

The L-PRF membrane and its derivatives useful in wound care surgery

Alessandro Crisci,^{1,3} Carmela Rescigno,² Michela Crisci⁴

¹Unit of Dermosurgery Cutaneous Transplantations and Hard-to-Heal Wound, “Villa Fiorita” Private Hospital, Aversa (CE), Italy;

²School of Medicine, University of Salerno, Fisciano (SA), Italy; ³Institute for the Studies and Care of Diabetics, Abetaia, Casagiove (CE), Italy; ⁴Faculty of Medicine and Surgery, Vasile Goldis Western University of Arad, Arad, Romania

ABSTRACT

Growing multidisciplinary field of tissue engineering aims to regenerate, improve or replace predictably damaged or missing tissues for a variety of conditions caused by trauma, disease and old age. To ensure that tissue engineering methods are widely applicable in the clinical setting, it is necessary to modify them in such a way that they are readily available and relatively easy to use in daily clinical routine. Therefore, the steps between preparation and application must be minimized and optimized to make them realistic implementation. General objective of developing platelet concentrates of natural origin can be produced *close* to the patient and accelerate the implantation process, being financially realistic for the patient and the health system. Fibrin rich in platelets and leukocytes (PRF) and its derivatives have been used in a wide variety of medical fields for soft tissue regeneration. In conclusion, the results of this systematic review highlight the positive effects of PRF on wound healing after regenerative therapy for the management of various soft tissue defects found in wound care.

INTRODUCTION

The multidisciplinary field of tissue engineering aims to repair, regenerate or restorably repair damaged and supportive tissues, including cells, tissues and organs, due to an assortment of biological conditions, including congenital anomalies, lesions, diseases and/or aging^{1,2}. During their regeneration, a key aspect concerns the growth of a vascular source that is able to support cell function and the future

development of tissues by maintaining a vital nutrient exchange through vessels blood. Although most tissue engineering scaffolds are avascular in nature, it remains essential that all regenerative strategies focus on developing a vascular network to achieve positive clinical outcomes and regeneration in both soft and hard tissues.³ Wound healing involves a cascade of complex, orderly and elaborate events involving many cell types driven by the release of soluble mediators and signals that are able to influence the return of circulating cells to damaged tissues. Platelets have proven to be important cells that regulate the hemostasis phase through vascular obliteration and facilitating the formation of fibrin clots. It is known that they are responsible for the activation and release of important biomolecules, including specific platelet proteins, growth factors including platelet-derived growth factor (PDGF), coagulation factors, adhesion molecules, cytokines/chemokines and angiogenic factors that are able to stimulate proliferation and activation of cells involved in wound healing, including fibroblasts, neutrophils, macrophages and mesenchymal stem cells. Despite the widespread use of platelet concentrates (HPC) (Figure 1) such as platelet-rich plasma, one of the drawbacks reported is the use of anticoagulation factors that delay normal wound events.^{4,5} Because of these limitations, further research has been focused on the development of a second generation platelet concentrate without using anticoagulation factors. As such, a platelet concentrate free of coagulation factors, subsequently termed platelet-rich fibrin (PRF), was developed because of its properties of anticipating tissue regeneration and wound healing. This fibrin scaffold, which has no cytotoxic potential, is obtained from 9 ml of the patient’s blood after 1 phase of centrifugation and contains a variety of blood cells – including platelets,

Correspondence: Alessandro Crisci, Unit of Dermosurgery Cutaneous Transplantations and Hard-to-Heal Wound, “Villa Fiorita” Private Hospital, 81031 Aversa (CE), Italy.
E-mail: alessandrocrisci@libero.it

Key words: Growth factors; Fibrin-rich in leukocytes and platelets; Fibrin-rich in injectable platelets; Stem cells.

Contributions: the authors contributed equally.

Conflict of interest: the authors declare no potential conflict of interest.

Funding: none.

Received for publication: 4 December 2018.

Accepted for publication: 21 January 2019.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution Non-Commercial 4.0 License (CC BY-NC 4.0).

©Copyright A. Crisci et al., 2019

Licensee PAGEPress, Italy

Italian Journal of Wound Care 2019; 3(1):12-18

doi:10.4081/ijwc.2019.46

B and T lymphocytes, monocytes, stem cells, and neutrophil granulocytes – in addition to growth factors. Furthermore, L-PRF (also called leukocyte-PRF) contains white blood cells, necessary cells that are important during the wound healing process.⁶ Moreover, since white blood cells, including neutrophils and macrophages, are among the first types of cells present in wound sites, their role also includes phagocytic fragments, microbes, and necrotic tissue, thus preventing infection. Macrophages are also key cells derived from the myeloid lineage and are considered one of the key cells involved in growth factor secretion during wound healing, including the transforming growth factor beta (TGF- β), PDGF and growth factor vascular endothelium (VEGF) (Figure 2). These cells, together with neutrophils and platelets, are key players in wound healing and in combination with their growth factors/secreted cytokines are able to facilitate tissue regeneration, the formation of new blood vessels (angiogenesis) and the infection prevention.

In 2008, Lundquist⁷ was one of the first to evaluate the

effects of PRF on human dermal fibroblasts. It was found that the proliferative effect of PRF on dermal fibroblasts was significantly greater than fibrin glue and recombinant PDGF-BB. Furthermore, PRF induced rapid release of collagen 1 and prolonged release and protection against pro-

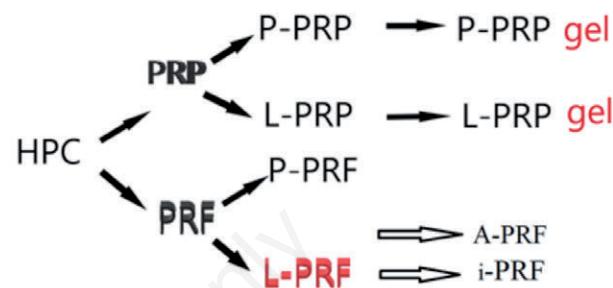


Figure 1. Platelets concentrates (HPC). PRP, platelet rich plasma; PRF, fibrin rich in platelets.

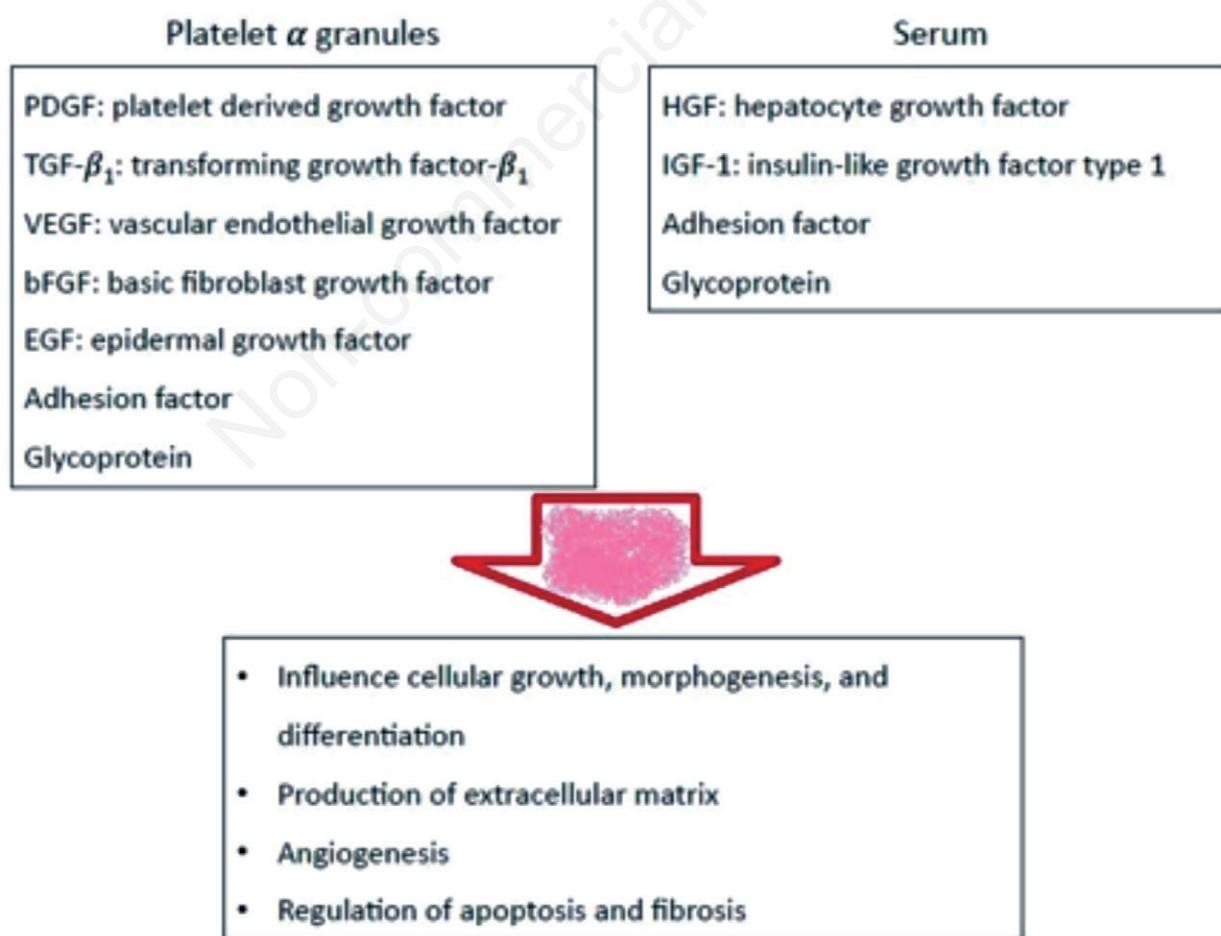


Figure 2. Function of the platelets in wound healing.

teolytic degradation of endogenous fibrogenic factors that are important for wound healing. In a second *in vitro* study conducted by Lundquist *et al.* in 2013,⁸ PRF induced the mitogenic and migratory effect on cultured human dermal fibroblasts and also showed that fibrocytes (a type of cell important for healing acute wounds) could be cultured within disks PRF, further promoting wound healing and soft tissue regeneration. Subsequently, Clipet *et al.*⁹ found that PRF induces the survival and proliferation of fibroblasts and keratinocytes. The PRF has been found to induce endothelial cell mitogenesis via the extracellular pathway of signal-regulated kinase activation. A slow and steady release of growth factors from the PRF matrix was observed that releases VEGF, a known growth factor responsible for the endothelial mitogenetic response.

L-PRF AND ITS DERIVATIVES IN THE HEALING OF CHRONIC WOUND ULCERS

L-PRF

In the longitudinal section of the L-PRF coagulum, produced according to the standard centrifugation protocol (30" of acceleration, 2' at 2700 rpm, 4' at 2400 rpm, 3' at 3000 rpm, and 36" of deceleration and stopping),⁴ a thick fibrin clot is present with minimal inter-fibre space. Cells are observed throughout the blood clot, although decreasing towards the most distal parts of the PRF clot (Figure 3).

Advanced-PRF

The PRF clots formed with the A-PRF centrifugation protocol (Advanced-PRF) (1500 rpm, 14 minutes)¹⁰ showed a freer structure with more inter-fibre space and more cells can be counted in the fibrin-rich clot. Furthermore, the cells are more evenly distributed in the clot than L-PRF, and some cells can also be found in the most distal parts of the clot. A representative image for cellular distribution within A-PRF is shown in Figure 4.

PRF injectable formulation

The development of an injectable formulation of PRF (referred to as i-PRF)^{11,12} (centrifuged at 700 rpm [60 g] for 3 minutes) was pursued with the goal of delivering a platelet concentrate easy to use to doctors in liquid formulation that can be used alone or easily combined with various biomaterials. Taking advantage of slower and shorter centrifugation speeds, a greater presence of regenerative cells with higher concentrations of growth factors can be observed compared to other PRF formulations using higher centrifugation rates.

Ghanaati *et al.*¹⁰ reported that velocity and time do not affect monocyte and stem cell concentrations, but influence

platelet and neutrophil concentrations. As a result, A-PRF contains more platelets, most were found in the distal part of the PRF and L-PRF membrane include more neutrophils. This type of concentrate has the potential to improve angiogenesis by expressing the enzymatic matrix metalloproteinase-9. Therefore, the inclusion of neutrophils in the PRF could be considered if angiogenesis is of interest.

Analysis of the study by Ghanaati *et al.*¹⁰ also revealed that the platelets were the only ones present in each coagulum area up to 87±13% in the L-PRF group and up to 84±16% in the A-PRF group (Figure 4). Furthermore, the results showed that T lymphocytes (L-PRF: 12±5%, A-PRF: 17±9%), B lymphocytes (L-PRF: 14±7%, A-PRF: 12±9%), CD34 positive stem cells (L-PRF: 17±6%, A-PRF: 21±11%), and Monocytes (L-PRF: 19±9%, A-PRF: 22±8%) not more than 30% of the total length of the clot have been found beyond a certain point, since they are distributed near the BC generated by the centrifugation process (Figure 4).

EFFECT OF PRF ON THE RELEASE OF GROWTH FACTORS

It has long been observed that the PRF releases a number of growth factors for the microenvironment.

The TGF-β has a broad efficacy of over 30 factors known as fibrosis agents, with TGF-β1 which is the most described in the literature. It is a known stimulator of the proliferation of various types of mesenchymal cells, including osteoblasts, and is the most powerful fibrotic agent among all cytokines. It plays a pre-eminent role in the synthesis of the matrix molecule such as collagen I and fibronectin, both from osteoblasts and fibroblasts. Although its regulatory mechanisms are particularly complex, TGF-β1 plays an active role in wound healing.

VEGF is the most powerful growth factor responsible for tissue angiogenesis. It has powerful effects on tissue remodeling and the incorporation of VEGF alone into various bone biomaterials has shown increases in new bone formation, thus indicating the rapid and powerful effects of VEGF.

Insulin-like growth factor is a positive regulator of proliferation and differentiation for most types of mesenchymal cells, which also act as cell protection agents. Although these cytokines are cell proliferative mediators, they also constitute the main axis of programmed regulation of cell death (apoptosis),¹³ inducing survival signals that protect cells from many apoptotic stimuli. Bayer *et al.*¹⁴ explored for the first time the properties contained in the PRF that can contribute to its anti-inflammatory/antimicrobial activities. It was discovered that in human keratinocytes, PRF induced the expression of hBD-2 (β-defensin 2).

EFFECTS OF PRF ON WOUND HEALING AND IN VIVO, ANGIOGENESIS

The effects of PRF have in particular been studied on the healing of soft tissue wounds and on angiogenesis in various animal models. In other medical pro-

cedures, the use of PRF has mainly been combined for success in the management of leg ulcers that are difficult to heal, including diabetic foot ulcers, venous ulcers, and leg ulcers. Furthermore, the PRF has been studied for the management of hand ulcers and soft tissue defects.^{15,16}

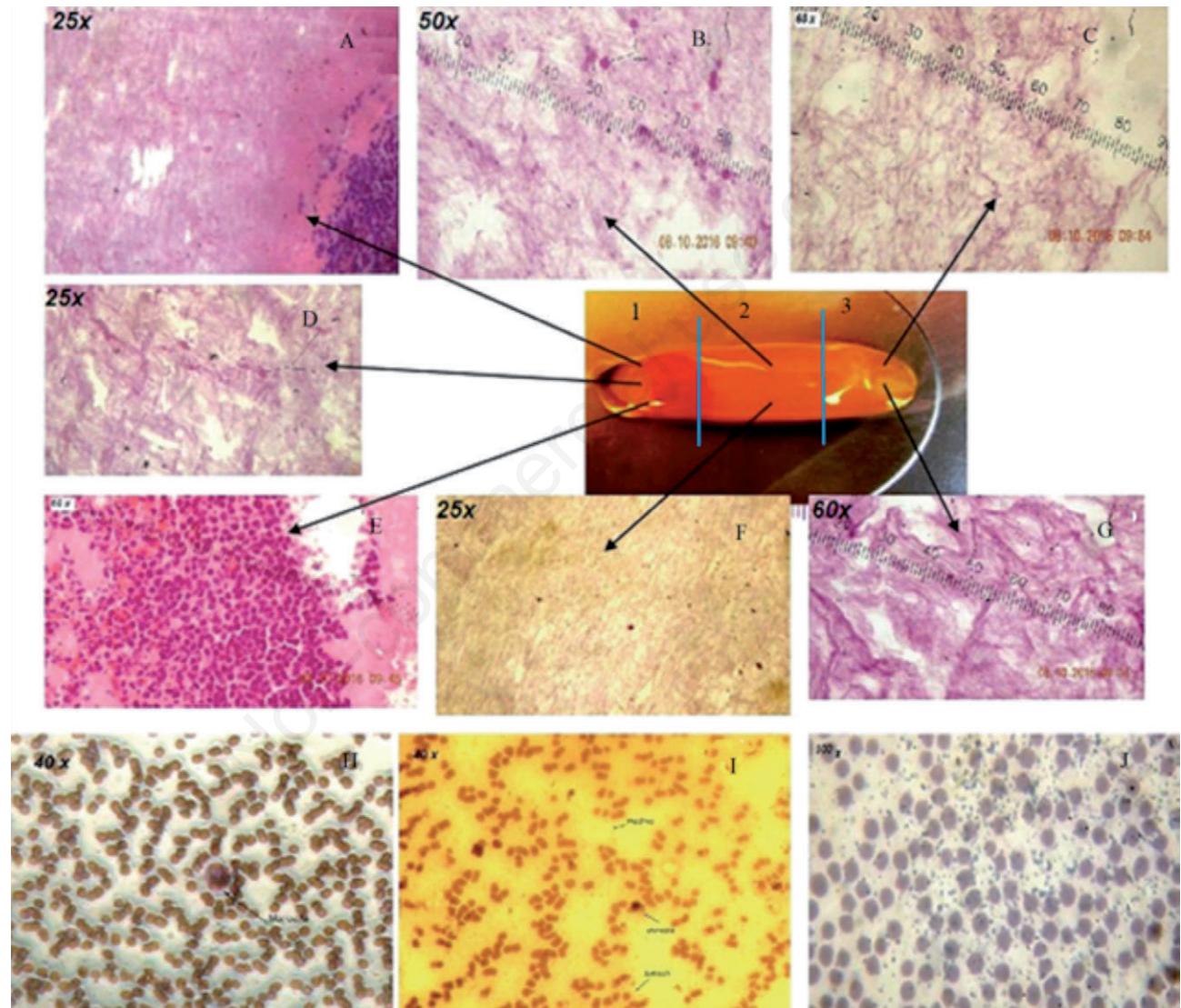


Figure 3. Horse L-PRF membrane at 0 minutes from compression (eosin-hematoxylin color). The L-PRF layers were fixed in 10% formalin buffered neutral solution at pH 7.2 for 48 hours and incorporated in paraffin according to the standard procedure. Twenty serial sections (7 µm thickness) of each sample were cut using a microtome. A) III proximal ingr. 25× white blood cells - fibrin reticulum; B) III average ingr. 60× erythrocytes-fibrin pattern; C) III distal ingr. 60× fibrin reticulum; D) III proximal ingr. 25× erythrocytes-fibrin; E) III proximal ingr. 60× fibrin on the right, lymphocytes in the center, erythrocytes and neutrophil granulocytes on the left; F) III medium ingr. 25× fibrin lattice; G) III distal ingr. 60× fibrin reticulum; H) Red clot smear ingr. 40× presence of monocytes in a carpet of erythrocytes; I) smear red clot ingr. 40× presence of erythrocytes, monocytes and platelets; J) smear red clot ingr. 100× platelets in a carpet of erythrocytes (May-Grunwald-Giemsa stain). *Reproduced from Crisci et al.,⁴ licensed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License.*

FURTHER RANDOMIZED CLINICAL TRIALS

One of the advantages reported by the PRF is the ability of the fibrin network to contain leukocytes, to resist and fight infections. Chronic unhealed wounds represent a significant medical challenge and the pathogenesis of unhealed wounds, therefore, requires new therapeutic options to improve clinical outcomes. Macrophages have proven to be key actors during tissue regeneration, wound healing and infection prevention. Furthermore, they contain antimicrobial effects that are able to reduce bacterial contamination after surgery.

DISCUSSION

The regenerative capacities of the PRF and its derivatives (A-PRF, i-PRF) (Figure 1) as a surgical adjuvant, have received considerable attention since its introduction in the early years of the new millennium. In contrast, no clear evidence remains to clarify the antimicrobial potential of this particular biomaterial that differs both structurally and biologically from other forms of HPC. Ghanaati *et al.*¹⁰ described histologically A-PRFTM as a matrix of cells seeded on fibrin-containing a variety of blood cells including: platelets, lymphocytes (B and T), monocytes, stem cells and neutrophil granulocytes able to release a set of growth factors.^{17,18} In theory, the biological components and physiological mechanisms for antimicrobial activity are similar within various types of

HPC and even coagulated blood. However, these autologous biomaterials differ in terms of i) the variable mix of cell types; ii) the vitality of the contained cells; iii) their mode of activation, natural or chemical; iv) the density of the fibrin network; v) interactions between cellular and extracellular components; vi) and the release of a variety of proteins. These differences may have a significant impact on their respective anti-inflammatory and antimicrobial properties.¹⁹⁻²³

Furthermore, the mechanisms and dynamics of the individual antimicrobial components contained in these biomaterials are poorly understood.

A-PRFTM shows antimicrobial activity against all single organisms tested within this study over a 24-hour period. These results are consistent with those of previous studies evaluating the antimicrobial properties of other HPC preparations.^{19-22,24} Because A-PRFTM shows antimicrobial properties, the need to determine whether this activity is significantly greater than that of a natural blood clot has emerged. Future investigations are needed to explore the antimicrobial spectrum of A-PRFTM and explore the possibility that it may act as a substrate to facilitate the growth of specific organisms.

Of particular relevance to the surgeon is that *Staphylococcus aureus* is a major cause of hospital-acquired infections, infections related to internal medical devices and infection of surgical wounds.²⁵ Significant research is focused on alternative treatment strategies in *S. aureus*-guided infections to reduce the risk of developing antibiotic-resistant strains.^{22,26} For this reason, *S. aureus*

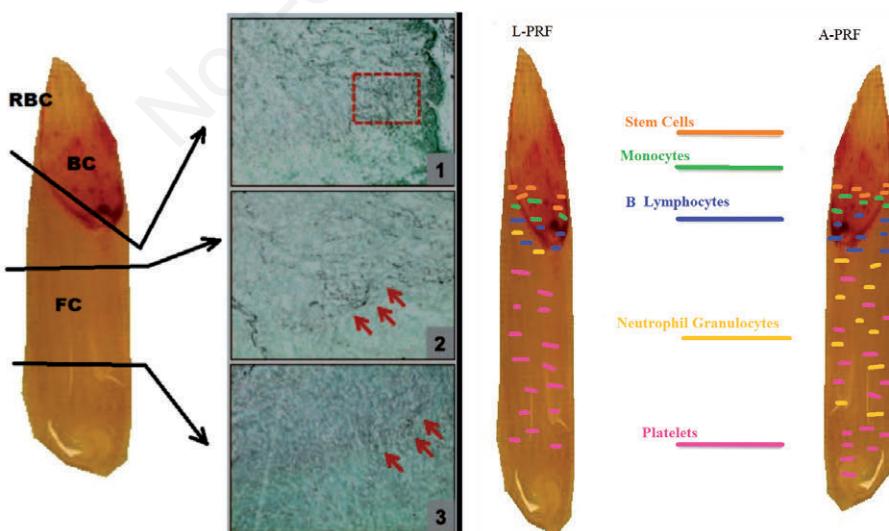


Figure 4. Advanced-PRF (A-PRF) total scan of a fibrin clot along its longitudinal axis (Masson-Goldner staining). RBC represents the fraction of red blood cells. The buffy coat (BC) is the transformation zone between the fraction of RBC and the fibrin clot and FC represents the fibrin clot. The three bars within the scan and the arrows show the first floors of the respective areas. The red arrows mark cells that are trapped inside the fibrin network.

remains the most frequently tested organism in the literature examining the antimicrobial activity of PC.¹⁹ Many different HPC preparations have shown antimicrobial activity for both methicillin-resistant and methicillin-susceptible *S. aureus* strains.^{19,22,24}

Candida albicans is the most frequently isolated of the fungal species in the microbiome. The impairment of an individual's immune response may allow these opportunistic fungi to cause infections.^{27,28} A-PRFTTM has a greater ability to consistently inhibit *C. albicans* growth than a normal blood clot. Furthermore, *C. albicans* is less susceptible to the antimicrobial components of platelets and confirms the findings of Tang *et al.*²⁹ who noted that human platelet antimicrobial peptides are more potent against fungi bacteria.

A-PRFTTM shows greater potential to inhibit *Streptococcus mutans* than a natural blood clot. However, since no other HPC has been tested against this organism, the mechanism of its inhibition and clinical potential requires further exploration.

Limitations

Although the results of many studies indicate that A-PRFTTM shows an antimicrobial activity, several limitations have emerged. Firstly, the *in vitro* investigation does not mimic a clinical situation in which A-PRFTTM will be placed in an environment surrounded by tissues that respond to a surgical event. In this scenario, A-PRFTTM can interact with a series of cells and cytokines involved in the wound healing process and modify initial immune responses and healing events.^{12,20,30} The release of activated platelet growth factors within the fibrin matrix may also modify the expression of antimicrobial peptides from surrounding tissues.¹⁴ It is possible that many patient factors can influence the quality of A-PRFTTM. Yajamanya *et al.*³¹ demonstrated that the fibrin matrix formed by their version of PRF in elderly patients was more generally organized than the fibrin matrix of younger subjects. The impact of this discovery has yet to be determined. The cell type, the number of cells and the concentration of the plasma components differ within each coagulum and between each coagulum,^{10,32} each sample disk cannot be identical to the other. One problem to be defined is that it is not yet possible to determine whether the tested material is bactericidal or bacteriostatic. Regardless of these drawbacks, the disc diffusion method was sufficient to demonstrate that A-PRFTTM shows antimicrobial activity.

CONCLUSIONS

Very little is known about the antibacterial properties of the PRF and its derivatives (A-PRF, i-PRF) and very few studies have investigated this phenomenon. From a tissue engineering point of view, it is interesting to note that so

far no research has focused on the strength, rigidity or resistance of the PRF despite its clinical use for over 15 years. Therefore, interest remains to better characterize its biomaterial properties and future research should focus on which factors could further improve its characteristics for various biomedical applications. It is essential that the next wave of research using PRF as an adjunct to soft tissue regenerative therapies develop appropriate studies with the necessary controls to further evaluate the regenerative potential of PRF for the healing of soft tissue wounds.

The use of A-PRFTTM in clinical practice has shown great potential to improve healing and improve surgical outcomes as it serves as an autologous scaffold that hosts cells and bioactive compounds.^{12,33-35} However, the antimicrobial potential of the material has been demonstrated and may be an important property contributing to clinically detected accelerated and uncomplicated healing events. The results of this review indicate that A-PRFTTM shows, however, an antimicrobial activity against *S. aureus*, *S. mutans*, *Enterococcus faecalis* and *C. albicans*. Furthermore, the spectrum and potency as an antimicrobial agent are far lower than those of an established surgical antimicrobial (specific antibiotic). Future investigations involving A-PRFTTM are therefore necessary to determine the full spectrum of its *in vitro* antimicrobial activity, its *in vivo* participation and the influence of the patient's characteristics on its biological activity. Furthermore, its clinical potential should be explored as a vehicle for the local administration of drugs within infected sites.¹⁹

Future studies should increase both patient variation and sample sizes for all future HPC-based studies.

REFERENCES

1. Crisci A. Le membrane L-PRF utili in chirurgia. J Plast Dermatol 2015;2:75-90.
2. Crisci A, Placido F, Crisci M, Bosco A. A new instrument aid of plastic surgeon: membranes L-PRF (Platelet-Rich-Fibrin). Update Plast Surg 2015;3:162-72.
3. Crisci A, Serra E, Cardillo F, Crisci M. Selezione di un modello animale pertinente per la prova degli effetti in vitro della fibrina ricca di leucociti e piastrine di Choukroun (L-PRF equino). Nota su un protocollo standardizzato proposto per l'uso clinico e l'uso di L-PRF Wound Box®. V.P.E. 2017; 1:41-50.
4. 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.
5. Marotta G, Licito A, Serra E, et al. Evaluation of genotyping methods and costs for IL1a polymorphisms in Platelet Rich-Plasma (PRP); viewpoint for therapy on the diabetic foot ulcers. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2018;22:575-7.
6. Crisci A, Benincasa G, Crisci M, Crisci F. Leukocyte Platelet-Rich Fibrin (L-PRF), a new biomembrane useful in tissue repair: basic science and literature review. Biointerface Res Appl Chem 2018;8:3635-43.

7. Lundquist R, Dziegieł MH, Agren MS. Bioactivity and stability of endogenous fibrogenic factors in plateletrich fibrin. *Wound Repair Regen* 2008;16:356.
8. Lundquist R, Holmstrøm K, Clausen C, et al. Characteristics of an autologous leukocyte and platelet-rich fibrin patch intended for the treatment of recalcitrant wounds. *Wound Repair Regen* 2013;21:66-76.
9. Clipet F, Tricot S, Alno N, et al. In vitro effects of Choukroun's platelet-rich fibrin conditioned medium on 3 different cell lines implicated in dental implantology. *Implant Dent* 2012;21:51-6.
10. Ghanaati S, Booms P, Orlowska A, et al. Advanced Platelet-Rich Fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *J Oral Implantol* 2014;40: 679-89.
11. Choukroun J. Advanced-PRF and i-PRF: platelet concentrates or blood concentrates? *J Periodont Med Clin Pract* 2014;1:1-3.
12. Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Hernandez M, et al. Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry? *Clin Oral Invest* 2017;21:2619-27.
13. Crisci A, De Crescenzo U, Crisci M. Platelet-Rich Concentrates (L-PRF, PRP) in tissue regeneration: control of apoptosis and interactions with regenerative cells. *J Clin Mol Med* 2018;1:5-12.
14. Bayer A, Lammel J, Rademacher F, et al. Platelet-released growth factors induce the antimicrobial peptide human beta-defensin-2 in primary keratinocytes. *Exper Dermatol* 2016; 25:460-5.
15. 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.
16. Crisci A, Marotta G, Benincasa G, Crisci M. L-PRF (fibrina ricca in leucociti e piastrine): uso in tre casi di ulcera diaabetica con osteomielite cronica. *J AMD* 2018;21:197-203.
17. Kobayashi E, Flückiger L, Fujioka-Kobayashi M, et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Invest* 2016;20:2353-60.
18. 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*. 2016;88:112-21.
19. Del Fabbro M, Bortolin M, Taschieri S, et al. Antimicrobial properties of platelet-rich preparations. A systematic review of the current pre-clinical evidence. *Platelets* 2016;27:276-85.
20. Burnouf T, Chou M-L, Wu U-W, et al. Antimicrobial activity of platelet (PLT)-poor plasma, PLT-rich plasma, PLT gel, and solvent/detergent-treated PLT lysate biomaterials against wound bacteria. *Transfusion* 2013;53:138-46.
21. Cieslik-Bielecka A, Dohan Ehrenfest DM, Lubkowska A, Bielecki T. Microbicidal properties of leukocyte- and platelet-rich plasma/fibrin (L-PRP/L-PRF): new perspectives. *J Biol Regul Homeost Agents* 2012;26:43-52.
22. Anitua E, Muruzabal F, Orive G. Antimicrobial properties of plasma rich in growth factors (PRGF-ENDOREST). In: Méndez-Vilas A, ed. *Science against microbial pathogens*. Formatex; 2011. pp 414-421.
23. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol* 2009;27:1578-67.
24. Bielecki TM, Gazdzik TS, Arendt J, et al. Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances: An in vitro study. *J Bone Joint Surg* 2007;89-B:417-20.
25. Zalavras CG, Patzakis MJ, Holton P. Local antibiotic therapy in the treatment of open fractures and osteomyelitis. *Clin Orthop* 2004;427:86-93.
26. Sause WE, Buckley PT, Strohl WR, et al. Antibody-Based biologics and their promise to combat staphylococcus aureus infections. *Trends Pharmacol Sci* 2016;37:231-41.
27. Jabra-Rizk MA, Kong EF, Tsui C, et al. *Candida albicans* pathogenesis: fitting within the host-microbe damage response framework. *Infect Immun* 2016;84:2724-39.
28. Marsh PD, Zaura E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *J Clin Periodontol* 2017;44:S12-22.
29. Tan Y-Q, Yeaman MR, Selsted ME. Antimicrobial Peptides from Human Platelets. *Infect Immun* 2002;70:6524-33.
30. El-Sharkawy H, Kantarci A, Deady J, et al. Platelet-rich plasma: Growth factors and pro- and anti-inflammatory properties. *J Periodontol* 2007;78:661-9.
31. Yajamanya SR, Chatterjee A, Babu CN, Karunanithi D. Fibrin network pattern changes of platelet-rich fibrin in young versus old age group of individuals: A cell block cytology study. *J Indian Soc Periodontol* 2016;20:151-6.
32. El Bagdadi K, Kubesch A, Yu X, et al. Reduction of relative centrifugal forces increases growth factor release within solid platelet-rich-fibrin (PRF)- based matrices: a proof of concept of LSCC (low speed centrifugation concept). *Eur J Trauma Emerg Surg* 2017; doi: 10.1007/s00068-017-0785-7. [Epub ahead of print]
33. Castro AB, Meschi N, Temmerman A, et al. Regenerative potential of leucocyte- and platelet-rich fibrin. Part B: sinus floor elevation, alveolar ridge preservation, and implant therapy. A systematic review. *J Clin Periodontol* 2017;44: 225-34.
34. Moraschini V, dos Santos Porto Barboza E. Use of platelet-rich fibrin membrane in the treatment of gingival recession: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol* 2016; 87:281-90.
35. Del Corso M, Vervelle A, Simonpieri A, et al. Current Knowledge and Perspectives for the Use of Platelet-Rich Plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 1: periodontal and dentoalveolar surgery. *Curr Pharmaceut Biotechnol* 2012;13:1207-30.

La membrana L-PRF e suoi derivati utili nella chirurgia del *wound care*

Alessandro Crisci,¹⁻³ Carmela Rescigno,² Michela Crisci⁴

¹Unità di Dermochirurgia Trapianti Cutanei e Ferite Difficili, Ospedale Privato “Villa Fiorita”, Aversa (CE), Italia; ²Dipartimento di Medicina, Università di Salerno, Fisciano (SA), Italia; ³Istituto per gli Studi e la Cura dei Diabetici, Abetaia, Casagiove (CE); ⁴Facoltà di Medicina e Chirurgia, Vasile Goldis Western University of Arad, Arad, Romania

RIASSUNTO

Il crescente settore multidisciplinare dell’ingegneria tessutale mira a rigenerare, migliorare o sostituire in modo prevedibile i tessuti danneggiati o mancanti per una varietà di condizioni cause da traumi, malattie e vecchiaia. Per garantire che i metodi per l’ingegneria tessutale siano ampiamente applicabili in ambito clinico, è necessario modificarli in modo da renderli prontamente disponibili e relativamente facili da usare nella routine clinica quotidiana. Pertanto, i passaggi tra la preparazione e l’applicazione devono essere ridotti al minimo e ottimizzati per renderli pratici e l’implementazione realistica. L’obiettivo generale di sviluppare concentrati piastrinici di origine naturale può essere prodotto vicino al paziente e accelerare il processo di impianto essendo finanziariamente realistico per il paziente e per il sistema sanitario. La fibrina ricca di piastrine (PRF) e i suoi derivati sono stati utilizzati in un’ampia varietà di campi medici per la rigenerazione dei tessuti molli. In conclusione, i risultati della presente revisione sistematica evidenziano gli effetti positivi del PRF sulla guarigione delle ferite dopo terapia rigenerativa per la gestione di vari difetti dei tessuti molli riscontrabili nel *wound care*.

INTRODUZIONE

Il campo multidisciplinare dell’ingegneria tessutale mira a riparare, rigenerare o ripristinare in modo prevedibile tessuti danneggiati e di supporto, tra cui cellule, tessuti e organi, a causa di un assortimento di condizioni biologiche, tra cui anomalie congenite, lesioni, malattie e/o invecchiamento.^{1,2} Durante la loro rigenerazione, un aspetto chiave riguarda la crescita di una fonte vascolare che è in grado di supportare la funzione cellulare e lo svi-

Corrispondenza: Alessandro Crisci, Unità di Dermochirurgia Trapianti Cutanei e Ferite Difficili, Ospedale Privato “Villa Fiorita”, 81031 Aversa (CE), Italia.

E-mail: alessandrocrisci@libero.it

Key words: Fattori di crescita; Fibrina ricca di leucociti e piastrine; Fibrina ricca di piastrine iniettabili; Cellule staminali.

Contributi: gli autori hanno contribuito equamente.

Conflitto d’interesse: gli autori dichiarano l’assenza di conflitto d’interesse.

Fondi: nessuno.

Ricevuto per la pubblicazione: 4 Dicembre 2018.
Accettato per la pubblicazione: 21 Gennaio 2019.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution Non-Commercial 4.0 License (CC BY-NC 4.0).

©Copyright A. Crisci et al., 2019
Licensee PAGEPress, Italy
Italian Journal of Wound Care 2019; 3(1):19-26
doi:10.4081/ijwc.2019.46

luppo futuro dei tessuti mediante il mantenimento di uno scambio vitale di nutrienti attraverso i vasi sanguigni. Sebbene la maggior parte degli *scaffolds* di ingegneria tessutale siano di natura avascolare, rimane essenziale che tutte le strategie rigenerative si concentrino sullo sviluppo di una rete vascolare per ottenere esiti clinici positivi e rigenerazione sia sui tessuti molli che duri.³ La guarigione delle ferite comporta una cascata di eventi complessi, ordinati ed elaborati che coinvolgono molti tipi cellulari guidati dal rilascio di mediatori solubili e segnali che sono in grado di influenzare il ritorno delle cellule circolanti ai tessuti danneggiati. Le piastrine si sono dimostrate cellule importanti che regolano la fase di emostasi attraverso l’obliterazione vascolare e la facilitazione della formazione di coaguli di fibrina. E’ noto che sono responsabili dell’attivazione e del rilascio di importanti biomolecole, incluse proteine piastriniche specifiche, fattori di crescita incluso il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), i fattori della coagulazione, molecole di adesione, citochine/chemiochine e fattori angiogenici che sono in grado di stimolare la proliferazione e l’attivazione delle cellule coinvolte nella guarigione delle ferite, compresi i fibroblasti, i neutrofili, i macrofagi e le cellule staminali mesenchimali. Nonostante l’uso diffuso di concentrati piastrinici (HPC) (Figura 1) come il plasma ricco di piastrine, uno degli inconvenienti riportati è l’uso di fattori anticoagulazione che ritardano i normali eventi di ferita.^{4,5} A causa di queste limitazioni, ulteriori ricerche sono state concentrate sullo sviluppo di un concentrato piastrinico di seconda generazione senza utilizzare fattori anticoagulazione. Come tale, un concentrato piastrinico privo di fattori di coagulazione, successivamente definito fibrina ricca di piastrine (PRF), è stato sviluppato a causa delle sue proprietà di anticipare la rigenerazione dei tes-

suti e la guarigione delle ferite. Questo *scaffold* di fibrina, che non possiede alcun potenziale citotossico, è ottenuto da 9 ml di sangue del paziente dopo 1 fase di centrifugazione e contiene una varietà di cellule del sangue – incluse piastrine, linfociti B e T, monociti, cellule staminali e granulociti neutrofili – oltre a fattori di crescita. L-PRF (anche chiamato leucociti-PRF), inoltre, contiene globuli bianchi, cellule necessarie che sono importanti durante il processo di guarigione della ferita.⁶ Inoltre, poiché i globuli bianchi, inclusi neutrofili e macrofagi, sono tra i primi tipi di cellule presenti nei siti di ferita, il loro ruolo include anche frammenti fagocitari, microbi e tessuto necrotico, prevenendo così l'infezione. I macrofagi sono anche le cellule chiave derivate dalla linea mieloide e sono considerati una delle cellule chiave implicate nella secrezione del fattore di crescita durante la guarigione delle ferite, compresi il fattore di crescita trasformante beta (TGF- β), PDGF e il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) (Figura 2). Queste cellule, insieme ai neutrofili e alle piastrine, sono attori chiave nella guarigione delle ferite e in

combinazione con i loro fattori di crescita/citochine secrete sono in grado di facilitare la rigenerazione dei tessuti, la formazione di nuovi vasi sanguigni (angiogenesi) e la prevenzione delle infezioni.

Nel 2008, Lundquist⁷ è stato uno dei primi a valutare

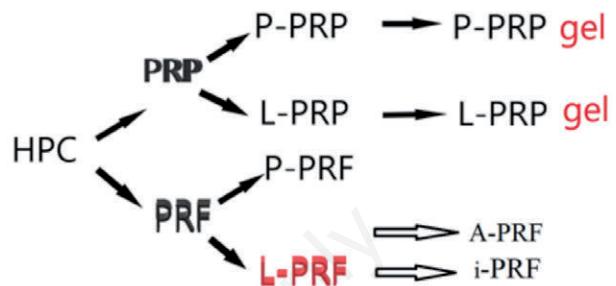


Figura 1. Concentrati piastrinici (HPC). PRP, plasma ricco di piastrine; PRF, fibrina ricca di piastrine.

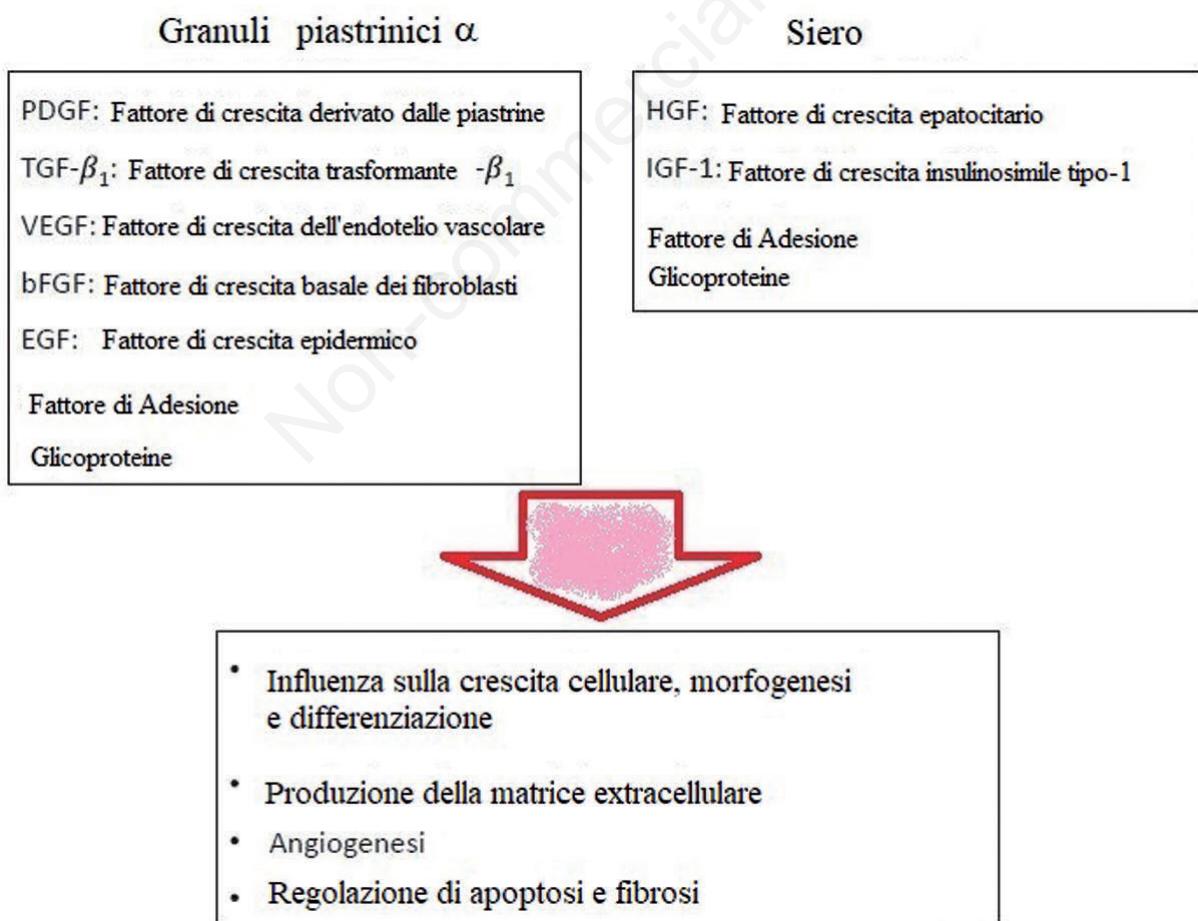


Figura 2. Funzione delle piastrine nella guarigione delle ferite.

gli effetti di PRF sui fibroblasti di derma umano. Si è constatato che l'effetto proliferativo di PRF sui fibroblasti dermici è stato in maniera significativa maggiore della colla di fibrina e del PDGF-BB ricombinante. Inoltre, la PRF induceva il rilascio rapido di collagene 1 e il rilascio prolungato e la protezione contro la degradazione proteolitica dei fattori fibrogenici endogeni che è importante per la guarigione delle ferite. In un secondo studio *in vitro* condotto da Lundquist *et al.* nel 2013,⁸ la PRF ha indotto l'effetto mitogeno e migratorio sui fibroblasti dermici umani in coltura e ha inoltre dimostrato che i fibrocyti (un tipo di cellula importante per la guarigione delle ferite acute) potrebbero essere coltivati all'interno di dischi di PRF, favorendo ulteriormente la guarigione delle ferite e la rigenerazione dei tessuti molli. Successivamente, Clipet *et al.*⁹ hanno trovato che PRF induce la sopravvivenza e la proliferazione dei fibroblasti e dei cheratinociti. È stato scoperto che la PRF induce la mitogenesi delle cellule endoteliali attraverso la via extracellulare di attivazione della chinasi regolata dal segnale. È stato osservato un rilascio lento e costante di fattori di crescita dalla matrice PRF che rilascia VEGF, un noto fattore di crescita responsabile della risposta mitogenetica endoteliale.

LA L-PRF E I SUOI DERIVATI NELLA GUARIGIONE DELLE ULCERE CRONICHE DELLE FERITE

L-PRF

Nella sezione longitudinale del coagulo L-PRF, prodotto secondo il protocollo standard di centrifugazione (30" di accelerazione, 2' a 2700 rpm, 4' a 2400 rpm, 3' a 3000 rpm, e 36" di decelerazione e arresto),⁴ è presente un denso coagulo di fibrina con uno spazio interfibre minimo. Le cellule sono osservate in tutto il coagulo, anche se in diminuzione verso le parti più distali del coagulo PRF (Figura 3).

Advanced-PRF

I coaguli di PRF formati con il protocollo di centrifugazione Advanced-PRF (A-PRF) (1500 rpm, 14 minuti)¹⁰ hanno mostrato una struttura più libera con più spazio interfibre e più cellule possono essere contate nel coagulo ricco di fibrina. Inoltre, le cellule sono distribuite più uniformemente nel coagulo rispetto a L-PRF, e alcune cellule possono essere trovate anche nelle parti più distali del coagulo. Un'immagine rappresentativa per la distribuzione cellulare all'interno di A-PRF è riportata nella Figura 4.

Formulazione iniettabile di PRF

Lo sviluppo di una formulazione iniettabile di PRF (denominato i-PRF)^{11,12} (centrifugato a 700 rpm [60 g] per

3 minuti) è stato perseguito con l'obiettivo di consegnare ai medici un concentrato piastrinico facile da usare in formulazione liquida che può essere utilizzata da sola o combinata facilmente con vari biomateriali. Approfittando di velocità di centrifugazione più lenta e più breve, una maggiore presenza di cellule rigenerative con maggiori concentrazioni di fattori di crescita può essere osservato rispetto ad altre formulazioni di PRF utilizzando velocità di centrifugazione più elevate.

Ghanaati *et al.*¹⁰ hanno riferito che la velocità e il tempo non influenzano le concentrazioni di monociti e cellule staminali, ma influenzano le concentrazioni di piastrine e neutrofili. Di conseguenza, A-PRF contiene più piastrine, la maggior parte è stata trovata nella parte distale della membrana PRF e L-PRF includono più neutrofili. Questo tipo di concentrato ha il potenziale per migliorare l'angiogenesi esprimendo la matrice enzimatica metalloproteinasi-9. Pertanto, l'inclusione di neutrofili nel PRF potrebbe essere presa in considerazione se l'angiogenesi è di interesse.

Le analisi dello studio di Ghanaati *et al.*¹⁰ hanno rivelato anche, che le piastrine erano le uniche presenti in ciascuna area del coagulo fino a 87±13% nel gruppo L-PRF e fino al 84±16% nel gruppo A-PRF (Figura 4). Inoltre, i risultati hanno mostrato che i Linfociti T (L-PRF: 12±5%, A-PRF: 17±9%), i Linfociti B (L-PRF: 14±7%, A-PRF: 12±9%), Cellule Staminali positive al CD34 (L-PRF: 17±6%, A-PRF: 21±11%), e Monociti (L-PRF: 19±9%, A-PRF: 22±8%) non sono stati trovati oltre un certo punto al massimo del 30% della lunghezza totale del coagulo, poiché sono distribuiti in prossimità del BC generato dal processo di centrifugazione (Figura 4).

EFFETTO DEL PRF SUL RILASCIO DEI FATTORI DI CRESCITA

È stato a lungo osservato che il PRF rilascia una serie di fattori di crescita per il microambiente.

Il TGF-β ha una vasta efficacia di oltre 30 fattori noti come agenti di fibrosi, con TGF-β1 che è il più descritto in letteratura. È un noto stimolatore della proliferazione di vari tipi di cellule mesenchimali, inclusi gli osteoblasti, costituisce l'agente fibrotico più potente tra tutte le citochine. Svolge un ruolo preminente nella sintesi della molecola della matrice come il collagene 1 e la fibronectina, sia dagli osteoblasti che dai fibroblasti. Sebbene i suoi meccanismi di regolazione siano particolarmente complessi, TGF-β1 svolge un ruolo attivo nella guarigione delle ferite.

Il VEGF è il fattore di crescita più potente responsabile dell'angiogenesi dei tessuti. Ha potenti effetti sul rimodellamento del tessuto e l'incorporazione del VEGF da solo in vari biomateriali ossei ha dimostrato aumenti nella nuova formazione ossea, indicando in tal modo gli effetti rapidi e potenti di VEGF.

Il fattore di crescita simile all'insulina è un regolatore positivo di proliferazione e differenziazione per la maggior parte dei tipi di cellule mesenchimali, che agiscono anche come agenti di protezione cellulare. Sebbene queste citochine siano mediatori proliferativi cellulari, costituiscono anche l'asse principale della regolazione programmata della morte cellulare (apoptosi),¹³ inducendo segnali di sopravvivenza che proteggono le cellule da molti stimoli apoptotici. Bayer *et al.*¹⁴ hanno esplorato per la prima volta le proprietà contenute nel PRF che possono contribuire alle sue attività antinfiammatorie/antimicrobiche. Si è scoperto che nei cheratinociti umani, la PRF induceva l'espressione di hBD-2 (β -defensina 2).

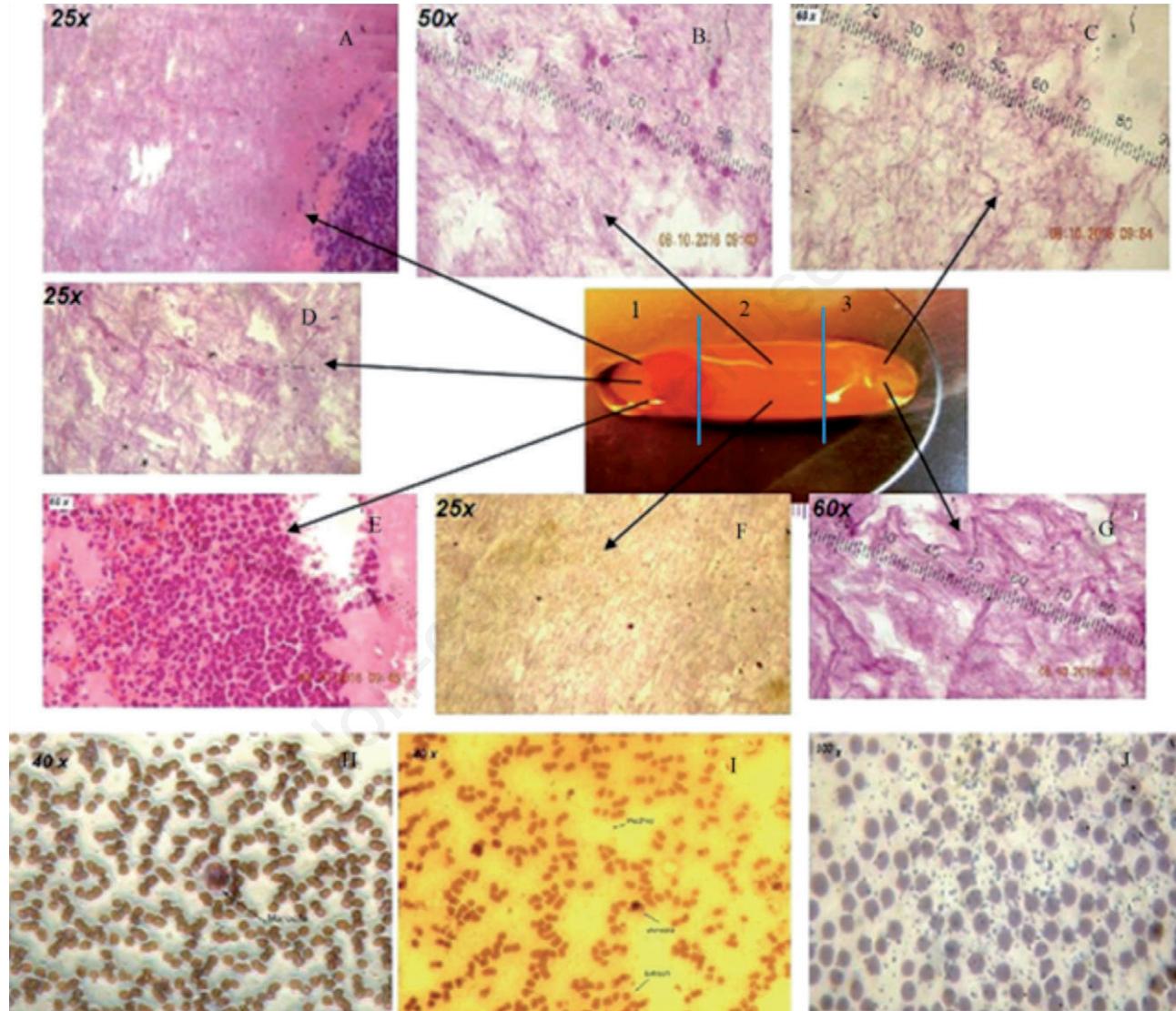


Figura 3. Membrana L-PRF di cavallo a 0 minuti dalla compressione (colorazione eosina-ematossilina). Gli strati L-PRF sono stati fissati in soluzione neutra tamponata di formalina al 10% a pH 7,2 per 48 ore e incorporata in paraffina secondo la procedura standard. Venti sezioni seriali (spessore 7 μm) di ciascun campione sono stati tagliati usando un microtomo. A) III prossimale ingr. 25 \times globuli bianchi-reticolo di fibrina; B) III medio ingr. 60 \times eritrociti-reticolo di fibrina; C) III distale ingr. 60 \times reticolo di fibrina; D) III prossimale ingr. 25 \times eritrociti-fibrina; E) III prossimale ingr. 60 \times fibrina a dx, linfociti al centro, eritrociti e granulociti neutrofili a sx; F) III medio ingr. 25 \times reticolo di fibrina; G) III distale ingr. 60 \times reticolo di fibrina; H) striscio di coagulo rosso ingr. 40 \times presenza di monocita in un tappeto di eritrociti; I) striscio coagulo rosso ingr. 40 \times presenza di eritrociti, monociti e piastrine; J) striscio coagulo rosso ingr. 100 \times presenza di piastrine in un tappeto di eritrociti (colorazione May-Grunwald-Giemsa). *Reproduced from Crisci et al.,⁴ licensed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License.*

EFFETTI DEL PRF SULLA GUARIGIONE DELLE FERITE E DELL'ANGIOGENESI IN VIVO

Gli effetti del PRF sono stati in particolare studiati sulla guarigione delle ferite dei tessuti molli e sull'angiogenesi in vari modelli animali. In altre procedure mediche, l'uso del PRF è stato principalmente combinato per il successo nella gestione delle ulcere delle gambe difficili da guarire, comprese le ulcere del piede diabetico, le ulcere venose e le ulcere arteriopatiche delle gambe. Inoltre, il PRF è stato studiato per la gestione delle ulcere della mano e nei difetti dei tessuti molli.^{15,16}

ULTERIORI STUDI CLINICI RANDOMIZZATI

Uno dei vantaggi riportati dal PRF è la capacità della rete di fibrina di contenere i leucociti, di resistere e combattere le infezioni. Le ferite non cicatrizzate croniche rappresentano una sfida medica significativa e la patogenesi delle ferite non guarite richiede pertanto nuove opzioni terapeutiche per migliorare i risultati clinici. I macrofagi hanno dimostrato di essere attori chiave durante la rigenerazione tissutale, la guarigione delle ferite e la prevenzione delle infezioni. Inoltre, contengono effetti antimicrobici che sono in grado di ridurre la contaminazione batterica dopo gli interventi chirurgici.

DISCUSSIONE

Le capacità rigenerative del PRF e dei suoi derivati (A-PRF, i-PRF) (Figura 1) come coadiuvante chirurgico hanno ricevuto notevole attenzione sin dalla sua introduzione nei primi anni del nuovo millennio. Al contrario, non rimane alcuna prova chiara per chiarire il potenziale antimicrobico di questo particolare biomateriale che differisce sia strutturalmente che biologicamente da altre forme di HPC. Ghanaati *et al.*¹⁰ hanno descritto istologicamente A-PRFTM come matrice di cellule seminate su fibrina contenente una varietà di cellule del sangue compresi: piastrine, linfociti (B e T), monociti, cellule staminali e granulociti neutrofili in grado di rilasciare una serie di fattori di crescita.^{17,18} In teoria, i componenti biologici e i meccanismi fisiologici per esercitare attività antimicrobica sono simili all'interno di vari tipi di HPC e persino del sangue coagulato. Tuttavia, questi biomateriali autologhi si differenziano per quanto riguarda: i) il mix variabile di tipi di cellule; ii) la vitalità delle cellule contenute; iii) il loro modo di attivazione, naturale o chimico; iv) la densità della rete di fibrina; v) interazioni tra componenti cellulari ed extracellulari; vi) e il rilascio di una varietà di proteine. Queste differenze possono avere un impatto significativo sulle loro rispettive proprietà antinfiammatorie e antimicrobiche.¹⁹⁻²³ Inoltre, i meccanismi e le dinamiche dei singoli componenti antimicrobici contenuti in questi biomateriali sono scarsamente comprensibili.

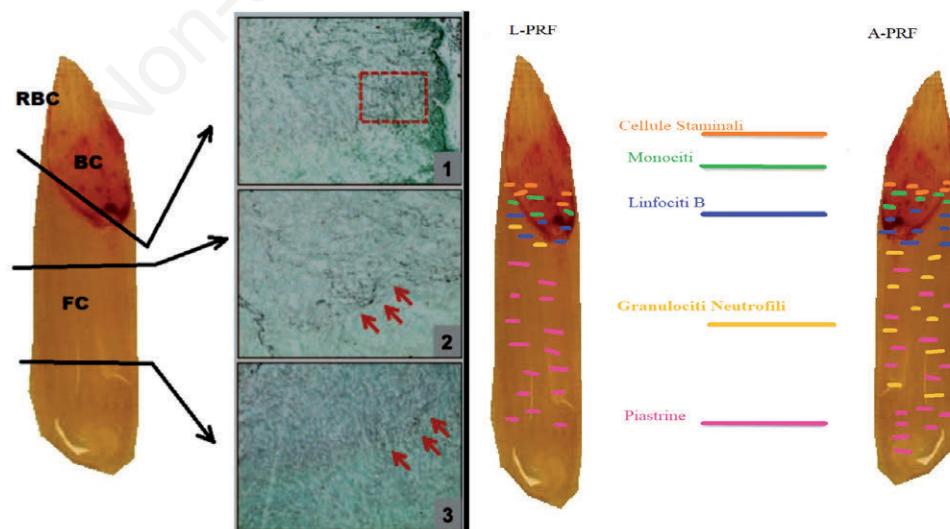


Figura 4. Advanced-PRF (A-PRF) scansione totale di un coagulo di fibrina lungo il suo asse longitudinale (colorazione di Masson-Goldner). RBC rappresenta la frazione di globuli rossi. Il *buffy coat* (BC) è la zona di trasformazione tra la frazione di RBC e il coagulo di fibrina e FC rappresenta il coagulo di fibrina. Le tre barre all'interno della scansione e le frecce mostrano i primi piani delle rispettive aree. Le frecce rosse contrassegnano le cellule che sono intrappolate all'interno della rete di fibrina.

A-PRFTM mostra l'attività antimicrobica contro tutti i singoli organismi testati all'interno di questo studio in un periodo di tempo di 24 ore. Questi risultati sono coerenti con quelli di precedenti studi che valutano le proprietà antimicrobiche di altri preparati di HPC.^{19-22,24} Poiché A-PRFTM mostra proprietà antimicrobiche è emersa la necessità di determinare se questa attività è significativamente maggiore di quella di un coagulo di sangue naturale. Sono necessarie indagini future per esplorare lo spettro antimicrobico di A-PRFTM ed esplorare la possibilità che possa agire come substrato per facilitare la crescita di organismi specifici.

Di particolare rilevanza per il chirurgo è che lo *Staphylococcus aureus* è una delle principali cause di infezioni acquisite ospedaliere, infezioni correlate a dispositivi medici interni e infezione di ferite chirurgiche.²⁵ Una ricerca significativa è focalizzata su strategie di trattamento alternative nelle infezioni guidate da *S. aureus* al fine di ridurre il rischio di sviluppare ceppi resistenti agli antibiotici.^{22,26} Per questo motivo *S. aureus* rimane l'organismo più frequentemente testato all'interno della letteratura esaminando l'attività antimicrobica di PC.¹⁹ Molte diverse preparazioni di HPC hanno dimostrato attività antimicrobica sia per ceppi meticillino-resistenti che meticillino-sensibili di *S. aureus*.^{19,22,24}

La *Candida albicans* è la più frequentemente isolata delle specie fungine all'interno del microbioma. La compromissione della risposta immunitaria di un individuo può consentire a questi funghi opportunistici di causare infezioni.^{27,28} A-PRFTM possiede una maggiore capacità di inibire costantemente la crescita di *c. albicans* rispetto a un coagulo di sangue normale. Inoltre *c. albicans* è meno suscettibile ai componenti antimicrobici delle piastrine e conferma le scoperte di Tang *et al.*²⁹ che hanno notato che i peptidi antimicrobici delle piastrine umane sono più potenti contro i batteri dei funghi.

A-PRFTM mostra un potenziale maggiore per inibire lo *Streptococcus mutans* rispetto a un coagulo di sangue naturale. Tuttavia, poiché nessun altro HPC è stato testato contro questo organismo, il meccanismo della sua inibizione e del potenziale clinico richiede ulteriori esplorazioni.

Limitazioni

Sebbene i risultati di molti studi indichino che A-PRFTM mostra un'attività antimicrobica, sono emerse diverse limitazioni. In primo luogo, l'indagine *in vitro* non imita una situazione clinica in cui A-PRFTM sarà collocato in un ambiente circondato da tessuti che rispondono a un evento chirurgico. In questo scenario, A-PRFTM può interagire con una serie di cellule e citochine coinvolte nel processo di guarigione delle ferite e modificare le iniziali risposte immunitarie e gli eventi di guarigione.^{12,20,30} Il rilascio di fattori di crescita da piastrine attivate all'interno della matrice di fibrina può anche modificare l'espressione di peptidi antimicrobici dai tessuti circostanti.¹⁴ È

possibile che numerosi fattori del paziente possano influenzare la qualità di A-PRFTM. Yajamanya *et al.*³¹ hanno dimostrato che la matrice di fibrina formata dalla loro versione di PRF nei pazienti anziani era più genericamente organizzata rispetto alla matrice di fibrina dei soggetti più giovani. L'impatto di questa scoperta deve ancora essere determinato. Il tipo di cellula, il numero di cellule e la concentrazione dei componenti del plasma differiscono all'interno di ciascun coagulo e tra ciascun coagulo,^{10,32} ciascun disco campione non può essere identico all'altro. Un problema da definire è che non si è ancora in grado di determinare se il materiale testato è battericida o batteriostatico. Indipendentemente da questi inconvenienti, il metodo di diffusione del disco è stato sufficiente a dimostrare che A-PRFTM mostra attività antimicrobica.

CONCLUSIONI

Molto poco è noto ancora circa le proprietà antibatteriche del PRF e dei suoi derivati (A-PRF, i-PRF) e molto pochi studi hanno indagato su questo fenomeno. Da un punto di vista dell'ingegneria dei tessuti, rimane interessante notare che finora nessuna ricerca si è concentrata sulla forza, rigidità o resistenza del PRF nonostante il suo uso clinico per oltre 15 anni. Pertanto, rimane l'interesse per caratterizzare meglio le sue proprietà di biomateriale e la ricerca futura dovrebbe concentrarsi su quali fattori potrebbero ulteriormente migliorare le sue caratteristiche per varie applicazioni biomediche. E' fondamentale che la prossima ondata di ricerca che utilizza il PRF come coadiuvante delle terapie rigenerative dei tessuti molli elabori studi appropriati con i controlli necessari per valutare ulteriormente il potenziale rigenerativo del PRF per la guarigione delle ferite dei tessuti molli.

L'uso di A-PRFTM nella pratica clinica ha mostrato un grande potenziale per migliorare la guarigione e migliorare gli esiti chirurgici poiché funge da *scaffold* autologo che ospita cellule e composti bioattivi.^{12,33-35} Tuttavia, il potenziale antimicrobico del materiale è stato dimostrato e può essere un'importante proprietà che contribuisce agli eventi di guarigione accelerati e non complicati rilevati clinicamente. I risultati di questa revisione indicano che A-PRFTM mostra tuttavia un'attività antimicrobica contro lo *S. aureus*, lo *S. mutans*, l'*Enterococcus faecalis* e la *C. albicans*. Inoltre, lo spettro e la potenza come agente antimicrobico sono di gran lunga inferiori a quelli di un antimicrobico chirurgico stabilito (antibiotico specifico). Sono necessarie quindi indagini future che coinvolgono A-PRFTM per determinare l'intero spettro della sua attività antimicrobica *in vitro*, la sua partecipazione *in vivo* e l'influenza delle caratteristiche del paziente sulla sua attività biologica. Inoltre, dovrebbe essere esplorato il suo potenziale clinico come veicolo per la somministrazione locale di farmaci all'interno di siti infetti.¹⁹ Gli studi futuri dovrebbero aumentare sia la varia-

zione dei pazienti che le dimensioni dei campioni per tutti gli studi futuri basati su HPC.

BIBLIOGRAFIA

1. Crisci A. Le membrane L-PRF utili in chirurgia. *J Plast Dermatol* 2015;2:75-90.
2. Crisci A, Placido F, Crisci M, Bosco A. A new instrument aid of plastic surgeon: membranes L-PRF (Platelet-Rich-Fibrin). *Update Plast Surg* 2015;3:162-72.
3. Crisci A, Serra E, Cardillo F, Crisci M. Selezione di un modello animale pertinente per la prova degli effetti in vitro della fibrina ricca di leucociti e piastrine di Choukroun (L-PRF equino). Nota su un protocollo standardizzato proposto per l'uso clinico e l'uso di L-PRF Wound Box®. *V.P.E.* 2017;1:41-50.
4. 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.
5. Marotta G, Licito A, Serra E, et al. Evaluation of genotyping methods and costs for IL1a polymorphisms in Platelet Rich-Plasma (PRP); viewpoint for therapy on the diabetic foot ulcers. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018;22:575-7.
6. Crisci A, Benincasa G, Crisci M, Crisci F. Leukocyte Platelet-Rich Fibrin (L-PRF), a new biomembrane useful in tissue repair: basic science and literature review. *Biointerface Res Appl Chem* 2018;8:3635-43.
7. Lundquist R, Dziegiej MH, Agren MS. Bioactivity and stability of endogenous fibrogenic factors in plateletrich fibrin. *Wound Repair Regen* 2008;16:356.
8. Lundquist R, Holmstrøm K, Clausen C, et al. Characteristics of an autologous leukocyte and platelet-rich fibrin patch intended for the treatment of recalcitrant wounds. *Wound Repair Regen* 2013;21:66-76.
9. Clipet F, Tricot S, Alno N, et al. In vitro effects of Choukroun's platelet-rich fibrin conditioned medium on 3 different cell lines implicated in dental implantology. *Implant Dent* 2012;21:51-6.
10. Ghanaati S, Booms P, Orlowska A, et al. Advanced Platelet-Rich Fibrin: a new concept for cell- based tissue engineering by means of inflammatory cells. *J Oral Implantol* 2014;40:679-89.
11. Choukroun J. Advanced-PRF and i-PRF: platelet concentrates or blood concentrates? *J Periodont Med Clin Pract* 2014;1:1-3.
12. Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Hernandez M, et al. Injectible platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry? *Clin Oral Invest* 2017;21:2619-27.
13. Crisci A, De Crescenzo U, Crisci M. Platelet-Rich Concentrates (L-PRF, PRP) in tissue regeneration: control of apoptosis and interactions with regenerative cells. *J Clin Mol Med* 2018;1:5-12.
14. Bayer A, Lammel J, Rademacher F, et al. Platelet-released growth factors induce the antimicrobial peptide human beta-defensin-2 in primary keratinocytes. *Exper Dermatol* 2016; 25:460-5.
15. 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.
16. Crisci A, Marotta G, Benincasa G, Crisci M. L-PRF (fibrina ricca in leucociti e piastrine): uso in tre casi di ulcera diabetica con osteomielite cronica. *J AMD* 2018;21:197-203.
17. Kobayashi E, Flückiger L, Fujioka-Kobayashi M, et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Invest* 2016;20:2353-60.
18. 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*. 2016;88:112-21.
19. Del Fabbro M, Bortolin M, Taschieri S, et al. Antimicrobial properties of platelet-rich preparations. A systematic review of the current pre-clinical evidence. *Platelets* 2016;27: 276-85.
20. Burnouf T, Chou M-L, Wu U-W, et al. Antimicrobial activity of platelet (PLT)-poor plasma, PLT-rich plasma, PLT gel, and solvent/detergent-treated PLT lysate biomaterials against wound bacteria. *Transfusion* 2013;53:138-46.
21. Cieslik-Bielecka A, Dohan Ehrenfest DM, Lubkowska A, Bielecki T. Microbicidal properties of leukocyte- and platelet-rich plasma/fibrin (L-PRP/L-PRF): new perspectives. *J Biol Regul Homeost Agents* 2012;26:43-52.
22. Anitua E, Muruzabal F, Orive G. Antimicrobial properties of plasma rich in growth factors (PRGF-ENDOREST). In: Méndez-Vilas A, ed. *Science against microbial pathogens*. Formatex; 2011. pp 414-421.
23. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol* 2009;27:1578-67.
24. Bielecki TM, Gazdzik TS, Arendt J, et al. Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances: An in vitro study. *J Bone Joint Surg* 2007;89-B:417-20.
25. Zalavras CG, Patzakis MJ, Holton P. Local antibiotic therapy in the treatment of open fractures and osteomyelitis. *Clin Orthop* 2004;427:86-93.
26. Sause WE, Buckley PT, Strohl WR, et al. Antibody-Based biologics and their promise to combat staphylococcus aureus infections. *Trends Pharmacol Sci* 2016;37:231-41.
27. Jabra-Rizk MA, Kong EF, Tsui C, et al. Candida albicans pathogenesis: fitting within the host-microbe damage response framework. *Infect Immun* 2016;84:2724-39.
28. Marsh PD, Zaura E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *J Clin Periodontol* 2017;44:S12-22.
29. Tan Y-Q, Yeaman MR, Selsted ME. Antimicrobial Peptides from Human Platelets. *Infect Immun* 2002;70:6524-33.
30. El-Sharkawy H, Kantarci A, Deady J, et al. Platelet-rich plasma: Growth factors and pro- and anti-inflammatory properties. *J Periodontol* 2007;78:661-9.
31. Yajamanya SR, Chatterjee A, Babu CN, Karunanithi D. Fibrin network pattern changes of platelet-rich fibrin in young versus old age group of individuals: A cell block cytology study. *J Indian Soc Periodontol* 2016;20:151-6.
32. El Bagdadi K, Kubesch A, Yu X, et al. Reduction of relative centrifugal forces increases growth factor release within solid platelet-rich-fibrin (PRF)- based matrices: a proof of concept of LSCC (low speed centrifugation concept). *Eur J Trauma Emerg Surg* 2017; doi: 10.1007/s00068-017-0785-7. [Epub ahead of print]

33. Castro AB, Meschi N, Temmerman A, et al. Regenerative potential of leucocyte- and platelet-rich fibrin. Part B: sinus floor elevation, alveolar ridge preservation, and implant therapy. A systematic review. *J Clin Periodontol* 2017;44: 225-34.
34. Moraschini V, dos Santos Porto Barboza E. Use of platelet-rich fibrin membrane in the treatment of gingival recession: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol* 2016;87:281-90.
35. Del Corso M, Vervelle A, Simonpieri A, et al. Current Knowledge and Perspectives for the Use of Platelet- Rich Plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 1: periodontal and dentoalveolar surgery. *Curr Pharmaceut Biotechnol* 2012;13:1207-30.