenza alla rottura equivalente a quella necessaria a rompere un'aorta intatta ed è molto maggiore rispetto ai tradizionali coaguli di PRP<sup>21</sup>.

L'obiettivo era quello di istituzionalizzare l'utilizzo di PRF in pazienti con osteomielite, per utilizzare questo concentrato piastrinico di seconda età, incoraggiando le forme di guarigione. Usando il A-PRF in casi di OM da ulcera su piede diabetico miglioreremo sicuramente la nostra comprensione sulla guarigione delle ferite, in particolare nella terapia rigenerativa delle lesioni cutanee croniche.

I risultati ottenuti in questi sette casi suggeriscono che le membrane PRF possono diventare in futuro un'opzione terapeutica in questa patologia di difficile trattamento. A



**Figura 6.** Paziente n. 5. In A e B situazione RMN del 1° dito, C: Condizioni intraoperatorie; D: Innesto di L-PRF profondamente nella lesione; E, F, G: evoluzione della ferita fino alla guarigione dopo 6 mesi ed un solo innesto di PRF (da Crisci et al., 2020, mod.)<sup>23,24</sup>.

partire da questa esperienza, intendiamo eseguire uno studio randomizzato per confermare l'effetto clinico di A-PRF e dei derivati, come i-PRF, anche in funzione della sua azione antibatterica. I motivi importanti per spiegare la probabile variabilità che si può osservare nei risultati, potrebbero essere attribuiti ai tipi di concentrati piastrinici utilizzati (PRP, PRF) che possono differire nella forma (gel o liquido), nonché nella concentrazione di piastrine, nel contenuto di leucociti, nella densità della rete fibrina, nella modalità di attivazione che può verificarsi naturalmente per contatto con i tessuti o può essere indotta dalla trombina o dal cloruro di calcio.

Gli Autori suggeriscono di utilizzare formulazioni contenenti leucociti e piastrine in combinazione dopo l'intervento chirurgico di debridement per ridurre la carica batterica

(uccidendo i batteri e inibendo la formazione del biofilm), e stimolare la guarigione.

Anche se i Concentrati Piastrinici di seconda generazione (PC) hanno effetti deboli sulla sola rigenerazione tissutale, questi biomateriali possono essere in grado di massimizzare l'efficacia di una primaria o iniziale terapia, come interventi chirurgici o farmaci, osservando un potenziamento della risposta del sistema immunitario agli antigeni<sup>15</sup>. La terapia PC può anche essere considerata una "terapia sostitutiva".

In entrambi i casi, i PC forniscono gli elementi necessari per la rigenerazione dei tessuti, inclusi i fattori di crescita e i materiali per ponteggi, che non possono essere forniti direttamente da interventi chirurgici o farmaci.

Gli Autori sperano che questo lavoro sia una delle basi

per studi futuri per esplorare ulteriormente il contributo di leucociti nella preparazione di PRF per ottenere una preparazione ottimale sia per combattere le infezioni che per promuovere efficacemente la guarigione delle ferite in particolare in casi di osteomielite cronica.

## Bibliografia

- 1 Fujioka-Kobayashi M, Miron RJ, Hernandez M, et al. Optimized platelet-rich fibrin with the low-speed concept: growth factor release, biocompatibility, and cellular response. *J Periodontol* 2017;88:112-21. <https://doi.org/10.1902/jop.2016.160443>
- 2 Toffler M, Toscano N, Holtzclaw D, et al. Introducing, Choukroun mins platelet rich fibrin (PRF) to reconstructive surgery milieu. *JACD* 2009;6:21-32.
- 3 Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. *Lancet* 2004;364:369-79.
- 4 Calhoun JH, Manring MM, Shirliff M. Osteomyelitis of the long bones. *Semin Plast Surg* 2009;23:59-72. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1214158>
- 5 Gogia JS, Meehan JP, Di Cesare PE, et al. Local antibiotic therapy in osteomyelitis. *Semin Plast Surg* 2009;23:100-7. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1214162>
- 6 Crisci A, Marotta G, Licito A, et al. Use of leukocyte platelet (L-PRF) rich fibrin in diabetic foot ulcer with osteomyelitis (three clinical cases report). *Diseases* 2018;6:30. <https://doi.org/10.3390/diseases6020030>.
- 7 Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Hernandez M, et al. Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry? *Clin Oral Investig* 2017;21:2619-27. <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2063-9>
- 8 Schär MO, Diaz-Romero J, Kohl S, et al. Platelet-rich concentrates differentially release growth factors and induce cell migration in vitro. *Clin Orthop Relat Res* 2015;473:1635-43. <https://doi.org/10.1007/s11999-015-4192-2>
- 9 Miron RJ, Chai J, Fujioka-Kobayashi M, et al. Evaluation of 24 protocols for the production of platelet-rich fibrin. *BMC Oral Health* 2020;20:310. <https://doi.org/10.1186/s12903-020-01299-w>
- 10 Crisci A, Lombardi D, Serra E, et al. Standardized protocol proposed for clinical use of L-PRF and the use of L-PRF Wound Box®. *J Unexplored Med Data* 2017;2:77-87. <https://doi.org/10.20517/2572-8180.2017.17>
- 11 Crisci A, Lombardi D, Serra E, et al. L-PRF: standardized protocol proposed for the use of fibrin rich in leukocyte platelet and the use of L-PRF Wound Box. Selection of an animal model. *Update in Plastic Surgery* 2017;3:141-9.
- 12 Crisci A. The L-PRF membrane (fibrin rich in platelets and leukocytes) and its derivatives (A-PRF, I-PRF) are useful as a source of stem cells in regenerative wound therapy: experimental work on the horse. *Regen Med Ther* 2019;3:37-45. <https://doi.org/10.36959/654/392>
- 13 D'asta F, Halstead F, Harrison P, et al. The contribution of leukocytes to the antimicrobial activity of platelet-rich plasma preparations: a systematic review. *Platelets* 2018;29:9-20. <https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1317731>
- 14 Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, et al. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85:638-46.
- 15 Kawase T, Mubarak S, Mourão CF. The platelet concentrates therapy: from the biased past to the anticipated future. *Bio-engineering* 2020;7:82. <https://doi.org/10.3390/bioengineering7030082>
- 16 Apostólico JS, Lunardelli VA, Coirada FC, et al. Adjuvants: classification, modus operandi, and licensing. *J Immunol Res* 2016,1459394. <https://doi.org/10.1155/2016/1459394>
- 17 Crisci A. La gestione dell'osteomielite nel piede diabetico. In: Crisci A. Il piede diabetico: nuove prospettive di prevenzione e cure. Roma: Edizioni Aracne 2014, pp. 109-113.
- 18 Madurantakam P, Yoganarasimha S, Hasan FK. Characterization of leukocyte-platelet rich fibrin, a novel biomaterial. *J Vis Exp* 2015;29:53221. <https://doi.org/10.3791/53221>
- 19 Cieslik-Bielecka A, Dohan Ehrenfest DM, Lubkowska A, et al. Microbicidal properties of leukocyte-and platelet-rich plasma/fibrin (L-PRP/L-PRF): new perspectives. *JBRHA* 2012;2(S):43-52.
- 20 Crisci A, Benincasa G, Crisci M, et al. Leukocyte Platelet-6. Rich Fibrin (L-PRF), a new bio membrane useful in tissue repair: basic science and literature review. *Bio interface Res Appl Chem* 2018;5:3635-43.
- 21 Crisci A, Crisci F, Crisci M. Second-generation platelet concentrates (L-PRF, A-PRF, i-PRF, i-PRF M, i-PRF+) in cutaneous wound surgery of the foot. *Adv Res Foot Ankle* 2019;2:111. <https://doi.org/10.29011/ARFA-111.1000011>
- 22 O'Connell SM, Hessler K, Darik H. Cascade Autologous System platelet-rich fibrin in the treatment of chronic leg ulcers. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2012;1:52-5. <https://doi.org/10.1089/wound.2011.0290>
- 23 Crisci A, D'Adamo R, Crisci M. The second-generation platelet concentrates in the treatment of chronic osteomyelitis: one modern regenerative surgery. *International Journal of Research - Granthaalayah* 2020;8:112-22. <https://doi.org/10.29121/granthaalayah.v8.i10.2020.1842>
- 24 Crisci A, D'Adamo R, Crisci M. Clinical trial on solid 2nd generation platelet-concentrates in the management of the chronic osteomyelitis: a advanced regenerative surgeries. *Preprints* 2020;2020120093. <https://doi.org/10.20944/preprints202012.0093.v1>